



# Pengaruh Protein RPGRIP1L pada Pembentukan Silia Primer sebagai Kandidat Target Terapi Gen Penyakit Siliopati

Ivanna Williantarra

Program Studi Bioteknologi, Indonesia International Institute for Life Sciences, Jakarta Timur, Indonesia

## ABSTRAK

Silia primer yang pada mulanya dianggap sebagai organel tanpa fungsi khusus, ternyata saat ini diketahui merupakan pusat koordinasi berbagai jalur transduksi sinyal sel. Salah satu penyakit siliopati dengan manifestasi klinis terberat adalah sindrom Meckel (MKS) dan sindrom Joubert (JBTS). Kedua sindrom ini disebabkan oleh absennya protein RPGRIP1L pada zona transisi silia primer. Penelitian ini bertujuan melihat pentingnya peran RPGRIP1L dalam *ciliogenesis*. RPGRIP1L diredam ekspresinya dan diperiksa pengaruhnya terhadap: (1) frekuensi *ciliogenesis*, (2) tingkat ekspresi protein pada jalur sinyal Hedgehog, dan (3) lokalisasi protein silia primer lainnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa absennya RPGRIP1L menurunkan frekuensi *ciliogenesis* hingga 46%. Turunnya frekuensi *ciliogenesis* ini bukan disebabkan karena turunnya tingkat ekspresi protein silia primer, melainkan kesalahan lokalisasi; hanya protein yang terlibat pada proses awal *ciliogenesis* sebelum pembentukan zona transisi yang terlokalisasi dengan tepat tanpa adanya RPGRIP1L. Tidak terekutnya protein di silia primer mengindikasikan fungsi RPGRIP1L sebagai perancah bagi protein-protein silia primer lainnya. Selain itu, tanpa adanya RPGRIP1L, aksonema tidak dapat tumbuh dari sentriol walaupun protein selubung sentriol, CP110, telah dilepaskan oleh TTBK2.

**Kata kunci:** RPGRIP1L, siliopati, silia primer, zona transisi.

## ABSTRACT

Primary cilia, which has been long considered as a vestigial organelle of little functional importance, is now known as a coordination hub for many signal transduction pathways. Two worst clinical manifestations of ciliopathies are the Meckel (MKS) and Joubert (JBTS) syndrome; Both are caused by the absence of RPGRIP1L protein at the transition zone of primary cilia. This research aims to check the role of RPGRIP1L in ciliogenesis. The effect of RPGRIP1L knockdown towards (1) ciliogenesis frequency, (2) Hedgehog signaling protein expression and (3) localization of other primary cilia proteins were checked using qRT-PCR and immunostaining techniques. It was found that knockdown of RPGRIP1L has caused a 46% reduction of ciliogenesis frequency. The reduction is not due to a lower expression of primary cilia protein, but mis-localization of the proteins; only the proteins which are involved in the early phase of ciliogenesis were correctly localized after RPGRIP1L knockdown, indicating the anchoring function of RPGRIP1L. Moreover, despite the removal of CP110 by TTBK2, the axoneme was not elongated in the absence of RPGRIP1L. **Ivanna Williantarra. The Role of RPGRIP1L in the Formation of Primary Cilia as Target Candidate for Gene Therapy in Ciliopathies.**

**Keywords:** Ciliopathies, primary cilia, RPGRIP1L, transition zone.

## PENDAHULUAN

Peran silia primer dalam transport protein di dalam sel menyebabkan silia primer menjadi organel kunci untuk berbagai jalur transduksi sinyal sel seperti jalur Hedgehog, Wnt dan Notch; jalur-jalur transduksi sinyal sel tersebut sangat penting dalam perkembangan sel kanker. Silia primer dapat ditemukan pada hampir semua sel mamalia yang berada dalam fase G1 dan gangguannya akan menyebabkan siliopati, yaitu gangguan perkembangan sel akibat gangguan pada silia primer. Beberapa contoh penyakit siliopati adalah sindrom Bardet-Biedl, sindrom Joubert, dan sindrom Meckel.<sup>1</sup>

Sindrom Meckel (MKSS) dan Jouberts (JBTS) merupakan sindrom dengan manifestasi klinis terberat di antara penyakit siliopati lainnya (**Gambar 1**). Sebagian besar janin yang mengidap sindrom Meckel tidak dapat bertahan setelah dilahirkan. Sindrom Meckel ini disebabkan oleh tidak adanya protein RPGRIP1L (*Retinitis Pigmentosa GTPase Interacting Protein-1 Like*). RPGRIP1L (homolog dari MKS-5 dan NPHP-8) merupakan salah satu protein pada zona transisi silia primer. Inaktivasi gen RPGRIP1L menyebabkan kematian tikus pada masa midgestasi dan hal yang sama juga ditemukan pada janin MKS manusia. Kematian janin ini disebabkan oleh

kelainan perkembangan otak, hati, ginjal, alat gerak, dan mata.<sup>2</sup>

Melihat besarnya pengaruh RPGRIP1L terhadap manifestasi klinis pasien siliopati, peneliti berhipotesis bahwa protein ini merupakan salah satu protein kunci dalam arsitektur silia primer. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi pengaruh peredaman ekspresi (*knockdown*) RPGRIP1L terhadap frekuensi pembentukan dan perekrutan protein silia primer.

## METODE

Silia primer pada sel RPE (*retina pigment*

**Alamat Korespondensi** email: [ivanna.i@i3l.ac.id](mailto:ivanna.i@i3l.ac.id)

## HASIL PENELITIAN



*epithelial*) digunakan sebagai model *in vitro* pada penelitian ini. Secara garis besar, penelitian dilakukan dengan meredam ekspresi RPGRIP1L menggunakan siRNA, lalu memeriksa pengaruh peredaman tersebut terhadap frekuensi pembentukan silia primer (*ciliogenesis*), ekspresi protein pada jalur transduksi Hedgehog, dan lokalisasi protein-protein struktural silia primer (**Gambar 2**).

### A. Peredaman RPGRIP1L

Peredaman RPGRIP1L dilakukan dengan transfeksi siRNA menggunakan Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX Reagent (*Thermo Fisher Scientific*). Keberhasilan peredaman dikonfirmasi dengan Western blot dan qRT-PCR. Protein untuk Western blot diekstrak menggunakan RIPA *buffer* dan dideteksi menggunakan antibodi dari Proteintech<sup>®</sup>. Ekstraksi RNA untuk RT-PCR dilakukan menggunakan *BCP – phase separation reagent*. RNA kemudian ditranskripsi balik menggunakan *reverse transcriptase kit* dari Invitrogen. RT-PCR dilakukan menggunakan SuperScript<sup>®</sup> qRT-PCR kit dengan *SYBR green* dari Invitrogen menggunakan mesin RT-PCR dari *applied biosystem*.

### B. Pengaruh peredaman terhadap frekuensi *ciliogenesis*

Frekuensi *ciliogenesis* diperiksa menggunakan

mikroskop fluoresensi. Protein GT335 sebagai penanda silia primer diwarnai pada sel dengan ekspresi RPGRIP1L yang telah diredam. Sebagai penanda lokasi sel, inti sel diwarnai dengan DAPI. Visualisasi sel dilakukan menggunakan peranti *CellF Imaging System*. Hasil visualisasi dianalisis menggunakan peranti ImageJ dan dianalisis statistik menggunakan peranti GraphPad Prism.

### C. Pengaruh peredaman terhadap ekspresi protein pada jalur transduksi Hedgehog

Analisis ekspresi protein dilakukan dengan mengekstraksi total RNA menggunakan *BCP – phase separation reagent*. Total RNA kemudian ditranskripsi balik menggunakan *reverse transcriptase kit* dari Invitrogen. qRT-PCR dilakukan menggunakan SuperScript<sup>®</sup> qRT-PCR kit dengan *SYBR green* dari Invitrogen dan mesin dari *applied biosystem*. Protein-protein yang diperiksa tingkat ekspresinya adalah Shh, Smo, Patched1, Gli1, Gli2, dan Rab8a. Hasil qRT-PCR diperiksa kemaknaannya secara statistik menggunakan peranti GraphPad Prism.

### D. Pengaruh peredaman terhadap lokalisasi protein struktural silia primer

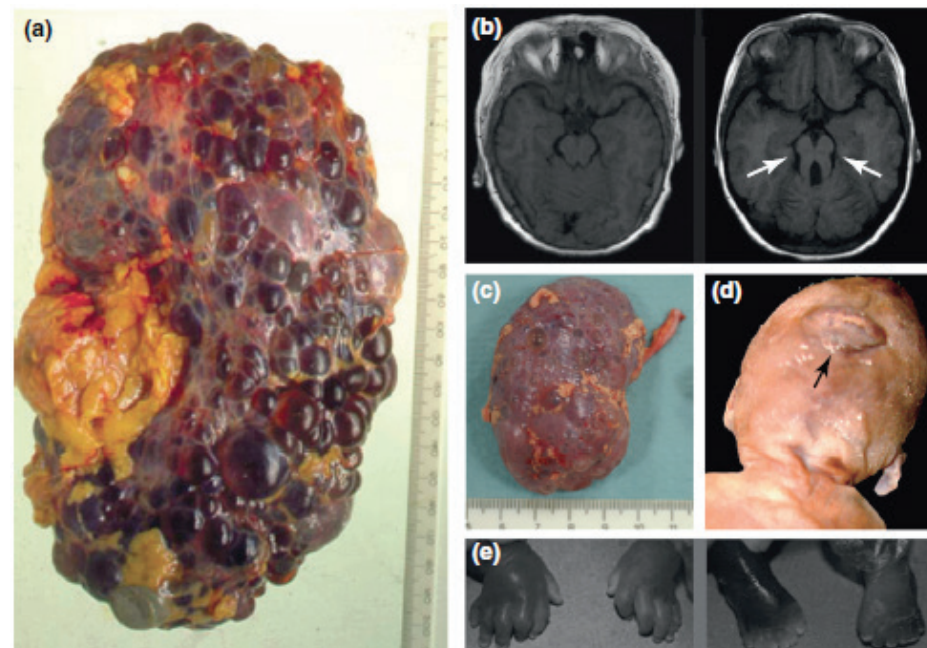
Analisis lokalisasi protein struktural silia primer juga dilakukan menggunakan mikroskop fluoresensi, sama seperti analisis frekuensi *ciliogenesis*. Protein-protein yang diperiksa

adalah: TCTN2, NPHP4, dan TMEM67 yang mewakili protein struktural zona transisi; ARL13B dan IFT88 yang mewakili protein pada membran silia; CEP162, CEP164, dan CEP290 yang mewakili protein pada tubuh basal (*basal body*); TTBK2 dan CP110 yang merupakan dua protein penting pada awal proses *ciliogenesis*.

### HASIL

Baik hasil Western blot maupun qRT-PCR mengkonfirmasi keberhasilan peredaman ekspresi RPGRIP1L pada sel RPE (**Gambar 2a**). Hasil Western blot menunjukkan tidak ada pita yang terdeteksi pada sel yang diredam ekspresinya, sedangkan kontrol menggunakan sel galur murni menunjukkan pita dengan ukuran 130-170 kDa, sesuai dengan berat RPGRIP1L, yaitu 151 kDa. Hasil qRT-PCR mengkonfirmasi lebih jauh hasil peredaman ekspresi secara kuantitatif bahwa ekspresi RPGRIP1L teredam hingga 65% lebih rendah dibandingkan kontrol.

**Gambar 2b** menunjukkan hasil analisis frekuensi *ciliogenesis*. Didapatkan bahwa peredaman ekspresi RPGRIP1L menurunkan jumlah silia primer pada sel RPE secara signifikan. Frekuensi *ciliogenesis* menurun hingga 46% apabila ekspresi RPGRIP1L diredam. Hal ini menunjukkan pentingnya ekspresi RPGRIP1L terhadap pembentukan silia primer.



**Gambar 1.** Manifestasi klinis berbagai penyakit siliopati. (a) Pembengkakan ginjal yang disebabkan tumbuhnya kista pada parenkim ginjal (3), (b) Tumbuhnya struktur 'gigi geraham' pada otak, (c) Pembengkakan ginjal pada sindrom NPHP, (d) Pergeseran otak posterior atau *occipital encephalocele*, dan (e) Gangguan perkembangan alat gerak.

Setelah mengetahui dampak peredaman ekspresi RPGRIP1L terhadap pembentukan struktural silia primer, dampak peredaman RPGRIP1L terhadap fungsi silia primer turut diselidiki. Silia primer diketahui merupakan lokasi terjadinya berbagai jalur transduksi sinyal sel, salah satunya adalah jalur Hedgehog. Karena itu, pengaruh peredaman RPGRIP1L terhadap ekspresi protein-protein jalur transduksi Hedgehog turut diperiksa. qRT-PCR digunakan untuk memeriksa tingkat ekspresi protein Hedgehog. Seperti ditunjukkan pada **Gambar 3**, peredaman protein RPGRIP1L tidak berpengaruh terhadap level ekspresi protein-protein pada jalur Hedgehog.

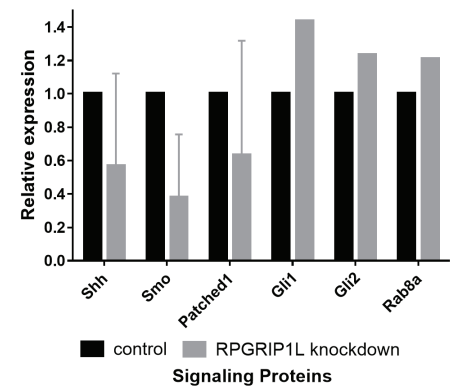
Pengaruh peredaman RPGRIP1L terhadap lokalisasi protein silia primer juga turut diperiksa pada penelitian ini. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peredaman RPGRIP1L mempengaruhi lokalisasi sebagian besar protein penyusun silia primer, kecuali protein-



## HASIL PENELITIAN

protein pada tubuh basal yang terletak pada dasar silia primer; sebelum zona transisi tempat RPGRIP1L seharusnya berada. Peredaman RPGRIP1L juga tidak mempengaruhi lokalisasi protein TTBK2, protein kinase penting dalam *ciliogenesis* yang berfungsi melepaskan protein CP110 dari sentriol agar akhirnya sentriol dapat berkembang menjadi silia primer. Sesuai hasil TTBK2, hanya terdeteksi

satu sinyal CP110 yang mengindikasikan protein tersebut telah terlepas dari sentriol. Walaupun CP110 telah dilepaskan, proses *ciliogenesis* tetap tidak berlanjut tanpa adanya RPGRIP1L. Hasil pemeriksaan pengaruh peredaman RPGRIP1L terhadap lokalisasi protein silia primer ditunjukkan pada gambar 4.



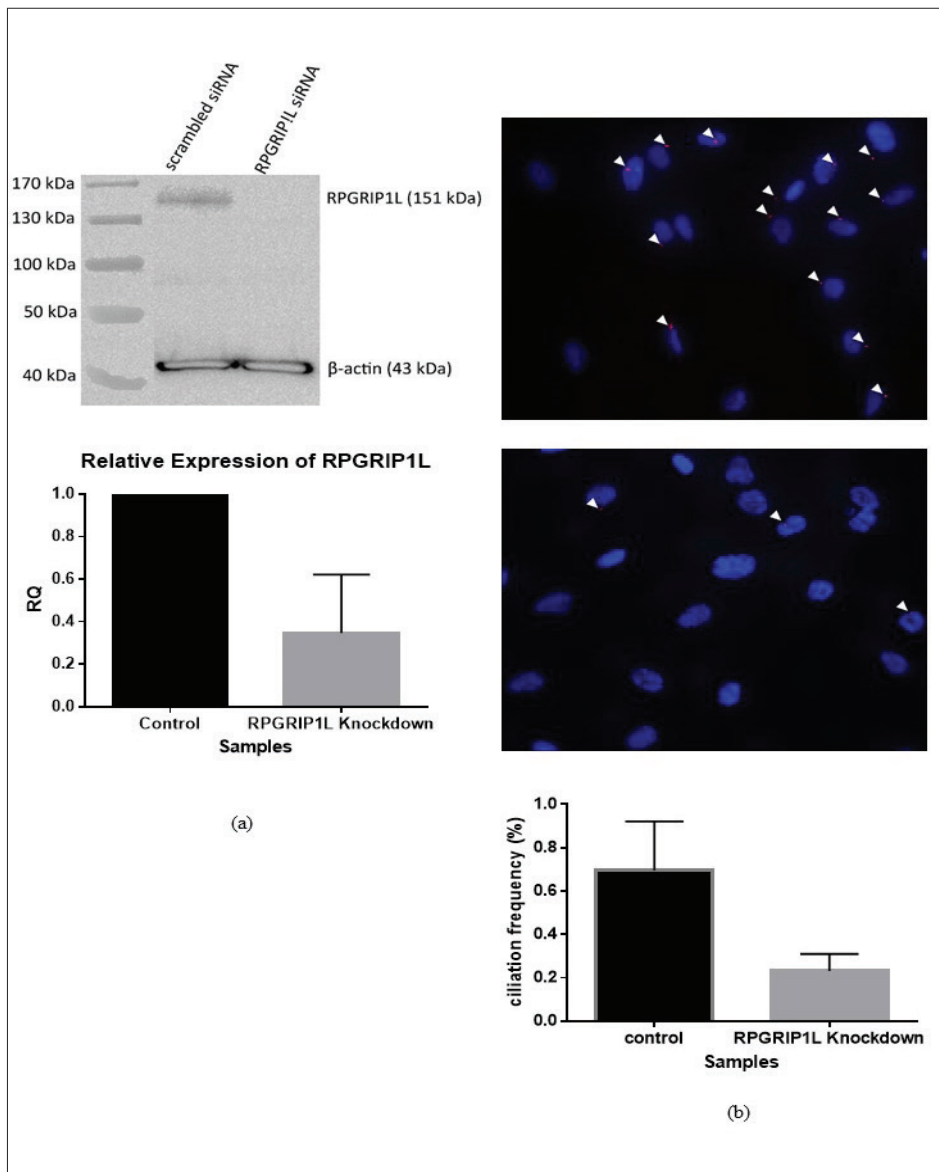
**Gambar 3.** Dampak peredaman RPGRIP1L terhadap tingkat ekspresi protein pada jalur Hedgehog. Protein yang diperiksa adalah Shh, Smo, Patched1, Gli1, Gli2, dan Rab8a relatif terhadap kontrol. Tidak ada perbedaan tingkat ekspresi yang signifikan antara sel teredam dan sel galur murni (N=3, n=3, P>0.05 ANOVA).

### PEMBAHASAN

Berdasarkan rangkaian eksperimen ini, dapat disimpulkan bahwa RPGRIP1L memegang peranan penting dalam proses pembentukan silia primer atau *ciliogenesis*. Peredaman RPGRIP1L terbukti menurunkan frekuensi *ciliogenesis* secara signifikan. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa RPGRIP1L bukan mempengaruhi ekspresi gen-gen protein silia primer, melainkan mempengaruhi transport protein menuju silia primer. Hal ini disimpulkan berdasarkan hasil qRT-PCR yang tidak menunjukkan adanya perbedaan tingkat ekspresi gen yang signifikan untuk protein kunci pada jalur Hedgehog antara sel galur murni dan sel yang teredam. Walaupun tingkat ekspresi tidak berubah, namun protein-protein silia primer tidak terlokalisasi di sekitar silia primer tempat mereka seharusnya berada.

Tidak semua protein terganggu lokalisasinya oleh peredaman RPGRIP1L. Lokalisasi protein-protein yang terletak pada dasar silia primer, tepatnya sebelum area zona transisi, tidak terganggu, sedangkan seluruh protein yang berlokasi pada dan setelah zona transisi, tempat seharusnya RPGRIP1L berada, tidak ditemukan berada pada lokasi terkait di mana mereka seharusnya berada.

Silia primer merupakan organel non-motil yang tumbuh pada sel-sel di fase G1. Arsitektur pada dasar silia primer tersusun atas beberapa bagian: tubuh *basal* (atau *basal body*) dan zona transisi yang dikelilingi oleh *pericentriolar*



**Gambar 2.** (a) Peredaman RPGRIP1L dikonfirmasi dengan Western blot dan qRT-PCR. RPGRIP1L diredam menggunakan siRNA, dan dihantarkan ke sel menggunakan *lipofectamine*. Tidak ada sinyal yang muncul pada perlakuan peredaman RPGRIP1L dibandingkan dengan kontrol peredaman menggunakan siRNA acak yang memunculkan sinyal pada 151 kDa, sesuai dengan berat RPGRIP1L. Hasil ini dikonfirmasi lebih lanjut menggunakan qRT-PCR yang menunjukkan tingkat ekspresi RPGRIP1L relatif lebih rendah hingga 65% antara sel teredam dan sel galur murni (N=4, n=3, P=0,0176, *t-test analysis*). (b) Peredaman RPGRIP1L menunjukkan dampak pada frekuensi *ciliogenesis*. Protein GT335 (merah; pemarka silia primer) dan asam nukleat (biru; pemarka inti sel) diwarnai pada sel RPE yang telah teredam dan dibandingkan dengan sel RPE galur murni. Hasil pewarnaan sel galur murni ditunjukkan pada panel atas, sedangkan sel teredam pada panel bawah dengan perbesaran 40x. Panah putih mengindikasikan keberadaan silia primer. Peredaman RPGRIP1L telah mengurangi frekuensi *ciliogenesis* hingga 46%. (N=3, n=10, P<0.0001, *t-test analysis*).

## HASIL PENELITIAN

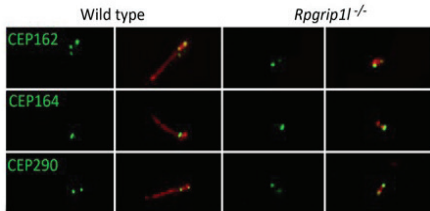


matrix dengan lebih dari 250 protein diperkirakan terlibat dalam pembentukan silia primer. Zona transisi tersusun atas modul MKS dan NPHP. Aksonema yang tersusun atas

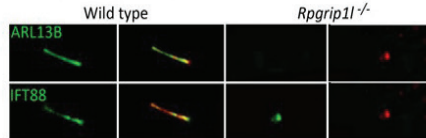
mikrotubulus tumbuh dari dasar silia primer membentuk kerangka silia primer.<sup>7</sup> Aksonema ini merupakan jalur bagi berbagai protein motor, seperti kinesin dan *dynein*, lalu gelang

mentransport protein di dalam sel.<sup>8</sup> Gambar 5 menunjukkan arsitektur silia primer pada sel mamalia.<sup>1</sup>

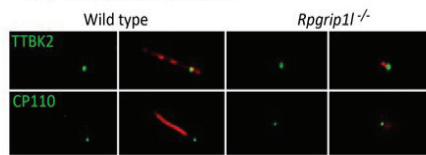
### Distal appendage proteins



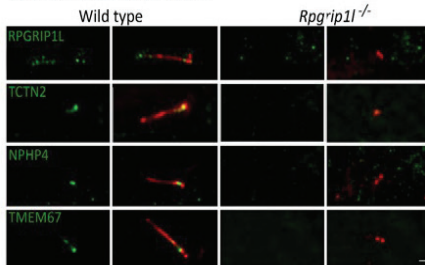
### Ciliary membrane proteins



### Early ciliogenesis proteins



### Transition zone proteins

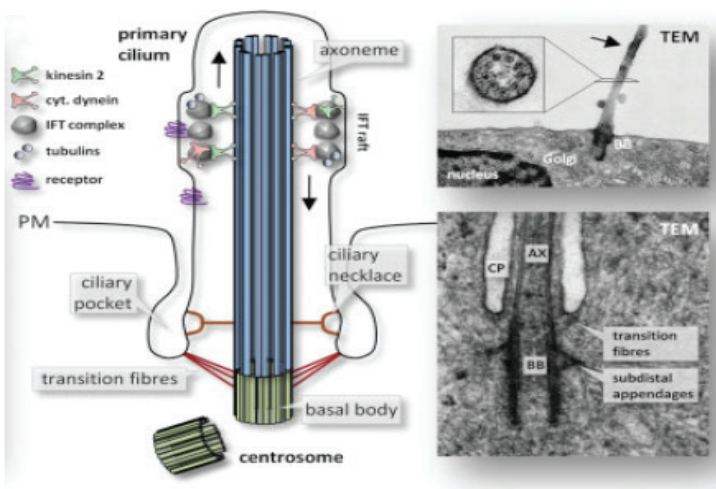


**Gambar 4.** Peredaman Rpgrip1L mengganggu lokalisasi protein-protein zona transisi dan membran silia primer. Protein *centrin* and tubulin terasetilasi diwarnai sebagai pemarka silia primer (merah), kecuali untuk pewarnaan TCTN2, IFT88, dan ARL13B di mana IFT88 digunakan sebagai pemarka silia primer. Protein target ditunjukkan terwarna hijau. Peredaman Rpgrip1L menyebabkan kesalahan lokalisasi protein pada modul NPHP (diwakili oleh NPHP4) dan modul MKS (diwakili oleh TMEM67) zona transisi. TCTN2, NPHP4, dan TMEM67 tidak ditemukan pada zona transisi. Sementara itu, peredaman Rpgrip1L tidak menunjukkan dampak pada lokalisasi protein pada tubuh basal (*distal appendage*) (diwakili oleh CEP164, CEP164, dan CEP290). Protein membran ARL13B tidak ditemukan pada sel teredam, sementara protein IFT88 masih terdeteksi pada dasar silia primer, namun tidak terelongsasi yang kemungkinan disebabkan karena tidak adanya membran silia primer. Yang menarik, sesuai dengan hasil pewarnaan yang mendeteksi keberadaan TTBK2, CP110 telah dilepaskan dari sentriol, namun *ciliogenesis* tetap tidak terjadi pada sel RPE dengan Rpgrip1L yang teredam.<sup>9</sup>

Tidak terekutnya protein-protein, kecuali protein yang berlokasi pada tubuh basal silia primer, mengindikasikan pentingnya peran Rpgrip1L dalam perekrutan protein ke silia primer. Rpgrip1L diduga memiliki fungsi penjangkaran atau *anchoring* yang berinteraksi dan merekrut protein-protein lain menuju silia primer. Dalam hal ini, Rpgrip1L diduga berfungsi sebagai perancah (*scaffold*) bagi protein silia primer. Karena itulah, tidak terekutnya Rpgrip1L menyebabkan tidak terlokalisasinya protein-protein silia primer lainnya dengan tepat dan menyebabkan manifestasi klinis terparah apabila dibandingkan kehilangan protein silia primer lainnya.

Hal menarik lainnya ditemukan saat memeriksa pengaruh peredaman Rpgrip1L terhadap protein TTBK2 dan CP110. CP110 merupakan protein yang melekat pada ujung distal sentriol, baik sentriol ibu maupun anak (*mother dan daughter centriole*). Adanya CP110 pada ujung sentriol menyebabkan aksonema tidak dapat tumbuh dari sentriol untuk membentuk silia primer. TTBK2 merupakan protein kinase yang mampu memfosforilasi CP110 agar terlepas dari sentriol dan memungkinkan aksonema bertumbuh membentuk silia primer. Karena itu, fosforilasi CP110 oleh TTBK2 merupakan proses yang kritical dalam *ciliogenesis*.<sup>10</sup>

Hasil penelitian menunjukkan peredaman Rpgrip1L tidak berpengaruh pada perekrutan TTBK2 ke sentriol. Yang menarik, hanya ditemukan satu sinyal CP110 yang mengindikasikan CP110 telah terfosforilasi oleh TTBK2 dan terlepas dari sentriol ibu. Walaupun demikian, aksonema tetap tidak tumbuh tanpa adanya Rpgrip1L. Hal ini mengindikasikan adanya *checkpoint* atau *intermediate state* yang penting setelah pelepasan CP110 yang perlu terjadi sebelum akhirnya aksonema dapat memanjang membentuk silia primer dan proses ini memerlukan Rpgrip1L. Fungsi Rpgrip1L diperkirakan tidak hanya menjadi perancah dalam proses perekrutan protein-protein silia primer, namun juga memungkinkan aksonema untuk bertumbuh dari sentriol.



**Gambar 5.** Struktur silia primer. Silia primer tumbuh dari kantong silia (silia poket) dari sentriol induk (*basal body*). Silia primer tersusun dari *intraflagellar transport* (IFT) dari tubuh basal. *Insert* atas menunjukkan hasil mikroskop elektron transmisi (TEM) pemotongan longitudinal silia primer dari fibroblas embrio tikus yang menunjukkan susunan 9 mikrotubulus luar ganda (9+0).<sup>9</sup> *Insert* bawah menunjukkan hasil TEM pemotongan longitudinal fibroblas manusia. BB: tubuh basal (*basal body*) [140], AX: aksonema (*axoneme*), CP: *ciliary pocket*.<sup>1</sup>



### SIMPULAN

RPGRIP1L merupakan protein yang berperan penting dalam *ciliogenesis*. Ketiadaan RPGRIP1L tidak mengganggu tingkat ekspresi protein

silia primer, namun mengganggu transport protein menuju silia primer. Diperkirakan, RPGRIP1L berperan sebagai perancah bagi protein-protein silia primer lainnya. Selain itu,

RPGRIP1L juga memegang peranan penting dalam memungkinkan aksonema bertumbuh dari sentriol pada fase sel G1.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Veland IR, Awan A, Pedersen, Yoder BK, Christensen ST. Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiology* 2009;111(3):39-53. doi: 10.1159/000208212.
2. Delous M, Baala L, Salomon R, Laclef C, Vierkotten J, Tory K, et al. The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat Genet.* 2007;39(7):875-81.
3. Boucher C, Sanford R. Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD, MIM173900, PKD1 and PKD2 genes, protein products known as polycystin-1 and polycystin-2). *Eur J Hum Genet.* 2004;12:347-54.
4. Parisi M. Clinical and molecular features of Joubert syndrome and related disorders. *Am J Med Genet C: Semin Med Genet.* 2009;151:326-40.
5. Bergmann C, Fliegauf M, Brüchele NO, Frank V, Olbrich H, Kirschner J, et al. Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2008;82:959-70.
6. Kumari N. Post-mortem examination of prenatally diagnosed fatal renal malformation. *J Perinatal.* 2008;28:736-42.
7. Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis and disease. *Cell.* 2009;137:32-45. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.023
8. Lu QL, Insinna C, Ott C, Stauffer J, Pintado PA, Rahajeng J, et al. Early steps in primary cilium assembly require EHD1/EHD3-dependent ciliary vesicle formation. *Nature Cell Biology* 2015;17(3):228-40. doi: 10.1038/ncb3109.
9. Kiprilov EN, Awan A, Desprat R, Velho M, Clement CA, Byskov AG, et al. Human embryonic stem cells in culture possess primary cilia with hedgehog signaling machinery. *J Cell Biol.* 2008;180:897-904.
10. Oda T, Chiba S, Nagai T, Mizuno K. Binding to Cep164, but not EB1, is essential for centriolar localization of TTBK2 and its function in ciliogenesis. *Genes Cells.* 2014;19(12):927-40. doi: 10.1111/gtc.12191.