Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Förderkennzeichen: 01EW2212

Teil I – Kurzbericht

Der Fokus des Projekts liegt auf dem Joubert-Syndrom (JS), einer neurologischen Entwicklungsstörung, die durch eine Ziliopathie bedingt ist und als paradigmatisches Beispiel für diese Form der Störung gilt. Die vorliegende Erkrankung ist durch einen neurologischen Kernphänotyp gekennzeichnet, der sich durch eine Reihe von Symptomen äußert, darunter neonatale Hypotonie und Atemstörungen, Entwicklungsverzögerungen, abnormale Augenbewegungen, Ataxie und geistige Behinderung. Bei allen JS-Patienten konnte eine charakteristische Fehlbildung des Kleinhirns und des Hirnstamms festgestellt werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen, durch die eine Ziliardysfunktion zu einer solchen neurologischen Entwicklungsstörung führt, sind bisher noch nicht vollständig erforscht, und derzeit gibt es keine wirksamen Behandlungsmethoden.

Wie andere Ziliopathien ist auch das JS genetisch und klinisch heterogen. Es sind mehr als 40 ursächliche Ziliargene bekannt, die zu einem Spektrum von Phänotypen unterschiedlicher Schwere führen. Darüber hinaus können unterschiedliche Missense-Varianten innerhalb desselben Gens zu divergierenden Auswirkungen auf das zentrale Nervensystem (ZNS) führen, was die Genotyp-Phänotyp-Korrelationen weiter verkompliziert.

Ein signifikanter Anteil der untersuchten Patienten weist Missense-Varianten auf, die gemäß der geltenden Klassifizierungskriterien als "Varianten von unbekannter Bedeutung" (VUS) eingestuft werden. Die Pathogenität dieser Varianten kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht bestimmt werden. Die mangelnde Kompetenz zur funktionellen Interpretation solcher Varianten stellt ein signifikantes Hindernis für die Bereiche der genetischen Beratung und der Pränataldiagnostik dar. Daher besteht ein dringender Bedarf an der Entwicklung systematischer und semi-hochdurchsatzfähiger Assays zur Bewertung der funktionellen Auswirkungen von VUS im Zusammenhang mit neurologischen Entwicklungsstörungen.

Um die Mechanismen von JS zu verstehen, ist es unerlässlich, die Auswirkungen von Mutationen der vier wichtigsten JS-Gene (CC2D2A, CEP290, RPGRIP1L und TMEM67) auf die molekularen Mechanismen dieser Erkrankung zu ermitteln. Darüber hinaus ist es von entscheidender Bedeutung, ihre Rolle bei der Fehlfunktion primärer Zilien in der embryonalen und adulten Neurogenese aufzuklären, einem Bereich, der bislang noch weitgehend unerforscht ist.

Die vorliegende Studie präsentiert eine Methodik, die darauf abzielt, bislang unbekannte Einblicke in die Funktion und Dysfunktion der Zilien während der Entwicklung des Zentralnervensystems zu erlangen. Die Methodik basiert auf einer großen Anzahl von Patientenmutationen, einer umfassenden Phänotypisierung von aus Patienten gewonnenen Zellen, embryonalen Stammzellen der Maus und zwei Tiermodellen (*C. elegans* und *D. rerio*), der umfangreichen SYSCILIA-Datenbank und dem Screening von Wirkstoffverbindungen. Die Untersuchung von hirnspezifischen Funktionsstörungen erfolgt durch die funktionelle Interpretation von Varianten (mit besonderem Schwerpunkt auf VUS) in Abhängigkeit vom neuronalen Kontext. Diese mehrstufige Analyse ermöglicht ein tiefgreifendes Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Korrelationen und unterstützt langfristig eine individualisierte Diagnose und Prognose. Die gewonnenen Erkenntnisse werden dazu beitragen, pharmakologische Eingriffe in die krankheitsauslösenden Signalwege des Gehirns zu erleichtern. Unter optimalen Voraussetzungen können daraus rationale Ansatzpunkte für die Behandlung abgeleitet werden.

Das Projekt hat drei Hauptziele. Primär soll ein tiefgreifender Einblick in die Funktionsweise primärer Zilien im Zusammenhang mit der Entwicklung des Zentralnervensystems, der Krankheitsätiologie und den Zilienprotein-/Gennetzwerken über eine Reihe von zunehmenden Ebenen der Zellkomplexität gewonnen werden. Die hier dargestellten Komplexitätsstufen erstrecken sich von kultivierten Zelllinien über aus iPSC gewonnene Astrozyten/Organoide bis hin zu spezifischen Geweben aus Tiermodellen. Zweitens müssen neue Ansätze für die funktionelle Interpretation von Varianten (insbesondere VUS) bereitgestellt werden, um die Diagnose und das Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu verbessern. Das Ziel besteht schließlich darin, Verbindungen und wiederverwendbare Medikamente zu identifizieren, die JS-assoziierte neurologische Entwicklungsphänotypen sowohl in vitro als auch in vivo lindern können.

Hinsichtlich der Ziele eins und zwei ist es uns gelungen, N-terminal und C-terminal Strep/Flag-markierte DNA-Konstrukte zu erzeugen, die eines der vier ausgewählten Gene (CC2D2A, CEP290, RPGRIP1L und TMEM67) enthalten. Im Anschluss daran wurden die Varianten der Patienten eingeführt, die von den Projektpartnern aus Italien und Frankreich für weitere Untersuchungen ausgewählt worden waren. Insgesamt wurden 48 Mutationen eingeführt, und alle diese Konstrukte wurden anschließend in der HEK293-Zelllinie zum Zweck der Massenspektrometrieanalyse stabil exprimiert. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung von CEP290 wurden die Protein-Protein-Interaktionsmuster von acht Patientenvarianten einer detaillierten Analyse unterzogen, um signifikante Unterschiede zum Wildtyp zu identifizieren. Die Varianten der Gene RPGRIP1L und CC2D2A wurden jeweils bei einer Anzahl von 12 bzw. 15 Patientenvarianten analysiert. Darüber hinaus wurden zwei Mutationen für RPGRIP1L in Hirngewebe von Mäusen untersucht. Die eingehende Analyse ergab eine umfangreiche Liste von Interaktomveränderungen dieser drei Proteine, die spezifische Veränderungen für jede Variante, aber auch Überschneidungen zwischen verschiedenen Varianten enthält. Die Analyse ergab, dass die untersuchten Varianten wie erwartet zu einem Verlust mehrerer Proteininteraktionen führten. Einige Proteininteraktionen wiesen jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine Funktionssteigerung auf. Die vorliegende Untersuchung ergab, dass die betreffenden Proteine in geringer Konzentration exprimiert wurden und sich in einem bestimmten, hochdichten Ziliar-Subkompartiment lokalisierten. Daher bestand die Notwendigkeit, die Methodik zur Probenvorbereitung zu optimieren. Die Implementierung dieses neuen Standards hat die Analyse dieser Mutationen erleichtert und somit die Erstellung eines umfassenden Wildtyp-CEP290-, RPGRIP1L- und CC2D2A-Protein-Interaktionsnetzwerks mit hoher statistischer Aussagekraft ermöglicht. Dieses Netzwerk hat sowohl bereits beschriebene als auch völlig neue Proteininteraktionen aufgezeigt. Das in diesem Projekt präsentierte Wildtyp-Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk fungiert als eine Art Gerüst, das den Rahmen für das Verständnis der Zusammensetzung, Funktion und Regulation der ziliären Transitionszone bildet.

In Kooperation mit dem Projektpartner aus Italien wurde eine umfassende Analyse des Genotyps der Patienten durchgeführt, wobei der Fokus auf dem Zusammenhang mit Veränderungen der Protein-Protein-Interaktionsmuster und dem beobachteten Phänotyp bei diesen JS-Patienten lag. In der Folge stellte Italien eine umfassende Liste von Patienten aus seinen Kliniken zur Verfügung. Die vorliegende Liste zielt darauf ab, für jeden Patienten die spezifische Mutation zu ermitteln, die als Ursache für JS identifiziert wurde, sowie eine Übersicht der beobachteten Symptome zu erfassen. Die vorliegende Korrelation verbindet spezifische Symptome mit bestimmten Veränderungen im Protein-Protein-Interaktionsmuster.

Im Rahmen des Projekts wurden zudem stabile DNA-Konstrukte für CEP290, CC2D2A, RPGRIP1L und TMEM67 erstellt, die die miniTurbo-Biotin-Ligase enthielten. Die vorliegende Studie zielte

auch darauf ab, verbesserte Techniken der Probenvorbereitung und der Massenspektrometrie in Kombination mit Proximity-Labeling zu entwickeln, um die Identifizierung vorübergehender Proteininteraktionen zu optimieren. Dieser Ansatz resultierte in einem CC2D2A-Wildtyp-Interaktom, das mit unseren anderen erzielten Ergebnissen vergleichbar ist. Zudem ist besonders bemerkenswert, dass CC2D2A und damit wahrscheinlich auch die TZ in hohem Maße an den Signal- und Transportwegen der Zilien beteiligt sind.

Darüber hinaus wurden Knockout-Zelllinien für CEP290, CC2D2A, RPGRIP1L und TMEM67 erzeugt. In zukünftigen Projekten werden diese Zelllinien für die Validierung von Interaktomveränderungen mittels Lokalisierungsstudien herangezogen.

Für die Projektpartner aus Frankreich und Ungarn wurde eine Analyse der unterschiedlichen Proteinzusammensetzung von Astrozyten mit verschiedenen RPGRIP1L-Mutationen sowie von Kleinhirn- und Rückenmark-Organoiden durchgeführt.

Die Ergebnisse dieses Projekts sollen in Zusammenarbeit mit allen Projektpartnern durch die Erstellung mehrerer Publikationen finalisiert werden.

Teil II – Eingehende Darstellung

Die primären Ziele des Projekts bestanden in der Erlangung tiefgreifender Einblicke in die Funktionsweise primärer Zilien im Zusammenhang mit der Entwicklung des Zentralnervensystems (ZNS) und der Ätiologie des Joubert-Syndroms (JS). Die Erreichung dieses Ziels wurde durch die Erstellung unterschiedlicher Zilienprotein-/Gennetzwerke über eine Reihe von zunehmenden Zellkomplexitätsstufen hinweg realisiert. Darüber hinaus ist es von essentieller Bedeutung, die funktionelle Interpretation von Varianten (insbesondere VUS) fortzuführen, um die Diagnosestellung zu optimieren und das Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu fördern.

Die Untersuchung der Proteinfunktion sowie die Aufdeckung ihrer Beteiligung an ziliären Prozessen und JS-Krankheitsmechanismen basierte zunächst auf der Erstellung von DNA-Konstrukten, die eines der vier ausgewählten Gene (CC2D2A, CEP290, RPGRIP1L und TMEM67) enthalten und entweder N- oder C-terminal zum Ziel-Gen einen Strep/Flag-Tag aufweisen (siehe Tabelle 1).

Table 1: Erstellte DNA-Konstrukte *– Diese Tabelle enthält alle generierten N-SF- und C-SF-DNA-Konstrukte für die ausgewählten Gene (CC2D2A, CEP290, RPGRIP1L und TMEM67) sowie die für die Klonierungsverfahren erforderlichen Ausgangsklone.*

Gene	Entry Clone	N-SF	C-SF
CC2D2A	✓	✓	✓
CEP290	✓	✓	✓
RPGRIP1L	✓	✓	✓
TMEM67	✓	✓	✓

Der nächste Schritt bestand in der Validierung dieser Konstrukte, um deren Anwendbarkeit für Interaktomstudien zu überprüfen. Um das angestrebte Resultat zu erreichen, ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Plasmide eine adäquate Transfektionsresistenz aufweisen, um eine Fragmentierung zu verhindern, und dass die transfizierten Zellen die Fähigkeit besitzen, das gewünschte Protein zu exprimieren. Daher wurden HEK293T-Zellen temporär mit N- oder C-terminal Strep/Flag-markierten Expressionskonstrukten transfiziert. Die Zellen wurden in einem ersten Schritt serumfrei gehalten, um das Zilienwachstum zu stimulieren. In einem zweiten Schritt wurden die

Zellen lysiert und für Western Blotting verwendet (siehe Abbildung 1). Die HEK293T-Zelllinie wurde aufgrund ihrer Fähigkeit, primäre Zilien zu bilden, ihrer hohen Proteinexpression und ihrer Eignung für eine effiziente Transfektion als geeignetes Subjekt für die Studie ausgewählt.

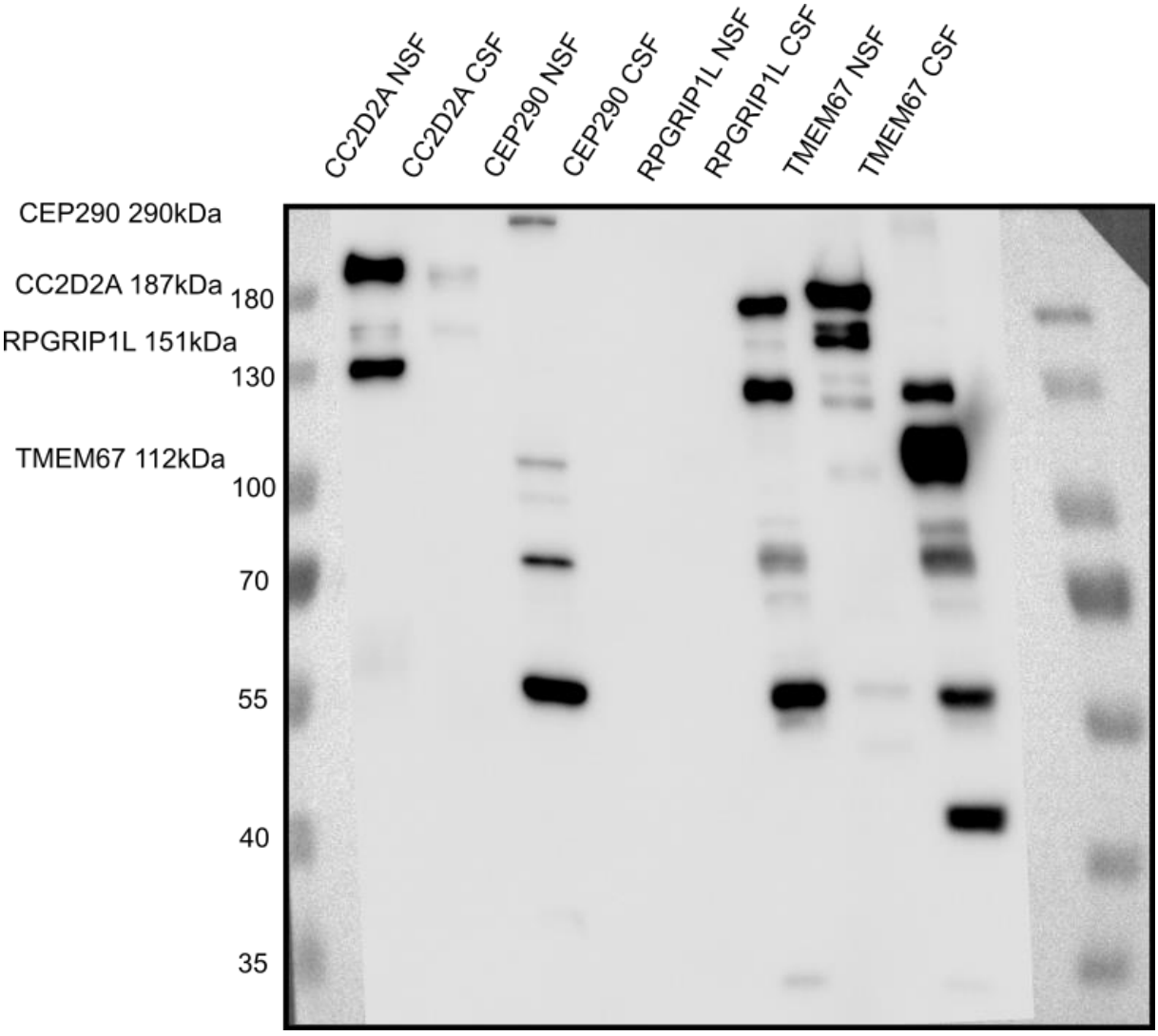

Figure 1: Validierung der generierten DNA-Konstrukte für Western Blot *– In HEK293T-Zellen wurde der Proteingehalt aller erzeugten N-SF- und C-SF-Expressionskonstrukte mittels Western Blot überprüft.*

Folglich wurden die N-SF-Konstrukte für CC2D2A, CEP290 und RPGRIP1L sowie die C-SF-Konstrukte für RPGRIP1L und TMEM67 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die übrigen Konstrukte zeigten entweder keine Bande in der richtigen Größe oder überhaupt keine Bande.

Neue interagierende Proteine, die bei Überexpression von RPGRIP1L entdeckt wurden

Vor einer detaillierten Untersuchung der Protein-Protein-Wechselwirkungen in den Ziel JS-Proteinen und anschließend der Mutationen bei Patienten ist es unerlässlich, zunächst den Versuchsaufbau in HEK293T-Zelllinien, die das Protein überexprimieren, als Vorversuch zu validieren. Dies ist eine notwendige Voraussetzung, um festzustellen, ob das Ziel-Protein nachgewiesen werden kann und ob bereits veröffentlichte Protein-Interaktoren identifiziert werden können. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden HEK293T-Zellen temporär mit N- oder C-terminal Strep/Flag-markierten Konstrukten transfiziert, die die Expression eines der vier Ziel-Proteine induzieren. Zur Veranschaulichung wurde Wildtyp-N-SF RPGRIP1L verwendet, wobei N-SF RAF1 als Kontrolle diente.

Die Bildung von Zilien wurde in transient transfizierten Zellen durch einen Starvation Prozess gefördert. Im Anschluss wurden eine Reihe von Folgeverfahren durchgeführt, darunter Zelllyse, Flag-Beads-vermittelte Immunpräzipitation, Proteindigestion, Peptidaufreinigung und MS-Analyse. Die Analyse der MS/MS-Datensätze erfolgte unter Verwendung von MaxQuant 1.6.1.0. Die Identifizierung der Proteine erfolgte anhand der SwissProt-Datenbank, und eine statistische Analyse wurde mit Perseus durchgeführt. Im Rahmen der statistischen Analyse wurden sechs biologische Replikate verwendet, die zuvor anhand von mindestens vier validen Werten filtriert wurden. Um statistisch signifikante Interaktoren aufzudecken, wurden ein ungepaarter Student-t-Test für zwei Stichproben (permutationsbasierte FDR < 0,05) und ein Ausreißertest (Signifikanz A, Benjamini-Hochberg-FDR < 0,05) durchgeführt. Die Identifizierung neuer RPGRIP1L-Interaktoren erfolgte durch die Analyse von Proteinen in den Wildtyp-RPGRIP1L-Proben anhand der Kontrolle (RAF1). Die Ergebnisse der Massenspektrometrieanalyse ergaben die Präsenz von 78 statistisch signifikanten (FDR < 0,05, Sig. A < 0,05) RPGRIP1L-Interaktoren in den überexprimierenden Zellen. Die Abbildung veranschaulicht die Kategorisierung dieser Interaktionen, wobei das Ausgangsprotein (blau), bekannte Interaktoren (grün) und ausgewählte neue Interaktoren (magenta) dargestellt sind (siehe Abbildung 2). Die letztgenannte Kategorie wurde aufgrund ihrer für Zilien und/oder JS relevanten Funktionalität selektiert. Eine Auswahl statistisch signifikanter Interaktoren ist in Tabelle 2 zu finden.

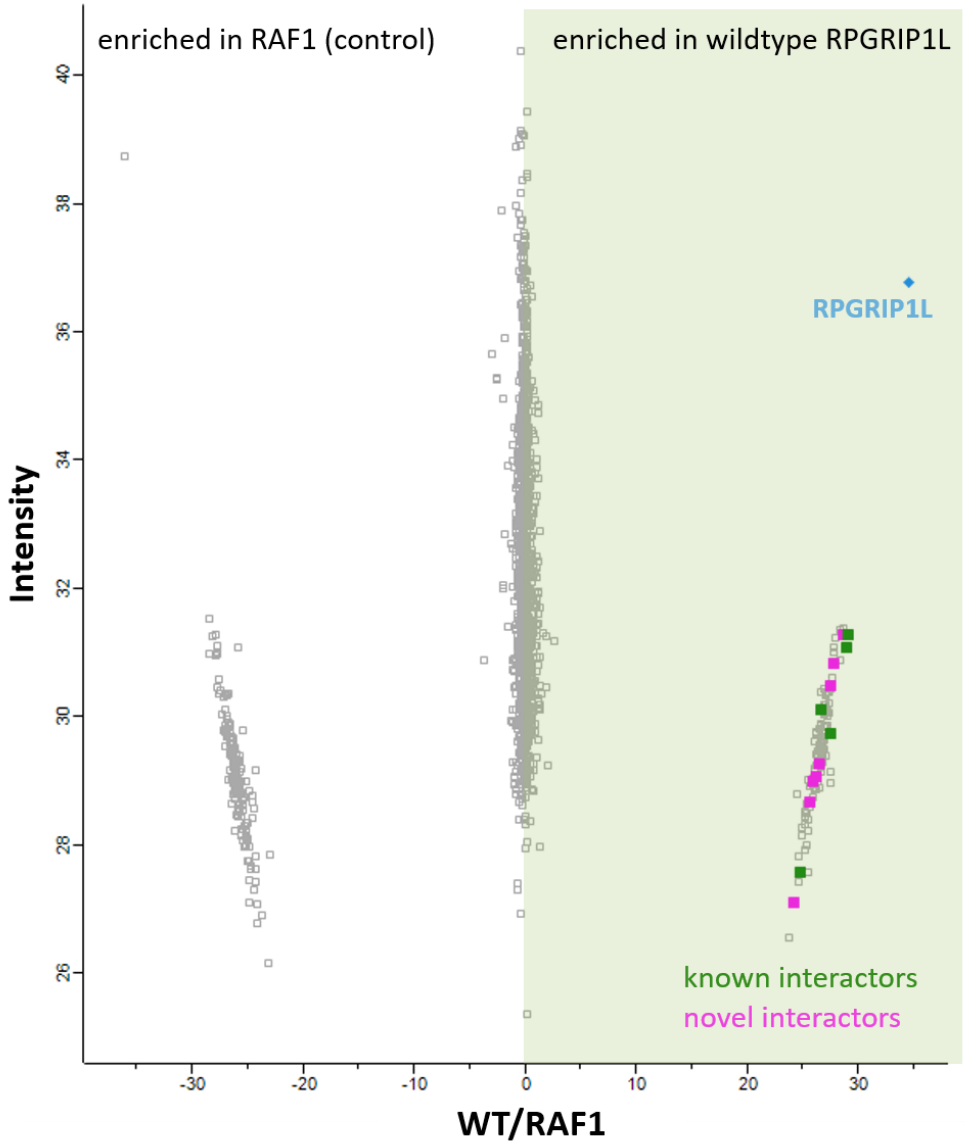

Figure 2: Wildtyp Interaktom von überexprimiertem RPGRIP1L *- Im Rahmen der Immunpräzipitation wurden HEK293T-Zellen vorübergehend entweder mit Strep/Flag-markiertem RPGRIP1L oder Strep/Flag-markiertem RAF1 als Kontrolle transfiziert. Die x-Achse stellt das log_2-Verhältnis der Proteinhäufigkeit in den Wildtyp-Proben (WT) gegenüber der Kontrolle (RAF1) dar, während die y-Achse die gemessene log_2-Intensität darstellt. Das als "RPGRIP1L" bezeichnete Ausgangsprotein ist in der Farbgebung Blau dargestellt. Die Darstellung bekannter RPGRIP1L-Interaktoren erfolgt in grüner Farbe. Interessante Interaktoren, die aufgrund ihrer Funktionalität für Zilien und/oder JS ausgewählt wurden, sind in magenta dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass alle Interaktoren statistisch signifikant waren (FDR < 0,05, Sig. A < 0,05).*

Table 2: Wildtyp Interaktoren von überexprimiertem RPGRIP1L *– Im Rahmen der Immunpräzipitation wurden HEK293T-Zellen vorübergehend entweder mit Strep/Flag-markiertem RPGRIP1L oder Strep/Flag-markiertem RAF1 als Kontrolle transfiziert. Die Tabelle präsentiert die Proteinnamen der identifizierten Interaktoren sowie RPGRIP1L als Referenz (blau) mit ihren medianen p-Werten und Verhältnissen von sechs biologischen Replikaten. Proteine, die bereits bekannt sind, werden durch eine grüne Hervorhebung gekennzeichnet, während bisher unbekannte Proteininteraktoren weiß dargestellt werden. Die Proteine, die in der vorliegenden Untersuchung präsentiert wurden, wiesen im Vergleich zu RAF1 eine signifikante Anreicherung im Wildtyp-RPGRIP1L (WT) auf (Signifikanz A < 0,05, permutationsbasierte FDR < 0,05).*

Protein	WT/RAF1	p-value
RPGRIP1L	34.66	4.023E-19
TRIM37	24.83	0.0199962
NEK4	29.20	4.033E-14
PCM1	27.52	8.452E-17
NPHP4	29.00	5.51E-13
CHTOP	26.65	0.0339062
NARS	27.86	0.0197401
CTNND1	26.28	0.0340421
STMN1	28.73	0.0016309
MARCKSL1	25.98	0.020024
RAB10	25.73	0.0310411
RHOA	27.50	0.0310362
DPYSL2	26.57	0.0322711
LNP	24.29	0.0199856

Die Ergebnisse der Untersuchung legen nahe, dass der hier beschriebene Ansatz zur Analyse der Wechselwirkungen des Wildtyp-Proteins RPGRIP1L genutzt werden kann, wodurch die Erstellung eines detaillierten RPGRIP1L-Netzwerks erleichtert wird. Es ist jedoch zu beachten, dass eine starke Überexpression zu erhöhten RPGRIP1L-Proteinkonzentrationen in den Zellen führen kann. Dies kann die komplexe Stöchiometrie verändern, physiologische Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinträchtigen und die Aufklärung des physiologischen Interaktoms von RPGRIP1L behindern.

Im darauffolgenden Schritt wurde eine stabile Transfektion der Zellen mit dem Konstrukt von Interesse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden HEK293-Zellen entweder mit einem N-SF/C-SF-Wildtyp-Plasmid oder einem Plasmid transfiziert, das eine vom Patienten stammende Mutation enthält, die durch ortsspezifische Mutagenese eingeführt wurde (siehe Abbildung 3). Im Anschluss wurden die Zellen einer positiven Selektion unterzogen,

wobei ein Antibiotikum (G418, ein Neomycin-Analogon) zum Einsatz kam. Es konnte nachgewiesen werden, dass, da der Vektor ein Neomycin-Resistenzgen trug, nur Zellen überlebten, die die Vektorsequenz stabil in ihr Genom integriert hatten. In Bezug auf diese stabilen Zelllinien wird das Ziel-Gen im Vergleich zur transienten Expression auf einem signifikant niedrigeren Niveau exprimiert. Diese Eigenschaft hat das Potenzial, ein Interaktom zu erzeugen, das eher den physiologischen Niveaus entspricht.

CEP290-NSF		RPGRIP1L-NSF		CC2D2A-NSF		TMEM67-CSF	
mutation	**cell line**	**mutation**	**cell line**	**mutation**	**cell line**	**mutation**	**cell line**
I5T	✓	R251X	✓	W581S	✓	N90K	✓
W7C	✓	Q550R	✓	V728F	✓	N242S	✓
H50Y	✓	A560V	✓	D788H	✓	M252T	✓
Q819L	✓	R602X	✓	R950X	✓	D301E	✓
E1568D	✓	T615P	✓	E1000V	✓	Y513C	✓
E1572K	✓	T677I	✓	P1122S	✓	V536D	✓
R1926P	✓	Q684X	✓	R1284C	✓	R549C	✓
Q2350K	✓	A695P	✓	R1330Q	✓	C615R	✓
		Y817X	✓	I1409T	✓	L696F	✓
		R1177X	✓	V1430A	✓	H782R	✓
		V1188M	✓	E1447A	✓	R820S	✓
		R1236C	✓	P1449T	✓	G821S	✓
				W1462R	✓	I833T	✓
				D1556V	✓		
				Y1557N	✓		

Figure 3: Generierte stabile Zelllinien *– Diese Abbildung zeigt alle generierten stabilen Zelllinien, die Strep/Flag-markierte Gene von Interesse (CC2D2A, CEP290, RPGRIP1L und TMEM67) exprimieren und spezifische Mutationen von Patienten aufweisen.*

Neue interagierende Proteine, die bei stabiler RPGRIP1L-Expression entdeckt wurden

Nach Durchführung vorläufiger Validierungstests und der Erzeugung stabiler Zelllinien, die eine spezifische, vom Patienten stammende Mutation aufweisen, wurde der Versuchsaufbau modifiziert. Zur Veranschaulichung wurde erneut RPGRIP1L ausgewählt. Für die Zelllyse, Affinitätsaufreinigung, Proteindigestion, Proteinreinigung und MS-Analyse wurden sechs biologische Replikate jeder Probengruppe (N-SF RAF1 und N-SF RPGRIP1L Wildtyp) vorbereitet. Das Zelllyseprotokoll wurde dahingehend modifiziert, dass ein zusätzlicher Ultraschallschritt implementiert wurde, mit dem Ziel, die Solubilisierung von Proteinen zu gewährleisten, die in der dicht gepackten Übergangszone und in membrangebundenen Fraktionen detektiert wurden. Darüber hinaus wurden die in diesem Experiment verwendeten MS/MS-Datensätze mit einer datenunabhängigen Erfassungsmethode (DIA-NN) analysiert. DIA-NN setzt weitreichende neuronale Netzwerke ein, um die Trennung zwischen echten Signalen und Hintergrundrauschen zu verbessern, die Quantifizierung sowie Strategien zur Interferenzkorrektur zu optimieren. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass datenunabhängige Erfassungsmethoden dazu in der Lage sind, alle Ionen innerhalb eines bestimmten Massenbereichs zu fragmentieren und zu analysieren. Dies umfasst auch Proteine mit geringer Häufigkeit, die bei datenabhängigen Erfassungsmethoden möglicherweise übersehen werden. Im Vergleich zu DDA hat sich diese Methode als empfindlicher erwiesen und liefert somit präzisere und umfassendere Ergebnisse. Die Identifizierung der Proteine erfolgte anhand einer UniProt-Datenbank, und mittels Perseus wurde eine Filterung vorgenommen. Für die statistische Analyse wurden ausschließlich Proteine berücksichtigt, die in mindestens vier von sechs Replikaten nachgewiesen wurden. Um statistisch signifikante Interaktoren zu ermitteln, wurden ein ungepaarter Student-t-Test für zwei Stichproben (permutationsbasierte FDR < 0,05) und ein Ausreißertest (Signifikanz A, Benjamini-Hochberg-FDR < 0,05) durchgeführt.

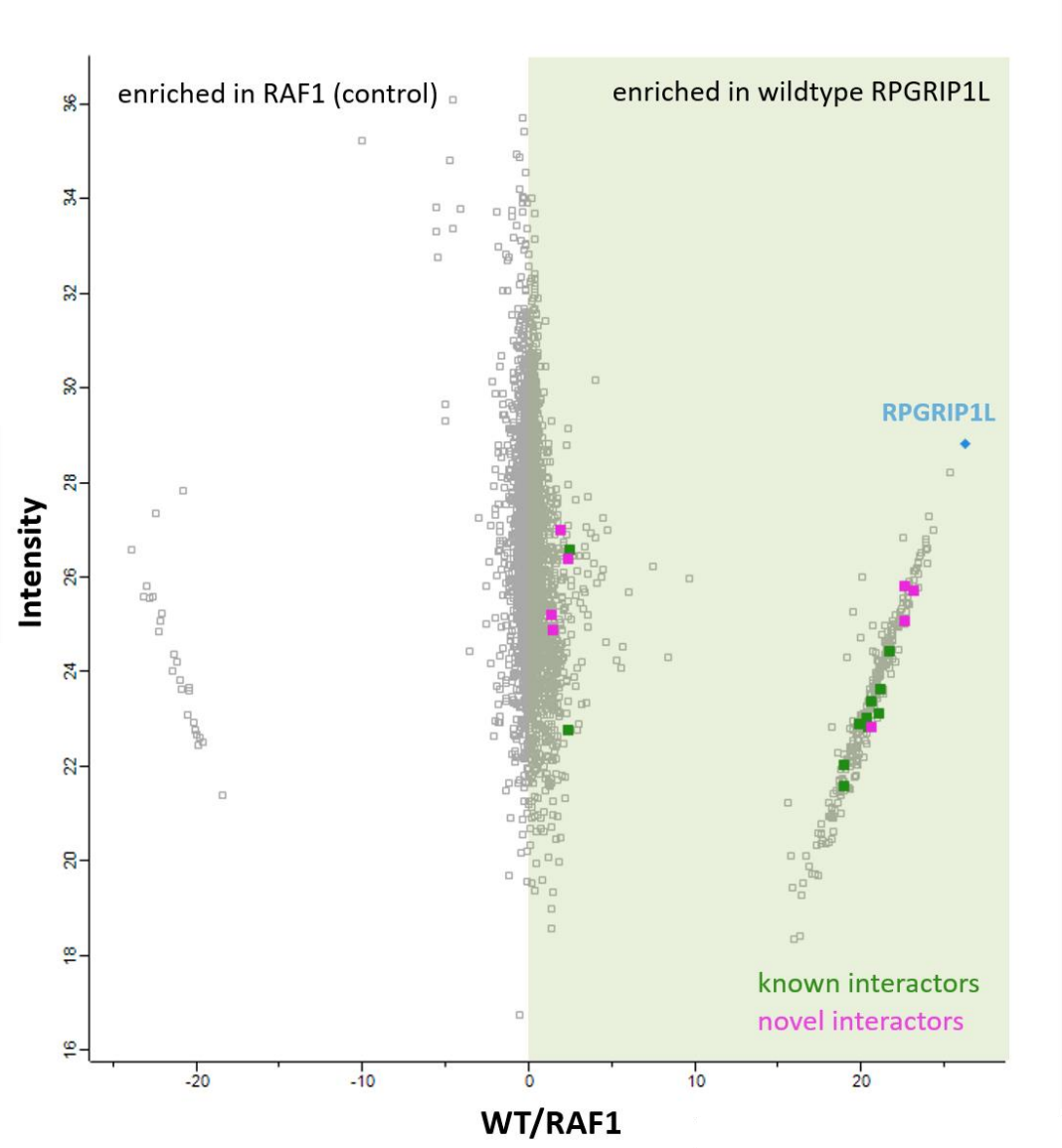

Figure 4: Wildtyp Interaktom von stabil exprimiertem RPGRIP1L *- Im Rahmen der Affinitätsreinigung wurden stabile HEK293-Zellen eingesetzt, die entweder mit Strep/Flag-markiertem RPGRIP1L oder Strep/Flag-markiertem RAF1 als Kontrolle transfiziert wurden. Die x-Achse stellt das log_2-Verhältnis der Proteinhäufigkeit in den Wildtyp-Proben (WT) gegenüber der Kontrolle (RAF1) dar, während die y-Achse die gemessene log_2-Intensität darstellt. Das als "RPGRIP1L" bezeichnete Ausgangsprotein ist in der Farbgebung Blau dargestellt. Die Darstellung bekannter RPGRIP1L-Interaktoren erfolgt in grüner Farbe. Proteine von Interesse, die sich durch ihre Funktionalität für Zilien und/oder JS auszeichnen, sind in magenta dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass alle Interaktoren statistisch signifikant waren (FDR < 0,05, Sig. A < 0,05).*

Im Anschluss an die Interaktomanalyse in den überexprimierenden Zellen wurden Proteine in den Wildtyp-RPGRIP1L-Proben aus den stabilen HEK293-Zelllinien gegen die Kontrolle (RAF1) analysiert. Die Ergebnisse der Massenspektrometrieanalyse ergaben 371 statistisch signifikante (FDR < 0,05, Sig. A < 0,05) RPGRIP1L-Interaktoren in den stabilen HEK293-Zelllinien. In Abbildung 4 werden das Ausgangsprotein (blau), bekannte Interaktoren (magenta) und ausgewählte Interaktoren (basierend auf ihrer für Zilien

und/oder JS relevanten Funktionalität; grün) dargestellt. Das als RPGRIP1L bezeichnete Ausgangsprotein wurde identifiziert und ist durch eine blaue Markierung gekennzeichnet. Die bereits bekannten und veröffentlichten Interaktoren (CCDC85C, NDC80, NPHP4, PCNT, NEK4, RAB5B, TMEM256, IFT74, RMDN3, HAUS8 und SPATS2L) sind in der Abbildung grün markiert. Neue Interaktoren von Interesse (NSFL1C, MINPP1, RAB12, ROCK1, EPHA7, TPGS1, IFT25, RAB18) sind entsprechend markiert. Alle Interaktoren statistisch signifikant waren (FDR < 0,05, Sig. A < 0,05) (siehe Tabelle 3).

Table 3: Wildtyp Interaktoren von stabil exprimiertem RPGRIP1L *– Im Rahmen der Affinitätsreinigung wurden stabile HEK293-Zellen eingesetzt, die entweder mit Strep/Flag-markiertem RPGRIP1L oder Strep/Flag-markiertem RAF1 als Kontrolle transfiziert wurden. Die Tabelle präsentiert die Proteinnamen der identifizierten Interaktoren sowie RPGRIP1L als Referenz (blau) mit ihren medianen p-Werten und Verhältnissen von sechs biologischen Replikaten. Proteine, die bereits bekannt sind, werden durch eine grüne Hervorhebung gekennzeichnet, während bisher unbekannte Proteininteraktoren weiß dargestellt werden. Die Proteine, die in der Analyse berücksichtigt wurden, wiesen im Vergleich zu RAF1 eine signifikante Anreicherung im Wildtyp-RPGRIP1L (WT) auf (Signifikanz A < 0,05, permutationsbasierte FDR < 0,05).*

Protein	WT/RAF1	p-value
RPGRIP1L	26.23	7.29E-18
HAUS8	21.05	0.00506
IFT74	21.71	0.039498
NDC80	2.50	0.042904
NEK4	19.01	0.008036
NPHP4	21.18	0.00027
PCNT	20.31	0.010403
RAB5B	2.354	0.016943
RMDN3	20.41	0.038736
CCDC85C	19.89	0.004567
SPATS2L	19.00	0.045766
TMEM256	20.65	0.045884
NSFL1C	1.91	0.003951
MINPP1	22.62	0.000269
RAB12	1.382	0.025513
ROCK1	23.12	1.18E-21
EPHA7	22.66	0.003107
TPGS1	20.64	0.005063
IFT25	1.48	0.027579
RAB18	2.40	0.012019

Ein erheblicher Anteil der statistisch signifikanten (FDR < 0,05, Sig. A < 0,05) RPGRIP1L-Interaktoren stand in Zusammenhang mit spezifischen Zilienfunktionen. Insgesamt waren 21 Proteine an der Zilienbildung beteiligt, 11 am intraflagellären Transport, 6 an der ziliären Übergangszone und 19 an der Funktion des Basalkörpers oder Zentrosoms. Es ist offensichtlich, dass eine Reihe von Proteinen an Signalprozessen beteiligt sind, darunter

Mitglieder der Wnt- (28 Proteine), Notch- (25 Proteine), Sonic Hedgehog- (Shh, 13 Proteine) und MTOR- (7 Proteine) Signalwege. Darüber hinaus steht ein erheblicher Anteil der Proteine in Zusammenhang mit dem Zellzyklus (63 Proteine) oder dem Membrantransport (43 Proteine; siehe Abbildung 5).

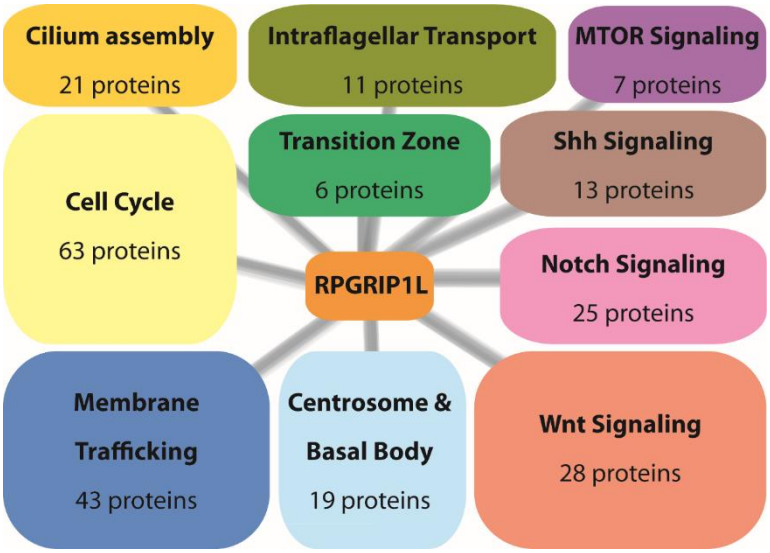

Figure 5: Resultate der RPGRIP1L wt Interaktom-Analyse *– Die statistisch signifikanten Interaktoren (FDR < 0,05, Sig. A < 0,05), die in den RPGRIP1L-Interaktomstudien identifiziert wurden, wurden entsprechend ihrer Zilienfunktion oder den Signalwegen, an denen sie beteiligt sind, gruppiert.*

Die vom Patienten stammenden RPGRIP1L-Mutationen R251X und Q550R verändern die spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen von RPGRIP1L

Eine eingehende Analyse der von Patienten stammenden Mutationen, welche Protein-Protein-Wechselwirkungen modifizieren, erweist sich als essentiell, um das Verständnis der regulatorischen Funktion von RPGRIP1L sowie der Auswirkungen von JS-Patientenmutationen auf die Proteinfunktionalität zu vertiefen. Darüber hinaus erleichtert sie die Korrelation von Symptomen nicht nur mit einem bestimmten Genotyp, sondern auch mit einem bestimmten RPGRIP1L-interagierenden Protein, das von dieser spezifischen Mutation beeinflusst wurde.

Zur Erreichung dieses Ziels wurde das Interaktom in einer physiologischen Umgebung (stabile Zelllinien) analysiert. Zur Veranschaulichung wurde ein Vergleich zwischen dem Wildtyp von RPGRIP1L und zwei verschiedenen Zuständen durchgeführt: einer verkürzten Mutation (R251X) und einer Missense-Mutation (Q550R). Die spezifischen Aminosäuren, die mutiert sind, sind in der RPGRIP1L-Proteinstruktur hervorgehoben (siehe Abbildung 6,

Panel 1). In HEK293-Zellen mit der R251X-Mutation ist RPGRIP1L aufgrund des Austauschs von Arginin (R) an Position 251 durch ein frühes Stopcodon (X) verkürzt. Die Pathogenität dieser Mutation bedarf im Patient einer weiteren Klassifizierung. Es konnte jedoch vorausgesagt werden, dass Mutationen con Arginin 251 typischerweise mit hoher Pathogenität assoziiert sind (siehe Abbildung 6, Panel 2). Im Zusammenhang mit RPGRIP1L-Q550R-mutierten Zellen wurde eine Substitution von Glutamin (Q) an Position 550 durch Arginin (R) beobachtet. Gemäß der Analyse von AlphaFold weist diese Variante einen Pathogenitätswert von 0,107 auf, was darauf hindeutet, dass sie als weniger pathogen eingestuft wird.

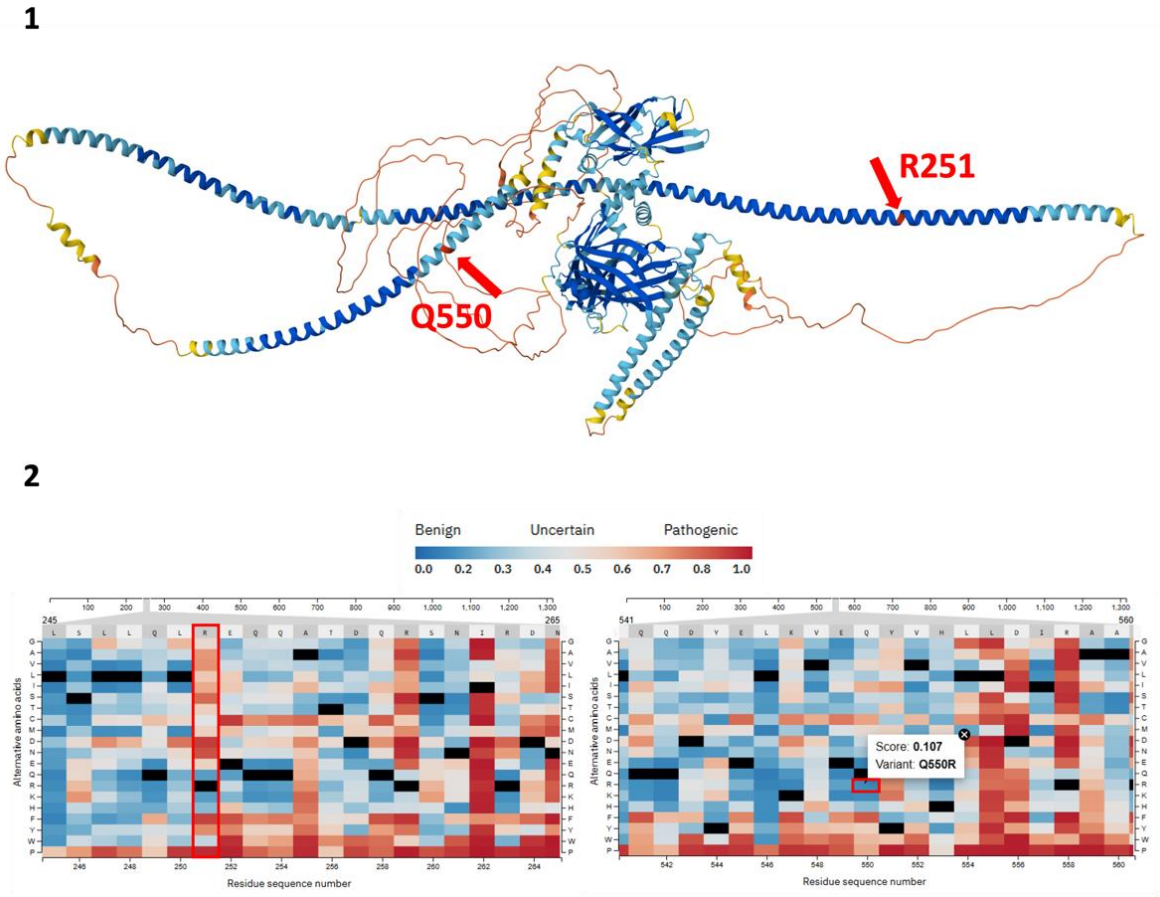

Figure 6: Analyse der JS Patientenmutationen in dieser Studie *- 1: Die Struktur des RPGRIP1L-Proteins ist dargestellt. Die Aminosäuren Q550 und R251 sind in der Proteinstruktur hervorgehoben und rot gefärbt. Die Darstellung der Bereiche mit sehr hoher Zuverlässigkeit erfolgt in dunkelblau. Diese Bereiche sind definiert als solche, die einen Rest-Zuverlässigkeitswert von pLDDT > 90 aufweisen. Bereiche mit hoher Konfidenz (90 > pLDDT > 70) werden in der Abbildung hellblau dargestellt, Bereiche mit geringer Konfidenz (70 > pLDDT > 50) in gelb und Bereiche mit sehr geringer Konfidenz (pLDDT < 50) in orange. In der vorliegenden Grafik werden die Pathogenität der Mutationen R251X (links) und Q550R (rechts) in Form farbiger Kästchen dargestellt. Die Grafik wurde unter Verwendung der Software AlphaFold erstellt.*

Im Anschluss an die detaillierte Analyse des Wildtyps von RPGRIP1L wurde eine Untersuchung der veränderten Protein-Protein-Wechselwirkungen in den mit dem Joubert-Syndrom assoziierten Patientenmutationen, nämlich RPGRIP1L R251X und Q550R, vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden zunächst RPGRIP1L-Wildtyp-Zellen gegen RAF1 als Kontrolle analysiert. Im Anschluss wurde der Versuch unternommen, die Veränderung der Interaktionsmuster in den Patientenmutationen R251X und Q550R aufzudecken. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Proben mit dem Wildtyp-Interaktom verglichen.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie ergaben 33 häufiger und 249 seltener vorkommende Interaktoren in N-SF RPGRIP1L R251X im Vergleich zum Wildtyp (alle statistisch signifikant, FDR < 0,05, Sig. A < 0,05). Die Proteine, die für die weitere Analyse ausgewählt wurden (basierend auf ihrer für Zilien und/oder JS relevanten Funktionalität), waren in den mutierten Proben weniger häufig vorhanden. Diese Beobachtung wurde als Indikator für eine reduzierte Interaktion mit interpretiert (siehe Abbildung 7 und Tabelle 4).

Table 4: RPGRIP1L Interaktoren mit verringerter Abundanz in R251X Patientenproben *- Im Rahmen der Affinitätsreinigung wurden stabile HEK293-Zellen eingesetzt, die entweder mit Strep/Flag-markiertem R251X-mutiertem RPGRIP1L oder Strep/Flag-markiertem Wildtyp-RPGRIP1L (WT) transfiziert waren. Die Tabelle präsentiert eine Übersicht der identifizierten Interaktoren, begleitet von ihren medianen p-Werten und Verhältnissen, die aus sechs biologischen Replikaten abgeleitet wurden. Es konnte festgestellt werden, dass sich alle aufgeführten Proteine im Vergleich zum R251X-Mutanten signifikant in WT RPGRIP1L angereichert haben (Signifikanz A < 0,05, permutationsbasierte FDR < 0,05).*

Vertraulich

Figure 7: R251X mutiertes RPGRIP1L Interaktom *- Im Rahmen der Affinitätsreinigung wurden stabile HEK293-Zellen eingesetzt, die entweder mit Strep/Flag-markiertem R251X-mutiertem RPGRIP1L oder Strep/Flag-markiertem Wildtyp-RPGRIP1L (WT) transfiziert wurden. Proteininteraktoren, die in den Wildtyp-RPGRIP1L-Zellen angereichert sind, sind in der Abbildung blau dargestellt. Die x-Achse stellt das log2-Verhältnis der Häufigkeit der Proteine in den mutierten Proben gegenüber dem Wildtyp dar, während die y-Achse die gemessene log2-Intensität repräsentiert. Proteine von Interesse werden in Magenta dargestellt. Das Ausgangsprotein ist in der Farbe Orange dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass alle Interaktoren statistisch signifikant waren (FDR < 0,05, Sig. A < 0,05).*

Vertraulich

Die Massenspektrometrieanalyse ergab, dass es in N-SF RPGRIP1L Q550R 91 häufiger und 255 seltener vorkommende Interaktoren gibt (alle statistisch signifikant (FDR < 0,05, Sig. A < 0,05)). Im Vergleich zum Wildtyp zeigt sich, dass es in N-SF RPGRIP1L Q550R mehr häufiger und weniger seltener vorkommende Interaktoren gibt. Ausgewählte Interaktoren

(basierend auf ihrer für Zilien und/oder JS relevanten Funktionalität) sind in Abbildung 8 und Tabelle 5 dargestellt.

Figure 8: Q550R mutiertes RPGRIP1L Interaktom *- Im Rahmen der Affinitätsreinigung wurden stabile HEK293-Zellen eingesetzt, die entweder mit Strep/Flag-markiertem Q550R-mutiertem RPGRIP1L oder Strep/Flag-markiertem Wildtyp-RPGRIP1L (WT) transfiziert wurden. Proteine, die in Wildtyp-RPGRIP1L-Zellen angereichert sind, sind in der Abbildung blau dargestellt. Die x-Achse stellt das log_2-Verhältnis der Häufigkeit der Proteine in den mutierten Proben gegenüber dem Wildtyp dar, während die y-Achse die gemessene log_2-Intensität repräsentiert. Proteine von Interesse werden in Magenta dargestellt. Das Ausgangsprotein sowie dessen Kerninteraktoren werden in der Farbe Orange dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass angereicherte Interaktoren statistisch signifikant waren (FDR < 0,05, Sig. A < 0,05), während verlorene Interaktoren den ungepaarten Student-t-Test bestanden (FDR < 0,05).*

Vertraulich

Table 5: RPGRIP1L Interaktoren mit verringerter Abundanz in Q550R Patientenproben *- Im Rahmen der Affinitätsreinigung wurden stabile HEK293-Zellen eingesetzt, die entweder mit Strep/Flag-markiertem Q550R-mutiertem RPGRIP1L oder Strep/Flag-markiertem Wildtyp-RPGRIP1L (WT) transfiziert waren. Die Tabelle präsentiert eine Übersicht der identifizierten Interaktoren, begleitet von ihren medianen p-Werten und Verhältnissen, die aus sechs biologischen Replikaten abgeleitet wurden. Es konnte eine signifikante Anreicherung aller aufgeführten Proteine im Vergleich zum Q550R-Mutanten festgestellt werden (Signifikanz A < 0,05, permutationsbasierte FDR < 0,05).*

Vertraulich

Die Mutationen RPGRIP1L R251X und Q550R wurden zuvor bei Patienten mit JS identifiziert. Die vorliegenden Mutationen wurden den Projektpartnern, Professor Enza Maria Valente und Dr. Fulvio D'Abrusco vom Institut für Molekulare Medizin der Universität Pavia, Italien, zusammen mit den entsprechenden Patienteninformationen zur Verfügung gestellt. Der Patient mit der R251X-Mutation wies okulomotorische Apraxie, axiale und limbische Hypotonie sowie das Molar-Tooth-Zeichen auf. Der Patient mit der Q550R-Mutation wies eine Reihe von klinischen Merkmalen auf, darunter Atemwegsanomalien, Ataxie, Hypotonie, geistige Behinderung, okulomotorische Apraxie, Nystagmus, Nierenbeckenerweiterung und das Molar-Tooth-Zeichen. Auf der Grundlage der beobachteten klinischen Manifestationen wurde eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation durchgeführt. Die Erreichung dieses Ziels wurde durch die Untersuchung der veränderten Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglicht, welche den zentralen Fokus dieses Projekts bildeten.

Die in diesem Projekt gesammelten Ergebnisse bestätigen somit den Einfluss der Mutationen R251X und Q550R auf das Interaktom von RPGRIP1L, wodurch

Veränderungen in den Protein-Protein-Wechselwirkungen verursacht werden, die möglicherweise zu einem gewebespezifischen Phänotyp führen.

Diese beiden Proteine könnten eine mögliche Verbindung darstellen, wie die Herzfunktion bei Patienten mit Joubert-Syndrom beeinträchtigt werden kann, und sollten auf jeden Fall Ziel zukünftiger Projekte sein.

Erzeugung und Validierung von Knockout-Zelllinien

Für die Validierung veränderter Protein-Protein-Interaktionen wurden Knockout-Zellen des retinalen Pigmentepithels (hTERT-RPE1 KO und ARPE19 KO) und HEK293-Knockout-Zellen unter Verwendung des CRISPR/Cas9 Systems erzeugt. Im Anschluss an die Transfektion der Zellen mit sgRNAs erfolgte die Selektion einzelner Klone sowie die DNA-Extraktion. Zur Erzeugung von CC2D2A-, CEP290-, RPGRIP1L- und TMEM67-Knockout-Zellen (KO) wurde eine Kombination aus drei spezifischen Guide-RNA-Sequenzen (sgRNA) verwendet, um gezielte Deletionen zu induzieren. Die Anwendung der Sanger-Sequenzierung führte zur Identifizierung von Deletionen in Verbindung mit einer Verschiebung des offenen Leserahmens und einem vorhergesagten frühen Stopcodon. Darüber hinaus wurde die Erzeugung von KO-Zelllinien durch die Verwendung einer Western-Blot-Analyse bestätigt. Obwohl die RPE1-Cas9#1-Kontrollbande eher schwach war, konnte dennoch ein signifikanter Unterschied zu den RPE1-KO-Banden festgestellt werden (siehe Abbildung 9). Nichtsdestotrotz war eine zweite Validierung erforderlich.

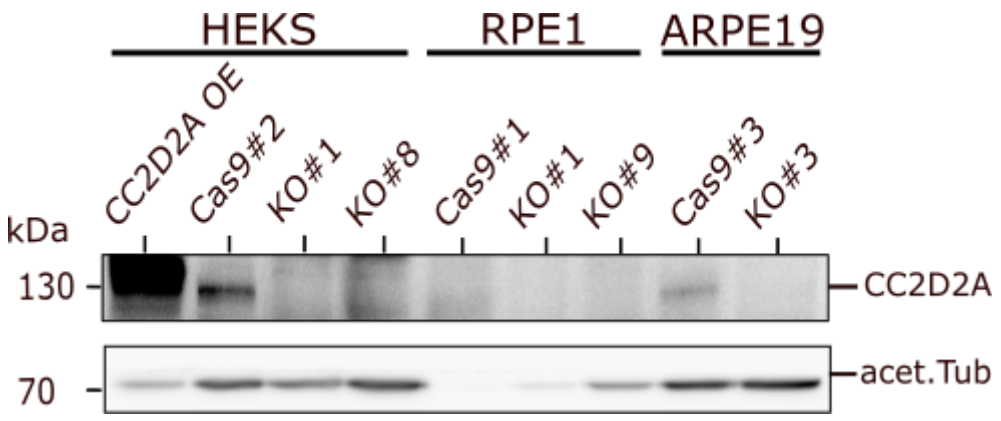

Figure 9: Protein Level von CC2D2A und acetyliertem Tubulin in CC2D2A Wildtyp und Knockout Zellen *– In HEK293-, hTERT-RPE1- und ARPE19-Kontroll- und Knockout-Zelllinien wurden die Proteinkonzentrationen von CC2D2A und acetyliertem Tubulin als Ladekontrolle mittels Western Blot überprüft.*

Im Rahmen der weiteren Validierung der generierten KO-Zelllinien, insbesondere der generierten hTERT-RPE1-KO-Zelllinie, sowie der Untersuchung eines möglichen Einflusses der Mutationen auf die CC2D2A-Lokalisierung wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Im Fokus der Untersuchung stand dabei die CC2D2A-Lokalisierung in Bezug auf das Zilium. Zu diesem Zweck wurde ARL13B, ein Zilienmarker, der in der Zilienmembran lokalisiert ist, für die Färbung verwendet, die in Magenta dargestellt sind. Das CC2D2A-Protein wurde in Grün dargestellt. Die Ko-Lokalisierung von CC2D2A und Zilien ist in der Übersicht weiß markiert. Es konnte beobachtet werden, dass CC2D2A in den wt-Zellen an der Basis des Ziliums lokalisiert ist, wo sich die Übergangszone befindet. In den CC2D2A-KO-Zellen war eine Unterscheidung des CC2D2A-Signals vom Hintergrund nicht möglich. Des Weiteren war auch das Signal für den Zilienmarker ARL13B nicht unterscheidbar. Diese Beobachtung legt nahe, dass ein vollständiger Verlust von CC2D2A unmittelbar zu einer Hemmung der Ziliogenese und folglich zu einem Phänotyp ohne Zilien führt (siehe Abbildung 10).

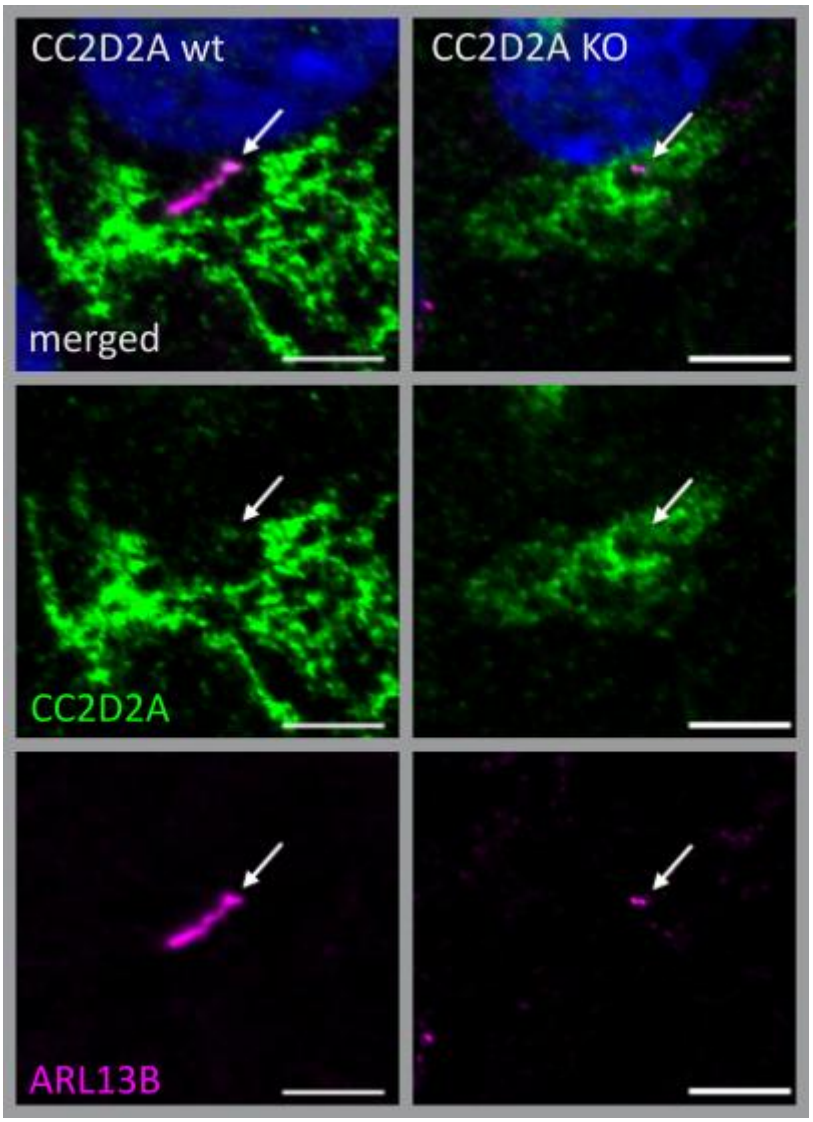

Figure 10: Fluoreszenzmicroskopiebilder der CC2D2A Knockout Zellen *– CC2D2A-Wildtyp- und KO-Zellen sind dargestellt. Die DNA ist mit DAPI (dunkelblau) angefärbt, das Zilium ist mit ARL13B (magenta) angefärbt, CC2D2A ist grün markiert. Die Ko-Lokalisierung ist weiß dargestellt. Der Maßstab beträgt 5 µm.*

Die präsentierten Resultate stellen lediglich einen Teil der gesammelten Informationen zu sämtlichen analysierten Mutationen dar. Die im Rahmen des Projekts gewonnenen umfassenden Gesamtergebnisse bilden eine solide Grundlage und werden in drei Manuskripten publiziert. Gemäß dem Plan werden die Ergebnisse von CC2D2A in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern aus Italien, Frankreich, Irland und Ungarn publiziert. Darüber hinaus sind zwei kleinere Arbeiten zur Veröffentlichung geplant. Die Zusammenarbeit erfolgt zum einen mit Italien (TMEM67) und zum anderen mit Frankreich (RPGRIP1L). Darüber hinaus wird ein separates Manuskript mit einer Zusammenfassung der Daten zu CEP290 angefertigt.

In Anbetracht der Resultate des Projekts ist die Formulierung zusätzlicher Projektideen sowie die Beschaffung der erforderlichen Finanzmittel im Bereich der Molekularbiologie degenerativer Netzhauterkrankungen und Ziliopathien von essentieller Bedeutung. Das Ziel besteht darin, die Ergebnisse im Rahmen nachfolgender Abschlussarbeiten und Doktorarbeiten weiterzuentwickeln. In diesem Kontext wurde ein Antrag auf weitere Förderung bei der ANR/DFG gestellt. Derzeit findet eine Prüfung des Antrags mit dem Titel "Unravelling the tissue specificity of ciliopathies by studying dynamic interactome changes at the ciliary gate in human neural progenitors" (Aufklärung der Gewebespezifität von Ziliopathien durch Untersuchung dynamischer Interaktomveränderungen am Ziliare Tor in menschlichen Nervenvorläuferzellen) statt.

Teil III - Erfolgskontrollbericht

Förderkennzeichen: 01EW2212

---

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

---

In Bezug auf die förderpolitischen Ziele des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF), zukunftsfähige wissenschaftliche Grundlagen zu schaffen, konnten folgende Beiträge geleistet werden. Die Übertragung der für dieses Projekt etablierten Versuchsdurchführung auf andere Mutationen ist problemlos möglich. Die Anwendung ist sowohl zur Evaluierung von Varianten unbekannter Signifikanz als auch von Mutationen, die zu gänzlich anderen Krankheiten führen, denkbar. Auf der anderen Seite konnte dargelegt werden, auf welche Weise unterschiedliche Mutationen im selben Gen durch den Verlust spezifischer Interaktionen zu divergierenden Symptomen führen können. Die in diesem Kontext gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnisse stellen einen exzellenten Ausgangspunkt für eine Vielzahl aufbauender und weiterführender Projekte dar. Darüber hinaus trägt diese Entwicklung zu einer Optimierung der pränatalen Diagnosestellung, der genetischen Beratung sowie der Langzeitprognose für Patienten mit dem Joubert-Syndrom bei.

Im Rahmen des Projekts wurde eine individuell konfigurierte Bibliothek mit 10.000 Verbindungen erstellt. Diese umfasst 3.000 von der FDA zugelassene Verbindungen sowie 7.000 bioaktive Verbindungen, die vom Hersteller aufgrund ihrer chemischen Diversität selektiert wurden. Die Prüfung der Wirksamkeit dieser Stoffe erfolgt in einer automatisierten Anlage des Projektpartners in Italien an neuronalen Vorläuferzellen, die vom Patienten abgeleitet wurden. Diese Bibliothek ist ein hervorragender Ausgangspunkt zur Identifizierung möglicher Wirkstoffe, die zur Linderung Joubert-Syndrom-spezifischer Symptome beitragen könnten.

---

2. Wissenschaftlicher oder technischer Erfolg des Vorhabens inkl. erreichter Nebenergebnisse und wesentlicher Erfahrungen

---

Das Projekt verfolgte die folgenden Hauptziele. Zunächst war ein tiefgreifender Einblick in die Funktionsweise primärer Zilien im Zusammenhang mit der Entwicklung des Zentralnervensystems sowie der Krankheitsätiologie des Joubert-Syndroms zu gewinnen. Die initiale Klonierung von getaggten Zilien-spezifischen DNA-Konstrukten, deren stabile Transfektion in menschliche Zelllinien sowie die anschließende massenspektrometrische Analyse und statistische Auswertung führten zum gewünschten Erfolg. Für das

vorliegende Projekt wurden neben den Zelllinien auch Astrozyten- und Organoidlysate analysiert sowie lysiertes Hirngewebe von Mäusen, um detaillierte Proteinnetzwerke zu erstellen. Diese dienten als Grundlage für die Analyse der Organisation und Funktion der ziliären Transition Zone, einer Struktur, die für die Entstehung des Joubert-Syndroms von entscheidender Bedeutung ist (siehe Teil II).

Ein zweiter Aspekt war die funktionelle Interpretation von Patientenmutationen sowie insbesondere Varianten unbekannter Signifikanz. Ziel war es, die Diagnose und das Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei vorliegendem Joubert-Syndrom zu verbessern. Die zuvor etablierte Versuchsdurchführung konnte erneut angewendet werden, wobei die verwendeten Konstrukte dahingehend modifiziert wurden, dass sie die Mutationen von Patienten widerspiegeln. Es konnte dargelegt werden, auf welche Weise unterschiedliche Mutationen im selben Gen durch den Verlust spezifischer Interaktionen zu divergierenden Symptomen führen können. Zudem können die in diesem Kontext gewonnenen Erkenntnisse über die Veränderungen der Protein-Protein-Interaktionen, die durch spezifische Patientenmutationen ausgelöst werden, bereits jetzt als Ansatzpunkt genutzt werden, um den zugrundeliegenden Krankheitsmechanismus des Joubert-Syndroms weiter zu entschlüsseln. Darüber hinaus konnten erstmals Hinweise auf bislang unbekannte Mechanismen gewonnen werden, die mittels Genotyp-Phänotyp-Korrelation ermittelt wurden und organspezifische Symptome erklären könnten (siehe Teil II).

---

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

a) Haben Vorhabensergebnisse zu Erfindungen und Patenten (angemeldet/erteilt) geführt oder wurden solche in Anspruch genommen? Wie wurden sie verwertet und welche weiteren Verwertungsmöglichkeiten sind erkennbar?
b) Haben sich die wirtschaftlichen, c) wissenschaftlichen und/oder technischen Erfolgsaussichten der Verwertung nach Projektende geändert?
d) Haben sich Änderungen bei der wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Anschlussfähigkeit, d.h. der notwendigen nächsten Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse, ergeben?

Wenn ja, bitte spezifizieren und Zeithorizont angeben**.**

---

a) Die Vorhabensergebnisse haben zu keinen angemeldeten oder erteilten Erfindungen und Patenten geführt, ebenso wurden keine Patente in Anspruch genommen.
b) Nach Projektabschluss haben sich die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten hinsichtlich der Verwertung geändert. Die erstellte Bibliothek umfasst 10.000

Wirkstoffe und könnte potenzielle Treffer liefern, die einen Einfluss auf das Fortschreiten der Symptomatik des Joubert-Syndroms haben. (1 Jahr)

c) Nach Projektabschluss haben sich die wissenschaftlichen Erfolgsaussichten hinsichtlich der Verwertung geändert. Es ist geplant, die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse in Fachjournalen sowie in Form von Fachbeiträgen auf nationalen und internationalen Tagungen/ Konferenzen zu veröffentlichen. Darüber hinaus werden die erzielten Ergebnisse in eine Forschungsdatenbank (PRIDE – Proteomics Identifications Database) einfließen. (6 Monate) Weiterhin wird die Zusammenarbeit mit den anderen Forschungsgruppen zunächst in kleinerem Rahmen fortgesetzt.

d) Auf der Basis der gewonnenen Projektergebnisse sollen weitere Projektideen formuliert und entsprechende Fördermittel im Bereich der Molekularbiologie degenerativer Netzhauterkrankungen sowie der Ziliopathien akquiriert werden. Es ist ferner beabsichtigt, die Ergebnisse im Rahmen weiterer Abschluss- und Promotionsarbeiten zu vertiefen. Hierzu wurde bereits ein Folgeantrag „Unravelling the tissue specificity of ciliopathies by studying dynamic interactome changes at the ciliary gate in human neural progenitors“ bei der ANR/DFG eingereicht und befindet sich in der Entscheidungsphase. (6 Monate)

---

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Eine Zielsetzung des Projekts bestand in der detaillierten Charakterisierung der Auswirkungen von Joubert-Syndrom-Genmutationen auf die Struktur, Organisation und Funktionsweise der Transition Zone, einem Subkompartiment des Ziliums, mit dem Ziel, den Einfluss auf ziliäre Signalwege und Proteinnetzwerke zu untersuchen. In diesem Kontext ist die Verwendung von *C.elegans* als *in-vivo* Modell von signifikanter Relevanz. Die entsprechenden genetisch modifizierten Wurmstämme wurden vom Projektpartner in Irland generiert. In der Folge wurden umfassende Anstrengungen unternommen, um die Immunpräzipitations- und Massenspektrometrie-Protokolle zur Isolierung von Proteinkomplexen aus *C.elegans*-Würmern zu optimieren. Allerdings hat sich die Isolation dieser Komplexe aus ganzen Würmern als äußerst komplex und zeitintensiv erwiesen. Es war davon auszugehen, dass die Entwicklung eines funktionierenden Protokolls weitere erhebliche Arbeitsaufwand erfordern würde. Aus diesem Grund wurde die Priorität auf die Anwendung von Protokollen mit Säugetierzellkulturen gelegt, da deren Realisierung als einfacher zu bewerten war. Beim Projektpartner in Irland wurde der Fokus auf die Einführung und Auswertung zusätzlicher Patientenmutationen in *C.elegans* gelegt.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt)

Die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse sind gemäß der Planung zur Veröffentlichung vorgesehen. Dies erfolgt in Fachjournalen sowie in Form von Fachbeiträgen auf nationalen und internationalen Tagungen/Konferenzen. So wurden Projektergebnisse bereits auf dem UK Cilia Network Summer Meeting 2025 präsentiert. Darüber hinaus werden die Forschungsergebnisse in kleineren Formaten auf elektronischem Wege anderen Forschungsgruppen präsentiert und diskutiert oder im Rahmen von Online-Symposien in größerem Umfang vorgestellt.

6. Einhaltung des Finanzierungs- und Zeitplans

Der Finanzierungsplan wurde eingehalten. Die vorliegenden Patientenmutationen für CC2D2A, CEP290 und RPGRIP1L wurden hinsichtlich ihres veränderten Interaktionsschemas in menschlichen Zelllinien analysiert und ausgewertet. Hinsichtlich der Analyse und Auswertung von TMEM67 besteht jedoch noch Forschungsbedarf. Aufgrund der bisher vielversprechenden Ergebnisse wird dies jedoch noch kostenneutral durchgeführt. Des Weiteren haben sich die übrigen Projektpartner dazu bereit erklärt, bis zur erfolgten Publikation der Resultate ebenso kostenneutral am Projekt weiterzuarbeiten.

7. Vorhabenspezifische Publikationen (ausschließlich Publikationen mit Angabe des Förderkennzeichens)

Die im Verlauf des Projekts gewonnenen Erkenntnisse und umfangreichen Ergebnisse werden in mehreren Publikationen veröffentlicht. Gemäß der Planung ist die Veröffentlichung der Resultate zu CC2D2A in Kooperation mit den Projektpartnern aus Italien, Frankreich, Irland und Ungarn vorgesehen. Darüber hinaus ist die Publikation zweier kleinerer Werke vorgesehen. Die Zusammenarbeit erfolgt zum einen mit Italien (TMEM67) und zum anderen mit Frankreich (RPGRIP1L). Des Weiteren wird ein eigenständiges Manuskript angefertigt, das eine Zusammenfassung der Daten zu CEP290 beinhaltet.