

1. Abstract

Primary cilia are sensory antennae-like organelles present on the surface of many cell types. Defects in primary cilia lead to a wide variety of diseases, collectively termed as ciliopathies. The ciliary membrane is distinct from the rest of the cell's plasma membrane due to the trafficking of several signaling membrane receptors. To understand the regulatory processes at the ciliary membrane, we targeted a genetically engineered peroxidase specifically to the inner side of the ciliary membrane to allow biotinylation followed by identification of the membrane-associated proteome using mass spectrometry. Comprehensive bioinformatic analyses of the dataset revealed high-stoichiometric presence of actin-binding proteins inside the cilium. This could be confirmed by immunofluorescence stainings for alpha-actinin and FilaminA and by complementary interaction proteomic analyses. Furthermore, treatment of cmAPEX with a small molecule inhibitor of actin polymerization that typically leads to primary cilia elongation revealed enrichment of the actin-binding and actin-related proteins including Myo5a in the cilia. Consistent with our proteomics data immunofluorescence stainings revealed that accumulation of Myo5a at the ciliary base increased significantly upon actin de-polymerization. Interestingly, Myo5a knockout decreased ciliation whereas upon induction of ciliary disassembly Myo5a was significantly enhanced in primary cilia. In summary, the at hand thesis presents a novel proteomics approach to study the rapid and dynamic changes of the ciliary membrane proteome in mammalian cells. This approach led to the identification of actin-binding proteins as novel, mechanosensitive components of primary cilia that might have important functions in cilia membrane dynamics.

2. Zusammenfassung

Primäre Zilien sind sensorische Organellen, die an Fühler oder Antennen erinnern und auf der Zelloberfläche vieler Säugerzellen ausgebildet werden. Zahlreiche genetische Erkrankungen werden durch Mutationen in Genen verursacht, die für ziliäre Proteine kodieren. Diese werden unter dem Begriff Ziliopathien zusammengefasst. Zilien sind eingeschlossen von Plasmamembran, deren Proteinzusammensetzung sich allerdings von der restlichen Zellmembran deutlich unterscheidet. Dies ist eine Grundvoraussetzung für sensorische Funktionen und ziliäre Signalübertragung. Daher wird der Eintritt von Membranproteinen in die Zilienmembran aber auch das ziliäre Targeting von löslichen Proteinen in das Innere des Ziliums an der Zilienbasis strikt reguliert. Um regulatorische Prozesse an der Zilienmembran im Detail zu verstehen, haben wir eine genetisch modifizierte Peroxidase, die die Markierung von umliegenden Proteinen mit Biotin und die nachfolgende Analyse des membran-assoziierten Proteoms mittels Massenspektrometrie erlaubt, spezifisch an der Innenseite der Zilienmembran exprimiert. Mit diesem Ansatz konnten wir erstmals zahlreiche Aktin-bindenden Proteine an der Zilienmembran und im Zilium nachweisen. Immunfluoreszenzfärbungen sowie ergänzende Interaktomanalysen konnten diese zentralen Befunde bestätigen. Interessanterweise resultierte die Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D, also die Inhibition der Aktin Polymerisierung, die zur Verlängerung von Zilien führt, in einer weiteren Anreicherung aktin-bindender Proteine im Zilium, darunter auch Myosin 5a. Eine vermehrte ziliäre Lokalisation von Myosin 5a fand sich weiterhin nach der Induktion des ziliären Abbaus, des sog. „ciliary disassembly“, während der CRISPR/Cas9 basierte Knockout von Myosin 5a den Verlust der Ziliogenese zu Folge hatte. Die vorliegende Arbeit konnte somit eine neue Methodik zur Analyse des ziliären membranassoziierten Proteoms entwickeln, mit deren Hilfe dynamische Veränderungen im ziliären Proteom von Säugerzellen in hoher zeitlicher Auflösung messbar sind. Bereits die erste Anwendung führte mit den Aktin-bindenden Proteinen zur Identifikation neuer Bestandteile des primären Ziliums, die die Dynamik des ziliären Auf- und Abbaus regulieren.