

Summary

Primary cilia are evolutionarily conserved and highly specialised sensory organelles found on the majority of mammalian cells. Cilia assemble and disassemble synchronously with the cell cycle. This periodic assembly in G1 and disassembly in G2/S facilitates the exchange of molecules between cilia, the nucleus, and other cellular compartments. The entry of proteins into, and their exit from the cilium is regulated at the ciliary base. This ensures a high level of specificity of the ciliary proteome, including ciliary membrane proteins. Given that protein translation does not occur in cilia, due to the lack of ribosomes, cilia are equipped with an extremely efficient transport system for protein complexes and components, known as the intraflagellar transport (IFT). IFT also plays a pivotal role in ciliary signalling. Genetic alterations affecting ciliary proteins and ciliary trafficking have been identified as a cause of a variety of syndromic human diseases, collectively known as ciliopathies. A major manifestation of these disorders is the development of (poly)cystic kidney disease, which ultimately results in end-stage renal failure.

Recent studies provided some evidence for the presence of RNA-binding proteins (RBPs) and RNA molecules in cilia. However, the function of these molecules remains largely unknown. In this context, the overarching aim of this thesis was to investigate the presence and nature of RBPs and RNAs in primary cilia and to gain insight into their role in cilia dynamics.

To this end, APEX-based ciliary proximity labelling was employed upon induction of ciliary disassembly to investigate the presence and function of ciliary RBPs. This approach led to the identification of 139 potential ciliary RBPs. Confocal and STED imaging confirmed the ciliary localization of selected RBPs, some of which are known to bind double-stranded RNA (dsRNA). Notably, using a well-established antibody against dsRNA we were able to demonstrate the presence of dsRNA in primary cilia. In addition, we observed an accumulation of dsRNA at the ciliary base together with alterations of ciliary length upon the inhibition of the RNA transport adapter XPO1 by leptomycin B.

In an unbiased approach to identify individual ciliary RNAs, we used APEX-RNA sequencing (APEXseq). This approach resulted in the identification of 129 ciliary candidate RNAs, with mRNAs and processed pseudogenes being overrepresented. To provide additional evidence and corroborate the APEXseq data, we conducted RNAscope experiments to confirm the ciliary localisation of some of the RNAs.

In conclusion, we found that RNAs and RBPs are integral components of primary cilia, adding a new layer of complexity to ciliary biology and signalling. The function of ciliary RNA is still under investigation. It may range from storage for local splicing and translation near the ciliary base to structural or enzymatic functions within cilia, roles in cilia-derived extracellular vesicles, or regulation of ciliary RNA-binding proteins. Expanding our knowledge of ciliary RNAs and RBPs will enhance our understanding of ciliary signalling and contribute significantly to developing treatments for ciliopathies.

Zusammenfassung

Primäre Zilien sind evolutionär konservierte und hochspezialisierte sensorische Organellen, die auf der Mehrzahl von Säugetierzellen zu finden sind. Zilien bauen sich synchron mit dem Zellzyklus auf und ab. Dieser periodische Aufbau in G1 und Abbau in G2/S erleichtert den Austausch von Molekülen zwischen den Zilien, dem Zellkern und anderen zellulären Kompartimenten. Der Eintritt von Proteinen in das Zilium und ihr Austritt aus dem Zilium wird an der Zilienbasis reguliert. Dies gewährleistet ein hohes Maß an Spezifität des ziliären Proteoms, einschließlich der ziliären Membranproteine. Da in Zilien aufgrund des Fehlens von Ribosomen keine Proteintranslation stattfindet, verfügen Zilien über ein äußerst effizientes Transportsystem für Proteinkomplexe und -komponenten, den so genannten intraflagellaren Transport (IFT). Genetische Veränderungen, die sich auf ziliäre Proteine und den ziliären Transport auswirken, wurden als Ursache für eine Reihe von syndromalen Erkrankungen des Menschen identifiziert und werden unter dem Begriff Ziliopathien zusammengefasst. Eine Hauptmanifestation dieser Erkrankungen ist die Entwicklung von (poly)zystischen Nierenerkrankungen, die schließlich zu einem Nierenversagen im Endstadium führt.

Jüngste Studien haben Hinweise auf das Vorhandensein von RNA-bindenden Proteinen (RBPs) und RNA-Molekülen in Zilien geliefert. Die Funktion dieser Moleküle ist jedoch noch weitgehend unbekannt. In diesem Zusammenhang war das übergeordnete Ziel dieser Arbeit,

das Vorhandensein und die Art von RBPs und RNAs in primären Zilien zu untersuchen und Einblicke in ihre Rolle in der Ziliendynamik zu gewinnen.

Zu diesem Zweck wurde APEX-based Proximity-labelling, spezieifisch für Zilien nach der Induktion des ziliären Abbaus eingesetzt, um das Vorhandensein und die Funktion der ziliären RBPs zu untersuchen. Dieser Ansatz führte zur Identifizierung von 139 potenziellen ziliären RBPs. Konfokale und STED-Mikroskopie bestätigten die ziliäre Lokalisierung ausgewählter RBPs, von denen einige dafür bekannt sind, dass sie doppelsträngige RNA (dsRNA) binden. Insbesondere konnten wir mit einem etablierten Antikörper gegen dsRNA das Vorhandensein von dsRNA in primären Zilien nachweisen. Darüber hinaus beobachteten wir eine Anhäufung von dsRNA an der Zilienbasis zusammen mit Veränderungen der Zilienlänge bei Inhibierung des RNA-Transportadapters XPO1 durch Leptomycin B.

In einem neutralen Versuch zur Identifizierung einzelner ziliärer RNAs verwendeten wir APEX-RNA-Sequenzierung (APEXseq). Dieser Ansatz führte zur Identifizierung von 129 ziliären Kandidaten-RNAs, wobei mRNAs und prozessierte Pseudogene überrepräsentiert waren. Um zusätzliche Beweise zu liefern und die APEXseq-Daten zu untermauern, führten wir RNAscope-Experimente durch, um die ziliäre Lokalisierung der RNAs zu bestätigen.

Zusammenfassend haben wir festgestellt, dass RNAs und RBPs integrale Bestandteile von primären Zilien sind, was der Zilienbiologie und -signalübertragung eine neue Ebene der Komplexität verleiht. Die Funktion der ziliären RNA wird noch untersucht. Sie kann von der Speicherung für lokales Splicing und Translation in der Nähe der Zilienbasis bis hin zu strukturellen oder enzymatischen Funktionen innerhalb der Zilien reichen. Darüber hinaus kann ziliäre RNA eine Funktion in extrazellulären Vesikeln, die von Zilien abstammen, oder in der Regulation von ziliären RNA-bindenden Proteinen haben. Die Erweiterung unseres Wissens über ziliäre RNAs und RBPs wird unser Verständnis der ziliären Signaltransduktion verbessern und wesentlich zur Entwicklung von Therapien für Ziliopathien beitragen.