

**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Bardet-Biedl syndrom: Testování léčiv pomocí buněčných modelů

Diplomová práce

ELIŠKA ČÍŽKOVÁ

Vedoucí práce: RNDr. Michaela Bosáková, Ph.D.

Ústav experimentální biologie
Program Bioanalytická laboratorní diagnostika ve
zdravotnictví - Lékařská genetika a molekulární
diagnostika

Brno 2025

MUNI
SCI

Bibliografický záznam

Autor: Eliška Čížková
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Bardet-Biedl syndrom: Testování léčiv pomocí buněčných modelů

Studijní program: Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví - Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Vedoucí práce: RNDr. Michaela Bosáková, Ph.D.

Rok: 2025

Počet stran: 88

Klíčová slova: Bardet-Biedl syndrom, BBS2, BBS10, ER stres, chemické chaperony

Bibliographic record

Author: Eliška Čížková
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Bardet-Biedl syndrome: Disease modelling for drug testing

Degree Programme: Bioanalytical Laboratory Diagnostics in Medicine – Medical Genetics and Molecular Diagnostics

Supervisor: RNDr. Michaela Bosáková, Ph.D.

Year: 2025

Number of Pages: 88

Keywords: Bardet-Biedl syndrome, BBS2, BBS10, ER stress, chemical chaperones

Abstrakt

Bardet–Biedl syndrom (BBS) představuje vzácnou multisystémovou ciliopatii, jejímž nejčastějším a nejzávažnějším projevem je retinální degenerace. Fotoreceptory jsou vysoce metabolicky aktivní buňky, jejichž světločivný segment tvoří metamorfovaná primární cilia. Poruchy v jejich struktuře a funkci, typické pro ciliopatie, mohou vést k narušení intraflagelárního transportu, jenž je klíčový pro správnou funkci fototransdukčního aparátu. Výsledkem této dysfunkce může být hromadění proteinů v endoplazmatickém retikulu (ER) a spuštění ER stresu, který potenciálně vyústí v apoptózu. Tato diplomová práce se zabývá primárními ciliemi, ER stresem a apoptózou v BBS10- a/nebo BBS2-deficientním modelu retinálních pigmentových buněk a testuje vybrané malé molekuly jako možná terapeutika BBS.

Abstract

Bardet–Biedl syndrome (BBS) is a rare multisystem ciliopathy, with photoreceptor death and retinal degeneration being its most frequent and severe manifestation. Photoreceptors are highly metabolically active cells whose light-sensitive outer segment is formed by a modified primary cilium. Structural and functional defects in cilia, typical of ciliopathies, can lead to disrupted intraflagellar transport, which is essential for the proper function of the phototransduction machinery. This dysfunction may result in protein accumulation in the endoplasmic reticulum (ER) and trigger ER stress, potentially leading to apoptosis. This thesis investigates the primary cilia, ER stress and apoptosis in BBS10- and/or BBS2-deficient models of retinal pigmented epithelium cells, and tests selected small molecules as potential therapeutics of BBS.

ZADÁNÍ
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2024/2025

Ústav:	Ústav experimentální biologie
Studentka:	Bc. Eliška Čížková
Program:	Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví - Lékařská genetika a molekulární diagnostika
Specializace:	Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví - Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Ředitel ústavu PTF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Bardet-Biedl syndrom: Testování léčiv pomocí buněčných modelů
Název práce anglicky:	Bardet-Biedl syndrome: Disease modelling for drug testing
Jazyk práce:	čeština

Oficiální zadání:

Bardet-Biedlův syndrom (BBS) je systémové onemocnění, způsobující časný nástup poškození zraku. Hlavním cílem projektu je navržení farmakologické modulační s cílem zamezit ztrátě zraku. Student ve své práci využije buněčných modelů BBS, odvozených z kmenových buněk upravených pomocí metody CRISPR/Cas9, a řady biochemických a zobrazovacích metod.

Vedoucí práce:	RNDr. Michaela Bosáková, Ph.D.
Datum zadání práce:	3. 10. 2023
V Brně dne:	9. 5. 2025

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Bc. Eliška Čížková, 3. 11. 2023

RNDr. Michaela Bosáková, Ph.D., 3. 11. 2023

RNDr. Pavel Lízal, Ph.D., 3. 11. 2023

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda vyjádřila svou upřímnou vděčnost všem, kteří mě při zpracování diplomové práce provázeli a podporovali. Především děkuji své vedoucí diplomové práce RNDr. Michaelae Bosákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky, trpělivost a čas, který mi věnovala. Děkuji také všem členům její laboratoře za jejich rady a ochotu pomoci. Děkuji mé rodině a přátelům, kteří mě během celého studia podporovali.

Obsah

Seznam obrázků	15
Seznam tabulek	16
Seznam pojmů a zkratk	17
Seznam příloh	19
1 Úvod	21
2 Primární cilium	22
2.1 Struktura primárního cilia.....	22
2.2 Ciliogeneze.....	25
2.3 Ciliopatie.....	26
3 Bardet-Biedl syndrom	28
3.1 Retinální dystrofie	31
4 ER stres	33
4.1 PERK signální dráha.....	34
4.2 IRE1 α signální dráha	36
4.3 ATF6 signální dráha.....	36
4.4 Chemické navození ER stresu	37
5 Materiál a metody	39
5.1 Buněčné kultury	39
5.2 Western blot.....	40
5.3 Imunocytochemie	44
6 Cíle práce	48
7 Výsledky	49
8 Diskuze	50
9 Souhrn	51
10 Summary	52

Použité zdroje	53
Příloha A Přehled genů asociovaných s BBS	68

Seznam obrázků

Obrázek 1 Struktura primárního cília.....	23
Obrázek 2 Klinická manifestace Bardet-Biedl syndromu, vytvořeno pomocí BioRender.com	29
Obrázek 3 Schéma ER stresu a UPR.....	35

Seznam tabulek

Tabulka 1 2xLaemmli lyzační pufr.....	41
Tabulka 2 Složení polyakrylamidových gelů.....	42
Tabulka 3 Složení pufrů pro SDS-PAGE a western blot.....	42
Tabulka 4 Složení TBS-Tween pufru	44
Tabulka 5 Seznam primárních protilátek pro western blot.....	44
Tabulka 6 Seznam primárních protilátek pro imunocytochemii	46
Tabulka 7 Složení montovacího média.....	46

Seznam pojmů a zkratek

APS	– peroxodisíran amonný
ATF6	– aktivační transkripční faktor 6
ATF4	– aktivační transkripční faktor 4
ASK1	– <i>Apoptosis Signal-regulating Kinase 1</i>
BBS	– Bardet-Biedl syndrom
BiP/GRP78	– <i>Glucose-regulated Protein 78</i>
Bcl-2	– <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
Cas	– proteiny asociované s CRISPR
CRISPR	– krátké, pravidelně rozmístěné, opakující se palindromatické repetice
CCDC28B	– <i>Coiled-Coil Domain Containing 28B</i>
CHOP	– <i>C/EBP-homologous protein</i>
CEP97	– <i>Centrosomal Protein 97</i>
CP110	– <i>Centriolar Coiled-Coil Protein 110</i>
DAPI	– 4',6-diamidin-2-fenylindol
D-MEM	– <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
eIF2 α	– eukaryotický iniciační faktor 2
ER	– endoplasmické retikulum
ERAD	– <i>endoplasmic reticulum associated degradation</i>
FBS	– fetální bovinní sérum
FGFR2	– <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>
GADD34	– <i>Growth Arrest and DNA Damage-inducible 34</i>
HERPUD1	– <i>Homocysteine Inducible ER Protein With Ubiquitin Like Domain 1</i>
IRE1 α	– <i>Inositol-requiring enzyme 1α</i>
JNK	– c-Jun N-terminální kináza
KO	– <i>knock-out</i>
NPHP1	– Nephrocystin 1

4-PBA	– fenylbutyrát sodný
p-eIF2 α	– fosforylovaný eukaryotický iniciační faktor 2
PERK	– <i>Protein kinase receptor – like endoplasmic reticulum kinase</i>
ROI	– <i>region of interest</i> ; oblast zájmu
RIDD	– <i>regulated IRE1-dependent decay</i>
RPE	– retinální pigmentové epiteliální buňky
SDS	– dodecyl sulfát sodný
SDS-PAGE	– sodium dodecyl sulfát-polyacrylamidová gelová elektroforéza
S.E.M.	– střední chyba průměru
SD	– směrodatná odchylka
SYFP	– <i>super yellow fluorescent protein SYFP2</i>
TBS	– <i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	– N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin
TMAO	– N,N-dimethylmethanamin-N-oxid
<i>TMEM67</i>	– <i>Transmembrane Protein 67</i>
<i>TTC21B</i>	– <i>Tetratricopeptide Repeat Domain 21B</i>
TU	– tunicamycin
TUDCA	– kyselina tauroursodeoxycholová
TRAF2	– <i>tumor necrosis factor receptor associated factor 2</i>
Tris	– 2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
UPR	– <i>unfolded protein response</i>
XBP1	– <i>X-box binding protein 1</i>

Seznam příloh

Přílohy v textu

Příloha A Přehled genů asociovaných s BBS

68

1 Úvod

Primární cilia jsou mikrotubulární organely, které vyčnívají z povrchu téměř všech savčích buněk a hrají klíčovou roli v senzoryckých a signálních procesech. Jejich funkční a strukturální integrita je nezbytná pro správný vývoj a homeostázu řady tkání, včetně sítnice. Poruchy ve struktuře nebo funkci primárních cilií vedou k široké skupině onemocnění známých jako ciliopatie, mezi které patří například Bardet-Biedl syndrom (BBS), kterému se věnuje tato diplomová práce (Turan et al., 2023).

Tato diplomová práce je shrnuje současné poznatky o BBS, se zvláštním zaměřením na retinální dystrofii, která patří mezi jeho nejčastější a nejzávažnější projevy. Postihuje téměř 95 % pacientů, přičemž první příznaky nastupují již dětském věku a degenerace tyčinek a čípků progreduje do úplné ztráty zraku ve druhé až třetí dekádě života (Adams et al., 2007; Beales et al., 1999; Niederlova et al., 2019). Molekulární podstata degenerace fotoreceptorů avšak stále není objasněna. Tato práce si proto dala za cíl na proteinové úrovni prozkoumat dynamiku stresu endoplazmatického retikula (ER stres), který by mohl vznikat jako důsledek narušeného transportu proteinů do primárního cilia, na kterém se podílejí produkty BBS genů; dále pak identifikovat potenciální léčebné cíle a pokusit se zvrátit patologický efekt ER stresu na buněčných modelech s *knock-out* mutací v genech *BBS2* a *BBS10*.

2 Primární cilium

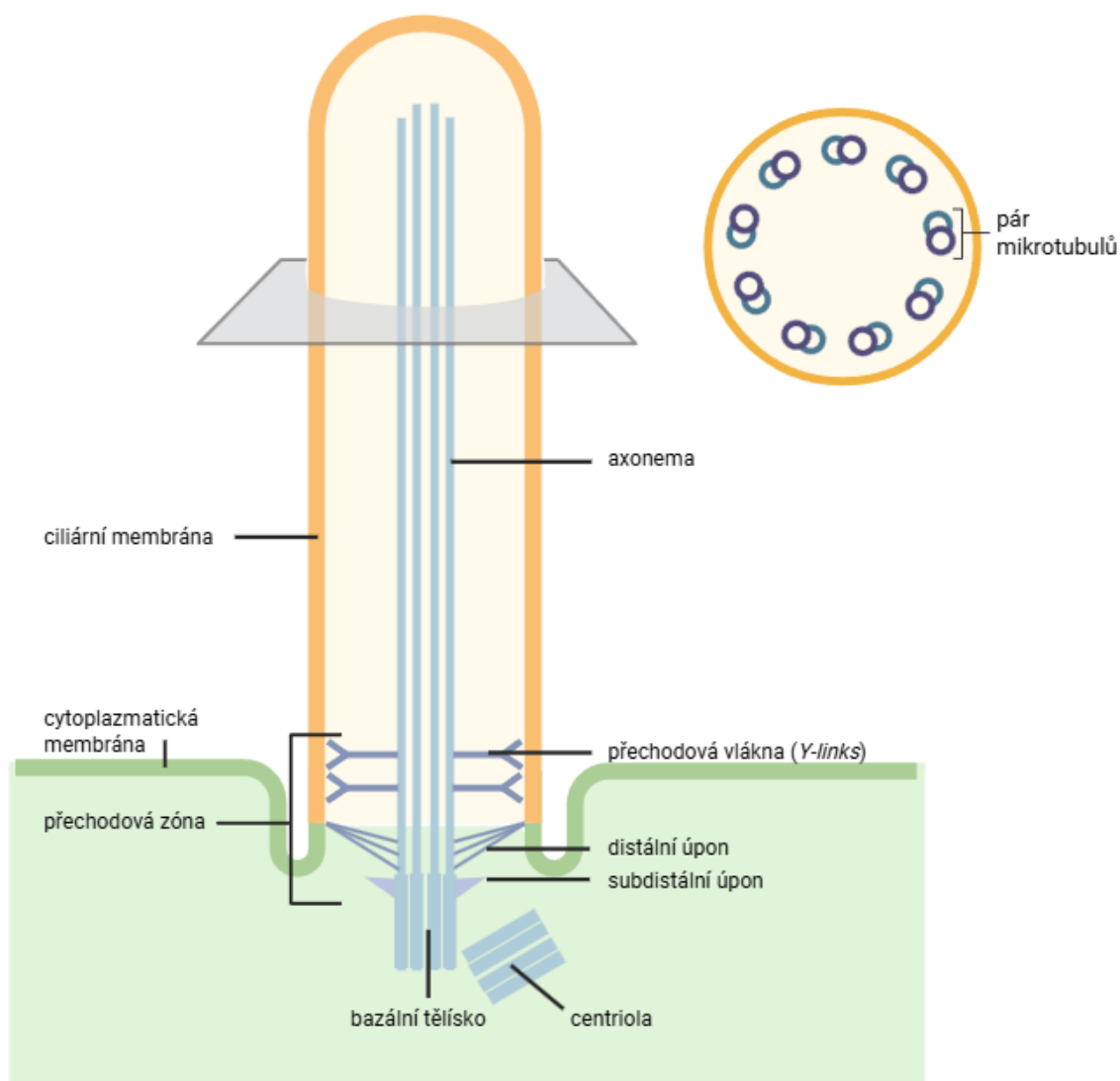
Primární cilia jsou specializované mikrotubulové struktury vyskytující se na povrchu většiny nedělicích se savčích buněk (Satir et al., 2010; Sorokin, 1968). Výjimku tvoří některé plně diferencované buněčné typy, například zralé adipocyty nebo rhabdomyocyty, které primární cilia nemají (Alieva and Vorobjev, 2004; Fu et al., 2014; Marion et al., 2009). Cilia se zapojují do celé řady buněčných procesů, včetně smyslového vnímání, buněčné motility, buněčného dělení, migrace, diferenciaci a buněčné signalizace a komunikace (Anvarian et al., 2019).

Primární cilia v buňce většinou plní úlohu signálních organely, která buď získává signály z okolí vazbou na receptory na svém povrchu, anebo integruje a reguluje signály pocházející z jiných částí buňky. Díky tomu jsou cilia místem aktivace řady klíčových signálních drah, mezi které patří například Hedgehog (Huangfu et al., 2003; Rohatgi et al., 2007), Wnt (Simons et al., 2005), Notch (Ezratty et al., 2011), Hippo (Habbig et al., 2011), anebo signální dráhy růstových faktorů (Nita et al., 2025; Wheway et al., 2018).

2.1 Struktura primárního cilia

Na buněčných površích se nacházejí různé typy cilií, které se liší svou pohyblivostí, počtem a strukturou. Každý typ cilií plní specifické úlohy, jež se odrážejí jejich morfologické a funkční variabilitě. Rozlišujeme tedy motilní cilia, schopné aktivního pohybu, a nemotilní cilia, kam řadíme i primární cilium, jehož stavbě bude věnována tato kapitola.

Na povrchu buněk se z pravidla vyskytuje právě jedno primární cilium, představující vysoce organizovanou buněčnou organelu, jejíž architekturu tvoří axonema tvořená mikrotubuly rostoucími z bazálního tělíska. Axonema je obklopena specializovanou ciliární membránou, která se od běžné plazmatické membrány liší jak složením lipidů, tak zastoupením specifických membránových proteinů (Obrázek 1).



Obrázek 1 Struktura primárního cilia
(vytvořeno pomocí BioRender.com)

Ve své proximální části je axonema typicky prstencová struktura 9 párů mikrotubulů vycházejících z bazálního tělíska. Bazální tělísko vzniká maturací mateřské centrioly a skládá se z 9 tripletů mikrotubulů uspořádaných do soudkovitého tvaru, subdistálního úponu a distálního úponu, které ho připojují k membráně (Chang et al., 2015). Na rozdíl od motilních cilií postrádají primární cilia centrální pár mikrotubulů a vyskytují se tak v mikrotubulové konfiguraci 9+0. Dalším rozdílem je i absence vnitřních a vnějších dyneinových ramen, které umožňují pohyb motilních cilií (Bloodgood,

2009; Satir and Christensen, 2007). Axonema poskytuje vazebná místa pro motorové proteiny a to zejména některé kinesiny a cytoplazmatický dynein-2, které umožňují transport molekul uvnitř cilia (Li and Ran, 2024). Tento aktivní pohyb molekul označujeme jako intraflagelární transport (IFT) a je zásadní nejen pro udržení ciliární homeostázy ale i buněčnou signalizaci. IFT je zodpovědný za transport tubulinových dimerů pro stavbu axonemy, která je neustále udržována v aktivním ekvilibriu (Lechtreck, 2015; Qin et al., 2004). IFT se také podílí na transportu funkčních molekul a během aktivace signálních drah zabezpečuje transport jejich komponent do cilia, v rámci cilia a také zpět do cytoplazmy. Tato závislost na IFT je podmíněna tím, že ve většině primárních cilií neprobíhá proteosyntéza (Pazour and Rosenbaum, 2002).

IFT je obousměrný transport a zatímco kinesin obstarává anterográdní transport k apikálnímu konci cilia, retrográdní transport je zprostředkován dyneinem-2 (Rosenbaum and Witman, 2002). Na motorové proteiny jsou navázány IFT částice, které zprostředkovávají vazbu s transportovanými molekulami. IFT jsou složeny ze 2 subkomplexů: IFT-A, který je tvořen 6 proteiny, a IFT-B složený z 15 proteinů (Pedersen and Rosenbaum, 2008; Taschner et al., 2012). IFT komplexy společně s oktamerickým proteinovým komplexem BBSome zprostředkovávají IFT (Lechtreck, 2015). BBSome funguje jako adaptér mezi IFT částicemi a samotným nákladem, který je transportován v rámci IFT. Připojení BBSomu k bazálnímu tělísku a jeho regulaci vstupu do cilia umožňuje přítomnost malé GTPázy BBS3/ARL6. BBSome je sestavován postupně a za jeho správné sestavení je zodpovědný chaperoninový komplex, složený z proteinů BBS6, BBS10 a BBS12 (Álvarez-Satta et al., 2017).

Distální konec primárního cilia představuje strukturálně unikátní oblast, kam nedosahují všechny axonemální mikrotubuly a tím vzniká prostor umožňující dynamický růst a resorpci axonemy. Zároveň zde probíhá reorganizace proteinů zajišťujících IFT a pravděpodobně také aktivace signálních drah včetně Hedgehog (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017; Pedersen et al., 2012). Ciliární mikrotubuly jsou charakteristické reverzibilními post-translačními modifikacemi (Westermann and Weber, 2003). Tyrosinace a detyrosinace mění afinitu mikrotubulů k IFT částicím, která umožňuje obousměrný

transport v ciliu (Chhatre et al., 2025). Nacházíme u nich také polyglutamylaci, přičemž defektní axonemální polyglutamylace má za následek narušení stability cilií a poruchu transportu přenašečů signálu do cilií (Hong et al., 2018). Glycylace je přítomná při vzniku primárních cilií a ovlivňuje jejich délku (Gadadhar et al., 2017). Acetylace ovlivňuje mechanické vlastnosti cilia (Chawan et al., 2020; Nguyen et al., 2015), přičemž deacetylace mikrotubulů je jedním z procesů provázejících resorpci cilia (Pugacheva et al., 2007a).

Proximální část cilia je tvořena přechodovou zónou, která obsahuje *Y-links* molekuly propojující mikrotubuly axonemy s ciliární membránou. Slouží jako bariéra, která znemožňuje prostou difuzi velkých proteinů dovnitř cilia (Szymanska and Johnson, 2012).

Ciliární membrána se svým lipidovým složením výrazně odlišuje od buněčného membrány i membrány periciliární oblasti. Je totiž specificky obohacena o steroly, glykolipidy a sfingolipidy (Tyler et al., 2009). Odlišné složení ciliární membrány, konkrétně obsah cholesterolu ovlivňuje například Hedgehog signalizaci (Kinnebrew et al., 2019). Spekuluje se o tom i v případě lokalizace FGFR2 (*Fibroblast growth factor receptor 2*), jehož signalizace je závislá na lokalizaci v ciliární membráně (Nita et al., 2025).

2.2 Ciliogeneze

Primární cilia se obvykle vytvářejí po ukončení mitózy v časně G1 fázi, případně po opuštění buněčného cyklu (fáze G0). Jejich tvorba může být vyvolána například odebráním mitogenů nebo zahájením buněčné diferenciaci (Marion et al., 2009; Wheatley et al., 1996). Studium primárních cilií probíhá na zavedených *in vitro* modelech, kterými jsou například myší fibroblasty 3T3 nebo lidské retinální pigmentované epiteliální (RPE) buňky, u nichž lze tvorbu cilií spolehlivě indukovat odebráním séra z kultačního média (Pugacheva et al., 2007b; Tucker et al., 1979).

Ciliogeneze může probíhat dvěma různými mechanismy: extracelulární a intracelulární drahou. Extracelulární ciliogeneze je iniciována ukotvením bazálního tělíska

odvozeného od mateřské centrioly, v kortexu bohatém na aktin a využívají ji např. buňky řasinkového epitelu (Ishikawa and Marshall, 2011). RPE využívají intracelulární dráhu, která je iniciována v cytoplazmě. Distální úpony mateřské centrioly na sebe vážou vezikuly pocházející z Golgiho aparátu, které následně splývají v jednu větší ciliární vezikulu, která se naváže na distální konec mateřské centrioly (Sorokin, 1968).

V další fázi iniciace ciliogeneze je nezbytné odstranit tzv. *capping proteiny* CP110 a CEP97, které znemožňují růst axonemy. Odstranění těchto proteinů je závislé na proteinu Tau tubulin kináza 2, která se přibližuje k bazálnímu tělísku prostřednictvím interakce s CEP164 (Goetz et al., 2012). Tento krok je nezbytný pro zahájení polymerace mikrotubulů a tvorbu axonemy, která roste směrem k buněčnému povrchu a je obalena ciliární membránou. V oblasti mezi bazálním tělískem a axonemou se vytváří přechodová zóna (Tyler et al., 2009) a aktivuje se IFT, který je nezbytný pro vytvoření struktury a fungování cilia (Pedersen et al., 2008).

2.3 Ciliopatie

Ciliopatie lze definovat jako skupinu geneticky podmíněných onemocnění, která jsou způsobena defekty ve struktuře nebo funkci primárních či motilních cilií (Reiter and Leroux, 2017). Geneticky představují heterogenní skupinu chorob a syndromů, které jsou způsobeny patologickými variantami ve více než 507 genů (Turan et al., 2023). Ty vedou k narušení funkce cilií, což se klinicky manifestuje širokým spektrem příznaků, které mohou zahrnovat například retinální degeneraci, polydaktylii, obezitu, nebo vrozené srdeční vady (Turan et al., 2023). Dysfunkce signálních drah v důsledku defektu cilií může vést k narušení organogeneze, čímž lze vysvětlit multisystémový charakter většiny ciliopatií (Braun and Hildebrandt, 2017).

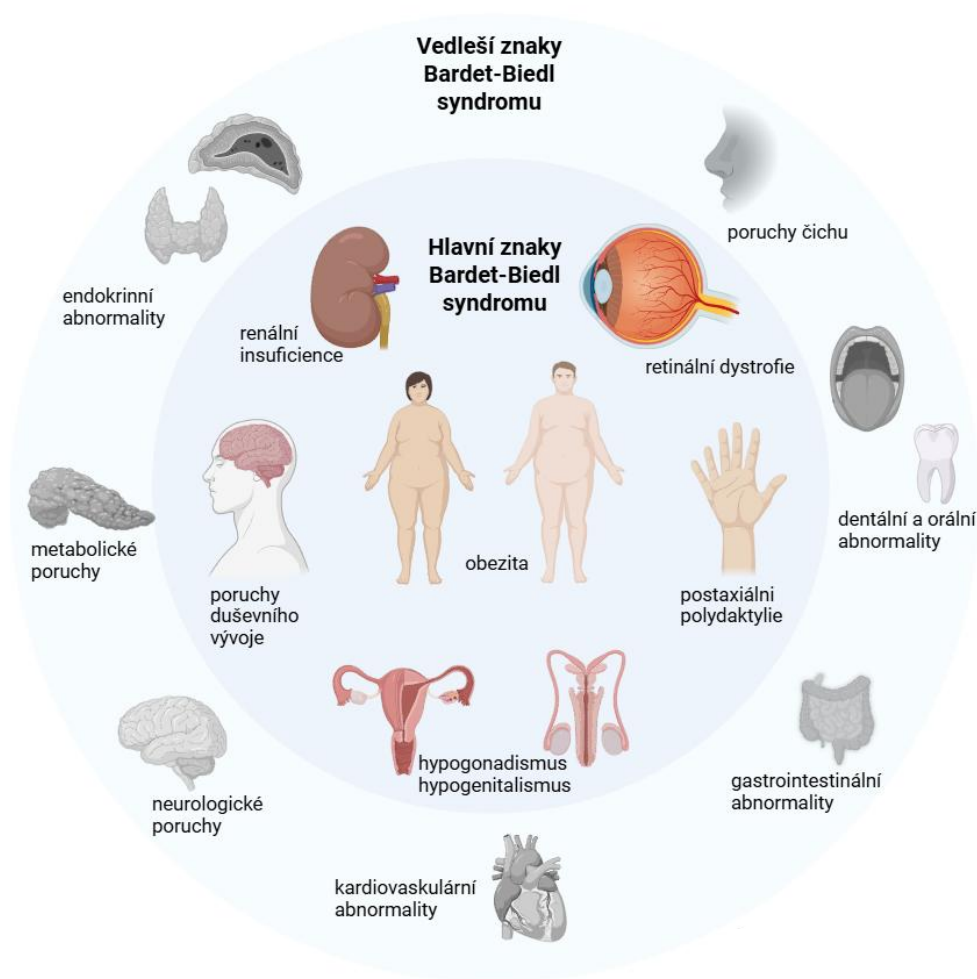
Podle toho, zda mutované geny kódují přímo proteiny lokalizované v ciliích, nebo zasahují do ciliárních procesů nepřímo, rozlišujeme primární a sekundární ciliopatie (Reiter and Leroux, 2017). 18 známých sekundárních ciliopatií je způsobeno mutacemi v genech, které sice neprodukují ciliární proteiny, ale podílejí se na procesech nezbytných pro ciliární funkci, například vezikulární transport. Primárních ciliopatií je

popsáno 34. Vznikají v důsledku mutací v genech, jejichž produkty se lokalizují přímo do axonemy, cilia, přechodové zóny či bazálního tělíska (Turan et al., 2023). Mezi tyto onemocnění patří například Joubertův syndrom, Meckel-Gruberův syndrom nebo Bardet-Biedl syndrom, na který se zaměřuje tato diplomová práce.

3 Bardet-Biedl syndrom

Bardet-Biedl syndrom (BBS) (OMIM#209901; ORPHA: 110) je vzácné genetické multisystémové onemocnění s variabilní klinickou manifestací (Obrázek 2). Klinická diagnóza BBS byla dle Forsythe a Beales stanovena přítomností buď čtyř hlavních znaků, nebo tří hlavních znaků a dvou vedlejších znaků. Hlavní znaky zahrnují dystrofii tyčinek a čípků sítnice, obezitu s ukládáním tuku v oblasti trupu, postaxiální polydaktylii, poruchy duševního vývoje, hypogenitalismus a renální insuficienci. Mohou se však projevit i méně časté symptomy, které označujeme jako vedlejší znaky. Mezi ně patří neurologické poruchy, poruchy čichu, dentální a orální abnormality, dále také kardiovaskulární, gastrointestinální, endokrinní a metabolické poruchy (Forsythe and Beales, 2013). V roce 2024 byla tato kritéria rozšířena o molekulární diagnostiku, která je ve většině zemí dnes k dispozici. Nová kritéria navíc zohledňují i věk pacienta a jsou proto stanovena pro každou věkovou skupinu (*in utero*, dětství, adolescence a dospělost) (Dollfus et al., 2024).

Projevy *in utero*, které zahrnují polydaktylii, abnormality ledvin, *situs inversus* a hydrometrocolpos, mohou být pozorovány během prenatalního ultrazvukového vyšetření ve druhém trimestru. U 39 % jedinců je však vyšetření bez nálezu, přičemž abnormality ledvin nebo polydaktylie jsou zjištěny až postnatálně (Mary et al., 2019). BBS je progresivní onemocnění; polydaktylie je jako jediný z hlavních znaků zřejmý od narození, zatímco ostatní symptomy se rozvíjejí či prohlubují během života (Forsythe and Beales, 2013). Diagnóza proto bývá nejčastěji stanovena až po nástupu prvních známek zrakového postižení (Hamel, 2007), nicméně obecně je možná v jakémkoli věku vzhledem ke klinické variabilitě pleiotropních příznaků a asynchronním projevům (Dollfus et al., 2024). Přestože bývá struktura motilních cilií u většiny pacientů s BBS zachována, často se u nich vyskytují příznaky typické pro motilní ciliopatie. Patří mezi ně například syndrom dechové tísně novorozence, časté záněty středního ucha nebo astma (Shoemark et al., 2015).



Obrázek 2 Klinická manifestace Bardet-Biedl syndromu, vytvořeno pomocí BioRender.com

Prevalence BBS se v evropské a severoamerické populaci odhaduje přibližně na 1:160 000 až 1:125 000 (Beales et al., 1997; Klein and Ammann, 1969). Výrazně vyšší výskyt byl však zaznamenán v izolovaných a pravděpodobně konsanguinních komunitách; příkladem je prevalence 1:3 700 na Faerských ostrovech (Hjortshøj et al., 2009), 1:13 500 u beduínské populace v Kuvajtu (Farag and Teebi, 1989) nebo 1:18 000 v Newfoundlandu (Moore et al., 2005).

BBS je autosomálně recesivní onemocnění, které je asociováno s patologickými variantami ve 26 genech (Příloha A) (Dollfus et al., 2024). Poté, co byl model trialelické dědičnosti (k fenotypovému projevu onemocnění dojde, pouze pokud je pacient nositelem 3 patologických variant ve 2 genech) pro BBS odmítnut (Abu-Safieh et al., 2012), byly 4 geny (*NPHP1*, *CCDC28B*, *TMEM67*, *TTC21B*) s BBS spojeny jako genetické

modifikátory druhého řádu, které přispívají k fenotypové variabilitě, ale jejich relevance v patologii je předmětem diskuze (Forsyth and Gunay-Aygun, 1993; Perea-Romero et al., 2022; Tian et al., 2023).

Některé produkty BBS genů se podílí na IFT, jelikož osm z nich (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8/ TTC8, BBS9, a BBS18/ BBIP1) tvoří strukturu označovanou jako BBSome (Ansley et al., 2003; Badano et al., 2003; Jin et al., 2010; Li et al., 2004; Mykytyn et al., 2001; Nishimura et al., 2005, 2001; Scheidecker et al., 2014). K sestavení BBSomu je nutná přítomnost chaperoninového komplexu tvořeného proteiny BBS6/MKKS, BBS10, BBS12 a šesti *chaperonin-containing TCP1* proteiny, které interagují s BBS2 a BBS7 podjednotkami (Seo et al., 2010). BBS3/ARL6, BBS14 a BBS17 zajišťují správný transport BBSomu do cilia i jeho pohyb v rámci struktury samotné (Barbelanne et al., 2015; Seo et al., 2011; Stowe et al., 2012). Zbylé geny asociované s BBS kódují proteiny, jejichž funkce není přímo spojena s funkcí nebo stavbou primárního cilia (Chiang et al., 2006; Weihbrecht et al., 2017). Incidence jednotlivých BBS s popisem genu a funkce proteinů je uvedena v Příloze A.

Nejčastějšími genetickými příčinami BBS jsou mutace v genech *BBS1*, *BBS10* a *BBS2*, které dohromady tvoří téměř polovinu všech případů (Niederlova et al., 2019). Patologické varianty v *BBS1* genu jsou vůbec nejzastoupenější (nacházíme je u 23,4 % pacientů) a bývají spojovány s mírnějším fenotypovým projevem onemocnění. *BBS1* patologie se typicky vyznačuje nižší penetrancí renálních anomálií a polydaktylie, přičemž ostatní hlavní znaky syndromu jsou přítomny v různé míře. Patologické varianty *BBS2* jsou přítomny asi u 9,6 % pacientů a jsou naopak spojovány s častějším výskytem postižení ledvin a polydaktylií; pacienti zároveň vykazují nižší stupeň obezity. *BBS10* je se 14,5 % druhým nejčastěji mutovaným genem u BBS a je asociován s nejzávažnějším renálním postižením; navíc bývá přítomen vyšší stupeň obezity, který nastupuje v raném věku (Forsyth and Gunay-Aygun, 1993; Niederlova et al., 2019). U pacientů s patologickou variantou v genu *BBS10* byl zaznamenán časnější nástup degenerace retiny ve srovnání s mutacemi *BBS1* nebo *BBS2*, a díky elektroretinografii je možné abnormality odhalit již před vypuknutím prvních příznaků (Denniston et al., 2014).

Bialelické varianty *BBS2* i *BBS10* mohou být spojeny i s nesyndromatickou izolovanou *retinitis pigmentosa* (Dollfus et al., 2024; Shevach et al., 2015).

3.1 Retinální dystrofie

Retinální dystrofie je nejčastějším znakem BBS a postihuje 94,4 % pacientů (Niederlova et al., 2019). Projevuje se nejčastěji jako dystrofie tyčinek a čípků sítnice s časným postižením makuly (Denniston et al., 2014). Makulární degenerace se nejprve projevuje šeroslepostí, následována je progresivní ztrátou periferního vidění, poruchou barvocitu a celkovou ztrátou zrakové ostrosti (Weihbrecht et al., 2017). První příznaky nastupují průměrně ve věku 8 let (Beales et al., 1999) a k úplné ztrátě zraku dochází ve druhé nebo třetí dekádě života (Adams et al., 2007). Kromě typické retinální dystrofie se u pacientů s BBS často vyskytují i další oftalmologické komplikace, mezi něž patří astigmatismus, strabismus, makulární degenerace doprovázená edémem, dále katarakta a v neposlední řadě také atrofie optického nervu. Tyto symptomy také přispívají k celkovému zhoršení zraku (Beales et al., 1999).

V současnosti neexistuje žádná účinná terapie, která by dokázala progresi retinální degenerace zvrátit nebo alespoň zpomalit. Jediným možným přístupem je včasné osvojení kompenzačních strategií, jako je výuka Braillova písma, nácvik prostorové orientace a samostatného pohybu s bílou holí, nebo využívání specializovaného softwaru pro práci s elektronickými zařízeními, které umožňují rozvoj soběstačnosti a nezávislého života (Dollfus et al., 2024; Forsyth and Gunay-Aygun, 1993).

Porozumění patogenezi retinální degenerace u BBS a ciliopatií obecně je klíčové pro vývoj účinné cílené terapie. Retina je totiž postižena u většiny ciliopatií; příčinou je degenerace fotoreceptorů. Jsou to specializované neurony, u kterých rozlišujeme zevní segment s membránovými invaginacemi, které u tyčinek a čípků tvoří disky, respektive lamely (Steinberg et al., 1980). Ty jsou neustále obměňovány z důvodu světelného poškození a zbytky disků jsou fagocytovány retinálními pigmentovými buňkami (Young, 1967). Světločivné zevní segmenty fotoreceptorů jsou vysoce

specializovaná metamorfovaná cilia (Ramamurthy and Cayouette, 2009). Díky obsahu retinalu v rhodopsinu jsou tyčinky schopny reagovat na přítomnost fotonů a aktivovat kaskádu a tvorby akčního potenciálu, který se přenáší na oční nerv (Patel and Tsiokas, 2021). Rhodopsin je transmembránový protein, jenž patří mezi receptory spřažené s G-proteiny (GPCR) a podobně jako i ostatní proteiny musí být do vnějšího segmentu fotoreceptoru transportován. Jeho transport do primárního cilia zprostředkovává GTPáza Rab8 (Wang et al., 2012).

Hypotéza, že retinální degenerace u BBS je důsledkem chybné lokalizace rhodopsinu, patřila mezi hojně diskutované mechanismy patogeneze onemocnění. Tato teorie byla podpořena studií na myším modelu s *knock-out* mutací v genu *BBS2*; ta prokázala aberantní lokalizaci rhodopsinu, kterou autoři asociovali s degenerací fotoreceptorů (Nishimura et al., 2004).

Dle alternativní hypotézy degenerace fotoreceptorů u BBS nemusí být primárně způsobena chybným transportem rhodopsinu, ale spíše akumulací proteinů vnitřního segmentu, což poukazuje na širší poruchu intracelulárního transportu a proteostázy (Seo et al., 2010). Navíc, přímá interakce mezi BBSomem a signální cíliární sekvencí rhodopsinu nebyla prokázána (Klink et al., 2017), přestože je BBSome esenciální při importu jiných GPCR v neuronech (Berbari et al., 2008). Nedávné studie ukazují, že zatímco ve většině buněk je nezbytné plně sestavený BBSome, v buňkách fotoreceptorů je tolerována i částečně sestavená forma (Hsu et al., 2021).

Další hypotézou pro mohutnou apoptózu fotoreceptorů u ciliopatií je vznik nekontrolovaného ER stresu a to v důsledku defektního IFT mezi vnějším a vnitřním segmentem (Wright et al., 2010). To bylo podpořeno myším modelem s mutací v genu *Bbs12*, který vykazoval vyšší hladiny markerů ER stresu (Mockel et al., 2012). ER stres je intenzivně studovanou oblastí výzkumu a signální dráhy, které popisují v následujících kapitolách, představují perspektivní terapeutické cíle díky dostupnosti celé řady inhibitorů a modulátorů.

4 ER stres

ER je dynamický systém cisteren a kanálků, který mj. umožňuje translaci a posttranslační modifikace některých sekretovaných, membránových a strukturních proteinů. Pokud tyto projdou mechanismy kontroly kvality, jsou transportovány do Golgiho aparátu, odkud mohou být dále transportovány na povrch buňky, do lysozomů nebo být sekrečními váčky uvolněny z buňky (Rapoport, 2007). ER umožňuje proteinům získat jejich nativní strukturu pomocí tzv. *foldingu* proteinů a je zároveň místem, kde dochází k řadě posttranslačních modifikací včetně glykosylace, odstraňování signální sekvence a tvorbě disulfidických můstků (Braakman and Hebert, 2013). Správnou funkci enzymů, především chaperonů, zajišťuje přítomnost vápenatých iontů uvnitř ER (Anken and Braakman, 2005).

Udržení homeostázy ER je klíčové k jeho správnému fungování. ER reaguje na zvýšenou koncentraci nesbalených nebo špatně sbalených proteinů ve svém lumen (ER stres) aktivací intracelulárních signálních drah, souhrnně nazývaných jako „odpověď na nesbalené proteiny“ (*Unfolded Protein Response* – UPR) (Obrázek 3). UPR zastupují tři mechanicky odlišné větve, jenž regulují expresi mnoha genů, které udržují homeostázu v ER nebo spouští apoptózu, pokud stres ER přetrvává. Jedná se o dráhy aktivované transmembránovými receptory PERK (*Protein kinase receptor – like endoplasmic reticulum kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) a IRE1 α (*inositol-requiring enzyme 1 α*) (Cao and Kaufman, 2012). Jejich luminální domény fungují jako senzory ER stresu; za fyziologických podmínek v lumen ER preferenčně interagují s chaperonem GRP78/BiP (*Glucose-regulated protein 78*), čímž je jejich aktivita potlačena. V případě akumulace proteinů v ER je však tato rovnováha vychýlena ve prospěch nesbalených proteinů, BiP se tak uvolní z komplexu se senzory ER stresu a jejich cytosolická doména následně aktivuje signální efektory UPR (Hendershot, 2004; Pfaffenbach and Lee, 2011).

Aktivace UPR vede ke globálnímu utlumení translace, ale zároveň aktivuje transkripční faktory, které zvyšují transkripci genů kódujících chaperony a proteiny ER

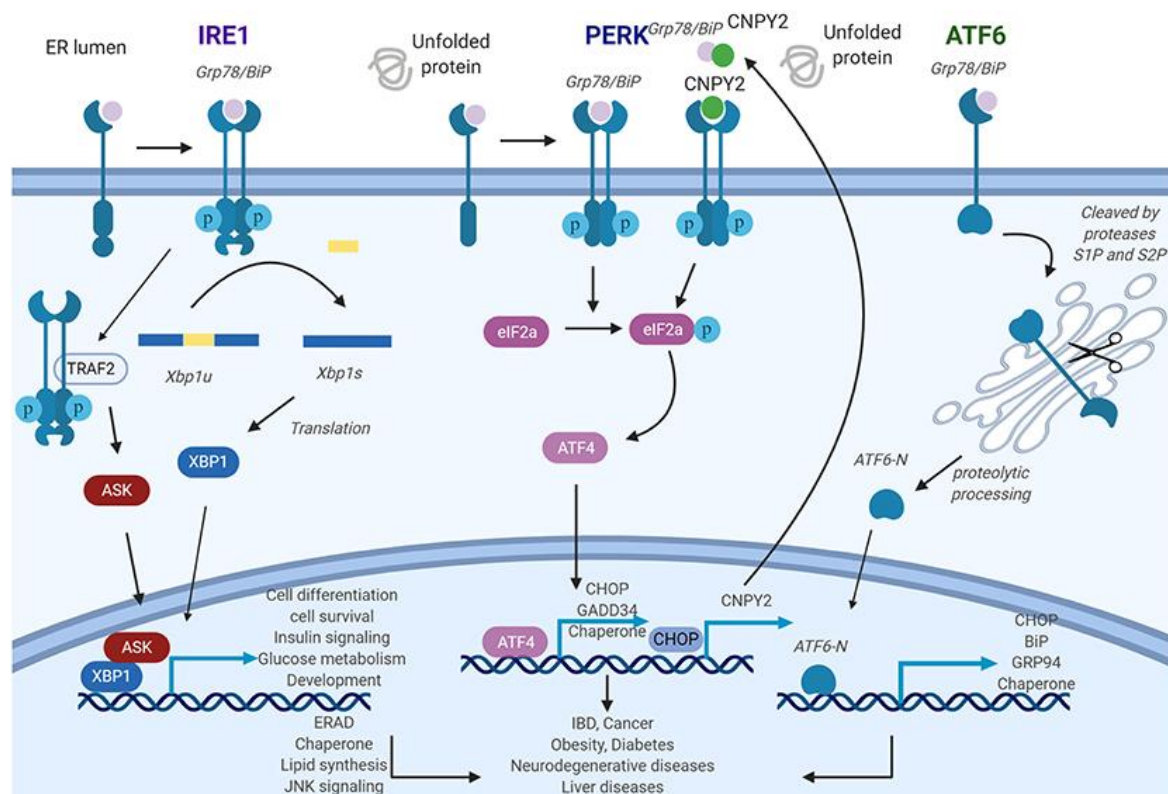
Associated Degradation (ERAD). Prostřednictvím procesu ERAD jsou nesbalené proteiny transportovány z ER do cytosolu a následně ubiquitylovány a degradovány proteazomem 26S (Smith et al., 2011). UPR lze funkčně rozdělit do dvou fází: během rané fáze vzniká protektivní odpověď v rámci které jsou aktivovány adaptační mechanismy zaměřené na obnovení homeostázy ER a snížení jeho zátěže. V případě, že stres přetrvává a přesahuje kompenzační kapacitu buňky, UPR přechází do pozdní proapoptotické fáze, charakterizované aktivací signálních drah vedoucích k programované buněčné smrti (Roller and Maddalo, 2013).

ER stres hraje klíčovou roli v patogenezi různých očních onemocnění, včetně glaukomu, diabetické retinopatie, věkem podmíněné makulární degenerace, *retinitis pigmentosa*, achromatopsie, katarakty, nebo uveálního melanomu. Mechanismy vedoucí k ER stresu zahrnují genetické mutace zodpovědné za vznik aberantních proteinů, epigenetické modifikace, poruchy autofagie, oxidativní stres, mitochondriální dysfunkci a poruchy metabolismu (Chen et al., 2023).

4.1 PERK signální dráha

PERK hraje klíčovou roli v regulaci translace během ER stresu (Obrázek 3). V reakci na ER stres se PERK aktivuje uvolněním BiP z luminální domény, oligomerizuje a následně fosforyluje Ser51α podjednotky eukaryotického iniciačního faktoru 2 (eIF2α) (Walter and Ron, 2011). Ten je součástí ribozomu a jeho fosforylace dočasně utlumuje proteosyntézu a omezuje přísun nově vznikajících proteinů do lumen ER, čímž se snižuje i zátěž ER, jež je důležitá k obnově homeostázy. Fosforylace eIF2α způsobí také iniciaci translace aktivačního transkripčního faktoru 4 (ATF4). Za fyziologických podmínek je translace ATF4 inhibována jeho 5' nepřekládanou oblastí. Při ER stresu však mRNA kódující tento protein uniká inhibici translace způsobené fosforylací eIF2α díky přítomnosti upstream otevřených čtecích rámců v této oblasti. ATF4 je klíčový pro expresi genů zapojených do regulace redoxní rovnováhy, metabolismu aminokyselin, syntézy proteinů, apoptózy a autofagie (Lu et al., 2004; Vattem and Wek, 2004).

ATF4 se zároveň účastní negativní zpětnovazební smyčky pro obnovu proteosyntézy. ATF4 způsobí zvýšení exprese GADD34 (*Growth Arrest and DNA Damage-inducible 34*), regulační podjednotky fosfatázy PP1, která následně defosforyluje p-eIF2 α , čímž obnovuje jeho aktivitu a umožňuje obnovení translace (Novoa et al., 2001). Při přetrvávajícím ER stresu ATF4 zvyšuje expresi proteinu CHOP (*C/EBP-homologous protein*) vazbou na jeho promotor (Harding et al., 2000). CHOP jako transkripční faktor ovlivňuje transkripci jak antiapoptotických genů tak i proapoptotických genů, včetně genů kódujících GADD34 nebo BCL2 (*Apoptosis regulator Bcl-2*) (Hu et al., 2019). CHOP deficientní buňky byly rezistentní k apoptóze způsobené ER stresem (Nam et al., 2015).



Obrázek 3 Schéma ER stresu a UPR

převzato (Li et al., 2020)

PERK také dokáže fosforylovat komplex KEAP-Nrf2, čímž zapříčiní jeho rozpad. Nrf2 poté v jádře funguje jako transkripční faktor (Cullinan et al., 2003). HERPUD1 (*Homocysteine Inducible ER Protein With Ubiquitin Like Domain 1*) je rezidentním

membránovým proteinem ER, který je zapojen v regulaci ubiquitin-ligázového komplexu HRD1 a reguluje degradaci proteinů v ER (Huang et al., 2014). Nrf1 přímo aktivuje expresi HERPUD1 prostřednictvím antioxidačních regulačních elementů (*ARE-like response elements*) (Ho and Chan, 2015).

4.2 IRE1 α signální dráha

IRE1 α je transmembránová protein-kináza, která obsahuje dvě katalytické domény: serin/threonin protein-kinázovou doménu a endoribonukleázovou doménu. Po aktivaci se jednotlivé molekuly IRE1 α oligomerizují a fosforylují, čímž získávají ribonukleázovou funkci. Takto aktivovaný IRE1 α je schopný sestřihu mRNA mj. transkripčního faktoru XBP1 (*X-box binding protein 1*), přičemž se vyštěpí 26-nukleotidový intron, který umožní posun čtecího rámce a vznik aktivní formy transkripčního faktoru XBP1s (Walter and Ron, 2011). XBP1s indukuje transkripci genů kódujících proteiny zapojené v procesech sbalování proteinů, jejich maturaci či export z ER (Yoshida et al., 2001).

ER stres může být také ovlivněn rozpadem mRNA pomocí RIDD (*regulated IRE1-dependent decay*). Pomocí RIDD je snížena hladina anti-apoptotické pre-miRNA, tudíž se zvyšuje transkripce proapoptotické kaspázy-2, která štěpí efektorové kaspázy (například kaspáza-3) a vyústí v apoptózu (Chen and Brandizzi, 2013).

Díky své endonukleázové aktivitě může IRE1 α také aktivovat dráhu c-Jun N-terminální kinázy (JNK) prostřednictvím přímé interakce s TRAF2 (*tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 2*). Tento komplex IRE1 α -TRAF2 následně aktivuje ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), což vede k fosforylaci JNK a indukci apoptózy (Urano et al., 2000).

4.3 ATF6 signální dráha

Když nastane ER stres, dojde k disociaci BiP z ATF6, který se na rozdíl od PERK a IRE1 α aktivuje de-oligomerizací, která obnaží lokalizační sekvenci a umožní translokaci ATF6

do Golgiho aparátu. Tam dochází postupně ke štěpení ATF6 proteázami *site-1 protease* (S1P) and *site-2 protease* (S2P), čímž dojde k odštěpení 50 kDa fragmentu označovaného jako ATF6p50. Jedná se o aktivní formu ATF6, která díky přítomnosti bazického leucinového zipu působí v jádře jako transkripční faktor (Haze et al., 1999). ATF6p50 je zodpovědný za transkripci cílových genů pro chaperony, včetně BiP a GRP94 (*Glucose-regulated protein 94*), dále pak foldáz, CHOP nebo proteinů ERAD (Reimold et al., 2001; Wu et al., 2007). ATF6p50 a XBPs podporují biogenezi ER a Golgiho aparátu, čímž zvyšují sekreční kapacitu buňky při stresu v endoplazmatickém retikulu (Bommiasamy et al., 2009; Shaffer et al., 2004).

4.4 Chemické navození ER stresu

K navození ER stresu v experimentálních podmínkách se běžně využívají chemické látky s různým mechanismem účinku. Jedná se o například inhibitory glykosylace, disruptory vápníkového metabolismu, redukční činidla, nebo látky způsobující hypoxii.

Většina nově syntetizovaných proteinů v ER podléhá posttranslačním modifikacím, které jsou často nezbytné pro jejich maturaci. Na tyto mechanismy cílí první skupina induktorů ER stresu, které inhibují N-glykosylaci. Konkrétním příkladem je tunicamycin, což je antibiotikum produkované *Streptomyces lysosuperificus* a jeho mechanismem účinku je inhibice aktivity enzymu GlcNAc-1-P transferáza (*UDP-N-acetylglucosamine—dolichyl-phosphateN-acetylglucosaminephosphotransferase*), čímž blokuje N-glykosylaci. Méně účinným inhibitorem je také 2-deoxy-D-glukóza (Dorner et al., 1990; Takatsuki et al., 1971).

Další skupinou látek indukujících ER stres jsou disruptory metabolismu vápenatých iontů (Ca^{2+}). Koncentrace Ca^{2+} iontů v ER je vysoká a některé chaperony, jako BiP, jsou na Ca^{2+} závislé. Látky, které tuto homeostázu naruší, vedou k ER stresu. A23187 (vápenatý ionofor) a thapsigargin (inhibitor Ca^{2+} pumpy) jsou běžně používány k modelování ER stresu (Price et al., 1992). Redukční činidla dithiotreitol a 2-merkaptoethanol znemožňují tvorbu disulfidických můstků, čímž vyvolávají ER stres. Hypoxie může být

rovněž indukuje ER stres, předpokládá se, že snížená koncentrace glukózy, způsobená přechodem z aerobní na anaerobní glykolýzu, může inhibovat N-glykosylaci a tím navodit ER stres (Akman et al., 2021).

5 Materiál a metody

5.1 Buněčné kultury

K experimentům byla použita linie imortalizovaných lidských retinálních pigmentovaných epiteliálních buněk hTERT RPE-1 (dále v textu pouze RPE-1); konkrétně její *wild-type* varianta, tři klonální linie nesoucí *knock-out* mutace se ztrátou funkce proteinu BBS10 – 3G1,12D2 a 2B2, jedna linie s *knock-out* mutací se ztrátou funkce proteinu BBS2 a jeho *addback* (*knock-in* BBS2 proteinu fúzovaného s proteinem SYFP2 *super yellow fluorescent protein*; dále v textu BBS2-SYFP) (Prasai et al., 2020). Tyto RPE-1 linie byly připraveny metodou CRISPR/Cas9 a získány pro naši laboratoř od dr. Martiny Huranové (Laboratoř genetiky a patologie řasinek na Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.).

Buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C, 5 % CO₂ v kompletním DMEM/F-12 médiu, které bylo připraveno obohacením DMEM/F-12, GlutaMAX™ supplement média (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, GlutaMAX™ supplement, Gibco™, Thermo Fisher Scientific kat. č. 31331028) o 10 % tepelně ošetřeného fetálního bovinního séra (Thermo Fisher Scientific kat. č. F7524) a směsí penicilinu a streptomycinu (Biosera, kat. č. XC-A4122/100) o výsledné koncentraci penicilin v koncentraci 60,27 mg/l, streptomycin v koncentraci 100 mg/l. Buňky byly pasážovány při dosažení konfluence při koncentraci buněk 2x10⁴ až 4x10⁴ na cm². Buňky byly uvolněny z podkladu odpovídajícím množstvím 1x trypsinu v PBS, kultivovány 10 minut inkubátoru, následně byl trypsin inaktivován přidáním 1,5x množstvím kompletního média. Suspenze buněk byla centrifugována 250 g po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet byl rozesuspendován v 1 ml kompletního média, aby bylo možné stanovit koncentraci buněk pomocí počítací buněk (Beckman Coulter Z2 S Dual Cell Counter Particle Size Analyzer).

5.1.1 Experimenty

RPE-1 buňky byly nasazovány v hustotě 20 000 buněk na cm² a kultivovány 24 h, nebo 48 h dle experimentu. ER stres byl indukován tunicamycinem (Merk, kat. č. T7765); jeho výsledná koncentrace je uvedena u každého experimentu.

U experimentů pro farmaceutickou modulaci ER stresu byly použity chemické chaperony: TUDCA (Sodium tauroursodeoxycholate, Merck, kat. č. T0266-500MG), 4-PBA (4-Phenylbutyric acid, Merck, kat. č. P21005-25G) a TMAO (Trimethylamin N-oxid, Merck, kat. č. 317594-1G). RPE-1 *BBS2*-KO buňky byly nasazeny v hustotě 20 000 buněk na cm² a po 6 h byly vystaveny chemickým chaperonům (TUDCA, 4-PBA nebo TMAO) o výsledných koncentracích 1 mM a 2 mM pro TUDCA a 4-PBA a 4 mM a 8 mM pro TMAO. Po 30 min pre-inkubaci byl přidán tunicamycin o výsledných koncentracích 125 a 312,5 nM. Po 48 h byly vzorky lyzovány.

5.2 Western blot

5.2.1 Příprava vzorků pro Western blot

Médium bylo z jednotlivých jamek odsáto, buňky byly následně opláchnuty roztokem PBS a přemístěny na led, kde byly lyzovány odpovídajícím množstvím 2xLaemmli pufru (Tabulka 1). Lyzační pufr se nechal působit 10 min, následně byly vzorky přeneseny do 1,5 ml zkumavek a denaturovány 8 min při teplotě 95 °C; po uplynutí doby byly vzorky zchlazeny přenesením na led a centrifugovány. Poté byly vzorky připraveny pro nanášení na gel, nebo byly uschovány při teplotě -20 °C k pozdější analýze.

Tabulka 1 2xLaemmlli lyzační pufr

1 M Tris-HCl, pH 6.8	1,25 ml
20% SDS	2,0 ml
Glycerol	2,0 ml
β -merkaptoethanol	1,0 ml
Destilovaná voda (dH ₂ O)	doplnit do 10 ml
Bromfenolová modř	do modrého zbarvení

5.2.2 SDS-PAGE

Samotné gelové elektroforéze předcházela příprava polyakrylamidových gelů o koncentraci 15 % a 10 % (Tabulka 2). Nejprve byly připravena směs na rozdělovací gel, která byla nanášena do formy mezi skla pro přípravu 1,5 mm gelu a převrstvena isopropanolem. Po zatuhnutí byl isopropanol odstraněn, gel opláchnut destilovanou vodou a převrstven směsí na přípravu zaostřovacího gelu. Ke tvorbě jamek byly použity hřebínky.

Takto připravené gely byly vloženy do elektroforetické aparatury (Mini-PROTEAN® Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, kat. č. 1658004), která byla naplněna elektroforetickým pufrem, složení pufru je uvedeno v Tabulka 3. Do jamek bylo nanášeno 25 μ l vzorku, nebo 1 μ l hmotnostního markeru (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™, kat. č. 26620) doplněného 24 μ l 2xLaemmlli pufru. Aparatura byla připojena ke zdroji napětí a elektroforetické rozdělení proteinů probíhalo při 120 V pro zaostřovací gel, respektive 150 V pro rozdělovací gel cca 90 min. Po ukončení elektroforézy byl oddělen zaostřovací gel a rozdělovací gel byl přenesen do přenosového pufru.

Tabulka 2 Složení polyakrylamidových gelů

	10% Rozdělovací gel (8 ml)	15% Rozdělovací gel (8 ml)	6% Zaostrňovací gel 20 ml
ddH ₂ O	14,3 ml	9,3 ml	15,3 ml
Acrylamide/Bis Solution 375:1 (40 % w/v) 26 % (Serva, kat.č. 1068101)	10 ml	15 ml	2,75 ml
Tris (1,5 M, pH 8,8)	15 ml	15 ml	–
Tris (0,5 M, pH 6,8)	–	–	2,63 ml
20% SDS	200 µl	200 µl	105 µl
10% APS	333 µl	333 µl	105 µl
TEMED	16 µl	16 µl	22,5 µl

Tabulka 3 Složení pufrů pro SDS-PAGE a western blot

10× Zásobní pufr (5 l)	Glycin – 720 g Tris – 151,5 g dH ₂ O – doplnit do 5 l
Přenosový pufr (5 l)	10× Zásobní pufr – 500 ml Methanol – 1 l dH ₂ O – 3,5 l
Elektroforetický pufr (10 l)	10× Zásobní pufr – 1 l 20% SDS – 50 ml dH ₂ O – doplnit do 10 l

5.2.3 Western blot a imunodetekce proteinů

Pro detekci proteinů byla použita polyvinylidendifluoridová membrána (Hybond® P Western blotting membranes, PVDF, Amersham™, kat. č. GE10600087), kterou bylo nutné před přenosem hydratovat po dobu 1 min v metanolu, poté byla opláchnuta přenosovým pufrém. Proteiny byly následně western blotem přeneseny na membránu pomocí aparatury (Criterion™ Blotter, Bio-Rad, kat. č. #1704071), která byla připojena ke zdroji napětí. Přenos probíhal při 105 V 75 min, pro přenos štěpených kaspáz byla doba přenosu upravena na 90 min, hodnota napětí zůstala shodná 105 V.

Po dokončení přenosu byly membrány blokovány v roztoku 5 % odtučněného mléka v TBS-Tween pufru po dobu 1 h na třepačce. TBS-Tween pufr byl připraven

smícháním 0,5 l zásobního roztoku 20x TBS-Tween pufru (složení udává Tabulka 4) s 9,5 l dH₂O. Poté byly membrány přesunuty do 50 ml zkumavky s 4 ml roztoku primární protilátky v 5 % odtučněném mléku v TBS-Tween pufru. Za kontinuálního rotování na rolleru byly membrány inkubovány při teplotě 4 °C přes noc. Seznam použitých primárních protilátek s příslušným ředěním je uveden v Tabulka 5.

Druhý den byly membrány vyjmuty z roztoku primárních protilátek a 3x po 5 minutách promyty v TBS-Tween pufru. Následně byly po dobu 1 h inkubovány v sekundární protilátce konjugované s křenovou peroxidázou (Anti-Mouse IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in sheep, kat. č. A6782; nebo Anti-Mouse IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in sheep kat. č. A5906, obě Sigma-Aldrich) v ředění 1:5 000. Po hodinové inkubaci následovalo odmytí nenavázaných protilátek TBS-Tween pufru 3x po dobu 15 min.

Poté byly membrány připravené na samotnou detekci proteinů. Pro detekci nanášecí kontroly (β -aktin) byl využit chemiluminiscenční substrát Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific™, kat. č. 32209), k detekci markerů ER stresu byl použit substrát SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific™, kat. č. 34095). Chemiluminiscence byla snímána detekčním systémem FUSION Solo S (Vilber) a zpracována softwarem FUSION (Vilber).

Relativní množství sledovaných markerů ER stresu bylo denzitometricky stanoveno pomocí softwaru FIJI ImageJ (<https://imagej.net>). Pro normalizaci exprese byl použit β -aktin nebo γ -tubulin.

Tabulka 4 Složení TBS-Tween pufru

20x TBS-Tween pufr	
NaCl	700 g
Tween 20	80 ml
2M TRIS, pH 7,	500 ml
dH ₂ O	doplnit do 5 L

Tabulka 5 Seznam primárních protilátek pro western blot

Název protilátky	Klon	Katalogové číslo	Výrobce	Ředění	Hostitelský druh
ATF4	D4B8	#11815	Cell Signaling Technology	1:1000	Králík
ATF6	D4Z8V	#65880	Cell Signaling Technology	1:1000	Králík
β-Aktin	8H10D10	#3700	Cell Signaling Technology	1:1000	Myš
BiP (GRP78)	C50B12	#3177	Cell Signaling Technology	1:1000	Králík
HERPUD1	Polyklo-nální	#26730	Proteintech	1:1000	Králík
IRE1α	14C10	#3294	Cell Signaling Technology	1:1000	Králík
PERK	C33E10	#3192	Cell Signaling Technology	1:1000	Králík
Štěpená kaspáza-3	Asp175	#9661	Cell Signaling Technology	1:1000	Králík
GRP94	9G10	#2104	Cell Signaling Technology	1:1000	Králík
GADD34	D9C8	#41222	Cell Signaling Technology	1:1000	Králík
phospho-eIF2α (Ser51)	119A11	#3398	Cell Signaling Technology	1:1000	Králík

5.3 Imunocytochemie

Buňky byly nasazeny do 24-jamkové destičky s vloženým 10 mm krycím sklíčkem. Do každé jamky bylo nasazeno 65 000 buněk, po 6 h bylo médium odsáto a nahrazeno

médiem bez FBS. Buňky byly kultivovány 48 h za standardních kultivačních podmínek (5% CO₂, 37 °C), což umožnilo synchronizaci buněčného cyklu buněk v G0/G1 fázi a tvorbu primárních cílů.

Po 48 h bylo médium z jamek odsáto a buňky byly fixovány ledovým 4% paraformaldehydem po dobu 15 min, poté byly buňky promyty 1x PBS 3x po 5 min (1x PBS bez Ca/Mg ROTI@Cell, kat. č. 9143.2). Následovala permeabilizace buněk, která byla provedena roztokem 0,1 % Tritonu X-100 v 1x PBS po dobu 5 min. Krycí sklíčka byla znovu opláchnuta roztokem 1x PBS 3x po dobu 5 min a přenesena na hydrofobní povrch a převrstvena roztokem 10 % koňského séra v 1x PBS a inkubována ve vlhké komoře po dobu 1 h při pokojové teplotě za účelem minimalizace nespecifických vazeb protilátek. Poté bylo 10 % koňské sérum nahrazeno roztokem primárních protilátek v 5 % koňském séru v 1x PBS a inkubováno ve vlhké komoře při teplotě 4 °C přes noc. Seznam použitých primárních protilátek a jejich přesné ředění je uvedeno v Tabulka 6.

Následující den byl roztok primárních protilátek odstraněn a sklíčka byla třikrát promyta roztokem 1x PBS po dobu 5 minut, aby se odstranily nenavázané protilátky. Následovala inkubace se sekundárními protilátkami, která probíhala po dobu 1 h při pokojové teplotě ve tmavé vlhké komoře. Sekundární protilátky byly ředěny v poměru 1:500 v roztoku 1x PBS. Po hodinové inkubaci následovalo promytí roztokem 1x PBS 3x 5 min. Takto připravená krycí sklíčka mohla být použita k výrobě preparátů. Na sklíčka bylo nanášeno 15 µl montovacího média Mowiolu (Mowiol® 40-88, Sigma-Aldrich, kat. č. 324590) (Tabulka 7), přebytečné médium bylo odstraněno a preparáty byly ponechány k vytvrzení 30 min při pokojové teplotě a ve tmě; dlouhodobě byly preparáty skladovány při teplotě 4 °C.

Preparáty byly snímány konfokálním mikroskopem LSM 700 (Laser scanning confocal microscope LSM 700, Carl Zeiss Microscopy GmbH) a softwarem ZEN Black (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Byl použit imerzní objektiv 63x, Plan-Apochromat, Oil. Z-stacks byl nastaven na vzdálenost 0,3 µm mezi jednotlivými řezy.

Tabulka 6 Seznam primárních protilátek pro imunocytochemii

Název protilátky	Klon / Popis	Katalogové číslo	Výrobce	Ředění	Hostitelský druh
ARL13B	Polyklonální	17711-1-AP	Proteintech	1:500	Králík
ARL13B	C-5	sc-515784	Santa Cruz Biotechnology	1:750	Myš
Acetylated- α -tubulin	6-11B-1	MABT868	Merck Millipore	1:500	Myš
Pericentrin	Polyklonální	ab4448	Abcam	1:500	Králík

Tabulka 7 Složení montovacího média

4 % Mowiol	
Mowiol 40-88	2,4 g
Glycerol (99,5 %)	4,76 ml
Destilovaná voda (dH ₂ O)	6 ml
0,2 M Tris-HCl pufr, pH 8,5	12,5 ml
DABCO (1,4-diazabicyklo-2,2,2-oktan)	0,675 g
DAPI	1 : 5 000

5.3.1 Měření vzdáleností na konfokálních snímcích v programu FIJI ImageJ

Délka primárních cilií byla měřena pomocí softwaru FIJI ImageJ (<https://imagej.net> s předinstalovanými pluginy). Ke zpracování byly použity snímky získané konfokální mikroskopií ve formátu CZI, který obsahuje metainformace o rozlišení, nutné k nastavení měřítka. Pro samotné měření byl použit plugin View5D (Rainer Heintzmann, King's College London, UK), který umožňuje zobrazovat a procházet až pětirozměrné datové sady. Pomocí nástroje *Straight Line Tool* byla vyznačena úsečka v délce signálu ARL13B, respektive acetylovaného tubulinu. Po vyznačení linie byla vzdálenost odečtena pomocí funkce *Measure*, přičemž výstup byl zaznamenán do tabulky.

5.3.2 Měření intenzity fluorescence v programu FIJI ImageJ

K analýze intenzity fluorescence specifických signálů na konfokálních snímcích byl použit software FIJI ImageJ. Po otevření jednotlivých CZI souborů byly snímky dle potřeby převedeny do 16bitového režimu. Měření bylo provedeno na nesaturovaných

snímcích, které nebyly upravovány. K vyhodnocení intenzity signálu byly nejprve definovány oblasti zájmu (*Regions of Interest*, ROI) poloautomaticky pomocí *Threshold* (nastavením intenzitního prahu a segmentací cílové oblasti) v kanálu pro acetylovaný tubulin. Následně byla v kanálu pro signál ARL13B měřena intenzita fluorescenčního signálu za účelem určení veličin: průměrná intenzita a integrovaná densita.

Průměrná intenzita představuje průměrnou hodnotu intenzity pixelů v rámci zvoleného výběru (ROI). Hodnota udává, jak silný je signál v průměru, bez ohledu na velikost oblasti. Integrovaná densita se vypočítává jako součin průměrné intenzity a plochy výběru. Tato hodnota reprezentuje celkové množství signálu v dané oblasti. Hodnoty jsou udané v jednotkách AU v případě průměrné intenzity, $\text{AU} \times \mu\text{m}^2$ pro integrovanou densitu.

Obě hodnoty byly získány pomocí funkce *Measure* a automaticky zaznamenány do výstupní tabulky *Results*. Všechny hodnoty byly dále exportovány statistické zpracování. Pro srovnání mezi různými podmínkami byly intenzity normalizovány vůči pozadí, měřenému ve stejné rovině mimo oblast primárního cília.

6 Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce je charakterizace primárních cílů a ER stresu u buněčných modelů BBS a následná farmakologická modulace stresové odpovědi pomocí malých molekul. K dosažení tohoto cíle jsme si stanovili následující dílčí cíle:

- 1 Charakterizace primárních cílů *BBS10*-KO RPE-1 pomocí imunocytochemického barvení pro účely validace buněčného modelu. Model *BBS2*-KO s jeho addbackem *BBS2*-SYFP byl v tomto smyslu již popsán (Prasai et al., 2020) a je v laboratoři zaveden.
- 2 Stanovení bazálního ER stresu v RPE-1 buňkách s *knock-out* mutací v genu *BBS10*.
- 3 Stanovení fenotypu *BBS*-KO buněk v reakci na farmakologicky indukovaný ER stres a identifikace možných terapeutických cílů.
- 4 Cílení na BBS patologii pomocí modulátorů ER stresu.

7 Výsledky

8 Diskuze

9 Souhrn

10 Summary

Použité zdroje

- Abu-Safieh, L., Al-Anazi, S., Al-Abdi, L., Hashem, M., Alkuraya, H., Alamr, M., Sirelkhatim, M.O., Al-Hassnan, Z., Alkuraya, B., Mohamed, J.Y., Al-Salem, A., Alrashed, M., Fageih, E., Softah, A., Al-Hashem, A., Wali, S., Rahbeeni, Z., Alsayed, M., Khan, A.O., Al-Gazali, L., Taschner, P.E.M., Al-Hazaa, S., Alkuraya, F.S., 2012. In search of triallelism in Bardet-Biedl syndrome. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 20, 420–427. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.205>
- Adams, N.A., Awadein, A., Toma, H.S., 2007. The Retinal Ciliopathies. *Ophthalmic Genet.* <https://doi.org/10.1080/13816810701537424>
- Akman, M., Belisario, D.C., Salaroglio, I.C., Kopecka, J., Donadelli, M., De Smaele, E., Riganti, C., 2021. Hypoxia, endoplasmic reticulum stress and chemoresistance: dangerous liaisons. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 40, 28. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01824-3>
- Alieva, I.B., Vorobjev, I.A., 2004. Vertebrate primary cilia: a sensory part of centrosomal complex in tissue cells, but a “sleeping beauty” in cultured cells? *Cell Biol. Int.* 28, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2003.11.013>
- Álvarez-Satta, M., Castro-Sánchez, S., Valverde, D., 2017. Bardet-Biedl Syndrome as a Chaperonopathy: Dissecting the Major Role of Chaperonin-Like BBS Proteins (BBS6-BBS10-BBS12). *Front. Mol. Biosci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00055>
- Anken, E. van, and Braakman, I., 2005. Versatility of the Endoplasmic Reticulum Protein Folding Factory. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40, 191–228. <https://doi.org/10.1080/10409230591008161>
- Anosov, M., Birk, R., 2019. Bardet-Biedl syndrome obesity: BBS4 regulates cellular ER stress in early adipogenesis. *Mol. Genet. Metab.* 126, 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.03.006>
- Ansley, S.J., Badano, J.L., Blacque, O.E., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Chul Kim, J., Ross, A.J., Eichers, E.R., Teslovich, T.M., Mah, A.K., Johnsen, R.C., Cavender, J.C., Alan Lewis, R., Leroux, M.R., Beales, P.L., Katsanis, N., 2003. Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425, 628–633. <https://doi.org/10.1038/nature02030>
- Anvarian, Z., Mykityn, K., Mukhopadhyay, S., Pedersen, L.B., Christensen, S.T., 2019. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 15, 199–219. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0116-9>

- Badano, J.L., Ansley, S.J., Leitch, C.C., Lewis, R.A., Lupski, J.R., Katsanis, N., 2003. Identification of a Novel Bardet-Biedl Syndrome Protein, BBS7, That Shares Structural Features with BBS1 and BBS2. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 650–658. <https://doi.org/10.1086/368204>
- Barbelanne, M., Hossain, D., Chan, D.P., Peränen, J., Tsang, W.Y., 2015. Nephrocystin proteins NPHP5 and Cep290 regulate BBSome integrity, ciliary trafficking and cargo delivery. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2185–2200. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu738>
- Beales, P.L., Elcioglu, N., Woolf, A.S., Parker, D., Flintner, F.A., 1999. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J. Med. Genet.* 36, 437–446.
- Beales, P.L., Warner, A.M., Hitman, G.A., Thakker, R., Flintner, F.A., 1997. Bardet-Biedl syndrome: a molecular and phenotypic study of 18 families. *J. Med. Genet.* 34, 92–98. <https://doi.org/10.1136/jmg.34.2.92>
- Berberi, N.F., Lewis, J.S., Bishop, G.A., Askwith, C.C., Mykityn, K., 2008. Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 4242–4246. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711027105>
- Bloodgood, R.A., 2009. Chapter 1 - From Central to Rudimentary to Primary: The History of an Underappreciated Organelle Whose Time Has Come. The Primary Cilium, in: Sloboda, R.D. (Ed.), *Methods in Cell Biology, Primary Cilia*. Academic Press, pp. 2–52. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)94001-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)94001-2)
- Bommiasamy, H., Back, S.H., Fagone, P., Lee, K., Meshinchi, S., Vink, E., Sriburi, R., Frank, M., Jackowski, S., Kaufman, R.J., Brewer, J.W., 2009. ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 122, 1626–1636. <https://doi.org/10.1242/jcs.045625>
- Braakman, I., Hebert, D.N., 2013. Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a013201. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013201>
- Braun, D.A., Hildebrandt, F., 2017. Ciliopathies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a028191. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028191>
- Brun, A., Yu, X., Obringer, C., Ajoy, D., Haser, E., Stoetzel, C., Roux, M.J., Messaddeq, N., Dollfus, H., Marion, V., 2019. In vivo phenotypic and molecular characterization of retinal degeneration in mouse models of three ciliopathies. *Exp. Eye Res.* 186, 107721. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107721>

- Cantagrel, V., Silhavy, J.L., Bielas, S.L., Swistun, D., Marsh, S.E., Bertrand, J.Y., Audollent, S., Attié-Bitach, T., Holden, K.R., Dobyns, W.B., Traver, D., Al-Gazali, L., Ali, B.R., Lindner, T.H., Caspary, T., Otto, E.A., Hildebrandt, F., Glass, I.A., Logan, C.V., Johnson, C.A., Bennett, C., Brancati, F., International Joubert Syndrome Related Disorders Study Group, Valente, E.M., Woods, C.G., Gleeson, J.G., 2008. Mutations in the cilia gene ARL13B lead to the classical form of Joubert syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.06.023>
- Cao, S.S., Kaufman, R.J., 2012. Unfolded protein response. *Curr. Biol.* CB 22, R622–626. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.004>
- Chang, C.-F., Schock, E.N., Attia, A.C., Stottmann, R.W., Brugmann, S.A., 2015. Chapter Four - The Ciliary Baton: Orchestrating Neural Crest Cell Development, in: Trainor, P.A. (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology, Neural Crest and Placodes*. Academic Press, pp. 97–134. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2014.11.004>
- Chawan, V., Yevate, S., Gajbhiye, R., Kulkarni, V., Parte, P., 2020. Acetylation/deacetylation and microtubule associated proteins influence flagellar axonemal stability and sperm motility. *Biosci. Rep.* 40, BSR20202442. <https://doi.org/10.1042/BSR20202442>
- Chen, S., Henderson, A., Petriello, M.C., Romano, K.A., Gearing, M., Miao, J., Schell, M., Sandoval-Espinola, W.J., Tao, J., Sha, B., Graham, M., Crooke, R., Kleinriders, A., Balskus, E.P., Rey, F.E., Morris, A.J., Biddinger, S.B., 2019. Trimethylamine N-Oxide Binds and Activates PERK to Promote Metabolic Dysfunction. *Cell Metab.* 30, 1141–1151.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.021>
- Chen, X., Shi, C., He, M., Xiong, S., Xia, X., 2023. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduct. Target. Ther.* 8, 1–40. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01570-w>
- Chen, Y., Brandizzi, F., 2013. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol.* 23, 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.06.005>
- Chhatre, A., Stepanek, L., Nievergelt, A.P., Alvarez Viar, G., Diez, S., Pigino, G., 2025. Tubulin tyrosination/detyrosination regulate the affinity and sorting of intraflagellar transport trains on axonemal microtubule doublets. *Nat. Commun.* 16, 1055. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56098-0>
- Chiang, A.P., Beck, J.S., Yen, H.-J., Tayeh, M.K., Scheetz, T.E., Swiderski, R.E., Nishimura, D.Y., Braun, T.A., Kim, K.-Y.A., Huang, J., Elbedour, K., Carmi, R., Slusarski, D.C., Casavant, T.L., Stone, E.M., Sheffield, V.C., 2006. Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 6287–6292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600158103>

- Coco-Martin, R.M., Pastor-Idoate, S., Pastor, J.C., 2021. Cell Replacement Therapy for Retinal and Optic Nerve Diseases: Cell Sources, Clinical Trials and Challenges. *Pharmaceutics* 13, 865. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060865>
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., Diehl, J.A., 2003. Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7198–7209. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.20.7198-7209.2003>
- Denniston, A.K., Beales, P.L., Tomlins, P.J., Good, P., Langford, M., Foggensteiner, L., Williams, D., Tsaloumas, M.D., 2014. EVALUATION OF VISUAL FUNCTION AND NEEDS IN ADULT PATIENTS WITH BARDET–BIEDL SYNDROME. *RETINA* 34, 2282. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000000222>
- Dollfus, H., Lilien, M.R., Maffei, P., Verloes, A., Muller, J., Bacci, G.M., Cetiner, M., van den Akker, E.L.T., Grudzinska Pechhacker, M., Testa, F., Lacombe, D., Stokman, M.F., Simonelli, F., Gouronc, A., Gavard, A., van Haelst, M.M., Koenig, J., Rossignol, S., Bergmann, C., Zacchia, M., Leroy, B.P., Mosbah, H., Van Eerde, A.M., Mekahli, D., Servais, A., Poitou, C., Valverde, D., 2024. Bardet-Biedl syndrome improved diagnosis criteria and management: Inter European Reference Networks consensus statement and recommendations. *Eur. J. Hum. Genet.* 32, 1347–1360. <https://doi.org/10.1038/s41431-024-01634-7>
- Dombrowski, F., Stieger, B., Beuers, U., 2006. Tauroursodeoxycholic acid inserts the bile salt export pump into canalicular membranes of cholestatic rat liver. *Lab. Invest.* 86, 166–174. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700371>
- Dorner, A.J., Wasley, L.C., Raney, P., Haugejorden, S., Green, M., Kaufman, R.J., 1990. The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion. *J. Biol. Chem.* 265, 22029–22034. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45843-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45843-7)
- Ezratty, E.J., Stokes, N., Chai, S., Shah, A.S., Williams, S.E., Fuchs, E., 2011. A role for the primary cilium in Notch signaling and epidermal differentiation during skin development. *Cell* 145, 1129–1141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.030>
- Farag, T.I., Teebi, A.S., 1989. High incidence of Bardet Biedl syndrome among the Bedouin. *Clin. Genet.* 36, 463–464. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1989.tb03378.x>
- Forsyth, R., Gunay-Aygun, M., 1993. Bardet-Biedl Syndrome Overview, in: Adam, M.P., Feldman, J., Mirzaa, G.M., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Forsythe, E., Beales, P.L., 2013. Bardet-Biedl syndrome. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 21, 8–13. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.115>

- Fu, W., Asp, P., Canter, B., Dynlacht, B.D., 2014. Primary cilia control hedgehog signaling during muscle differentiation and are deregulated in rhabdomyosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 9151–9156.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1323265111>
- Gadadhar, S., Dadi, H., Bodakuntla, S., Schnitzler, A., Bièche, I., Rusconi, F., Janke, C., 2017. Tubulin glycylation controls primary cilia length. *J. Cell Biol.* 216, 2701–2713. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612050>
- Gani, A.R., Uppala, J.K., Ramaiah, K.V.A., 2015. Tauroursodeoxycholic acid prevents stress induced aggregation of proteins *in vitro* and promotes PERK activation in HepG2 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 568, 8–15.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.031>
- Garcia-Gonzalo, F.R., Reiter, J.F., 2017. Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a028134. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028134>
- Goetz, S.C., Liem, K.F., Anderson, K.V., 2012. The Spinocerebellar Ataxia-Associated Gene Tau Tubulin Kinase 2 Controls the Initiation of Ciliogenesis. *Cell* 151, 847–858. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.010>
- Guzmán Mendoza, N.A., Homma, K., Osada, H., Toda, E., Ban, N., Nagai, N., Negishi, K., Tsubota, K., Ozawa, Y., 2021. Neuroprotective Effect of 4-Phenylbutyric Acid against Photo-Stress in the Retina. *Antioxidants* 10, 1147.
<https://doi.org/10.3390/antiox10071147>
- Habbig, S., Bartram, M.P., Müller, R.U., Schwarz, R., Andriopoulos, N., Chen, S., Sägmüller, J.G., Hoehne, M., Burst, V., Liebau, M.C., Reinhardt, H.C., Benzing, T., Schermer, B., 2011. NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *J. Cell Biol.* 193, 633–642. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009069>
- Hamel, C.P., 2007. Cone rod dystrophies. *Orphanet J. Rare Dis.* 2, 7.
<https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-7>
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., Ron, D., 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6, 1099–1108. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00108-8)
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K., 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 10, 3787–3799.
<https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787>

- Hendershot, L.M., 2004. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 71, 289–297.
- Hjortshøj, T.D., Grønskov, K., Brøndum-Nielsen, K., Rosenberg, T., 2009. A novel founder BBS1 mutation explains a unique high prevalence of Bardet-Biedl syndrome in the Faroe Islands. *Br. J. Ophthalmol.* 93, 409–413.
<https://doi.org/10.1136/bjo.2007.131110>
- Ho, D.V., Chan, J.Y., 2015. Induction of Herpud1 expression by ER stress is regulated by Nrf1. *FEBS Lett.* 589, 615–620. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.01.026>
- Hong, S.-R., Wang, C.-L., Huang, Y.-S., Chang, Yu-Chen, Chang, Ya-Chu, Pusapati, G.V., Lin, C.-Y., Hsu, N., Cheng, H.-C., Chiang, Y.-C., Huang, W.-E., Shaner, N.C., Rohatgi, R., Inoue, T., Lin, Y.-C., 2018. Spatiotemporal manipulation of ciliary glutamylation reveals its roles in intraciliary trafficking and Hedgehog signaling. *Nat. Commun.* 9, 1732. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03952-z>
- Horwitz, A., Birk, R., 2021. BBS4 Is Essential for Nuclear Transport of Transcription Factors Mediating Neuronal ER Stress Response. *Mol. Neurobiol.* 58, 78–91.
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-02104-z>
- Hsu, Y., Bhattarai, S., Thompson, J.M., Mahoney, A., Thomas, J., Mayer, S.K., Datta, P., Garrison, J., Searby, C.C., Vandenberghe, L.H., Seo, S., Sheffield, V.C., Drack, A.V., 2023. Subretinal gene therapy delays vision loss in a Bardet-Biedl Syndrome type 10 mouse model. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 31, 164–181.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.12.007>
- Hsu, Y., Seo, S., Sheffield, V.C., 2021. Photoreceptor cilia, in contrast to primary cilia, grant entry to a partially assembled BBSome. *Hum. Mol. Genet.* 30, 87–102.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa284>
- Hu, H., Tian, M., Ding, C., Yu, S., 2019. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front. Immunol.* 9, 3083.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03083>
- Huang, C.-H., Chu, Y.-R., Ye, Y., Chen, X., 2014. Role of HERP and a HERP-related Protein in HRD1-dependent Protein Degradation at the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 289, 4444–4454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.519561>
- Huangfu, D., Liu, A., Rakean, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., Anderson, K.V., 2003. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426, 83–87. <https://doi.org/10.1038/nature02061>

- Ishikawa, H., Marshall, W.F., 2011. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 222–234. <https://doi.org/10.1038/nrm3085>
- Jiang, H., Xiong, S., Xia, X., 2014. Chemical chaperone 4-phenylbutyrate prevents endoplasmic reticulum stress induced by T17M rhodopsin. *Cell Biosci.* 4, 75. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-75>
- Jiang, J., Reho, J.J., Bhattarai, S., Cherascu, I., Hedberg-Buenz, A., Meyer, K.J., Tayyari, F., Rauckhorst, A.J., Guo, D.F., Morgan, D.A., Taylor, E.B., Anderson, M.G., Drack, A.V., Rahmouni, K., 2021. Endothelial BBSome is essential for vascular, metabolic, and retinal functions. *Mol. Metab.* 53, 101308. <https://doi.org/10.1016/j.mol-met.2021.101308>
- Jin, H., White, S.R., Shida, T., Schulz, S., Aguiar, M., Gygi, S.P., Bazan, J.F., Nachury, M.V., 2010. The Conserved Bardet-Biedl Syndrome Proteins Assemble a Coat that Traffics Membrane Proteins to Cilia. *Cell* 141, 1208–1219. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.015>
- Kennedy, D., Samali, A., Jäger, R., 2015. Methods for studying ER stress and UPR markers in human cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1292, 3–18. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2522-3_1
- Kinnebrew, M., Iverson, E.J., Patel, B.B., Pusapati, G.V., Kong, J.H., Johnson, K.A., Luchetti, G., Eckert, K.M., McDonald, J.G., Covey, D.F., Siebold, C., Radhakrishnan, A., Rohatgi, R., 2019. Cholesterol accessibility at the ciliary membrane controls hedgehog signaling. *eLife* 8, e50051. <https://doi.org/10.7554/eLife.50051>
- Klein, D., Ammann, F., 1969. The syndrome of Laurence-Moon-Bardet-Biedl and allied diseases in Switzerland. Clinical, genetic and epidemiological studies. *J. Neurol. Sci.* 9, 479–513. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(69\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0022-510x(69)90091-4)
- Klink, B.U., Zent, E., Juneja, P., Kuhlee, A., Raunser, S., Wittinghofer, A., 2017. A recombinant BBSome core complex and how it interacts with ciliary cargo. *eLife* 6, e27434. <https://doi.org/10.7554/eLife.27434>
- Kusaczuk, M., 2019. Tauroursodeoxycholate—Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives. *Cells* 8, 1471. <https://doi.org/10.3390/cells8121471>
- Lechtreck, K.F., 2015. IFT-Cargo Interactions and Protein Transport in Cilia. *Trends Biochem. Sci.* 40, 765–778. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.09.003>
- Lee, Y.Y., Hong, S.H., Lee, Y.J., Chung, S.S., Jung, H.S., Park, S.G., Park, K.S., 2010. Tauroursodeoxycholate (TUDCA), chemical chaperone, enhances function of islets

by reducing ER stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 735–739.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.022>

Li, A., Song, N.-J., Riesenberger, B.P., Li, Z., 2020. The Emerging Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Balancing Immunity and Tolerance in Health and Diseases: Mechanisms and Opportunities. *Front. Immunol.* 10.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03154>

Li, J.B., Gerdes, J.M., Haycraft, C.J., Fan, Y., Teslovich, T.M., May-Simera, H., Li, H., Blacque, O.E., Li, L., Leitch, C.C., Lewis, R.A., Green, J.S., Parfrey, P.S., Leroux, M.R., Davidson, W.S., Beales, P.L., Guay-Woodford, L.M., Yoder, B.K., Stormo, G.D., Katsanis, N., Dutcher, S.K., 2004. Comparative Genomics Identifies a Flagellar and Basal Body Proteome that Includes the *BBS5* Human Disease Gene. *Cell* 117, 541–552.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00450-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00450-7)

Li, L., Ran, J., 2024. Regulation of ciliary homeostasis by intraflagellar transport-independent kinesins. *Cell Death Dis.* 15, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06428-9>

Lu, P.D., Harding, H.P., Ron, D., 2004. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* 167, 27–33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408003>

Marion, V., Stoetzel, C., Schlicht, D., Messaddeq, N., Koch, M., Flori, E., Danse, J.M., Mandel, J.-L., Dollfus, H., 2009. Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1820–1825. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812518106>

Mary, L., Chennen, K., Stoetzel, C., Antin, M., Leuvrey, A., Nourisson, E., Alanio-Detton, E., Antal, M.C., Attié-Bitach, T., Bouvagnet, P., Bouvier, R., Buenerd, A., Clémenson, A., Devisme, L., Gasser, B., Gilbert-Dussardier, B., Guimiot, F., Khau Van Kien, P., Leroy, B., Loget, P., Martinovic, J., Pelluard, F., Perez, M.-J., Petit, F., Pinson, L., Rooryck-Thambo, C., Poch, O., Dollfus, H., Schaefer, E., Muller, J., 2019. Bardet-Biedl syndrome: Antenatal presentation of forty-five fetuses with biallelic pathogenic variants in known Bardet-Biedl syndrome genes. *Clin. Genet.* 95, 384–397.
<https://doi.org/10.1111/cge.13500>

Mockel, A., Obringer, C., Hakvoort, T.B.M., Seeliger, M., Lamers, W.H., Stoetzel, C., Dollfus, H., Marion, V., 2012. Pharmacological Modulation of the Retinal Unfolded Protein Response in Bardet-Biedl Syndrome Reduces Apoptosis and Preserves Light Detection Ability. *J. Biol. Chem.* 287, 37483–37494.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386821>

Moore, S.J., Green, J.S., Fan, Y., Bhogal, A.K., Dicks, E., Fernandez, B.A., Stefanelli, M., Murphy, C., Cramer, B.C., Dean, J.C.S., Beales, P.L., Katsanis, N., Bassett, A.S.,

- Davidson, W.S., Parfrey, P.S., 2005. Clinical and genetic epidemiology of Bardet-Biedl syndrome in Newfoundland: a 22-year prospective, population-based, cohort study. *Am. J. Med. Genet. A* 132A, 352–360.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30406>
- Mykytyn, K., Braun, T., Carmi, R., Haider, N.B., Searby, C.C., Shastri, M., Beck, G., Wright, A.F., Iannaccone, A., Elbedour, K., Riise, R., Baldi, A., Raas-Rothschild, A., Gorman, S.W., Duhl, D.M., Jacobson, S.G., Casavant, T., Stone, E.M., Sheffield, V.C., 2001. Identification of the gene that, when mutated, causes the human obesity syndrome BBS4. *Nat. Genet.* 28, 188–191. <https://doi.org/10.1038/88925>
- Nam, D.-H., Han, J.-H., Lee, T.-J., Shishido, T., Lim, J.H., Kim, G.-Y., Woo, C.-H., 2015. CHOP deficiency prevents methylglyoxal-induced myocyte apoptosis and cardiac dysfunction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 85, 168–177.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.05.016>
- Nguyen, A.M., Young, Y.-N., Jacobs, C.R., 2015. The primary cilium is a self-adaptable, integrating nexus for mechanical stimuli and cellular signaling. *Biol. Open* 4, 1733–1738. <https://doi.org/10.1242/bio.014787>
- Niederlova, V., Modrak, M., Tsyklauri, O., Huranova, M., Stepanek, O., 2019. Meta-analysis of genotype-phenotype associations in Bardet-Biedl syndrome uncovers differences among causative genes. *Hum. Mutat.* 40, 2068–2087.
<https://doi.org/10.1002/humu.23862>
- Nishimura, D.Y., Fath, M., Mullins, R.F., Searby, C., Andrews, M., Davis, R., Andorf, J.L., Mykytyn, K., Swiderski, R.E., Yang, B., Carmi, R., Stone, E.M., Sheffield, V.C., 2004. Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16588–16593. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405496101>
- Nishimura, D.Y., Searby, C.C., Carmi, R., Elbedour, K., Van Maldergem, L., Fulton, A.B., Lam, B.L., Powell, B.R., Swiderski, R.E., Bugge, K.E., Haider, N.B., Kwitek-Black, A.E., Ying, L., Duhl, D.M., Gorman, S.W., Heon, E., Iannaccone, A., Bonneau, D., Biesecker, L.G., Jacobson, S.G., Stone, E.M., Sheffield, V.C., 2001. Positional cloning of a novel gene on chromosome 16q causing Bardet-Biedl syndrome (BBS2). *Hum. Mol. Genet.* 10, 865–874. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.8.865>
- Nishimura, D.Y., Swiderski, R.E., Searby, C.C., Berg, E.M., Ferguson, A.L., Hennekam, R., Merin, S., Weleber, R.G., Biesecker, L.G., Stone, E.M., Sheffield, V.C., 2005. Comparative Genomics and Gene Expression Analysis Identifies *BBS9*, a New Bardet-Biedl Syndrome Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 1021–1033.
<https://doi.org/10.1086/498323>

- Nita, A., Abraham, S.P., Elrefaay, E.R., Fafilek, B., Cizkova, E., Ursachi, V.C., Gudernova, I., Koudelka, A., Dudeja, P., Gregor, T., Feketova, Z., Rico, G., Svozilova, K., Celiker, C., Czyrek, A.A., Barta, T., Trantirek, L., Wiedlocha, A., Krejci, P., Bosakova, M., 2025. FGFR2 residence in primary cilia is necessary for epithelial cell signaling. *J. Cell Biol.* 224, e202311030. <https://doi.org/10.1083/jcb.202311030>
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., Ron, D., 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J. Cell Biol.* 153, 1011–1022. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.1011>
- Nozaki, S., Katoh, Y., Terada, M., Michisaka, S., Funabashi, T., Takahashi, S., Kontani, K., Nakayama, K., 2017. Regulation of ciliary retrograde protein trafficking by the Joubert syndrome proteins ARL13B and INPP5E. *J. Cell Sci.* 130, 563–576. <https://doi.org/10.1242/jcs.197004>
- Patel, M.M., Tsiokas, L., 2021. Insights into the Regulation of Ciliary Disassembly. *Cells* 10, 2977. <https://doi.org/10.3390/cells10112977>
- Pazour, G.J., Rosenbaum, J.L., 2002. Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol.* 12, 551–555. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02410-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02410-8)
- Pedersen, L.B., Rosenbaum, J.L., 2008. Chapter Two Intraflagellar Transport (IFT): Role in Ciliary Assembly, Resorption and Signalling, in: *Current Topics in Developmental Biology, Ciliary Function in Mammalian Development*. Academic Press, pp. 23–61. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)00802-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00802-8)
- Pedersen, L.B., Schrøder, J.M., Satir, P., Christensen, S.T., 2012. The ciliary cytoskeleton. *Compr. Physiol.* 2, 779–803. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110043>
- Pedersen, L.B., Veland, I.R., Schrøder, J.M., Christensen, S.T., 2008. Assembly of primary cilia. *Dev. Dyn.* 237, 1993–2006. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21521>
- Perea-Romero, I., Solarat, C., Blanco-Kelly, F., Sanchez-Navarro, I., Bea-Mascato, B., Martin-Salazar, E., Lorda-Sanchez, I., Swafiri, S.T., Avila-Fernandez, A., Martin-Merida, I., Trujillo-Tiebas, M.J., Carreño, E., Jimenez-Rolando, B., Garcia-Sandoval, B., Minguez, P., Corton, M., Valverde, D., Ayuso, C., 2022. Allelic overload and its clinical modifier effect in Bardet-Biedl syndrome. *Npj Genomic Med.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41525-022-00311-2>
- Pfaffenbach, K.T., Lee, A.S., 2011. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.09.007>

- Prasai, A., Schmidt Cernohorska, M., Ruppova, K., Niederlova, V., Andelova, M., Draber, P., Stepanek, O., Huranova, M., 2020. The BBSome assembly is spatially controlled by BBS1 and BBS4 in human cells. *J. Biol. Chem.* 295, 14279–14290.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013905>
- Price, B.D., Mannheim-Rodman, L.A., Calderwood, S.K., 1992. Brefeldin A, thapsigargin, and AIF4- stimulate the accumulation of GRP78 mRNA in a cycloheximide dependent manner, whilst induction by hypoxia is independent of protein synthesis. *J. Cell. Physiol.* 152, 545–552. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041520314>
- Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., Golemis, E.A., 2007a. HEF1-Dependent Aurora A Activation Induces Disassembly of the Primary Cilium. *Cell* 129, 1351–1363. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.035>
- Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., Golemis, E.A., 2007b. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129, 1351–1363. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.035>
- Qin, H., Diener, D.R., Geimer, S., Cole, D.G., Rosenbaum, J.L., 2004. Intraflagellar transport (IFT) cargo. *J. Cell Biol.* 164, 255–266.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200308132>
- Ramamurthy, V., Cayouette, M., 2009. Development and disease of the photoreceptor cilium. *Clin. Genet.* 76, 137–145. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01240.x>
- Rapoport, T.A., 2007. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450, 663–669.
<https://doi.org/10.1038/nature06384>
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., Glimcher, L.H., 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300–307.
<https://doi.org/10.1038/35085509>
- Reiter, J.F., Leroux, M.R., 2017. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 533–547.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.60>
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., Scott, M.P., 2007. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317, 372–376.
<https://doi.org/10.1126/science.1139740>

- Roller, C., Maddalo, D., 2013. The Molecular Chaperone GRP78/BiP in the Development of Chemoresistance: Mechanism and Possible Treatment. *Front. Pharmacol.* 4, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00010>
- Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., 2002. Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 813–825. <https://doi.org/10.1038/nrm952>
- Satir, P., Christensen, S.T., 2007. Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 377–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236>
- Satir, P., Pedersen, L.B., Christensen, S.T., 2010. The primary cilium at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 499–503. <https://doi.org/10.1242/jcs.050377>
- Scheidecker, S., Etard, C., Pierce, N.W., Geoffroy, V., Schaefer, E., Muller, J., Chennen, K., Flori, E., Pelletier, V., Poch, O., Marion, V., Stoetzel, C., Strähle, U., Nachury, M.V., Dollfus, H., 2014. Exome sequencing of Bardet–Biedl syndrome patient identifies a null mutation in the BBSome subunit BBIP1 (BBS18). *J. Med. Genet.* 51, 132–136. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101785>
- Seo, S., Baye, L.M., Schulz, N.P., Beck, J.S., Zhang, Q., Slusarski, D.C., Sheffield, V.C., 2010. BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 1488–1493. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910268107>
- Seo, S., Mullins, R.F., Dumitrescu, A.V., Bhattarai, S., Gratie, D., Wang, K., Stone, E.M., Sheffield, V., Drack, A.V., 2013. Subretinal Gene Therapy of Mice With Bardet–Biedl Syndrome Type 1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 6118–6132. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-11673>
- Seo, S., Zhang, Q., Bugge, K., Breslow, D.K., Searby, C.C., Nachury, M.V., Sheffield, V.C., 2011. A Novel Protein LZTFL1 Regulates Ciliary Trafficking of the BBSome and Smoothed. *PLOS Genet.* 7, e1002358. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002358>
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J.W., Calame, K., Glimcher, L.H., Staudt, L.M., 2004. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.010>
- Shepshelovich, J., Goldstein-Magal, L., Globerson, A., Yen, P.M., Rotman-Pikielny, P., Hirschberg, K., 2005. Protein synthesis inhibitors and the chemical chaperone TMAO reverse endoplasmic reticulum perturbation induced by overexpression of

- the iodide transporter pendrin. *J. Cell Sci.* 118, 1577–1586.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02294>
- Shevach, E., Ali, M., Mizrahi-Meissonnier, L., McKibbin, M., El-Asrag, M., Watson, C.M., Inglehearn, C.F., Ben-Yosef, T., Blumenfeld, A., Jalas, C., Banin, E., Sharon, D., 2015. Association Between Missense Mutations in the BBS2 Gene and Nonsyndromic Retinitis Pigmentosa. *JAMA Ophthalmol.* 133, 312–318.
<https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2014.5251>
- Shoemark, A., Dixon, M., Beales, P.L., Hogg, C.L., 2015. Bardet Biedl syndrome: motile ciliary phenotype. *Chest* 147, 764–770. <https://doi.org/10.1378/chest.13-2913>
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Krönig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O.A., Jenny, A., Mlodzik, M., Polok, B., Driever, W., Obara, T., Walz, G., 2005. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat. Genet.* 37, 537–543. <https://doi.org/10.1038/ng1552>
- Smith, M.H., Ploegh, H.L., Weissman, J.S., 2011. Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in the Endoplasmic Reticulum. *Science* 334, 1086–1090.
<https://doi.org/10.1126/science.1209235>
- Sorokin, S.P., 1968. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J. Cell Sci.* 3, 207–230. <https://doi.org/10.1242/jcs.3.2.207>
- Spalluto, C., Wilson, D.I., Hearn, T., 2013. Evidence for reciliation of RPE1 cells in late G1 phase, and ciliary localisation of cyclin B1. *FEBS Open Bio* 3, 334–340.
<https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.08.002>
- Steinberg, R.H., Fisher, S.K., Anderson, D.H., 1980. Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors. *J. Comp. Neurol.* 190, 501–518.
<https://doi.org/10.1002/cne.901900307>
- Stowe, T.R., Wilkinson, C.J., Iqbal, A., Stearns, T., 2012. The centriolar satellite proteins Cep72 and Cep290 interact and are required for recruitment of BBS proteins to the cilium. *Mol. Biol. Cell* 23, 3322–3335. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-02-0134>
- Szymanska, K., Johnson, C.A., 2012. The transition zone: an essential functional compartment of cilia. *Cilia* 1, 10. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-10>
- Takatsuki, A., Arima, K., Tamura, G., 1971. TUNICAMYCIN, A NEW ANTIBIOTIC. I ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TUNICAMYCIN. *J. Antibiot. (Tokyo)* 24, 215–223. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.215>

- Taschner, M., Bhogaraju, S., Lorentzen, E., 2012. Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. *Differentiation, Cilia in Development and Disease* 83, S12–S22. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.11.001>
- Tian, X., Zhao, H., Zhou, J., 2023. Organization, functions, and mechanisms of the BBSome in development, ciliopathies, and beyond. *eLife* 12, e87623. <https://doi.org/10.7554/eLife.87623>
- Tucker, R.W., Pardee, A.B., Fujiwara, K., 1979. Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell* 17, 527–535. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90261-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90261-7)
- Turan, M.G., Orhan, M.E., Cevik, S., Kaplan, O.I., 2023. CiliaMiner: an integrated database for ciliopathy genes and ciliopathies. *Database* 2023, baad047. <https://doi.org/10.1093/database/baad047>
- Tyler, K.M., Fridberg, A., Toriello, K.M., Olson, C.L., Cieslak, J.A., Hazlett, T.L., Engman, D.M., 2009. Flagellar membrane localization via association with lipid rafts. *J. Cell Sci.* 122, 859–866. <https://doi.org/10.1242/jcs.037721>
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science* 287, 664–666. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664>
- Vattem, K.M., Wek, R.C., 2004. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11269–11274. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400541101>
- Viralgen and Axovia Partner to Manufacture an Investigational Gene Therapy for Retinal Dystrophy in Bardet-Biedl Syndrome (BBS) Patients [WWW Document], n.d. URL <https://viralgen.com/news/viralgen-and-axovia-partner-to-manufacture-an-investigational-gene-therapy-for-retinal-dystrophy-in-bardet-biedl-syndrome-bbs-patients> (accessed 4.28.25).
- Volz, A.-K., Frei, A., Kretschmer, V., de Jesus Domingues, A.M., Ketting, R.F., Ueffing, M., Boldt, K., Krämer-Albers, E.-M., May-Simera, H.L., 2021. Bardet-Biedl syndrome proteins modulate the release of bioactive extracellular vesicles. *Nat. Commun.* 12, 5671. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25929-1>
- Walter, P., Ron, D., 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1209038>

- Wang, J., Morita, Y., Mazelova, J., Deretic, D., 2012. The Arf GAP ASAP1 provides a platform to regulate Arf4- and Rab11-Rab8-mediated ciliary receptor targeting. *EMBO J.* 31, 4057–4071. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.253>
- Weihbrecht, K., Goar, W.A., Pak, T., Garrison, J.E., DeLuca, A.P., Stone, E.M., Scheetz, T.E., Sheffield, V.C., 2017. Keeping an Eye on Bardet-Biedl Syndrome: A Comprehensive Review of the Role of Bardet-Biedl Syndrome Genes in the Eye. *Med. Res. Arch.* 5, 10.18103/mra.v5i9.1526.
- Westermann, S., Weber, K., 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 938–948. <https://doi.org/10.1038/nrm1260>
- Wheatley, D.N., Wang, A.M., Strugnell, G.E., 1996. Expression of Primary Cilia in Mammalian Cells. *Cell Biol. Int.* 20, 73–81. <https://doi.org/10.1006/cbir.1996.0011>
- Wheway, G., Nazlamova, L., Hancock, J.T., 2018. Signaling through the Primary Cilium. *Front. Cell Dev. Biol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00008>
- Williams, J., Hurling, C., Munir, S., Harley, P., Machado, C.B., Cujba, A.-M., Alvarez-Fallas, M., Danovi, D., Lieberam, I., Sancho, R., Beales, P., Watt, F.M., 2023. Modelling renal defects in Bardet-Biedl syndrome patients using human iPS cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 11, 1163825. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1163825>
- Wright, A.F., Chakarova, C.F., Abd El-Aziz, M.M., Bhattacharya, S.S., 2010. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat. Rev. Genet.* 11, 273–284. <https://doi.org/10.1038/nrg2717>
- Wu, J., Rutkowski, D.T., Dubois, M., Swathirajan, J., Saunders, T., Wang, J., Song, B., Yau, G.D.-Y., Kaufman, R.J., 2007. ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev. Cell* 13, 351–364. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.07.005>
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K., 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881–891. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00611-0)
- Young, R.W., 1967. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J. Cell Biol.* 33, 61–72. <https://doi.org/10.1083/jcb.33.1.61>

Příloha A Přehled genů asociovaných s BBS

BBS ID	Gen	Název genu	Funkce	OMIM	Zastoupení
BBS1	<i>BBS1</i>	<i>Bardet-Biedl syndrome 1</i>	BBSome	209900	23,4%
BBS2	<i>BBS2</i>	<i>Bardet-Biedl syndrome 2</i>	BBSome	606151	9,6%
BBS3	<i>ARL6</i>	<i>ADP ribosylation factor like GTPase 6</i>	GTPáza, regulace vstupu BBSome do cilia	608845	5,3%
BBS4	<i>BBS4</i>	<i>Bardet-Biedl syndrome 4</i>	BBSome	600374	5,1%
BBS5	<i>BBS5</i>	<i>Bardet-Biedl syndrome 5</i>	BBSome	603650	3,7%
BBS6	<i>MKKS</i>	<i>MKKS centrosomal shuttling protein</i>	Chaperonin-like, sestavení BBSomu	604896	6,3%
BBS7	<i>BBS7</i>	<i>Bardet-Biedl syndrome 7</i>	BBSome	607590	4,2%
BBS8	<i>TTC8</i>	<i>Tetratricopeptide repeat domain 8</i>	BBSome	608132	2,0%
BBS9	<i>BBS9</i>	<i>Bardet-Biedl syndrome 9</i>	BBSome	607968	3,4%
BBS10	<i>BBS10</i>	<i>Bardet-Biedl syndrome 10</i>	Chaperonin-like, sestavení BBSomu	610148	14,5%
BBS11	<i>TRIM32</i>	<i>Tripartite motif containing 32</i>	E3 ubiquitin ligáza	602290	<1,0%
BBS12	<i>BBS12</i>	<i>Bardet-Biedl syndrome 12</i>	Chaperonin-like, sestavení BBSomu	610683	6,4%
BBS13	<i>MKS1</i>	<i>MKS transition zone complex subunit 1</i>	součást přechodové zóny	609883	1,0%
BBS14	<i>CEP290</i>	<i>Centrosomal protein 290</i>	součást přechodové zóny	610142	6,3%
BBS15	<i>WDPCP</i>	<i>WD repeat containing planar cell polarity effector</i>	CPLANE complex; regulace ciliogeneze	613580	<1,0%
BBS16	<i>SDCCAG8</i>	<i>SHH signaling and ciliogenesis regulator SDCCAG8</i>	regulace ciliogeneze, <i>Hedgehog signaling</i>	613524	4,3%

BBS17	<i>LZTFL1</i>	<i>Leucine zipper transcription factor like 1</i>	BBSome trafficking	606568	<1,0%
BBS18	<i>BBIP1</i>	<i>BBSome interacting protein 1</i>	BBSome	613605	<1,0%
BBS19	<i>IFT27</i>	<i>Intraflagellar transport 27</i>	IFT-B komplex	615870	<1,0%
BBS20	<i>IFT172</i>	<i>Intraflagellar transport 172</i>	IFT-B komplex	607386	<1,0%
BBS21	<i>CFAP418</i>	<i>Cilia And Flagella Associated Protein 418</i>	neznámá	614477	1,6%
BBS22	<i>IFT74</i>	<i>Intraflagellar transport 74</i>	IFT-B komplex	608040	<1,0%
BBS23	<i>CEP19</i>	<i>Centrosomal protein CEP19</i>	regulace transportu proteinů do cilia	615586	<1,0%
BBS24	<i>SCAPER</i>	<i>S-phase cyclin A associated protein in the ER</i>	ciliární dynamika	611611	neznámá
BBS25	<i>CEP164</i>	<i>Centrosomal protein 164</i>	tvoří distální úpony, iniciace ciliogeneze	614848	<1,0%
BBS26	<i>SCLT1</i>	<i>Sodium channel and clathrin linker 1</i>	regulace ciliogeneze	611399	<1,0%
<i>Genové modifikátory</i>					
	<i>NPHP1</i>	<i>Nephrocystin 1</i>	součást přechodové zóny	607100	neznámá
	<i>CCDC28B</i>	<i>Coiled-coil domain containing 28B</i>	regulace ciliogeneze	610162	neznámá
	<i>TMEM67</i>	<i>Meckelin</i>	součást přechodové zóny, regulace signalizace	609884	neznámá
	<i>TTC21B</i>	<i>Tetratricopeptide repeat domain 21B</i>	IFT-A komplex	612014	neznámá

(Dollfus et al., 2024; Forsyth and Gunay-Aygun, 1993; Niederlova et al., 2019)