



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk

Rozprawa doktorska pt.:

**Charakterystyka białek wiążących RNA
oraz oddziaływań kolistych RNA z białkami
w mózgu myszy**

*Characterization of RNA-binding proteins
and circular RNA-protein interactions in the mouse brain*

Mgr inż. Marta Sztachera

Promotor: dr hab. Monika Piwecka

Zakład Niekodujących RNA

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

Poznań, 2025

Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania wszystkim tym, którzy przyczynili się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Słowa szczególnej wdzięczności kieruję do Pani Promotor, dr hab. Moniki Piweckiej. Dziękuję za poświęcony czas, ogrom przekazanej wiedzy, nieustające inspiracje, zaangażowanie oraz nieocenioną pomoc i wsparcie merytoryczne na każdym etapie powstawania tej pracy.

Dziękuję wszystkim obecnym i byłym Pracownikom Zakładu Niekodujących RNA. Dziękuję Wam za serdeczność, przyjaźń, niezwykle miłą i twórczą atmosferę pracy, która sprawiała, że codzienne wyzwania stawały się łatwiejsze. Wasze wsparcie, dobre słowo, wspólne dyskusje i motywacja były dla mnie bezcenne i na zawsze pozostaną w mojej pamięci.

Pragnę również podziękować wszystkim osobom, z którymi miałam przyjemność współpracować, gdy moja przygoda z doktoratem rozpoczynała się w murach Wielkopolskiego Centrum Zaawansowanych Technologii. Wasza życzliwość i wsparcie na tym pierwszym, kluczowym etapie mojej pracy naukowej były dla mnie niezwykle ważne.

Na koniec, z całego serca pragnę podziękować moim Najbliższym, bez których ta podróż naukowa nie byłaby możliwa. Mojemu kochanemu Mężowi, Mikołajowi, dziękuję za jego miłość, cierpliwość, wyrozumiałość i nieustające wsparcie, szczególnie w tych trudniejszych chwilach zwątpienia. Dziękuję moim wspieranym Rodzicom za ich bezwarunkową miłość, wiarę we mnie od samego początku i za wszystko, co dla mnie zrobili, bym mogła realizować swoje marzenia. Serdeczne podziękowania kieruję do mojego kochanego Rodzeństwa oraz ich Partnerów za trzymanie kciuków, słowa otuchy i bycie zawsze blisko. Wasza miłość i wiara w moje siły były dla mnie największą motywacją i dodawały mi skrzydeł.

Dziękuję.

Niniejsza rozprawa doktorska powstała w efekcie realizacji projektu badawczego Sonata Bis o numerze 2018/30/E/NZ3/00624 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz była wspierana przez projekt NAWA, Polskie Powroty 2019 o numerze PPN/PPO/2019/1/00035.

Spis treści

Dorobek naukowy	9
Lista skrótów	11
Streszczenie	16
Abstract	18
1. Wprowadzenie	20
1.1. Białka wiążące RNA.....	20
1.1.1. Charakterystyka ogólna	20
1.1.2. Domeny wiążące RNA oraz regiony nieuporządkowane.....	20
1.1.3. Funkcjonalne powiązanie RBP i RNA	22
1.1.4. Dysfunkcje RBP w chorobach neurodegeneracyjnych	24
1.2. Choroby układu nerwowego związane z uszkodzeniem osłonek mielinowych komórek nerwowych.....	25
1.2.1. Klasyfikacja	26
1.2.2. Podłoże	26
1.3. Kolisty RNA	28
1.3.1. Biogeneza i nazewnictwo	28
1.3.2. Lokalizacja komórkowa i wzorce ekspresji.....	29
1.3.3. Stabilność circRNA	31
1.3.4. Funkcje circRNA.....	31
1.3.4.1. Oddziaływanie z miRNA	31
1.3.4.2. Oddziaływanie z białkami.....	32
1.3.4.3. Translacja kolistych RNA	34
1.4. Metody badania interakcji RNA-białko <i>in vivo</i>	34
1.4.1. Stabilizowanie interakcji RNA-białko.....	35
1.4.1.1. Sieciowanie formaldehydem	35
1.4.1.2. Sieciowanie UV.....	36
1.4.2. Metody analityczne zorientowane na wzbogacanie pojedynczego białka w kompleksie z RNA	37
1.4.3. Metody analityczne zorientowane na wzbogacanie pojedynczego RNA w kompleksie z białkami.....	38
1.4.4. Metody badania całkowitego interaktomu RNA z białkami	42
1.4.5. Metody badania oddziaływań kolistych RNA z białkami	45

1.4.6.	Wyzwania w badaniu endogennych circRNA i lncRNA metodami RNA pull-down.....	47
2.	Cele pracy	49
3.	Materiały i metody	51
3.1.	Ważniejsze odczynniki chemiczne, biochemiczne oraz gotowe zestawy odczynników	51
3.2.	Przeciwciała	53
3.3.	Bufory	53
3.4.	Oligonukleotydy DNA.....	56
3.5.	Sprzęt laboratoryjny	59
3.6.	Oprogramowanie i algorytmy	60
3.7.	Mysie modele eksperymentalne.....	60
3.7.1.	Myszy typu dzikiego	60
3.7.2.	Myszy <i>Cdr1as knockout</i>	61
3.7.3.	Myszy <i>shiverer</i>	61
3.7.4.	Genotypowanie	61
3.8.	Homogenizacja tkanek i warunki sieciowania UV	62
3.8.1.	Biopulweryzacja tkanki mózgowej (metoda B) i sieciowanie UV	62
3.8.2.	Homogenizacja mózgu myszy w szklanym homogenizatorze typu Dounce (metoda H) i sieciowanie UV	63
3.8.3.	Homogenizacja tkanek mózgowej, mięśniowej oraz płucnej w homogenizatorze kulkowym.....	64
3.9.	Procedura XRNAX	64
3.9.1.	Liza tkanki mózgowej	65
3.9.2.	Oczyszczanie kompleksów RNA-białko z interfazy	66
3.9.3.	Oczyszczanie kompleksów RNA-białko z ekstraktów XRNAX przy wykorzystaniu kolumniek krzemionkowych oraz trawienie białek do spektrometrii masowej.....	66
3.9.4.	Przygotowanie próbek do spektrometrii mas i znakowanie TMT.....	67
3.9.5.	Chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) i przetwarzanie danych.....	67
3.10.	Analiza Ontologii Genów (GO) dla wyników XRNAX	67
3.11.	Modelowanie struktury białek.....	67
3.12.	Izolacja całkowitego RNA oraz DNazowanie	68
3.13.	Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym	68
3.14.	Odwrotna transkrypcja	68
3.15.	Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).....	68

3.16.	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) i z sondą TaqMan (TaqMan qPCR).....	69
3.17.	Izolacja białek	69
3.18.	Barwienie srebrem.....	70
3.19.	Western blot	70
3.20.	Northern blot	71
3.21.	Przygotowanie kriosekcji tkanki mózgowej	71
3.22.	Barwienia immunofluorescencyjne (IF) białek i mikroskopia.....	72
3.22.1.	Barwienie fluorescencyjne i obrazowanie	72
3.22.2.	Obliczenie intensywności sygnału IF	72
3.23.	Przewidywanie struktury 2D kolistych RNA za pomocą programu RNAfold	73
3.24.	Procedura circRNA pull-down.....	73
3.24.1.	Projektowanie sond specyficznych dla kolistych RNA.....	73
3.24.2.	Przygotowanie kulek pokrytych streptawidyną.....	74
3.24.3.	Liza tkanki mózgowej	74
3.24.4.	Wstępne oczyszczanie lizatów z potencjalnych cząsteczek biotynylowanych ..	76
3.24.5.	Hybrydyzacja circRNA z sondami i wzbogacanie kompleksów circRNA-białko	77
3.24.6.	Oczyszczanie wzbogaconych kompleksów circRNA-białko	78
3.24.7.	Elucja RNA	79
3.24.8.	Elucja białka	79
3.24.9.	Przygotowanie prób, pomiary LC-MS/MS i przetwarzanie danych	80
3.24.10.	Analiza danych LC-MS/MS	80
3.25.	Trawienie RNA w lizatach tkanki mózgu RNazą R	81
3.25.1.	Trawienie RNA sprzężone z selekcją mRNA	81
3.26.	Analizy transkryptomyczne z wykorzystaniem technologii NanoString nCounter®...82	
3.26.1.	Hybrydyzacja RNA z sondami specyficznymi dla wybranych transkryptów (TagSet custom assay).....	82
3.26.2.	Hybrydyzacja RNA z sondami specyficznymi dla miRNA (Mouse v1.5 miRNA assay).....	83
3.27.	Analizy statystyczne.....	83
3.28.	Narzędzia wykorzystane do opracowania rycin.....	83
4.	Wyniki	84
4.1.	Optymalizacja metody XRNAX do charakteryzowania oddziaływań RNA-białko w tkance mózgowej myszy	84
4.1.1.	Analiza wzbogacenia białek wiążących RNA w procedurze XRNAX	86

4.1.2.	Ocena względnej ilości RNA w fazie wodnej i w interfazie w procedurze XRNAX	87
4.2.	Wysokoprzepustowa walidacja protokołu XRNAX w mózgu zdrowej myszy	89
4.2.1.	Charakterystyka RBP wzbogaconych po procedurze XRNAX (metoda B)	90
4.2.2.	Analiza białek wykrytych w interfazie oraz RBP wzbogaconych po procedurze XRNAX H.....	93
4.3.	Określenie zmian jakościowych w interakcjach RNA-białko w mózgu z defektem mielinizacji z zastosowaniem XRNAX	95
4.3.1.	Potwierdzenie mutacji <i>Mbp</i> w mózgu myszy <i>shiverer</i>	96
4.3.2.	Charakterystyka RBP wzbogaconych po XRNAX w mózgu <i>shiverer</i>	96
4.3.3.	Porównanie białek RBP zaangażowanych w formowanie cytoplazmatycznych granul wzbogaconych po XRNAX w mózgu zdrowym z XRNAX w mózgu <i>shiverer</i>	99
4.4.	Analiza alternatywnego splicingu genów regulowanych przez MBNL1 w mózgu z deficytem mieliny	101
4.5.	Analiza izofrom mRNA i circRNA generowanych z genów <i>Mbnl1</i> i <i>Mbnl2</i> oraz ich wpływ na subkomórkową lokalizację białka MBNL1	104
4.6.	Analiza porównawcza protokołu XRNAX z innymi metodami do charakteryzowania oddziaływań RNA-białko w tkance mózgowej myszy	110
4.7.	Optymalizacja nowego protokołu circRNA pull-down do wychwytywania kolistych RNA wraz z ich interaktomem w mózgu myszy	113
4.7.1.	Wybór circRNA i kontroli do eksperymentu	115
4.7.2.	Optymalizacja kluczowych etapów eksperymentu circRNA pull-down.....	118
4.7.3.	Analiza wydajności i specyficzności eksperymentów circRNA pull-down z homogenatów tkankowych.....	120
4.7.3.1.	Na przykładzie circRNA <i>Cdr1as</i>	120
4.7.3.2.	Dla innych wybranych kolistych RNA	122
4.7.4.	Usuwanie mRNA z lizatów do eksperymentu circRNA pull-down.....	125
4.8.	Analiza wychwytywania miRNA oraz RBP związanych do wzbogacanego circRNA	127
4.8.1.	Analizy wzbogacenia miRNA oraz białek związanych z circRNA <i>Cdr1as</i>	127
4.8.2.	Analiza miRNA oraz RBP oddziałujących z innymi wybranymi circRNA.....	136
5.	Dyskusja	141
5.1.	Rozważania na temat zastosowania XRNAX do badania interakcji RNA-białko w tkankach	141
5.2.	Zmiany w interakcjach RNA-białko w mózgu z deficytem mieliny	145
5.3.	Protokół RNA pull-down do badań oddziaływań circRNA-białko w tkance.....	149
5.4.	Podsumowanie wkładu pracy w poznanie funkcji circRNA i hipotezy do dalszych badań	156

6. Wnioski	158
7. Bibliografia	161

Dorobek naukowy

Wykaz publikacji naukowych:

- **Sztachera M**, Wendlandt-Stanek W, Serwa RA, Stanaszek L, Smuszkiewicz M, Wronka D, Piwecka M (2024). Interrogation of RNA-bound proteome with XRNAX illuminates molecular alterations in the mouse brain affected with dysmyelination. *Cell Reports*, 44(1):115095. doi: 10.1016/j.celrep.2024.115095, PMID: 39709601.
(IF₂₀₂₄ ang. *impact factor*) – 7,5; MNiSW₂₀₂₄ – 200)
- Zacharjasz J*, **Sztachera M***, Smuszkiewicz M, Piwecka M (2024). Micromanaging the neuroendocrine system - A review on miR-7 and the other physiologically relevant miRNAs in the hypothalamic-pituitary axis. *FEBS Letters*, 598(13):1557-1575. doi: 10.1002/1873-3468.14948, PMID: 38858179.
(IF₂₀₂₄ – 3,0; MNiSW₂₀₂₄ – 100)

* równorzędny pierwszy autor

- **Sztachera M**, Wendlandt-Stanek W, Piwecka M (2025). Protocol for brain tissue processing and downstream analysis of RNA-protein interactions in vivo in tissues. *STAR Protocols* (ID: STAR-PROTOCOLS-D-25-00179), *manuskrypt wstępnie zaakceptowany, na etapie drobnej rewizji*.

Manuskrypty w przygotowaniu:

- **Sztachera M**, Koliński M, Piwecka M. Insights into non-coding transcriptome afforded by studying RNA-protein interactions.
- Zacharjasz J, Smuszkiewicz M, Kałużna E, **Sztachera M**, Piwecka M. miRNA regulation in space and time in the postnatal mouse pituitary gland and endocrine cell lines.

Wyróżnienia naukowe, otrzymane nagrody, inne:

Pierwszy autor:

- 24-27.06.2025 (Poznań, Polska), **wyróżnienie w postaci zakwalifikowania do wygłoszenia prezentacji ustnej** podczas konferencji międzynarodowej „2nd Polish RNA Biology Meeting”, wystąpienie pt.: “Catch me if you can: Unveiling circRNA functions through capturing RNA-protein interactions”.
- 07-09.10.2024 (Bazylea, Szwajcaria), **wyróżnienie w postaci zakwalifikowania do wygłoszenia prezentacji ustnej** podczas konferencji międzynarodowej “Non-coding

RNA World 2024: Exploring Mechanisms, Designing Medicines”, tytuł wystąpienia: „Insight Into MBNL1-Dependent Splicing Perturbation and Circular RNA Dysregulation in the Dysmyelinated Mouse Brain Afforded by RNA-Protein Interactome Study”.

- 28-30.09.2023 (Warszawa, Polska), **wyróżnienie w postaci zakwalifikowania do wygłoszenia prezentacji ustnej** podczas konferencji międzynarodowej „Polish RNA Biology Meeting”, wystąpienie pt.: “Investigation of RNA-protein interactions and brain-specific RBPome in the mouse brain tissue”.
- 19-21.11.2021 (Poznań, Polska), **nagroda za najlepszy poster “Best Poster Award”** podczas międzynarodowej konferencji naukowej „The International Conference of the Centenary of Natural Sciences Club of Adam Mickiewicz University”, plakat i wystąpienie ustne pt.: „XRNAX as a method to study RNA interactome in the adult mouse brain”.
- 08.2021 (Rungstedgaard, Dania), **stypendium/ travel grant** na uczestnictwo w konferencji międzynarodowej „RNA Mechanisms and Brain Disease”, plakat oraz krótka prezentacja typu „*flash talk*” pt.: „Identification of circRNAs functions in the mouse brain by studying their interactions with proteins”.
- **Wyróżnienie** przez firmę Bio-Techne (Minnesota, USA) **zdjęcia mikroskopowego**. Zdjęcie zostało zaprezentowane w kalendarzu: 2023 Art of RNAscope Calendar.
- 09.2022 kurs letni MaxQuant Summer School 2022 w Barcelonie “13th International Summer School On Computational Mass Spectrometry-Based Proteomics”.

Współautor:

- 09.2023 (Szczecin, Polska) Nagroda im. Włodzimierza Mozołowskiego dla młodych biochemików w sesji posterowej podczas konferencji naukowej „5th BIO Congress” w Szczecinie. Tytuł plakatu naukowego: „The dynamics of miRNAs Expression in the postnatal mouse pituitary gland and insights into cell-type specific miRNA regulation in pituitary gland” (Autorzy: Julian Zacharjusz, Ewelina Kałużna, **Marta Sztachera**, Monika Piwecka).

Lista skrótów

4SU	4-tiourydyna (ang. <i>4-thiouridine</i>)
5EU	5-etynylourydyna (ang. <i>5-ethynyluridine</i>)
6SG	6-tioguanozyna (ang. <i>6-thioguanosine</i>)
ALS	stwardnienie zanikowe boczne (ang. <i>amyotrophic lateral sclerosis</i>)
ASO	antysensowne oligonukleotydy (ang. <i>antisense oligonucleotides</i>)
BL	ligaza biotynowa (ang. <i>biotin ligase</i>)
BS	splicing wsteczny (ang. <i>backsplicing</i>)
BSJ	połączenie typu <i>backsplice</i> (ang. <i>backsplice junction</i>)
CARPID	wychwytywanie RNA-białko z użyciem CRISPR/CasRx (ang. <i>CRISPR-assisted RNA-protein interaction detection method</i>)
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i>)
Cdr1as	antysensowny RNA <i>Cdr1</i> (ang. <i>Cdr1 antisense RNA</i>)
CELF2	ang. <i>CUGBP, Elav-like family member 2</i>
CHART	analiza hybrydyzacji z wychwytem RNA (ang. <i>RNA capture hybridization analysis</i>)
ChIRP-MS	izolacja chromatyny poprzez oczyszczanie RNA sprzężona ze spektrometrią masową (ang. <i>chromatin isolation by RNA purification followed by mass spectrometry</i>)
ciRNA	introniczne koliste RNA (ang. <i>intronic circular RNA</i>)
circRNA	koliste RNA (ang. <i>circular RNA</i>)
CLIP	immunoprecypitacja poprzedzona sieciowaniem UV (ang. <i>cross-linking and immunoprecipitation</i>)
CLIP-seq	sekwencjonowanie połączone z CLIP (ang. <i>cross-linking immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing</i>)
CRUIS	system wychwytywania RNA oparty na CRISPR (ang. <i>the CRISPR-based RNA-united interacting system</i>)
CSD	domena <i>cold shock</i> (ang. <i>cold shock domain</i>)
dCas9	katalitycznie nieaktywna nukleaza Cas9 (ang. <i>dead Cas9</i>)
DM	dystrofia miotoniczna (ang. <i>myotonic dystrophy</i>)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsRBD	dwuniciowa domena wiążąca RNA (ang. <i>double-stranded RNA-binding domain</i>)

EcircRNA	eksonowe koliste RNA (ang. <i>exonic circular RNA</i>)
eCLIP	ulepszona metoda CLIP-seq (ang. <i>enhanced crosslinking and immunoprecipitation</i>)
eRIC	wzmocnione wychwytywanie interakcji RNA-białko (ang. <i>enhanced RNA interactome capture</i>)
EIF4A3	eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4A-III (ang. <i>eukaryotic initiation factor 4A-III</i>)
EIcircRNA	eksonowo-introniczne koliste RNA (ang. <i>exon-intron circular RNA</i>)
FA	formaldehyd (ang. <i>formaldehyde</i>)
FUS	ang. <i>fused in sarcoma protein</i>
FTD	otępienie czołowo-skroniowe (ang. <i>frontotemporal dementia</i>)
FXTAS	zespół drżenia i ataksji związany z łamliwym chromosomem X (ang. <i>fragile X-associated tremor/ataxia syndrome</i>)
gRNA	ang. <i>guide RNA</i>
HARD-AP	ang. <i>high-affinity RNA-binding domain Affinity Purification</i>
HITS-CLIP	CLIP z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem (ang. <i>high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation</i>)
HK	gen referencyjny (ang. <i>housekeeping gene</i>)
hnRNP A1	heterogenna rybonukleoproteina jądrowa A1 (ang. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>)
hnRNP R	heterogenna rybonukleoproteina jądrowa R (ang. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R</i>)
HYPR-MS	hybrydyzacja i oczyszczanie kompleksów RNA-białko sprzężone ze spektrometrią masową (ang. <i>hybridization purification of RNA-protein complexes followed by mass spectrometry</i>)
ICS	intronowe sekwencje komplementarne (ang. <i>intronic complementary sequences</i>)
IDR	region nieuporządkowany strukturalnie (ang. <i>intrinsically disordered region</i>)
iDRiP	identyfikacja białek bezpośrednio oddziałujących z RNA (ang. <i>identification of proteins directly interacting with RNA</i>)
IF	immunofluorescencja (ang. <i>immunofluorescence</i>)

IGF2BP1	białko wiążące mRNA insulinopodobnego czynnika wzrostu 2 (ang. <i>insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1</i>)
incPRINT	wychwytywanie interakcji białko-RNA w komórce (ang. <i>in cell protein-RNA interaction</i>)
ISH	hybrydyzacja <i>in situ</i> (ang. <i>in situ hybridization</i>)
IRES	wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu (ang. <i>internal ribosome entry site</i>)
KH	domena białkowa K-homology (ang. <i>K homology domain</i>)
LC-MS/MS	spektrometria mas sprzężona z chromatografią cieczową (ang. <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>)
LEAP-RBP	ang. <i>liquid-emulsion-assisted-purification of RNA-bound protein</i>
lincRNA	duże międzygenowe niekodujące RNA (ang. <i>large intergenic noncoding RNAs</i>)
LNA	ang. <i>locked nucleic acid</i>
lncRNA	długie niekodujące RNA (ang. <i>long non-coding RNA</i>)
m6A	N ⁶ -metyloadenozyna (ang. <i>N⁶-methyladenosine</i>)
miRNA	mikroRNA (ang. <i>microRNA</i>)
MBP	zasadowe białko mieliny (ang. <i>myelin basic protein</i>)
MBNL1	białko <i>muscleblind 1</i> (ang. <i>muscleblind like splicing regulator 1</i>)
mRNA	informacyjny RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
ncRNA	niekodujące RNA (ang. <i>non-coding RNA</i>)
NLS	sygnał lokalizacji jądrowej (ang. <i>nuclear localization sequence</i>)
OOPS	ang. <i>orthogonal organic phase separation</i>
ORF	otwarta ramka odczytu (ang. <i>open reading frame</i>)
OUN/ CNS	ośrodkowy układ nerwowy (ang. <i>central nervous system</i>)
PCBP1	białko wiążące poli(rC) 1 (ang. <i>poly(rC)-binding protein 1</i>)
pCLAP	ang. <i>peptide cross-linking and affinity purification</i>
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	paraformaldehyd (ang. <i>paraformaldehyde</i>)
PLP	białko proteolipidowe (ang. <i>proteolipid protein</i>)
PNA	kompleks peptydowo-nukleinowy (ang. <i>peptide-nucleic acid</i>)
PTEX	ang. <i>phenol toluol extraction</i>
qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)

RAPID	ang. <i>RNA–protein interaction detection</i>
RAP-MS	oczyszczanie z antysensownym RNA połączone ze spektrometrią masową (ang. <i>RNA antisense purification coupled with mass spectrometry</i>)
RBD	domena wiążąca RNA (ang. <i>RNA-binding domain</i>)
RBP	białko wiążące RNA (ang. <i>RNA-binding protein</i>)
RBD-ID	identyfikacja regionów wiążących RNA metodą proteomiczną (ang. <i>proteomic identification of RNA-binding regions</i>)
RI	zatrzymany intron (ang. <i>retained intron</i>)
RIC	metoda wychwytywania interaktomu RNA (ang. <i>RNA interactome capture</i>)
RIP	immunoprecypitacja RNA (ang. <i>RNA immunoprecipitation</i>)
RIP-seq	sekwencjonowanie połączone z RIP (ang. <i>RNA immunoprecipitation sequencing</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RNaza	rybonukleaza (ang. <i>ribonuclease</i>)
RNaza R	rybonukleaza R (ang. <i>ribonuclease R</i>)
RNP	kompleks rybonukleoproteinowy (ang. <i>ribonucleoprotein</i>)
Rpm	obroty na minutę (ang. <i>revolutions per minute</i>)
RRM	motyw rozpoznający RNA (ang. <i>RNA recognition motif</i>)
rRNA	rybosomalny RNA (ang. <i>ribosomal RNA</i>)
RT	odwrotna transkrypcja (ang. <i>reverse transcription</i>)
RT-PCR	odwrotna transkrypcja z reakcją łańcuchową polimerazy (ang. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SM	stwardnienie rozsiane (ang. <i>multiple sclerosis</i>)
snRNA	mały jądrowy RNA (ang. <i>small nuclear RNA</i>)
ssRNA	jednoniciowe RNA (ang. <i>single-stranded RNA</i>)
STAMP	ang. <i>surveying targets by APOBEC-mediated profiling</i>
TDP-43	białko TDP-43 (ang. <i>transactivation (TAR) DNA-binding protein 43 kDa</i>)
TRIBE	ang. <i>targets of RNA-binding proteins identified by editing</i>
tRNA	transportujące RNA (ang. <i>transfer RNA</i>)
UTR	region mRNA nieulegający translacji (ang. <i>untranslated region</i>)
UV	promieniowanie ultrafioletowe (ang. <i>ultraviolet</i>)
vIPR	badanie interakcji RNA-białko <i>in vivo</i> przez RNA pull-down (ang. <i>in vivo interactions by pull-down of RNA</i>)

WT	typu/ szczepu dzikiego (ang. <i>wild-type</i>)
XPO2	eksportyna-2 (ang. <i>exportin-2</i>)
XRNAX	ang. <i>protein-crosslinked RNA extraction</i>
XRNAX B	metoda XRNAX poprzedzona homogenizacją przez biopulweryzację
XRNAX H	metoda XRNAX poprzedzona homogenizacją w homogenizatorze Dounce'a
ZnF	motyw palca cynkowego (ang. <i>zinc finger domain</i>)

Streszczenie

Białka wiążące RNA (RBP) biorą udział w regulacji większości procesów związanych z funkcjonowaniem RNA w komórkach. Agregacja RBP, zmiany lokalizacji komórkowej tych białek oraz zaburzenia w interakcjach RNA-białko zostały powiązane z patogenezą niektórych chorób neurologicznych. W ostatnich latach odkryto, że RNA, w tym liczne niekodujące RNA (ncRNA) również mogą wpływać na funkcje i lokalizację RBP, np. wykazano, że niektóre koliste RNA (circRNA) kształtują aktywność tych białek, działając jako stabilizatory lub uczestnicząc w ich transporcie. Chociaż opisano kilka istotnych interakcji circRNA z białkami w układzie nerwowym, funkcje większości endogennych circRNA i makromolekuł, które z nimi oddziałują pozostają nieznane.

Pomimo rozwoju nowych metod badania kompleksów RNA-białko, większość z nich została zoptymalizowana do pracy na liniach komórkowych. W niniejszej pracy doktorskiej skoncentrowałam się na zoptymalizowaniu wysokoprzepustowych metod badania interakcji RNA-białko bezpośrednio w tkance, tak by umożliwić rozpoznanie i analizę natywnych interakcji RNA-RBP występujących w warunkach *in vivo*. Głównymi celami zastosowania opracowywanych przez mnie metod była charakterystyka puli białek RBP w mózgu myszy oraz przybliżenie funkcji endogennych kolistych RNA wzbogaconych w mózgu w porównaniu do innych tkanek.

W pierwszej części pracy zaadaptowałam metodę XRNAX do identyfikacji interaktomu całkowitego RNA z białkami w tkance mózgowej myszy szczepu dzikiego. Porównałam dwie metody homogenizacji mózgu i wybrałam biopulweryzację, jako technikę lepiej zachowującą integralność RNA w kompleksach z białkami po naświetlaniu światłem ultrafioletowym. Stabilne kompleksy RNA-białko izolowano za pomocą procedury XRNAX oraz dodatkowo oczyszczano na kolumnie krzemionkowej, a peptydy uzyskane po częściowym trawieniu identyfikowano metodą spektrometrii masowej. Zidentyfikowano kilkaset białek, z których większość stanowiły znane, kanoniczne RBP. Następnie, zastosowałam tą samą procedurę do analizy tkanki mózgowej myszy z defektem mielinizacji (*shiverer*). Wyniki ujawniły zaburzenia w interakcjach RNA-białko wśród kanonicznych RBP zaangażowanych w alternatywny splicing i formowanie granul komórkowych. Te obserwacje potwierdzono dla białka MBNL1 m.in. poprzez zaobserwowanie zwiększonej kumulacji MBNL1 w jądrach komórkowych, co prawdopodobnie skutkowało zmianami w alternatywnym splicingu genów regulowanych przez to białko. Deregulacja lokalizacji MBNL1 została powiązana z obniżoną ekspresją circRNA *circMbnl1*(3,4,5,6), zawierającego sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) oraz z podwyższoną ekspresją mRNA *Mbnl1* z sekwencją NLS. Jest to przesłanka, która wskazuje

na to, że deregulacja circRNA może wpływać na lokalizację białka kodowanego przez ten sam gen, co circRNA.

W drugiej części pracy zoptymalizowałam protokół circRNA pull-down do izolacji i analizy białek związanych z endogennymi circRNA z mózgu myszy. Skuteczność zastosowanego protokołu została potwierdzona na podstawie wzbogacenia circRNA *Cdr1as* wraz z jego znanymi partnerami: miR-7 i AGO2. Analiza proteomiczna ujawniła również nowe interakcje *Cdr1as* z kilkoma RBP i białkami synaptycznymi. Dodatkowo, uzyskano specyficzny wychwyt dwóch kolejnych kolistych RNA wzbogaconych w mózgu: *circDtnb(5,6,7,8)* oraz *circHipk3(2)* oraz określono ich potencjał do wiązania białek. Ponadto zidentyfikowano miR-124-3p, jako mikroRNA oddziałujący z *circDtnb(5,6,7,8)*. W szerszej perspektywie wykorzystanie metody RNA pull-down może przyczynić się do lepszego poznania funkcji wielu innych endogennych circRNA w układzie nerwowym.

Podsumowując, niniejsza praca prezentuje nowe protokoły do wysokoprzepustowego badania natywnych interakcji RNA-białko w tkankach oraz dostarcza nowych danych poszerzających wiedzę o funkcjonowaniu RBP i circRNA w komórkach mózgu, zarówno w homeostazie, jak i w patologii układu nerwowego związanej z demielinizacją.

Abstract

RNA-binding proteins (RBPs) play crucial roles in regulating various aspects of RNA function within cells. Aggregation of RBPs, alterations in their subcellular localization, and disruptions in RNA-protein interactions have been linked to the pathogenesis of several neurological diseases. In recent years, RNA, including numerous non-coding RNAs (ncRNAs), has also been found to participate in the regulation of RBP function and localization. For instance, certain circular RNAs (circRNAs) have been shown to contribute to the regulation of RBP function, serving as scaffolds, protein stabilizers, or participating in their transport. Although several important circRNA-protein interactions in the nervous system have been described, the functions of most endogenous circRNAs remain largely unknown.

Despite development of many new methods for studying RNA-protein complexes, most of them have been optimized to be used in cell lines. This doctoral dissertation focused on optimizing high-throughput methods for studying RNA-protein interactions directly in tissue, to provide identification and analysis of native RNA-RBP interactions naturally occurring in a living organism. The primary aims were to characterize the RBP repertoire in the brain and to gain insights into the functions of endogenous circular RNAs within this organ.

In the first part of this work, XRNAX method was adapted to identify the total RNA-protein interactome in wild-type mouse brain tissue. Two brain homogenization methods were compared, and biopulverization was selected as the technique best preserving the integrity of RNA-protein interactions after UV irradiation. Stable RNA-protein complexes were isolated using the XRNAX procedure and further purified on a silica column, with peptides identified by mass spectrometry. Several hundred proteins were identified, the majority of which were known, canonical RBPs. Subsequently, the same procedure was applied to analyze brain tissue from mice with a myelination defect (*shiverer* mice). The results revealed disruptions in RNA-protein interactions among canonical RBPs involved in alternative splicing and stress granule formation. These observations were confirmed for MBNL1 protein. MBNL1 was shown to be abnormally accumulated in the cell nuclei, which likely resulted in altered alternative splicing pattern among MBNL1-regulated genes. Further, the subcellular mislocalization of MBNL1 has been linked to reduced expression of *circMbnl1(3,4,5,6)*, which contains a nuclear localization signal (NLS). This coincided with the increased expression of mRNA *Mbnl1* also containing an NLS sequence. This evidence suggests that dysregulation of circRNA can affect the localization of a protein encoded by the same host gene.

In the second part, of my disertaion, I optimized circRNA pull-down protocol for isolation and analysis of proteins bound to endogenous circRNAs in the mouse brain. The

efficacy of the protocol has been confirmed by evidencing the enrichment of circRNA *Cdr1as* along with its known partners: miR-7 and AGO2. Proteomic analysis also revealed novel interactions of *Cdr1as* with several other RBPs and synaptic proteins. Additionally, specific pull-down of two other brain-enriched circular RNAs, *circDtnb(5,6,7,8)* and *circHipk3(2)*, has been performed, and their protein-binding potential has been assessed. Furthermore, miR-124-3p has been identified as directly interacting with *circDtnb(5,6,7,8)*. In a broader perspective, the application of this RNA pull-down method can contribute to a better understanding of the functions of many other endogenous circRNAs in the nervous system.

In summary, this dissertation presents novel high-throughput protocols for studying native RNA-protein interactions in tissues and provides new data expanding our knowledge about RNA binding proteins and circRNA functioning in the brain cells in homeostasis and in neurological pathology associated with dysmyelination.

1. Wprowadzenie

1.1. Białka wiążące RNA

1.1.1. Charakterystyka ogólna

Białka wiążące RNA (ang. *RNA-binding proteins*, RBPs) należą do licznej i wysoce zróżnicowanej grupy białek, które odgrywają kluczową rolę w podstawowych procesach biologicznych związanych z biogenezą oraz całym cyklem życiowym RNA w komórkach. RBP różni się zarówno powinowactwem, jak i swoistością wiązania RNA (ang. *ribonucleic acid*). Specyficzność RBP w wiązaniu RNA jest oceniana jako znacznie niższa w porównaniu z białkami wiążącymi DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*), ponadto interakcje RNA-białko mają charakter krótkotrwały¹⁻⁴. Jest to dodatkowe utrudnienie w zadaniu polegającym na ich charakterystyce i w badaniu mechanizmów i kinetyki wiązania RNA przez RBP⁵⁻⁸. Dzięki rozwojowi metod badania interakcji RNA-białko, liczba znanych białek wiążących RNA wzrosła w ostatnich kilku latach. Zgodnie z aktualną wersją bazy danych *RBPbase v0.22 alpha* (aktualizacja z 2025 roku), do tej pory odkryto 4257 ludzkich i 3168 mysich RBP^{1,9-12}. Dane te uzyskano na podstawie pionierskich badań nad interakcjami RNA-białko w systemach linii komórkowych, a w ostatnich dwóch latach atlas mysich RBP rozszerzono także o wyniki analiz proteomicznych z kilku organów myszy^{11,12}. Dla przykładu, baza danych *RBPbase v0.2.1 alpha* z roku 2024 obejmowała 2619 mysich RBP, a w roku 2025 liczba ta wzrosła do ponad 3000 białek, po uwzględnieniu danych z najnowszej pracy identyfikującej RBP w komórkach rozrodczych samców myszy¹². W ostatnich latach potwierdzono również, że aktywność RBP może być odmienna między różnymi narządami, niezależnie od ich obfitości¹¹. Informacje te podkreślają potrzebę charakteryzowania funkcji RBP w kontekście poszczególnych typów tkanek czy narządów i ich udziału w regulacji procesów molekularnych związanych z ekspresją genów w różnych układach biologicznych.

1.1.2. Domeny wiążące RNA oraz regiony nieuporządkowane

RBP tradycyjnie klasyfikuje się na podstawie obecności jednego lub kilku typów domen wiążących RNA (ang. *RNA-binding domains*, RBDs). Do najpowszechniejszych domen zalicza się motyw rozpoznający RNA (ang. *RNA recognition motif*, RRM), domenę K-homology (ang. *K homology domain*, KH), domenę wiążącą dwuniciowy RNA (ang. *double-stranded RNA-binding domain*, dsRBD) oraz domenę helikazy RNA zawierającą motyw DExH/D-box. Domeny te wykazują specyficzność względem sekwencji lub struktur drugorzędowych RNA¹³. RBP często zawierają wiele kopii tego samego typu RBD lub kombinacje różnych domen w obrębie jednego białka, co umożliwia kooperacyjne oddziaływanie z RNA^{14,15}. Rodziny

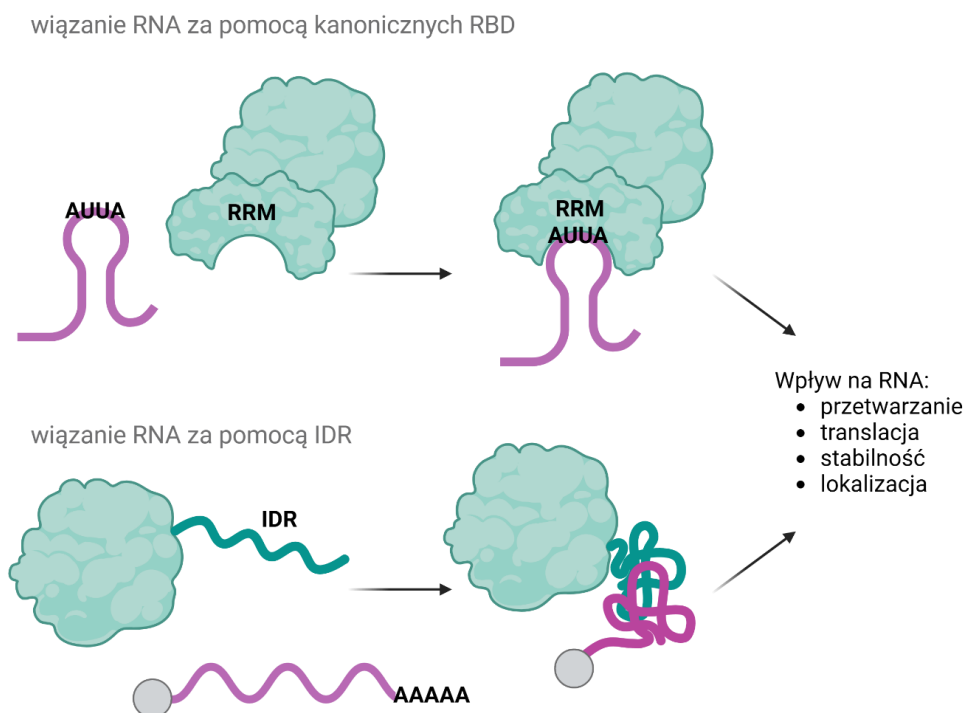
białek, posiadające określone typy RBD, przedstawiono w Tabeli 1, a schematyczny sposób działania RBD zaprezentowano na Rycinie 1 (panel górny).

Tabela 1. Domeny wiążące RNA wraz z reprezentatywnymi rodzinami białek.

NAZWA DOMENY	RODZINY BIAŁEK ZAWIERAJĄCE RBD
RRM	hnRNP, czynniki regulujące splicing, ELAV/Hu <i>powszechnie występująca domena</i>
KH	hnRNP, białka regulujące translację, NOVA <i>powszechnie występująca domena</i>
dsRBD	RNazy, Dicer, ADAR, PKR
Helikazy (DExH/D-box)	DExH/D-box, typu-RIGI, NS3, typu-UPF1, eIF4A
ZnF	Czynniki transkrypcyjne, enzymy METTL <i>powszechnie występująca domena</i>
CSD	Białka <i>cold shock</i> , białka Y-box
Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ)	Białka Argonaute, Dicer
P-element Induced Wimpy Testis (PIWI)	Białka Argonaute
Pentatricopeptide repeat (PPR)	Białka edytujące RNA
Domena homologii Pumilio (ang. <i>Pumilio</i> <i>homology domain</i>)	Białka PUF
Domena homologii YT521-B (ang. <i>YT521-B</i> <i>homology domain</i>)	Rodzina YTH odczytująca modyfikację m ⁶ A
Sm and Like-Sm (Sm / Lsm)	Białka spliceosomalne U1, HFQ

Opracowano na podstawie Corley i inni 2020¹

Współczesne kryteria definiowania RBP uległy istotnej rewizji w związku z nowymi wynikami badań uzyskanymi dzięki rozwojowi metod wychwytywania interaktomu RNA (ang. *RNA interactome capture*, RIC)^{10,16–18}, których zastosowanie rozszerzyło repertuar RBP. Po pierwsze, wykazano, że wiele nowoodkrytych RBP posiada zdolność wiązania RNA pomimo braku kanonicznych RBD¹⁹. Po drugie, kilka domen białkowych kojarzonych z wiązaniem DNA lub białek, jak np. motyw palca cynkowego (ang. *zinc finger domain*, ZnF) lub domena *cold shock* (ang. *cold shock domain*, CSD) zostało zaklasyfikowanych jako RBD - domeny wykazujące sekwencyjną specyficzność również wobec RNA (Tabela 1)^{20,21}.



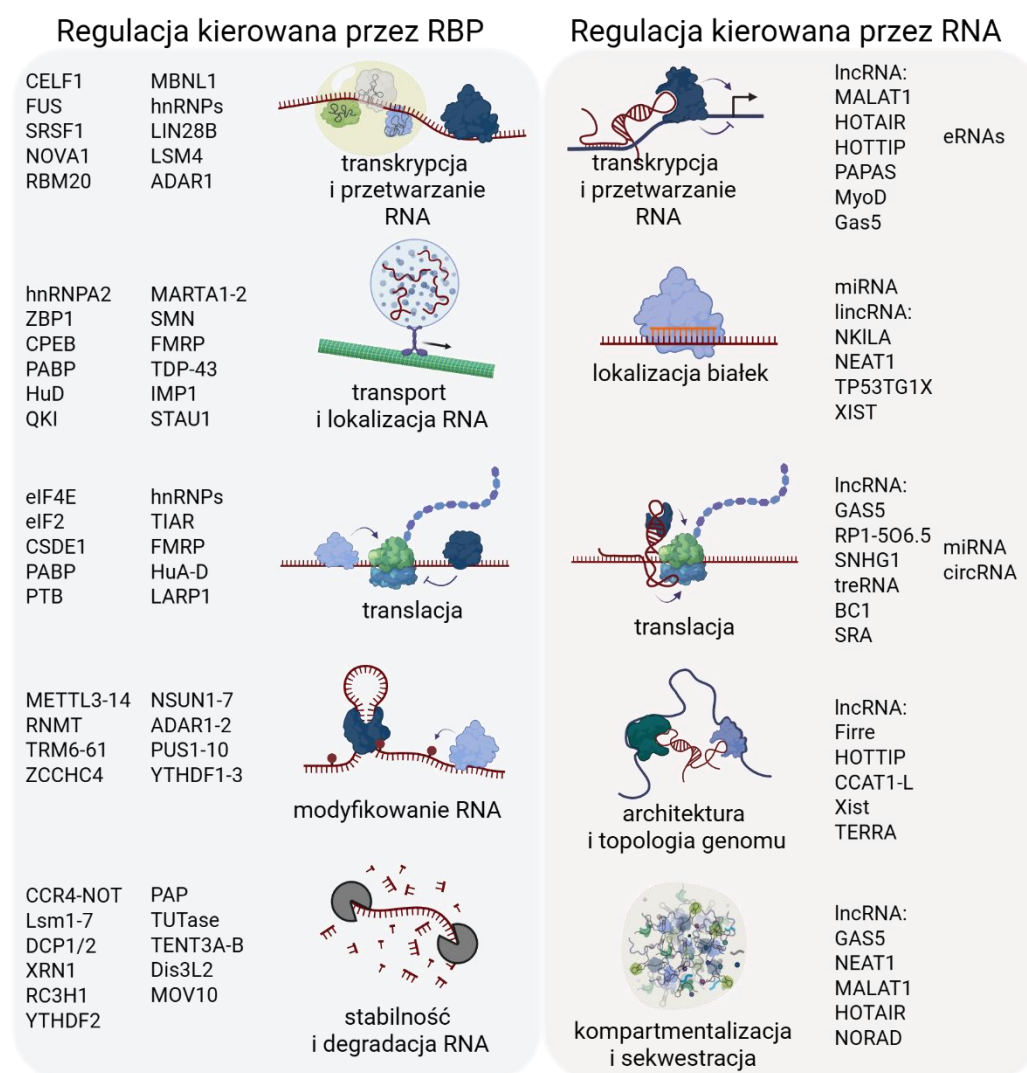
Rycina 1. Mechanizmy wiązania RNA przez RBP. Opracowano na podstawie Hentze i inni²²

Duży podzbiór białek zidentyfikowanych jako RBP, w tym niektóre enzymy metaboliczne, posiada regiony nieuporządkowane strukturalnie (ang. *intrinsically disordered region*, IDR) pozbawione dobrze zdefiniowanej struktury trójwymiarowej i klasycznej domeny wiążącej RNA (dolny panel Ryciny 1). Wykazano, że RBP posiadające IDR bogate w argininę lub reszty naładowane elektrostatycznie (jak np. w białkach FUS, TDP-43) pośredniczą w rozdzielaniu faz płyn-płyn i w formowaniu nieobłonionych organelli (ang. *membraneless organelles*), takich jak plamki jądrowe (ang. *nuclear speckles*), ciała Cajala, cytoplazmatyczne granule stresowe czy ciała P (ang. *P-bodies*)^{23–31}. Te dynamiczne struktury stanowią miejsca biosyntezy, przetwarzania i przechowywania RNA, a jednocześnie pełnią funkcję sekwestracji i przechowywania odpowiednich RBP, wpływając na ich lokalną dostępność.

1.1.3. Funkcjonalne powiązanie RBP i RNA

W ostatnich latach dzięki rozwojowi nowych technologii badawczych, odnotowano eksplozję doniesień naukowych opisujących dynamiczną ekspresję i funkcje biologiczne nowych klas niekodujących RNA (ang. *non-coding RNA*, ncRNA), takich jak długie ncRNA (ang. *long non-coding RNA*, lncRNA) i koliste RNA (ang. *circular RNA*, circRNA). RBP modulują funkcje RNA, w tym ncRNA, na wielu poziomach (Ryc. 2). Identyfikacja lokalizacji komórkowej oraz partnerów molekularnych ncRNA, takich jak RBP, stała się kluczowa dla formułowania hipotez badawczych dotyczących ich funkcji.

Sekwestracja RBP w organellach nieobłonionych, kierowana przez RNA, podważa klasyczny paradygmat postrzegania tych białek jako jedynych determinantów roli kompleksów RNA-białko^{32–34}. Liczne badania funkcjonalne nad ncRNA przyczyniły się do zmiany tej perspektywy, wyróżniając zwłaszcza lncRNA i mikroRNA (ang. *microRNA*, miRNA), wśród innych klas RNA, jako czynniki determinujące lokalizację RBP, ich dostępność funkcjonalną, aktywność enzymatyczną i przedstawiając niektóre RBP jako czynniki regulowane przez RNA, a nie jako ich regulatory (Ryc. 2). Ważne przykłady takich regulacji obejmują m.in. rekrutację czynników transkrypcyjnych do *loci* genomowych przez lncRNA^{35–37}, hamowanie aktywności enzymatycznej metylotransferaz przez wiązanie ncRNA^{38–41}, czy wpływanie na strukturę i upakowanie genomu przez niektóre lncRNA, które działają jako rusztowania łączące RBP z regionami regulacyjnymi DNA^{39,42–44}.



Rycina 2. Regulacja ekspresji genów kierowana przez RBP oraz przez ncRNA. Opracowano na podstawie^{35–49}.

1.1.4. Dysfunkcje RBP w chorobach neurodegeneracyjnych

RBP kontrolują szeroki zakres procesów molekularnych kluczowych dla dojrzewania neuronów, plastyczności synaptycznej oraz utrzymania funkcji neuronalnych i glejowych. Procesy te obejmują m.in. transport RNA wzdłuż aksonów i dendrytów, lokalną translację, stabilizację cząsteczek RNA oraz ich degradację. Lokalna synteza białek warunkuje złożone procesy związane z kontrolą pobudliwości neuronalnej i plastyczności synaptycznej^{50–53}.

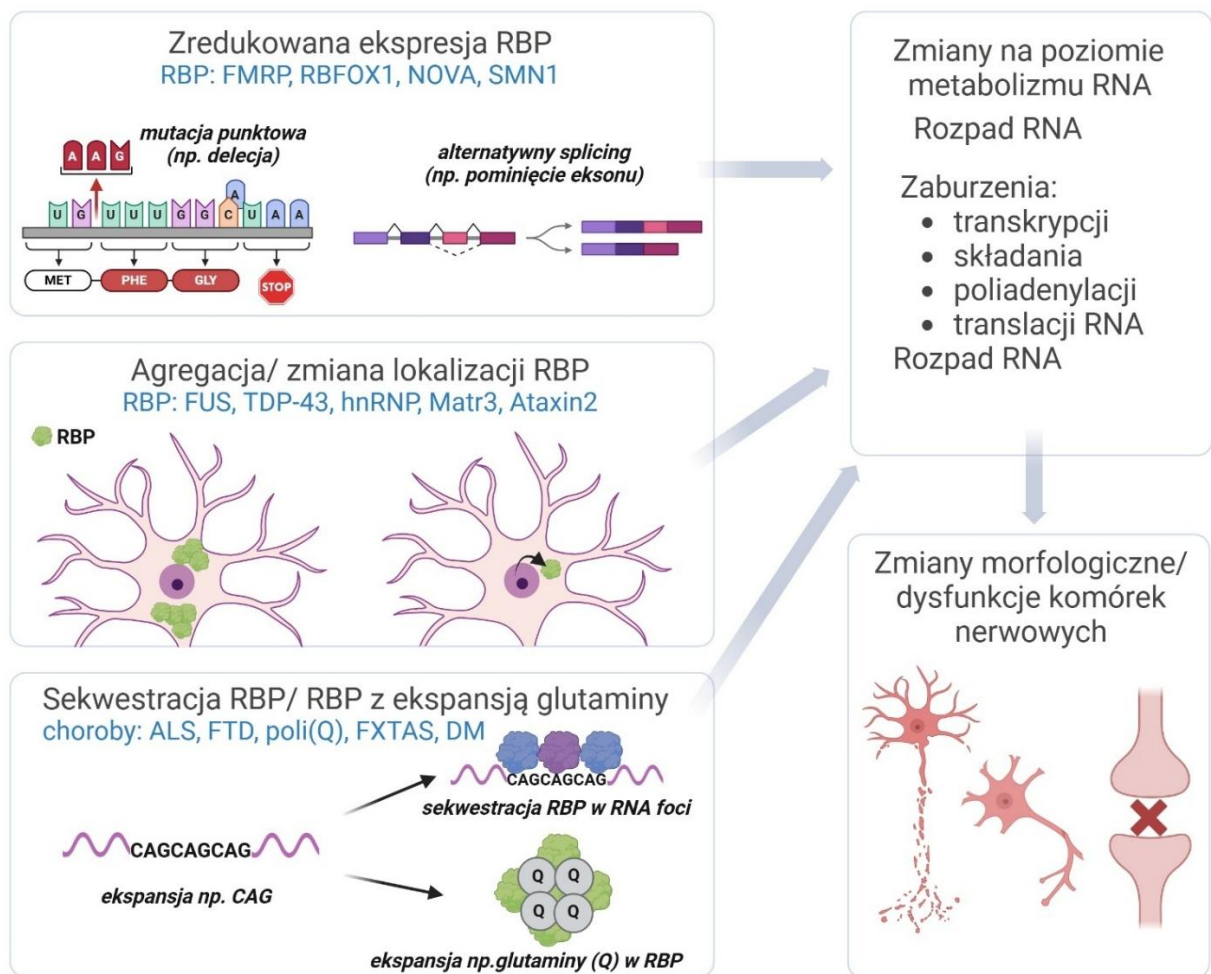
Deregulacja metabolizmu RNA zależnego od RBP w komórkach nerwowych może prowadzić do poważnych zaburzeń funkcjonowania mózgu, co wiąże się z patogenezą chorób neurologicznych, w tym neurodegeneracyjnych^{54,55}. Wyróżnić możemy trzy główne mechanizmy dysfunkcji RBP w tych schorzeniach (Ryc. 3):

1. **Zmniejszona ekspresja RBP** - spowodowana mutacjami punktowymi w DNA, nieprawidłowym splicingiem lub utratą alleli kodujących RBP.
2. **Nieprawidłowe przejście fazowe RBP** - związane z domenami o niskiej złożoności, prowadzące do patologicznej agregacji lub zmiany lokalizacji subkomórkowej RBP, a w konsekwencji do utraty lub zmiany ich funkcji biologicznych.
3. **Ekspansja powtórzeń nukleotydowych** - powodująca sekwestrację RBP w skupiskach RNA o zwiłokrotnionych powtórzeniach lub/i syntezę białek z wydłużonymi sekwencjami aminokwasowymi (np. poliglutaminowymi), które tracą naturalne właściwości.

Skutkiem tych zaburzeń są nieprawidłowości m.in. w splicingu, transporcie i translacji docelowego RNA, co finalnie upośledza morfologię i funkcję komórek nerwowych (Ryc. 3)⁵⁵.

Jednym z najlepiej scharakteryzowanych przykładów są patologie związane z białkami TDP-43 (ang. *transactivation (TAR) DNA-binding protein 43 kDa*) i FUS (ang. *fused in sarcoma*) w stwardnieniu zanikowym bocznym (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*, ALS) oraz otępieniu czołowo-skroniowym (ang. *frontotemporal dementia*, FTD). W tych chorobach dochodzi do cytoplazmatycznej agregacji białek, tworzenia inkluzji i utraty ich funkcji jądrowych, co zaburza metabolizm wielu transkryptów^{56–59}.

Odrębną, dobrze scharakteryzowaną grupę stanowią choroby poliglutaminowe np. choroba Huntingtona i ataksje rdzeniowo-mózdkowe, w których ekspansja powtórzeń CAG w DNA prowadzi do syntezy białek z wydłużonymi sekwencjami glutaminowymi. Agregaty takich białek w neuronach wywołują toksyczne skutki, włączając w to zaburzenia funkcji mitochondriów i nadmierną apoptozę^{60–65}.



Rycina 3. Główne mechanizmy prowadzące do zaburzeń RBP w chorobach neurodegeneracyjnych. Opracowano na podstawie Nussbacher i inni 2019⁵⁵. FXTAS - zespół drżenia i ataksji związany z łamliwym chromosomem X (ang. *fragile X-associated tremor/ataxia syndrome*), DM – dystrofia miotoniczna (ang. *myotonic dystrophy*).

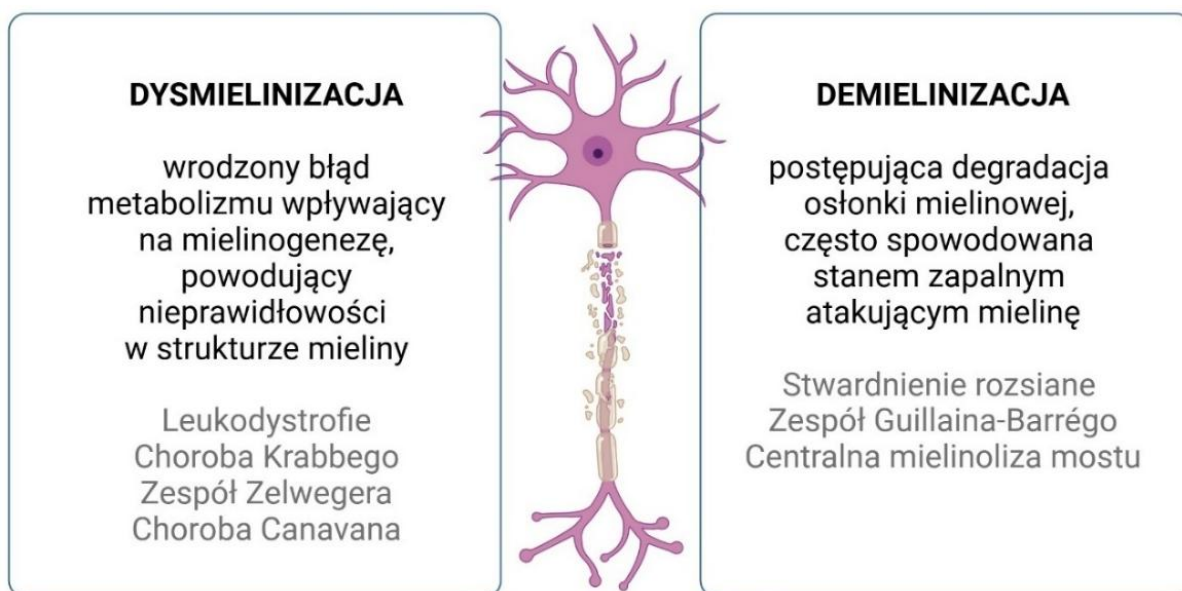
1.2. Choroby układu nerwowego związane z uszkodzeniem osłonek mielinowych komórek nerwowych

Mielina to wyspecjalizowana błona lipidowo-białkowa tworząca wielowarstwową osłonkę wokół aksonów neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Mielina w OUN jest dynamicznie organizowana przez oligodendrocyty, które wytwarzają równocześnie wiele wypustek otaczających sąsiadujące aksony. Izolacja włókien nerwowych przez mielinę umożliwia przewodzenie skokowe impulsu nerwowego, zwiększając prędkość propagacji potencjałów czynnościowych. Do dodatkowych funkcji mieliny należy zapewnianie wsparcia metabolicznego oraz ochrona mechaniczna aksonów, a także zwiększenie precyzji wyładowań w zakończeniach neuronów⁶⁶.

1.2.1. Klasyfikacja

Deficyt mieliny może wynikać z zaburzeń syntezy jej składników podczas rozwoju (dysmielinizacja) lub postępującej degradacji prawidłowo uformowanej osłonki (demielinizacja) (Ryc. 4).

Dysmielinizacja obejmuje choroby spowodowane wrodzonymi defektami metabolicznymi składników lipidowych mieliny lub mutacjami głównych białek strukturalnych, takich jak zasadowe białko mieliny (ang. *myelin basic protein*, MBP) oraz białko proteolipidowe (ang. *proteolipid protein*, PLP). Demielinizacja odnosi się do utraty wcześniej prawidłowo zsyntetyzowanej mieliny i może być wynikiem współdziałania różnych czynników⁶⁷. Choroby układu nerwowego związane z uszkodzeniem osłonek mielinowych sklasyfikowano i wymieniono na Rycinie 4.



Rycina 4. Klasyfikacja chorób związanych z uszkodzeniem osłonek mielinowych.

1.2.2. Podłoże

Choroby związane z deficytem mieliny w OUN mogą wynikać z predyspozycji genetycznych, przebytych stanów zapalnych, chorób autoimmunologicznych lub narażenia na toksyczne substancje chemiczne^{67,68}.

Stwardnienie rozsiane (ang. *multiple sclerosis*, SM) jest najczęstszą chorobą demielinizacyjną. Jest to przewlekła, zapalno-demielinizacyjna choroba OUN, która najczęściej rozpoczyna się między 20. a 40. rokiem życia i występuje częściej u kobiet niż u mężczyzn, w stosunku około 3:1^{69,70}. U większości pacjentów początkowe stadia choroby

charakteryzują się odwracalnymi epizodami dysfunkcji neurologicznej trwającymi kilka dni lub tygodni. Z czasem rozwijają się nieodwracalne deficyty kliniczne i poznawcze, które obniżają jakość i skracają długość życia pacjenta o kilka lat⁷⁰. Patogeneza SM jest złożona i obejmuje współdziałanie czynników genetycznych oraz środowiskowych. W całym genomie zidentyfikowano ponad 200 wariantów genetycznych związanych z ryzykiem SM, w tym polimorfizmy w genach układu HLA, które kodują białka zaangażowane w regulację odpowiedzi immunologicznej^{71,72}. Do czynników środowiskowych wpływających na rozwój SM należy zakażenie wirusem Epsteina-Barr. Infekcja wirusem w okresie dojrzewania lub wczesnej dorosłości zwiększa ryzyko SM nawet 32-krotnie, co może wynikać z mimikry molekularnej między antygenami wirusa a białkami mieliny^{73,74}. Inne czynniki środowiskowe obejmują palenie tytoniu, które nasila procesy zapalne i stres oksydacyjny, niski poziom witaminy D związany z niedostateczną ekspozycją na promieniowanie słoneczne oraz otyłość w okresie dojrzewania, która zwiększa produkcję prozapalnych cytokin, takich jak leptyna. Dodatkowo nadmierne spożycie alkoholu lub kofeiny oraz przebyta mononukleozą zakaźną również mogą zwiększać ryzyko rozwoju choroby⁷⁵.

Podłoże molekularne SM jest słabo poznane. Niedawno opublikowane badania wskazują na możliwy udział RBP w patogenezie tej choroby. Wykazano, że u pacjentów z SM dochodzi do błędnej lokalizacji heterogennej rybonukleoproteiny jądrowej A1 (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*, hnRNP A1). Białko to normalnie występuje w jądrze komórkowym, jednak u chorych akumuluje się w cytoplazmie neuronów korowych i rdzenia kręgowego⁷⁶. Co ciekawe, całkowite poziomy hnRNP A1 nie różnią się między zdrowymi mózgami a mózgami pacjentów z SM, kluczowe znaczenie ma jednak utrata funkcji wynikająca z jego nieprawidłowej lokalizacji. Fenotyp ten został również odtworzony w mysim modelu demielinizacji⁷⁷. Ponadto u pacjentów z SM zaobserwowano błędną lokalizację cytoplazmatyczną innego RBP - białka TDP-43⁷⁶, które jest znane ze swojej roli w neurodegeneracji.

W kilku pracach badawczych poświęcono uwagę profilowaniu miRNA⁷⁸⁻⁸² oraz circRNA⁸³⁻⁸⁵, a wyniki pokazały deregulację tych cząsteczek u pacjentów z SM w porównaniu do osób zdrowych. Wyniki te mogą wskazywać nowe kierunki badań zmian molekularnych w patogenezie SM, zorientowane na ncRNA, RBP lub interakcje RNA-RBP. Lepsze zrozumienie roli czynników molekularnych oraz ich powiązania z czynnikami środowiskowymi i układem immunologicznym może przyczynić się do opracowania bardziej skutecznych terapii celowanych dla pacjentów z SM.

1.3. Koliste RNA

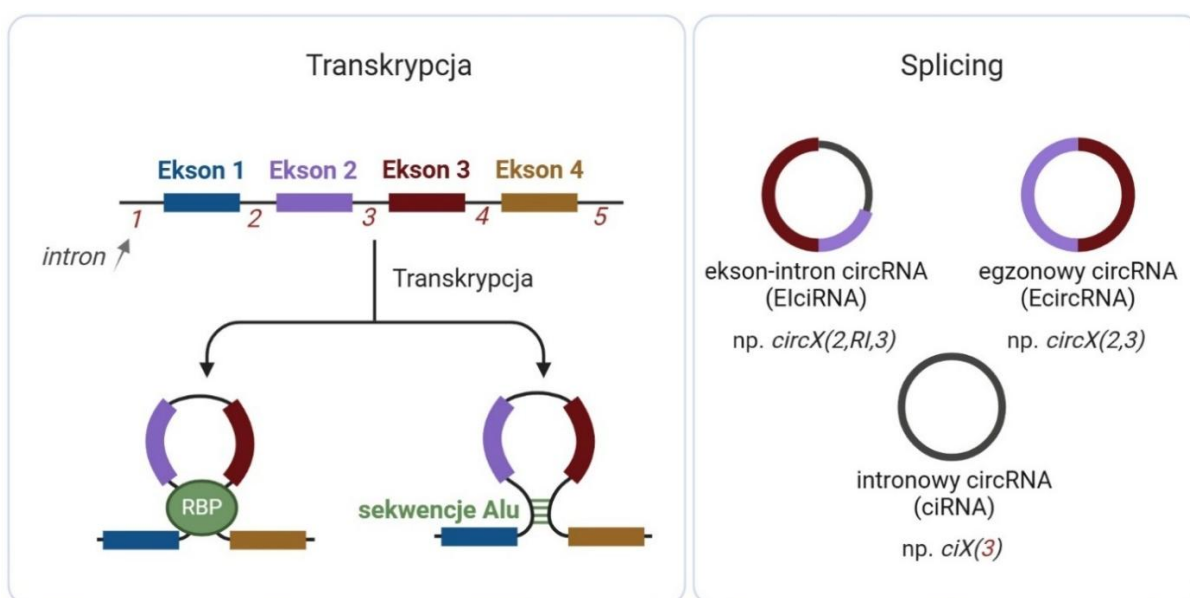
Koliste RNA to kowalencyjnie zamknięte jednoniciowe RNA (ang. *single-stranded RNA*, ssRNA) należące do klasy ncRNA. Fakt, że ssRNA może przyjąć formę kolistą, został po raz pierwszy zaobserwowany w wiroidach roślinnych⁸⁶. Powszechna ekspresja circRNA u organizmów wielokomórkowych została udokumentowana w ciągu ostatniej dekady, co stało się możliwe dzięki rozwojowi technologii sekwencjonowania RNA oraz metod bioinformatycznych umożliwiającym detekcję ncRNA, w tym circRNA^{87–97}.

1.3.1. Biogeneza i nazewnictwo

Większość circRNA powstaje z genów kodujących białka w wyniku splicingu wstecznego (ang. *backsplicing*, BS), który prowadzi do kowalencyjnego połączenia końca 5' eksonu z początkiem 3' eksonu, tworząc zamkniętą strukturę RNA. W wyniku tego procesu powstaje charakterystyczne połączenie ekson-ekson typu *backsplice* (ang. *backsplice junction*, BSJ), które odróżnia circRNA od liniowego mRNA. Chociaż większość adnotowanych circRNA składa się wyłącznie z eksonów (ang. *exonic circRNA*, EcircRNA), istnieją również inne typy circRNA, które powstają w wyniku alternatywnych mechanizmów biogenezy. Jednym z takich mechanizmów jest retencja intronu, która prowadzi do powstania circRNA zawierających zarówno eksony, jak i sekwencje intronowe (ang. *exon-intron circRNA*, EIciRNA)⁹⁸. Istnieją także koliste RNA tworzone wyłącznie z sekwencji intronowych (ang. *intronic circRNA*, ciRNA)⁹⁹. Typy te zostały przedstawione na Rycinie 5.

Biogeneza circRNA zależy od aktywności maszynerii spliceosomalnej oraz czynników regulujących splicing wsteczny. Kluczową rolę odgrywają intronowe sekwencje komplementarne (ang. *intronic complementary sequences*, ICS), zwane również ‘odwrotnie komplementarnymi sekwencjami’ (RCMs, ang. *Reverse Complementary Matches*¹⁰⁰), które znajdują się w intronach sąsiadujących z cyrkularyzującymi eksonami^{89,97}. Sekwencje ICS, takie jak powtórzenia *Alu*, tworzą struktury drugorzędowe na zasadzie komplementarności, co promuje cyrkularyzację eksonów znajdujących się pomiędzy nimi^{89,99} (Ryc. 5). Dodatkowo, RBP, takie jak QKI, NOVA2 czy MBNL1^{100–104}, mogą wiązać się z ICS, modulując ich interakcje i wpływając promująco^{104–106} lub hamująco na ekspresję circRNA^{92,100,101} (Ryc. 5). Wiązanie RBP w obrębie ICS może przybliżać lub oddalać pary ICS, co bezpośrednio wpływa na efektywność splicingu wstecznego. Ujawniono również, że modyfikacja RNA N⁶-metyloadenozyną (m⁶A) jest kolejnym czynnikiem promującym produkcję circRNA, a proces ten jest mediowany przez białka takie jak DDX5 i YTHDC1^{107,108}.

Z jednego genu może powstawać wiele izoform kolistych RNA, różniących się składem eksonów lub obecnością zatrzymanych intronów. Aby ustandaryzować sposób ich nazewnictwa, przyjęto konwencję obejmującą prefiks „circ”, symbol genu macierzystego oraz informację o składowych RNA, czyli numery eksonów lub intronów wchodzących w skład danego circRNA¹⁰⁹ (Ryc. 5). Na przykład kolisty RNA pochodzący z eksonów 2, 3, 4 i 5 genu *FAM120A* powinien być nazwany *circFAM120A(2,3,4,5)*. Jeśli w strukturze circRNA zachowany jest intron, dodaje się skrót „RI” (ang. *retained intron*), a w przypadku alternatywnego miejsca składania ze skróconym lub wydłużonym eksonem stosuje się odpowiednio, oznaczenie „S” (krótszy) lub „L” (dłuższy)¹⁰⁹. System ten pozwala na precyzyjne określenie struktury i pochodzenia molekularnego circRNA oraz ułatwia komunikację naukową w tej dziedzinie¹⁰⁹.



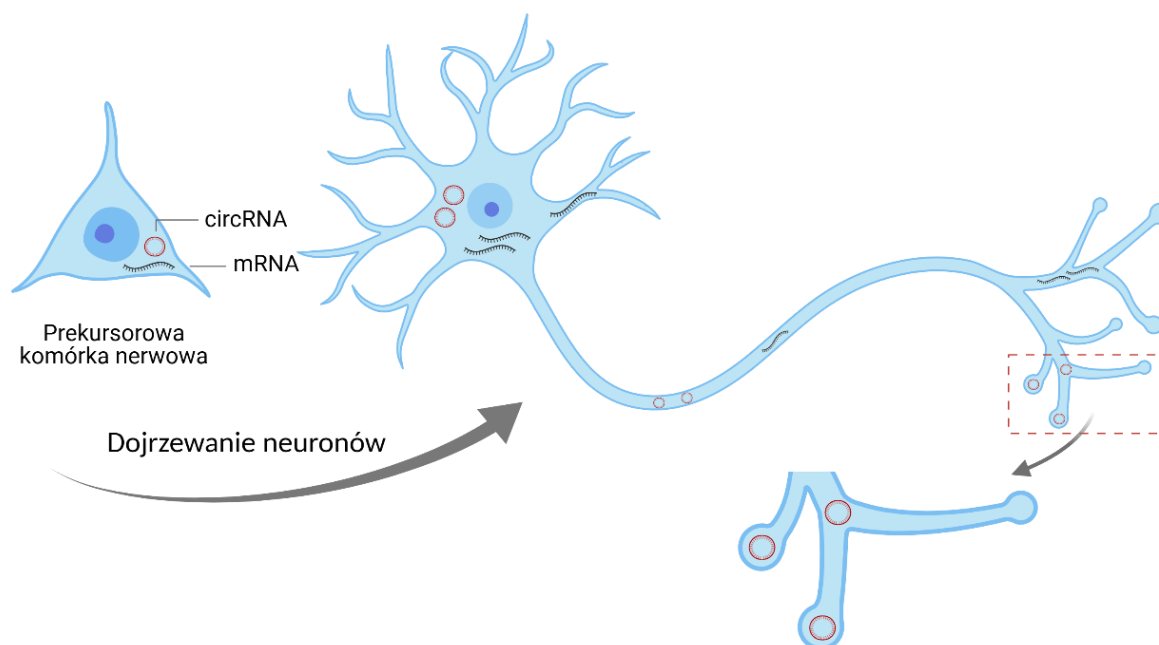
Rycina 5. Schemat biogenezy i nazewnictwa kolistych RNA.

1.3.2. Lokalizacja komórkowa i wzorce ekspresji

Pomimo że circRNA nie posiadają ogona poli(A) ani czapeczki 5', większość z nich znajduje się w cytoplazmie, co wskazuje na istnienie mechanizmu eksportu tych cząsteczek z jądra komórkowego. Huang i współpracownicy odkryli, że helikaza Hel25E u *Drosophila* i jej ludzki homolog - UAP56/URH49, są modulatorami lokalizacji circRNA i mogą kontrolować wydajność eksportu jądrowego poprzez wykrywanie dojrzałych circRNA ze względu na ich długość¹¹⁰. Niedawno opublikowane badania ujawniły, że eksport circRNA wymaga udziału białka Ran-GTP, eksportyny-2 (ang. *exportin-2*, XPO2) oraz białka wiążącego

RNA - IGF2BP1 (ang. *insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1*). IGF2BP1 pełni rolę adaptora, który wiąże się bezpośrednio z circRNA, jednocześnie rekrutując Ran-GTP i XPO2. Utworzony kompleks umożliwia następnie transport circRNA z jądra do cytoplazmy. Co ciekawe, mechanizm ten jest bardziej zbliżony do eksportu białek niż do eksportu mRNA¹¹¹. Ponadto wykazano, że niektóre circRNA mogą być eksportowane z jądra po wcześniejszej modyfikacji m⁶A, co jest procesem wspomagany przez białka takie jak DDX5 i YTHDC1^{112,113}.

Wzorce ekspresji circRNA są wysoce zróżnicowane między poszczególnymi cząsteczkami, jednak badania wykazały ogólną tendencję wskazującą na znacznie wyższą ekspresję circRNA w mózgu ssaków w porównaniu do innych narządów^{92,114,115}. Wykazano również, że dynamika ekspresji circRNA i mRNA pochodzących z tego samego genu często różni się, a wiele kolistych RNA ulega znacznie wyższej ekspresji niż ich liniowe odpowiedniki⁹². Co więcej, liczne circRNA w mózgu są transkrybowane z genów kodujących białka synaptyczne, a same kolisty RNA często lokalizują się w zakończeniach nerwowych^{114,116}. Wyniki tych badań sugerują potencjalne funkcje circRNA w komórkach nerwowych, szczególnie w synapsach (Ryc. 6).



Rycina 6. Synaptyczna lokalizacja circRNA w neuronach. Opracowano na podstawie Rybak-Wolf 2015, You 2015^{92,114}.

1.3.3. Stabilność circRNA

Kolista, zamknięta struktura oraz brak wolnych końców 3' i 5' sprawiają, że circRNA są bardziej stabilne i odporne na degradację w porównaniu do ich liniowych odpowiedników - mRNA. Badania wykazały, że większość circRNA w komórkach ssaków charakteryzuje się znacznie dłuższym czasem półtrwania (średnio 20 godzin) w porównaniu do mRNA (4–7 godzin), co potwierdza ich wyjątkową trwałość^{117,118}. Całkowite poziomy kolistych RNA wzrastają wraz z wiekiem w tkance mózgowej myszy, nicieni i much^{119–122}. Najnowsze wyniki profilowania circRNA z głów *Drosophila* potwierdzają, że ta akumulacja jest spowodowana głównie wysoką stabilnością circRNA, a nie ich zwiększoną biogenezą¹²³.

Do tej pory zidentyfikowano kilka mechanizmów degradacji circRNA. W rozpad circRNA mogą być zaangażowane endonukleazy, takie jak AGO2, w procesie kierowanym przez miRNA. Przykładem jest degradacja circRNA *Cdr1as* (ang. *Cdr1 antisense RNA*) przez kompleks miR-671 i AGO2, który rozpoznaje specyficzną sekwencję w cząsteczce circRNA^{124,125}. Należy jednak podkreślić, że nie wszystkie circRNA posiadają w obrębie swojej struktury miejsce wiązania dla miRNA. Innym białkiem uczestniczącym w procesie destabilizacji circRNA jest GW182¹²⁶. Białko to posiada domenę Mid, która może służyć jako rusztowanie molekularne do rekrutacji różnych czynników rozpadu RNA¹²⁷. Zaproponowano, że GW182 może pośredniczyć w interakcjach między circRNA a czynnikami rozpadu circRNA poprzez swoją domenę Mid¹²⁶.

Struktury drugorzędowe circRNA, takie jak hybrydy DNA:RNA tworzone w miejscach transkrypcji, są rozpoznawane przez RNazę H1, co inicjuje ich degradację¹²⁸. Dodatkowo, helikaza RNA UPF1 rozpoznaje i rozwija struktury drugorzędowe circRNA, umożliwiając ich rozkład przez endonukleazę G3BP1¹²⁹. W warunkach infekcji wirusowych circRNA mogą tworzyć nietypowe struktury, które są rozpoznawane i przecinane przez RNazę L, co stanowi część odpowiedzi przeciwwirusowej¹³⁰.

Najnowsze badania wykazały również udział rybonukleazy DIS3 w degradacji circRNA. Białko to wiąże się preferencyjnie z motywami bogatymi w uracyl w circRNA, prowadząc do ich rozkładu w cytoplazmie. Mechanizm ten jest ewolucyjnie zachowany u myszy i ludzi¹³¹.

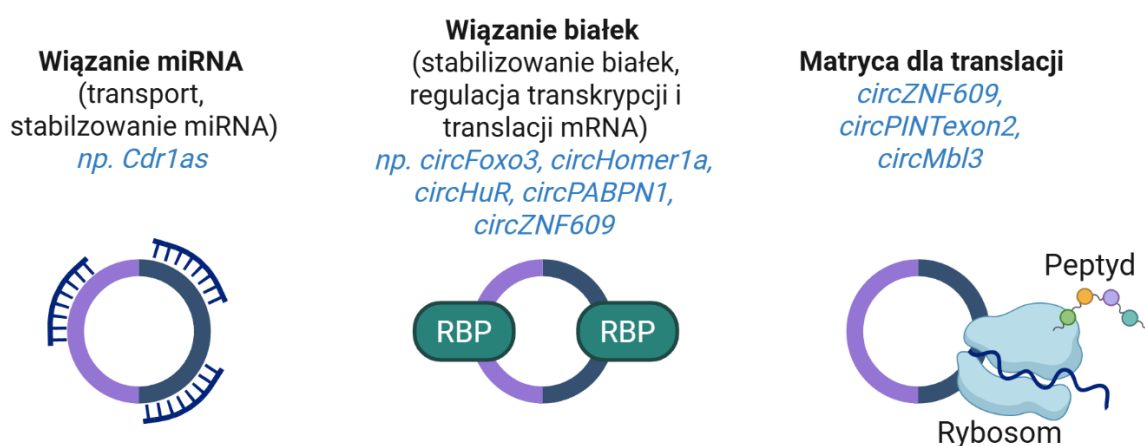
1.3.4. Funkcje circRNA

1.3.4.1. Oddziaływanie z miRNA

Jednym z najlepiej poznanych circRNA jest *Cdr1as*, który występuje wyłącznie w strukturze kolistej i charakteryzuje się wysoką liczebnością w układzie nerwowym ssaków,

w tym u człowieka i myszy. Badania wykazały, że *Cdr1as* jest głównie zlokalizowany w cytoplazmie komórek OUN^{91,92,124}. Dalsze analizy ujawniły, że cząsteczka ta ulega specyficznej ekspresji w neuronach, zwłaszcza w neuronach pobudzających mózgu, i zawiera ponad 70 zachowanych miejsc wiązania miRNA miR-7^{91,92,125,132} (Ryc. 7). Piwecka i współpracownicy zaproponowali, że *Cdr1as* może regulować stabilność i transport kompleksu miR-7:AGO w neuronach, a także że miR-671, wiążąc się z *Cdr1as*, moduluje jego poziom¹²⁵. Wyciszenie *Cdr1as* w mózgu myszy prowadziło do obniżenia poziomu miR-7, co skutkowało zwiększoną ekspresją markerów aktywności neuronalnej regulowanych przez miR-7¹²⁵. Najnowsze badania wskazują, że *Cdr1as*, poprzez wiązanie miR-7, buforuje aktywność miRNA, modulując uwalnianie glutaminianu z zakończeń presynaptycznych. Mechanizm ten wpływa na łączność neuronalną odpowiedzialną za długotrwałą plastyczność synaptyczną¹³³. Dodatkowo wykazano, że *Cdr1as* może hamować regulację docelowych mRNA przez miR-7, zapobiegając w ten sposób śmierci komórek wywołanej udarem niedokrwiennym mózgu¹³⁴.

Zidentyfikowano także inne przypadki modulowania transportu i aktywności miRNA przez circRNA. Na przykład *circNRIP1* wiąże miR-149, wpływając na szlak AKT1/mTOR i promując progresję raka żołądka¹³⁵. Z kolei *circHIPK3* poprzez wiązanie miR-558 tłumi ekspresję heparynazy, co hamuje inwazję raka pęcherza moczowego¹³⁶. Te przykłady wskazują na istotną rolę mechanizmu oddziaływania circRNA-miRNA w procesach nowotworowych. Funkcje takich interakcji w układzie nerwowym pozostają słabo poznane.



Rycina 7. Funkcje kolistych RNA.

1.3.4.2. Oddziaływanie z białkami

Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że circRNA mogą wiązać białka i że te kompleksy pełnią istotne funkcje w różnych procesach biologicznych (Ryc. 7). Analiza 16 zbiorów danych eCLIP zdeponowanych w ENCODE (HepG2: n=5 oraz K562: n=11) ujawniła, że circRNA

kolokalizują z RBP w ludzkich liniach komórkowych HepG2 i K562, a także wykazała wzbogacenie miejsc wiązania RBP w obrębie eksonów podlegających cyrkularyzacji¹³⁷. W tej samej pracy wykazano, że *circCDYL* zawiera wiele miejsc wiązania RBP i oddziałuje z białkiem GRWD1 w komórkach HepG2. Analizy kilku zestawów danych sekwencjonowania circRNA w mózgu człowieka ujawniły wysoką korelację między poziomem circRNA a ekspresją RBP w neuronach. W szczególności białka PTBP1 i PTBP2 wykazały silną korelację z circRNA, przy czym niski poziom PTBP1 i wysoki poziom PTBP2 zaobserwowano zarówno w neuronach GABAergicznym, jak i glutaminergicznym¹³⁸. Znane są również przypadki wiązania RBP przez koliste RNA, w których circRNA pełnią rolę rusztowania białek. Na przykład *circFoxo3* w komórkach NIH3T3 wiąże białka CDK2 oraz p21, tworząc potrójny kompleks *circFoxo3*-p21-CDK2, który blokuje funkcję CDK2 i opóźnia progresję cyklu komórkowego¹³⁹.

Oddziaływanie circRNA z białkami odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu układu nerwowego. *CircHomer1a*, który jest wzbogacony w neuronach i ulega silnej ekspresji w korze czołowej, wiąże się z białkiem HuD (znanym również jako ELAVL4), co prowadzi do zwiększonej ekspresji synaptycznej *circHomer1a* w mysiej korze przedczołowej¹⁴⁰. *CircHomer1a* wpływa na ekspresję genów synaptycznych i funkcje poznawcze, a jego antagonizm wobec liniowego mRNA *Homer1b* jest kluczowy dla regulacji plastyczności synaptycznej. Ponadto zidentyfikowano eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4A-III (EIF4A3) jako białko bezpośrednio wiążące się z *circHomer1a*, które pozytywnie reguluje jego syntezę¹⁴¹. Niedawno wykazano, że inny circRNA, *circCwc27*, który podobnie jak *circHomer1a* występuje obficie w mózgu, szczególnie w neuronach, jest związany z patogenezą choroby Alzheimera. Mechanizm molekularny związany z *circCwc27* został zbadany za pomocą techniki RNA pull-down w hipokampie myszy. Wśród białek wiążących *circCwc27* zidentyfikowano PUR- α , którego aktywność jest hamowana przez *circCwc27*, a to przyczynia się do patogenezы choroby Alzheimera¹⁴².

CircRNA mogą również modulować procesy transkrypcji i translacji mRNA zarówno w sposób promujący, jak i hamujący. Na przykład *circEIF3J* oraz *circPAIP2* zwiększają ekspresję swoich genów rodzicielskich⁹⁸. Z kolei *circHuR* tłumi transkrypcję genu *HuR* poprzez wiązanie się z białkiem CNBP, co zapobiega jego interakcji z promotorem genu *HuR*¹⁴³. *CircPABPN1* znacząco hamuje wiązanie białka HuR z mRNA *PABPN1*, ograniczając syntezę tego białka¹⁴⁴. Inny kolisty RNA, *circZNF609*, oddziałuje z białkiem HuR, promując jego wiązanie z mRNA *CKAP5* i wzmacniając translację CKAP5, co w konsekwencji reguluje

funkcję mikrotubul w komórkach nowotworowych i wspomaga progresję cyklu komórkowego¹⁴⁵.

CircRNA mogą również uczestniczyć w transporcie białek. Na przykład *circAMOTL1*, wysoce eksprymowany w tkance serca noworodków, wiąże białka PDK1 i AKT1, zwiększając fosforylację AKT1 i ułatwiając jego translokację do jądra komórkowego. Mechanizm ten wspiera przeżycie kardiomiocytów oraz ich regenerację¹⁴⁶. Z kolei *circYAP1* wiąże białko YAP1, zapobiegając jego fosforylacji i zwiększając transport YAP1 do jądra komórkowego¹⁴⁷.

Znane oddziaływania circRNA z białkami oraz ich funkcje zostały podsumowane i przedstawione w Tabeli 3 w punkcie 1.4.5.

1.3.4.3. Translacja kolistych RNA

Nieliczne prace przedstawiają mechanizmy translacji circRNA lub ich fragmentów do peptydów, mimo braku końców 3' i 5' (Ryc. 7). Udowodniono, że translacja circRNA może zachodzić dzięki niekanonicznym mechanizmom inicjacji, takim jak obecność wewnętrznego miejsca wiązania rybosomu (ang. *internal ribosome entry site*, IRES) lub modyfikacje postranskrypcyjne, np. m⁶A. Legnini i współpracownicy zidentyfikowali otwartą ramkę odczytu (ang. *open reading frame*, ORF) w sekwencji *circZNF609* i wykazali, że ulega on translacji do białka w sposób zależny od splicingu, ale niezależny od czapeczki 5'. Wyniki te pokazały, że *circZNF609* koduje białko regulujące proliferację mioblastów¹⁴⁸. W innej pracy wykazano, że *circPINTexon2* zawiera funkcjonalny IRES, który umożliwia syntezę peptydu o długości 87 aminokwasów, hamującego proliferację komórek glejaka¹⁴⁹. Jeszcze inna grupa badawcza zidentyfikowała, w pomiarze spektrometrii mas, białko pochodzące z *circMbl3*¹⁵⁰. *CircMbl* jest interesujący również z innego względu. Wcześniejsze badania wykazały, że biogeneza *circMbl* jest regulowana przez czynnik splicingowy - białko MBL kodowane przez gen *muscleblind*. Białko to wiąże się z intronami flankującymi sekwencję *circMbl*, co umożliwia jego cyrkularyzację. Co ciekawe, *circMbl* może wiązać się z białkiem MBL i modulować jego dostępność, tworząc mechanizm sprzężenia zwrotnego, który reguluje biogenezę kolistego RNA¹⁰².

1.4. Metody badania interakcji RNA-białko *in vivo*

W warunkach natywnych większość białek oddziałuje z cząsteczkami RNA w sposób przejściowy, głównie za pośrednictwem wiązań wodorowych lub oddziaływań elektrostatycznych^{151–155}. Pomimo trudności wynikających z wysokiej dynamiki tych interakcji, opracowano kilka metod umożliwiających ich badanie. Metody te zazwyczaj

polegają na izolacji kompleksów rybonukleoproteinowych (ang. *ribonucleoprotein*, RNP) w ich stanie natywnym lub po etapie sieciowania, które stabilizuje interakcje RNA-białko poprzez wprowadzenie wiązań kowalencyjnych między zasadami w RNA a preferowanymi aminokwasami w białku. Jednym z klasycznych podejść do badania oddziaływań RNA-białko jest izolacja pojedynczego RBP i analiza związanych z nim cząsteczek RNA lub izolacja określonego RNA i identyfikacja oddziałujących z nim RBP^{156,157}. Na pograniczu tych dwóch podejść rozwijają się metody umożliwiające badanie całkowitego interaktomu RNA-białko.

1.4.1. Stabilizowanie interakcji RNA-białko

Sieciowanie to proces chemicznego łączenia dwóch lub więcej cząsteczek poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych w miejscu ich oddziaływania. Interakcje RNA-białko można stabilizować za pomocą odczynników chemicznych, takich jak formaldehyd (ang. *formaldehyde*, FA) czy paraformaldehyd (ang. *paraformaldehyde*, PFA), lub poprzez naświetlanie materiału biologicznego promieniowaniem ultrafioletowym (ang. *ultraviolet*, UV) o określonej długości fali. Sieciowanie umożliwia stosowanie rygorystycznych warunków w procedurach badawczych analizujących oddziaływanie RNA-białko, zwiększając specyficzność i skuteczność izolacji kompleksów RNA-RBP¹⁵⁸.

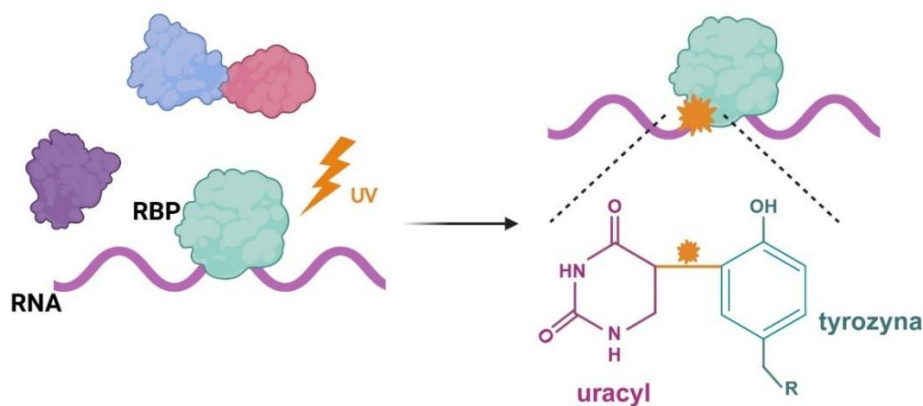
1.4.1.1. Sieciowanie formaldehydem

Chemiczne sieciowanie z użyciem FA lub PFA może prowadzić do stabilizacji interakcji kwas nukleinowy-białko oraz białko-białko i przebiega w dwóch etapach. W przypadku sieciowania interakcji RNA-białko, w pierwszym etapie FA reaguje z silnym nukleofilem, takim jak grupa aminowa w aminokwasie białka, co prowadzi do powstania produktu pośredniego, który szybko przekształca się w zasadę Schiffa (iminę). Aminokwasy najczęściej reagujące z FA to lizyna, arginina, histydyna, cysteina, tryptofan, tyrozyna, asparagina i glutamina¹⁵⁹. W drugim etapie zasada Schiffa reaguje z innym nukleofilem np. zasadą RNA, co ostatecznie prowadzi do powstania usieciowanego produktu RNA-białko. Nukleofil w drugim etapie reakcji może pochodzić również z innego białka lub DNA, co skutkuje powstaniem kompleksów białko-białko lub białko-DNA. Kolejną istotną cechą sieciowania chemicznego jest jego odwracalność na obu etapach reakcji¹⁶⁰. Wykazano, że zmiany stężenia stosowanego FA oraz czasu inkubacji z odczynnikiem chemicznym podczas procesu utrwalania wpływają na stabilizację interakcji RNA-białko lub przesuwiają reakcję w kierunku sieciowania kompleksów DNA/białko-białko¹⁶¹. Zdolność FA do stabilizacji interakcji między różnymi makrocząsteczkami jest zaletą w badaniach interakcji RNA-DNA-białko. Reakcję sieciowania

za pomocą FA można wzmocnić poprzez dodanie niektórych aminokwasów, takich jak lizyna lub glicyna^{160,162}.

1.4.1.2. Sieciowanie UV

Sieciowanie UV jest jedną z podstawowych metod stosowanych do stabilizacji kontaktów RNA-białko. Naświetlanie komórek promieniowaniem UV prowadzi do utworzenia wiązania kowalencyjnego między pierścieniami aromatycznymi znajdującymi się w bliskim sąsiedztwie, które występują zarówno w zasadach azotowych kwasów nukleinowych, jak i w wybranych aminokwasach (Ryc. 8)¹⁶³. Wykorzystanie światła UV stanowi standard w badaniach oddziaływań RNA-białko, ponieważ wiązania kowalencyjne powstają głównie między cząsteczkami RNA i białkami będącymi w bezpośrednim kontakcie, nie promując jednocześnie powstawania wiązań kowalencyjnych w oddziaływaniach białko-białko¹⁶⁴. Zazwyczaj stosuje się naświetlanie światłem UV o długości fali 254 nm. Alternatywnym podejściem jest sieciowanie UV przy długości fali 365 nm, które polega na utrwaleniu oddziaływań pomiędzy białkami i cząsteczkami RNA, które zawierają fotoreaktywne rybonukleozydy, np. 4-tiourydyne (4SU) lub 6-tioguanozynę (6SG). Sieciowanie UV przy długości fali 365 nm pozwala osiągnąć wyższą wydajność stabilizacji kompleksów RNA-białko w porównaniu z naświetlaniem światłem o długości fali 254 nm¹⁶⁵.



Rycina 8. Sieciowanie UV. Tworzenie wiązania kowalencyjnego między pierścieniami aromatycznymi zasad azotowych (np. uracylu) i aminokwasów (np. tyrozyny). R – rodnik. Utworzono w oparciu o Urdaneta & Beckmann 2020 oraz Kramer i inni 2011^{164,168}.

Wydajność sieciowania UV jest zależna od właściwości nukleotydów i reszt aminokwasowych. Pirymidyny wykazują wyższą fotoreaktywność niż puryny¹⁶⁶. Jeśli chodzi o aminokwasy, najwyższą reaktywnością cechują się reszty cysteiny, lizyny, fenyloalaniny, tryptofanu i tyrozyny, podczas gdy histydyna oraz kwasy glutaminowy i asparaginowy charakteryzują się nieco niższą wydajnością sieciowania¹⁶⁷. Należy pamiętać, że nie każde

białko ulega efektywnemu sieciowaniu z RNA po naświetlaniu światłem UV, co jest wynikiem wysokiej dynamiki i przejściowego charakteru interakcji RNA-białko⁶ oraz różnej fotoreaktywności określonych aminokwasów i nukleotydów^{166,167}. W przeciwieństwie do sieciowania chemicznego, sieciowanie UV jest termostabilne i nieodwracalne.

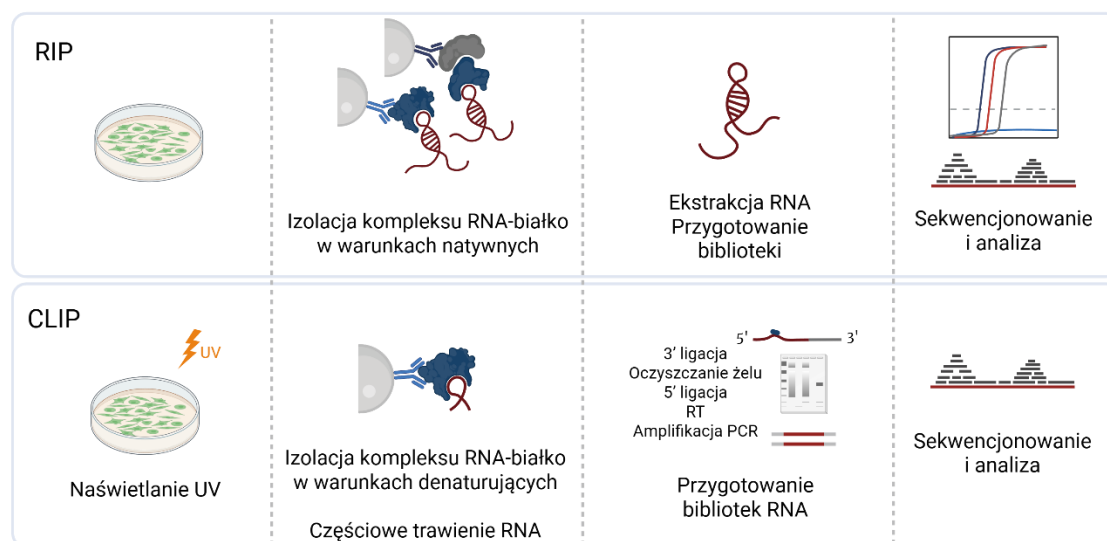
1.4.2. Metody analityczne zorientowane na wzbogacanie pojedynczego białka w kompleksie z RNA

Immunoprecypitacja RNA (ang. *RNA immunoprecipitation*, RIP) stanowi podstawowe podejście *ex vivo* służące do izolacji pojedynczego białka w celu analizy związanych z nim cząsteczek RNA. Metoda ta obejmuje izolację natywnych kompleksów RBP-RNA z ekstraktu komórkowego lub tkankowego przy użyciu przeciwciał specyficznych dla danego RBP, a następnie izolację i identyfikację związanego RNA metodami biologii molekularnej^{169,170}, np. poprzez sekwencjonowanie RNA (ang. *RNA immunoprecipitation sequencing*, RIP-seq) (Ryc. 9). Od momentu opracowania, metoda RIP była wielokrotnie wykorzystywana do badania interakcji RNA-białko, przyczyniając się m.in. do odkrycia nowych klas RNA wiązanych przez RBP, np. wiązanie lncRNA *Xist*, *Tsix* i *HOTAIR* przez białka kompleksu represyjnego Polycomb 2^{37,171,172}.

Protokół RIP opiera się na wychwytywaniu kompleksów RNA-białko w stanie natywnym, co uniemożliwia zastosowanie rygorystycznych warunków płukania po immunoprecypitacji. To ograniczenie może prowadzić do identyfikacji niespecyficznych interakcji RNA-białko, które nie występują *in vivo*. Np. wykazano, że podczas lizy komórek może dochodzić do powstania oddziaływań między cząsteczkami, które w warunkach fizjologicznych nie mają możliwości wzajemnego oddziaływania¹⁷³.

Problem ten rozwiązano poprzez wprowadzenie metody sieciowania i immunoprecypitacji (ang. *cross-linking and immunoprecipitation*, CLIP). CLIP stanowi zmodyfikowaną wersję protokołu RIP z dodatkowym etapem stabilizacji oddziaływań RNA-białko (Ryc. 9). Materiał biologiczny poddawany jest naświetlaniu światłem UV o długości fali 254 nm, co indukuje kowalencyjne połączenie RNA z białkiem podczas ich bezpośredniej interakcji. Następnie kompleksy RNA-białko izoluje się przy użyciu przeciwciał specyficznych dla danego białka. Wprowadzenie sieciowania umożliwia zastosowanie bardziej rygorystycznych warunków izolacji RNP oraz precyzyjną identyfikację docelowych RNA. Frakcję RNA analizuje się metodą wysokoprzepustowego sekwencjonowania, a całą procedurę określa się jako CLIP-seq (ang. *cross-linking immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing*) lub HITS-CLIP (ang. *high-throughput sequencing of RNA isolated by CLIP*)^{174,175}. Zmodyfikowane

metody CLIP, opracowane w ostatnich kilku latach, znacząco podnoszą swoistość, czułość oraz precyzję mapowania interakcji RNA-białko, wykorzystując m.in. fotoreaktywne nukleozydy i zoptymalizowane procedury przygotowania bibliotek^{165,176–181}.



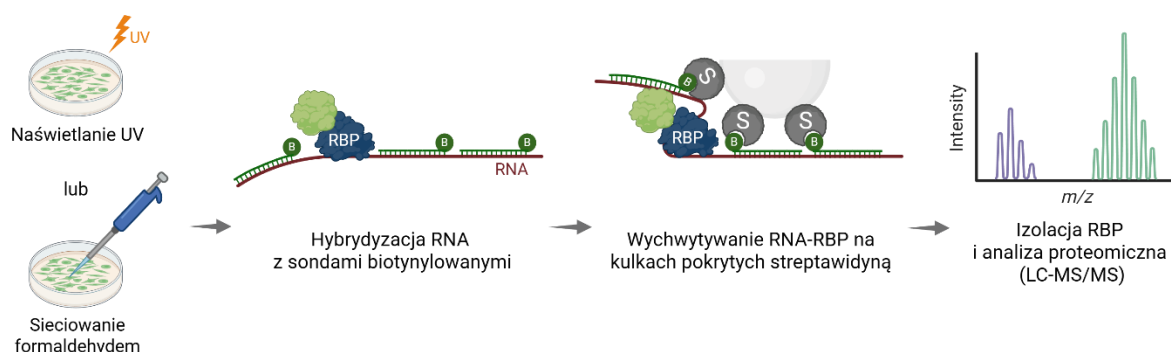
Rycina 9. Metody badania interakcji RNA-białko zorientowane na wychwytywaniu RBP.

Głównym ograniczeniem metod opartych na CLIP jest konieczność posiadania przeciwciała o wysokiej swoistości. Alternatywą są techniki niezależne od przeciwciał, takie jak TRIBE (ang. *targets of RNA-binding proteins identified by editing*), gdzie RBP poddaje się fuzji z domeną katalityczną ADAR, indukując edycję adenozyń do inozyń w docelowym RNA¹⁸². Podobnie metoda STAMP (ang. *surveying targets by APOBEC-mediated profiling*) wykorzystuje fuzję RBP z deaminazą APOBEC1, generującą konwersję cytozyn do uracyli w RNA¹⁸³.

1.4.3. Metody analityczne zorientowane na wzbogacanie pojedynczego RNA w kompleksie z białkami

Metody RIP oraz CLIP są bardzo przydatne do identyfikacji cząsteczek RNA oddziałujących z interesującym nas białkiem. Natomiast jeśli obiektem zainteresowania są białka oddziałujące z konkretnym RNA, wykorzystuje się metody typu RNA pull-down, które polegają na specyficznym wychwytywaniu docelowej cząsteczki RNA z komórki wraz z jej białkowymi partnerami. W ten sposób uzyskuje się tzw. RBPom (ang. *RBPome*), czyli zestaw białek wiążących konkretne RNA. Metody RNA-centriczne stały się standardem w analizie interakcji RNA-białko *in vivo*. Ich rozwój pozwala na mapowanie sieci regulacyjnych z udziałem niekodujących RNA, co dotychczas zostało wykorzystane głównie dla lncRNA.

Metody RNA pull-down, takie jak CHART (ang. *RNA capture hybridization analysis*^{184,185}), ChIRP-MS (ang. *chromatin isolation by RNA purification followed by mass spectrometry*^{162,186}), HyPR-MS (ang. *hybridization purification of RNA-protein complexes followed by mass spectrometry*¹⁸⁷), RAP-MS (ang. *RNA antisense purification coupled with mass spectrometry*^{188,189}), iDRiP (ang. *identification of proteins directly interacting with RNA*¹⁹⁰), czy vIPR (ang. *in vivo interactions by pull-down of RNA*¹⁹¹), umożliwiają identyfikację białek oddziałujących *in vivo* z konkretnymi cząsteczkami RNA, co jest kluczowe dla zrozumienia ich funkcji. Ich siła leży w specyficzności, pozwalającej badać interakcje wybranego RNA z jego interaktomem białkowym w warunkach komórkowych. Centralnym etapem jest stabilizacja kompleksów RNA-białko, najczęściej za pomocą sieciowania formaldehydem lub promieniowaniem UV. Następnie, docelowe RNA wraz z przyłączonymi białkami jest wychwytywane z użyciem oligonukleotydów antysensownych (ang. *antisense oligonucleotides*, ASO) znakowanych biotyną, a związane białka identyfikuje się spektrometrią mas sprzężoną z chromatografią cieczową (ang. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS/MS), co zaprezentowano na Rycinie 10. Metody te umożliwiły m.in. identyfikację białek stabilizujących mRNA *Ank* w dendrytach neuronów¹⁹², mapowanie interaktomów lncRNA^{188,190} oraz badanie regulacyjnej roli regionów UTR (ang. *untranslated region*) mRNA w transkrypcji i translacji¹⁹³.



Rycina 10. Metody RNA-centriczne oparte na wykorzystaniu ASO znakowanych biotyną do badania interakcji RNA-białko.

Techniki oparte o wykorzystanie ASO należą do najczęściej wykorzystywanych metod RNA pull-down. Podobieństwa i różnice w kluczowych protokołach opartych na ASO znakowanych biotyną, zarówno dla metod poprzedzonych sieciowaniem formaldehydem (CHART, ChIRP-MS, HyPR-MS), jak i naświetlaniem światłem UV (RAP-MS, vIPR), prezentuje Tabela 2.

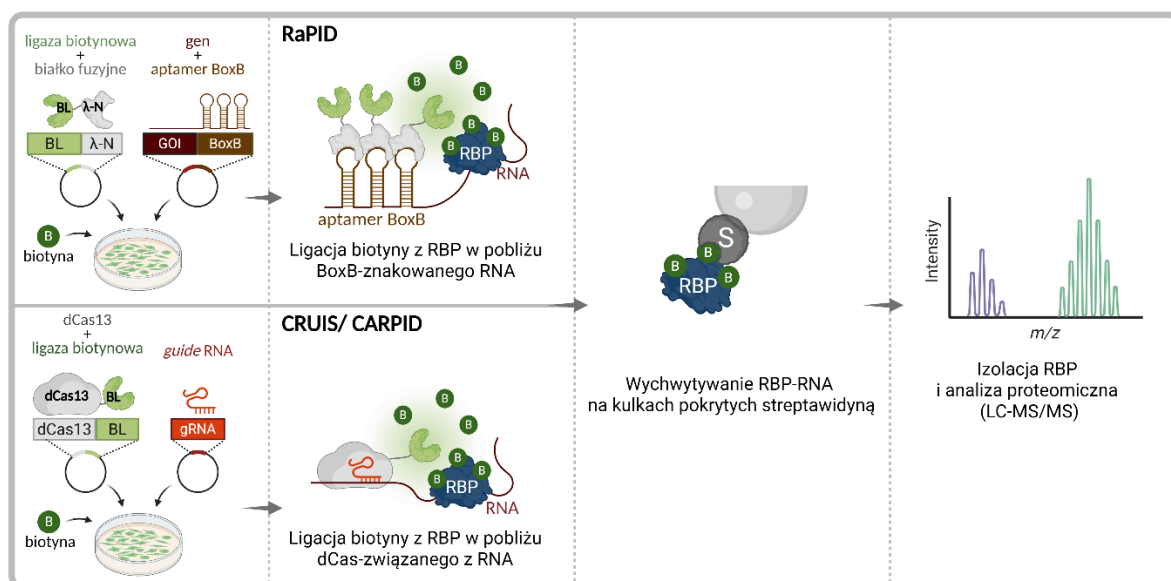
Tabela 2. Porównanie wybranych metod badania interakcji RNA-białko opartych na hybrydyzacji docelowego RNA z ASO.

	CHART-MS ¹⁸⁵	ChIRP-MS ¹⁶²	RAP-MS ¹⁸⁸	HyPR-MS ¹⁸⁷	vIRP ¹⁹¹
Materiał wyjściowy (input)	Linia komórkowa MCF-7	Zarodkowe komórki macierzyste	Zarodkowe komórki macierzyste	Komórki raka prostaty PC3	Szczepy <i>C. elegans</i>
Docelowe RNA	lncRNA: <i>roX2</i> , <i>NEAT1</i> , <i>MALAT1</i>	lncRNA: <i>TERC</i> , <i>roX2</i> , <i>HOTAIR</i> , <i>Xist</i>	<i>U1 snRNA</i> , <i>18S rRNA</i> , <i>lncRNA Xist</i>	lncRNA: <i>MALAT1</i> , <i>NEAT1</i> , <i>NORAD</i>	mRNA: <i>lin-41</i> , <i>gld1</i> , <i>alg-1</i>
Oligonukleotydy (sondy)	Znakowane biotyną ASO DNA	Znakowane biotyną ASO DNA	Znakowane biotyną ASO DNA	Znakowane biotyną ASO wychwytyjące z „uchwytem” na końcu 5’ Oligonukleotydy uwalniające z „uchwytem” na końcu 3’	Znakowane biotyną ASO DNA
Długość sond	25 nt	20 nt	90 nt	20-30 nt	20 nt
Liczba sond	1	43	142	2-3	10
Metoda sieciowania	3% FA, 30 min	3% FA, 30 min	UV 254 nm	1% FA, 10 min	UV 312-365 nm lub UV 254 nm 2% PFA, 30 min
Hybrydyzacja sondy z RNA	20°C, 12 h	37°C, 4-16 h	67°C, 2 h	37°C, 3 h	37°C, 2 lub 12 h
Wzbogacanie kompleksu RNA-białko	Żywica pokryta streptawidyną	Kulki pokryte streptawidyną	Kulki pokryte streptawidyną	Kulki pokryte streptawidyną Uwolnienie za pośrednictwem „uchwyty”	Kulki pokryte streptawidyną
Elucja białek	Trawienie trypsyną	Elucja cieplna, nadmiar biotyny	Trawienie benzonazą	Procedura eFASP (Spiniello 2018)	Trawienie benzonazą
Elucja RNA	Trawienie proteinazą K	Trawienie proteinazą K	Trawienie proteinazą K	Trawienie proteinazą K	Trawienie proteinazą K
Identyfikacja białek	Western Blot LC-MS/MS	Western Blot LC-MS/MS	Western Blot LC-MS/MS	Western Blot LC-MS/MS	Western Blot LC-MS/MS
Ocena wzbogacenia RNA	RT-qPCR	RT-qPCR	RT-qPCR	RT-qPCR	RT-qPCR

Chociaż metody RNA pull-down, takie jak CHART, ChIRP-MS czy RAP-MS, okazały się niezwykle przydatne w identyfikacji białkowych partnerów specyficznych lncRNA takich jak *NEAT1*, *MALAT1*, *HOTAIR*, *NORAD*, czy *Xist*, znacząco poszerzając wiedzę o tych cząsteczkach^{162,185,188}, należy zauważyć, że większość z nich była dotychczas stosowana głównie w liniach komórkowych, co może ograniczać pełne zrozumienie wykrytych interakcji RNA-białko w bardziej złożonym układzie biologicznym, takim jak tkanki. Spośród przedstawionych technik, jedynie metoda vIPR została wykorzystana w prostym organizmie wielokomórkowym *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)¹⁹¹.

W ostatnich latach opracowano nowe metody RNA pull-down, takie jak RaPID (ang. *RNA-protein interaction detection*¹⁹⁴), systemy oparte na CRISPR, jak CRUIS (ang. *the CRISPR-based RNA-united interacting system*¹⁹⁵) i CARPID (ang. *CRISPR-assisted RNA-protein interaction detection method*¹⁹⁶), oraz techniki wykorzystujące aptamery omijające etap sieciowania, opierając się na znakowaniu w bliskiej odległości, lub specyficznych interakcjach aptamer-ligand do identyfikacji białek oddziałujących z RNA^{197,198}. Metody te, np. RaPID oraz CRUIS/CARPID, wykorzystują ligazę biotynową sprzężoną z komponentem wiążącym RNA (jak białko λ -N w RaPID), lub nieaktywną katalitycznie nukleazą Cas (dCas9/dCas13a w CRUIS/CARPID), która jest precyzyjnie kierowana do docelowego RNA przez wbudowany aptamer (BoxB w RaPID), lub *guide*-RNA (gRNA w systemach CRISPR)^{194–196}. W efekcie, białka znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie docelowego RNA są znakowane biotyną, co umożliwia ich późniejszą izolację (Ryc. 11).

Chociaż te nowatorskie podejścia po raz kolejny przyczyniły się do pogłębienia wiedzy o interakcjach ncRNA z białkami, to mają ograniczone zastosowanie w przypadku badania oddziaływań RNA-RBP bezpośrednio w tkankach. Metody te polegają na wprowadzaniu konstruktów genetycznych do komórek celem ekspresji niezbędnych elementów systemu, np. plazmidów kodujących docelowe RNA z aptamerami, białka fuzyjne z ligazami biotynowymi czy komponenty systemu CRISPR, jak dCas i gRNA. Zastosowanie tych metod jest zatem technologicznie ograniczone do hodowli komórkowych. Skuteczne i kontrolowane dostarczenie tych złożonych systemów do wszystkich komórek w obrębie heterogennych tkanek *in vivo* stanowi znaczące wyzwanie, ograniczające ich bezpośrednie wykorzystanie do badań w tkankach lub organizmach.



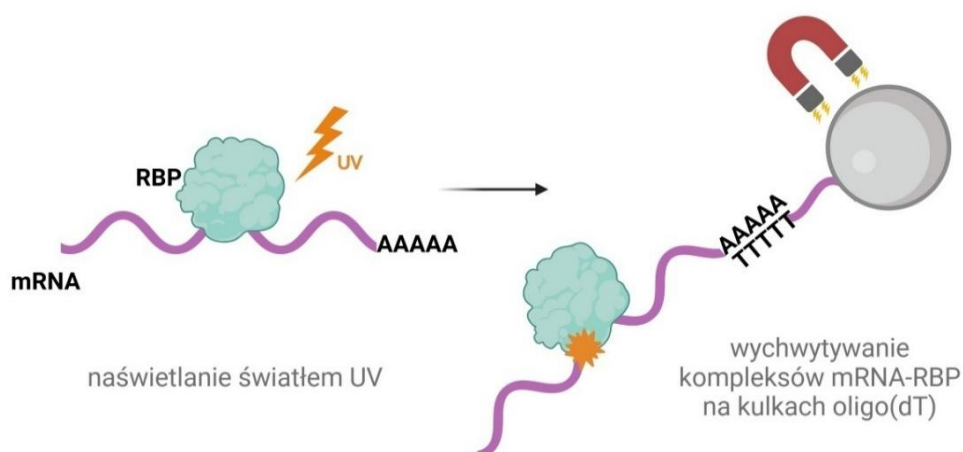
Rycina 11. Metody RNA-centriczne bez sieciowania kompleksów RNA-białko.

1.4.4. Metody badania całkowitego interaktomu RNA z białkami

Opracowano kilka podejść skierowanych na identyfikację oddziaływań transkryptom-białka, tj. detekcji składników proteomu i transkryptomu zaangażowanych globalnie we wzajemne oddziaływanie. Najwcześniej opracowane metody koncentrowały się na identyfikacji repertuaru RBP związanych z mRNA w hodowlach komórkowych. Protokoły te obejmowały napromieniowanie komórek światłem UV, następnie izolację mRNA z lizatów komórkowych przy użyciu kulek magnetycznych pokrytych oligo(dT) wraz z białkami (Ryc. 12), a RBP oddziałujące z mRNA były identyfikowane za pomocą LC-MS/MS^{10,17}. Wdrożenie protokołu RIC i jego zmodyfikowanej, ulepszonej wersji **eRIC** (ang. *enhanced RNA interactome capture*) wykorzystującej sondy LNA (ang. *locked nucleic acid*) oraz zoptymalizowane warunki wychwytywania kompleksów mRNA-białko, umożliwiło poszerzenie katalogu RBP oraz scharakteryzowanie regionów cis-regulacyjnych w obrębie poliadenylowanych RNA^{9,199}. Metody te pozwoliły także na identyfikację oddziaływań RBP z poliadenylowanymi ncRNA, takimi jak lncRNA czy z wirusowym RNA w modelach komórkowych^{16,17,200}.

W ostatnim czasie opublikowano dwa przełomowe badania wykorzystujące metody oparte na wychwytywaniu poliadenylowanych RNA i wiążących się do nich białek bezpośrednio w tkankach^{11,201}. W pierwszym z nich zastosowano eRIC do charakterystyki proteomu związanego z mRNA w tkankach mózgu, nerek i wątroby myszy, ujawniając m.in., narządowo-

specyficzną aktywność RBP niezależną od poziomu ekspresji tych białek oraz wiązanie RNA przez ponad sto klasycznych enzymów metabolicznych, które nie posiadają domen typu RBD¹¹. W drugim badaniu wykorzystano metodę **pCLAP** (ang. *peptide cross-linking and affinity purification*) do porównania interaktomów RBP-mRNA w zdrowym mózgu myszy i modelu choroby Huntingтона (HD)²⁰¹. W protokole pCLAP zastosowano sieciowanie interakcji RNA-białko światłem UV bezpośrednio w homogenatach tkankowych (uzyskanych w procesie delikatnej dysocjacji mózgu w buforze). Białka w homogenacie tkankowym są wstępnie trawione do peptydów, a dalsza procedura obejmuje izolację peptydów kowalencyjnie związanych z poliadenylowanym RNA za pomocą kulek oligo(dT) i ich identyfikację metodą spektrometrii mas. Udoskonalenia w procedurze, nazwanej *brain-pCLAP*, umożliwiły analizę interaktomu RNA-białko z niewielkiej ilości materiału, tj., w jednej półkuli mózgu myszy, oraz mapowanie regionów białek zaangażowanych w wiązanie RNA. Dzięki zastosowaniu metody pCLAP zidentyfikowano nieprawidłową regulację białka RBM5 w mózgu myszy będącej modelem HD²⁰¹. Oba podejścia, eRIC i pCLAP, stworzyły nowe możliwości badania endogennych interakcji RNA-białko w układach tkankowych.



Rycina 12. Uproszczony schemat wzbogania kompleksów mRNA-RBP na kulkach pokrytych oligo(dT) po naświetlaniu komórek / tkanek światłem UV.

Metody oparte na wzboganiu kompleksów RNA-białko przy użyciu oligo(dT) w procesie RNA pull-down są ograniczone do identyfikacji RBP wiążących poliadenylowane RNA, tj., mRNA i wybrane lncRNA. Wiele współczesnych podejść umożliwia jednak odzyskiwanie interaktomu RNA-białko dla transkryptów poliadenylowanych i tych niepoliadenylowanych. Przykładowo, metoda RBD-ID (ang. *proteomic identification of RNA-binding regions*) łączy inkorporację 4SU, sieciowanie UV i spektrometrię mas do mapowania

interakcji RNA-białko w jądrowych frakcjach komórkowych²⁰². Dzięki analizie zmian masy peptydów usieciowanych z RNA znakowanym 4SU zidentyfikowano nowe RBP, w tym białka bez wcześniejszej adnotacji funkcjonalnej związanej z wiązaniem RNA, a także białka oddziałujące z ncRNA²⁰².

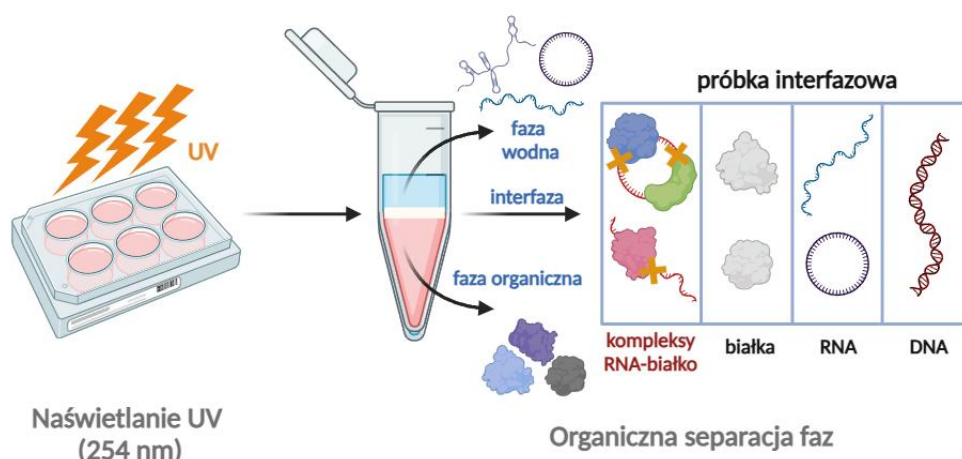
Strategie pomijające status poliadenylacji transkryptów w badaniu oddziaływań RNA-białko wykorzystują, np. chemię „klik” (ang. *click chemistry*) do badania oddziaływań RNA wyznakowanych 5-etynylourydyną (5EU)^{203,204}. Protokoły te obejmują znakowanie metaboliczne RNA w hodowlach komórkowych poprzez transkrypcyjną inkorporację 5EU, sieciowanie UV, reakcję z azydkiem-biotyną oraz oczyszczanie powinowactwa. Wśród wykrywanych RNA w kompleksie z białkami znajdują się nie tylko mRNA, ale także małe jądrowe RNA (ang. *small nuclear RNA*, snRNA), lncRNA i miRNA. Oprócz klasycznych RBP zidentyfikowano białka wiążące DNA (np. regulatory mitozy)²⁰³ oraz enzymy metaboliczne²⁰⁴.

Najnowsze podejście, nazwane HARD-AP (ang. *high-affinity RNA-binding domain Affinity Purification*), wykorzystuje specjalnie zaprojektowane białko HARD o wysokim, niezależnym od sekwencji powinowactwie do różnych klas RNA, w tym niepoliadenylowanych RNA. Białko HARD służy do efektywnego wychwytywania kompleksów RNA-białko bezpośrednio ze świeżych tkanek. Innowacyjność HARD-AP polega na możliwości izolacji białek bez konieczności sieciowania, choć opcjonalne sieciowanie UV i płukanie buforami o wysokim stężeniu soli może dodatkowo zwiększać specyficzność i utrwalić słabsze interakcje RNA-białko. Metoda HARD pozwoliła na stworzenie kompleksowego atlasu białek wiążących RNA w różnych organach myszy i identyfikację nowej domeny wiążącej RNA - domeny LIM²⁰⁵.

Kilka lat temu trzy zespoły badawcze opracowały metody umożliwiające globalną analizę interakcji RNA-białko, obejmujących zarówno kompleksy RBP-mRNA, jak i RBP z niepoliadenylowanymi transkryptami, z wykorzystaniem separacji faz organicznych²⁰⁶. Metody **XRNAX** (ang. *protein-crosslinked RNA extraction*²⁰⁷), **PTEX** (ang. *phenol toluol extraction*²⁰⁸) i **OOPS** (ang. *orthogonal organic phase separation*²⁰⁹) opierają się na zjawisku separacji usieciowanych kompleksów RNA-białko w interfazie podczas ekstrakcji z użyciem mieszanin organicznych (Ryc. 13). Wykorzystanie tych technik pozwoliło na identyfikację nowych RBP, w tym licznych regulatorów remodelowania chromatyny oraz białek pozbawionych kanonicznych RBD. Co istotne, metody te efektywnie wychwytyują niepoliadenylowane RNA, takie jak transportujące RNA (ang. *transfer RNA*, tRNA), rybosomalne RNA (ang. *ribosomal RNA*, rRNA) oraz lncRNA^{207–209}. W 2023 roku do tego

zestawu metod dołączyło LEAP-RBP (ang. *liquid-emulsion-assisted-purification of RNA-bound protein*), charakteryzujące się wyjątkową selektywnością w izolacji kompleksów RNA-białko nawet przy ich niskiej obfitości²¹⁰. Metoda ta, po standardowym sieciowaniu UV interakcji RNA-białko, wykorzystuje unikalny, heterogeniczny system rozpuszczalników wzbogacony litem, który umożliwia szybkie i selektywne wytrącanie kompleksów RNA-białko. Dzięki temu LEAP-RBP znacząco redukuje tło pochodzące od wolnych, niezwiązanych z RNA białek²¹⁰.

Organiczna separacja fazowa kompleksów RNA-białko znajduje również zastosowanie w analizie RNA związanych z RBP np. poprzez sekwencjonowanie fragmentów RNA związanych z białkami²¹¹. POP-seq (ang. *protein occupancy profile-sequencing*) dostarczył kompleksowych map miejsc wiązania RBP w transkryptomie, ujawniając m.in., że wysoko ekspresowane lncRNA mogą pełnić funkcję „gąbek” molekularnych i w ten sposób modulować dostępność RBP²¹¹.



Rycina 13. Separacja fazowa usieciowanych kompleksów RNA-białko.

1.4.5. Metody badania oddziaływań kolistych RNA z białkami

Funkcja większości circRNA pozostaje nieznana. Jak opisano we wcześniejszej sekcji 1.3.4.2, oddziaływania pomiędzy kolistymi RNA a białkami zostały scharakteryzowane dla małej grupy tych cząsteczek, jednak te odkrycia wykazały, że circRNA mogą odgrywać istotne role w regulacji procesów komórkowych. Mimo postępu w biologii molekularnej, techniki służące do wychwytywania kompleksów circRNA-RBP zorientowane na pojedynczy circRNA i wykonywalne w warunkach *in vivo*, wciąż są mocno ograniczone i wymagają optymalizacji. Dotychczas większość badań skupionych na identyfikacji partnerów białkowych circRNA

przewodzona była w liniach komórkowych, a uzyskane, dzięki nim wyniki dotyczące funkcji tych interakcji podsumowano w Tabeli 3.

Table 3. Funkcje molekularne kompleksów circRNA-RBP

Metoda wychwytywania kompleksów circRNA-białko		circRNA	RBP	Funkcja	Referencje
Białko-centryczne	RIP	<i>circHomer1a</i>	HuD	Zwiększenie ekspresji synaptycznej <i>circHomer1a</i>	Zimmerman 2020 ¹⁴⁰
	RIP	<i>circPABPN1</i>	HuR	Hamowanie wiązania białka HuR z mRNA <i>PABPN1</i> i ograniczenie syntezy PABPN1	Abdelmohsen 2017 ¹⁴⁴
	CLIP	<i>circZNF609</i>	HuR	Promowanie interakcji mRNA <i>CKAP5</i> -HuR przez <i>circZNF609</i> i zwiększona synteza CKAP5	Rossi 2022 ¹⁴⁵
	RIP	<i>circRTN4</i> , <i>circADCY2</i> , <i>circLDLRAD3</i>	PABPC1	Modulowanie relokacji circRNA podczas różnicowania neuronów	Cao 2024 ²¹²
	RIP (+ RNA pull-down <i>in vitro</i>)	<i>circMBOAT2</i>	PTBP1	Stabilizowanie PTBP1 przez <i>circMBOAT2</i> i ułatwienie eksportu mRNA <i>FASN</i> do cytoplazmy	Yu 2023 ²¹³
	Dane eCLIP (+RIP)	<i>circCDYL</i>	GRWD1	Regulowanie targetów białka GRWD1	Okholm 2020 ¹³⁷
	RNA-centryczne	RNA pull-down	<i>circCwc27</i>	PUR- α	Hamowanie aktywności PUR- α przez ograniczenie wiązania białka do promotorów genów docelowych
RNA pull-down		<i>circFoxo3</i>	CDK2, p21	Tworzenie kompleksu <i>circFoxo3</i> -p21-CDK2, który	Du 2016 ¹³⁹

				blokuje funkcję CDK2	
	RNA pull-down	<i>circSamd4</i>	PURA, PURB	Utworzenie kompleksu, który wzmacnia miogenezę	Pandey 2020 ²¹⁴
	RNA pull-down	<i>circYap</i>	TPM4, ACTG	Wzmocnienie interakcji pomiędzy TPM4 i ACTG	Wu 2022 ¹³⁸
	RNA pull-down (+RIP)	<i>circGlis3</i>	QKI	Zwiększenie ekspresji <i>circGlis3</i> za pośrednictwem QKI	Liu 2023 ²¹⁵
	RNA pull-down	<i>circBtl1</i>	DDX3Y	Zakłócenie stabilności mRNA <i>Atf4</i> i hamowanie samoodnawiania komórek macierzystych jelit	Guo 2023 ²¹⁶

1.4.6. Wyzwania w badaniu endogennych circRNA i lncRNA metodami RNA pull-down

Pierwszym technicznym aspektem, który stanowi wyzwanie w badaniu natywnych kompleksów ncRNA-białko, jest ich wcześniejsza stabilizacja. Powszechnie stosowaną techniką jest sieciowanie oddziaływań RNA-białko poprzez naświetlanie komórek promieniowaniem UV, które umożliwia powstanie wiązania kowalencyjnego między cząsteczką RNA a białkiem. Stworzenie takiego wiązania umożliwia zastosowanie bardziej rygorystycznych warunków wychwytywania i oczyszczania kompleksów RNA-białko, i tym samym odmycie "tła", czyli niespecyficznych, obficie występujących w komórkach RBP i RNA. Jednak wydajność sieciowania UV jest niska, co skutkuje brakiem detekcji interakcji RNA-białko dla części natywnych oddziaływań¹⁶⁴.

Jednym z wyzwań związanych z metodami RNA pull-down, mających na celu identyfikację RBP oddziałujących z ncRNA, w tym circRNA, jest potrzeba uzyskania wydajnego wzbogacenia RNA, wystarczającego do ilościowej i jakościowej analizy związanych z nimi RBP. Wiele endogennych ncRNA występuje w komórkach w niskiej liczbie kopii, co wymaga bardzo dużej liczby komórek w materiale wyjściowym eksperymentu. Przykładowo, w metodologiach zaprojektowanych do badania interakcji lncRNA-białko *in vivo*, takich jak ChIRP-MS, CHART czy RAP-MS, użyto odpowiednio około 100, 80 i 200 milionów komórek jako materiału wyjściowego^{162,185,188}. W przypadku badania lncRNA *Xist*, który ulega niskiej ekspresji, jednak jest bardzo dużym transkryptem, ilość materiału wyjściowego została

zwiększona do 800 milionów komórek^{188,189}. Tak duża ilość materiału wyjściowego może jednak prowadzić do powstania „tła”, tj. detekcji niespecyficznych białek wiążących się z ASO lub kulkami wykorzystywanymi do wychwytywania kompleksów RNA-białko.

Kolejnym ograniczeniem eksperymentów RNA pull-down jest ich wysoki koszt. Techniki te wymagają dużych ilości materiału komórkowego lub tkankowego, a także użycia odczynników wysokiej jakości, takich jak modyfikowane sondy DNA, kulki pokryte streptawidyną czy inhibitory RNaz, co generuje znaczne koszty pojedynczego eksperymentu.

Dodatkowo, koliste RNA stanowią trudny obiekt badań. CircRNA są generowane z tego samego *loci* co ich liniowe odpowiedniki. W przypadku powstawania obu izoform (kolistej i mRNA) z jednego genu istnieje potrzeba zaprojektowania ASO do BSJ tak, aby wychwytywały one tylko circRNA. Zadanie to jest skomplikowane, ponieważ eksperyment ogranicza się wówczas do zastosowania tylko jednej sondy, co może zmniejszyć jego wydajność oraz/lub prowadzić do niespecyficznego wiązania ASO z mRNA.

Z uwagi na fakt, że większość opublikowanych do tej pory protokołów RNA pull-down była ograniczona do badań w liniach komórkowych, istnieje potrzeba dostosowania metod badania interakcji circRNA-białko bezpośrednio w tkankach, co pozwoliłoby na uzyskanie bardziej rzeczywistego obrazu oddziaływań tych cząsteczek w warunkach tkankowych i lepsze poznanie funkcji kolistych RNA.

2. Cele pracy

Głównym celem rozprawy było opracowanie metod umożliwiających scharakteryzowanie oddziaływań RNA-białko w tkance mózgowej myszy, a także ich wykorzystanie do określenia funkcji kompleksów RNA-białko oraz roli kolistych RNA w komórkach układu nerwowego. W ramach realizacji celu głównego, wyznaczono następujące cele szczegółowe:

1. Adaptacja metody XRNAX do oceny efektywności stabilizowania kompleksów RNA-białko i badań nad circRNA w materiale tkankowym.

Zoptymalizowano metodę badania globalnych interakcji RNA-białko (XRNAX²⁰⁷) do pracy z materiałem tkankowym, włączając w to optymalizację metody homogenizacji tkanki mózgowej myszy przed sieciowaniem UV. Za pomocą metod biologii molekularnej takich jak: qRT-PCR, Northern blot, Western blot oraz barwienie srebrem oceniano efektywność sieciowania kompleksów RNA-białko światłem UV. Wybrano biopulweryzację, jako optymalną metodę homogenizacji do dalszych badań interakcji RNA-białko w tkankach. Wyselekcjonowano circRNA o potencjale wiązania białek.

2. Zastosowanie zoptymalizowanego protokołu XRNAX do badań interakcji całkowitego RNA (tj. bez względu na status poliadenylacji) z białkami w mózgu.

Przeprowadzono eksperymenty XRNAX w mózgu myszy typu dzikiego. Wśród interaktorów RNA wykryto kilkaset różnych białek, z czego ~70% stanowiły kanoniczne RBP. Następnie wykonano eksperymenty XRNAX w mózgu myszy z defektem mielinizacji (mutantów *Mbp*^{-/-}), aby sprawdzić, czy metoda XRNAX pozwoli na identyfikację zmian w oddziaływaniach RNA-białko, które będą mogły pomóc w zrozumieniu tej patologii układu nerwowego. Te badania ujawniły dziesiątki RBP (w tym 16 białek zaangażowanych w formowanie inkluzji cytoplazmatycznych i 15 zaangażowanych w alternatywny splicing) o zmienionych oddziaływaniach z RNA względem myszy zdrowych, z których walidowano MBNL1.

3. Opracowanie metody circRNA pull-down do badania interakcji circRNA z białkami w mózgu myszy.

Opracowano nową metodę circRNA pull-down efektywną we wzbogacaniu specyficznych circRNA z tkanki mózgu poprzez wykonanie etapów jak podano poniżej. Wybrano kryteria selekcji oraz dokonano selekcji kandydatów circRNA do eksperymentu circRNA pull-down. Wybrano odpowiednie kontrole do eksperymentu. Wykorzystano metodę homogenizacji poprzez kriogeniczne proszkowanie tkanki oraz te same warunki naświetlania UV, które to zostały wykorzystane do wykonywania eksperymentów XRNAX. Zoptymalizowano kolejne kroki eksperymentu circRNA

pull-down, włączając w to wybór sond do detekcji circRNA, czas i długość hybrydyzacji sond oraz skład buforów płuczających użytych w eksperymencie.

4. Analiza miRNA oraz RBP związanych z wybranymi circRNA *in vivo* w mózgu.

Zoptymalizowany protokół circRNA pull-down testowano pod kątem potencjału identyfikacji interaktorów miRNA oraz RBP *in vivo* w tkance. Wykonano analizy miRNA TaqMan oraz pomiary NanoString nCounter i potwierdzono wzbogacania miRNA związanych do circRNA *Cdr1as* znanych z wcześniejszych doniesień literaturowych. Barwienie srebrem żeli poliakrylamidowych ujawniło różnicujące sygnały dla białek związanych do różnych circRNA względem kontroli negatywnej. Przeprowadzono analizę LC-MS/MS i analizę proteomiczną dla eluatów z eksperymentów RNA pull-down z sondą komplementarną do *Cdr1as*, ujawniając nowe, dotychczas nieznane białka wiążące się z tą cząsteczką. Udowodniono, że opracowany w niniejszej pracy protokół circRNA pull-down można z powodzeniem stosować do wzbogacania kompleksów circRNA-miRNA-białko i tym samym, do badania oddziaływań natywnych circRNA z białkami i miRNA w tkankach *in vivo*.

3. Materiały i metody

3.1. Ważniejsze odczynniki chemiczne, biochemiczne oraz gotowe zestawy odczynników

Tabela 4. Lista odczynników chemicznych i biochemicznych

Nazwa	Producent	Numer katalogowy
Odczynniki		
Chlorek wapnia	Sigma Aldrich	21115
dNTP mix	Thermo Fisher Scientific	R0152, R0162, R0142, R0172
Startery - random hexamer	Thermo Fisher Scientific	58875
Agaroza	Roth	3810.4
Odczynnik do detekcji CDP-Star	Thermo Fisher Scientific	T2214
Chloroform	Sigma Aldrich	C2432
Roztwór Denhardt (50X)	Thermo Fisher Scientific	750018
EDTA	Thermo Fisher Scientific	15575
EGTA	Sigma Aldrich	324626
Siarczan dekstranu	BioShop	CAS#9011-18-1
Mieszanka do znakowania RNA DIG	Roche	11277073910
Bufor dla DNazy I	Thermo Fisher Scientific	B43
DPBS	Thermo Fisher Scientific	14190-144
PBS	Roth	18912-014
Bufor dla polimerazy DreamTaq™ (Green Buffer, 10X)	Thermo Fisher Scientific	B71
Bufor dla RNazy R	Lucigen	RNR07250
Odczynnik do detekcji ECL	GE Healthcare	RNP2106
Etanol	Merck	1.00986.2500
Fluoromount-G	Thermo Fisher Scientific	00-4958-02
GlycoBlue™ Coprecipitant	Ambion	AM9515
Chlorowodorek guanidyny	BioShop	GUA001.500
Chlorek litu	Sigma Aldrich	L4408
Chlorek magnezu	Thermo Fisher Scientific	AM9530G
Izopropanol	Acros Organics	327270010
MOPS	Roth	6979.4
Roztwór NBT/BCIP	Roche	11681451001
Mleko odtłuszczone	Roth	T145.3
Normal Goat Serum Control	Invitrogen	31873
NuPAGE™ LDS Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific	NP0007
Medium do mrożenia tkanek O.C.T.	Leica	14020108926
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	26619
Paraformaldehyd	Roth	0335.3
PBS	Roth	18912-014
Inhibitor RNaz RiboLock	Thermo Fisher Scientific	EO0384
Mysi inhibitor RNaz	New England Biolabs	M0314
Inhibitory proteaz (cocktail set III)	Calbiochem	539134
Mocznik	Sigma Aldrich	U0631
RotiStock 20% SDS	Roth	1057.1
Chlorek sodu	Roth	0601.2
Deoksycholan sodu	Sigma Aldrich	D6750
SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain	Thermo Fisher Scientific	S11494
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	Invitrogen	S33102
TCEP	Sigma Aldrich	646547

Tris	Roth	0188.4
Triton X-100	Sigma Aldrich	93443
TRIzol	Thermo Fisher Scientific	15596026
TWEEN®20	Sigma Aldrich	P9416
UltraPure 1M Tris-HCl, pH 7.5	Thermo Fisher Scientific	15567-027
UltraPure 1M Tris-HCl, pH 8.0	Thermo Fisher Scientific	15568-025
UltraPure™ SSC, 20x	Thermo Fisher Scientific	15557036
Vectashield mounting medium with DAPI	Vector Laboratories	H-1200-10
Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1	Thermo Fisher Scientific	65002
Oligo d(T)25 Magnetic Beads	New England Biolabs	S1419S
NP-40	Thermo Fisher Scientific	85124
SDS	Thermo Fisher Scientific	AM9823
NorthernMax	Thermo Fisher Scientific	AM8677
Odczynnik blokujący	Sigma Aldrich	11096176001
Kwas maleinowy	Sigma Aldrich	M0375
Glicyna	Roth	3187.5
Gotowe zestawy odczynników		
DNAfree DNA Removal Kit	Thermo Fisher Scientific	AM1906
MEGAClear™ Kit Purification of Transcription Reactions	Thermo Fisher Scientific	AM1908
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX)	Solis BioDyne	08-25-0000S
Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit	Thermo Fisher Scientific	84868
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23227
RNeasy MINI Kit	Qiagen	74104
SilverXpress™ Silver Staining Kit	Thermo Fisher Scientific	LC6100
Dynabeads™ Streptavidin Trial Kit	Thermo Fisher Scientific	65801D
72-multiplex TagSet Custom Nanostring Gene Expression Code Set	Nanostring Technologies, Seattle, USA	XT-ELE-P1TS-072 Piwecka i inni 2017
Mouse v1.5 miRNA assay	Nanostring Technologies, Seattle, USA	CSO-MMIR15-12 Mu-MIRTAG-12
Enzymy		
DNaza I	Thermo Fisher Scientific	EN0521
Polimeraza DNA Dream Taq	Thermo Fisher Scientific	EPO703
Odwrotna transkryptaza Maxima H Minus	Thermo Fisher Scientific	EP0752
Odwrotnej transkryptaza SuperScript III	Thermo Fisher Scientific	18080093
Proteaza III z zestawu RNAscope™	Advanced Cell Diagnostics	322381
Proteinaza K	Roche	3115828001
RNaza A	Thermo Fisher Scientific	EN0531
RNaza I	Ambion	AM2295
RNaza T1	Thermo Fisher Scientific	EN0541
RNaza R	Lucigen	RNR07250
Mix Trypsyna / LysC	Promega	V5073

3.2. Przeciwciała

Tabela 5. Lista przeciwciał

Nazwa	Producent	Numer katalogowy
Przeciwciała		
Anty-AGO1	Cell Signalling	5053S
Anty-AGO2	Abcam	ab32381
Anty-Kalretynina	Proteintech	66496-1-Ig
Anty-Digoksygenina (AP fragmenty Fab)	Roche	11093274910
Anty-DRD2	Proteintech	55084-1-AP
Anty-ELAVL2	Proteintech	14008-1-AP
Anty-G3BP	Abcam	ab181150
Anty-MBNL1	Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease	Clone no. 4A8
Anty-MBP	Millipore	MAB386
Anty-PCBP1	Thermo Fisher Scientific	PA5-86005
Anty-TDP-43	Proteintech	10782-2-AP
Anty-TIAL1 (anty-TIAR)	Cell Signalling	5137S
Anty-TUB33	Sigma	T2200-200UL
Anty- β -aktyna	Cell Signalling	3700S
Anty-PTBP2	Proteintech	55186-1-AP
Przeciwciało drugorzędowe anty-mysie Alexa 568	Thermo Fisher Scientific	A-11004
Przeciwciało drugorzędowe przeciw mysim IgG (H+L; Cross-Adsorbed), HRP	Invitrogen	G-21040
Przeciwciało drugorzędowe anty-królicze Alexa 488	Thermo Fisher Scientific	A-11008
Przeciwciało drugorzędowe przeciw króliczym IgG (H+L), HRP	Invitrogen	31460
Przeciwciało drugorzędowe anty-szczurze Alexa 488	Invitrogen	A11006

3.3. Bufory

Bufory do płukania w metodzie XRNAX:

1. Bufor TE+SDS 0.1%, pH 8

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- 0,1 % SDS
- Inhibitor RNaz 0,6 U/ μ l

2. Bufor TE+SDS 0.5%, pH 8

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- 0,5 % SDS

Bufor do trawienia białek proteinazą K (2x stężony)

- 50 mM Tris-HCL
- 10 mM EDTA
- 150 mM NaCl
- 1 % SDS
- 1 mg/ml Proteinaza K

Bufor do lizy w metodzie RNA pull-down i trawieniu liniowych cząsteczek RNA przy użyciu RNazy R

- 1x PBS
- 0,1 % SDS
- 0,5 % deoksycholan sodu
- 0,5 % NP-40

Przed użyciem bufor do lizy został uzupełniony o inhibitory proteaz i RNaz. Protease Inhibitor cocktail Set III (Calbiochem #539134): 5 µl / 1000 µl buforu do lizy; Murine RNase Inhibitor (NEB, # M0314L): 25,5 µl / 1000 µl buforu do lizy.

Bufor do hybrydyzacji (1,5x stężony) w metodzie RNA pull-down

- 15 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 7,5 mM EDTA
- 750 mM LiCl
- 0,75 % Triton X-100
- 0,3 % SDS
- 0,15 % deoksycholan sodu
- 6 M mocznik
- 3,75 mM TCEP

Przed użyciem bufor do hybrydyzacji został uzupełniony o TCEP oraz inhibitory proteaz. Protease Inhibitor cocktail Set III: 5 µl / 1000 µl buforu do hybrydyzacji.

Bufor dla RNazy R (10x)²¹⁷

- 200 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 1 mM MgCl₂
- 1 M LiCl

Bufor do wiązania mRNA – trawienie liniowych cząsteczek RNA przy użyciu RNazy R

- 100 mM Tris-HCl, pH 7.5,
- 500 mM LiCl,
- 0.5% LiDS,
- 1 mM EDTA,
- 5 mM DTT

Przygotowany zgodnie z rekomendacją producenta (New England Biolabs, Oligo d(T)₂₅ Magnetic Beads).

Bufor do rozdzielania elektroforetycznego białek (1x) pH 8,3

- 0,025 M Tris-HCl
- 0,19 M glicyna
- 0,1 % SDS

Bufor do transferu białek (1x)

- 25 mM Tris-HCl
- 192 mM glicyna
- 20 % methanol

Bufor TBS (10x) pH 7,6

- 0,25 M Tris-HCl
- 1,37 M chlorek sodu

Bufor TBS-T do płukania membran (1x) - Western blot

- 1x TBS, pH 7,6
- 0,1 % Tween20

Bufor do blokowania membrany po transferze - Western blot

- 1x TBS-T
- 5 % mleko w proszku

Roztwór kwasu maleinowego pH 7,5 – Northern blot

- 0.1 M kwas maleinowy
- 0,15 M chlorek sodu

Bufor do płukania pH 7,5 – Northern blot

- 0.1 M kwas maleinowy
- 0,15 M chlorek sodu
- 0,3 % Tween20

Bufor do detekcji pH 9,5 – Northern blot

- 0,1 M Tris-HCL
- 0,1 M chlorek sodu

Bufor do blokowania membrany po transferze (10x) – Northern blot

- 10 % odczynnik do blokowania
- roztwór kwasu maleinowego

Bufor do lizy – genotypowanie

- 200 mM NaCl
- 100 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 5 mM EDTA pH 8
- 0,2%, SDS
- 100 µg/ml proteinaza K

3.4. Oligonukleotydy DNA

Tabela 6. Sekwencje oligonukleotydów

Nazwa	Sekwencja startera 5' -> 3' lub ID sondy	Metoda
Cdr1as_Div2_F	GCGCAGTGTCTCCAGTGTAT	qRT-PCR
Cdr1as_Div2_R	GGAAGACCTTGGTACTGGCA	qRT-PCR
Malat1_F	GAGCTCGCCAGGTTTACAGT	qRT-PCR
Malat1_R	AACTACCAGCAATTCCGCCA	qRT-PCR
Actb_F	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	qRT-PCR
Actb_R	ACCAGAGGCATACAGGGACA	qRT-PCR
Hprt_F	GTTGCTTACCTCACTGCT	qRT-PCR

Hprt_R	TCATCGCTAATCACGACGCT	qRT-PCR
Gapdh_F	AATGTGTCCGTCGTGGATCT	qRT-PCR
Gapdh_R	CCCTGTTGCTGTAGCCGTAT	qRT-PCR
Cyrano_F	GAAACATAGGCTGGGACAAT	qRT-PCR
Cyrano_R	TGTTACTGGGCTCTGTTT	qRT-PCR
circRims2_F	AAAGTCGCAGTGCCTCTCAA	qRT-PCR
circRims2_R	TCCCATCCTGAGCGATACTTC	qRT-PCR
Mrpl19_F	CCAAGCCGATTCAGAGCAC	qRT-PCR
Mrpl19_R	CAGGAACCTTCTCTCGTCTTCC	qRT-PCR
Homer1_F	TGCCTTGTTGAGTTGCCTCC	qRT-PCR
Homer1_R	AGATAGGTTGCTCCCCCATTT	qRT-PCR
Ankib1_F	GAGGAGACACAGACAGCAGC	qRT-PCR
Ankib1_R	CTCCCCCTCTGGGAGATCGAA	qRT-PCR
Hipk3_F	GCAGCACATGGTAAACCCAC	qRT-PCR
Hipk3_R	CGACCAGACCATGTCTGTGAA	qRT-PCR
circHipk3_F	GCCAGCCGTACAGGGTTAAA	qRT-PCR
circHipk3_R	AACACAACCGCTTGGCTCTA	qRT-PCR
Stau2a_F	ACAAGCTGCCAGACACAATG	qRT-PCR
Stau2a_R	TTCAGCGCAATCTCAAACAC	qRT-PCR
circStau2_F	GGAACTGAATGGGCTCGCTA	qRT-PCR
circStau2_R	ACTTCCGTATCCCTCACAGC	qRT-PCR
Zfp609_F	GTACTGACAGGAGTGCCGAC	qRT-PCR
Zfp609_R	TGTAGAAGAAAGCCCTGCGG	qRT-PCR
Rasa2_F	TATCCGCCTCAGCTGCTTAT	qRT-PCR
Rasa2_R	ACTGGGTAGCCAGGGAGTTT	qRT-PCR
Gigyf2_F	AGCAGAACTTTTGAGCAGGTTT	qRT-PCR
Gigyf2_R	AGAAAGAGGAGGGGACGTGA	qRT-PCR
circGigyf2_F	ATCACAGAGCTGGGAAGAAAGG	qRT-PCR
circGigyf2_R	GTGATACTCCCACCACTGGAC	qRT-PCR
Dtnb_F	TAAAGGCTCAAGCCACAGGG	qRT-PCR
Dtnb_R	ATTGCGGAGGTTTCTCCTCG	qRT-PCR
circDtnb_F	ACCAGCACCAGATGAAGGAG	qRT-PCR
circDtnb_R	TCCAGCATTTTCCACCACAC	qRT-PCR
gfp_F	GGCCCTGTCTTTTACCAGAC	qRT-PCR
gfp_R	TCGTCCATGCCATGTGTAATC	qRT-PCR
circMbnl1(3,4L)_F	TTAACCCTTACCTGGGGCCT	qRT-PCR
circMbnl1(3,4L)_R	TTTGCAGTTCTCTCTGGAGC	qRT-PCR
circMbnl1(3,4,5,6)_F	TGTACTTCCCCCATTTGCCAAA	qRT-PCR
circMbnl1(3,4,5,6)_R	TTTGCAGTTCTCTCTGGAGC	qRT-PCR
circMbnl2_F	GCTCCGACGAAGAATGCAAG	qRT-PCR
circMbnl2_R	CAGCTTTGGAGGATGTGGGA	qRT-PCR
Mbnl1(1)_F	GGAGTCGCGATCCCACAAT	qRT-PCR
Mbnl1(1)_R	GGCACTTCTTAGTACCAACCTCT	qRT-PCR

Mbnl1(2)_F	TGCATGACACCCGCTACAAG	qRT-PCR
Mbnl1(2)_R	GTGGCAGATGTTGTTGCTGC	qRT-PCR
Mbnl2_F	CCAGCTAGAGATTAATGGGAGG	qRT-PCR
Mbnl2_R	CCGCATTTGTCCCTATGGTG	qRT-PCR
CamKII_F	GGAGGAAACAAGAAGAACGATG	qRT-PCR
CamKII_R	TCAGCTGCTCTGTCACTTTGAT	qRT-PCR
Mbp_F_Mes	GCCTGTCCCTCAGCAGATT	qRT-PCR
Mpb_R_Mes	GCCTCCGTAGCCAAATCC	qRT-PCR
Mbp_F_MP	GGCAAGGTACCCTGGCTAAA	qRT-PCR
Mbp_R_MP	TCTCGTGTGTGAGTCCTTGT	qRT-PCR
Mbp_F_235	TGTGCCACATGTACAAGGACT	qRT-PCR
Mbp_R_235	AAATCTGCTGAGGGACAGGC	qRT-PCR
Mbnl2_e6_F	GCAGGCCAAAATCAAAGCTG	RT-PCR
Mbnl2_e6_R	GCACTGGTCAGAGCCTGC	RT-PCR
Mbnl2_e9_F	GGGTGCTCTTCATCCCTTACC	RT-PCR
Mbnl2_e9_R	GCAGATTCTTGGCATTCCATTCC	RT-PCR
Add3_e14_F	CTAACCCATTCAGCCACCTC	RT-PCR
Add3_e14_R	CATCATGCATCTCGTCCTTG	RT-PCR
Sorbs1_e15_F	TCAGAGTCACCAAGACATTTTATACC	RT-PCR
Sorbs1_e15_R	AATTTGGCTCGAGCAGGTC	RT-PCR
Kif13A_e26_F	ACTCATGGTTGAAGCCATCC	RT-PCR
Kif13A_e26_R	TCCCGTCGTTTAATGAGTGC	RT-PCR
Picalm_e18_F	AAGGTTGCACCAACAACCTGC	RT-PCR
Picalm_e18_R	ATGCCCCGTTGGTGTAGTAGC	RT-PCR
Mbnl1_e5_F	GACTTGCTCACGACCAGACA	RT-PCR
Mbnl1_e5_R	GTGGCAGATGTTGTTGCTGC	RT-PCR
oIMR0968	ACCGTCCTGAGACCATTGTC	Genotyp. <i>shiverer</i>
oIMR0969	GTGCTTATCTAGTGTATGCCTGTG	Genotyp. <i>shiverer</i>
oIMR8744	CAAATGTTGCTTGTCTGGTG	Genotyp. <i>shiverer</i>
oIMR8745	GTCAGTCGAGTGCACAGTTT	Genotyp. <i>shiverer</i>
Cdr1as_F	GCAAGTCTTCCAACACTGTCA	synteza sondy RNA
Cdr1as_R_T7	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGTATACTGGAAGACTTGAAGTG	synteza sondy RNA
Cdr1as_BSJ_sonda	GGTACTGGCACCCTGGAACCCCTGGATACGGCAGACACCAGAA [Btntg]	pull-down
Cdr1as_MS1_sonda	GAAGACCTGGAGATGTTGGA [Btntg]	pull-down

Cdr1as_MS2_sonda	CTGGAAGATCACGATTGTCT [BtnTg]	pull-down
Cdr1as_MS3_sonda	CACGGAAGATCTAGATACCA [BtnTg]	pull-down
Cdr1as_MS4_sonda	ACGGTGGATTTTCAGGAAGA [BtnTg]	pull-down
Cdr1as_MS5_sonda	CCGGAAGACTTAGATTTTCA [BtnTg]	pull-down
Cdr1as_MS6_sonda	AGACACAGATTACTGGGAAG [BtnTg]	pull-down
Cdr1as_MS7_sonda	ATTTTCAGGAAGACATGGGT [BtnTg]	pull-down
Cdr1as_MS8_sonda	CAGGAAGACATGGATTTTCC [BtnTg]	pull-down
Cdr1as_MS9_sonda	TCCGAAGACATGGATTTTGG [BtnTg]	pull-down
Cdr1as_MS10_sonda	CGCAGTTGTTGGAAGACATA [BtnTg]	pull-down
circDtnb_sonda	GGTCAACTTGCCCTCGGCCCTACCAAGAGGAATGCTCCTTCATC [BtnTg]	pull-down
circGigyf2_sonda	ACCACTGGACAGAGCACGGAGCCTACATCTTTCTTCCTGGTTT [BtnTg]	pull-down
circStau2_sonda	TATCCCTCACAGCTCCACAAAACCTCTGATTGTACATGCCCCGGA [BtnTg]	pull-down
circHpk3_sonda	ACCAAGACTTGTGAGGCCATACCTGTAGTAGCGAGATTGAAGAT [BtnTg]	pull-down
gfp_sonda	ACGTGTCTTGTAGTTCCCGTCATCTTTGAAAAATATAGTTCTTT [BtnTg]	pull-down
dme-miR-7a	ID: 000268	TaqMan
cgr-miR-7b	ID: 477361_mat	TaqMan
U6 snRNA	ID: 001973	TaqMan
snoRNA 202	ID: 001232	TaqMan
hsa-miR-671-5p	ID: 197646_mat	TaqMan
hsa-let-7a	ID: 000377	TaqMan
miR-9	ID: 002231	TaqMan

3.5. Sprzęt laboratoryjny

Tabela 7. Lista sprzętów laboratoryjnych wykorzystanych do badań

Nazwa	Model	Producent
System dokumentacji żeli	Azure c500 Imaging System	Azure Biosystems
Biopulweryzator / homogenizator	59012N	BioSpec Products, Inc
Kriostat	CM 1950	Leica
Mikroskop konfokalny	TCS SP5 II with LAS AF SP5 and LAS X SP8	Leica
Mikroskop fluorescencyjny	All-in-one BZ-X810 96M15468	Keyence
System dokumentacji żeli	G:Box chemiluminescence	Syngene
Homogenizator	Precellys® Evolution 23405-300	Bertin Technologies
Spektrometr masowy	UltiMate 3000 nano-LC system coupled to a Q Exactive HF-X	Thermo Fisher Scientific
Piecyk do hybrydyzacji z kroslinkerem UVP	HL-2000	Analytick Jena
nCounter® SPRINT Profiler	1604P0093	Nanostring Technologies, Seattle
Rotator	RM-2M	ELMI

DynaMag™-2 magnet	12321D	Thermo Fisher Scientific
DynaMag™-15 magnet	12301D	Thermo Fisher Scientific
Sonikator	FB-120	Fisher brand
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	1703940	BioRad

3.6. Oprogramowanie i algorytmy

Tabela 8. Wykaz oprogramowania i algorytmów

Nazwa	Autorzy	Dostęp
DAVID Functional Annotation Tool	Sherman, Huang ^{218,219}	david.ncifcrf.gov/tools.jsp
InterPro Scan web tool	Jones ²²⁰	ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/
AlphaFold Protein Structure Database	Jumper, Varadi ^{221,222}	alphafold.ebi.ac.uk/
ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/	
Fiji software	Schindelin ²²³	fiji.sc/
GraphPad Prism v.9		
Intensity Ratio Nuclei Cytoplasm Tool	Lemaire ²²⁴	RRID:SCR_018573
UCSF Chimera software	Pettersen ²²⁴	cgl.ucsf.edu/chimera/
MaxQuant v 1.6.17.0	Tyanova ²²⁵	maxquant.org/
Perseus v 1.6.10.0	Tyanova ²²⁶	maxquant.org/perseus/
nSolver 4.0	Nanostring Technologies, Seattle	
Stellaris Probe Designer	LGC Biosearch Technologies	biosearchtech.com/support/tools/design-software/stellaris-probe-designer

3.7. Mysie modele eksperymentalne

3.7.1. Myszy typu dzikiego

W badaniach wykorzystano samce myszy typu dzikiego (ang. *wild-type*, WT) C57BL/6N w wieku 13-15 tygodni w procedurze XRNAX oraz 13-20 tygodni w eksperymentach RNA pull-down. Myszy C57BL/6N uzyskano z Charles River Laboratories (Niemcy). Hodowlę myszy prowadzono w wolnym od patogenów obiekcie SPF w Zwierzędarni Centrum Zaawansowanych Technologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu, w grupach od trzech do pięciu myszy w jednej klatce w 12-godzinny cykl światło-ciemność, temperaturze 22°C, z dostępem do pożywienia i wody bez limitu. Myszy znieczulano izofluranem, a następnie uśmiercano przez dekapitację. Pobierano tkanki: mózgową,

mięśniową oraz płucną. Wszystkie procedury z udziałem myszy przeprowadzono zgodnie z przepisami 3R dotyczącymi dobrostanu zwierząt i zgodnie z wytycznymi określonymi w dyrektywie Rady Wspólnoty Europejskiej 2010/63/UE.

3.7.2. Myszy *Cdr1as* knockout

W części eksperymentów RNA pull-down wykorzystano mózg myszy z delecją genu *Cdr1as*. Zwierzęta *Cdr1as* KO wygenerowano przy użyciu technologii CRISPR/Cas9, jak opisano wcześniej¹²⁵. Tak, jak w przypadku myszy typu dzikiego, tkanki pobierano od dorosłych samców w wieku 13-20 tygodni. Hodowlę myszy prowadzono w warunkach oraz zgodnie z wytycznymi, jakie zostały opisane w sekcji powyżej (3.7.1.).

3.7.3. Myszy *shiverer*

W badaniu wykorzystującym procedurę XRNAX wykorzystano samce myszy *shiverer* (*Mbp^{shi}*, *Mbp^{-/-}*) w wieku 13-15 tygodni. Hodowlę myszy prowadzono w warunkach oraz zgodnie z wytycznymi, jakie zostały opisane w sekcji powyżej (3.7.1.). Hodowlę myszy prowadzono w wolnym od patogenów obiekcie SPF w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

3.7.4. Genotypowanie

Genotypy myszy szczepu dzikiego oraz *Cdr1as* knockout określono za pomocą metody PCR z wykorzystaniem genomowego DNA wyekstrahowanego z biopsji ogona. Tkanki poddawano lizie przez 3-godziną inkubację w buforze do lizy w temperaturze 55°C. PCR wykonano na matrycy genomowego DNA i przy użyciu dwóch zestawów starterów do genotypowania, jak opisano wcześniej¹²⁵. Produkty PCR analizowano przez elektroforezę na 2,5% żelach agarozowych.

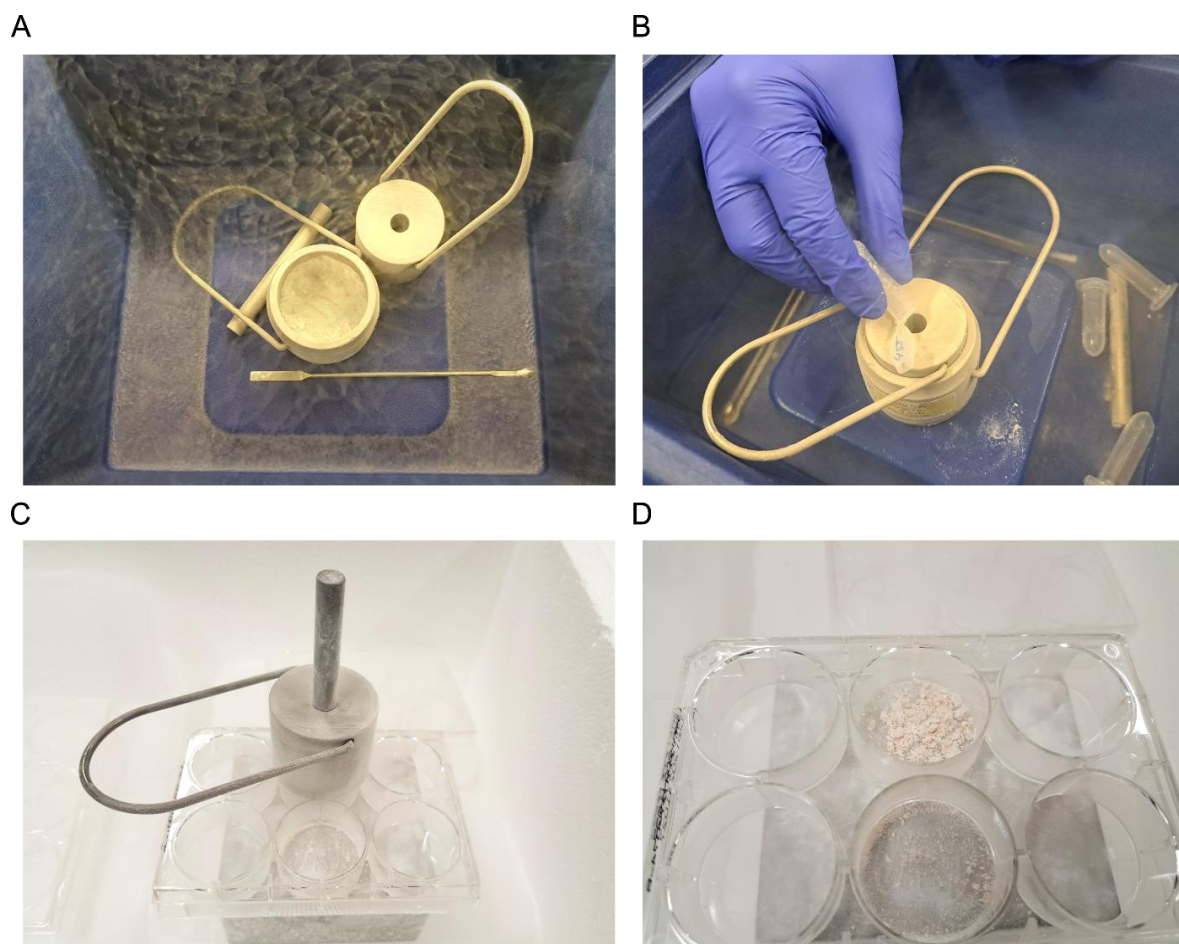
Genotypy myszy *shiverer* określono za pomocą metody PCR z wykorzystaniem genomowego DNA wyekstrahowanego z biopsji ucha. PCR wykonano zgodnie z zaleceniami The Jackson Laboratory (www.jax.org/strain/001428). Produkty PCR analizowano na 1,5% żelach agarozowych. Wielkość produktów dla myszy zmutowanych *shiverer* wynosiła 308 pz, a dla wewnętrznej kontroli pozytywnej 200 pz. Sekwencje starterów użytych do genotypowania podano w Tabeli 6.

3.8. Homogenizacja tkanek i warunki sieciowania UV

3.8.1. Biopulweryzacja tkanki mózgowej (metoda B) i sieciowanie UV

Proszkowanie, inaczej biopulweryzację, tkanki mózgowej (Ryc. 14) użyto, jako metodę homogenizacji w eksperymentach XRNAX oraz RNA pull-down.

Mózgi pobierano natychmiast po uśmierceniu zwierzęcia i umieszczano w szalce ze schłodzonym, sterylnym buforem PBS. Następnie mózg rozdzielano na dwie półkule, przenoszono do probówek typu Eppendorf i zamrażano w ciekłym azocie. Tkanki przechowywano w temperaturze -80°C do momentu użycia. Drobnny proszek z każdej półkuli mózgowej przygotowano w instrumencie do homogenizacji proszkowej (Biopulweryzator, 59012N, BioSpec Products, Inc.). Zamrożoną tkankę umieszczano w komorze schłodzonej ciekłym azotem. Tłuczek, również schłodzony do temperatury kriogenicznej, wprowadzano do komory, a w tkankę uderzano kilkakrotnie młotkiem do uzyskania drobnego proszku. Sproszkowaną tkankę przenoszono na schłodzoną płytkę 6-dołkową umieszczoną na zamrożonym (-80°C) metalowym bloczku i natychmiast umieszczono w piecu do hybrydyzacji UV (UVP Hybrilinker Oven HL-2000, analytic-jena). Tkanekę naświetlano trzykrotnie światłem UV o długości fali 254 nm, 400 mJ/cm^2 . Pomiędzy każdym naświetlaniem sproszkowaną tkankę mieszano na płytce poprzez szybkie i krótkie potrząsanie płytką. Próbkę pobierano z płytki do probówki za pomocą zmrożonej w ciekłym azocie łyżeczki i ponownie umieszczano w ciekłym azocie. Cała procedura biopulweryzacji i sieciowania została przeprowadzana **bez rozmrażania tkanki**. Kontrolne, niesieciowane próbki pobierano do probówki bezpośrednio po rozdrobnieniu tkanki w biopuleryzatorze i umieszczano w ciekłym azocie. Do każdego pojedynczego eksperymentu XRNAX używano jednego mózgu myszy WT i jednego mózgu myszy *shiverer*. Do pojedynczych eksperymentów RNA pull-down wykorzystano od jednej półkuli do 2 całych mózgów myszy.



Rycina 14. Homogenizacja tkanki mózgowej poprzez biopulweryzację. A. BioPulverizer i metalowy tłok schłodzono w temperaturze -80°C , a następnie w ciekłym azocie. B. Przenoszenie jednej półkuli mózgu do komory BioPulverizera. C. BioPulverizer zawierający sproszkowaną tkankę umieszczoną na wstępnie schłodzonej płytce 6-dołkowej. D. Przenoszenie sproszkowanej tkanki na wstępnie schłodzoną płytkę 6-dołkową.

3.8.2. Homogenizacja mózgu myszy w szklanym homogenizatorze typu Dounce (metoda H) i sieciowanie UV

Homogenizację tkanki mózgowej w szklanym homogenizatorze wykorzystano w części eksperymentów XRNAX. Pobrane mózgi przemywano schłodzonym buforem PBS i natychmiast umieszczano w schłodzonym na lodzie szklanym homogenizatorze Dounce zawierającym 6 ml (schłodzonego) PBS. Tkanke mózgową wstępnie rozdrabniano przez pięć delikatnych przesunięć tłuczka A i następnie homogenizowano do uzyskania jednolitej zawiesiny przez pięć kolejnych przesunięć tłuczkiem B. Zhomogenizowaną tkankę przenoszono na schłodzoną na lodzie płytkę 6-dołkową w taki sposób, aby utworzyć cienką (~ 1 mm) warstwę homogenatu w każdym dołku (900 μl homogenatu na jeden dołek). Płytkę z homogenatem umieszczano na tacce z lodem i naświetlano trzykrotnie światłem UV o długości fali 254 nm, 400 mJ/cm². Pomiędzy każdym naświetlaniem homogenat mieszano

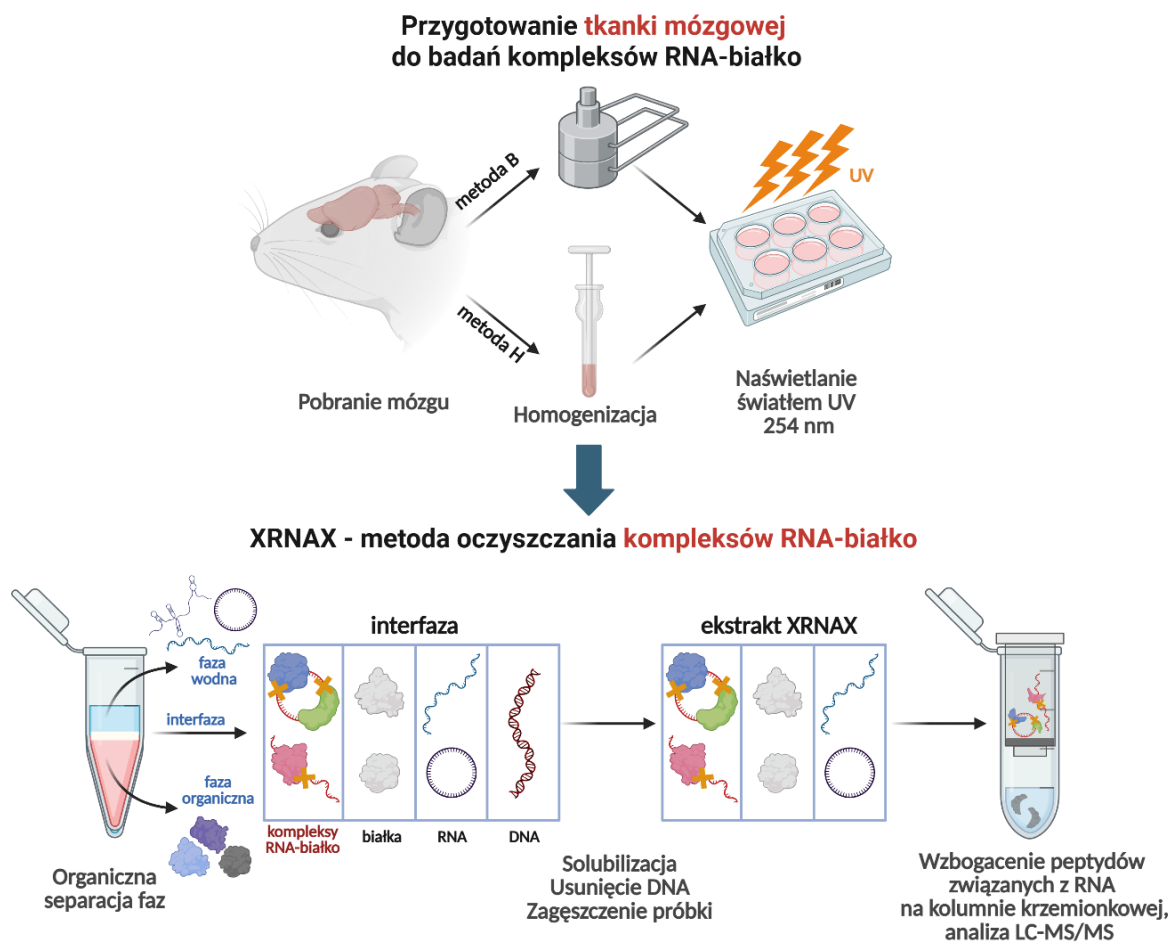
poprzez szybkie i krótkie potrząsanie płytką. Po naświetlaniu homogenat zbierano do 5 ml probówek typu Eppendorf i odwirowywano przy obrotach 10 000 RMP w 4°C przez 5 min. Supernatant odrzucano, a osad komórkowy zamrażano w ciekłym azocie. Próbkę kontrolną niesieciowaną UV przygotowywano stosując te same warunki homogenizacji pomijając jedynie etap naświetlania UV. Homogenaty zbierano bezpośrednio do probówek 5 ml i odwirowywano. Po odwirowaniu, osady komórkowe natychmiast zamrażano w ciekłym azocie. Do każdego indywidualnego eksperymentu XRNAX używano jednego mózgu myszy WT, zarówno dla próbek poddanych naświetlaniu UV, jak i kontrolnych niepoddanych działaniu UV.

3.8.3. Homogenizacja tkanek mózgowej, mięśniowej oraz płucnej w homogenizatorze kulkowym

Rozdrabnianie tkanek w homogenizatorze kulkowym zastosowano do izolacji RNA i walidacji zmian w alternatywnym splicingu zależnym od MBNL1 oraz do badania izoform kolistych RNA pochodzących z *Mbnl1* i *Mbnl2* w mózgu z deficytem mieliny. W tym celu, pobrano różne obszary mózgu (kora mózgowa, mózdzek, opuszka węchowa, prążkowie, podwzgórze), płuco oraz mięsień szkieletowy (mięsień brzuchaty łydki). Tkanki przemywano w schłodzonym PBS i natychmiast umieszczano w probówkach 1,5 ml zawierających kulki do homogenizacji tkanki i 1 ml odczynnika Trizol. Pobrane regiony mózgu homogenizowano w homogenizatorze kulkowym (Precellys® Evolution, Bertin, 23405-300-rd001) 2 x przy obrotach 5500 RPM z 1-minutową przerwą między cyklami, podczas gdy płuca i mięśnie szkieletowe homogenizowano 3 x 6800 RPM z 1-minutową przerwą.

3.9. Procedura XRNAX

Metodę XRNAX²⁰⁷ po optymalizacji homogenizacji tkanki mózgu zastosowano do badań natywnych oddziaływań RNA-białko w mózgu myszy (Ryc. 15).



Rycina 15. Główne etapy procedury XRNAX do analizy oddziaływań RNA-białko w mózgu myszy. Tkankę mózgową homogenizowano dwoma różnymi sposobami, a następnie poddawano naświetlaniu UV. Kompleksy RNA-białko oczyszczano z interfazy po separacji fazowej odczynnikiem Trizol, a następnie wzbogacano peptydy związane z RNA na kolumnach krzemionkowych. Peptydy analizowano z zastosowaniem pomiarów LC-MS/MS.

3.9.1. Liza tkanki mózgowej

Homogenaty tkankowe lizowano w zimnym Trizolu (Thermo Fisher Scientific). Zamrożony proszek tkanki mózgowiej lub osad po homogenizacji typu Dounce rozmrażano przez dodanie małej ilości Trizolu, a następnie całość przenoszono do 15 ml falkonu wypełnionego resztą odczynnika Trizol. Do lizy jednego mózgu użyto łącznie 8 ml Trizolu, a jego ilość obliczano na podstawie przybliżonej liczby komórek w próbce zgodnie z *Blue Brain Atlas*²²⁷. Homogenaty lizowano przez pipetowanie w górę i w dół za pomocą automatycznej pipety z końcówką 5 ml, a następnie kilkakrotnie (ok. 10 x) przepuszczano przez igłę 20G umieszczoną na strzykawce 1 ml, do uzyskania jednorodnej próbki. Lizaty inkubowano na lodzie przez 10 min. 1/20 objętości lizatu użyto do standardowej izolacji RNA i ekstrakcji białek oraz dalszych analiz RT-qPCR i Western blot. Te próbki służyły później, jako próby

wyjściowe (ang. *input*) tj. próby odniesienia do analiz eksperymentów XRNAX. Większą część prób (19/20) poddano procedurze XRNAX zgodnie z protokołem Trendel i inni²⁰⁷. W skrócie, lizaty mieszano z chloroformem (1,6 ml) i inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. Następnie próbki wirowano przez 10 min, 7000 g w 4°C. Fazę wodną przenoszono do nowej probówki bez naruszania interfazy i wykorzystywano do izolacji RNA. Interfazę zbierano w jednym lub kilku kawałkach do świeżej 2 ml probówki Eppendorf poprzez delikatne zasysanie jej końcówką pipety. Fazę organiczną przenoszono do świeżej probówki i wykorzystano do izolacji białka niezwiązanego do RNA.

3.9.2. Oczyszczanie kompleksów RNA-białko z interfazy

Interfazę zebraną po rozdzieleniu faz poddano dalszemu płukaniu, dezintegracji i trawieniu DNA. Wytrącone kompleksy RNA-białko oczyszczano w dalszych etapach na kolumnach krzemionkowych. Wszystkie kroki wykonano zgodnie z opublikowanym protokołem XRNAX²⁰⁷ (www.xrnax.com/theprotocol). Walidację przeprowadzono na poziomie RNA metodą qRT-PCR poprzez obserwację poziomu wybranych transkryptów w fazie wodnej po naświetlaniu UV w porównaniu do kontroli bez naświetlania (sekwencje użytych oligonukleotydów zamieszczono w Tabeli 6) lub/i na poziomie białka z wykorzystaniem analizy Western blot w próbkach z interfazy oraz fazy organicznej. Integralność RNA z interfazy, jak i z fazy wodnej oceniono poprzez rozdzielenie RNA na żelu agarozowym. Stężenie ekstraktu XRNAX określano poprzez pomiar stężenia RNA, zgodnie z oryginalnym protokołem XRNAX.

3.9.3. Oczyszczanie kompleksów RNA-białko z ekstraktów XRNAX przy wykorzystaniu kolumn krzemionkowych oraz trawienie białek do spektrometrii masowej

25-50 µg ekstraktu XRNAX (z interfazy) lub taka sama ilość materiału z kontrolnych próbek nieusieciowanych została użyta do wysokoprzepustowych pomiarów proteomicznych. Białka niezwiązane z RNA z ekstraktów XRNAX (lub odpowiednich kontroli) były usuwane przez częściowe trawienie trypsyną w mieszaninie z endoproteinazą Lys-C (V5073, Promega) i oddzielone od kompleksów RNA-białko przez wirowanie na kolumnach krzemionkowych. Użyto kolumn z zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen). Kompleksy RNA-białko po elucji z kolumny krzemionkowej zostały poddane działaniu RNazy w celu całkowitego usunięcia RNA i dalszemu trawieniu trypsyną białek związanych z RNA do peptydów. Po etapie całkowitego trawienia trypsyną, peptydy były zagęszczane, poddane znakowaniu TMT i analizie NanoLC-MS/MS.

3.9.4. Przygotowanie próbek do spektrometrii mas i znakowanie TMT

Białka wiążące RNA zostały specyficznym wzbogacone z ekstraktów XRNAX, następnie oczyszczone i trawione do peptydów, jak opisano w poprzedniej sekcji 3.9.3. Białka izolowane z fazy organicznej lub próbek wyjściowych zostały przygotowane do spektrometrii masowej w Międzynarodowym Instytucie Mechanizmów Molekularnych i Maszyn Polskiej Akademii Nauk przez zespół badawczy Proteomics Core Facility pod kierownictwem dr Remigiusza Serwy. Szczegółowy opis przygotowania prób i ich znakowania TMT wykonany przez współpracowników został opisany w publikacji podsumowującej wyniki naszych badań²²⁸.

3.9.5. Chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) i przetwarzanie danych

Rozdział chromatograficzny, pomiar prób w systemie NanoLC-MS/MS, przetwarzanie danych za pomocą MaxQuant v 1.6.17.0²²⁵ oraz Perseus v. 1.6.10.0²²⁶, a także normalizację zestawów danych wykonano dla trzech oddzielnych zestawów eksperymentów tj. XRNAX mózgów WT poprzedzony homogenizacją Dounce, XRNAX mózgów WT poprzedzony biopulweryzacją, oraz XRNAX mózgów myszy *shiverer* poprzedzony biopulweryzacją. Pomiar proteomiczny został przeprowadzony w Międzynarodowym Instytucie Mechanizmów Molekularnych i Maszyn Polskiej Akademii Nauk przez zespół badawczy Proteomics Core Facility pod kierownictwem dr Remigiusza Serwy. Uzyskane zestawy danych zostały zdeponowane w bazie PRIDE (PRoteomics IDentifications Database, Perez-Riverol 2022) w ramach ProteomeXchange Consortium²²⁹. Identyfikator danych: PXD052011.

3.10. Analiza Ontologii Genów (GO) dla wyników XRNAX

Analizę terminów GO (ang. *Gene Ontology*, GO) dla białek wzbogaconych po XRNAX przeprowadzono przy użyciu narzędzia DAVID Functional Annotation Tool (david.ncifcrf.gov/tools.jsp). Jako ‘background’ wykorzystano zestaw białek zidentyfikowanych w próbkach wyjściowych (cały proteom mózgu). Wartości *p* (ang. *p-value*) zdefiniowano na podstawie testowania wielokrotnego z korekcją Benjaminiego dostarczanego przez narzędzie DAVID^{218,219}.

3.11. Modelowanie struktury białek

Przewidywane struktury białek pobrano z AlphaFold Protein Structure Database^{221,222}. Domeny wiążące RNA na wizualizacjach struktur białek przedstawiono na podstawie adnotacji domen według bazy UniProt (UniProt Consortium 2019). Wszystkie wizualizacje wykonano w oprogramowaniu UCSF Chimera²²⁴.

3.12. Izolacja całkowitego RNA oraz DNazowanie

Całkowity RNA ekstrahowano przy użyciu standardowego protokołu Trizol. Stężenie RNA po izolacji mierzono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). RNA poddano działaniu odczynników z zestawu DNasefree Kit (Thermo Fisher Scientific) w celu usunięcia DNA. Procedurę przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.

3.13. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym

Jakość wyizolowanego RNA sprawdzano poprzez nakładanie 0,5 - 1 µg całkowitego RNA na 1% żel agarozowy i ocenę integralności frakcji 28S i 18S rRNA.

3.14. Odwrotna transkrypcja

Jednoniciowe komplementarne DNA (ang. *complementary DNA*, cDNA) syntetyzowano przy użyciu 200 ng RNA, jako materiału wyjściowego w przypadku walidacji eksperymentów XRNAS lub 10 µl RNA po DNazowaniu w przypadku prób po RNA pull-down. Do badania izoform splicingowych przy pomocy RT-PCR, do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto 500 ng RNA poddanego wcześniej działaniu DNazy. Odwrotną transkrypcję wykonywano przy użyciu enzymu Maxima H Minus RT (Thermo Fisher Scientific), losowych starterów heksamerowych i mieszaniny deoksyrybonukleotydów (dNTP, ThermoFisher Scientific), zgodnie z instrukcją producenta. Do pomiaru miRNA z zastosowaniem zestawu TaqMan po eksperymentach RNA pull-down używano 5 µl RNA z całej objętości prób otrzymanych po DNazowaniu. Odwrotną transkrypcję wykonywano przy użyciu mieszaniny starterów specyficznych dla danego, wykrywanego miRNA, odwrotnej transkryptazy SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) i mieszaniny dNTP (ThermoFisher Scientific), zgodnie z instrukcją producenta.

3.15. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Do reakcji używano 50 ng cDNA jako matrycy w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 5U/µl Dream Taq DNA Polymerase, 1x Dream Taq Buffer (10x, ThermoFisher Scientific), 0,5 µM startera F (ang. *forward*), 0,5 µM startera R (ang. *reverse*), 0,5 mM dNTP i H₂O do objętości całkowitej 50 µl. W celu zmniejszenia efektu *off-target* wykonywano Touchdown PCR w termocyklerze PCR (Biometra). Produkty PCR rozdzielano w 3% żelu agarozowym. W celu wykonania pomiarów ilościowych produktów RT-PCR określano intensywność prążków na żelu z zastosowaniem ImageJ (Fiji). Wartości te zostały wykorzystane m.in. do obliczenia wartości procentowej *spliced-in* (PSI). Liczba powtórzeń biologicznych dla analiz izoform splicingowych wynosiła n = 3-6. Istotność statystyczną obliczono przy użyciu testu *two-way* ANOVA, **p* < 0,05 ***p* < 0,01, ****p* < 0,001, *****p* < 0,0001, n.s.: nieistotne.

3.16. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) i z sondą TaqMan (TaqMan qPCR)

qPCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) wykonywano przy użyciu systemu CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD) z wykorzystaniem mieszaniny 5x HOT FIREPol EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne) i starterów zaprojektowanych dla analizowanych transkryptów (Tabela 6). Względna ilość transkryptu obliczono przy użyciu metody $\Delta\Delta Ct$. Dane normalizowano wobec średniej geometrycznej wartości Ct z dwóch lub trzech genów referencyjnych (*Gapdh*, *Actb*, *Hprt*), o ile nie wskazano inaczej w sekcji „Wyniki”. W analizach qPCR używano co najmniej 3 powtórzenia biologiczne (o ile nie wskazano inaczej w sekcji „Wyniki”), a każdą reakcję przeprowadzono w potrójnych powtórzeniach technicznych. Istotność statystyczną obliczono przy pomocy dwuczynnikowej analizy wariancji (ang. *two-way ANOVA*), gdzie: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, n.s.: nieistotne statystycznie.

qPCR w czasie rzeczywistym TaqMan przeprowadzono przy użyciu systemu QuantStudio 3 Real-Time PCR Detection System (Applied Biosystems) przy użyciu mieszaniny TaqMan™ Universal Master Mix II (ThermoFisher Scientific) i sond TaqMan specyficznych dla analizowanych transkryptów miRNA. Względna ilość miRNA obliczono przy użyciu metody $\Delta\Delta Ct$ przy normalizacji do średniej geometrycznej wartości Ct z dwóch genów referencyjnych (*U6*, *sno-202*). W każdej reakcji qRT-PCR użyto co najmniej 3 powtórzeń biologicznych i każdą reakcję przeprowadzono w potrójnych powtórzeniach technicznych. Istotność statystyczną obliczono, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (*one-way ANOVA*), $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, n.s.: nieistotne. Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism v.9.

3.17. Izolacja białek

Białka do walidacji eksperymentów XRNAX z próbek wyjściowych (całkowite białko z tkanki mózgowej) i próbek fazy organicznej izolowano zgodnie z protokołem Trizol i instrukcją producenta (Thermo Fisher Scientific). Próbkę interfazy, tj. ekstrakt XRNAX i próbkę interfazy kontrolnej (nieotraktowanej UV), zostały bezpośrednio użyte do pomiaru stężenia białka, a następnie poddane eksperymentom Western blot i barwieniu srebrem. Stężenie białek z próbek wyjściowych, fazy organicznej i ekstraktów XRNAX oceniono przy użyciu zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit zgodnie z instrukcją producenta (Thermo Fisher Scientific).

3.18. Barwienie srebrem

1 µl ekstraktu XRNAX i taką samą ilość ekstraktu białek z interfazy z próby kontrolnej niepoddanej działaniu promieniowania UV rozdzielano w 10% żelu SDS-PAGE i wizualizowano zestawem do barwienia srebrem SilverXpress™ Silver Staining Kit (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z instrukcją producenta.

Do walidacji elautów białkowych po RNA pull-down, zastosowano 30% objętości próby po elucji białek z całości kulek streptawidynowych. Do kulek dodawano 10 µl wody oraz 10 µl odczynnika NuPAGE™ LDS (Thermo Fisher Scientific) i denaturowano w 95°C przez 5 min. Próbkę schładzano 2 min. na lodzie a następnie umieszczano na statywie magnetycznym. Pobrane eluaty rozdzielano elektroforetycznie w 10% żelu SDS-PAGE, a następnie białka wizualizowano zestawem do barwienia srebrem SilverXpress™ Silver Staining Kit (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z instrukcją producenta.

3.19. Western blot

20 µg białek otrzymanych z interfazy, fazy organicznej i próbek wyjściowych z eksperymentów XRNAX użyto do analiz Western blot. Wszystkie białka wykrywano dalej stosując te same kroki. W przypadku analizy białek w eksperymentach RNA pull-down pobierano 30 µl lizatu tkanki mózgowej jako materiał wyjściowy do analizy Western blot. Po eksperymentach RNA pull-down pobierano 95-98% z całkowitej objętości kulek streptawidynowych ze związanymi kompleksami RNA-białko i taką samą ilość kulek z prób kontrolnych. Do kulek dodawano 15 µl wody oraz 15 µl odczynnika NuPAGE™ LDS (Thermo Fisher Scientific) i gotowano w 95°C przez 5 min. Po tym czasie próbki schładzano 2 min. na lodzie, umieszczano na statywie magnetycznym, a eluaty zbierano do nowych probówek. Wszystkie pozostałe próbki białkowe (interfazy, fazy organiczne i próby wyjściowe dla XRNAX oraz lizaty z RNA pull-down) mieszano z 1x stężonym barwnikiem obciążającym (NuPAGE™ LDS, Thermo Fisher Scientific) i denaturowano przez 10 min w 70°C, zgodnie z zaleceniem producenta. Białka rozdzielano w 10% żelach SDS-PAGE i przenoszono na membranę PVDF przy użyciu systemu do elektrotransferu półsuchego (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BIO-RAD). Membranę blokowano w 5% odtłuszczonym mleku przez godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym w 4°C przez noc. Zastosowano następujące przeciwciała pierwszorzędowe: anti-ELAVL2 (Proteintech, 14008-1-AP, 1:1000); anti-AGO1 (Cell Signalling, #5053S, 1:1000); anti-TUB33 (Sigma, T2200-200UL, 1:2500); anti-β-aktyna (Cell Signalling, #3700S, 1:1000); anti-PCBP1 (Thermo Fisher Scientific, #PA5-86005, 1:1000); anti-TDP-43

(Proteintech, #10782-2-AP, 1:2000); anty-TIAL1(anty-TIAR) (Cell Signalling, #5137S, 1:1000); anty-AGO2 (Abcam, ab32381, 1:1000). Po inkubacji, membrany przemywano 3 razy w buforze TBS-T i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z HRP przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej. Zastosowane następujące przeciwciała drugorzędowe: przeciwciało anty-królicze IgG H+L, HRP (Invitrogen, 31460, 1:20000), przeciwciało anty-mysie IgG (H+L), HRP (Invitrogen, G-21040, 1:20000). Po trzech dodatkowych płukaniach TBS-T białka wizualizowano na membranach przy użyciu odczynnika ECL (GE Healthcare, RPN2106) i systemu obrazowania Azure c500 (Azure Biosystems). Do półilościowych pomiarów intensywności białek na membranie użyto oprogramowania ImageJ (Fiji).

3.20. Northern blot

Ekstrakty XRNAX (8 µg) i całkowity RNA (10 µg) wyizolowany z próbek wyjściowych (cały mózg myszy) zostały użyte do Northern blot. W skrócie, ekstrakty RNA zostały zdenaturowane w buforze zawierającym glioksal (Thermo Fisher Scientific), nałożone na 1,2% żel agarozowy zawierający 1% formaldehyd i rozdzielane przez 2–2,5 h w buforze MOPS. Żel namaczano w 1×TBE przez 20 min, a następnie RNA przenoszono na membranę Hybond-N+ (GE Healthcare) przez godzinę, 15 V przy użyciu systemu do transferu półsuchego (Bio-Rad). Następnie membrana była suszona, naświetlana światłem UV i traktowana w sposób opisany wcześniej¹²⁵. Do hybrydyzacji użyto sondy RNA znakowanej DIG otrzymanej w reakcji transkrypcji *in vitro* (IVT) specyficznej dla circRNA *Cdr1as*. Wykrywanie sygnału prowadzono za pomocą przeciwciała anty-DIG sprzężonego z AP (1:2500, Roche). Do wizualizacji sygnału użyto odczynnika detekcyjnego CDP-Star (Sigma), a następnie membrany obrazowano za pomocą systemu do detekcji chemiluminescencji G:Box (Syngene). Sekwencje starterów użytych do otrzymania matrycy cDNA dla IVT i syntezy sondy specyficznej dla *Cdr1as* podano w Tabeli 6.

3.21. Przygotowanie kriosekcji tkanki mózgowej

Mózgi myszy WT i *shiverer* w wieku 13-20 tygodni przemywano buforem PBS, a następnie umieszczono w jednorazowych foremkach kriogenicznych w medium do zamrażania tkanek O.C.T. Foremki umieszczano na bloku stalowym schłodzonym w suchym lodzie, a po całkowitym zamrożeniu tkanki foremkę przenoszono do zamrażarki -80°C. Do przygotowania skrawków mózgu użyto urządzenia kriostat (Leica CM 1950). Temperaturę w komorze kriostatu ustawiono na -19°C, a temperaturę ostrza na -17°C. Grubość sekcji wynosiła 16 µm. Sekcje przenoszono na szkiełka podstawowe, suszono przez około godzinę w temperaturze pokojowej i przechowywano w zamrażarce w temperaturze -80°C do czasu użycia.

3.22. Barwienia immunofluorescencyjne (IF) białek i mikroskopia

3.22.1. Barwienie fluorescencyjne i obrazowanie

Do barwienia immunofluorescencyjnego wykorzystano kriosekcje mózgu (16 μ m) myszy WT i *shiverer*. We wszystkich eksperymentach IF użyto skrawków strzałkowych, bocznych z lokalizacją od 1,2 do 1,8 mm od linii środkowej. Współrzędne ustalono zgodnie z atlasem *Mouse Brain Atlas*, po wcześniejszym barwieniu hematoksyliną i eozyną. Przed barwieniem skrawki tkanki utrwalono w 4% PFA przez 15 minut. Po utrwaleniu skrawki trzykrotnie przemywano zimnym PBS, następnie przemywano raz w PBS-T (PBS uzupełniony o 0,1% Triton X-100) i dwukrotnie zimnym PBS, po czym blokowano przez 1 godzinę w roztworze blokującym (5% NGS, 1% PBS) w 4°C. Skrawki mózgu inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez noc w 4°C. Zastosowano przeciwciało anty-MBNL1 (Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease, 1:200). Niezwiązane przeciwciała usuwano przy użyciu PBS, a mieszaninę przeciwciał drugorzędowych nakładano na skrawki i inkubowano przez 1,5 godz. w temperaturze pokojowej. Zastosowano przeciwciała: anty-królicze Alexa 488 (Scientific, #A-11008, 1:500) i anty-mysie Alexa 568 (Thermo Fisher Scientific, #A-11004, 1:500). Szkiełka nakrywkowe stabilizowano na szkiełkach podstawowych za pomocą medium Vectashield z DAPI (Vector Laboratories, #H-1200-10) do obrazowania. Obrazowanie wykonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Keyence, BZ-X810) i/lub mikroskopu konfokalnego (Leica TCS SP5 II z oprogramowaniem LAS AF SP5 i LAS X SP8). Obrazy analizowano przy użyciu oprogramowania Fiji²²³.

3.22.2. Obliczenie intensywności sygnału IF

Współczynnik intensywności sygnału MBNL1 w jądrze komórkowym i cytoplazmie obliczono przy użyciu oprogramowania Fiji²²³ i narzędzia Intensity Ratio Nuclei Cytoplasm Tool (RRID:SCR_018573). Użyto dwóch obrazów jako danych wyjściowych: kanału cytoplazmatycznego (sygnał MBNL1) i kanału z jądra komórkowego (sygnał DAPI). Sygnał DAPI wykorzystano do segmentacji jąder. Pomiary wykonano w kanale cytoplazmatycznym po korekcie intensywności tła. Podczas analizy wykorzystano automatycznie ustawione parametry korekcji tła i współczynnika intensywności dla pojedynczego obrazu, z wyjątkiem parametru „maks. % nasycenia”, który ustawiono na 100% i „min. obszar jądra” zmieniony na 0,05. Sygnał immunofluorescencji MBNL1 został zliczony z $n = 2$ różnych zwierząt zarówno w przypadku myszy WT, jak i *shiverer* oraz z $n = 8$ (WT) i $n = 8$ (*Shi*) skrawków mózgu. Średnia liczba komórek z pojedynczego obrazu wynosiła 90-120 dla WT i 100-130 dla *Shi* w zależności od analizowanego regionu mózgu. Istotność statystyczną obliczono przy użyciu

dwukierunkowej analizy wariancji, gdzie $*p < 0,05$ $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, n.s.: nieistotne statystycznie.

3.23. Przewidywanie struktury 2D kolistych RNA za pomocą programu RNAfold

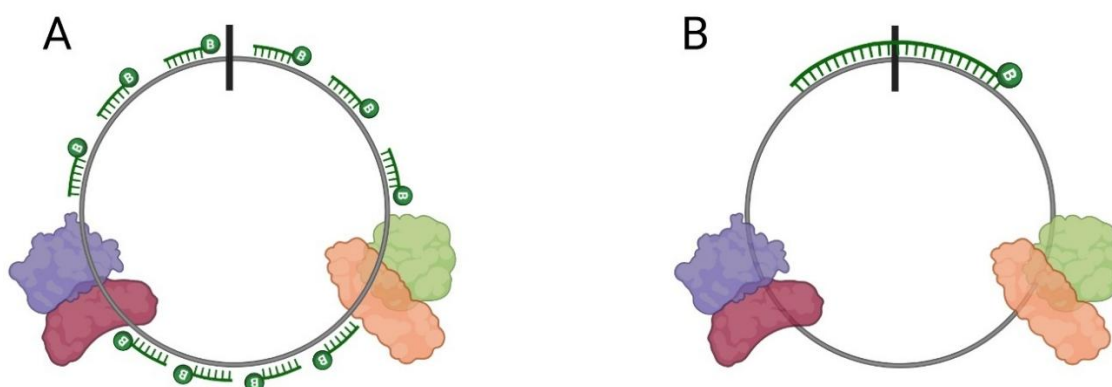
Struktury drugorzędowe kolistych RNA wygenerowano z zastosowaniem narzędzia RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). Narzędzie wykorzystuje algorytm minimalnej energii swobodnej (ang. *Minimum Free Energy*, MFE) do generowania struktur charakteryzujących się wysoką stabilnością. Po wprowadzeniu sekwencji pojedynczego RNA, zaznaczano w ustawieniach, że cząsteczka jest kolista („assume RNA molecule to be circular”).

3.24. Procedura circRNA pull-down

Protokół circRNA pull-down opracowano i zoptymalizowano do badań oddziaływań kolistych RNA z białkami w tkance mózgowej myszy.

3.24.1. Projektowanie sond specyficznych dla kolistych RNA

W celu przeprowadzenia procedury circRNA pull-down zaprojektowano szereg oligonukleotydowych sond DNA modyfikowanych biotyną. Do eksperymentu *Cdr1as* pull-down zaprojektowano dwa typy sond DNA, mianowicie 10 krótkich sond DNA o długości 20 nukleotydów wiążących się na całej długości circRNA *Cdr1as* (Ryc. 16A) oraz pojedynczą długą sondę DNA zaprojektowaną dla unikalnego złącza *back-splice junction* (BSJ) (Ryc. 16B). Dla pozostałych, wybranych kolistych RNA tj.: *circHipk3*(2), *circStau2*(2,3,4,5), *circDtnb*(5,6,7,8), *circGigyl2*(4,5,6,7,8) oraz dla kontroli negatywnej *Gfp mRNA* (ang. *green fluorescent protein*) zaprojektowano pojedyncze długie sondy, w przypadku kolistych RNA - swoiste dla sekwencji BSJ (Ryc. 16B).



Rycina 16. Schemat sond DNA specyficznych dla circRNA. A. Schematyczna reprezentacja krótkich biotynyloowanych sond DNA o długości 20 nukleotydów zaprojektowanych do wychwytywania *Cdr1as*. B. Schematyczna reprezentacja pojedynczej sondy (o długości 44 nukleotydów) do wychwytywania kolistych RNA i swoistej dla sekwencji BSJ.

Do zaprojektowania krótkich sond (Ryc. 16A) użyto narzędzie Stellaris Probe Designer (www.biosearchtech.com/support/tools/design-software/stellaris-probe-designer).

Projektowanie zestawu sond DNA za pomocą Stellaris Probe Designer definiuje temperaturę hybrydyzacji sond na 37°C. Wykorzystano następujące ustawienia przy projektowaniu sond: ustawiono maksymalną liczbę sond na 30, długość oligonukleotydów na 20 nt i minimalną długość odstępu między oligonukleotydami na 10 nt. Specyficzność sond potwierdzono za pomocą programu BLAT.

Projektowanie sond DNA swoistych dla sekwencji BSJ w circRNA zostało wykonane ręcznie, tak, aby każda sonda obejmowała 22 nukleotydy na prawo i 22 nukleotydy na lewo od sekwencji BSJ. Wszystkie sondy zostały zamówione, jako oligodeoksynukleotydy modyfikowane biotyną na 3' końcu. Temperaturę hybrydyzacji długich sond ustalano empirycznie.

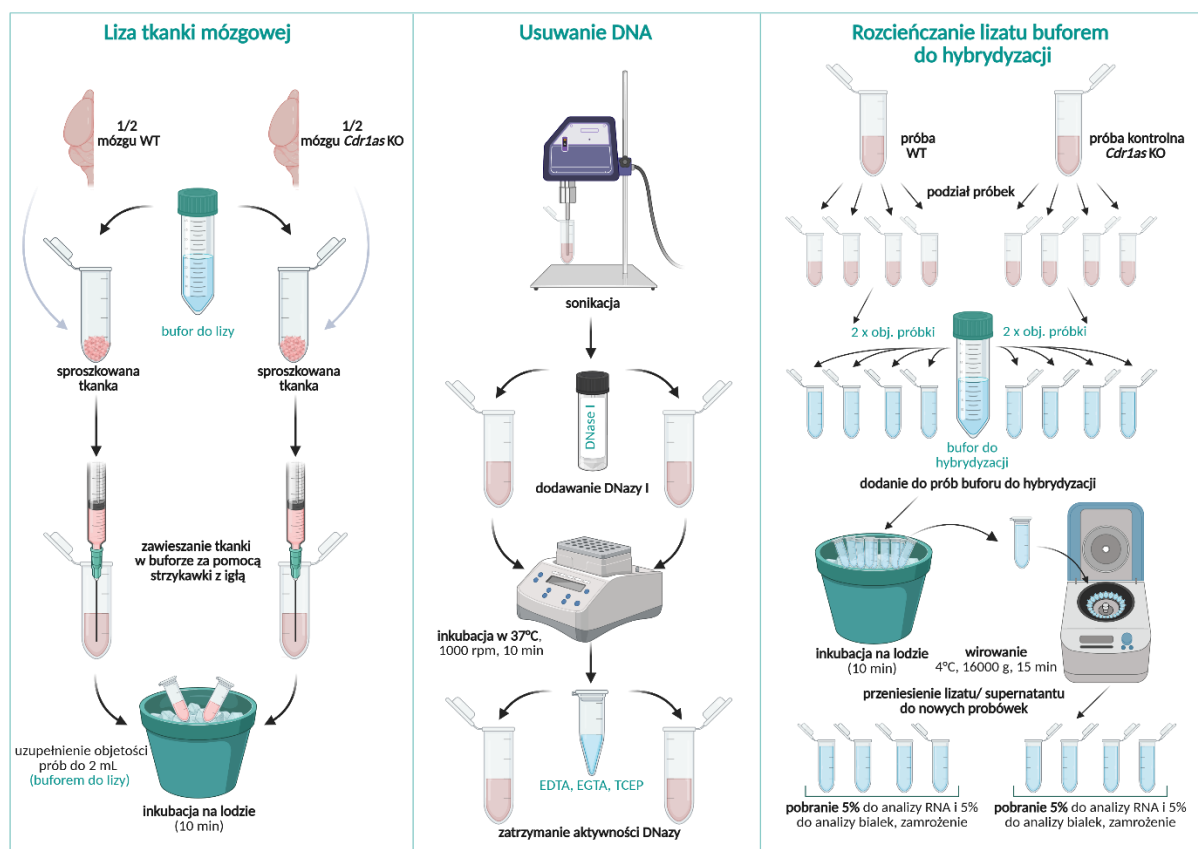
3.24.2. Przygotowanie kulek pokrytych streptawidyną

W procedurze circRNA pull-down wykorzystywano kulki Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (Thermo Fisher Scientific, #65002). Objętość kulek ustalono w odniesieniu do przybliżonej liczby komórek w materiale wyjściowym. Do tego celu wykorzystano wytyczne z protokołu RAP-MS^{188,189}, w którym użyto 1,2 ml kulek magnetycznych pokrytych streptawidyną na 200 milionów komórek. W protokole circRNA pull-down, użytym dalej do wzbogacania kompleksów circRNA-białko z mózgu, liczbę komórek w tkance szacowano w oparciu o *Blue Brain Atlas*²²⁷. Odpowiednią ilość kulek przenoszono do próbek 1,5 ml, umieszczano na statywie magnetycznym i usuwano supernatant. Następnie kulki przemywano 4-krotnie buforem Tris-HCl 10 mM pH 7,5, a dalej 2-krotnie 1x buforem do hybrydyzacji suplementowanym inhibitorami proteaz. Do każdego płukania używano 500 µl buforu, tj. ilość, która całkowicie „przykrywała” kulki na statywie. Kulki przemywano za każdym razem obracając kilkakrotnie próbkę a następnie próbki umieszczano na statywie magnetycznym na 2 min. Po tym czasie kulki gromadziły się na ścianie przy magnesie, co pozwalało na usunięcie oddzielonego buforu. Na koniec kulki zawieszano w ½ ich wyjściowej objętości w buforze do lizy suplementowanym inhibitorami proteaz i RNaz. Kulki zawieszone w buforze przechowywano w lodówce do czasu ich użycia.

3.24.3. Liza tkanki mózgowej

Warunki lizy tkanki mózgowej dobrano tak, aby uzyskać jednorodną zawiesinę z jednoczesnym zachowaniem integralności kompleksów RNA-białko. Do procedury RNA pull-down używano homogenatów przygotowanych przez biopulweryzację mózgu.

Sproszkowaną tkankę przechowywano w temperaturze -80°C , przenoszono na lód i natychmiast dodawano bufor do lizy suplementowany inhibitorami proteaz i RNaz. Na lizę próby zawierającej połowę mózgu (proszek zajmował około 350 μl objętości probówki) użyto 1,4 ml buforu do lizy. Proszek pipetowano za pomocą pipety automatycznej z końcówką 1 ml, a następnie przepuszczano około 10-krotnie przez strzykawkę 1 ml z igłą 20G i 22G do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Następnie próbki inkubowano na lodzie przez 10 min. Po tym czasie próbki wciąż inkubowane na lodzie sonikowano przez łącznie 30 s z przerywanymi impulsami (1 s włączony / 1 s wyłączony). Do każdej próbki dodawano 50 U DNazy I (Thermo, 89836) i suplementowano 1x stężonym roztworem soli (500 mM MgCl_2 , 100 mM CaCl_2). Trawienie DNA przeprowadzono w temperaturze 37°C przez 10 min. Po tym czasie próbki z powrotem umieszczano na lodzie i natychmiast dodawano mieszaninę roztworu zawierającego 10 mM EDTA, 5 mM EGTA i 2,5 mM TCEP, aby zatrzymać aktywność DNazy. W kolejnym etapie lizat mieszało z podwójną objętością 1,5x stężonego buforu do hybrydyzacji i inkubowano na lodzie przez kolejne 10 min. Próbkę wirowano w 4°C , 16000xg przez 15 min a następnie przenoszono supernatant do nowej probówki o zmniejszonej adsorpcji białek (Protein LoBind) o objętości 2 ml. 5% lizatu zachowywano, jako próbki wyjściowe do dalszej analizy RNA i białka (Ryc. 17). Próbkę *input* mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C , a większą część lizatu użyto do dalszej procedury RNA pull-down.



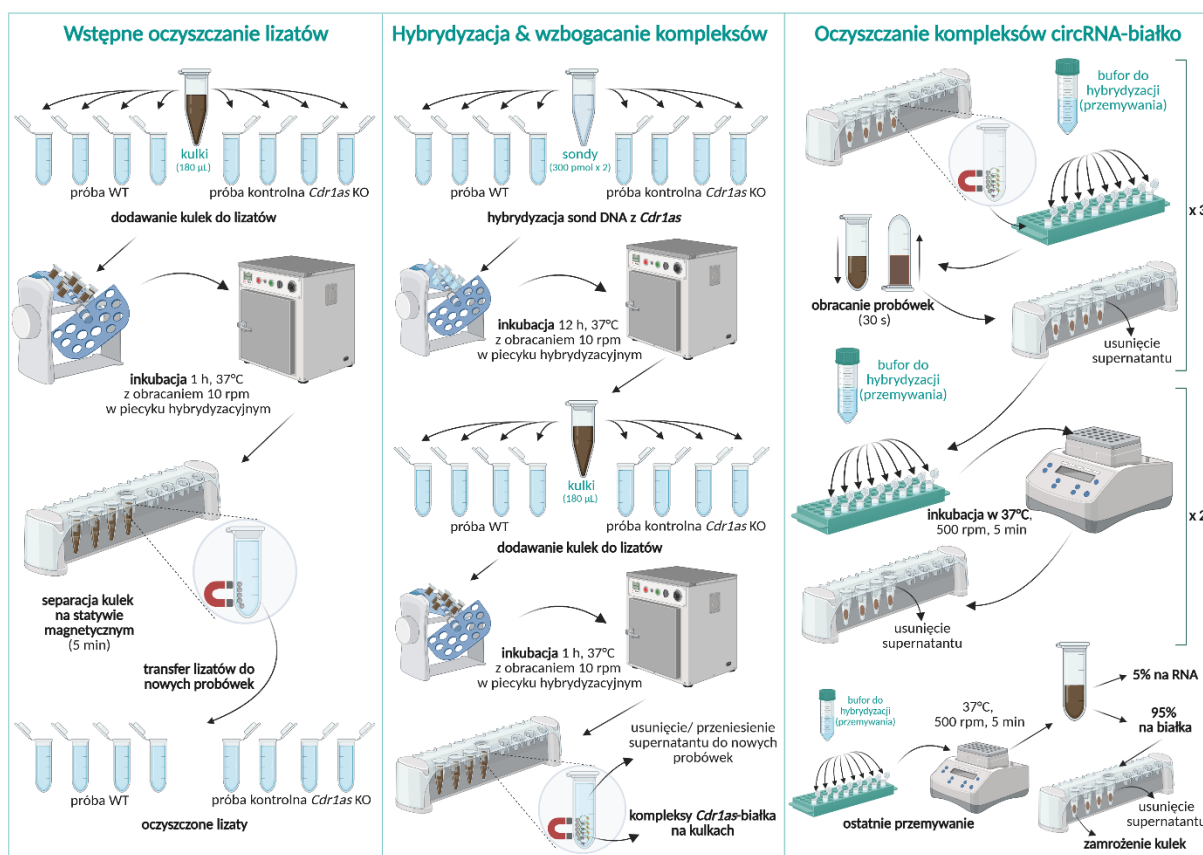
Rycina 17. Szczegółowy protokół lizy tkanki mózgowej i usuwania DNA z prób przed procedurą circRNA pull-down. Uzyskanie jednorodnej zawiesiny ze sproszkowanej tkanki mózgowej w buforze lizującym obejmuje wielokrotne przepuszczenie próbki przez strzykawkę z igłą (panel lewy). DNA jest usuwane z próbki przez sonikację i traktowanie DNazą (panel środkowy). Przed rozpoczęciem procedury circRNA pull-down lizat jest rozcieńczany buforem hybrydazyjnym. 5% lizatu jest pobierane w oddzielnych próbkach w celu dalszej analizy RNA i białek (panel prawy).

3.24.4. Wstępne oczyszczanie lizatów z potencjalnych cząsteczek biotynylowanych

W kolejnym etapie eksperymentu z lizatów usuwane są cząsteczki potencjalnie biotynylowane, aby zredukować tło podczas właściwego etapu, w którym stosuje się sondy biotynylowane do wzbogacania kompleksów RNA–białko. (Ryc. 18). Do lizatu dodano kulki Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 w objętości przeliczonej jak podano powyżej w punkcie „Przygotowanie kulek pokrytych streptawidyną”. Lizaty inkubowano z kulkami przez godzinę poprzez obracanie na rotorze przy 10 obr./min w piecu hybrydazyjnym w temperaturze 37°C (UVP Hybrilinker Oven HL-2000, analytic-jena).

W tym czasie przygotowano sondy DNA do późniejszego etapu hybrydyzacji. W tym celu denaturowano 300 pmol mieszaniny 10-ciu sond DNA o długości 20 nukleotydów lub pojedynczą długą sondę BSJ w temperaturze 85°C przez 3 min. Sondy schładzano i przechowywano na lodzie do czasu użycia.

Po godzinnej inkubacji lizaty umieszczano na statywie magnetycznym na co najmniej 5 minut, celem oddzielenia kulek. Lizaty po etapie wstępnego oczyszczania przenoszono do nowych 2 ml probówek typu Protein LoBind.



Rycina 18. Szczegółowy protokół circRNA pull-down na przykładzie circRNA *Cdr1as*.

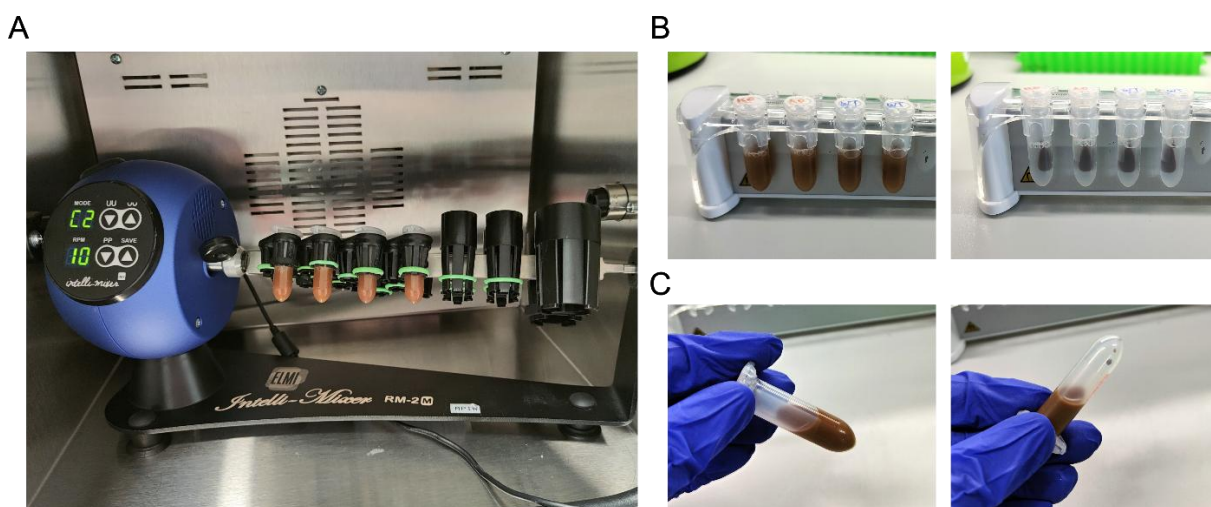
1-godzinna inkubacja lizatów z kulkami pokrytymi streptawidyną zapewnia usunięcie endogennych, biotynylowanych cząsteczek z lizatów (panel lewy). Hybrydyzacja sond DNA (10 x 20 nt) znakowanych biotyną do docelowego circRNA prowadzona była przez noc (12 godz.) w temperaturze 37°C w piecu hybrydyzacyjnym. Kompleksy circRNA *Cdr1as*-białko są wychwytywane na kulkach pokrytych streptawidyną (panel środkowy). Usuwanie niezwiązanych, niespecyficznych białek lub wszelkich innych pozostałości z użytych buforów obejmuje trzykrotne przemycie kompleksów circRNA-białko w temperaturze pokojowej, a następnie trzykrotne przemycie w temperaturze 37°C. Po ostatnim przemyciu w temperaturze 37°C zbierano 5% kulek ze związanymi kompleksami circRNA-białko do analizy RNA i 95% do analizy białka (panel prawy).

3.24.5. Hybrydyzacja circRNA z sondami i wzbogacanie kompleksów circRNA-białko

Do detekcji circRNA używano 10-ciu krótkich (22-nt) sond DNA z biotyną na 3' końcu lub jednej długiej (44 nt) biotynylowanej sondy DNA zaprojektowanej do sekwencji BSJ kolistego RNA (Ryc. 16). Lizaty podgrzewano przez 5 minut do temperatury hybrydyzacji tj. 37°C w przypadku krótkich 20-nt sond DNA lub 56°C w przypadku użycia długiej sondy swoistej

dla BSJ. Do lizatów dodawano 300 pmol zdenaturowanych w poprzednim etapie sond DNA i inkubowano przez noc (12 godz.) w 37°C przy jednoczesnym obracaniu probówek na rotorze (10 obr./min) w piecu hybrydacyjnym. Alternatywnie hybrydyzacje wykonywano w czasie 3 godz. w 56°C przy użyciu sondy swoistej dla BSJ.

Pod koniec hybrydyzacji przygotowano kulki do wzbogacania kompleksów RNA-białko. Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 zawieszano ponownie w buforze do lizy suplementowanym inhibitorami proteaz i RNaz i inkubowano w temperaturze hybrydyzacji. Kulki pokryte streptawidyną dodawano do lizatów z sondami i inkubowano 1 godz. w temperaturze hybrydyzacji (Ryc. 19A). Czas inkubacji wydłużano do 1,5 godz., jeśli materiał wyjściowy w eksperymencie wynosił ≥ 100 milionów komórek. Po tym czasie oddzielano kulki od lizatu na statywie magnetycznym (Ryc. 19B) przez 5 min. i następnie przenoszono supernatant do nowych 2 ml probówek Protein LoBind. Próbkę supernatantu została zachowana w ciekłym azocie i umieszczona w zamrażarce w temperaturze -80°C. Kulki magnetyczne ze związanymi kompleksami RNA-białko przepłukiwano w kolejnych etapach eksperymentu celem pozbycia się niezwiązanych cząsteczek.



Rycina 19. Hybrydyzacja circRNA z sondami DNA i wychwytywanie kompleksów circRNA-białko z homogenatów mózgu. A. Wychwytywanie kompleksów RNA-białko na streptawidynowych kulkach magnetycznych w czasie inkubacji w temperaturze 37°C z mieszaniem/rotacją. B. Rozdzielanie kulek na statywie magnetycznym. C. Płukanie kulek po hybrydyzacji i wychwyceniu kompleksów RNA-białko.

3.24.6. Oczyszczanie wzbogaconych kompleksów circRNA-białko

Do oczyszczania kompleksów circRNA-białko związanych do kulek ze streptawidyną przygotowano bufor hybrydacyjny 1x stężony i przemywano nim kulki magnetyczne 3-krotnie w temperaturze pokojowej (Ryc. 19C). Za każdym razem kulki zawieszano w 500 μ l buforu i mieszano zawartość probówki poprzez jej delikatne obracanie przez około 30 s. Po

każdym płukaniu umieszczano próbki na statywie magnetycznym na 2 minuty, a po tym czasie dokładnie usuwano bufor i powtarzano płukanie. W następnym etapie przemywano kompleksy RNA-białko związane na kulkach 3-krotnie w 500 µl 1x buforu do hybrydyzacji w temperaturze hybrydyzacji (37°C lub 56°C) na termobloku, przy jednoczesnym wytrząsaniu 500 obr./min przez 5 min. Po każdym płukaniu, kulki umieszczano na statywie magnetycznym na 2 minuty i dokładnie usuwano bufor. W przypadku wykorzystania kulek ze związanymi kompleksami RNA-białko do dalszej analizy proteomicznej z zastosowaniem LC-MS/MS, stosowano dodatkowy etap 2-3-krotnego przepłukiwania kulek buforem Tris-HCl o stężeniu 10 mM i pH 8, celem pozbycia się pozostałości detergentów. Na ostatnim etapie płukania kulki rozdzielano do 2 próbek 2 ml typu Protein LoBind w objętościach 5% (taki sam %, jak w przypadku pobrania próbek *input*) do dalszej analizy RNA metodą RT-qPCR i 95% do dalszej analizy białek metodami barwienia srebrem i Western blot. W przypadku przygotowywania prób do analiz LC-MS/MS pobierano 98% kulek do analizy białek a 2% pozostawiano do kontrolnego sprawdzenia wzbogacenia RNA po procedurze RNA pull-down. Próbki rozdzielone do osobnych próbek umieszczano na statywie magnetycznym i po co najmniej 3 min. (lub do czasu, aż wszystkie kulki osiadą na ścianie próbki od strony statywu) usuwano dokładnie bufor płuczący znad kulek. Próbki zawierające osuszone kulki natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i dalej przechowywano w temperaturze -80°C.

3.24.7. Elucja RNA

Próbki *input* oraz 5% kulek pozostawionych po procedurze circRNA pull-down używano do elucji RNA. Próbki *input* zawieszano w 200 µl a kulki w 100 µl 1x stężonego buforu do trawienia białek uzupełnionego o proteinazę K (1 mg/ml). Wszystkie próby inkubowano w 50°C przez 45 min. Po tym czasie natychmiast dodawano do próbek 1 ml odczynnika Trizol i inkubowano 8 min w temperaturze pokojowej. Następnie wykonywano izolację całkowitego RNA przy użyciu standardowego protokołu Trizol. Na koniec osady RNA zawieszano w 15 µl wody i mierzono stężenia RNA przy użyciu spektrofotometru NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). 4 µl wyizolowanego RNA poddano działaniu odczynników z zestawu DNAfree Kit (Thermo Fisher Scientific) w celu usunięcia DNA zgodnie z instrukcją producenta. Odwrotną transkrypcję i qPCR wykonywano tak, jak opisano we wcześniejszych sekcjach.

3.24.8. Elucja białka

Elucję białka z kulek magnetycznych na potrzeby analiz barwienia srebrem lub Western blot przeprowadzono poprzez gotowanie kulek z rozcieńczonym odczynnikiem NuPAGE™

LDS (Thermo Fisher Scientific). W tym celu do kulek dodawano 10-15 μ l wody i taką samą objętość odczynnika NuPAGE™ LDS i gotowano w 95°C przez 5 min. Probówki umieszczano na 2 min. na statywie magnetycznym celem odseparowania eluatu zawierającego białka od kulek. Barwienie srebrem i Western blot wykonano tak, jak opisano we wcześniejszych sekcjach.

3.24.9. Przygotowanie prób, pomiary LC-MS/MS i przetwarzanie danych

Celem wykonania analizy proteomicznych i identyfikacji białek związanych do circRNA, eksperyment *Cdr1as* pull-down przeprowadzono w czterech powtórzeniach biologicznych z mózgów WT i czterech powtórzeniach z mózgów *Cdr1as* KO (kontrola negatywna). W każdym pojedynczym eksperymencie użyto 2 mózgów jako materiału wyjściowego. Procedura trawienia białek i uzyskiwania peptydów z kompleksów RNA-białko, pomiary LC-MS/MS, zbieranie i przetwarzanie danych w programach MaxQuant²²⁵ i Perseus²²⁶ zostały wykonane przez Laboratorium Spektrometrii Masowej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk.

3.24.10. Analiza danych LC-MS/MS

Dane proteomiczne z eksperymentów circRNA pull down przetwarzano dalej w programie Excel m.in. ze wszystkich zidentyfikowanych peptydów/ białek odfiltrowano dane dla peptydów niepowtarzające się między powtórzeniami biologicznymi i stanowiące *background* eksperymentu. Do dalszej analizy odseparowano i pozostawiono dane dla peptydów powtarzające się w co najmniej 3 na 4 powtórzeniach biologicznych. Odseparowano również peptydy i białka, dla których uzyskano zliczenia znormalizowanej intensywności peptydów jedynie w próbach WT po *Cdr1as* pull-down, z jednoczesnym brakiem odczytów (lub maksymalnie jednym odczytem) w kontroli negatywnej (*Cdr1as* KO). Celem przygotowania dalszych wizualizacji danych na wykresach i wskazania peptydów/białek wzbogaconych po eksperymencie *Cdr1as* pull-down zerowe odczyty intensywności peptydów w kontrolach negatywnych zamieniono na podprogową wartość intensywności peptydów (tj. 20,5). Analizę terminów GO dla białek wzbogaconych po *Cdr1as* pull-down przeprowadzono przy użyciu narzędzia DAVID Functional Annotation Tool (david.ncifcrf.gov/tools.jsp). Jako bazę do analizy wykorzystano zestaw białek otrzymanych z pomiarów proteomicznych wykonanych na ekstraktach białkowych z całego mózgu myszy. Wartości *p* zdefiniowano na podstawie testowania wielokrotnego z korekcją Benjaminiego dostarczanego przez narzędzie DAVID^{218,219}. Wykresy wizualizujące dane przygotowano w programie GraphPad Prism v.9.

3.25. Trawienie RNA w lizatach tkanki mózgu RNazą R

W celu sprawdzenia możliwości usunięcia frakcji mRNA z lizatu tkanki mózgowej przed właściwym eksperymentem circRNA pull-down, przeprowadzono trawienie liniowych cząsteczek RNA w lizatach tkanki mózgowej z użyciem RNazy R. Do tego celu używano 10% (zawierającego około 40 µg całkowitego RNA) zamrożonego homogenatu przygotowanego przez biopulweryzację połowy mózgu. Zamrożony proszek zawieszono w 400 µl buforu do lizy, a następnie poddano lizie i przepuszczono przez strzykawkę z igłą w sposób zgodny z wcześniej opisanym etapem protokołem RNA pull-down (punkt 3.25.3.). Po etapie lizy, próbki inkubowano przez 10 min. na lodzie. Po inkubacji lizat rozdzielono na dwie porcje o równej objętości, przeznaczone do reakcji kontrolnej i reakcji z RNazą R. Do próbki kontrolnej dodano 1x stężony bufor reakcyjny (mieszanina komercyjnego buforu dla RNazy R zawierającego KCl oraz buforu przygotowanego w oparciu o protokół Xiao i Wilusz 2019²¹⁷ suplementowanego LiCl, zmieszanych w proporcji 1:1) oraz 50 U DNazy I (Thermo, 89836). Do próbki badawczej dodano 1 x stężony bufor reakcyjny, 50 U DNazy I i dodatkowo 10 U RNazy R (Lucigen, RNR07250). Obie próbki inkubowano następnie przez 60 minut w temperaturze 37°C. Po tym czasie próbki z powrotem umieszczano na lodzie i natychmiast dodawano mieszaninę roztworu zawierającego 10 mM EDTA, 5 mM EGTA i 2,5 mM TCEP, aby zatrzymać aktywność enzymów. Próbkę inkubowano na lodzie przez kolejne 10 min. a następnie wirowano przy 16000 x g przez 15 min. w temperaturze 4°C. Supernatant z każdej próbki przeniesiono do świeżych probówek o pojemności 1,5 mL. RNA izolowano zgodnie ze standardowym protokołem Trizol, a następnie wyizolowane RNA wykorzystano do reakcji odwrotnej transkrypcji i analizy ilościowej za pomocą qRT-PCR.

3.25.1. Trawienie RNA sprzężone z selekcją mRNA

Następnie, po trawieniu enzymatycznym, do protokołu wprowadzono etap selekcji na kulkach oligo(dT) w celu dalszej deplekcji mRNA. Próbę po trawieniu enzymatycznym i próbę kontrolną bez dodatku RNazy R, odwirowano przy 16000 x g przez 15 minut w temperaturze 4°C z supernatant z każdej próbki przeniesiono do świeżych probówek o pojemności 1,5 mL. Próbkę poddano dodatkowemu etapowi usuwania poliadenylowanego mRNA przy użyciu kulek magnetycznych Oligo d(T)25 Magnetic Beads (New England Biolabs, S1419S). Przed użyciem kulki dokładnie zawieszono w ich oryginalnym buforze. Następnie, do dwóch oddzielnych, wolnych od RNaz probówek o pojemności 1,5 mL, przeniesiono po 10 µl zawiesiny kulek z oryginalnego opakowania. Probówki umieszczono na statywie magnetycznym i po 30 sekundach (lub gdy zawiesina stała się klarowna) usuwano supernatant. Kulki przemywano

dwukrotnie poprzez zawieszanie ich w 100 μ l świeżego buforu do wiązania mRNA, za każdym razem usuwając supernatant po separacji magnetycznej. Po ostatnim przemyciu, osadzone kulki zawieszono w 80 μ l buforu do wiązania mRNA i całość dodawano do próbki po trawieniu RNAzą R. Do próbki kontrolnej (tj. bez RNazy R) dodano jedynie 80 μ l buforu do wiązania mRNA (bez kulek). Obie próbki inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej poprzez obracanie na rotorze przy 10 obr./min, aby umożliwić hybrydyzację ogonów poli(A) mRNA do oligonukleotydów oligo(dT) na powierzchni kulek. Po inkubacji próbki umieszczono na magnesie na 2 minuty, a supernatant, zawierający RNA zubożone o poliadenylowane transkrypty, ostrożnie przeniesiono do nowych próbek o pojemności 1,5 ml. Z tak przygotowanych supernatantów izolowano RNA, a następnie uzyskane RNA wykorzystano do reakcji odwrotnej transkrypcji i analizy ilościowej za pomocą qRT-PCR.

3.26. Analizy transkryptomiczne z wykorzystaniem technologii NanoString nCounter®

3.26.1. Hybrydyzacja RNA z sondami specyficznymi dla wybranych transkryptów (TagSet custom assay)

RNA oczyszczone z eluatów circRNA pull-down poddawano DNazowaniu. 100 ng RNA z tych eksperymentów wykonanych zarówno w mózgach myszy WT, jak i *Cdr1as* KO użyto do hybrydyzacji sond swoistych dla 72 transkryptów wyselekcjonowanych wcześniej przez dr hab. Monikę Piwecką do walidacji zmian transkryptomicznych w mózgach myszy z delecją *Cdr1as*¹²⁵. Wśród 72 wyselekcjonowanych transkryptów znalazły się grupy wybranych genów markerów neuronalnych, genów natychmiastowej wczesnej odpowiedzi (ang. *immediate early genes*), genów regulowanych przez miR-7 oraz genów zegara okołodobowego (ang. *circadian clock genes*)¹²⁵. Reakcję hybrydyzacji przeprowadzono mieszając próbki RNA z nadmiarem odpowiednich sond oraz mieszaniną Znaczników Reporterowych i Wychwytyjących (TagSet) i następnie inkubując próbki w temperaturze 67°C przez 18 godzin. Po zakończeniu hybrydyzacji, próbki zostały załadowane na specjalny kartridż. Następnie kartridż umieszczono w urządzeniu nCounter® SPRINT Profiler, które automatycznie przeprowadza dalsze etapy analizy. Urządzenie działa w dwóch głównych fazach. W pierwszej fazie, przy użyciu zintegrowanego systemu mikroprzepływowego, następuje oczyszczenie kompleksów RNA-sonda poprzez usunięcie niezwiązanych, nadmiarowych sond i znaczników. Oczyszczone kompleksy są następnie immobilizowane i precyzyjnie rozmieszczane na powierzchni obrazującej kartridża, wykorzystując oddziaływanie biotynylowanego Znacznika Wychwytyjącego ze streptawidyną pokrywającą powierzchnię kartridża. W drugiej fazie, zautomatyzowany wielokanałowy mikroskop skanuje powierzchnię kartridża, a zintegrowany

system analizy cyfrowej zlicza poszczególne, unikalne, fluorescencyjne kody kreskowe Znaczników Reporterowych, które zostały przyłączone do docelowych cząsteczek RNA. Wyniki są eksportowane w postaci plików danych w formacie .csv, zwanych plikami RCC (ang. *Reporter Code Count*), które zawierają liczbę zliczeń dla każdej badanej cząsteczki RNA w poszczególnych próbkach. Poziomy ekspresji mRNA analizowano przy użyciu oprogramowania nSolver 3.0. Dane normalizowano wobec genów: *Actb*, *Hprt*, *Gapdh* i *Tubb5* oraz z zastosowaniem wewnętrznych kontroli pozytywnych i negatywnych.

3.26.2. Hybrydyzacja RNA z sondami specyficznymi dla miRNA (Mouse v1.5 miRNA assay)

RNA oczyszczone z eluatów circRNA pull-down poddawano DNazowaniu. 100 ng RNA z tych eksperymentów użyto do analizy ekspresji miRNA nCounter® Mouse v1.5 (NanoString, CSO-MMIR15-12). Wszystkie etapy testu wykonano zgodnie z protokołem NanoString dedykowanym do tego zestawu (MAN-C0009-08-nCounter-miRNA-Expression-Assay). W skrócie, unikalne znaczniki oligonukleotydowe ligowano z miRNA. Próbkę po etapie ligacji oczyszczono przez dodanie 1 µl Ligation Clean-Up Enzyme i 1-godzinną inkubację w temperaturze 37°C. Oczyszczone z enzymu próbki rozcieńczano i hybrydyzowano z sondami przy użyciu odczynników NanoString. Sondy wiążące miRNA i sondy reporterowe z unikalnym fluorescencyjnym barkodem hybrydyzowano z miRNA podczas 18-godzinnej inkubacji w temperaturze 65°C. Po zakończeniu hybrydyzacji, próbki zostały załadowane na kartridż i umieszczone w urządzeniu nCounter® SPRINT Profiler, a reakcja detekcji kompleksów sonda-miRNA znakowanych fluorescencyjnie została przeprowadzona automatycznie, jak opisano powyżej (3.26.1). Pomiary zostały wykonane w Max Delbrück Center, Berlin Institute for Medical Systems Biology (MDC-BIMSB). Poziomy ekspresji miRNA analizowano przy użyciu oprogramowania nSolver 3.0 poprzez normalizację do wewnętrznych kontroli pozytywnych i negatywnych.

3.27. Analizy statystyczne

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu GraphPad Prism v.9. Wszystkie szczegóły dotyczące analiz oraz wyboru testów statystycznych dla poszczególnych eksperymentów zamieszczono w opisach do rycin oraz w opisach metod. Wartości *p* obliczono przy użyciu ANOVA lub *t* – testu.

3.28. Narzędzia wykorzystane do opracowania rycin

Ryciny prezentujące wyniki uzyskane w niniejszej pracy opracowano w programie Inkscape. Rysunki i schematy utworzono w BioRender.com.

4. Wyniki

4.1. Optymalizacja metody XRNAX do charakteryzowania oddziaływań RNA-białko w tkance mózgowej myszy

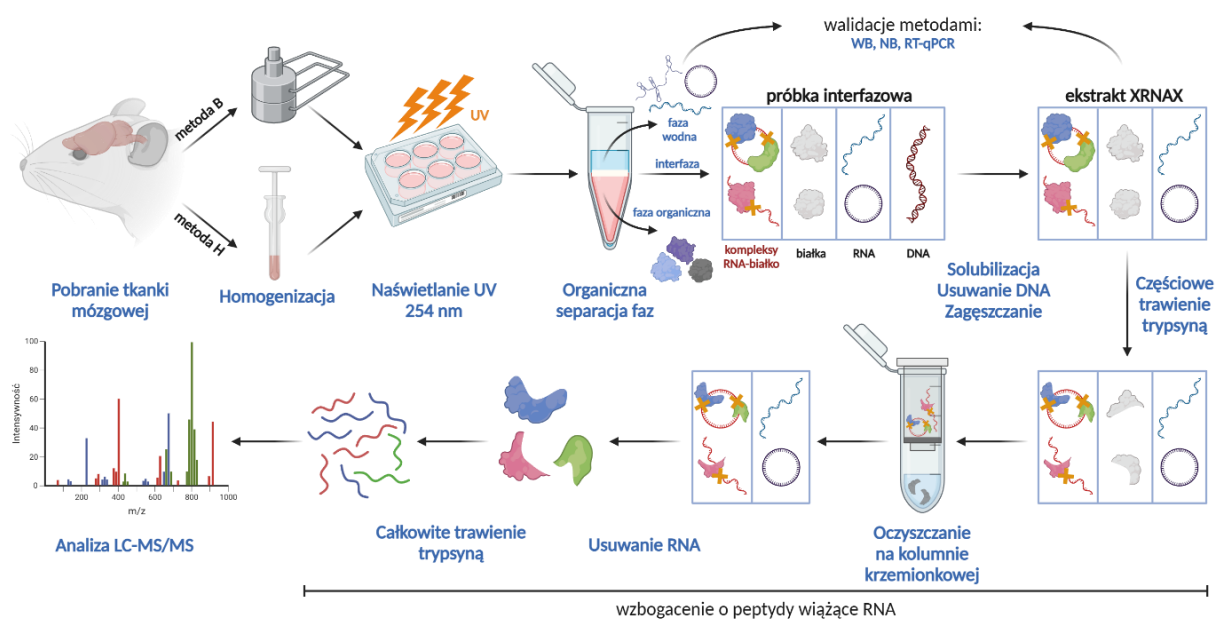
Niniejsza sekcja prezentuje rezultaty badań, których nadrzędnym celem było opracowanie i zastosowanie metod umożliwiających dogłębną charakterystykę oddziaływań RNA-białko naturalnie występujących w tkance mózgowej myszy. Kluczową motywacją do podjęcia tych prac była potrzeba przezwyciężenia ograniczeń dotychczasowych protokołów, które są zoptymalizowane głównie do pracy z liniami komórkowymi, i umożliwienia analizy natywnych kompleksów RNA-białko w złożonym środowisku tkankowym. W pierwszej kolejności przedstawiono zatem wyniki adaptacji metody XRNAX²⁰⁷, ze szczególnym uwzględnieniem optymalizacji etapu homogenizacji tkanki mózgowej oraz oceny efektywności stabilizacji oddziaływań RNA-białko poprzez sieciowanie UV. Następnie, wykorzystując zoptymalizowany protokół XRNAX, przystąpiono do charakterystyki białek wiążących całkowite RNA (niezależnie od statusu poliadenylacji) w mózgu myszy szczepu dzikiego, co miało na celu zmapowanie RBPomu mózgu.

Protokół do badania oddziaływań RNA-białko, XRNAX²⁰⁷, został opublikowany w 2019 roku. Naukowcy przeprowadzili eksperymenty na trzech ludzkich liniach komórkowych (MCF7, HeLa i HEK293), które połączyli z trawieniem trypsyną oraz wzbogacaniem peptydów związanych z RNA na kolumnach krzemionkowych. W wyniku tych badań zidentyfikowano proteomy wiążące RNA, obejmujące odpowiednio 1207 białek dla komórek MCF7, 1239 dla HeLa oraz 1357 dla HEK293²⁰⁷. Stwierdzono również, że ponad 800 z tych białek było wspólnych dla wszystkich trzech linii komórkowych, a ponad 700 zidentyfikowano jako wiążące niepoliadenylowane RNA. Ponadto, sekwencjonowanie RNA z ekstraktów XRNAX uzyskanych z komórek MCF7 wykazało obecność wszystkich głównych biotypów RNA, które wykrywane są także poprzez klasyczną ekstrakcję RNA odczynnikami Trizol. Wśród zidentyfikowanych transkryptów znalazło się około 1500 kodujących białka oraz podobna liczba (około 1500) dużych międzygenowych niekodujących RNA (ang. *large intergenic noncoding RNAs*, lincRNA)²⁰⁷. Na koniec protokół XRNAX zastosowano do określania zmian ilościowych w RBPomie wywołanych stresem po traktowaniu komórek MCF7 arseninem i zaobserwowano masową przebudowę proteomu związanego z translacją i oddziałującego z RNA²⁰⁷. Podsumowując, protokół XRNAX jest użytecznym narzędziem do kompleksowej identyfikacji białek wiążących różne biotypy RNA oraz analizy zmian w RBPomie (np. w odpowiedzi na stres komórkowy) w ludzkich liniach komórkowych, a także wykazuje potencjał adaptacji do badania interakcji RNA-białko w innych układach, jak np. tkanki.

Ograniczona do kilku warstw komórek²³⁰ penetracja światła UV o długości 254 nm w materiale biologicznym uniemożliwia efektywną stabilizację kompleksów RNA-białko w większości tkanek i wymaga rozdrobnienia tkanki oraz optymalizacji procedury utrwalania oddziaływań RNA-białko. Aby ocenić skuteczność naświetlania UV w sieciowaniu kompleksów RNA-białko w homogenatach mózgu myszy, zastosowano dwie różne metody homogenizacji tkanek przed samym procesem sieciowania. Użyto mózgu myszy szczepu dzikiego zhomogenizowanego przez rozdrobnienie w homogenizatorze Dounce (metoda H) i biopulweryzację, inaczej proszkowanie (metoda B, Ryc. 20). W pierwszym przypadku naświetlano światłem UV cienką warstwę płynnego homogenatu, natomiast w drugim przypadku drobno sproszkowaną, zamrożoną tkankę mózgową (dokładne opisy homogenizacji znajdują się w sekcji Metody). Dalej kontynuowano procedurę XRNAX oraz izolację i oczyszczanie kompleksów RNA-białko z interfazy po separacji fazowej zgodnie z opublikowanym protokołem XRNAX²⁰⁷. Dla obu metod homogenizacji przygotowano również odpowiednie próbki kontrolne, które nie zostały poddane naświetlaniu UV. Po wieloetapowym oczyszczaniu, obejmującym usunięcie DNA, i rozpuszczeniu próbek z interfazy, otrzymano ekstrakty XRNAX. Zgodnie z założeniami, powinny być one wzbogacone w usieciowane kompleksy RNA-białko oraz pozbawione DNA.

Procedurę XRNAX, gdy jest ona poprzedzona homogenizacją metodą biopulweryzacji, w dalszej części pracy określa się mianem „XRNAX B”. Natomiast w przypadku, gdy homogenizację przeprowadzono przez rozdrobnienie tkanki w homogenizatorze Dounce’a, procedura ta nosi nazwę „XRNAX H”.

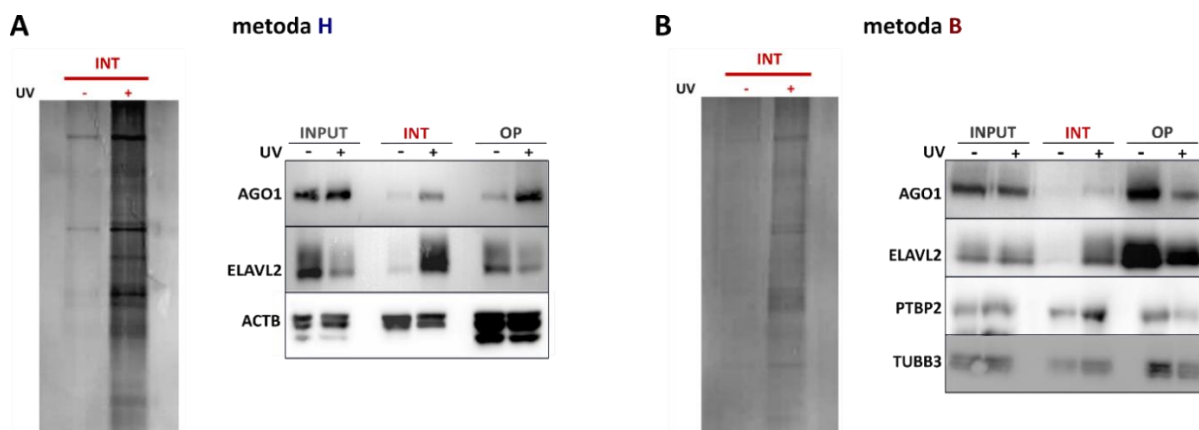
Wyniki otrzymane z zastosowaniem protokołu XRNAX w tkance mózgu myszy omawiane w dalszej części pracy w punktach od 4.1 do 4.5 stanowią część opublikowanej pracy, której pierwszym autorem jest autorka niniejszej pracy doktorskiej²²⁸.



Rycina 20. Szczegółowe etapy procedury XRNAX przeprowadzonej w tkance mózgowej myszy. Przed sieciowaniem światłem UV przy długości fali 254 nm stosowano dwie różne metody homogenizacji tkanki mózgowej: metodę B (biopulweryzację zamrożonej tkanki) i metodę H (homogenizację za pomocą homogenizatora Dounce bezpośrednio po resekcji mózgu). Po rozdzieleniu faz odczynnikiem Trizol, interfaza jest używana do odzyskania proteomu związanego z RNA, co daje początek ekstraktowi XRNAX. Ekstrakty XRNAX były walidowane pod kątem wzbogacenia RBP (metodami Western blot – WB) oraz wykrywania RNA (Northern blot – NB, i RT-qPCR). Po tych wstępnych walidacjach, ekstrakty XRNAX były poddawane trawieniu trypsyną i wzbogaceniu peptydów związanych z RNA na kolumnkach krzemionkowych do dalszej analizy LC-MS/MS (walidacja wysokoprzepustowa).

4.1.1. Analiza wzbogacenia białek wiążących RNA w procedurze XRNAX

Aby potwierdzić wzbogacenie białek wiążących RNA w interfazie uzyskanej za pomocą protokołu XRNAX, przeprowadzono analizy Western blot oraz barwienie srebrem. Analiza Western blot wykazała, że kanoniczne RBP, takie jak AGO1 oraz swoiście występujące w tkankach nerwowych białko ELAVL2 (znane również jako HuB), były wzbogacone w ekstraktach XRNAX w porównaniu z nieusieciowanymi próbkami kontrolnymi (Ryc. 21A-B). Co więcej, barwienie srebrem ujawniło ogólne wzbogacenie puli białek w próbkach z interfazy poddanych sieciowaniu UV, w porównaniu z próbkami nieusieciowanymi (Ryc. 21A-B). Na tym etapie walidacji potwierdzono, że obie zastosowane metody homogenizacji umożliwiają skuteczne wzbogacenie RBP w ekstraktach XRNAX.



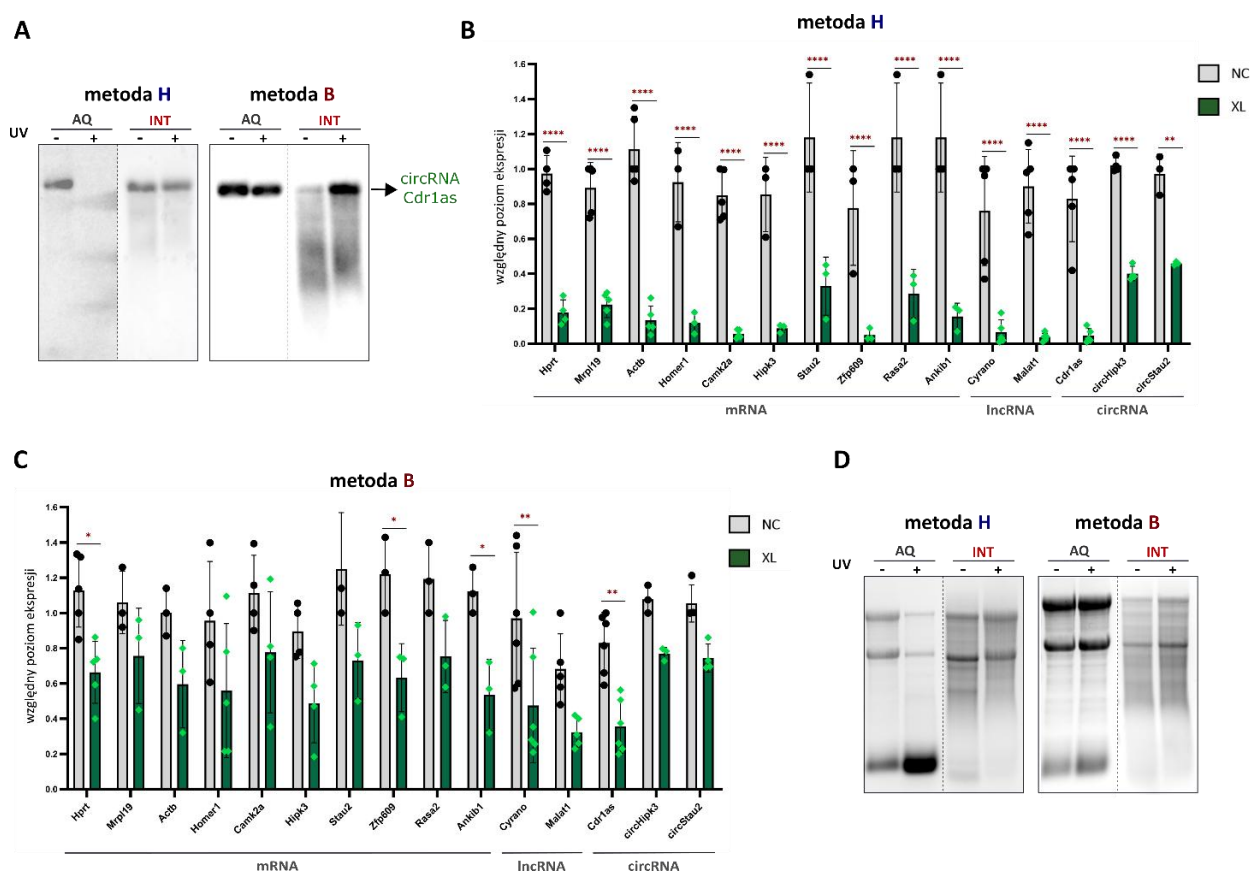
Rycina 21. Wzbogacenie białek wiążących RNA w interfazie po eksperymencie XRNAX.

A. Walidacja metody XRNAX H za pomocą barwienia srebrem i analizy Western blot. Po lewej: barwienie srebrem ekstraktów białkowych uzyskanych z próbek interfazy po naświetlaniu UV (ekstrakt XRNAX) i bez naświetlania UV (próbka kontrolna). Po prawej: analiza Western blot AGO1 i ELAVL2 w próbkach interfazy (INT), tj. w ekstrakcie XRNAX po naświetlaniu UV, w kontroli bez UV, w całym mózgu (INPUT) i w próbkach fazy organicznej (OP). **B.** Walidacja metody XRNAX B za pomocą barwienia srebrem i analizy Western blot została przeprowadzona zgodnie z opisem w punkcie A, z dodatkową analizą białka PTBP2 metodą Western blot.

4.1.2. Ocena względnej ilości RNA w fazie wodnej i w interfazie w procedurze XRNAX

Obserwowane wzbogacenie białek w ekstraktach XRNAX sugerowało, że w interfazie, po sieciowaniu UV, zostanie również przechwycona część transkryptomu związana z tymi białkami. Zgodnie z tym założeniem, analizowano poziomy RNA w próbkach z interfazy (ekstrakty XRNAX) oraz w próbkach z fazy wodnej, stanowiącej pozostałość po procedurze XRNAX (Ryc. 20, panel górny). RNA pochodzące z ekstraktów XRNAX oraz z odpowiadających im faz wodnych naniesiono na denaturujące żele agarozowe i poddano analizie Northern blot w celu detekcji circRNA *Cdr1as* – transkryptu o wysokiej ekspresji w mózgu, znanego z wiązania mikroRNA oraz białka AGO2¹²⁵. Analiza Northern blot wykazała wzbogacenie *Cdr1as* w próbkach XRNAX uzyskanych metodą B (biopulweryzacja), czemu towarzyszył niższy poziom detekcji tego transkryptu w odpowiadającej jej fazie wodnej (Ryc. 22A, prawa strona). Sugeruje to, zgodnie z oczekiwaniami, skuteczne przechwycenie *Cdr1as* w interfazie po naświetlaniu UV. Natomiast w przypadku metody H (homogenizator Dounce), analiza XRNAX wykazała obecność *Cdr1as* zarówno w usieciowanych, jak i nieusieciowanych próbkach z interfazy, jednak nieoczekiwanie transkrypt ten był całkowicie niewykrywalny w usieciowanej próbce z fazy wodnej (Ryc. 22A, lewa strona). Obserwację tę potwierdziły analizy RT-qPCR, które ujawniły spadek poziomu detekcji o 60% do ponad 90% dla circRNA *Cdr1as*, wybranych mRNA oraz kilku testowanych lncRNA w próbkach RNA

z fazy wodnej, przygotowanych metodą XRNAX H i poddanych sieciowaniu UV (Ryc. 22B). Dla porównania, w przypadku homogenizacji metodą B, połączonej z procedurą XRNAX, spadek poziomu RNA w próbkach z fazy wodnej wynosił średnio od 20% do 60%, w zależności od analizowanego transkryptu (Ryc. 22C). Stwierdzono, że zarówno brak *Cdr1as* w fazie wodnej po naświetlaniu UV w procedurze XRNAX poprzedzonej metodą H (Ryc. 22A, lewa strona), jak i ogólnie obniżony poziom RNA w fazie wodnej dla próbek homogenizowanych w homogenizatorze Dounce i naświetlanych UV (Ryc. 22B), mogą być spowodowane wysokim stopniem degradacji RNA (Ryc. 22D, lewa strona). Degradacja ta prawdopodobnie zachodziła podczas etapu sieciowania płynnego homogenatu, na skutek ekspozycji RNA na działanie RNaz uwalnianych z uszkodzonych komórek. Jednocześnie, jakość RNA była zachowana w przypadku biopulweryzacji połączonej z XRNAX (Ryc. 22D, prawa strona). Wskazuje to, że biopulweryzacja jest metodą homogenizacji bardziej odpowiednią i niezawodną dla protokołu XRNAX oraz innych metod wykorzystujących naświetlanie UV tkanki mózgowej do analizy kompleksów RNA-białko, pozwalając na zachowanie fizjologicznie istotnych interakcji.



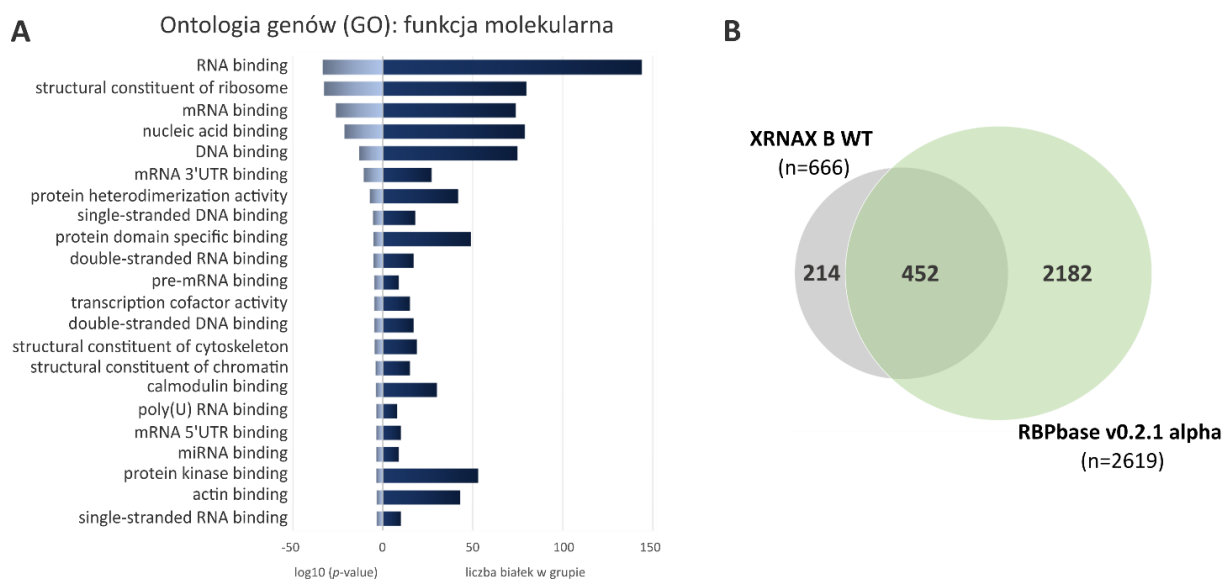
Rycina 22. Wzbogacenie RNA w interfazie z jednoczesnym ubytkiem RNA w fazie wodnej po eksperymencie XRNAX. A. Analiza Northern blot w kierunku detekcji circRNA *Cdr1as* w próbkach interfazy (INT) i próbkach RNA z fazy wodnej (AQ) uzyskanych metodą XRNAX H i XRNAX B oraz

w odpowiednich próbkach kontrolnych niepoddanych działaniu promieni UV. **B.** Metoda XRNAX H: pomiary RT-qPCR wybranych mRNA, lncRNA i circRNA wykonane na matrycy RNA z fazy wodnej po eksperymentach XRNAX (próbki naświetlane UV, XL, zielone słupki) i dla odpowiednich prób kontrolnych bez UV (NC, szare słupki). Metodę $\Delta\Delta C_t$ zastosowano do obliczenia względnego poziomu ekspresji znormalizowanej do transkryptu *circRims2*. Przeanalizowano $n = 3-5$ powtórzeń biologicznych, pojedyncze kropki reprezentują indywidualne powtórzenia. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, n.s.: nieistotne statystycznie (two-way ANOVA). **C.** Metoda XRNAX B: pomiary RT-qPCR dla wybranych mRNA, lncRNA i circRNA wykonane zgodnie z opisem w B. **D.** Próbkę RNA z fazy wodnej (AQ) i interfazy (INT) rozdzielono w 1% żelach agarozowych. RNA uzyskano podczas eksperymentów XRNAX poddanych naświetlaniu UV i z próbek kontrolnych bez naświetlania UV, odpowiednio przy użyciu metod XRNAX H i B.

Dodatkowo, zaobserwowano tendencję do obniżenia poziomu wybranych kolistych RNA, takich jak *circHipk3(2)* oraz *circStau2(2,3,4,5)*, w fazie wodnej po naświetlaniu UV (XL) w porównaniu z nieusieczowaną próbką kontrolną (NC) w procedurze XRNAX B (Ryc. 22C). Obserwacja ta może sugerować, że te cząsteczki RNA, których zdolność do interakcji z białkami nie została dotychczas w pełni scharakteryzowana, są zdolne do tworzenia kompleksów z białkami. Wynik ten wskazuje również, że metoda XRNAX z wykorzystaniem biopulweryzacji może być użytecznym narzędziem do oceny zdolności różnych biotypów RNA do wiązania białek.

4.2. Wysokoprzepustowa walidacja protokołu XRNAX w mózgu zdrowej myszy

Aby systematycznie scharakteryzować RBPom mózgu dorosłych myszy WT (samce, 13-15 tygodni), wykorzystano analizę LC-MS/MS do profilowania składu białkowego ekstraktów XRNAX (Rycina 20, dolny panel). W tym celu ekstrakty XRNAX poddano częściowemu trawieniu trypsyną, a następnie oczyszczaniu cząsteczek RNA usieczonych z peptydami przy użyciu kolumn krzemionkowych (zgodnie z oryginalnym protokołem XRNAX²⁰⁷). Założeniem tego etapu oczyszczania było wzbogacenie białek usieczonych z RNA i ograniczenie pomiarów MS do białek RBP²⁰⁷. W próbach XRNAX B zidentyfikowano łącznie sześćset sześćdziesiąt sześć białek²²⁸. Analiza terminów GO dla tych białek (Ryc. 23A) oraz porównanie ich z zestawem znanych RBP z bazy *RBPbase v0.2.1. alpha* (Ryc. 23B) potwierdziła, że większość z nich była rozpoznana jako RBP.



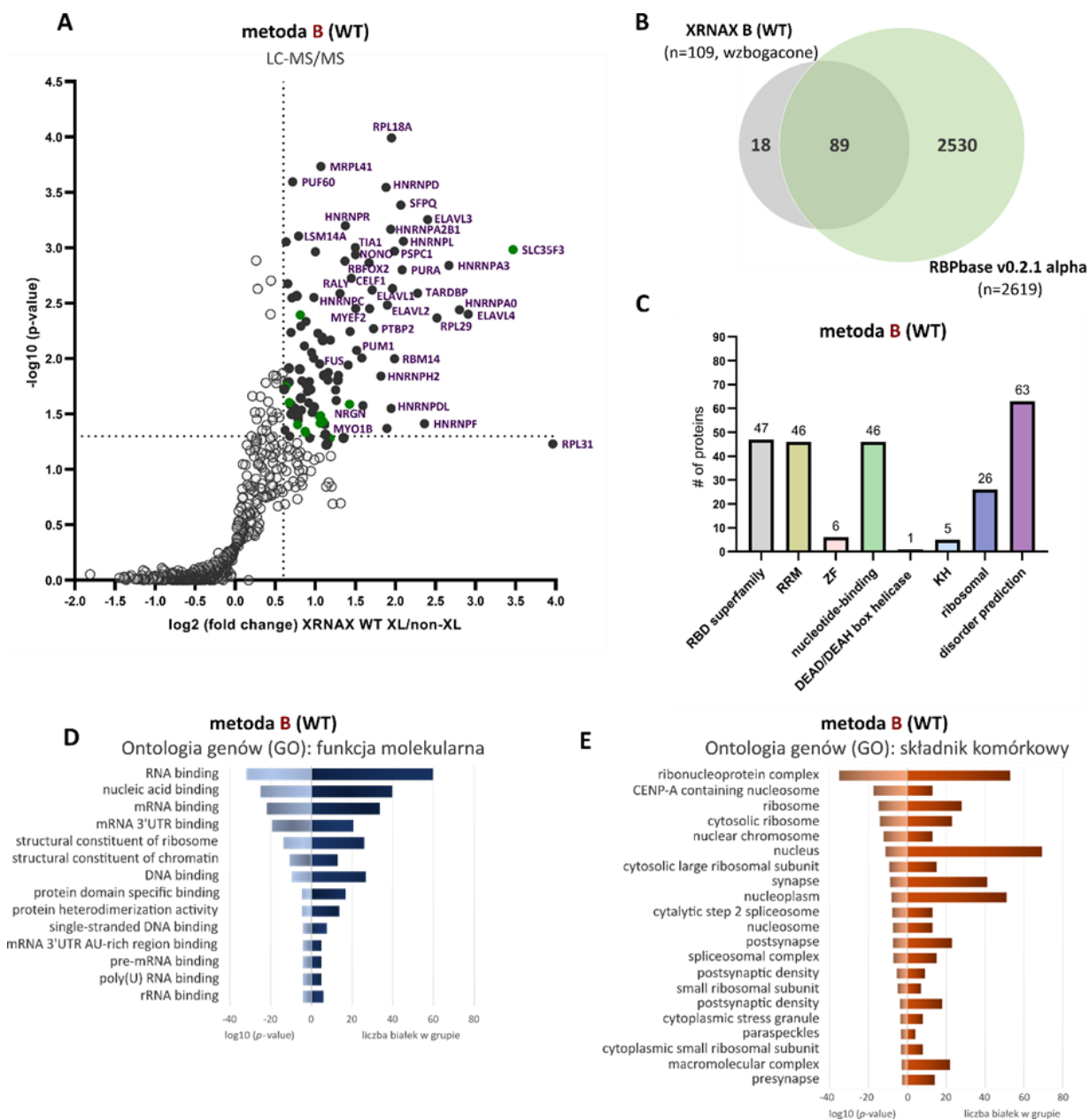
Rycina 23. Analiza białek wykrytych w interfazie po procedurze XRNAX (metoda B) za pomocą pomiaru LC-MS/MS. A. Analiza ontologii genów dla funkcji molekularnych (DAVID) dla $n = 666$ białek z interfazy zidentyfikowanych w pomiarach LC-MS/MS w próbach XRNAX B. Wartość p GO TERM $< 0,005$, tło: proteom całego mózgu myszy, $n = 3803$ białek. **B.** Diagram Venn'a porównujący $n = 666$ białek interfazowych wykrytych w mózgu myszy metodą XRNAX B ze znanymi mysimi RBP zdeponowanymi w bazie danych RBPbase v0.2.1 alfa ($n = 2619$).

4.2.1. Charakterystyka RBP wzbogaconych po procedurze XRNAX (metoda B)

Po ocenie skuteczności izolacji RBP z interfazy przy użyciu protokołu XRNAX z homogenizacją metodą B, analizę skoncentrowano na białkach wzbogaconych w uzyskanych ekstraktach. Spośród 666 zidentyfikowanych białek, dla 109 stwierdzono istotne wzbogacenie w ekstraktach XRNAX poddanych sieciowaniu UV (XL) w porównaniu z nieusieciowaną próbką kontrolną (non-XL) (Ryc. 24A). Około 80% białek, które uległy specyficznemu wzbogaceniu w procedurze XRNAX, było już wcześniej sklasyfikowanych jako RBP (w oparciu o dane z bazy RBPbase, Ryc. 24B) i stanowiło znaczną frakcję wszystkich białek zawierających znane, kanoniczne domeny wiążące RNA (RBD; Ryc. 24C). Analiza GO pod kątem funkcji molekularnej wykazała istotne wzbogacenie w ekstraktach XRNAX grup białek o funkcji wiązania RNA (w tym specyficznie mRNA), białek będących strukturalnymi składnikami rybosomu oraz innych białek zaangażowanych w wiązanie kwasów nukleinowych (Ryc. 24D).

Ponieważ procedura XRNAX pozwala na wzbogacanie RBP wiążących zarówno mRNA, jak i transkrypty niepoliadenylowane, spodziewano się licznej reprezentacji białek rybosomalnych w wynikach analizy LC-MS/MS. Analiza GO w kategorii „komponent

komórkowy” dla zbioru danych XRNAX wykazała istotne wzbogacenie białek jądrowych (n = 66), komponentów rybosomalnych, a także regulatorów splicingu oraz białek specyficznych dla neuronów, takich jak białka synaptyczne (n = 43) (Ryc. 24E).



Rycina 24. Identyfikacja białek związanych z RNA w mózgu myszy przy użyciu XRNAX (metoda B). **A.** Wykres *volcano* przedstawiający stopień zmiany (ang. *fold-change*, FC) białek zidentyfikowanych w ekstraktach XRNAX (XL) w porównaniu do nieusieciowanych (non-XL) próbek kontrolnych. Zarówno ekstrakty XRNAX, jak i próbki kontrolne z interfazy poddano oczyszczaniu na kolumnach krzemionkowych w celu wzbogacenia peptydów związanych z RNA oraz pomiarom LC-MS/MS. n = 3 powtórzeń biologicznych, tj. indywidualne pomiary MS z różnych eksperymentów XRNAX B. Wypełnione kółka - białka wzbogacone XRNAX B, $\log_2 FC > 0,6$ i $p < 0,05$. Potencjalnie nowi kandydaci RBP są oznaczeni na zielono. Otwarte kółka — wyniki nieistotne statystycznie. **B.** Diagram Venn’a porównujący n = 109 białek

wzbogaconych w XRNAX B w mózgu myszy WT ze wszystkimi znanymi mysimi RBP zdeponowanymi w *RBPbase* v0.2.1 *alfa* (n = 2619). C. Liczba białek z kanonicznymi RBD i przewidywanymi regionami nieuporządkowanymi wykryta w zestawie białek wzbogaconym metodą XRNAX B ($\log_2$ FC XL/non-XL > 0,6, $p < 0,05$). RBD, domena wiążąca RNA; RRM, motyw rozpoznający RNA; ZF, domena palca cynkowego; KH, domena homologiczna K. D. Analiza funkcji molekularnych GO (DAVID) białek zmierzonych w LC-MS/MS po XRNAX B (n = 109 białek wzbogaconych); $p < 0,005$; tło -proteom z całego mózgu myszy, n = 3803 białka. E. Analiza składników komórkowych GO (DAVID) dla wyników LC-MS/MS po XRNAX B (n = 109 białek wzbogaconych). Termin GO $p < 0,005$; tło jak opisano w (D).

Wśród białek synaptycznych zidentyfikowanych za pomocą protokołu XRNAX wykryto białka rybosomalne, białka z rodziny hnRNP oddziałujące z mRNA oraz kilka białek zaangażowanych w uwalnianie neuroprzekazników i związanych z błoną pęcherzyków transportowych, takich jak SYNGR3, RAB3A, SLC1A2, SLC1A3 czy SLC6A1²²⁸. Funkcja niektórych z tych białek nie jest bezpośrednio związana z wiązaniem RNA, a białka te nie są sklasyfikowane jako RBP w aktualnej bazie *RBPbase*; przykładami są transporter glutaminianu SLC1A2 oraz neurogranina (NRGN). Warto zaznaczyć, że oba te białka zidentyfikowano jako potencjalnie wiążące RNA również w niedawno opublikowanym badaniu, w którym wykorzystano metodę pCLAP²⁰¹. Szczegółowej analizie poddano również najliczniejszą grupę białek wzbogaconych w procedurze XRNAX, tj. białka jądrowe. W tej grupie wszystkie zidentyfikowane białka (n = 66) były sklasyfikowane jako RBP w aktualnej wersji bazy *RBPbase*, a wśród nich znajdowały się represory transkrypcji (np. CIRBP i MYEF2), aktywatory transkrypcji (np. PURA i SFPQ), białka zaangażowane w splicing mRNA oraz białka charakterystyczne dla różnych kompartmentów jądrowych²²⁸. Łącznie, wyniki te sugerują, że białka synaptyczne, takie jak SLC1A2 i NRGN, mogą pełnić dotychczas nieznane funkcje związane z interakcjami z RNA, na przykład uczestnicząc w lokalnej regulacji ekspresji genów na poziomie synaps. Alternatywnie, możliwe jest, że funkcja tych białek jest modulowana przez RNA, które wpływa na ich stabilność lub aktywność. Jednoczesne wzbogacenie licznych, dobrze scharakteryzowanych RBP jądrowych potwierdza wysoką specyficzność protokołu XRNAX w identyfikacji rzeczywistych interakcji RNA-białko w materiale biologicznym. Odkrycia te podkreślają zatem potencjał zastosowanej metodyki do poszerzania wiedzy o RBPomie mózgu i odkrywania niekanonicznych ról białek w procesach neuronalnych.

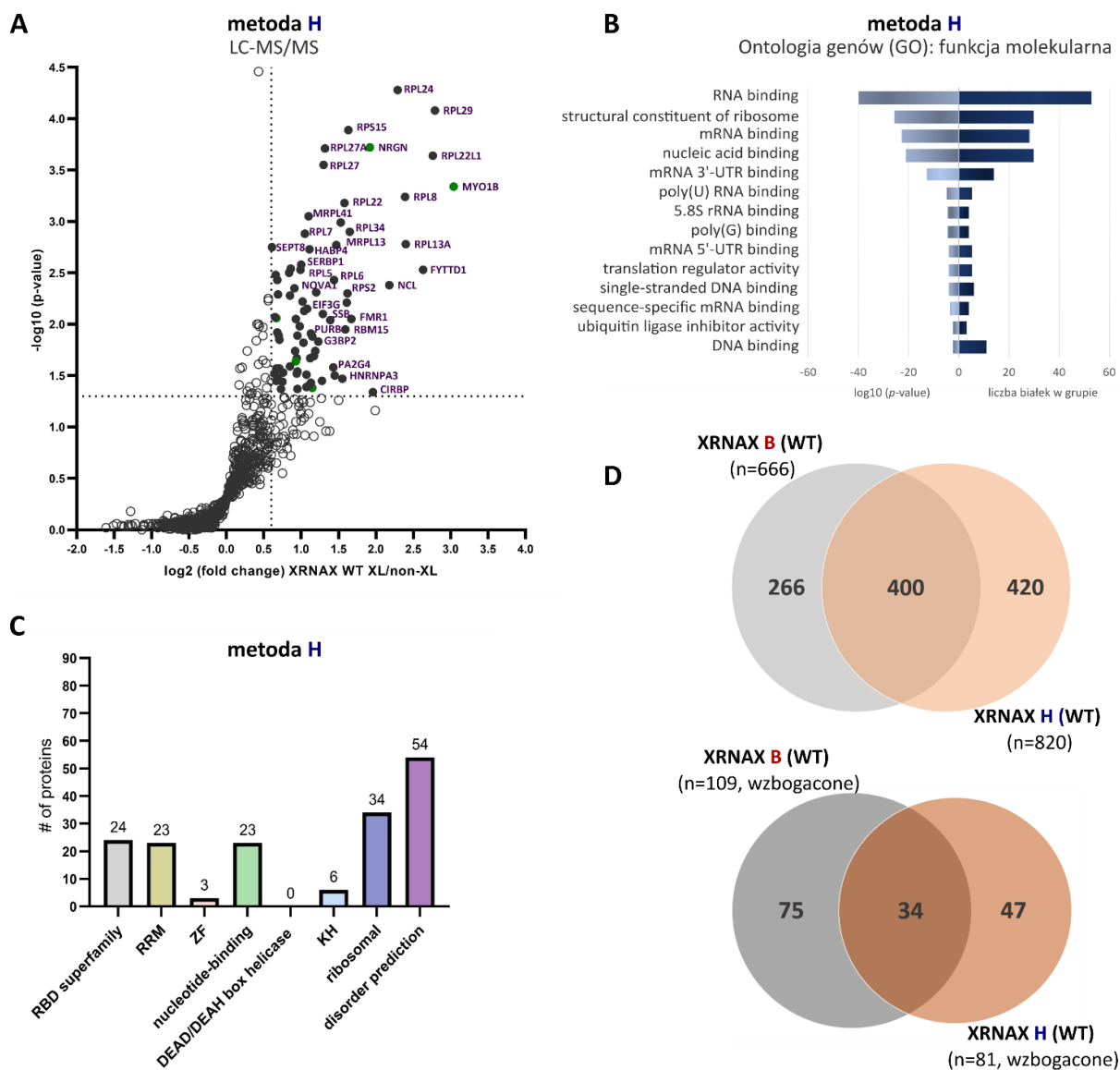
Dodatkowo, przeanalizowano struktury białek oraz regiony białkowe odpowiadające peptydom zidentyfikowanym metodą spektrometrii mas w ekstraktach XRNAX. Projekcja peptydów zidentyfikowanych w procedurze XRNAX na struktury RBP zawierających

kanoniczne RBD²³¹ pokazuje, że peptydy wykryte za pomocą spektrometrii mas lokalizują się w obrębie RBD, takich jak domeny RRM czy ZF, lub w regionach bezpośrednio z nimi sąsiadujących²²⁸.

Przedstawione analizy proteomiczne potwierdziły skuteczność i specyficzność metody XRNAX, z wykorzystaniem homogenizacji metodą B, w izolacji RBP z tkanki mózgowej. Potwierdzeniem tej efektywności była identyfikacja peptydów pochodzących z białek specyficznie oddziałujących z RNA. Ponadto, analiza jednej z grup RBP najsilniej wzbogaconych w wyniku zastosowania procedury XRNAX, białek synaptycznych, pozwoliła zidentyfikować białka, które dotychczas nie były klasyfikowane jako RBP, lecz wykazują potencjał wiązania RNA.

4.2.2. Analiza białek wykrytych w interfazie oraz RBP wzbogaconych po procedurze XRNAX H

W celu pełniejszego porównania wpływu obu badanych metod homogenizacji na efektywność izolacji kompleksów RNA-białko, przeprowadzono dodatkowo analizę LC-MS/MS dla białek wyizolowanych przy użyciu protokołu XRNAX H. W procedurze tej zidentyfikowano całkowitą liczbę białek ($n = 820$) porównywalną z uzyskaną dla protokołu XRNAX B. Jednakże, spośród nich jedynie 81 białek wykazało statystycznie istotne wzbogacenie w usieciowanych próbkach XRNAX w porównaniu z odpowiednimi nieusieciowanymi próbkami kontrolnymi (Ryc. 25A). Ten zbiór istotnie wzbogaconych białek scharakteryzowano również pod kątem obecności RBD, potwierdzając, że wzbogacona grupa zidentyfikowanych białek to głównie RBP (Ryc. 25B-C). Stwierdzono jednak, że profil tych 81 RBP pokrywał się tylko częściowo z profilem RBP istotnie wzbogaconych w procedurze XRNAX B (Ryc. 25D). Obserwacje te wskazują, że metoda homogenizacji tkanki, poprzedzająca etap sieciowania UV, znacząco wpływa na profil identyfikowanych interakcji RNA-białko.



Rycina 25. Wysokoprzepustowa walidacja wyników XRNAX poprzedzonych homogenizacją typu H w mózgu myszy WT. **A.** Wykres *volcano* pokazujący istotnie wzbogacone RBP z próbek po sieciowaniu UV (XL) względem próbek nienaświetlanych (nie-XL) uzyskanych metodą XRNAX H. $n = 3$ powtórzenia biologiczne (ekstrakty XRNAX z 3 różnych mózgów) poddano pomiarom MS. Wypełnione kółka oznaczają białka wzbogacone po XRNAX z $\log_2 \text{FC} > 0,6$, wartość $p < 0,05$. Potencjalnie nowi kandydaci RBP są oznaczeni na zielono. Otwarte kółka oznaczają nieistotne statystycznie wyniki. **B.** Analiza GO (DAVID) funkcji molekularnych dla $n = 81$ białek wzbogaconych, zidentyfikowanych metodą LC-MS/MS w metodzie XRNAX H, wartość $p < 0,005$, tło: proteom z całego mózgu myszy, $n = 5509$ białek. **C.** Liczba białek z kanonicznymi domenami wiążącymi RNA i przewidywanymi regionami nieuporządkowanymi w zestawie białek wzbogaconych metodą XRNAX H ($\log_2 \text{FC XL/non-XL} > 0,6$). **D.** Diagram Venn'a dla wyników LC-MS/MS porównujących 2 zestawy danych: wszystkie wykryte białka XRNAX uzyskane z próbek interfazy metodą XRNAX B ($n = 666$) i metodą XRNAX H ($n = 820$) (góra). Diagram Venn'a dla białek wzbogaconych metodą XRNAX, $\log_2 \text{FC} > 0,6$ i wartość $p < 0,05$, w mózgach typu dzikiego metodą B i metodą H, odpowiednio $n = 109$ i $n = 81$ (dół).

Podsumowując, zastosowanie protokołu XRNAX pozwoliło na identyfikację specyficznych dla mózgu RBP oraz peptydów pochodzących z domen bezpośrednio zaangażowanych w wiązanie cząsteczek RNA. Biopulweryzacja (metoda B) zamrożonej tkanki, zastosowana przed etapem sieciowania UV, okazała się metodą optymalną do izolacji kompleksów RNA-białko z mózgu. Przemawia za tym fakt, iż skutkowała ona mniejszą degradacją RNA, pozwoliła na uzyskanie reprezentatywnego profilu RBP, a także stwarza większe prawdopodobieństwo zachowania rzeczywistych, natywnych interakcji RNA-białko *in vivo*.

4.3. Określenie zmian jakościowych w interakcjach RNA-białko w mózgu z defektem mielinizacji z zastosowaniem XRNAX

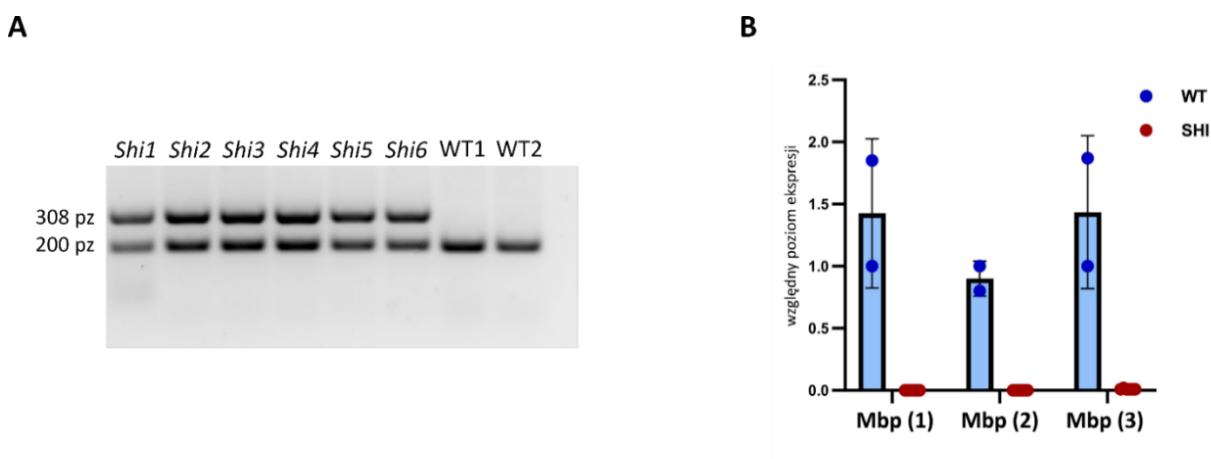
Mielina to wielowarstwowa osłonka białkowo-lipidowa otaczająca aksony komórek nerwowych. Główną funkcją osłonki mielinowej jest umożliwienie szybkiego przewodzenia impulsów nerwowych, jednak pełni ona również istotne role we wsparciu metabolicznym i ochronie mechanicznej aksonów. Niedawne badania wykazały także, że mielina wpływa na utrzymanie długoterminowej integralności oraz precyzyjnych wzorców aktywności aksonalnej⁶⁶. Deficyty mieliny w ośrodkowym układzie nerwowym prowadzą do poważnych zaburzeń funkcjonalnych u ludzi i zwierząt⁶⁸, w tym chorób demielinizacyjnych, jak np. stwardnienie rozsiane.

W niniejszej pracy, opierając się na wcześniejszej pomyślnej adaptacji i walidacji protokołu XRNAX dla tkanki mózgowej myszy typu dzikiego (co stanowiło realizację pierwszego celu szczegółowego), dokonano charakterystyki globalnego profilu interakcji RNA-białko w mózgu myszy z wrodzonym deficytem mieliny. Do tego celu wykorzystano model myszy *shiverer* (*Shi*) oraz zoptymalizowaną metodę XRNAX, połączoną z homogenizacją tkanki mózgowej metodą B i wysokoprzepustową analizą LC-MS/MS (zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 20), aby scharakteryzować profil białek wiążących RNA w mózgach dorosłych samców tych myszy. Zastosowanie tej zoptymalizowanej metody w kontekście patologii OUN jest drugim celem szczegółowym pracy, który zakładał wykorzystanie XRNAX do identyfikacji różnic w RBPomie mózgu myszy z defektem mielinizacji, co mogłoby rzucić nowe światło na molekularne podstawy tej neuropatologii. Wybór modelu myszy *shiverer*, charakteryzującego się mutacją w genie *Mbp* (ang. *myelin basic protein*) i poważnymi zaburzeniami mielinizacji w OUN, stworzył unikalną możliwość zbadania, jak tak ten fundamentalny defekt wpływa na globalny krajobraz oddziaływań RNA-białko i czy zidentyfikowane zmiany mogą wskazywać na nowe mechanizmy kompensacyjne lub patogenne. Poniższe wyniki przedstawiają szczegółową analizę jakościową interakcji RNA-

białko w mózgach tych myszy, ze szczególnym uwzględnieniem białek wykazujących zmieniony profil wiązania RNA w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

4.3.1. Potwierdzenie mutacji *Mbp* w mózgu myszy *shiverer*

Przed wykonaniem eksperymentu XRNAX, potwierdzono mutację *Mbp* u myszy *shiverer* na poziomie DNA poprzez genotypowanie (Ryc. 26A) oraz na poziomie RNA poprzez analizę mRNA *Mbp* metodą RT-qPCR z trzema różnymi parami starterów (Ryc. 26B).



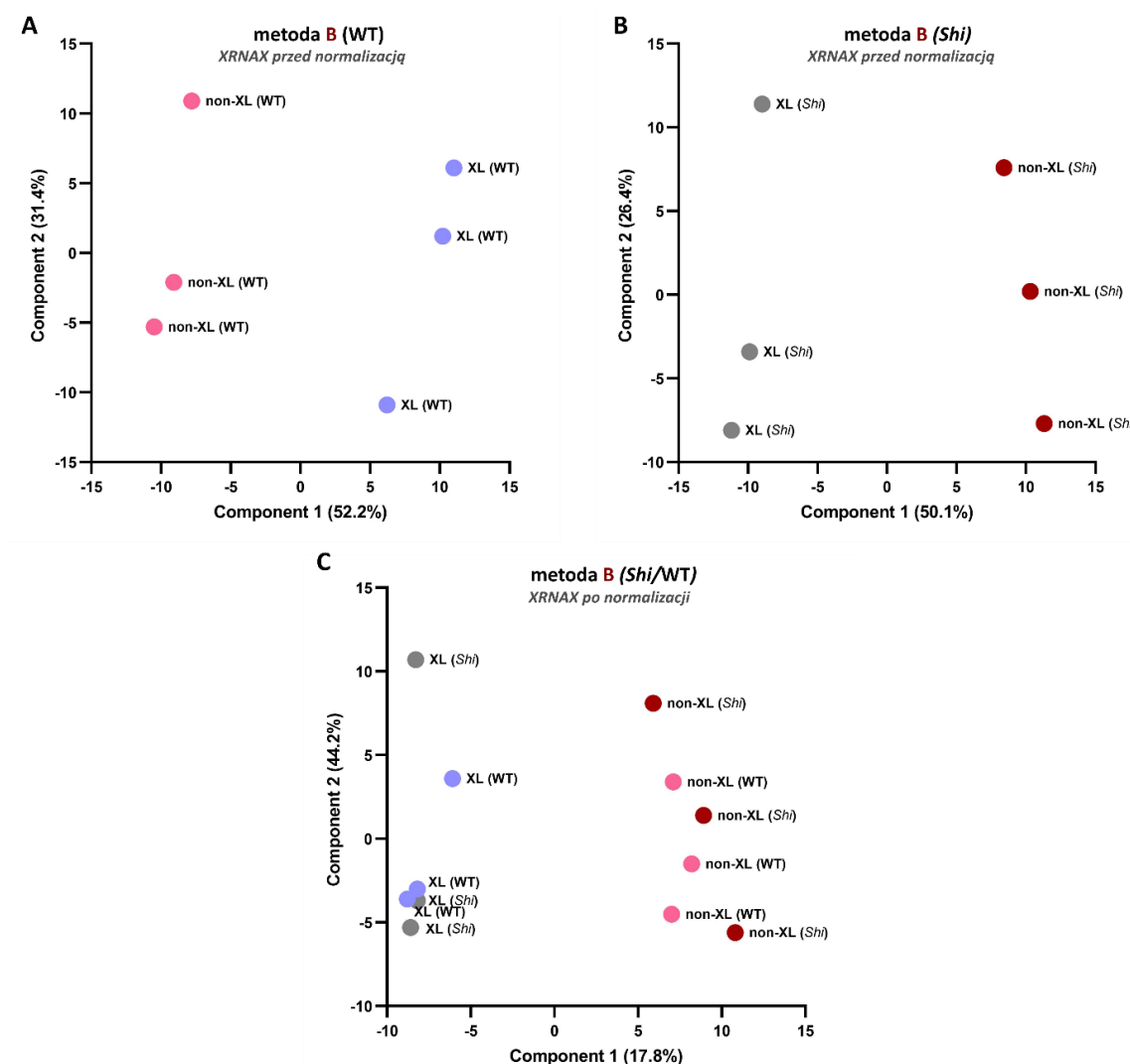
Rycina 26. Walidacja podstawowego białka mieliny (ang. *myelin basic protein*, MBP)

u myszy *shiverer*. **A.** Wyniki genotypowania metodą PCR dla myszy *shiverer* przeprowadzonego na DNA wyekstrahowanym z biopsji ucha. Górny produkt (308 pz) wskazuje mutację w *locus Mbp*, a dolny (200 pz) służył jako wewnętrzna kontrola pozytywna dla PCR. **B.** Analiza względnego poziomu ekspresji mRNA *Mbp* u myszy *shiverer* w porównaniu do mózgu myszy typu dzikiego (RT-qPCR przeprowadzona z trzema różnymi zestawami starterów). Przeanalizowano n = 2 powtórzenia biologiczne dla myszy WT i n = 6 powtórzeń biologicznych dla myszy *shiverer*.

4.3.2. Charakterystyka RBP wzbogaconych po XRNAX w mózgu *shiverer*

Analiza głównych składowych (ang. *principal component analysis*, PCA) danych LC-MS/MS uzyskanych z procedury XRNAX B (wykorzystującej proszkowanie tkanki mózgowej) wykazała wyraźne rozdzielenie próbek poddanych naświetlaniu UV (XL) od próbek kontrolnych niepoddanych temu procesowi (non-XL), zarówno dla mózgów myszy typu dzikiego (Ryc. 27A), jak i myszy *shiverer* (Ryc. 27B). W celu dokładniejszego porównania, dane LC-MS/MS pochodzące z tych dwóch eksperymentów (XRNAX B na mózgach myszy WT oraz *shiverer*) przetworzono wspólnie w oprogramowaniu MaxQuant (zgodnie ze szczegółowym opisem zawartym w opublikowanej pracy²²⁸). Analiza PCA tych połączonych i znormalizowanych danych (Ryc. 27C) również potwierdziła wyraźne rozdzielenie próbek na grupy XL i non-XL. Co więcej, ta analiza wykazała, że próbki pochodzące z mózgów myszy WT i *shiverer* tworzyły wspólne klastry w zależności od tego, czy zostały poddane sieciowaniu

UV, czy też nie, sugerując, że efekt sieciowania był dominującym czynnikiem różnicującym próbki w tej analizie.



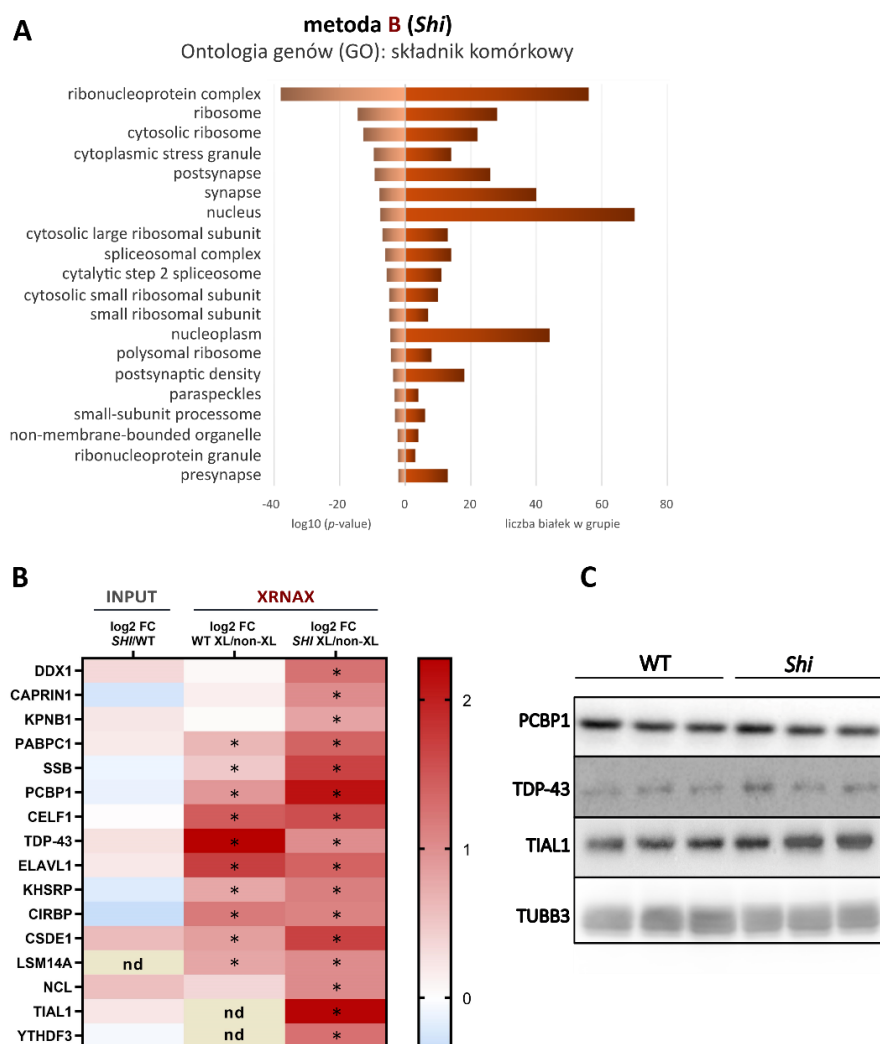
Rycina 27. Próbkę XRNAX w mózgu WT i *Shi* naświetlane UV i kontrolne (nienaświetlane) grupują się oddzielnie po spektrometrii masowej. Analiza głównych składowych (PCA) danych LC-MS/MS z metody XRNAX B dla próbek XL i nietraktowanych UV (non-XL) w mózgu WT (A), w mózgu *shiverer* (B) oraz dla obu zestawów danych po normalizacji (C).

W próbkach z interfazy po XRNAX B w mózgach myszy *shiverer* zidentyfikowano łącznie 633 białka (Ryc. 28A;²²⁸) z czego 125 białek było wzbogacone w porównaniu z próbkami kontrolnymi bez naświetlania UV. Zidentyfikowane białka częściowo pokrywały się z tymi, które wykryto w mózgu myszy typu dzikiego (Ryc. 28B). Podobnie jak w eksperymentach XRNAX przeprowadzonych na mózgu WT, XRNAX na tkankach mózgowych myszy *Shi* był specyficzny względem odzyskiwania białek RBP (Ryc. 28 C-D).

4.3.3. Porównanie białek RBP zaangażowanych w formowanie cytoplazmatycznych granul wzbogaconych po XRNAX w mózgu zdrowym z XRNAX w mózgu *shiverer*

Realizując założenia pracy dotyczące wykorzystania zoptymalizowanego protokołu XRNAX do identyfikacji zmian w oddziaływaniach RNA-białko w kontekście patologii układu nerwowego, postanowiono zwrócić szczególną uwagę na te grupy RBP, które wykazywały najbardziej znaczące różnice w oddziaływaniu z transkryptomem pomiędzy mózgami myszy *shiverer* a zwierzętami kontrolnymi. W tym celu wykonano dodatkowe analizy GO pod kątem komponentów komórkowych (Ryc. 29) i procesów biologicznych (Ryc. 30) dla białek istotnie wzbogaconych po XRNAX w mózgach *Shi* względem niesieciowanych prób kontrolnych (n = 125).

Analiza GO pod kątem składników komórkowych wykazała, że kategoria funkcjonalna związana z tworzeniem cytoplazmatycznych granul stresu (ang. *cytoplasmic stress granules*) reprezentowała termin istotnie statystycznie wzbogacony w puli białek zidentyfikowanych w ekstraktach XRNAX z mózgów myszy *shiverer* (Ryc. 29A). Porównanie wyników XRNAX uzyskanych z mózgów myszy *shiverer* i WT ujawniło, że większość RBP związanych z granulami stresu, takich jak DDX1, CAPRIN1, PABPC1 oraz PCBP1, wykazywała silniejsze wzbogacenie (wyższe wartości $\log_2$ FC XL/non-XL) w mózgach *shiverer* niż w mózgach WT (Ryc. 29B). Co istotne, całkowity poziom tych białek w ekstraktach komórkowych (*input*) nie różnił się znacząco pomiędzy mózgami *shiverer* a WT (Ryc. 29B, *input* i 29C). Wyniki te sugerują, że protokół XRNAX umożliwia detekcję jakościowych zmian w profilu wiązania RNA przez RBP, które niekoniecznie korelują ze zmianami w całkowitym poziomie ekspresji tych białek.



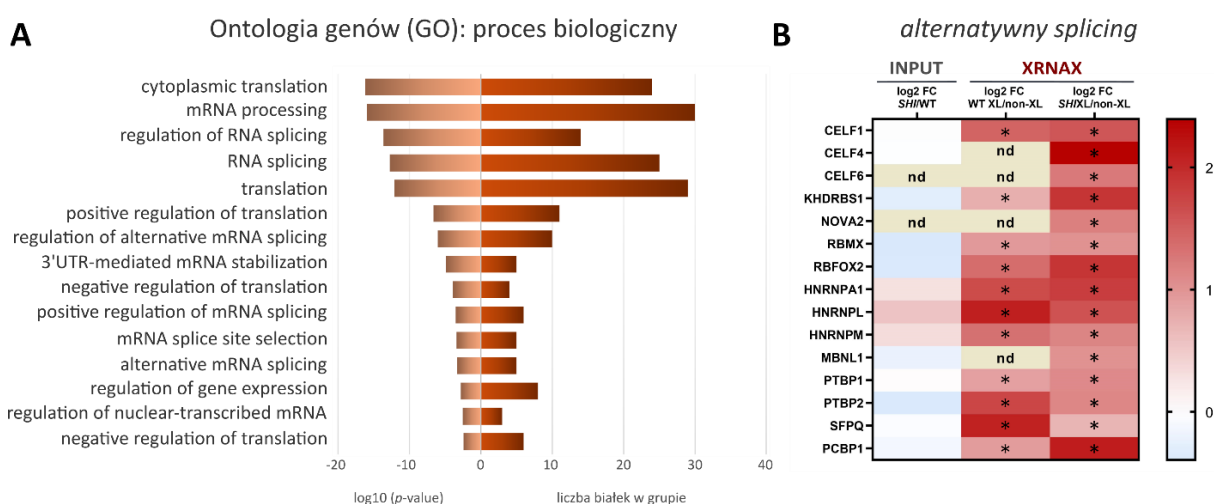
Rycina 29. Wzbogacenie białek zaangażowanych w formowanie cytoplazmatycznych granul u myszy *shiverer* po XRNAX. **A.** Analiza GO pod kątem składników komórkowych wykonana przy użyciu DAVID dla $n = 125$ białek wzbogaconych po XRNAX dla myszy *shiverer*. GO term $p < 0,005$; tło $n = 3803$ białek, *input* - ekstrakty z całej tkanki mózgu. **B.** Mapa cieplna (ang. *heat map*) dla reprezentacji RBP zaangażowanych w formowanie granulek stresu i granulek rybonukleoproteinowych (ang. *ribonucleoprotein granule*). Pierwsza kolumna przedstawia porównanie pomiarów LC-MS/MS z próbek całego mózgu (*input*) myszy *shiverer* (*Shi*) i typu dzikiego (WT). Druga i trzecia kolumna przedstawiają wartości log2 FC dla białka pomiędzy XRNAX (XL) i kontrolą (non-XL) kolejno w mózgu WT i *Shi* (oba przetworzone metodą B). Dla każdej kolumny przeanalizowano $n = 3$ powtórzenia biologiczne. Gwiazdka wskazuje na istotnie wzbogacone białka w zestawach danych XRNAX metodą LC-MS/MS ($\log_2 FC > 0,6$, $p < 0,05$). **C.** Analiza Western blot białek PCBP1, TDP-43 i TIAL1 uzyskanych z ekstraktów białkowych całego mózgu (*input*) WT i *shiverer*.

W celu potwierdzenia obserwacji dotyczących zmienionego wzoru interakcji białka PCBP1 (ang. *poly(rC)-binding protein 1*) z RNA w mózgach myszy *shiverer* względem WT, przeprowadzono analizy walidacyjne. Analiza immunofluorescencyjna potwierdziła, że PCBP1 tworzy liczne wewnątrzkomórkowe ogniska (inkluzje), szczególnie widoczne

w komórkach mszystych hipokampa. Formowanie się tych inkluzji które kolokalizowały z RNA, obserwowane było już na wczesnym etapie rozwoju zwierzęcia (w stadium P12) przed pełną manifestacją objawów neurologicznych. Ilość inkluzji PCBP1 była większa u zwierząt dorosłych, które wykazują postępujące symptomy neurologiczne, w tym drżenie i napady padaczkowe. Wskazuje to na potencjalną patologiczną agregację PCBP1 w hipokampie, która może zaburzać funkcje tego białka i być powiązana z fenotypem myszy *shiverer*. Bardziej szczegółowe dane na temat roli i zachowania PCBP1 w mózgu myszy *shiverer* zostały dostarczone przez dr Weronikę Wendlandt-Stanek z Zakładu Niekodujących RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, a wyniki dla tych badań, zostały zaprezentowane w opublikowanej pracy Sztachera i inni²²⁸.

4.4. Analiza alternatywnego splicingu genów regulowanych przez MBNL1 w mózgu z deficytem mieliny

Analiza GO pod kątem procesów biologicznych dla białek zidentyfikowanych metodą XRNAX B w mózgu myszy *shiverer* ujawniła obecność licznych RBP zaangażowanych w proces alternatywnego splicingu (Ryc. 30A). Zaobserwowano, że niektóre z tych białek, takie jak hnRNPA1, KHDRBS1 (znane również jako SAM68), PTBP1 czy RBFOX2, wykazywały wyższy stopień wzbogacenia (wyrażony jako stosunek sygnału w próbkach poddanych sieciowaniu UV [XL] do sygnału w próbkach kontrolnych niepoddanych sieciowaniu [non-XL]) w mózgu myszy *shiverer* w porównaniu do mózgu myszy WT. Z kolei inne białka, na przykład hnRNPL, charakteryzowały się odwrotnym trendem, wykazując większą efektywność izolacji w ramach protokołu XRNAX w mózgu myszy WT (Ryc. 30B).



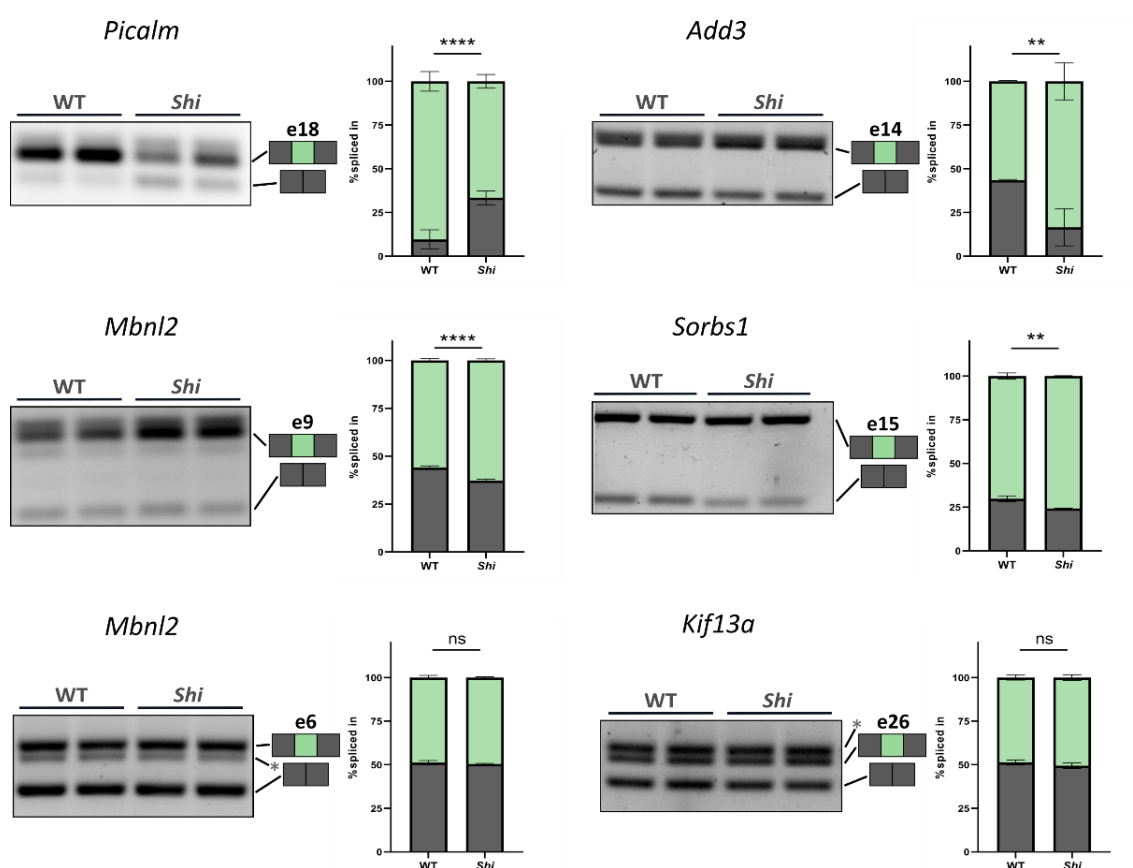
Rycina 30. Wzbogacenie białek regulujących alternatywny splicing u myszy *shiverer* po XRNAX. A. Analiza GO dla białek wzbogaconych po XRNAX (n = 125) z mózgu *Shi* pod kątem zaangażowania w procesy biologiczne wykonana przy użyciu DAVID. GO term $p < 0,005$; tło n = 3803 białek, *input* - ekstrakty

z całej tkanki mózgu. **B.** Mapa cieplna dla reprezentacji RBP regulujących alternatywny splicing RNA. Pierwsza kolumna przedstawia porównanie pomiarów LC-MS/MS z próbek całego mózgu (*input*) myszy *shiverer* i WT. Druga i trzecia kolumna przedstawiają wartości $\log_2$ FC dla białka pomiędzy XRNAX (XL) i kontrolą (non-XL) kolejno w mózgu WT i *Shi* (oba przetworzone metodą B). Dla każdej kolumny przeanalizowano $n = 3$ powtórzenia biologiczne. Gwiazdka wskazuje na istotnie wzbogacone białka w zestawach danych XRNAX metodą LC-MS/MS ($\log_2$ FC > 0,6, $p < 0,05$).

Aby zbadać, czy białka zaangażowane w alternatywny splicing odgrywają zróżnicowaną rolę w generowaniu izoform mRNA w mózgach myszy *shiverer* w porównaniu do mózgów typu dzikiego, do dalszych badań walidacyjnych wytypowano białko MBNL1 (ang. *Muscleblind-like protein*). Kluczowym, choć nie jedynym, czynnikiem decydującym o wyborze MBNL1 był jego potencjalnie odmienny profil interakcji z RNA: silne wzbogacenie w ekstraktach XRNAX B z mózgów myszy *shiverer*, przy jednoczesnym braku detekcji tego białka w analogicznych ekstraktach z mózgów WT. Ta obserwacja sugerowała, że w warunkach defektu mielinizacji MBNL1 może być odmiennie rekrutowane do kompleksów RNA-białko, a jego dostępność do wiązania RNA może ulegać zmianie, co potencjalnie wpływa na regulację alternatywnego splicingu jego genów docelowych. Ponadto białko MBNL1 jest dobrze zbadane w kontekście dystrofii miotonicznej²³². M.in. wykazano, że sekwestracja MBNL1 przez RNA zawierające toksyczne ekspansje trójnukleotydów prowadzi do zaburzeń splicingu wielu genów. Podobne dysfunkcje aktywności MBNL1 odnotowano również w odniesieniu do nowotworów^{233,234}. Co istotne dla niniejszych badań, MBNL1 jest opisany jako regulator rozwoju i funkcji komórek nerwowych, w tym oligodendrocytów – komórek odpowiedzialnych za produkcję mieliny, których dysfunkcja leży u podstaw fenotypu myszy *shiverer*^{235–237}. MBNL1 występuje zarówno w jądrze komórkowym, jak i cytoplazmie, gdzie pełni zróżnicowane funkcje. Wykazano, m.in., że jest zaangażowane w alternatywny splicing pre-mRNA²³⁸, regulację poliadenylacji²³⁹, a także lokalizację i translację mRNA²⁴⁰. Ta ostatnia funkcja jest szczególnie interesująca, biorąc pod uwagę potrzebę precyzyjnego transportu i translacji mRNA kodujących białka mieliny w wypustkach oligodendrocytów. W kulturach neuronów wykazano ponadto, że cytoplazmatyczny MBNL1 wpływa na morfogenezę i wzrost wypustek nerwowych²⁴¹. Zaburzenia w funkcjonowaniu MBNL1, np. poprzez jego nieprawidłową lokalizację lub zmienioną aktywność wiązania RNA, mogą więc prowadzić do szerokiego spektrum defektów na poziomie molekularnym i komórkowym, potencjalnie przyczyniając się do obserwowanych zaburzeń mielinizacji.

W niniejszej pracy MBNL1 zostało zidentyfikowane jako białko o zmienionym profilu oddziaływań z RNA w mózgach myszy *shiverer* w porównaniu do mózgów WT. Hipotezą

badawczą było, że wykryta zmiana może wpływać na procesy alternatywnego splicingu regulowane przez to białko (Ryc. 30B). Na podstawie opublikowanych danych HITS-CLIP²³⁹ dla MBNL1 oraz innych prac walidujących eksperymentalnie geny i konkretne eksony regulowane przez MBNL1 w procesie alternatywnego splicingu w tkankach nerwowych^{242–244}, wybrano i zbadano kilka transkryptów ulegających alternatywnemu splicingowi w mózgu, które są znanymi celami MBNL1. W tej analizie odnotowano około 30% spadek w pomijaniu eksonu 18 w *Picalm*, wzrost włączania (inkluzji) eksonu 14 w *Add3* oraz nieznacznie zwiększone włączenie eksonu 9 w *Mbnl2* i eksonu 15 w *Sorbs1* w mózgu *Shi* w porównaniu z mózgiem WT (Ryc. 31). Nie znaleziono istotnych różnic w pomijaniu bądź inkluzji eksonu 6 w *Mbnl2*, a także w innym analizowanym genie, *Kif13a*. Ta analiza wykazała, że niektóre geny docelowe MBNL1 wykazują zróżnicowane wzorce tworzenia izoform mRNA w mózgu *Shi* względem WT. Te zróżnicowane wzorce splicingu w mózgu *shiverer*, w połączeniu ze zmienioną interakcją MBNL1 z RNA, mogą wskazywać na zaburzenie normalnej funkcji regulacyjnej tego białka w kontekście demielinizacji. Może to prowadzić do nieprawidłowej ekspresji izoform genów kluczowych dla homeostazy neuronalnej lub glejowej, przyczyniając się do fenotypu obserwowanego u myszy *shiverer*.



Opis Ryciny 31 znajduje się na stronie 104.

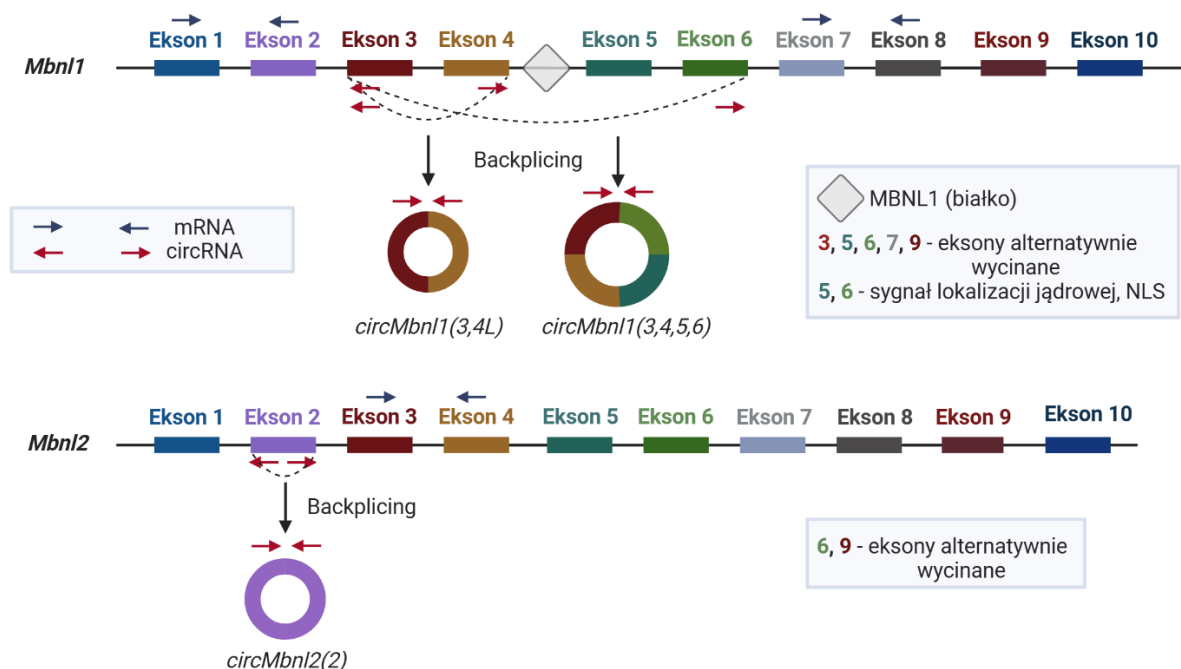
Rycina 31. Analiza eksonów regulowanych przez MBNL1 w mózgach WT i *Shi*.

Reprezentatywne 3% żele agarozowe z produktami RT-PCR. RT-PCR prowadzono przy użyciu zestawów starterów zaprojektowanych dla konkretnych izoform mRNA. Wykresy pokazują obliczenia zdarzeń pomijania lub włączania eksonów, kalkulowanych jako średnie wartości procentowe *spliced-in* (PSI) $\pm$ SD ($n = 3-5$). Istotność statystyczną obliczono przy użyciu dwukierunkowej analizy wariancji (ANOVA): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, nieistotne; e-ekson.

4.5. Analiza izoform mRNA i circRNA generowanych z genów *Mbnl1* i *Mbnl2* oraz ich wpływ na subkomórkową lokalizację białka MBNL1

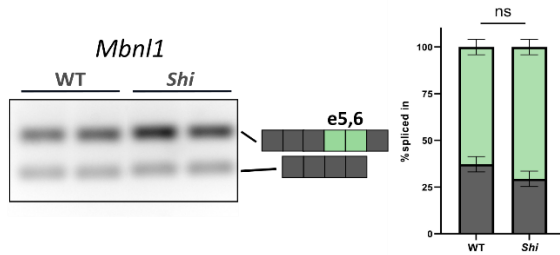
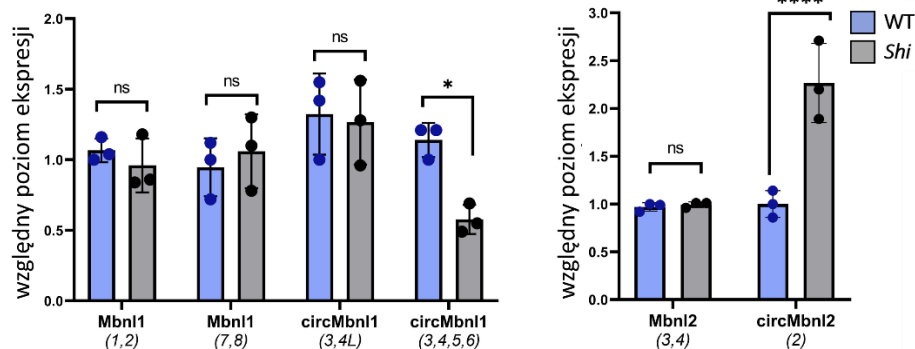
Po zaobserwowaniu zmian w profilu oddziaływań białka MBNL1 z RNA w mózgach myszy *shiverer* względem mózgu WT (Ryc. 30B) oraz jego potencjalnego wpływu na alternatywny splicing (Ryc. 31), naturalnym krokiem było poszerzenie analiz o inne aspekty regulacji związane z tym kluczowym czynnikiem. Biorąc pod uwagę rosnące zainteresowanie rolą kolistych RNA w funkcjonowaniu układu nerwowego oraz realizując cele niniejszej pracy dotyczące badania funkcji tych cząsteczek w mózgu, postanowiono zbadać, czy gen *Mbnl1* - oprócz kodowania białka regulatorowego - jest również źródłem transkryptów kolistych i czy ich ekspresja może być zaburzona w kontekście defektu mielinizacji. Hipoteza zakładała, że skoro białko MBNL1 wykazuje zmienione oddziaływania z RNA w modelu *shiverer*, to również transkrypty circRNA pochodzące z jego własnego genu mogą podlegać zmienionej regulacji lub pełnić specyficzne funkcje w tym patologicznym stanie.

Wcześniejsze doniesienia naukowe wykazały, że białko MBNL1 może promować pominięcie eksonu 5 z jego własnych dojrziałych transkryptów²⁴⁵. Ponadto pokazano, że *loci Mbnl1* i *Mbnl2* u ssaków oraz ich homolog *mbl* u muszek owocowych wytwarzają transkrypty koliste (circRNA) złożone z eksonów, które są wzbogacone i silnie wyrażane w mózgu oraz konserwowane ewolucyjnie^{102,246}. W oparciu o te dwa ustalenia, zaprojektowano serię eksperymentów mających na celu zbadanie mRNA oraz circRNA *Mbnl1* i *Mbnl2* pochodzących z genów *Mbnl1* i *Mbnl2* (Ryc. 32). W oparciu o bazę danych circBase²⁴⁶ ustalono powstawanie dwóch różnych izoform circRNA z genu *Mbnl1* i jednego circRNA z genu *Mbnl2*. Co ciekawe, dłuższy circRNA *Mbnl1*(3,4,5,6) posiada w swojej strukturze eksony 5 i 6 zawierające sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization sequence*, NLS). Postanowiono sprawdzić, czy ekspresja kolistych RNA pochodzących z genów *Mbnl1* i *Mbnl2* ulega zmianie pomiędzy mózgiem typu dzikiego a mózgiem z defektem mielinizacji oraz czy zmiana ta jest związana z lokalizacją MBNL1.



Rycina 32. Schemat prezentujący strukturę genów *Mbn1* i *Mbn2*. Strzałki wskazują lokalizację starterów użytych do pomiarów izoform mRNA i circRNA w reakcjach RT-qPCR. mRNA *Mbn1* wykrywano za pomocą dwóch różnych zestawów starterów, a analizy tych produktów oznaczono jako *Mbn1*(1,2) i *Mbn1*(7,8).

Po pierwsze, ustalono, że w mózgu *Shi* istnieje tendencja do wyższego włączania eksonów 5 i 6 w powstające mRNA *Mbn1*, tj. izoformy splicingowej, która zawiera sygnał lokalizacji jądrowej dla białka MBNL1 (Ryc. 32, Ryc. 33A). Po drugie, odkryto, że dwa z trzech circRNA wygenerowanych z loci *Mbn1*, mianowicie *circMbn1*(3,4,5,6) i *circMbn2*(2), były wyraźnie deregulowane w mózgach *Shi* w porównaniu z mózgami WT, podczas gdy ogólna obfitość mRNA *Mbn1* i *Mbn2* nie ulegała zmianie (Ryc. 33B). *CircMbn1*(3,4,5,6), obejmujący eksony 3, 4, 5 i 6, miał niższą ekspresję w mózgu *Shi*, a *circMbn2*(2), obejmujący pojedynczy ekson 2, ulegał wyższej ekspresji w mózgu *Shi* względem mózgu WT (Ryc. 33B).

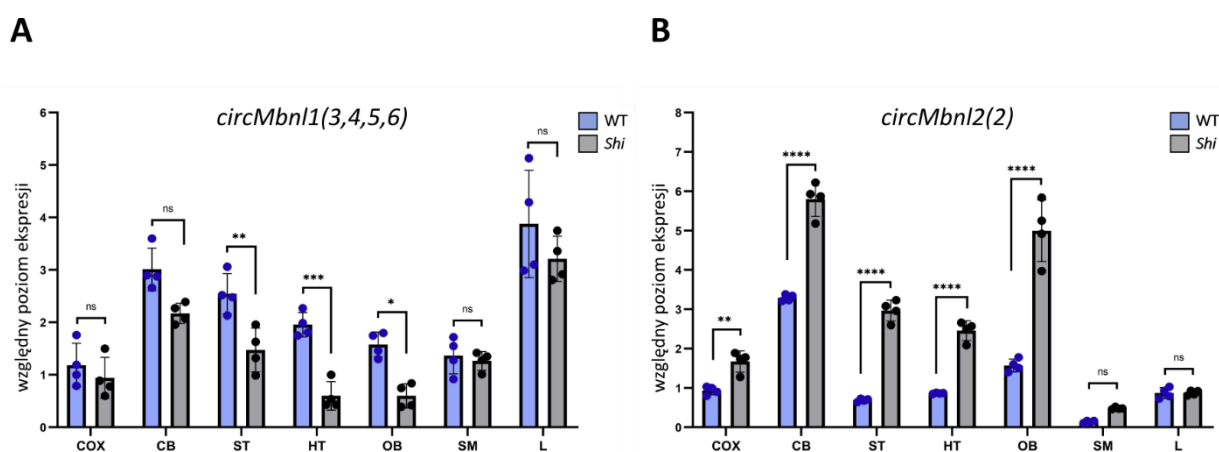
A**B**

Rycina 33. Zmniejszenie ekspresji *circMbnl1(3,4,5,6)* odpowiada zwiększonemu włączaniu eksonów 5 i 6 zawierających sygnał lokalizacji jądrowej do mRNA *Mbnl1*.

A. Analiza izoform mRNA *Mbnl1* z i bez eksonów 5 i 6. Przedstawiono reprezentatywny żel agarozowy z produktami RT-PCR uzyskanymi przy użyciu zestawu starterów specyficznych dla izoformy oraz obliczenia zdarzeń wykluczenia lub włączenia eksonu 5 i 6. Dane przedstawiają średnie wartości PSI $\pm$ SD ($n = 6$ powtórzeń biologicznych). Istotność statystyczną obliczono przy użyciu dwukierunkowej analizy wariancji ANOVA: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, nieistotne. **B.** Analiza RT-qPCR izoform transkryptów *Mbnl1* (po lewej) oraz mRNA i circRNA *Mbnl2* (po prawej). Względny poziom transkryptów znormalizowano do genu referencyjnego *Gapdh*. Przeprowadzono $n = 3$ biologicznie niezależne eksperymenty. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, nieistotne statystycznie (dwukierunkowa analiza wariancji, ANOVA).

Wiadomo, że koliste RNA wykazują wzorce ekspresji specyficzne dla poszczególnych regionów mózgu ssaków⁹². W związku z tym, zbadano, czy *circMbnl1(3,4,5,6)* i *circMbnl2(2)* również charakteryzują się taką specyfiką regionalną oraz czy ewentualne zaburzenia w poziomach ich ekspresji w mózgu z defektem mielinizacji są ograniczone do określonych jego obszarów. Zgodnie z danymi z *Human Protein Atlas* (wersja 23.0), gen *Mbnl1* jest wysoko ekspresjonowany w różnych typach komórek mózgowych, a także w płucach (L) i mięśniach szkieletowych (SM). Biorąc pod uwagę te informacje, wyekstrahowano RNA z kilku głównych regionów mózgu, a także z płuc i mięśni szkieletowych myszy WT oraz *shiverer*, a następnie przeanalizowano poziomy ekspresji *circMbnl1(3,4,5,6)* i *circMbnl2(2)* za pomocą RT-qPCR. Stwierdzono, że *circMbnl1(3,4,5,6)* wykazywał niższy poziom ekspresji we wszystkich badanych obszarach mózgu myszy *shiverer* w porównaniu do mózgowi WT, z wyjątkiem kory

mózgowej, i nie wykazywał różnic w poziomie ekspresji pomiędzy tymi genotypami w mięśniach szkieletowych czy płucach (Ryc. 34A). Z kolei *circMbnl2(2)* charakteryzował się wyższym poziomem ekspresji we wszystkich analizowanych obszarach mózgu myszy *shiverer* w porównaniu do mózgów WT, a także w mięśniach szkieletowych, lecz nie w płucach (Ryc. 34B). Lokalizację obu circRNA w mózgu zbadano dodatkowo metodą hybrydyzacji RNA *in situ*, wykorzystując sondy specyficzne dla charakterystycznego dla tych cząsteczek połączenia *back-splice*, co zostało zaprezentowane w opublikowanej pracy²²⁸.



Rycina 34. Analiza ekspresji *circMbnl1(3,4,5,6)* oraz *circMbnl2(2)* w wybranych częściach mózgu i innych tkankach WT i *Shi*. **A.** Analiza RT-qPCR *circMbnl1(3,4,5,6)* w izolowanych obszarach mózgu (COX, kora mózgowa; CB, mózdzek; ST, prążkowie; HT, podwzgórze; OB, opuszka węchowa), mięśniach szkieletowych (SM, mięsień brzuchaty łydki) i tkankach płuc (L). Względny poziom ekspresji *circMbnl1(3,4,5,6)* w mózgach WT i *Shi* został znormalizowany do genów HK (*Gapdh* i *Actb*). Przeprowadzono n = 4 biologicznie niezależne eksperymenty. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, nieistotne statystycznie (dwukierunkowa ANOVA). **B.** Analiza RT-qPCR dla *circMbnl2(2)* w izolowanych obszarach mózgu (COX, CB, ST, HT, OB) oraz tkankach SM i L. Względną ekspresję obliczono w sposób opisany w A.

Powyższe wyniki niosą ze sobą dwie główne implikacje. Po pierwsze, ponieważ włączenie eksonu 5 do transkryptu mRNA *Mbnl1* zostało wcześniej powiązane z jądrową lokalizacją białka MBNL1²⁴⁷, należało więc oczekiwać jego wyższej obfitości w kompartmentcie jądrowym w mózgach myszy *shiverer*. Po drugie, zmniejszona ekspresja circRNA *circMbnl1(3,4,5,6)* mogłaby promować wydajniejsze włączanie eksonu 5 do transkryptu mRNA *Mbnl1*. W celu weryfikacji tych hipotez, zbadano jądrowe i cytoplazmatyczne poziomy białka MBNL1 w kilku obszarach mózgu, koncentrując się na tych, w których zaobserwowano znaczącą redukcję ekspresji *circMbnl1(3,4,5,6)* (Ryc. 35A). Kwantyfikacja sygnału białka MBNL1 wykazała, że obniżone poziomy *circMbnl1(3,4,5,6)* korelowały ze zwiększoną

akumulacją MBNL1 w jądrach komórkowych prążkowiec (ST), podwzgórza (HT) i opuszki węchowej (OB) mózgow myszy *shiverer* (Ryc. 35A-C). Uzyskane wyniki silnie sugerują, że *locus Mbnl1* może wykorzystywać produkcję circRNA jako mechanizm modulacji jądrowej lokalizacji białka MBNL1. Mechanizm ten wydaje się być aktywny w mózgach myszy *shiverer*, gdzie obniżona ekspresja *circMbnl1(3,4,5,6)* koreluje z wyższym poziomem inkluzji eksonów 5 i 6 do transkryptu mRNA *Mbnl1* oraz ze wzmocnionym sygnałem jądrowym białka MBNL1.

Podsumowując, wykazano, że ekspresja i przetwarzanie transkryptów z *loci Mbnl1* i *Mbnl2* są odmiennie regulowane w mózgach z defektem mielinizacji w porównaniu do mózgow typu dzikiego. Ponadto, dane wskazują, że subkomórkowa lokalizacja i akumulacja białka MBNL1 w jądrze komórkowym mogą być sprzężone z produkcją circRNA z *locus Mbnl1*.

Rycina 35. Porównanie sygnału MBNL1 w jądrze komórkowym i cytoplazmie w komórkach mózgu myszy szczepu dzikiego i *shiverer*. **A.** Obrazy reprezentatywne sygnału MBNL1 IF w strzałkowych przekrojach mózgu WT i *shiverer* w obrębie obszaru korowego, COX (somatosensorycznego, S1), mózdzku, CB (jądro głębokie mózdzku), prążkowie, ST (*caudoputamen*) i opuszki węchowej, OB (jądro węchowe przednie). Skala: 20 μ m. **B.** Przykłady analizy ilościowego oznaczania sygnału MBNL1 IF z obrazów immunofluorescencji w jądrach i cytoplazmie różnych obszarów mózgu przy użyciu narzędzia Intensity Ratio Nuclei Cytoplasm Tool (Metody). **C.** Kwantyfikacja stosunku intensywności sygnału immunofluorescencyjnego MBNL1 w jądrach (niebieski) i cytoplazmie (szary) różnych obszarów mózgu: kory mózgowej (S1), mózdzku (DCN, jądro głębokie mózdzku), prążkowie (CP), podwzgórza (LHA, boczny obszar podwzgórza) i opuszki węchowej (AON, przednie jądro węchowe). Sygnał immunofluorescencyjny liczono z $n = 2$ powtórzeń biologicznych (mózgi różnych myszy) dla WT i *Shi* oraz z $n = 8$ (WT) i $n = 8$ (*Shi*) przekrojów mózgu. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, nieistotne statystycznie (dwukierunkowa analiza wariancji).

W szerszej perspektywie, wykazano, że protokół XRNAX może być użyteczny w badaniach różnic jakościowych w interakcjach RNA-białko pomiędzy tkanką zdrową a tkanką dotkniętą chorobą. Został on z powodzeniem zastosowany do walidacji zmian jakościowych w mózgu myszy *shiverer* w odniesieniu do zdrowego, co podkreśla jego potencjał jako punkt wyjścia do dalszych walidacji zmian w kontekście patogenezy chorób demielinizacyjnych, ale również innych schorzeń, otwierając możliwości identyfikacji nowych celów terapeutycznych.

4.6. Analiza porównawcza protokołu XRNAX z innymi metodami do charakteryzowania oddziaływań RNA-białko w tkance mózgowej myszy

W celu pełniejszego zrozumienia specyficzności i wartości wyników otrzymanych z zastosowaniem protokołu XRNAX, istotne było porównanie ich z wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu innych, niedawno opracowanych metod, które wykorzystano do identyfikacji oddziaływań RBP-RNA w tkankach. Protokół XRNAX, opisany pierwotnie przez Trendela i wsp.²⁰⁷ i dalej zoptymalizowany do użycia w tkance mózgowej i opisany w niniejszej pracy (Sztachera i wsp.²²⁸) opiera się na sieciowaniu UV interakcji RNA-białko w sproszkowanej kiogenicznie tkance mózgu, a następnie izolacji kompleksów RNA-białko zawierających wszystkie biotypy RNA, z interfazy po organicznej separacji faz. Usieciowane kompleksy RNA-białko są następnie nadtrawiane trypsyną, oczyszczane na kolumnach krzemionkowych, a wzbogacone w ten sposób peptydy usieciowane z RNA są identyfikowane w spektrometrii mas²²⁸. Metoda pCLAP, wykorzystana przez Mullari i wsp.²⁰¹ do porównania interaktomów RBP-mRNA w zdrowym mózgu myszy oraz w modelu HD, działa poprzez

sieciowanie UV interakcji RNA-białko również w homogenatach tkankowych. Kluczowym etapem tej metody jest wstępne trawienie białek w homogenacie tkankowym do peptydów, a następnie izolacja tych peptydów, które są kowalencyjnie związane z poliadenylowanym RNA, przy użyciu kulek oligo(dT) i ich identyfikacja za pomocą spektrometrii mas²⁰¹. Metoda eRIC, zastosowana do badania interakcji RNA-białko w tkankach i opisana przez Perez-Perri i wsp.¹¹, podobnie jak pCLAP, bazuje na sieciowaniu UV i przechwytywaniu kompleksów mRNA-białko na kulkach oligo(dT), przy czym promieniowaniu UV nie jest poddawany homogenat, a cienkie skrawki organów (grubość 30 µm), które dopiero po tym etapie są łączone w odpowiednie próbki za pomocą buforu do lizy. Dodatkowo, po przechwytywaniu kompleksów mRNA-białko, pozostały lizat zubożony o te kompleksy wykorzystano do identyfikacji interakcji niepoliadenylowanych RNA z białkami¹¹. Wszystkie trzy wspomniane podejścia zostały z powodzeniem zastosowane do badania interakcji RNA-białko w tkance mózgowej myszy.

Porównanie wyników powyższych prac pozwala na obserwację, że chociaż XRNAX umożliwił specyficzną i powtarzalną identyfikację znanych, kanonicznych RBP, to metoda ta wzbogacała mniejszą liczbę RBP w porównaniu do próbek kontrolnych tj. nienaświetlanych UV. Metoda XRNAX pozwoliła na identyfikację mniejszej liczby RBP niż dwie wspomniane wcześniej metody - eRIC¹¹ i pCLAP²⁰¹ – które wzbogaciły większą liczbę białek (Ryc. 36, Tabela 9). Ponadto, zaobserwowano stosunkowo niewielkie pokrycie zbiorów RBP zidentyfikowanych przy użyciu tych trzech metod (XRNAX, pCLAP i eRIC) (Ryc. 36), co sugeruje, że każda z nich charakteryzuje się specyficznymi obciążeniami metodycznymi. Najprawdopodobniej jest to związane z różnicami technicznymi pomiędzy tymi metodami (Tabela 9), w tym przygotowaniu tkanki przed sieciowaniem UV.

Należy jednak podkreślić, że w porównaniu do pCLAP i eRIC, XRNAX jawi się jako metoda stosunkowo łatwa do wykonania. Kluczowym atutem jest tutaj etap przygotowania próbki: tkanka jest przygotowywana w prosty i szybki sposób poprzez jej proszkowanie w ciekłym azocie. Udowodniono również, że zastosowane w tej pracy proszkowanie tkanek przed etapem sieciowania UV zapewnia zachowanie integralnych interakcji RNA-białko *in vivo* i uzyskanie powtarzalnych wyników w kolejnych etapach eksperymentu. Biopulweryzację można potencjalnie wykorzystać do badania interakcji RNA-białko w dowolnym typie tkanki, co czyni protokół XRNAX atrakcyjnym narzędziem, szczególnie w kontekście badań zmian jakościowych w interakcjach RNA-białko, lub tam, gdzie kluczowa jest minimalizacja manipulacji próbką przed sieciowaniem. Dodatkowo, istotną zaletą protokołu XRNAX jest jego zdolność do przechwytywania kompleksów RNA-białko zawierających wszystkie biotypy

RNA. Metoda pCLAP, ze względu na specyfikę procedury, koncentruje się na analizie oddziaływań z mRNA. Choć metoda eRIC również umożliwia analizę interakcji z różnymi typami RNA, to osiągnięcie tego celu wymaga zastosowania dwóch metod, co niewątpliwie podnosi poziom skomplikowania protokołu w porównaniu do XRNAX.

Tabela 9. Podsumowanie i porównanie metod XRNAX, eRIC i pCLAP do badania proteomu związanego z RNA w tkankach ssaków.

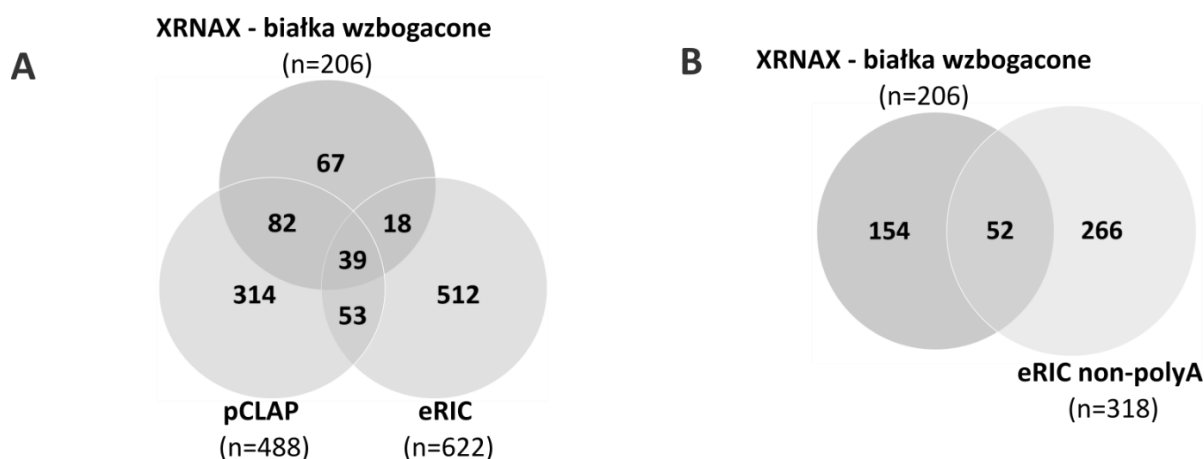
	XRNAX	eRIC	pCLAP
Materiał biologiczny	Mózg (mysz)	Mózg, płuco, wątroba (mysz)	Mózg (mysz)
Rodzaj/ stan tkanki	Zamrożone tkanki	Zamrożone tkanki	Świeże tkanki
Przygotowanie prób przed naświetlaniem UV	Biopulweryzacja (proszkowanie)	Krio-sekcjonowanie	Homogenizator Tenbroeck (i filtr nylonowy 50 μ m) w buforze HBSS
Ilość materiału wyjściowego na próbkę	1-2 mózgi	Krio-sekcje z ~80% mózgu myszy; eluaty z dwóch mózgów zostały połączone	½ mózgu
Metoda sieciowania	UV (λ = 254 nm) proszku tkankowego (zamrożonego)	UV (λ = 254 nm) krio-sekcji tkankowych (o grubości 30 μ m)	UV (λ = 254 nm) homogenatu tkankowego
Dawka UV	400 mJ/cm ² (3x)	1 J/cm ²	0.175 J/cm ² (2x)
Liza tkanki	Trizol	Bufor do lizy (20mM Tris-HCl pH 7.5, 500mM LiCl, 1mM EDTA, 5mM DTT, 0.5% (w/v) LiDS z dodatkiem inhibitorów proteaz i RNaz)	Bufor do lizy (6 M GndHCl, 100 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM TCEP, 10 mM chloroacetamid)
Czas lizy	po UV	po UV	przed UV
Wzbogacanie kompleksów RNA-białko	Poprzez separację fazy organicznej, oczyszczanie, częściowe trawienie trypsyną, wzbogacanie na kolumnach krzemionkowych, obróbkę RNazą i całkowite trawienie trypsyną	- wychwytywanie mRNA na kulkach oligo(dT) - Ekstrakcja fazy stałej na bazie krzemionki 2C z frakcji przepływowej (transkrypty niepoliadenylowane)	Poprzez wychwytywanie mRNA na kulkach oligo(dT)
Odczyt	Znakowanie TMT & LC-MS/MS	Znakowanie TMT & LC-MS/MS	LC-MS/MS
Analiza RBP	Dla całego transkryptomu (niezależnie od statusu poliadenylacji – w jednym eksperymencie)	Dla całego transkryptomu (niezależnie od statusu poliadenylacji – w dwóch eksperymentach)	Proteom związany z mRNA
Liczba wykrytych białek/ peptydów	WT metoda B: 666; Shi metoda B: 633.	1471** (mózg; polyA)	362** (mózg; non-polyA)
Liczba białek wzbogaconych	Łącznie (WT B, WT H, Shi): 206* (logFC>0,6)	622** (logFC>1; mózg; polyA)	318** (logFC>0,6; mózg; non-polyA)
			Łącznie (WT, HD): 575***
			Łącznie (WT, HD): 488***

* Całkowita liczba unikalnych białek wzbogaconych ($\log_2 FC > 0,6$) ze wszystkich zestawów danych XRNAX (WT B, WT H i *Shi* B).

** Liczba białek określona zgodnie z danymi uzupełniającymi eRIC (poliA) i (nie-poliA), $\log_2 FC > 1$. Perez-Perri i inni, Nat Comm. 2023.

*** Liczba białek określona zgodnie z danymi uzupełniającymi pCLAP (WT i HD). LogFC nieokreślony. Mullari i inni, Nat Comm. 2023.

(Legenda do Tabeli 9 znajduje się na stronie 112).

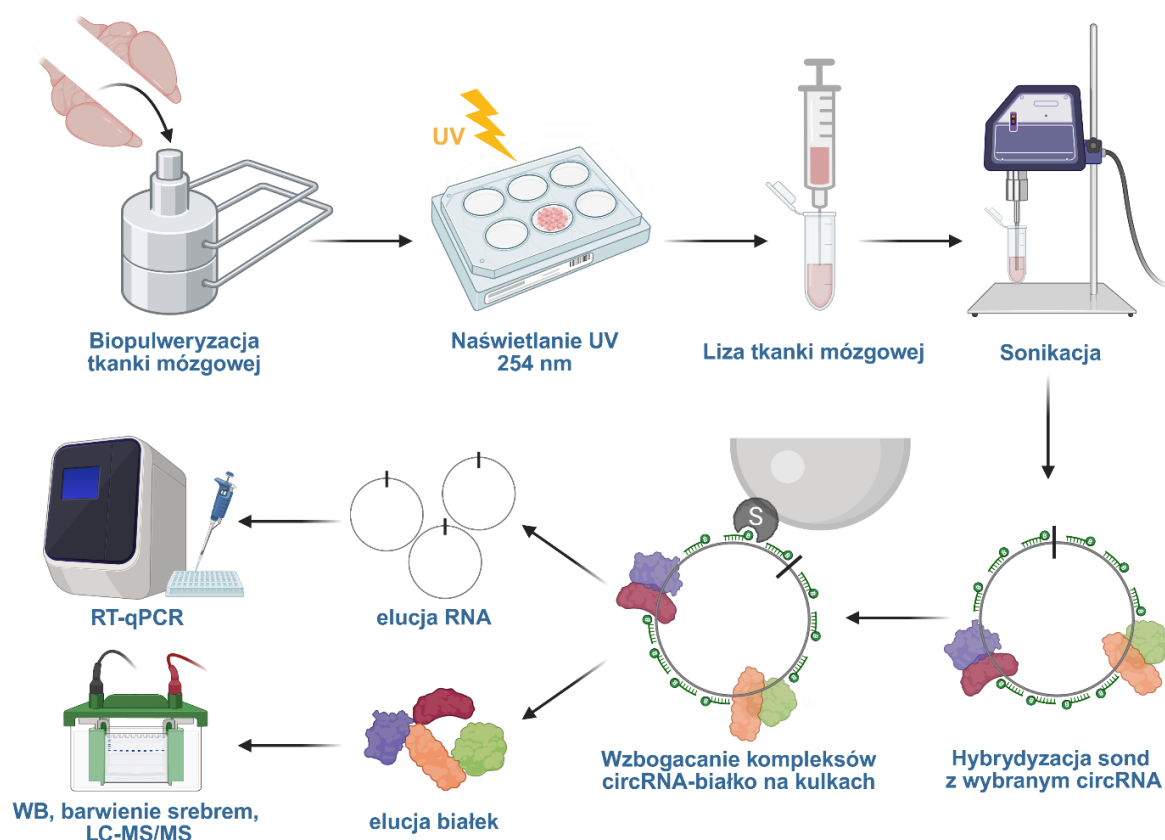


Rycina 36. Porównanie wyników białkowych uzyskanych metodami XRNAX, eRIC i pCLAP. **A.** Diagram Venna porównujący $n = 206$ białek wzbogaconych XRNAX ($\log_2 FC > 0,6$) wykrytych w mózgu myszy w kompleksach z RNA (łącznie: metoda XRNAX WT B, WT H i *Shi* B), z $n = 622$ RBP z mózgu zidentyfikowanymi przez eRIC ($\log_2 FC > 1$) i $n = 488$ RBP z mózgu zidentyfikowanymi przez pCLAP. **B.** Diagram Venna porównujący $n = 206$ białek wzbogaconych XRNAX ($\log_2 FC > 0,6$) wykrytych w mózgu myszy z $n = 318$ RBP związanymi z RNA nie-poli(A) zidentyfikowanymi przez eRIC ($\log_2 FC > 0,6$).

4.7. Optymalizacja nowego protokołu circRNA pull-down do wychwytywania kolistych RNA wraz z ich interaktomem w mózgu myszy

Zaprezentowane powyżej wyniki potwierdziły, że protokół XRNAX poprzedzony przygotowaniem tkanki mózgowej poprzez biopulweryzację i naświetlaniem światłem UV przy długości fali 254 nm pozwala na specyficzne odzyskiwanie interaktomu RNA-białko z mózgu²²⁸. To osiągnięcie, stanowiące realizację pierwszych celów niniejszej pracy, stworzyło solidne podstawy do dalszych, bardziej ukierunkowanych badań nad specyficznymi klasami RNA i ich interakcjami. W szczególności, rosnąca wiedza na temat potencjalnie istotnych ról circRNA w funkcjonowaniu układu nerwowego, przy jednoczesnym braku kompleksowych narzędzi do badania ich natywnych interakcji *in vivo* w tkankach, stanowiła silną motywację do podjęcia kolejnych wyzwań badawczych.

Zgodnie z trzecim i czwartym celem szczegółowym rozprawy, dążono do opracowania i zoptymalizowania metody umożliwiającej izolację endogennych kompleksów circRNA-białko (oraz circRNA-miRNA) bezpośrednio z tkanki mózgowej, a następnie do wykorzystania tej metody do identyfikacji molekularnych partnerów wybranych circRNA. Poznanie tych interakcji jest kluczowe dla zrozumienia mechanizmów działania circRNA i ich potencjalnego udziału w procesach fizjologicznych w mózgu. Dlatego też ustalone i zwalidowane warunki przetwarzania tkanki mózgowej, obejmujące biopulweryzację i sieciowanie UV, wykorzystano jako wstępny, kluczowy etap nowego protokołu RNA pull-down, ukierunkowanego na badanie oddziaływań endogennych circRNA z białkami. W ramach dalszych prac zoptymalizowano kolejne etapy tej procedury, w tym ustalono warunki hybrydyzacji specyficznych sond DNA z wybranymi, docelowymi circRNA, opracowano strategię wzbogacania kompleksów circRNA-białko na kulkach magnetycznych pokrytych streptawidyną oraz zoptymalizowano metody elucji obu składowych kompleksów (tj. circRNA i białek) w celu ich późniejszej analizy (Ryc. 37).



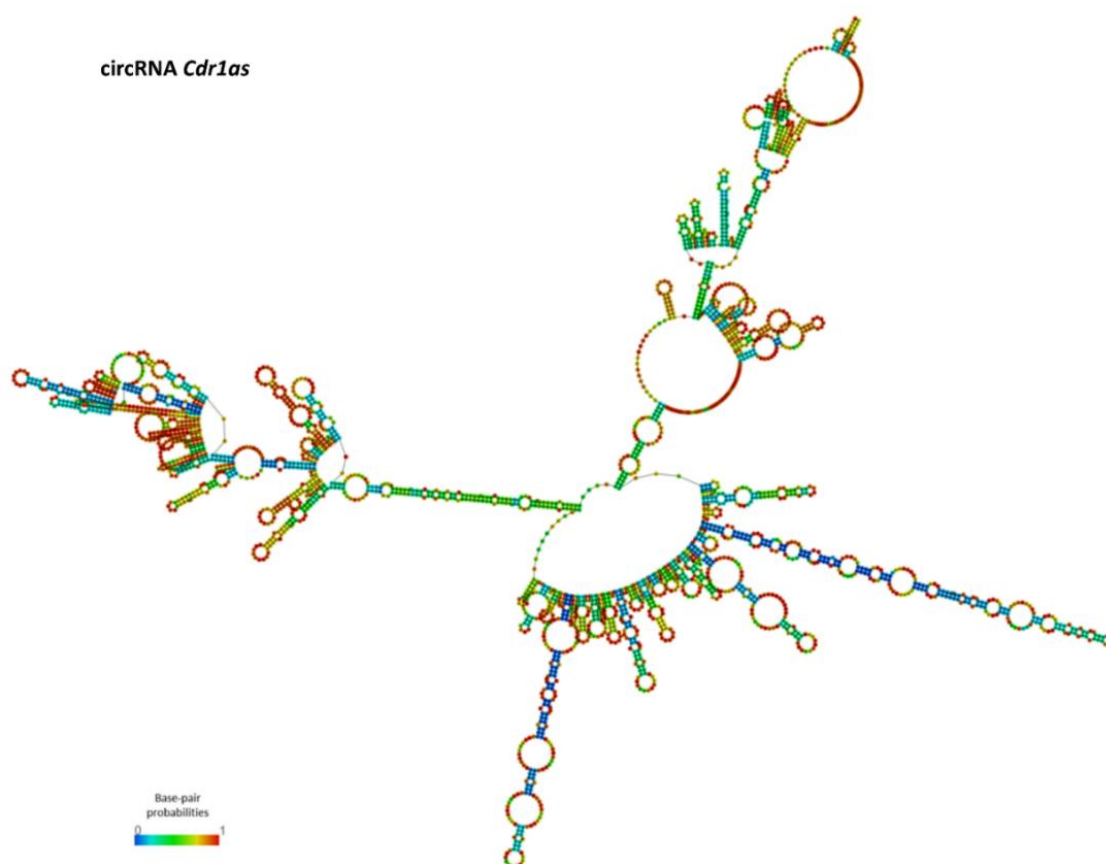
Rycina 37. Główne etapy procedury circRNA pull-down. Po przetworzeniu i lizie tkanki mózgowej, procedura circRNA pull-down obejmuje hybryzację biotynylowanych sond DNA do circRNA w lizacie tkankowym oraz wychwytywanie kompleksów circRNA-białko na kulkach pokrytych streptawidyną. Kolejne kroki to wielokrotne etapy płukania (mające na celu usunięcie niespecyficznie związanych cząsteczek) oraz elucja związanych białek i RNA z kulek w celu ich dalszej analizy.

4.7.1. Wybór circRNA i kontroli do eksperymentu

CircRNA *Cdr1as* wybrano jako pierwszy obiekt do optymalizacji protokołu RNA pull-down, kierując się następującymi kryteriami:

- wysoka ekspresja w mózgu myszy i człowieka^{91,92,124},
- znane białko oddziałujące z *Cdr1as* - AGO2¹²⁵,
- brak izoformy liniowej mRNA^{91,92,124},
- dostępny myszy model *Cdr1as* KO - wykorzystany jako kontrola negatywna do eksperymentów¹²⁵,
- wzbogacenie *Cdr1as* w interfazie protokołu XRNAX, demonstrujące skuteczne sieciowanie tego transkryptu z białkami pod wpływem promieniowania UV (Ryc. 22).

Hipotezę, że *Cdr1as*, jako długi niekodujący, kolisty RNA, aktywnie wiąże białka w tkance mózgowej, silnie wspiera jego znaczna długość (2927 nukleotydów). Taka rozbudowana cząsteczka nie tylko oferuje większą powierzchnię potencjalnych interakcji, ale również, dzięki obecności licznych wewnętrznie komplementarnych motywów, posiada zdolność do formowania złożonych i różnorodnych struktur drugorzędowych, takich jak struktury pętli czy spinki do włosów (Ryc. 38). Istotne jest, że właśnie takie dwuniciowe lub częściowo dwuniciowe regiony RNA są preferencyjnie rozpoznawane i wiązane przez RBP, w tym te posiadające domeny rozpoznające dwuniciowe RNA (dsRNA)²⁴⁸. Zatem, przewidywana struktura drugorzędowa *Cdr1as* czyni go kandydatem do pełnienia roli platformy molekularnej, który mógłby modulować aktywność lub lokalizację partnerów białkowych w komórkach nerwowych.

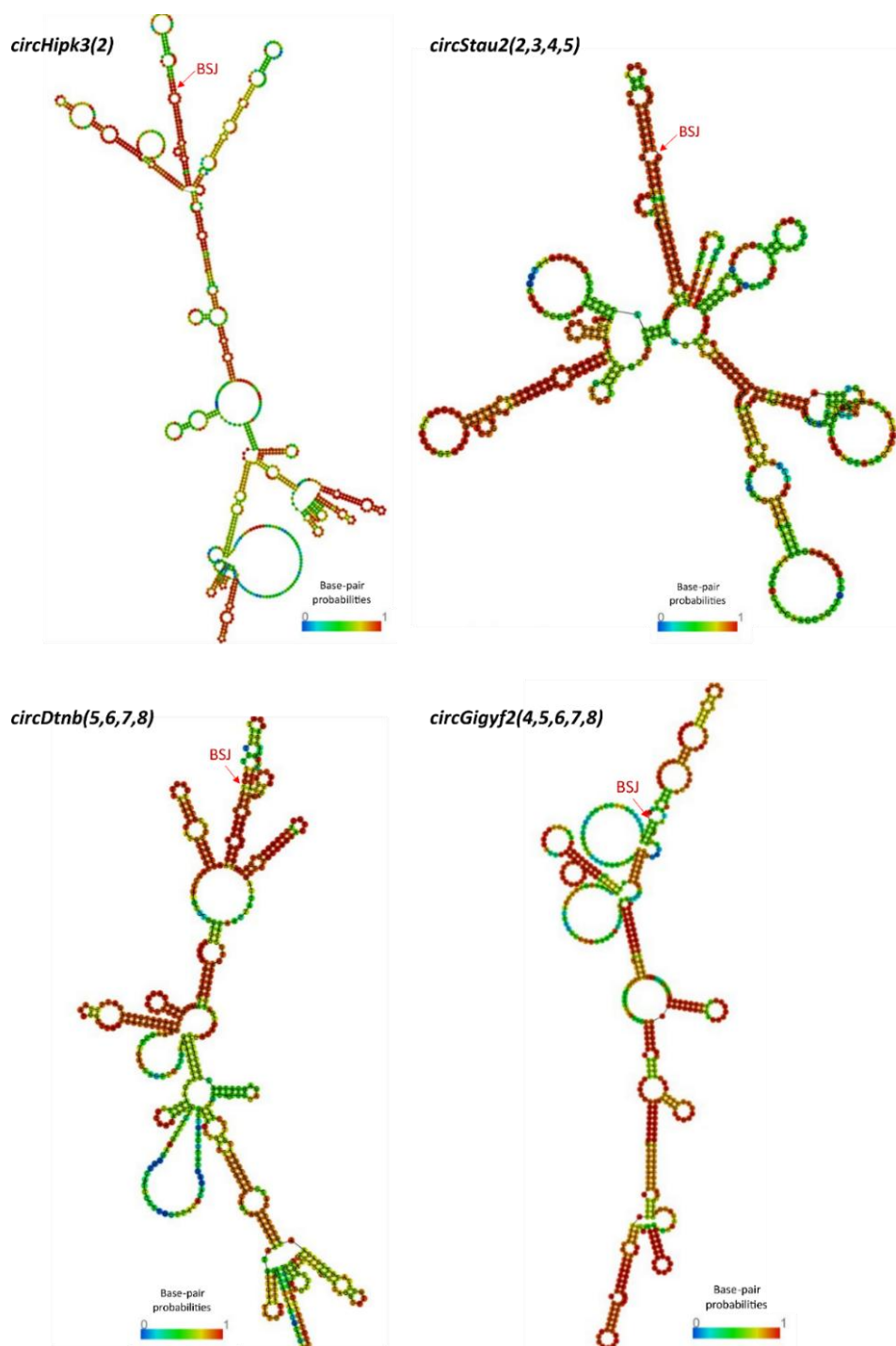


Rycina 38. Przewidywana struktura 2D circRNA *Cdr1as*. Utworzono za pomocą programu RNAfold.

Kolejne cztery circRNA, tj.: *circHipk3*(2), *circStau2*(2,3,4,5), *circDtnb*(5,6,7,8) i *circGigyl2*(4,5,6,7,8), wyselekcjonowano według poniższych kryteriów:

- silne wzbogacenie w synapsach^{92,114} i neuronach pierwotnych (nieopublikowane dane sekwencjonowania RNA),
- ekspresja circRNA *circHipk3*(2), *circDtnb*(5,6,7,8), *circGigyl2*(4,5,6,7,8) w mózgu jest wyższa od ekspresji mRNA transkrybowanego z tego samego genu,
- obserwowane częściowe zmniejszenie ilości *circHipk3*(2) i *circStau2*(2,3,4,5) w fazie wodnej po przeprowadzeniu protokołu XRNAX, co wskazuje na potencjał tych circRNA do wiązania białek i przejście tych kompleksów do interfazy (Ryc. 22B-C),
- pokrycie eksonów tworzących *circHIPK3* wieloma miejscami wiązania RBP¹³⁷,

Przewidywane struktury drugorzędowe cząsteczek circRNA wybranych do eksperymentów circRNA pull-down, które potencjalnie mogą być rozpoznawane i wiązane przez RBP²⁴⁸ zaprezentowano na Rycinie 39.



Rycina 39. Przewidywane struktury 2D kandydatów circRNA do RNA pull-down.

Utworzono za pomocą programu RNAfold.

W celu kontroli sygnału niespecyficznego po circRNA pull-down, do eksperymentów włączono kontrole negatywne. W eksperymentach *Cdr1as* pull-down jako kontrolę negatywną użyto tkanki myszy z deplecją genomową *Cdr1as* (*Cdr1as* knockout). Z kolei przy walidacji wzbogacania pozostałych kandydatów circRNA wykonywano dodatkowo eksperyment RNA pull-down z użyciem sondy zaprojektowanej na wiązanie mRNA *gfp* tj. cząsteczki RNA niewystępującej endogennie w mózgu myszy.

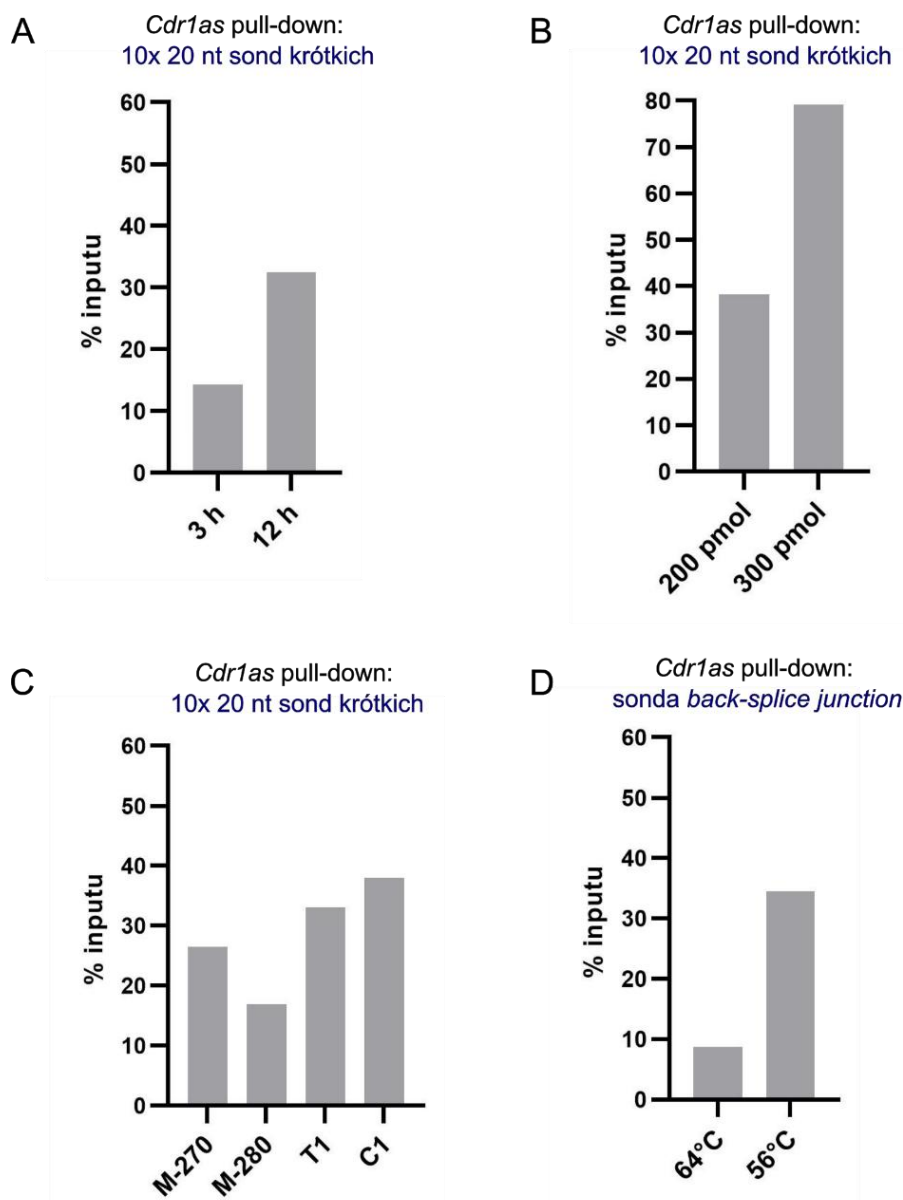
4.7.2. Optymalizacja kluczowych etapów eksperymentu circRNA pull-down

Procedura przetwarzania tkanki mózgowej (homogenizacja, sieciowanie UV) na potrzeby badania interakcji RNA-białko została zoptymalizowana wcześniej²²⁸ i następnie zastosowano ją w niezmiennych warunkach jako etap przygotowawczy do procedury circRNA pull-down. Kilka głównych etapów protokołu RNA pull-down zostało zaczerpniętych z już istniejących protokołów, w tym RAP-MS^{188,189}, vIPR¹⁹¹ i ChIRP^{162,186}. Etapy te należało następnie dostosować do pracy z tkanką mózgową oraz do specyfiki badania kolistych RNA. Optymalizacji poddano kluczowe etapy eksperymentu, w tym: stężenie ASO, czas i temperaturę hybrydyzacji circRNA z sondą oraz rodzaj kulek stosowanych do wzbogacania kompleksów circRNA-białko.

Pierwszym celem w eksperymencie RNA pull-down był circRNA *Cdr1as*. Przetestowano wstępnie 10 krótkich, biotynylowanych ASO DNA w celu wyłapania tej kolistej cząsteczki z lizatu tkanki mózgowej. Wykazano, że 12-godzinna hybrydyzacja z ASO DNA podwoiła wzbogacenie *Cdr1as* względem hybrydyzacji 3-godzinnej (Ryc. 40A). Podobnie, zwiększenie stężenia sond z 200 pmol do 300 pmol zaowocowało dwukrotnie wyższym poziomem odzysku circRNA (Ryc. 40B). W obu przypadkach do wychwytywania *Cdr1as* związanego z biotynylowanymi ASO użyto kulek pokrytych streptawidyną, Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (Thermo Fisher Scientific, 65002), rekomendowanych i powszechnie stosowanych w eksperymentach RNA pull-down. Wydajność kulek C1 w skutecznym wyłapywaniu kompleksów RNA-białko porównano z innymi kulkami dostępnymi na rynku: M-270, M-280 i T1 (Dynabeads™ Streptavidin Trial Kit, Thermo Fisher Scientific, 65801D), potwierdzając najwyższą efektywność wychwytu circRNA przy użyciu kulek C1 (Ryc. 40C).

Z uwagi na fakt, że nie dla wszystkich kolistych RNA można zastosować wiele sond, gdyż cząsteczki te często posiadają liniowe odpowiedniki mRNA, sprawdzono również wydajność wychwytu *Cdr1as* za pomocą pojedynczej sondy BSJ o długości 44 nukleotydów, zaprojektowanej komplementarnie do sekwencji złącza typu *back-splice*, charakterystycznego dla circRNA. Temperaturę hybrydyzacji *Cdr1as* z sondą zaprojektowaną do wiązania sekwencji BSJ ustalono empirycznie; uzyskano około 3,5 x wyższe wzbogacenie tej cząsteczki przy zastosowaniu temperatury 56°C w porównaniu do 64°C (Ryc. 40D).

Podsumowując, wstępne optymalizacje protokołu RNA pull-down na poziomie RNA pozwoliły ustalić optymalne i wydajne warunki wzbogacania *Cdr1as*, zarówno przy użyciu zestawu wielu sond ASO celujących w sekwencję wewnętrzną, jak i pojedynczej sondy skierowanej na złącze BSJ.



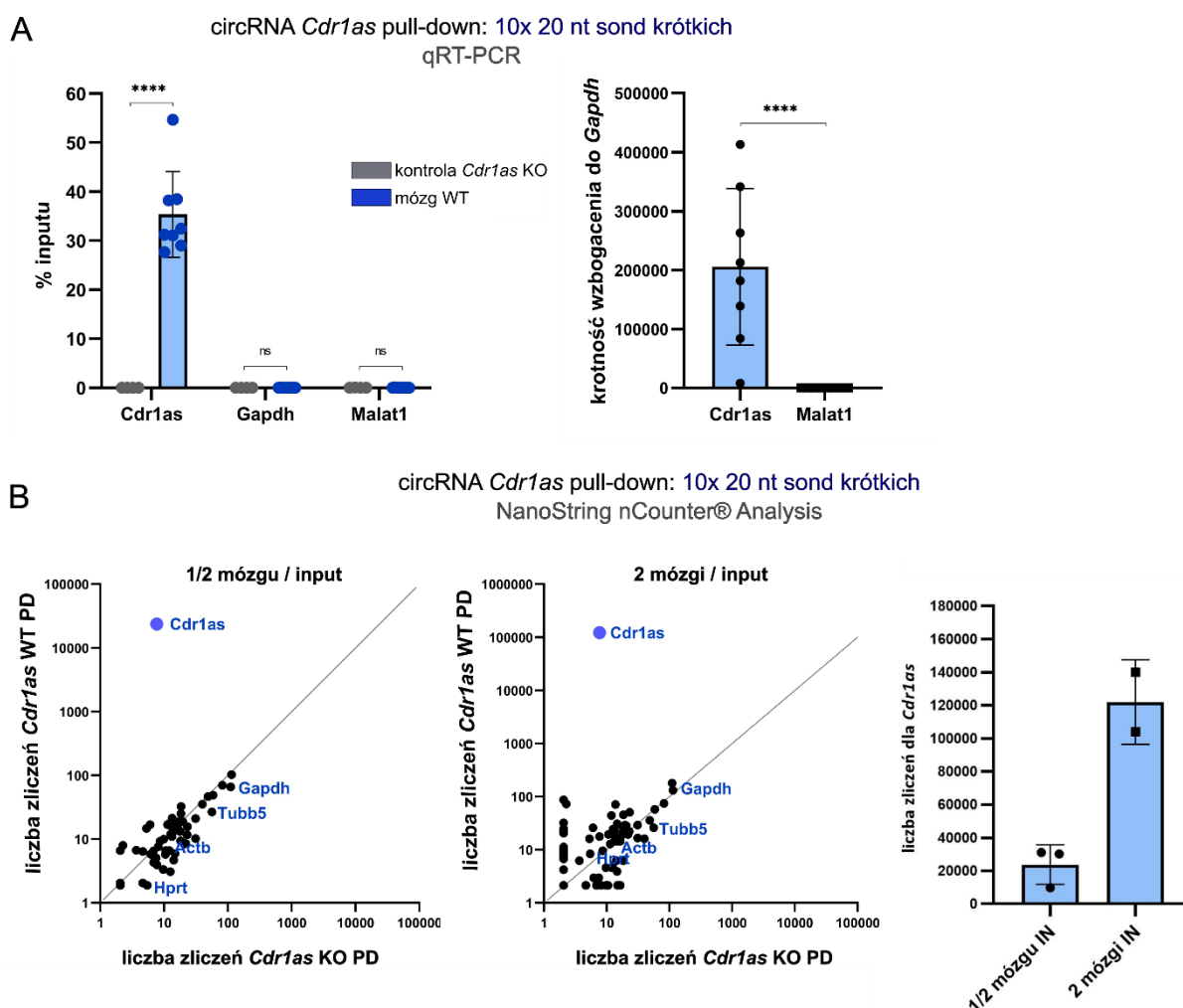
Rycina 40. Optymalizacja warunków circRNA pull-down na poziomie RNA. Analiza poziomu *Cdr1as* w eluacie po eksperymencie RNA pull-down (RT-qPCR). Porównanie wydajności wzbogacanie *Cdr1as* przy zastosowaniu: **A.** dwóch różnych czasów hybrydyzacji (3 h i 12 h) *Cdr1as* z zestawem 10x 20 nt ASO DNA znakowanych biotyną, w stężeniu 200 pmol, **B.** 12-godzinnej hybrydyzacji *Cdr1as* z zestawem 10x 20 nt ASO DNA znakowanych biotyną, użytych w ilości 200 lub 300 pmol, **C.** czterech różnych typów kulek pokrytych streptawidyną (M-270, M-280, T1, C1) różniących się rozmiarem i zdolnością wiązania cząsteczek biotynyłowanych, **D.** 3-godzinnej hybrydyzacji *Cdr1as* z pojedynczą sondą BSJ DNA o długości 44 nt znakowaną biotyną, przeprowadzonej w temperaturze 64°C lub 56°C. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono, używając homogenatów z połowy mózgu myszy WT jako materiału wyjściowego. Względne wzbogacenie *Cdr1as* obliczono jako procent materiału wyjściowego (% input). Słupki przedstawiają średnią z n = 3 powtórzeń technicznych.

4.7.3. Analiza wydajności i specyficzności eksperymentów circRNA pull-down z homogenatów tkankowych

4.7.3.1. Na przykładzie circRNA *Cdr1as*

W pierwszym etapie skupiono się na ocenie powtarzalności zoptymalizowanego protokołu. Powtarzalność wstępnie ustalonych warunków procedury RNA pull-down sprawdzono, przeprowadzając kilka niezależnych eksperymentów. Procedura circRNA pull-down z użyciem wielu krótkich sond DNA komplementarnych do *Cdr1as* umożliwiła wydajne (30-40%; Ryc. 41A, lewa strona) i specyficzne (Ryc. 41A, prawa strona i 41B) wzbogacenie tej docelowej cząsteczki z homogenatów tkankowych. Zwiększenie materiału wyjściowego z połowy mózgu do dwóch mózgów na próbkę zwiększyło wychwyt *Cdr1as* ponad pięciokrotnie (Ryc. 41B). Ponadto użycie pojedynczej sondy DNA komplementarnej do BSJ (zamiast zestawu wielu krótkich sond DNA) w eksperymentach circRNA pull-down skutkowało wysokim (prawie 30%; Ryc. 41C) wzbogaceniem *Cdr1as* w procedurze RNA pull-down.

Podsumowując, procedura RNA pull-down w mózgu okazała się metodą wydajną, specyficzną i powtarzalną, zapewniając 30-40% wzbogacenie *Cdr1as* przy zastosowaniu obu testowanych strategii wykorzystujących sondy komplementarne do tej cząsteczki (tj. zestawu wielu sond wewnętrznych lub pojedynczej sondy celującej w złącze BSJ).



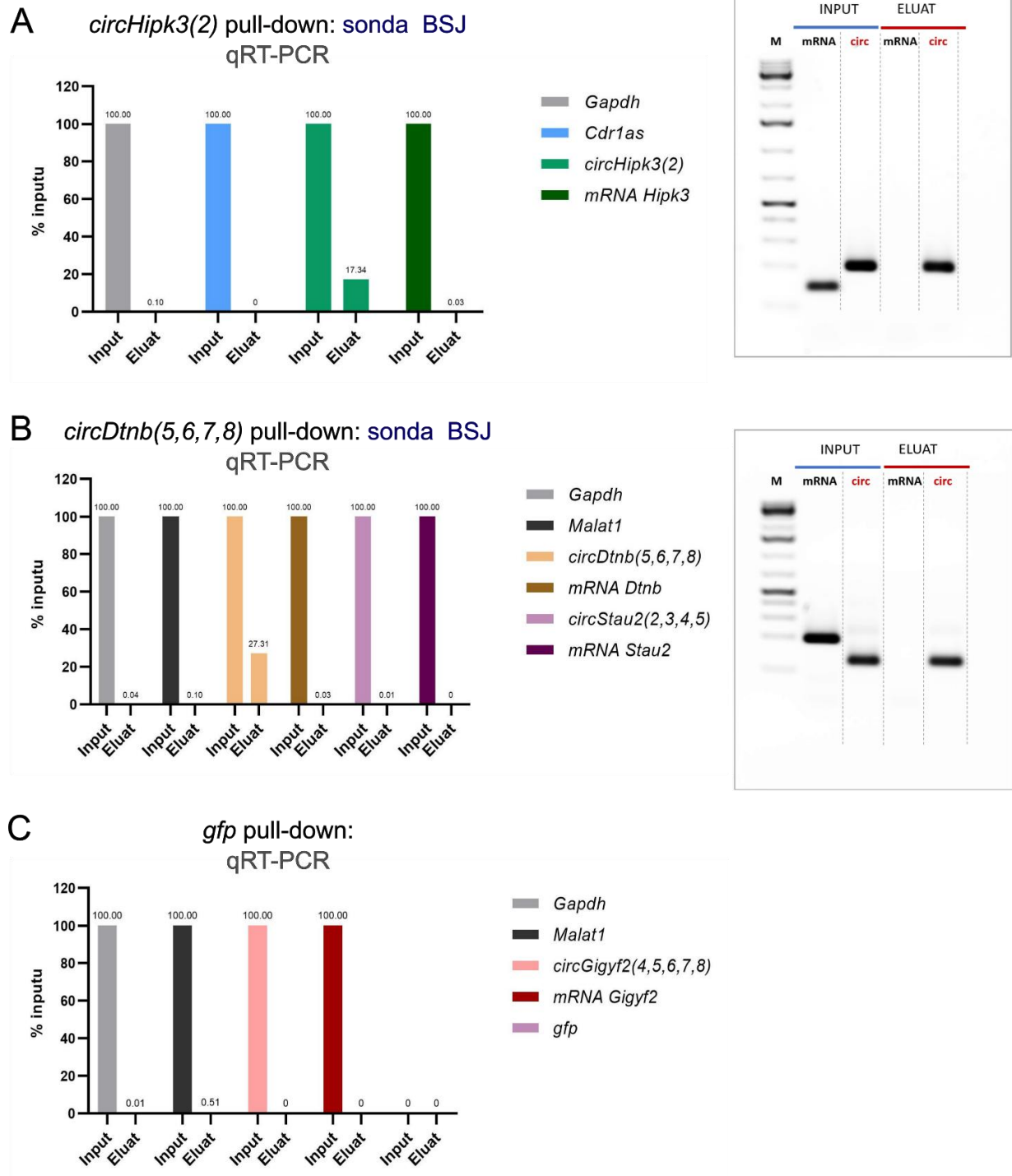
Rycina 41. Wzbogacenie circRNA *Cdr1as* po zoptymalizowanej procedurze RNA pull-down. **A.** Walidacja wzbogacenia circRNA *Cdr1as* po procedurze circRNA pull-down za pomocą qRT-PCR w porównaniu do materiału wyjściowego (*input*). Do hybrydyzacji zastosowano 10 różnych sond DNA o długości 20 nt. Eksperymenty wykonano w mózgu WT i *Cdr1as* KO. Względne wzbogacenie *Cdr1as* obliczono jako procent danych *input* (po lewej) lub jako krotność wzbogacenia *Cdr1as* względem *Gapdh* (po prawej). Przeprowadzono $n = 8$ niezależnych eksperymentów RNA pull-down dla *Cdr1as* z połową mózgu, jako materiałem wyjściowym. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; ns, nieistotne (lewy wykres: dwukierunkowa ANOVA, prawy wykres: niesparowany dwustronny t -test). **B.** Walidacja specyficzności *Cdr1as*

pull-down za pomocą technologii NanoString nCounter w mózgu WT vs *Cdr1as* KO (opis eksperymentu w sekcji „Materiały i metody”). Dane przedstawiono jako średnią ilość zliczeń znormalizowanych do wewnętrznych kontroli dodatnich i ujemnych oraz genów HK (*Actb*, *Gapdh*, *Hprt* i *Tubb5*). $n = 3$ (1/2 mózgu, lewa strona) lub $n = 2$ (2 mózgi, środek) biologicznie niezależne próby z eksperymentów *Cdr1as* pull-down. Wykres po prawej stronie przedstawia porównanie liczby zliczeń *Cdr1as* po eksperymentach pull-down wykonanych na jednej półkuli mózgu oraz na dwóch mózgach. C. Walidacja qRT-PCR wzbogacenia *Cdr1as* po RNA pull-down w porównaniu do inputu po procedurze RNA pull-down z zastosowaniem pojedynczej sondy 44nt DNA do BSJ w mózgu WT i *Cdr1as* KO. Względne wzbogacenie obliczono zgodnie z opisem w (A). Przeprowadzono $n = 4$ biologicznie niezależne eksperymenty *Cdr1as* pull-down z połową mózgu jako materiałem wyjściowym. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; ns, nieistotne (lewy wykres: dwukierunkowa ANOVA, prawy wykres: niesparowany dwustronny t - test).

4.7.3.2. Dla innych wybranych kolistych RNA

Biorąc pod uwagę, że funkcja większości circRNA oraz ich oddziaływanie z białkami i miRNA pozostają w dużej mierze nieznane, a zidentyfikowanie tych interakcji może dostarczyć cennych informacji na temat np. potencjału tych cząsteczek do regulacji ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym, postanowiono rozszerzyć eksperymenty circRNA pull-down na inne cząsteczki circRNA swoiste dla tkanek układu nerwowego, dla których brak jest dotychczas szczegółowych danych literaturowych.

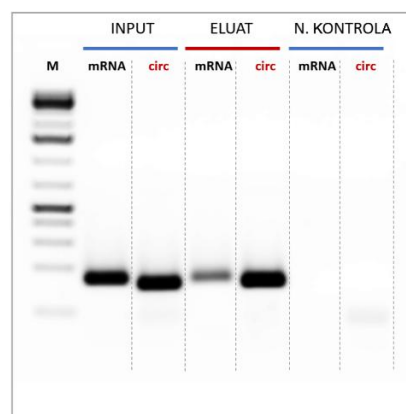
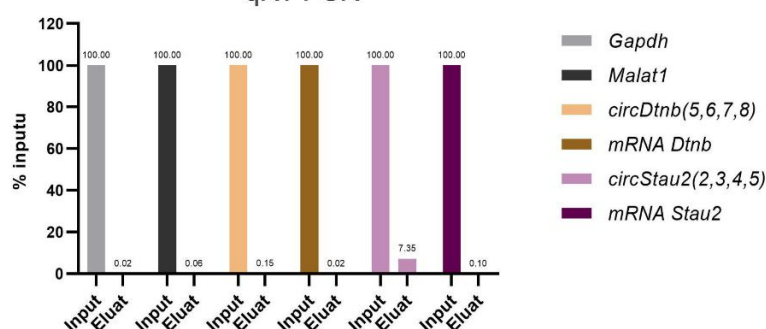
Opracowany i zoptymalizowany protokół circRNA pull-down, został pomyślnie zastosowany do wzbogacania circRNA *Cdr1as*. Sprawdzone, czy protokół RNA pull-down z sondą komplementarną do BSJ zapewni wydajne i specyficzne wzbogacenie również innych wybranych circRNA. Dla pierwszych dwóch wyselekcjonowanych do eksperymentu circRNA, *circHipk3(2)* i *circDtnb(5,6,7,8)* uzyskano poziom wzbogacenia odpowiednio ~20% (Ryc. 42A, lewa strona) i ~30% (Ryc. 42B, lewa strona). Uzyskano specyficzne odzyskiwanie tych cząsteczek circRNA z homogenatów tkankowych w eluatach po procedurze circRNA pull-down tj., pozbawione odpowiadających im mRNA (Ryc. 42A-B). Zgodnie z oczekiwaniami, nie wykryto transkryptów circRNA w kontrolnym eksperymencie RNA pull-down z sondami dla *gfp* (Ryc. 42C).



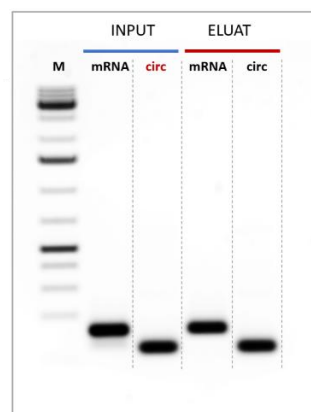
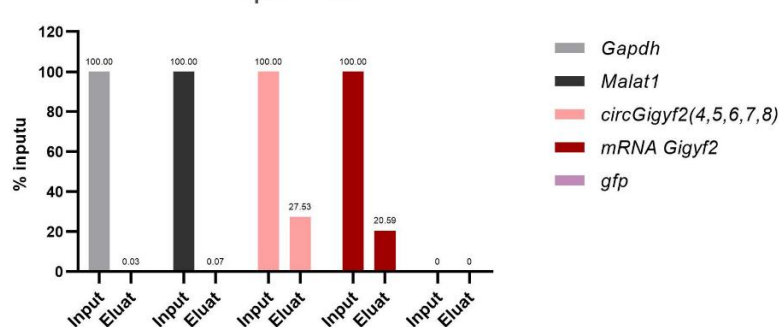
Rycina 42. Wzbogacenie circRNA *circHipk3(2)* i *circDtnb(5,6,7,8)* po eksperymencie RNA pull-down z sondą specyficzną dla *back-splice junction*. Walidacja qRT-PCR wzbogacenia w eluacie A. *circHipk3(2)*, B. *circDtnb(5,6,7,8)* i C. kontroli negatywnej *gfp* w porównaniu z danymi input po procedurze RNA pull-down z zastosowaniem sondy BSJ DNA. Każdy pojedynczy eksperyment przeprowadzono na połowie mózgu myszy WT. Wysokość słupka oznacza średnią z $n = 3$ powtórzeń. Po prawej stronie zaprezentowano rozdział produktów circRNA i ich liniowych odpowiedników mRNA na żelu po qRT-PCR.

Eksperymenty RNA pull-down dla kolejnych dwóch wyselekcjonowanych kandydatów, tj. *circStau2(2,3,4,5)* oraz *circGigyf2(4,5,6,7,8)* również umożliwiły odzyskanie obu tych cząsteczek z homogenatów mózgu, odpowiednio na poziomie ~7% (Ryc. 43A, lewa strona) i ~30% (Ryc. 43B, lewa strona). Jednakże w tych przypadkach oprócz circRNA wykryto również mRNA pochodzące z tych samych *loci* genomowych (Ryc. 43A-B). W eksperymencie *circStau2(2,3,4,5)* pull-down, detekcja mRNA *Stau2* w eluatach była niewielka (Ryc. 43, prawa strona), podczas gdy w procedurze dla *circGigyf2(4,5,6,7,8)* wychwycono zarówno circRNA, jak i mRNA pochodzące z tego samego genu w niemal równej ilości (Ryc. 43B, prawa strona).

A *circStau2(2,3,4,5)* pull-down: sonda BSJ
qRT-PCR



B *circGigyf2(4,5,6,7,8)* pull-down: sonda BSJ
qRT-PCR



Rycina 43. Wzbogacenie circRNA *circStau2(2,3,4,5)* i *circGigyf2(4,5,6,7,8)* po eksperymencie RNA pull-down z sondą komplementarną do sekwencji BSJ. Walidacja qRT-PCR wzbogacenia w eluacie RNA: **A.** *circStau2(2,3,4,5)* i **B.** *circGigyf2(4,5,6,7,8)* po procedurze circRNA pull-down z zastosowaniem sondy BSJ i w porównaniu do prób wyjściowych (Input). Każdy pojedynczy eksperyment przeprowadzono na jednej półkuli mózgu myszy WT. Wysokość słupka oznacza średnią z $n = 3$ powtórzeń. Po prawej stronie zaprezentowano rozdział produktów circRNA i ich liniowych odpowiedników mRNA na żelu po qRT-PCR. N. kontrola – kontrola negatywna, użyta do reakcji PCR (nie zawierająca matrycy cDNA).

Podsumowując, opracowana metoda circRNA pull-down może być wykorzystana do badań endogennych kolistych RNA bezpośrednio w materiale tkankowym, ponieważ zapewnia wydajne odzyskiwanie circRNA z homogenatów tkankowych. Mimo zastosowania tylko jednej sondy komplementarnej do BSJ, wydajność wychwytu docelowych circRNA pozostaje wysoka. Wydajność tę można dodatkowo spróbować zwiększyć dla poszczególnej wychwytywanej cząsteczki, optymalizując temperaturę hybrydyzacji ASO z docelowym RNA, ponieważ zależy ona od temperatury topnienia specyficznej dla danej sondy DNA. Obserwowany brak specyficzności w odzyskiwaniu *circStau2*(2,3,4,5) i *circGigf2*(4,5,6,7,8) może wynikać ze skutecznego wiązania odpowiedniego transkryptu mRNA przez część sondy, która jest komplementarna częściowo do sekwencji eksonu występującego w mRNA. Zastosowane sondy BSJ miały długość 44 nukleotydów: każda składała się z dwóch 22-nukleotydowych ramion, które wiązały się z sekwencjami eksonów po obu stronach unikalnego dla circRNA złącza typu *back-splice*. Nie eliminuje to jednak zastosowania protokołu do badań tych kolistych RNA. Potencjalne rozwiązania omówiono w kolejnym punkcie 4.7.4.

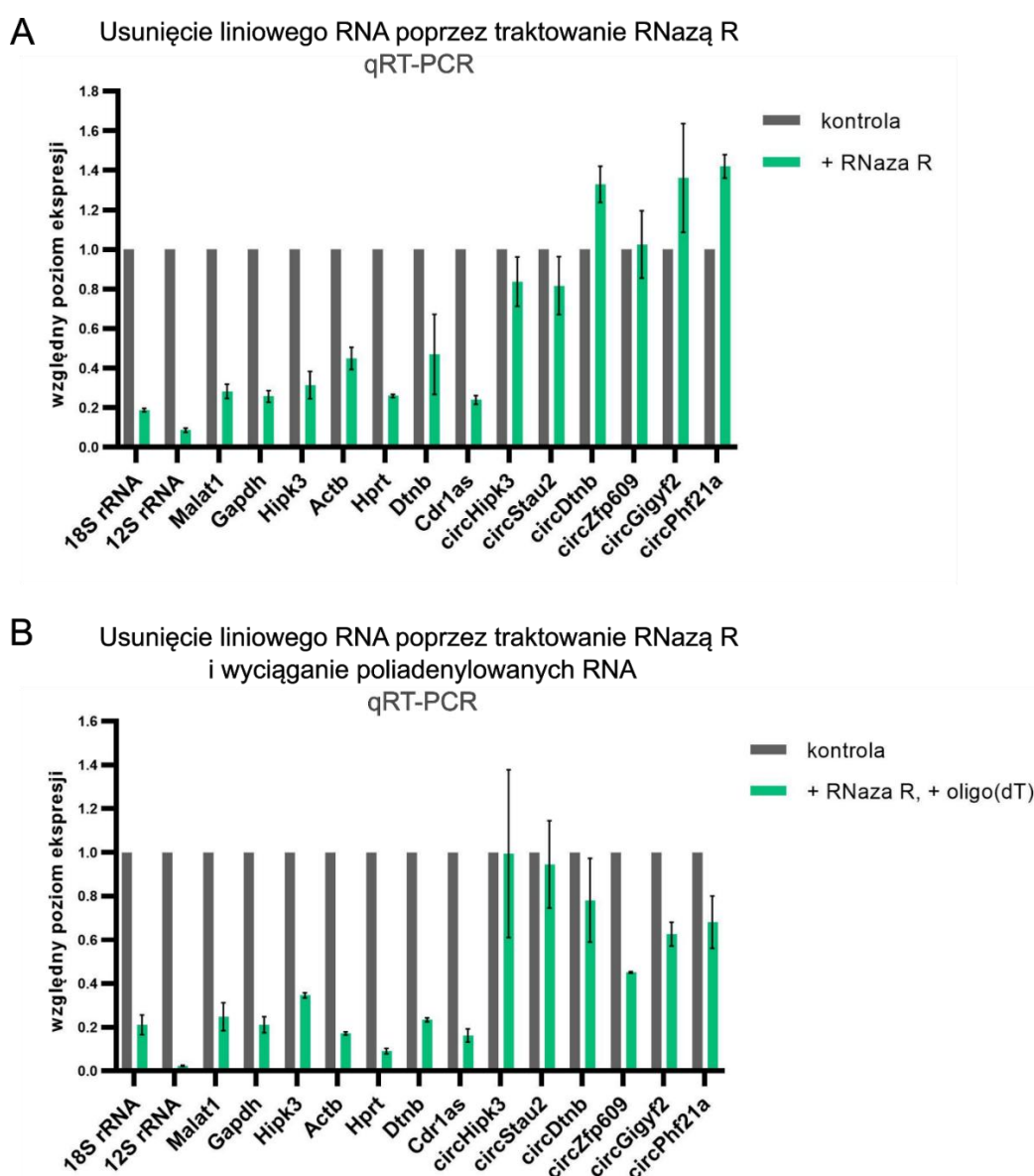
4.7.4. Usuwanie mRNA z lizatów do eksperymentu circRNA pull-down

Wcześniejsze eksperymenty RNA pull-down wykonano na lizatach mózgu, nie usuwając z nich żadnych frakcji RNA przed przystąpieniem do wzbogacania cząsteczek kolistych RNA. Większość cząsteczek circRNA jest wysoce stabilna i odporna na działanie nukleaz. Postanowiono sprawdzić, czy istnieje możliwość usunięcia frakcji mRNA z lizatu tkanki mózgowej przed właściwym eksperymentem circRNA pull down. Do tego celu użyto RNazy R, która selektywnie trawi liniowe RNA, na ogół oszczędzając cząsteczki koliste. Taki zabieg przeprowadzono w kilku pracach w celu wzbogacenia frakcji circRNA, jednakże stosowano go na oczyszczonym RNA^{217,249,250}.

Po przeprowadzeniu podstawowych optymalizacji stężenia RNazy R oraz składu soli dodawanych do lizatu (w celu zwiększenia wydajności działania nukleazy), sprawdzono skuteczność trawienia enzymatycznego. Wykazano usunięcie około 50-80% testowanych mRNA i rRNA z lizatu tkanki mózgowej po trawieniu RNAzą R (Ryc. 44A). Następnie, po trawieniu enzymatycznym, do protokołu wprowadzono etap selekcji na kulkach oligo(dT) w celu dalszej deplekcji mRNA. Zastosowanie obu kroków zwiększyło skuteczność usuwania mRNA z lizatu, a odsetek usuniętych transkryptów liniowych mieścił się w granicach 60-90% (Ryc. 44B).

Wstępne optymalizacje usuwania mRNA z lizatów tkankowych dają obiecujące wyniki i stwarzają potencjalną możliwość zastosowania tej procedury przed właściwym

eksperymentem circRNA pull-down w celu zwiększenia specyficzności wzbogacania docelowego circRNA. Należy jednak zwrócić uwagę, że przy zastosowaniu dodatkowego etapu z kulkami oligo(dT) niektóre cząsteczki circRNA również ulegały częściowemu usunięciu, w tym *circGigyl2(4,5,6,7,8)* (Ryc. 44B). Cząsteczka ta posiada w swojej sekwencji dwanaście trójnukleotydowych motywów 'AAA' oraz dodatkowo jeden dłuższy motyw 'AAAAA', co potencjalnie umożliwia jej wychwycenie na kulkach oligo(dT). Dodatkowo zaobserwowano, że pewne circRNA (np. *Cdr1as*) są częściowo trawione przez samą RNazę R (Ryc. 44A).



Rycina 44. Usuwanie liniowych cząsteczek RNA z lizatów tkanki mózgowej. Analiza qRT-PCR ekspresji wybranych cząsteczek rRNA, mRNA oraz circRNA w lizacie tkanki mózgowej po **A.** traktowaniu RNazą R i **B.** traktowaniu RNazą R połączonym z wyciąganiem mRNA za pomocą ogonów poli(A) na kulkach oligo(dT) względem kontroli nietraktowanej enzymem oraz bez dodatku oligo(dT). Wysokość słupka oznacza średnią z n = 3 powtórzeń eksperymentu, a słupki błędów standardowe.

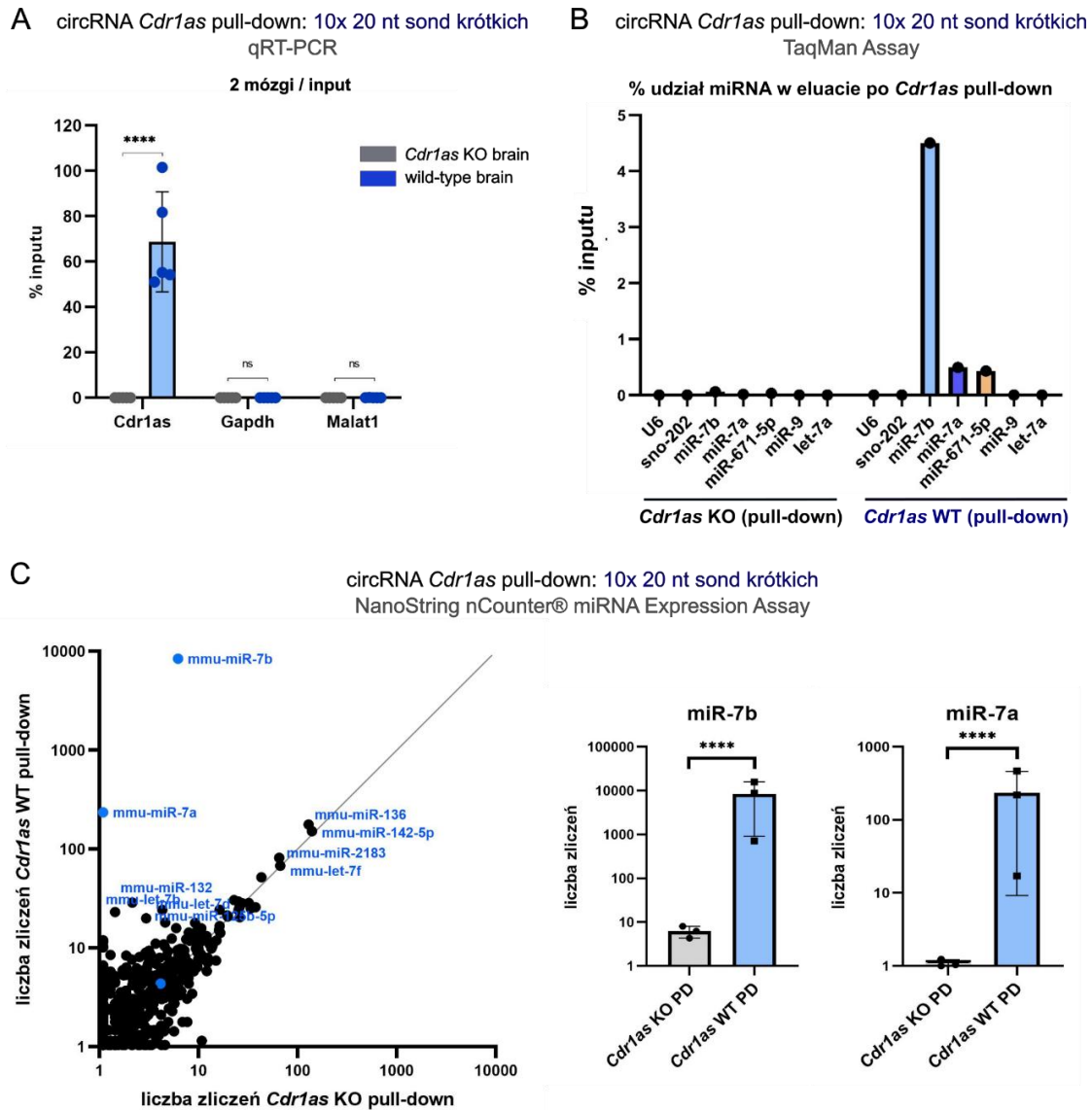
4.8. Analiza wychwytywania miRNA oraz RBP związanych do wzbogacanego circRNA

Po skutecznym opracowaniu i walidacji protokołu circRNA pull-down (cel szczegółowy numer 3), kluczowym krokiem było sprawdzenie możliwości wykorzystania tej metody do zidentyfikowania molekularnych partnerów tj. białek i miRNA wchodzących w interakcje z wybranymi circRNA *in vivo* w tkance mózgowej (cel szczegółowy numer 4). Wiedząc, że circRNA mogą pełnić funkcje regulatorowe poprzez wiązanie miRNA¹²⁵ oraz RBP^{139,140,142}, postawiono hipotezę, że badane cząsteczki circRNA mogą wykazywać specyficzny dla siebie profil oddziałujących RBP i być może również miRNA. Oczekiwano, że identyfikacja tych interaktorów dostarczy wglądu w potencjalne mechanizmy działania analizowanych circRNA i ich rolę w sieciach regulacji genów w mózgu.

4.8.1. Analizy wzbogacenia miRNA oraz białek związanych z circRNA *Cdr1as*

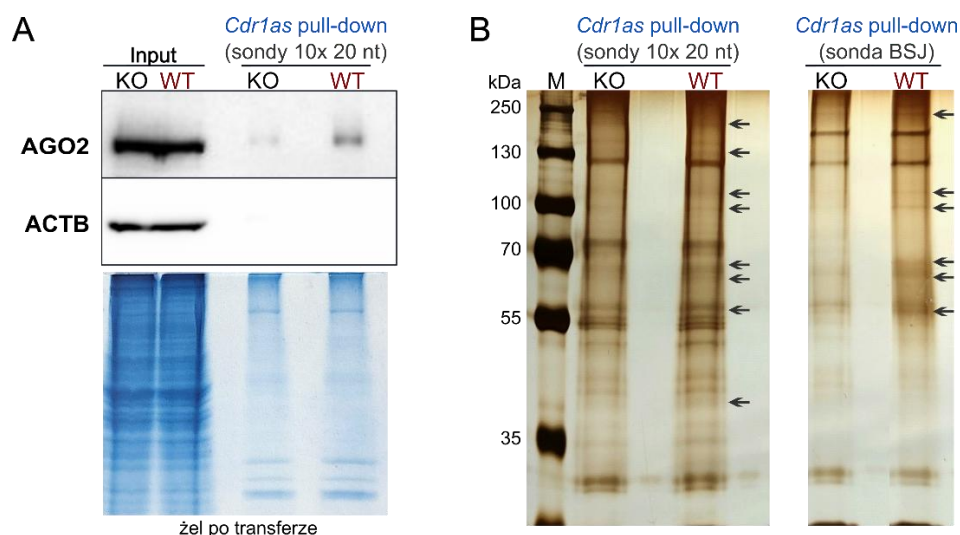
CircRNA *Cdr1as* wiąże mikroRNA miR-7 oraz białko AGO2 w mózgu¹²⁵, dlatego oczekiwano wychwycenia tych cząsteczek wraz z *Cdr1as* w eksperymencie circRNA pull-down.

Przeprowadzono dodatkowe eksperymenty *Cdr1as* pull-down z materiałem wyjściowym zwiększonym do dwóch mózgów na próbkę i uzyskano wysoki odzysk *Cdr1as*, na poziomie ~70% (Ryc. 45A). Wyniki analizy TaqMan oraz analizy ekspresji mikroRNA metodą NanoString nCounter miRNA Expression Assay potwierdziły obecność miR-7b oraz miR-7a w eluacie RNA po eksperymencie *Cdr1as* pull-down z użyciem krótkich, biotynylowanych sond DNA komplementarnych do *Cdr1as* RNA (Ryc. 45B-C).



Rycina 45. Analiza miRNA związanych z circRNA *Cdr1as* po eksperymencie RNA pull-down. **A.** Walidacja wzbogacenia (qRT-PCR) *Cdr1as* po procedurze circRNA pull-down z zastosowaniem 10-ciu komplementarnych sond DNA. Walidacje wykonano dla eksperymentów przeprowadzonych w mózgu WT i *Cdr1as* KO i porównano z materiałem wyjściowym (Input). Względne wzbogacenie *Cdr1as* obliczono jako procent transkryptu *Cdr1as* w homogenacie mózgu użytym do eksperymentu (Input). Przeprowadzono $n = 5$ niezależnych eksperymentów *Cdr1as* pull-down stosując 2 mózgi na próbę, jako materiał wyjściowy. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; ns, nieistotne, dwukierunkowa ANOVA. **B.** Analiza qPCR z sondą TaqMan obecności miRNA w eluacie po eksperymencie *Cdr1as* pull-down. Wysokość słupka oznacza średnią $n=3$ powtórzeń technicznych. **C.** Wysokoprzepustowa walidacja miRNA w eluacie po *Cdr1as* pull-down metodą Nanostring tj. hybrydyzacji z sondami swoistymi dla panelu mysich miRNA (Mouse v1.5 miRNA assay). Dane przedstawiono jako średnią ilość zliczeń znormalizowanych wobec wewnętrznych kontroli pozytywnych i negatywnych oraz genów typu HK (*Actb*, *Gapdh*, *Hprt* i *Tubb5*). $n = 3$ biologicznie niezależne próby z eksperymentów *Cdr1as* pull-down. Wykresy po prawej stronie porównują ilość odczytów dla miR-7b i miR-7a w eluacie po *Cdr1as* pull-down (PD) między mózgiem *Cdr1as* KO i WT. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; ns, nieistotne, niesparowany dwustronny t - test.

Analiza eluatu białkowego otrzymanego po eksperymencie *Cdr1as* pull-down potwierdziła obecność AGO2 (Ryc. 46A), z jednoczesnym niewielkim tłem tego białka w próbie kontrolnej *Cdr1as* knockout. Obecność tła może świadczyć o wiązaniu się AGO2 do sond użytych do wzbogacenia *Cdr1as*, lub ewentualnie do kulek użytych do wzbogacania kompleksów circRNA-białko. Barwienie srebrem białek odzyskanych z eluatów *Cdr1as* pull-down wykazało, że *Cdr1as* ma więcej potencjalnych partnerów białkowych w mózgu (Ryc. 46B). Użycie odpowiednich kontroli do eksperymentu circRNA pull-down w tkance, jest niezwykle istotne i konieczne do późniejszego odróżnienia białek/ peptydów specyficznym oddziaływającym z daną cząsteczką circRNA od niespecyficznego tła, które może się pojawić po eksperymencie (Ryc. 46A, dół; Ryc. 46B), szczególnie podczas przeprowadzania go w homogenatach tkankowych.



Rycina 46. Analiza eluatów białek po eksperymencie *Cdr1as* RNA pull-down. **A.** Western Blot z przeciwciałem anti-AGO2 w próbkach *input* i w eluatach po *Cdr1as* pull-down w mózgu WT i *Cdr1as* KO. W każdym eksperymencie użyto dwóch mózgów jako materiał wyjściowy. **B.** Barwienie srebrem białek odzyskanych po *Cdr1as* pull-down z mózgu WT i KO przy użyciu 10 sond (lewa strona) i sondy BSJ (prawa strona). Strzałki wskazują pasma białek, które różnicują próbki.

Połączenie opisanego protokołu RNA pull-down z analizą proteomiczną eluatów białkowych może przyczynić się do identyfikacji nowych, nieznanych dotąd białek-partnerów oddziałujących z ncRNA. Zastosowanie takiego podejścia może zatem pozwolić na lepsze zrozumienie funkcji słabo scharakteryzowanych ncRNA i przybliżyć ich molekularne oddziaływania w kontekście tkankowo-specyficznym. Dlatego po wstępnym wykazaniu potencjału *Cdr1as* do wiązania białek innych niż AGO2 (Ryc. 46), postanowiono zidentyfikować te interakторы za pomocą analizy LC-MS/MS. Zidentyfikowano 61 białek wykazujących wzbogacenie ($\log_2 \text{FC} > 0,1$) w eluatach po eksperymencie *Cdr1as* pull-down

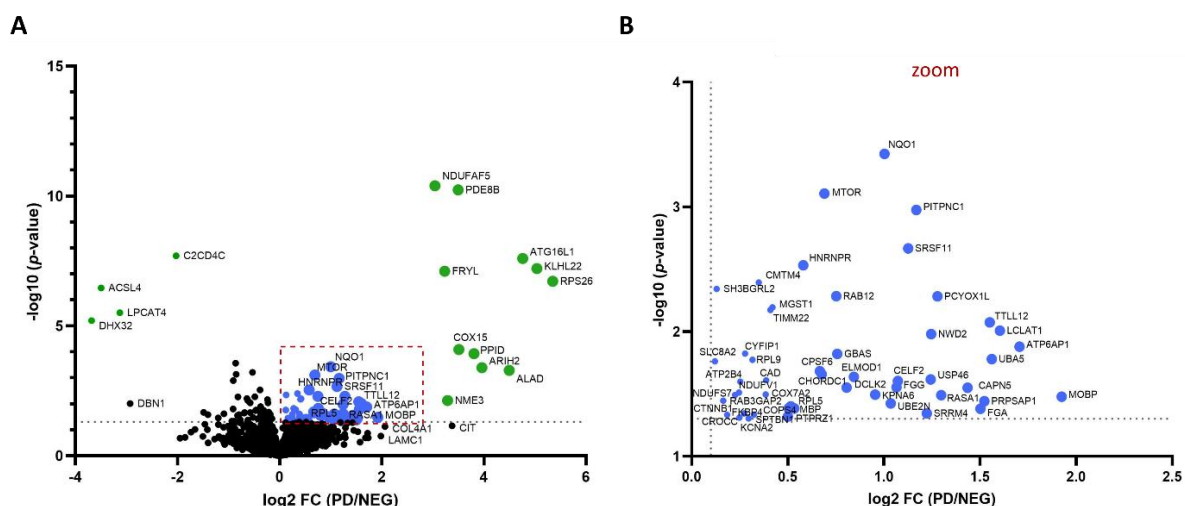
w mózgu WT względem mózgu myszy *Cdr1as* KO. Spośród nich, 11 wykryto wyłącznie w próbkach z mózgu WT (Tabela 10, Ryc. 47A-B).

Tabela 10. Białka wzbogacone w eluatach po eksperymentach *Cdr1as* pull-down.

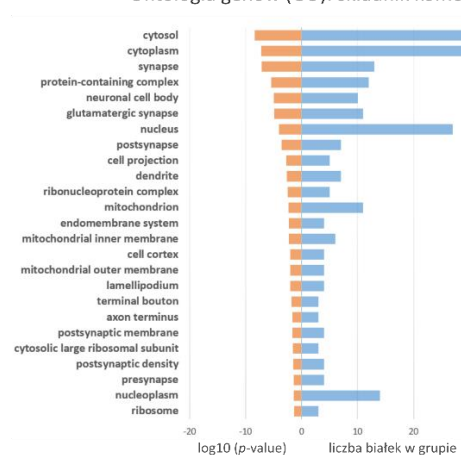
Nazwa białka	RBPbase	log2 FC (PD/NEG)	-log10 (p-value)	Nazwa białka	RBPbase	log2 FC (PD/NEG)	-log10 (p-value)
MOBP		1,92	1,48	NDUFAF5		3,04	10,39
ATP6AP1		1,71	1,88	PDE8B		3,50	10,24
LCLAT1		1,60	2,01	FRYL	+	3,23	7,10
UBA5		1,56	1,78	ALAD		4,50	3,29
TTL12		1,55	2,07	RPS26	+	5,35	6,71
PRPSAP1		1,52	1,44	COX15		3,51	4,09
FGA	+	1,50	1,38	ATG16L1		4,76	7,59
CAPN5	+	1,43	1,55	KLHL22		5,04	7,21
RASA1		1,30	1,49	PPID	+	3,81	3,93
PCYOX1L		1,28	2,28	NME3		3,29	2,12
NWD2		1,25	1,98	ARIH2		3,96	3,39
USP46		1,24	1,62				
SRRM4	+	1,22	1,34				
PITPNC1		1,17	2,98				
SRSF11	+	1,13	2,67				
CELF2	+	1,07	1,60				
FGG	+	1,07	1,55				
UBE2N	+	1,04	1,42				
NQO1		1,00	3,42				
KPNA6		0,95	1,49				
ELMOD1		0,84	1,64				
DCLK2		0,81	1,55				
GBAS		0,76	1,82				
RAB12		0,75	2,28				
MTOR	+	0,69	3,11				
CHORDC1	+	0,68	1,66				
CPSF6	+	0,67	1,68				
HNRNPR	+	0,58	2,53				
RPL5	+	0,53	1,38				
MBP		0,52	1,40				
COPS4		0,51	1,38				
PTPRZ1		0,50	1,32				
MGST1		0,42	2,19				
TIMM22		0,41	2,17				
CAD	+	0,39	1,61				
COX7A2		0,39	1,50				
CMTM4		0,35	2,39				
SPTBN1	+	0,32	1,33				
RPL9	+	0,32	1,77				
KCNA2		0,30	1,30				
CYFIP1	+	0,28	1,82				
FKBP4	+	0,27	1,34				
ATP2B4		0,25	1,60				
CROCC		0,25	1,31				
NDUFV1	+	0,25	1,51				
RAB3GAP2	+	0,23	1,49				
CTNNB1	+	0,18	1,33				
NDUFS7		0,16	1,45				
SH3BGRL2		0,13	2,34				
SLC8A2		0,12	1,76				

Pogrubioną czcionką oznaczono białka identyfikowane w analizie GO, jako synaptyczne.

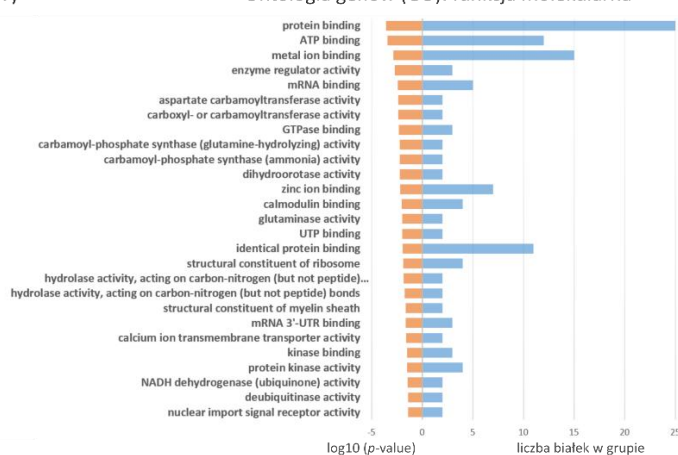
Analiza GO dla grupy 61 wzbogaconych białek ujawniła istotne statystycznie kategorie obejmujące białka cytoplazmatyczne, neuronalne i synaptyczne (w tym 11 białek powiązanych z synapsami glutaminergicznymi) oraz białka rybosomalne (Ryc. 47C). Odkrycia te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi lokalizacji *Cdr1as* w komórkach układu nerwowego^{91,92}, a także mogą być przesłanką dla wnioskowania o obecności tego kolistego RNA w zakończeniach nerwowych^{125,133}. Warto zauważyć, że wśród zidentyfikowanych 16 białek synaptycznych (Tabela 10, pogrubiona czcionka), 9 znajduje się w bazie danych *RBPbase*, w tym trzy białka rybosomalne – RPL5, RPL9 i RPS26. Ponadto wśród białek wiążących *Cdr1as* zidentyfikowano białka wiążące mRNA, jony metali, ATP oraz liczne enzymy (Ryc. 47D). Wśród zidentyfikowanych, wzbogaconych, znanych RBP posiadających kanoniczne RBD wykryto między innymi CELF2 (ang. *CUGBP, Elav-like family member 2*) oraz hnRNP R (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R*; Ryc. 47A-B i 47E-F). Mapowanie peptydów wykrytych dla tych białek w analizie LC-MS/MS ujawniło, że lokalizują się one w obrębie RBD (Ryc. 47E-F). Ponadto, opublikowane wcześniej dane CLIP-seq wskazują, że CELF2 preferencyjnie wiąże się z sekwencjami zawierającymi motyw UGU, w tym UGUA²⁵⁴ oraz UGUU²⁵⁵. Ujawniono, że sekwencja *Cdr1as* posiada 40 motywów UGU oraz po jednym motywie UGUA oraz UGUU, co może dodatkowo wspierać hipotezę o wiązaniu CELF2 z kolistym RNA *Cdr1as* (Ryc. 47G). Jednakowoż, wiązanie CELF2 w obrębie sekwencji *Cdr1as* oczekuje na dalszą walidację i potwierdzenie inną niż circRNA pull-down metodą badawczą. Podobnie, interesujące będzie dalsze zbadanie, jaka jest rola kompleksów CELF2:*Cdr1as* RNA w komórkach nerwowych.



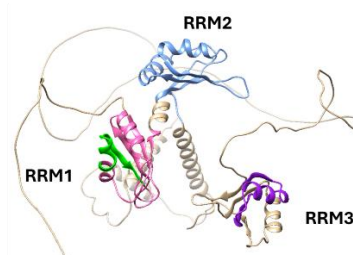
C Ontologia genów (GO): składnik komórkowy



D Ontologia genów (GO): funkcja molekularna

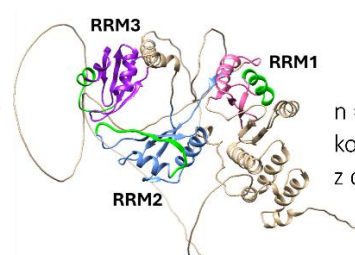


E **CELF2**



n = 1 peptyd (zielony)
koresponduje
z domena RRM1

F hnRNP R



n = 3 peptydy (zielone)
korespondują
z domenami RBM

G >mmu circ 0001878|NM 001166658|Cdr1

[illegible]

Opis Ryciny 47 znajduje się na stronie 133.

Rycina 47. Identyfikacja białek związanych z circRNA *Cdr1as* metodą spektrometrii mas.

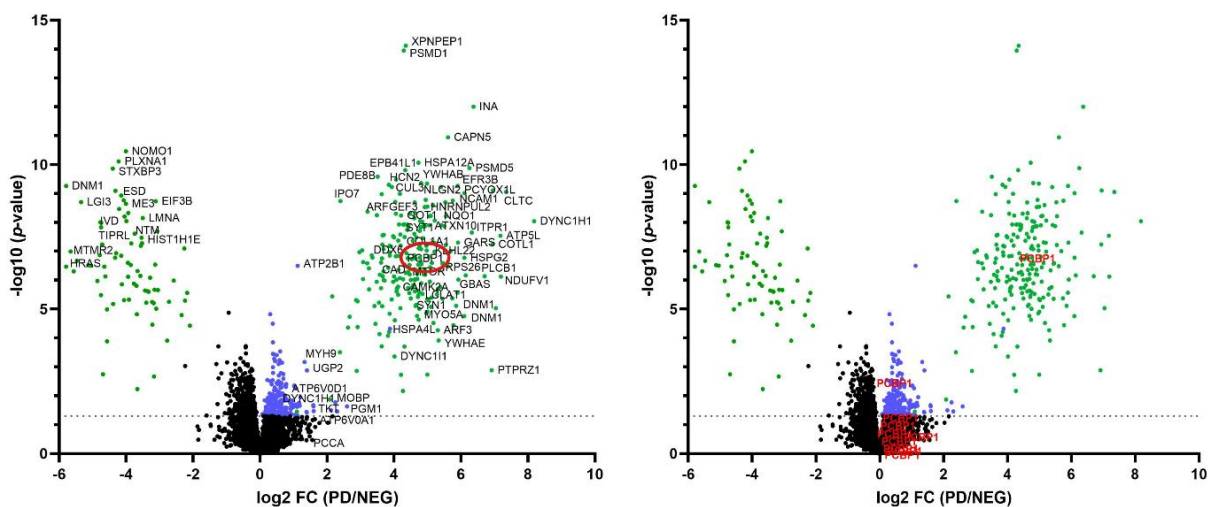
A. Wykres *volcano* pokazujący analizę białek zidentyfikowanych w pomiarach spektrometrii mas po eksperymencie *Cdr1as* pull-down w mózgu WT (PD) względem kontroli negatywnej, czyli mózgu *Cdr1as* KO (NEG). $n = 4$ powtórzenia (eluaty białek po RNA pull-down z czterech różnych eksperymentów) poddano pomiarom MS. Niebieskie kropki oznaczają białka wzbogacone po pull-down z $\log_2 FC > 0,1$, wartość $p < 0,05$, a zielone - białka zidentyfikowane unikalnie w po pull-down w mózgu WT. **B.** Powiększenie (zoom) części wykresu a punktu A. dla białek wzbogaconych po *Cdr1as* pull-down. **C.** Analiza GO (DAVID) składników komórkowych dla $n = 61$ białek wzbogaconych po *Cdr1as* pull-down. Wartość $p < 0,005$, tło: proteom z mózgu myszy. **D.** Analiza GO funkcji molekularnych dla $n = 61$ białek wzbogaconych, zidentyfikowanych metodą LC-MS/MS po *Cdr1as* pull-down. wartość $p < 0,005$, tło: proteom mózgu myszy. **E.** Struktura białka CELF2 uzyskana za pomocą programu AlphaFold, z trzema domenami RRM oznaczonymi kolorami. Kolor zielony - peptyd zidentyfikowany w analizie *Cdr1as* pull down. **F.** Struktura białka hnRNP R uzyskana za pomocą programu AlphaFold, z oznaczonymi kolorami trzema domenami RRM. Kolor zielony - peptydy zidentyfikowane w MS. **G.** Sekwencja *Cdr1as* (2927 nt) z oznaczonymi znanymi motywami sekwencyjnymi rozpoznawanymi przez CELF2.

Wiele białek w analizie LC-MS/MS po *Cdr1as* pull-down zostało zidentyfikowanych na podstawie wykrycia licznych peptydów. Celem dokładniejszego wglądu w uzyskane dane przygotowano wykres typu *volcano* przedstawiający wszystkie wykryte i wzbogacone peptydy ($n = 442$; $\log_2 FC > 0,1$), zidentyfikowane w eksperymencie pull-down (Ryc. 48A). Wśród peptydów zidentyfikowanych wyłącznie w próbie pull-down z mózgu WT (niewykrytych w kontroli negatywnej - myszy *Cdr1as* KO) znalazł się peptyd należący do znanego RBP - PCBP1 (Ryc. 48A, lewa strona). Łącznie dla białka PCBP1 zidentyfikowano 11 peptydów, spośród których jeden wykazywał silne wzbogacenie po *Cdr1as* pull-down (Ryc. 48A, prawa strona). Ze względu na wcześniejsze obserwacje dotyczące zmian w interakcjach PCBP1 z RNA w mózgu z defektem mielinizacji²²⁸, a także na fakt, że PCBP1 jest znanym białkiem wiążącym RNA, jego potencjalne oddziaływanie z *Cdr1as* stało się przedmiotem szczególnego zainteresowania. PCBP1 rozpoznaje przede wszystkim sekwencje bogate w cytozyny i motywy bogate w UC oraz dłuższe motywy jak UUUCCC w RNA²⁵⁶. Sprawdzono, czy te znane motywy znajdują się w obrębie sekwencji *Cdr1as*, potwierdzając obecność 463 motywów UC i 2 motywów UUUCCC (Ryc. 48B). Zmapowano lokalizację wzbogaconego peptydu na strukturę białka PCBP1 i stwierdzono, że lokalizuje się on w obrębie domen wiążących RNA – KH1 i KH2 (Ryc. 48C). Obecność PCBP1 w eluacie po *Cdr1as* pull-down potwierdzono metodą Western blot (Ryc. 48D). Uzyskane wyniki dostarczają dowodów na swoistą interakcję *Cdr1as* z białkiem PCBP1, która prawdopodobnie zachodzi poprzez jego domeny KH wiążące RNA, co zostało potwierdzone zarówno na poziomie identyfikacji wzbogaconych peptydów,

jak i całego białka. Tak, jak w przypadku CELF2, i tutaj dalsze badania są niezbędne, by określić znaczenie kompleksów PCBP1:*Cdr1as* w komórkach nerwowych.

Podsumowując, zastosowanie połączonego podejścia opartego na circRNA pull-down i proteomice umożliwiło identyfikację szeregu białek oddziałujących z *Cdr1as* w mózgu myszy. Analiza proteomiczna ujawniła wzbogacenie białek o funkcjach cytoplazmatycznych, neuronalnych, synaptycznych, co jest zgodne z dotychczasową wiedzą na temat lokalizacji i potencjalnych funkcji *Cdr1as* w komórkach nerwowych. Istotne jest odkrycie interakcji *Cdr1as* z białkiem PCBP1, znanym regulatorem potranskrypcyjnym, która to interakcja zachodzi prawdopodobnie poprzez domeny KH wiążące RNA. Wyniki te sugerują, że *Cdr1as* może odgrywać rolę w modulowaniu aktywności PCBP1 (lub jego aktywność i lokalizacja może być modulowana przez to białko) w komórkach mózgu, co otwiera nowe ścieżki do badania funkcji tego kolistego RNA w kontekście procesów neuronalnych i/ lub potencjalnych zaburzeń patologicznych. Ciekawym faktem jest również identyfikacja grupy białek synaptycznych, po *Cdr1as* pull-down. Większość tych białek nie posiada klasycznych RBD. Jednakże, wyniki uzyskane w XRNAX²²⁸ a także w pCLAP²⁰¹ wskazują na potencjalną możliwość wiązania RNA przez niektóre białka synaptyczne. Łącznie, wyniki te otwierają drogę do poznania nieznanych dotąd mechanizmów regulacji białek synaptycznych poprzez ich oddziaływanie z RNA, w tym z circRNA.

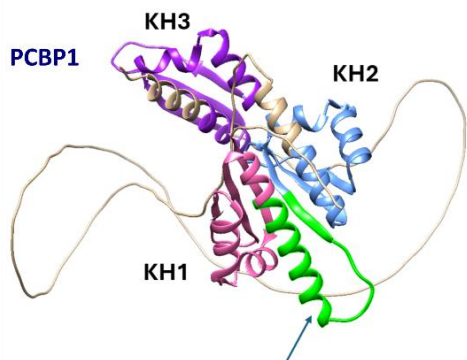
circRNA *Cdr1as* pull-down: 10x 20 nt sond krótkich
Analiza LC-MS/MS - peptydy



B >mmu_circ_0001878|NM_001166658|Cdr1

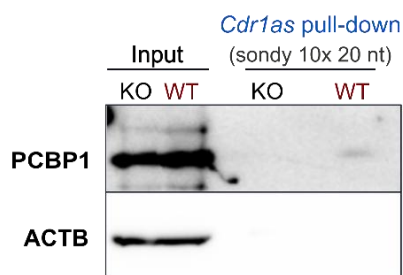
[illegible]

C



n = 1 wzbogacony peptyd (zielony) koresponduje z domenami KH

D



Rycina 48. Cdr1as wiąże białko PCBP1 w tkance mózgowej. A. Wykres typu *volcano* pokazujący peptydy wzbogacone po eksperymencie *Cdr1as* pull-down w mózgu WT (PD) względem kontroli negatywnej, czyli mózgu *Cdr1as* KO (NEG). n = 4 powtórzenia biologiczne. Niebieskie kropki oznaczają peptydy wzbogacone po pull-down n = 219 z $\log_2 \text{FC} > 0,1$, wartość $p < 0,05$, a zielone – peptydy zidentyfikowane unikalnie w po pull-down w mózgu WT (n = 223). Po prawej stronie umieszczono ten sam wykres, z zaznaczonymi peptydami zidentyfikowanymi dla PCBP1 (n = 11). **B.** Sekwencja *Cdr1as* z oznaczonymi motywami sekwencyjnymi potencjalnie rozpoznawanymi przez PCBP1. **C.** Przewidywana struktura białka PCBP1 uzyskana za pomocą

programu AlphaFold, z oznaczonymi kolorami trzema domenami KH. Peptyd wzbogacony, zidentyfikowany w MS (kolor zielony) nałożono na domeny KH w programie Chimera 1.18. **D.** Western Blot z przeciwciałem anty-PCBP1 w próbkach *input* i w eluatach po *Cdr1as* pull-down w mózgu WT i *Cdr1as* KO. W każdym eksperymencie użyto dwóch mózgów jako materiał wyjściowy.

4.8.2. Analiza miRNA oraz RBP oddziałujących z innymi wybranymi circRNA

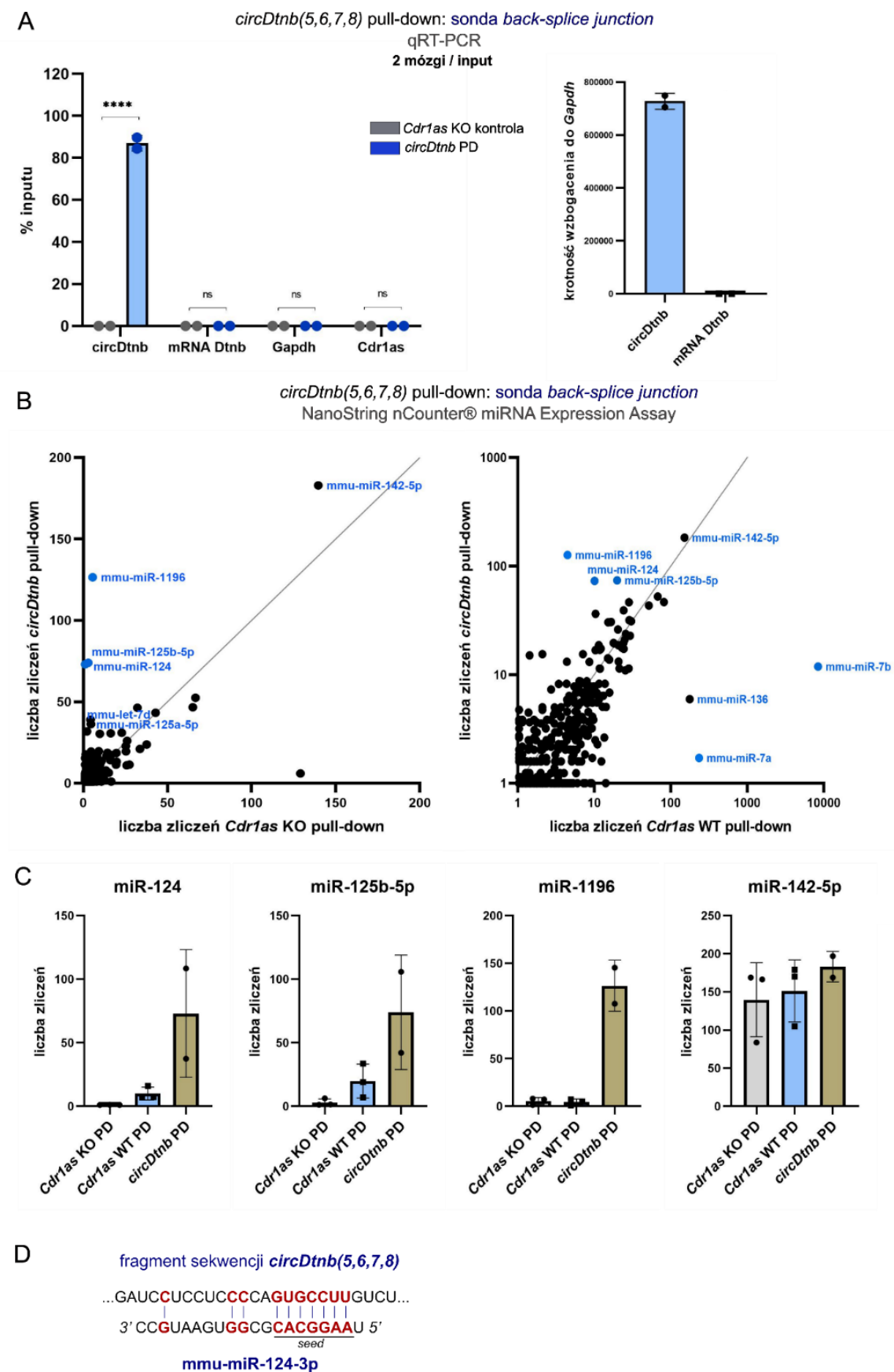
Wyniki omówione w powyższych sekcjach na przykładzie *Cdr1as*, potwierdziły możliwość wykorzystania protokołu circRNA pull-down do badania natywnych oddziaływań kolistych RNA z miRNA i białkami. Postanowiono sprawdzić użyteczność tej metody do badań innych endogennych cząsteczek circRNA.

Z uwagi na fakt, że procedura circRNA pull-down okazała się szczególnie wydajnie (~30% wzbogacenia) i swoście (brak mRNA po circRNA pull-down) wzbogacać *circDtnb(5,6,7,8)*, wykonano dodatkowe eksperymenty pull-down dla tej cząsteczki. Dotychczasowe doniesienia na temat *circDtnb* są nieliczne. Praca Wang i wsp.²⁵⁷ zidentyfikowała *circDtnb* w mysim modelu ciężkiego ostrego zapalenia trzustki (SAP), sugerując, że może on uczestniczyć w rozwoju tej choroby poprzez regulację transdukcji sygnału wapniowego. Zaproponowano, iż *circDtnb* oddziałując z miR-6938-3p, wpływa na regulację ekspresji genu *Calb1*, choć autorzy wskazali, że rola ta wymaga dalszej weryfikacji.

Celem charakterystyki *circDtnb(5,6,7,8)* w mózgu myszy wykonano eksperymenty circRNA pull-down ze zwiększonym materiałem wyjściowym (dwa mózgi na próbkę), co zwiększyło odzysk docelowego RNA w eluacie do ~80% względem materiału wyjściowego (Ryc. 49A). Analizy ekspresji miRNA metodą NanoString nCounter miRNA Expression Assay ujawniły kilka miRNA, miR-1196, miR-124 i miR-125, jako potencjalne cząsteczki oddziałujące z *circDtnb(5,6,7,8)* (Ryc. 49B-C). Zauważono również, że miR-142-5p ma wysoką liczbę zliczeń w eluatach po wszystkich trzech eksperymentach circRNA pull-down tj. dla *circDtnb* oraz *Cdr1as* w mózgu KO i WT (Ryc. 49B-C), co może świadczyć o tym, że wiąże się on niespecyficznie np. z kulkami wykorzystywanymi podczas eksperymentu.

Sprawdzono, czy *circDtnb(5,6,7,8)* posiada miejsca wiązania dla miRNA. Przewidywane miejsce wiązania potwierdzono dla *miR-124*; analiza wykazała komplementarność 7 nukleotydów regionu 'seed' tej cząsteczki miRNA do sekwencji *circDtnb(5,6,7,8)* oraz dodatkowe pojedyncze parowania zasad w pozycjach 11, 12 i 18 *miR-124* (Ryc. 49D).

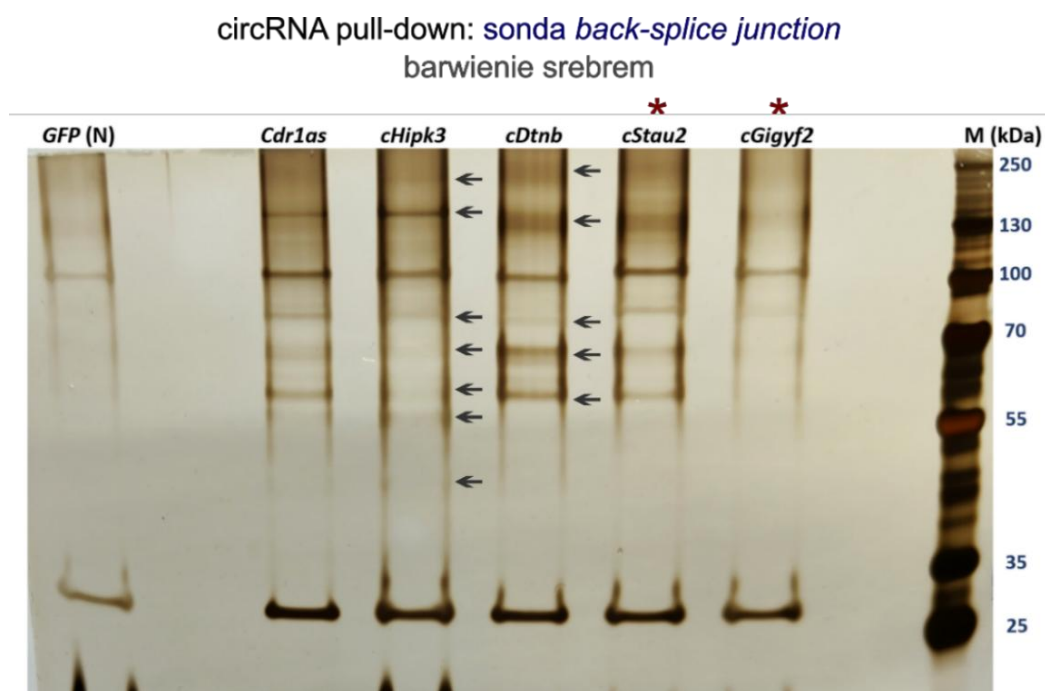
MiR-124-3p jest zachowanym ewolucyjnie miRNA i, zgodnie z *miRNA Tissue Atlas* 2025²⁵⁸, czwartym pod względem poziomu ekspresji miRNA w mózgu myszy. Odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu neuronów i regulacji funkcji synaptycznych. MiR-124 wpływa na ekspresję białek ważnych dla struktury i działania synaps, przyczyniając się do precyzyjnego dostrajania przekazywania sygnałów nerwowych, a także jest czynnikiem inicjującym zmiany metaboliczne na początkowym etapie neurogenezy^{256–261}. *CircDtnb(5,6,7,8)* jest wzbogacony w synapsach⁹², a koliste RNA mogą modulować funkcje miRNA poprzez ich wiązanie i stabilizację^{125,133}. Otrzymane wyniki wskazują na wiązanie miR-124 do *circDtnb(5,6,7,8)*, co może sugerować udział tej kolistej cząsteczki RNA w regulowaniu miR-124. Jednakże, określenie dokładnej roli i mechanizmu tego oddziaływania wymaga dalszych, szczegółowych badań.



Rycina 49. Analizy miRNA w eluatach po eksperymencie circRNA pull-down dla *circDtnb*(5,6,7,8). A Walidacja qRT-PCR wzbogacenia *circDtnb*(5,6,7,8) jako procent wyjściowego RNA

w homogenacie po procedurze RNA pull-down z zastosowaniem sondy BSI komplementarnej z *circDtnb(5,6,7,8)* w mózgu WT i kontrolnego eksperymentu z sondą *Cdr1as* w mózgu *Cdr1as* KO. Względne wzbogacenie *circDtnb(5,6,7,8)* obliczono jako procent danych wyjściowych/ input (po lewej) lub jako krotność wzbogacenia circRNA względem *Gapdh* (po prawej). Przeprowadzono $n = 2$ biologicznie niezależne eksperymenty *circDtnb(5,6,7,8)* pull-down z dwoma mózgami, jako materiał wyjściowy. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; ns, nieistotne, dwukierunkowa ANOVA. **B.** Wysokoprzepustowa walidacja miRNA w eluacie po *circDtnb(5,6,7,8)* pull-down metodą hybrydyzacji z sondami swoistymi dla panelu cząsteczek miRNA (analiza Mouse v1.5 miRNA assay została przeprowadzona, jak na Ryc. 45 a opis eksperymentu został umieszczony w sekcji „Materiały i metody”). $n = 2$ biologicznie niezależne eksperymenty *circDtnb(5,6,7,8)*. Wyniki odniesiono do analiz miRNA, uzyskanych po *Cdr1as* pull-down w mózgu KO (lewa strona) i WT (prawa strona) **C.** Wykresy przedstawiające porównanie ilości odczytów uzyskanych w analizie z punktu B dla miR-124 i miR-125, miR-1196 i miR-142 w eluatach po *circDtnb(5,6,7,8)* pull-down i *Cdr1as* pull-down w mózgu KO i WT. **D.** Analiza wiązania miR-124 z *circDtnb(5,6,7,8)*.

Następnie przeprowadzono pilotowe analizy mające na celu określenie, czy badane cząsteczki circRNA mogą wiązać białka. W tym celu białka pozyskane z eluatów po eksperymentach pull-down dla: *circHipk3(2)*, *circDtnb(5,6,7,8)*, *circStau2(2,3,4,5)* i *circGigyl2(4,5,6,7,8)*, jak również dla kontroli negatywnej (pull-down z sondą anty-*gfp*) i pozytywnej (pull-down dla *Cdr1as*), rozdzielono elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym, a następnie wybarwiono srebrem. Wizualna inspekcja żelu ujawniła liczne różnice w profilu białkowym prób z eksperymentów *circHipk3(2)* i *circDtnb(5,6,7,8)* pull down, a kontrolą negatywną, co sugeruje oddziaływanie tych cząsteczek circRNA z białkami (Ryc. 50). Wybarwiono również białka uzyskane po eksperymentach circRNA pull-down dla *circStau2(2,3,4,5)* i *circGigyl2(4,5,6,7,8)*, należy jednak przypomnieć, że w eksperymentach tych, wraz z cząsteczkami circRNA, wzbogaceniu uległy również ich mRNA. W związku z tym widoczne prążki białkowe mogą reprezentować białka oddziałujące także (lub wyłącznie) z liniowymi izoformami.



Rycina 50. Barwienie srebrem białek z eluatów po eksperymentach circRNA pull-down.

Białka z eluatów po eksperymentach pull-down barwiono srebrem, jak opisano w sekcji „Materiały i Metody”. Strzałki wskazują białka różnicujące między circRNA pull-down a kontrolą negatywną (*gfp* pull-down). Gwiazdki wskazują eksperymenty circRNA pull-down, w których poza kolistymi RNA odzyskano także mRNA.

Łącznie, uzyskane wyniki potwierdzają, że cząsteczki circRNA wzbogacone w mózgu i zakończeniach synaptycznych mogą wiązać białka oraz mogą oddziaływać z miRNA. Potwierdzają również, że opracowany protokół circRNA pull-down jest wysoce przydatny do badania oddziaływań w kompleksach circRNA-miRNA-białko oraz poznawania wynikających z nich funkcji. Przeprowadzone analizy pozwoliły zidentyfikować nowe białka wiążące się do *Cdr1as*, a także ujawniły oddziaływanie *circDtnb*(5,6,7,8) (cząsteczki wzbogaconej w zakończeniach nerwowych) z mikroRNA miR-124-3p, znanym z udziału w regulacji funkcji synaptycznych. Te nowe odkrycia wskazują na prawdopodobną funkcję kolistych RNA w synapsach, która może polegać na stabilizacji oddziałujących z nimi białek i cząsteczek miRNA, co z kolei może modulować ich aktywność.

5. Dyskusja

Złożona sieć oddziaływań pomiędzy cząsteczkami RNA a białkami odgrywa fundamentalną rolę w regulacji ekspresji genów i utrzymaniu homeostazy komórkowej, szczególnie w tak skomplikowanym środowisku, jakim jest tkanka mózgowa. Pomimo rosnącej świadomości znaczenia tych interakcji, ich kompleksowe badanie *in vivo*, zwłaszcza w kontekście specyficznych typów RNA, takich jak koliste RNA, oraz w stanach patologicznych, wciąż stanowi istotne wyzwanie metodologiczne. Niniejsza rozprawa doktorska została podjęta w celu sprostania tym wyzwaniom, koncentrując się na głównym zadaniu, jakim było opracowanie i zastosowanie metod umożliwiających wszechstronną charakterystykę oddziaływań RNA-białko w tkance mózgowej myszy. Realizacja tego nadrzędnego celu obejmowała, po pierwsze, adaptację i optymalizację metody XRNAX do analizy globalnych interakcji RNA-białko w materiale tkankowym, a następnie jej wykorzystanie do identyfikacji zmian w tych oddziaływaniach w mysim modelu defektu mielinizacji. Równolegle, kluczowym aspektem pracy było opracowanie nowatorskiego protokołu circRNA pull-down, dedykowanego badaniu specyficznych interakcji wybranych kolistych RNA z ich partnerami białkowymi oraz miRNA, co miało na celu przybliżenie ich potencjalnych funkcji w komórkach układu nerwowego. W niniejszej dyskusji szczegółowo omówione zostaną wyniki uzyskane w toku realizacji wyżej wymienionych celów badawczych, ze szczególnym uwzględnieniem: charakterystyki białek wiążących RNA w zdrowej tkance mózgowej myszy, zrozumienia jakościowych zmian w interakcjach RNA-białko w procesie demielinizacji (w odniesieniu do stanu prawidłowego), a także dla naświetlenia potencjalnych funkcji circRNA w mózgu.

5.1. Rozważania na temat zastosowania XRNAX do badania interakcji RNA-białko w tkankach

Metoda XRNAX (ang. *protein-crosslinked RNA extraction*)²⁰⁷ stanowi cenne narzędzie dedykowane badaniu interaktomu RNA-białko. Jej fundament opiera się na sieciowaniu *in vivo* interakcji RNA-białko promieniowaniem UV, a następnie, po lizie komórek, na izolacji i oczyszczaniu kompleksów RNA-białko z interfazy po separacji organicznej faz. Pierwotnie, protokół ten został z sukcesem zastosowany przez Trendela i współpracowników do badania zmian w proteomie związanym z RNA w odpowiedzi na stres komórkowy (indukowany arseninem) w hodowlach komórkowych, ukazując jego potencjał w odkrywaniu globalnych rearanżacji oddziaływań RNA-białko²⁰⁷.

W niniejszej pracy doktorskiej podjęto wyzwanie adaptacji i optymalizacji metody XRNAX do analizy interakcji RNA-białko bezpośrednio w złożonym materiale, jakim jest tkanka mózgowa myszy. Praca z tkankami, w odróżnieniu od homogennych, jednowarstwowych hodowli komórkowych, stwarza dodatkowe wyzwania. Po pierwsze, dotyczą one efektywnej homogenizacji przy jednoczesnym zachowaniu natywnych interakcji molekularnych i minimalizacji degradacji składników kompleksu RNA-białko. Po drugie, problemem jest wydajność sieciowania UV w materiale tkankowym po homogenizacji, gdyż światło UV o długości 254 nm przenika efektywnie jedynie przez kilka warstw komórek²³⁰. Kluczowym etapem optymalizacji była ocena skuteczności naświetlania UV w sieciowaniu kompleksów RNA-białko w homogenatach mózgu myszy przygotowanych dwiema różnymi metodami: metodą homogenizacji mechanicznej z użyciem homogenizatora Dounce'a (metoda H) oraz metodą kriogenicznego proszkowania tkanki, czyli biopulweryzacji (metoda B). Jak szczegółowo opisano w sekcji wyników (Ryc. 21-22), analizy porównawcze wykazały, że biopulweryzacja (metoda B) zapewniała lepsze zachowanie integralności RNA po sieciowaniu UV, minimalizując problem degradacji RNA obserwowany przy użyciu homogenizatora Dounce'a w połączeniu z sieciowaniem UV oraz pozwoliła na efektywną akumulację kompleksów RNA-białko w interfazie po organicznej separacji faz. Wnioski te jednoznacznie wskazały, że biopulweryzacja jest metodą homogenizacji bardziej odpowiednią i niezawodną dla protokołu XRNAX oraz potencjalnie innych metod wykorzystujących naświetlanie UV tkanki mózgowej do analizy kompleksów RNA-białko²²⁸. Pozwala ona na zachowanie integralności RNA oraz, co za tym idzie, fizjologicznie istotnych interakcji RNA-białko, minimalizując artefakty związane z degradacją. Dlatego też biopulweryzacja została wybrana jako optymalna metoda przygotowania prób tkankowych do dalszych eksperymentów XRNAX.

Zastosowanie zoptymalizowanego protokołu XRNAX, poprzedzonego biopulweryzacją, w mózgu myszy typu dzikiego pozwoliło na identyfikację i charakterystykę RBPomu. Analiza proteomiczna metodą LC-MS/MS ekstraktów XRNAX²²⁸ zaowocowała identyfikacją łącznie 666 białek, z czego 109 wykazało istotne wzbogacenie w próbkach poddanych sieciowaniu UV w porównaniu do prób kontrolnych nienaświetlanych UV (Ryc. 24). Zgodnie z oczekiwaniami, około 80% tych specyficznie wzbogaconych białek stanowiły znane, kanoniczne RBP, w tym liczne białka rybosomalne, jądrowe oraz, co istotne dla tkanki mózgowej, białka synaptyczne. Identyfikacja peptydów zlokalizowanych w obrębie RBD lub w ich bezpośrednim sąsiedztwie dodatkowo potwierdziła specyficzność metody w wychwytywaniu regionów białkowych zaangażowanych w kontakt z RNA²²⁸. Te odkrycia nie tylko walidują skuteczność

zoptymalizowanego protokołu w specyficznym odzyskiwaniu RBP, ale również wskazują na jego potencjał w odkrywaniu nowych, niekanonicznych interakcji RNA-białko, takich jak te zidentyfikowane dla białek synaptycznych SLC1A2 czy NRG1.

Wykazana specyficzność odzyskiwania RBP w procedurze XRNAX w mózgu WT otworzyła drogę do dalszego wykorzystania tej metody w bardziej złożonym kontekście badawczym. Zastosowano ją zatem do analizy interaktomu RNA-RBP w mózgu myszy *shiverer*, modelu charakteryzującego się deficytem mieliny w OUN, aby zbadać, czy i jakie zmiany w oddziaływaniach RNA-białko można zidentyfikować przy użyciu tej metody w kontekście patologii. W mózgach myszy *shiverer* metoda XRNAX pozwoliła na identyfikację 633 białek, z czego 125 było wzbogaconych w porównaniu z próbkami kontrolnymi bez naświetlania UV (Ryc. 28); zbiór ten częściowo pokrywał się z RBPomem zidentyfikowanym w mózgu WT, a metoda również w tym modelu wykazała specyficzność względem odzyskiwania RBP. Uzyskane dane z XRNAX w modelu *shiverer* dostarczyły cennych spostrzeżeń na temat potencjalnych zmian molekularnych związanych z tą patologią. Analiza GO białek istotnie wzbogaconych po XRNAX w mózgach *Shi* (n = 125) wykazała, że kategoria funkcjonalna związana z tworzeniem cytoplazmatycznych granul stresu była istotnie statystycznie wzbogacona (Ryc. 29). Co więcej, większość RBP związanych z granulami cytoplazmatycznymi, takich jak DDX1, CAPRIN1, PABPC1 oraz PCBP1, wykazywała silniejsze wzbogacenie w oddziaływaniach z RNA w mózgach *shiverer* niż w mózgach WT, mimo że ich całkowity poziom ekspresji nie różnił się znacząco między genotypami. Ponadto, analiza GO pod kątem procesów biologicznych wyników XRNAX dla mózgu *Shi* ujawniła obecność licznych RBP zaangażowanych w proces alternatywnego splicingu, które wykazywały zmieniony stopień wzbogacenia w mózgu *shiverer* w porównaniu do WT (Ryc. 30), w tym MBNL1. Łącznie dane te sugerują, że XRNAX jest w stanie wykrywać jakościowe zmiany w profilu wiązania RNA przez RBP, niezależne od zmian w ich całkowitej ilości. Zidentyfikowane przez XRNAX zmiany, dotyczące zaangażowanych w granule cytoplazmatyczne i biorących udział w regulacji splicingu, mogą odzwierciedlać zaburzenia na poziomie molekularnym towarzyszące demielinizacji i przyczyniać się do obserwowanego fenotypu. Co istotne, dzięki zastosowaniu XRNAX zarówno w mózgu WT, jak i *shiverer*, zidentyfikowano również kilka interesujących białek jako kandydatów na nowe RBP, tj. białka, które nie były wcześniej klasyfikowane jako wiążące RNA, a mimo to uległy istotnemu wzbogaceniu w tej procedurze.

Aby pełniej ocenić specyfikę i wartość protokołu XRNAX, istotne jest jego porównanie z innymi niedawno opracowanymi metodami globalnej identyfikacji RBP w tkankach, takimi jak pCLAP²⁰¹ i eRIC¹¹, które również zastosowano do badania oddziaływań RNA-białko w mózgu myszy. Obie prace zostały opublikowane w 2023 roku i są to pionierskie doniesienia na temat natywnych oddziaływań RNA-białko w tkankach, które stanowiły istotny punkt odniesienia dla badań przedstawionych w niniejszej dysertacji. Podstawowe różnice techniczne między tymi metodami a XRNAX (Tabela 9), szczególnie w zakresie przygotowania tkanki przed sieciowaniem UV oraz strategii izolacji kompleksów RNA-białko, prawdopodobnie przyczyniają się do obserwowanego, stosunkowo niewielkiego pokrycia zbiorów RBP identyfikowanych przez każdą z nich (Ryc. 36). Sugeruje to istnienie obciążeń metodycznych związanych z każdą z tych metod.

Jak wskazano w sekcji wyników, metoda XRNAX pozwoliła na identyfikację mniejszej liczby RBP w porównaniu do eRIC i pCLAP. Niemniej jednak, XRNAX wyróżnia się kilkoma istotnymi zaletami. Przede wszystkim, jest to protokół stosunkowo najprostszy i najbardziej bezpośredni. Kluczowym atutem jest tu szybkie i proste przygotowanie próbki poprzez biopulweryzację, co, jak wykazano, zapewnia zachowanie integralnych interakcji RNA-białko *in vivo* oraz uzyskanie powtarzalnych wyników. Homogenizacja i liza tkanki mózgowej w buforze, jak w metodzie pCLAP²⁰¹, stanowi bardziej inwazyjną obróbkę badanego materiału i obarczoną błędem degradacji materiału RNA i prawdopodobieństwem wystąpienia wiązań niespecyficznych, które mogą pojawić się po uwolnieniu makromolekuł z komórek do lizatów. Takie problemy z degradacją RNA wykazano dla metody XRNAX w przypadku zastosowania homogenizacji metodą Dounce'a w PBS. Z kolei przygotowanie setek skrawków zamrożonej tkanki przed naświetlaniem UV, jak w eRIC¹¹, i ich późniejsze łączenie w pojedynczą próbkę, jest niezwykle czasochłonne. Zachowanie integralności kompleksów RNA-białko, czyni XRNAX szczególnie atrakcyjnym narzędziem do badań, gdzie priorytetem jest analiza zmian jakościowych w interakcjach RNA-białko. Co więcej, istotną przewagą XRNAX może być jego zdolność do jednoczesnego przechwytywania kompleksów RNA-białko zawierających wszystkie biotypy RNA w jednym etapie izolacji z interfazy poorganicznej separacji faz. Dla porównania, pCLAP²⁰¹ bazuje na izolacji peptydów związanych z poliadenylowanymi cząsteczkami RNA, które są wychwytywane przy użyciu kulek oligo(dT), a eRIC¹¹, choć umożliwia analizę interakcji z niepoliadenylowanymi RNA, wymaga do tego celu osobnych, dodatkowych procedur po wstępnym przechwyceniu kompleksów mRNA-białko, co podnosi stopień skomplikowania protokołu.

Warto również wspomnieć o najnowszym, opublikowanym w roku 2024 osiągnięciu w dziedzinie badań interakcji RNA-białko *in vivo* w tkance, czyli metodzie HARD-AP²⁰⁵. Podejście to, wykorzystujące specjalnie zaprojektowane białko HARD o wysokim, niezależnym od sekwencji powinowactwie do różnych klas RNA (w tym niepoliadenylowanych), umożliwiło uzyskanie jeszcze większego odzysku RBP z tkanek niż metody XRNAX, pCLAP czy eRIC²⁰⁵. To może sugerować, że protokół XRNAX nie jest być może najlepszym narzędziem, jeśli głównym celem jest jedynie maksymalizacja liczby identyfikowanych białek wiążących RNA. Jednakże, jak wykazano w niniejszej pracy, jego niepodważalna wartość tkwi w zdolności do badania zmian jakościowych w interakcjach RNA-białko. XRNAX, szczególnie w połączeniu ze zoptymalizowaną metodą przygotowania tkanki, jaką jest biopulweryzacja, osiąga to poprzez zachowanie wysokiej specyficzności odzyskiwanych RBP, co potwierdzono zarówno w mózgu WT, jak i *shiverer*. Ponadto, co kluczowe, biopulweryzacja minimalizuje manipulacje *ex vivo* przed natychmiastowym sieciowaniem UV sproszkowanej tkanki, co sprzyja zachowaniu natywnych, fizjologicznych interakcji RNA-białko. Dlatego, mimo pojawiania się metod o potencjalnie wyższej wydajności w identyfikacji całkowitej liczby RBP, XRNAX pozostaje optymalnym narzędziem do precyzyjnego badania jakościowych zmian w interakcjach RNA-białko *in vivo* w tkankach, zwłaszcza gdy istotne jest uchwycenie subtelnych różnic w profilu wiązania w różnych stanach fizjologicznych lub patologicznych.

5.2. Zmiany w interakcjach RNA-białko w mózgu z deficytem mieliny

Wyniki analizy proteomu związanego z RNA w mózgu myszy *shiverer* (modelu deficytu mieliny w OUN), uzyskane dzięki metodzie XRNAX, podkreślają znaczenie badań interaktomu RNA-białko dla zrozumienia zmian molekularnych w kontekście chorobowym. Po pierwsze, wykazano, że wiele RBP charakteryzuje się zmienionym (podwyższonym lub zmniejszonym) poziomem wiązania RNA w mózgu z deficytem mieliny, co niekoniecznie koreluje ze zmianami w całkowitym poziomie tych białek. Obserwacja ta sama w sobie nie jest nowa, gdyż podobne zjawisko opisywano już dla pojedynczych RBP; w niniejszej pracy jednak wykazano je po raz pierwszy w sposób wysokoprzepustowy, analizując całkowity RBPom w tkance objętej procesem patologicznym. Zróżnicowany poziom wiązania RNA przez RBP może wynikać ze zmienionej lokalizacji subkomórkowej tych białek (całkowitej lub częściowej, np. związanej ze zmianą ekspresowanej izoformy), ich sekwestracji, zmian w poziomie ekspresji docelowych cząsteczek RNA w warunkach choroby lub kombinacji tych czynników⁵⁵. Takie przypadki obserwowano szczególnie często w przypadku chorób

neurodegeneracyjnych, w których badano poszczególne RBP i wykazano podobne zaburzenia. Najlepiej zbadanymi przykładami są TDP-43, FUS i białka z rodziny hnRNP⁵⁵. W przypadku chorób demielinizacyjnych dogłębnie zbadano tylko jeden konkretny RBP – hnRNPA1^{76,77}. Całkowite poziomy białka hnRNPA1 nie różnią się między zdrowymi kontrolami a mózgami pacjentów cierpiących na stwardnienie rozsiane. Jednakże wykazano, że białko to, normalnie zlokalizowane w jądrze komórkowym, u pacjentów ulega częściowej relokalizacji do cytoplazmy w neuronach korowych, co prowadzi do zmian we wzorach splicingu docelowych cząsteczek RNA regulowanych przez hnRNPA1 w jądrze komórkowym. Fenotyp ten łatwo odtworzono również w mysim modelu demielinizacji⁷⁷.

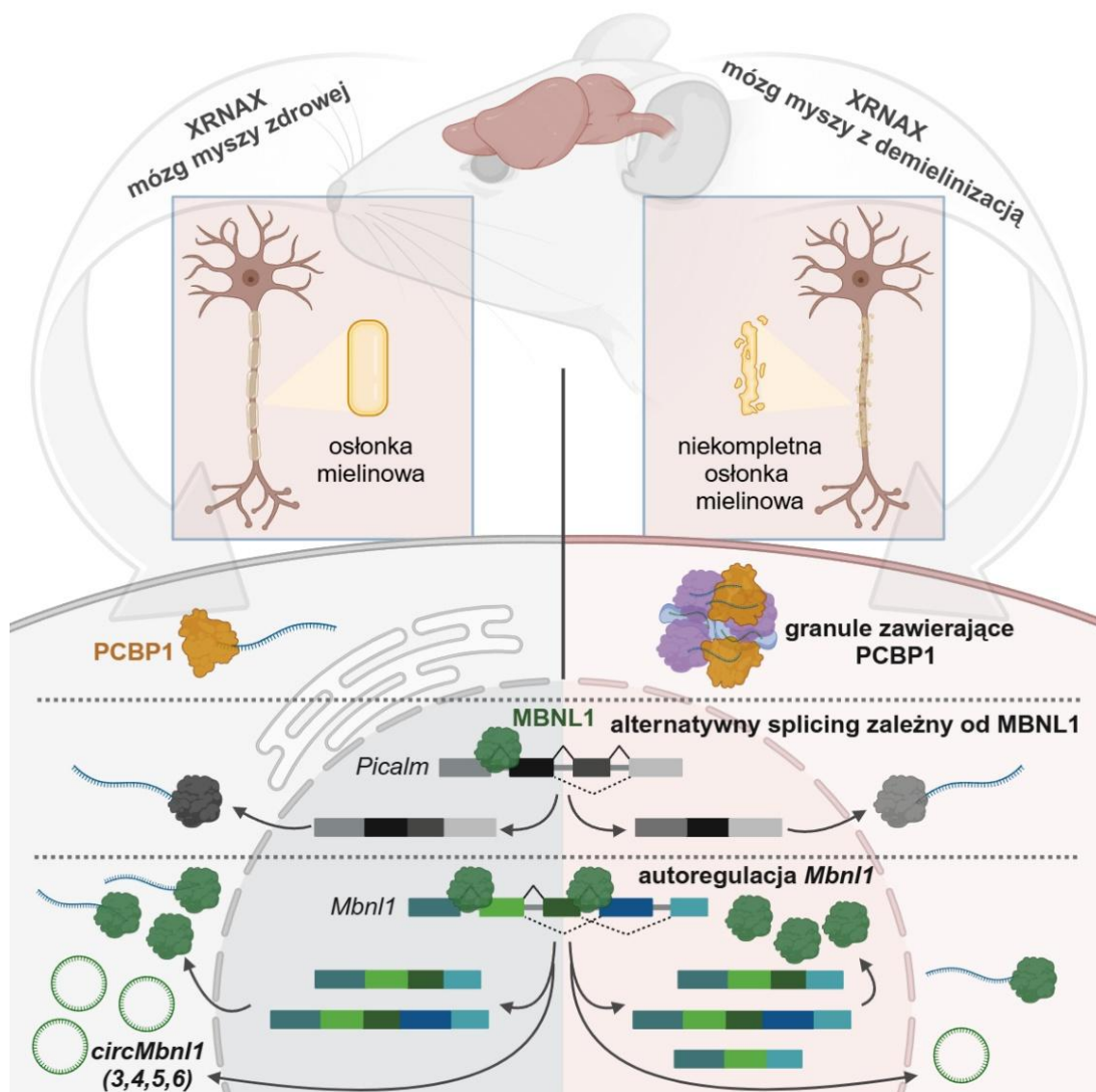
W niniejszej pracy przeprowadzono szerszą walidację dla innego RBP - MBNL1, które nie było wcześniej bezpośrednio powiązane z demielinizacją lub dysmielinizacją lecz z dystrofią i chorobami nowotworowymi, co czyniło je interesującym kandydatem do dalszych badań.

Analiza MBNL1, przeprowadzona w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, ujawniła, że docelowe pre-mRNA tego białka ulegają odmiennemu składaniu (splicingowi) w mózgu myszy *Shi* w porównaniu z mózgiem WT. Obserwowany efekt jest prawdopodobnie konsekwencją zaburzeń w alternatywnym splicingu samego genu *Mbnl1*. W szczególności wykazano, że poziom ekspresji *circMbnl1*(3,4,5,6) jest obniżony w tkance mózgowej z deficytem mieliny. Jednocześnie obserwowano względny wzrost udziału izoformy mRNA *Mbnl1* zawierającej eksony 5 i 6 w porównaniu z izoformą pozbawioną tych eksonów. Jest to o tyle istotne, że ekson 5 i 6 genu *Mbnl1* kodują sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), a ich alternatywny splicing prowadzi do powstawania cytoplazmatycznych lub jądrowych izoform białka MBNL1, także w neuronach^{241,247,262,263}. Ponadto wiadomo, że białko MBNL1 reguluje włączanie/wykluczanie tych eksonów we własnym pre-mRNA (genu *Mbnl1*, w ramach pętli autoregulacyjnej), poprzez wiązanie się z sekwencjami intronowymi²⁴⁵. W niniejszych badaniach wykazano, że zmniejszeniu ekspresji *circMbnl1*(3,4,5,6) towarzyszy wyższy poziom włączania eksonów 5 i 6 do transkryptu mRNA *Mbnl1*. Potwierdzono również zwiększoną akumulację białka MBNL1 w mózgu myszy z deficytem mieliny, szczególnie w podwzgórzu, opuszcze węchowej i prążkowie, czyli w regionach, w których obserwowano niższą ekspresję *circMbnl1*(3,4,5,6). Co ważne, wyższa akumulacja MBNL1 w jądrach komórkowych tkanki mózgowej z niedoborem mieliny jest zgodna ze zmianami obserwowanymi w alternatywnym splicingu genów docelowych dla MBNL1 w mózgu myszy *Shi*. W szerszym kontekście, wyniki te sugerują, że produkcja circRNA z locus *Mbnl1* u myszy pełni rolę regulacyjną w kontroli powstawania izoform mRNA *Mbnl1* oraz wzorca subkomórkowej lokalizacji białka MBNL1.

Co istotne, mechanizm ten wydaje się być ewolucyjnie zachowany. Niedawno wykazano, że homologiczne *locus mbl* u *Drosophila melanogaster* jest regulowane w podobny, tzn. udowodniono, że produkcja circRNA z tego *locus* stanowi mechanizm buforujący poziom ekspresji mRNA *mbl* w ramach pętli autoregulacyjnej^{102,267}. Wykazano również, że ten autoregulacyjny mechanizm działa w sposób zależny od typu tkanki, tj. że jest związany z różnymi izoformami *circMbl* w mózgu i oku²⁶⁷. Podsumowując, wyniki dotyczące MBNL1 stanowią kolejny przykład potwierdzający przydatność metody XRNAX do wyłaniania interesujących i biologicznie istotnych RBP, których oddziaływania z RNA warto badać w kontekście chorobowym. Uzyskano cenne informacje na temat procesów regulowanych przez MBNL1 w kontekście dysmielinizacji; jednakże konieczne będą dalsze badania w celu głębszego zrozumienia m.in. konsekwencji zaburzeń funkcji MBNL1 dla jego cytoplazmatycznych cząsteczek docelowych oraz specyficzności obserwowanych zmian w zależności od typu komórki. Zaobserwowano również zmiany w poziomie transkryptów mRNA i circRNA genu *Mbnl2* w mózgach myszy *Shi*, co także wymaga bardziej szczegółowych badań.

Innym białkiem, którego zmienione oddziaływania z RNA w mózgu myszy *Shi* zidentyfikowano za pomocą XRNAX, było PCBP1. Wyniki dotyczące tego białka, które wykazywało silniejsze wzbogacenie po XRNAX w mózgu myszy *Shi* w porównaniu do WT, zostały szczegółowo opisane w publikacji, której pierwszym autorem jest autorka niniejszej pracy doktorskiej²²⁸, przy czym większość analiz eksperymentalnych dotyczących PCBP1 wykonała dr Weronika Wendlandt-Stanek. Wiadomo, że PCBP1 jest składnikiem granul neuronalnych oraz granul formowanych w oligodendrocytach, gdzie wraz z hnRNPA2 uczestniczy w transporcie mRNA, przyczyniając się konkretnie do zatrzymania translacji transportowanych transkryptów^{268,269}. Wykazano również, że PCBP1 tworzy kompleksy z lncRNA *Mena* i HNRNP K, które biorą udział w regulacji lokalnej translacji mRNA w aksonach²⁷⁰. Wspomniana publikacja (Sztachera i wsp., 2025²²⁸) pokazuje akumulację PCBP1 w mózgu myszy *Shi*, a dokładnie w ciałach komórkowych (somach) komórek mszystych we wnętrzu zakrętu zębatego hipokampa. Do tej pory nie raportowano nieprawidłowości w zakręcie zębatym hipokampa w kontekście demielinizacji lub dysmielinizacji. Ponadto, fizjologiczna rola komórek mszystych była słabo poznana aż do odkrycia ich funkcji w kontekście padaczki skroniowej (TLE). Donoszono, że komórki mszyste są szczególnie podatne na uszkodzenia wywołane napadami padaczkowymi, a ich częściową utratę uznaje się za cechę charakterystyczną TLE^{271,272}. Sugeruje się, że przeżywające komórki

mszyste odgrywają rolę ochronną, zapobiegając spontanicznemu postępowi napadów padaczkowych²⁷³. Na podstawie tych doniesień można spekulować, że nieprawidłowa akumulacja granul związanych z PCBP1 może być powiązana z dysfunkcją komórek mszystych u myszy *Shi*. Zaobserwowano, że zwiększona akumulacja granul PCBP1 jest widoczna już na wczesnym etapie, mniej więcej w czasie początku manifestacji objawów neurologicznych u myszy *Shi*. Oznacza to, że wystąpienie nieprawidłowości molekularnych w komórkach mszystych poprzedza pojawienie się objawów fenotypowych. U dorosłych osobników liczba granul PCBP1 potraja się w porównaniu do poziomu obserwowanego w zakręcie zębatym w dniu postnatalnym 12 (P12). Sugeruje to, że dysfunkcja komórek mszystych pogłębia się wraz z progresją objawów neurologicznych u myszy *Shi*, takich jak drżenie i napady padaczkowe^{274,275}. Co ciekawe, niedawne badanie wykazało, że białko FUS kolokalizuje z PCBP1 i PCBP2 w neuronach warstwy ziarnistej zakrętu zębatego oraz komórek piramidalnych hipokampa, tworząc inkluzje cytoplazmatyczne w mózgach pacjentów z ALS²⁷⁶. Pozostaje wiele pytań otwartych w kontekście PCBP1 np., w jaki sposób formowane są granule PCBP1 w przebiegu postępującej demielinizacji oraz jakie składniki RNA są zawarte w tych inkluzjach? Odpowiedzi na te pytania wymagają dalszych badań. Niemniej jednak, zaburzenia dotyczące akumulacji PCBP1 w hipokampie, ujawnione dzięki metodzie XRNAX, wskazują na potencjalne znaczenie tego białka w patogenezie demielinizacji w OUN.



Rycina 51. Zaburzenia oddziaływań PCBP1-RNA i MBNL1-RNA w mózgu z defektem mielinizacji opisane w niniejszej dysertacji. Liczba granul PCBP1 jest wyraźnie zwiększona w mózgu *shiverer* w komórkach mszystych hipokampa. Wzór docelowych transkryptów, których splicing jest regulowany przez MBNL1 różni się między mózgiem pozbawionym mieliny a mózgiem typu dzikiego, co prawdopodobnie jest związane z zaburzeniem splicingu *Mbnl1* i generowaniem kolistego RNA z tego miejsca. Opracowano na podstawie abstraktu graficznego z manuskryptu Sztachera i wsp., 2025, *Cell Reports*.

5.3. Protokół RNA pull-down do badań oddziaływań circRNA-białko w tkance

Zrozumienie złożonych sieci regulacji ekspresji genów w komórce wymaga identyfikacji i charakterystyki interakcji pomiędzy różnymi klasami molekuł, w tym oddziaływań RNA-białko oraz RNA-RNA. Metody RNA pull-down stanowią kluczowe narzędzie w tym obszarze, umożliwiając izolację docelowej cząsteczki RNA wraz z jej bezpośrednimi partnerami molekularnymi - białkami lub innymi kwasami nukleinowymi. Potrzeba rozwoju i optymalizacji takich technik wynika z faktu, że funkcje wielu cząsteczek RNA, zwłaszcza

niekodujących, są ściśle powiązane z ich zdolnością do tworzenia kompleksów z innymi makromolekułami. Identyfikacja tych interaktorów jest często pierwszym krokiem do rozszyfrowania mechanizmów działania danego RNA i jego roli w procesach komórkowych, zarówno w fizjologii, jak i patologii. Najczęściej stosowane protokoły opierają się na wykorzystaniu antysensownych oligonukleotydów (ASO) znakowanych biotyną, które poprzez komplementarność sekwencji selektywnie wiążą docelowe RNA^{162,188,189,191}. Utworzone w ten sposób kompleksy są następnie wychwytywane z lizatów komórkowych lub tkankowych za pomocą kulek pokrytych streptawidyną, a związane z RNA białka można zidentyfikować, np. metodą spektrometrii mas.

Pomimo ugruntowanej pozycji, metody RNA pull-down dedykowane do badania interakcji lncRNA z RBP, jak znane i stosowane od lat protokoły RAP-MS^{188,189} i ChIRP-MS^{162,186}, charakteryzują się pewnymi ogólnymi ograniczeniami. Jednym z wyzwań technicznych jest stabilizacja natywnych kompleksów RNA-białko. Powszechnie stosowane sieciowanie UV, choć umożliwia utworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy RNA a białkami i zastosowanie bardziej rygorystycznych warunków oczyszczania, charakteryzuje się niską wydajnością, co może prowadzić do utraty informacji o słabych lub przejściowych interakcjach¹⁶⁴. Ponadto, kluczowym aspektem w kontekście analizy ilościowej i jakościowej RBP związanych do RNA jest wydajne wzbogacenie transkryptów. Wiele endogennych circRNA i lncRNA występuje w komórkach w niskiej liczbie kopii, co wymaga bardzo dużej ilości materiału wyjściowego do eksperymentów typu RNA pull-down. Zwiększanie ilości materiału może prowadzić do powstania „tła”, czyli detekcji niespecyficznych białek wiążących się z ASO lub kulkami, co utrudnia identyfikację rzeczywistych interaktorów.

W przypadku badania interaktorów circRNA, sytuacja jest dodatkowo skomplikowana przez ograniczenia wynikające z obecności sekwencji mRNA, które zawierają te same egsony co circRNA. Kluczowym etapem RNA pull-down jest zaprojektowanie specyficznych sond. Ze względu na fakt, że circRNA w przeważającej większości powstają z tych samych *loci* genowych co ich liniowe odpowiedniki mRNA i dzielą z nimi większość sekwencji, jedynym unikalnym regionem celowania do zaprojektowania komplementarnych sond jest sekwencja BSJ. Ogranicza to możliwość projektowania sond komplementarnych wyłącznie do sekwencji BSJ. Takie podejście, choć konieczne dla zachowania swoistości, może zmniejszać wydajność wychwytywania circRNA lub nawet je uniemożliwiać, jeśli np. sekwencja BSJ jest związana przez białko. Ponadto, przy nieoptymalnym projekcie sond może dochodzić do częściowego, niespecyficznego wychwytywania liniowych mRNA.

Dotychczas opublikowano jedynie kilka protokołów dedykowanych izolacji białek związanych z circRNA²⁷⁴⁻²⁷⁶. Niestety, większość z nich posiada istotne ograniczenia, które praktycznie uniemożliwiają badanie interakcji circRNA-RBP w tkankach. Zaproponowane protokoły zostały zwalidowane i zastosowane głównie w liniach komórkowych, przykładowo do badania białek oddziałujących z *circMLL(9,10)* oraz *circYAP*^{276,277}. Co więcej, wiele z tych metod opiera się na nadekspresji badanych circRNA przed wykonaniem eksperymentu pull-down^{274,276,277}. Jest to podejście użyteczne do badania potencjalnych interakcji, jednak nie odzwierciedla ono fizjologicznych poziomów endogennych circRNA, które często występują w niskiej liczbie kopii, i utrudnia przeniesienie tych metod na materiał tkankowy, gdzie nadekspresja jest niemożliwa. Nawet w przypadku protokołów zoptymalizowanych dla endogennych circRNA w linii komórkowej bez ich nadekspresji, jak w przypadku *circHipk2*, poziom wzbogacenia tego circRNA w eluacie był jedynie dwukrotnie wyższy niż dla kontroli²⁷⁵. Taki stosunkowo niski odzysk docelowego RNA może być niewystarczający do identyfikacji mniej licznych lub słabiej wiążących się do circRNA interaktorów białkowych lub miRNA.

Biorąc pod uwagę powyższe wyzwania, zarówno te ogólne dla RNA pull-down oraz te specyficzne dla circRNA, ograniczenia dotychczasowych protokołów circRNA pull-down, jak i dodatkowe trudności związane z pracą z tkankami, istnieje potrzeba opracowania i walidacji metody pozwalającej na efektywne badanie interakcji endogennych circRNA z białkami bezpośrednio w tkankach. W odpowiedzi na te potrzeby, w niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę zaprojektowania i zoptymalizowania nowego protokołu RNA pull-down, specjalnie dostosowanego do badania oddziaływań endogennych circRNA z białkami w tkance mózgowej. Procedura przetwarzania tkanki mózgowej, obejmująca homogenizację metodą biopulweryzacji oraz sieciowanie UV, została wcześniej zoptymalizowana²²⁸ i zastosowana w niezmiennych warunkach jako etap przygotowawczy. Następnie, kluczowe etapy samego protokołu RNA pull-down, częściowo zaczerpnięte z istniejących metod takich jak RAP-MS^{188,189}, vIPR¹⁹¹ i ChIRP-MS^{162,186}, zostały starannie dostosowane do specyfiki pracy z materiałem tkankowym oraz do badania kolistych RNA. Optymalizacji poddano między innymi stężenie ASO, czas i temperaturę hybrydyzacji circRNA z sondą oraz rodzaj kulek magnetycznych stosowanych do wzbogacania kompleksów circRNA-białko. Celem opracowania takiego protokołu było uzyskanie bardziej rzeczywistego obrazu oddziaływań tych cząsteczek w warunkach *in vivo*, co jest kluczowe dla pełniejszego poznania biologicznych funkcji kolistych RNA.

Wstępne optymalizacje protokołu, przeprowadzone na modelowej cząsteczce *Cdr1as*, objęły kluczowe parametry, takie jak stężenie i rodzaj sond (testowano zarówno zestaw wielu krótkich ASO celujących w sekwencję wewnętrzną, jak i pojedynczą, dłuższą sondę skierowaną na unikalne złącze BSJ), czas i temperaturę hybrydyzacji oraz typ kulek magnetycznych. Skuteczność zoptymalizowanego protokołu potwierdzono poprzez wydajne i specyficzne wzbogacenie modelowej cząsteczki *Cdr1as* z mózgu myszy typu dzikiego. Jak przedstawiono w sekcji wyników (Ryc. 41), procedura circRNA pull-down z użyciem wielu krótkich sond DNA komplementarnych do *Cdr1as* lub jednej sondy DNA zorientowanej na BSJ umożliwiła powtarzalne, wydajne (30-40% odzysku) i specyficzne wzbogacenie tej docelowej cząsteczki, co potwierdzono brakiem istotnego wychwytu innych transkryptów. Zwiększenie materiału wyjściowego z połowy mózgu do dwóch mózgów na próbkę dodatkowo zwiększyło wychwyt *Cdr1as* pięciokrotnie. Co istotne, potwierdzono również specyficzność metody poprzez wykazanie efektywnego wychwycenia z tkanki mózgowej znanych i dobrze scharakteryzowanych interaktorów *Cdr1as*, takich jak białko AGO2 oraz miR-7^{91,124,125,132}.

Wobec przedstawionych wyzwań i istniejącej luki metodologicznej, kluczowym celem niniejszej pracy było nie tylko opracowanie i zoptymalizowanie protokołu circRNA pull-down efektywnego w tkance mózgowej (Cel szczegółowy 3), ale przede wszystkim jego praktyczne zastosowanie do identyfikacji molekularnych partnerów – białek i miRNA – oddziałujących z wybranymi circRNA *in vivo* (Cel szczegółowy 4). Oczekiwano, że identyfikacja tych interaktorów dostarczy fundamentalnego wglądu w potencjalne mechanizmy działania analizowanych circRNA i przybliży ich funkcję w mózgu.

Pozytywna walidacja metody na znanych interaktorach *Cdr1as* zachęciła do dalszych badań, mających na celu odkrycie nieopisanych dotąd białek partnerskich dla tej cząsteczki. Barwienie srebrem białek z eluatów *Cdr1as* pull-down już na tym etapie sugerowało, że *Cdr1as* oddziałuje z wieloma potencjalnymi partnerami białkowymi w mózgu (Ryc. 46). Podkreślono również, że użycie odpowiednich kontroli (np. myszy *Cdr1as* KO) jest absolutnie kluczowe w eksperymentach circRNA pull-down w tkance, aby odróżnić białka specyficznie oddziałujące z danym circRNA od niespecyficznego tła.

Połączenie protokołu circRNA pull-down z analizą proteomiczną metodą LC-MS/MS pozwoliło na systematyczną identyfikację tych interaktorów. Zidentyfikowano 61 białek wykazujących istotne wzbogacenie w eluatach po eksperymencie *Cdr1as* pull-down z mózgu WT względem mózgu myszy *Cdr1as* KO (Ryc. 47). Analiza funkcjonalna tej grupy 61 wzbogaconych białek (GO) ujawniła istotne statystycznie kategorie, obejmujące białka cytoplazmatyczne, neuronalne i synaptyczne (w tym 11 białek powiązanych z synapsami

glutaminergicznymi) oraz białka rybosomalne. Odkrycia te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi cytoplazmatycznej lokalizacji *Cdr1as* w komórkach układu nerwowego^{92,125} i mogą wspierać dane wskazujące na funkcję tego kolistego RNA w zakończeniach nerwowych^{125,133}. Szczególnie interesujące jest zidentyfikowanie wśród białek wzbogaconych po *Cdr1as* pull-down, grupy molekuł funkcjonujących w synapsach neuronów glutaminergicznych, co doskonale wpisuje się w niedawne doniesienia Cerda-Jara i wsp.¹³³ o roli *Cdr1as* w modulacji uwalniania glutaminianu. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki, wskazujące (lecz niepotwierdzające) na bezpośrednie oddziaływanie *Cdr1as* z tymi białkami synaptycznymi mogą sugerować, że jego rola wykracza poza samo buforowanie miR-7. Warto w tym miejscu przypomnieć, że kilka białek synaptycznych zidentyfikowanych w XRNAX²²⁸ i pCLAP²⁰¹ wykazuje potencjał wiązania RNA, mimo braku klasycznych domen RBD. Być może *Cdr1as* pełni funkcję rusztowania molekularnego dla określonych białek synaptycznych, wpływa na ich stabilność lub lokalizację. Jest to ciekawa hipoteza, która oczywiście wymaga dalszych bardziej szczegółowych badań.

Wśród zidentyfikowanych po *Cdr1as* pull-down kanonicznych RBP wykryto między innymi CELF2 oraz hnRNP R (Ryc. 47), a mapowanie peptydów potwierdziło ich lokalizację w obrębie domen RBD. Jak wskazano, rodzina białek CELF, do której należy CELF2, reguluje wiele etapów przetwarzania RNA, od alternatywnego splicingu po translację²⁵¹. W układzie nerwowym, CELF2 zlokalizowane w cytoplazmie komórek i pełni funkcję inhibitora translacji mRNA²⁵². W niniejszej pracy, pokazano, że sekwencja *Cdr1as* zawiera aż 40 motywów UGU oraz motywy UGUA i UGUU (Ryc. 47G). Są to sekwencje preferencyjnie wiązane przez CELF2, co potwierdzają nowsze doniesienia oparte na danych CLIP-seq^{254,255}. Wcześniej białko to identyfikowano jako wiążące powtórzenia CUG²⁸⁰, które to, co ciekawe, również licznie występują w sekwencji *Cdr1as*; dokładnie obecnych jest 31 takich motywów. Tak duża liczba potencjalnych miejsc wiązania CELF2 na cząsteczce *Cdr1as* może sugerować ich bezpośrednią interakcję. Biorąc pod uwagę zaangażowanie CELF2 w regulację translacji oraz jego obecność w interaktomie *Cdr1as* obok białek rybosomalnych i synaptycznych, można wysunąć hipotezę, że *Cdr1as* poprzez wiązanie CELF2 mógłby uczestniczyć w modulowaniu translacji specyficznych mRNA w neuronach, potencjalnie w obrębie synaps.

Podobnie intrygujące jest wykrycie białka hnRNP R jako potencjalnego interaktora *Cdr1as*, z peptydami mapującymi się również do jego domen RBD (Ryc. 47F). HnRNP R, jako klasyczne RBP, zaangażowane jest w różnorodne aspekty metabolizmu RNA. Chociaż jego główne funkcje zostały opisane w kontekście jego lokalizacji w jądrze komórkowym, hnRNP R występuje również w cytoplazmie, gdzie może uczestniczyć w regulacji mRNA, w tym w

ich transporcie do odległych przedziałów neuronalnych^{281–283}. Funkcje hnRNP R w neuronach są wielorakie i opisane również w kontekście utrzymania integralności i funkcji aksonów. Badania wykazały, że hnRNP R jest niezbędne dla prawidłowego wzrostu aksonów w motoneuronach, regulując ich transkryptom, w tym mRNA kodujące białka zaangażowane w transmisję synaptyczną i kierowanie aksonów²⁸⁴. Utrata hnRNP R prowadzi do defektów wzrostu aksonów, co podkreśla jego fundamentalną rolę w rozwoju neuronalnym^{284,285}. Co więcej, hnRNP R odgrywa rolę w kontrolowaniu lokalnej syntezy białek w aksonach, co jest kluczowe dla ich wzrostu i tworzenia połączeń nerwowo-mięśniowych. Mechanizm ten obejmuje interakcję hnRNP R z transferazą O-GlcNAc i modulację O-GlcNAcytacji czynnika inicjacji translacji eIF4G, co wpływa na syntezę komponentów cytoszkieletu i białek synaptycznych²⁸³. Niedawne doniesienia wskazują również na zaangażowanie hnRNP R w regulację transportu i utrzymanie funkcjonalności mitochondriów aksonalnych w motoneuronach²⁸². Wykazano, że głównym partnerem hnRNP R w neuronach ruchowych jest niekodujący RNA 7SK. HnRNP R i 7SK współdziałają w regulacji transkryptomu aksonalnego, a funkcja 7SK we wzroście aksonów zależy od jego interakcji z hnRNP R²⁸⁴. Identyfikacja hnRNP R w eluacie po *Cdr1as* pull-down, otwiera zatem możliwość, że *Cdr1as* może stanowić kolejny, dotychczas nieopisany, ncRNA oddziałujący z hnRNP R w neuronach. Dalsze badania nad konsekwencjami funkcjonalnymi interakcji *Cdr1as*:hnRNP R są wysoce uzasadnione, aby lepiej zrozumieć molekularne mechanizmy leżące u podstaw funkcji *Cdr1as* w komórkach nerwowych.

Szczególną uwagę zwrócono również na białko PCBP1, dla którego zidentyfikowano 11 peptydów, w tym jeden silnie wzbogacony i mapujący się do domen KH1 i KH2 (Ryc. 48) w eluatach uzyskanych po eksperymentach *Cdr1as* pull-down. Obecność PCBP1 w eluacie po *Cdr1as* pull-down potwierdzono metodą Western blot. Biorąc pod uwagę wcześniejsze obserwacje dotyczące zmian w interakcjach PCBP1 z RNA w mózgu z defektem mielinizacji²²⁸ oraz jego znaną rolę w kompleksach z lncRNA *Mena* i białkami hnRNP w regulacji lokalnej translacji mRNA w aksonach²⁷⁰, odkrycie, że PCBP1 wiąże otwiera nowe perspektywy. Łącznie, wyniki te mogą sugerować bardziej różnorodne i złożone funkcje *Cdr1as* w komórkach układu nerwowego niż dotychczas opisano tj. w kontekście wiązania miR-7.

Użyteczność circRNA pull-down sprawdzono również w badaniu innych cząsteczek circRNA, o których funkcjach wiadomo znacznie mniej. Zastosowanie zoptymalizowanego protokołu circRNA pull-down z sondą komplementarną do BSJ dla *circHipk3(2)* i *circDtnb(5,6,7,8)* pozwoliło na ich wydajne i specyficzne wzbogacenie (Ryc. 42). Już na etapie analizy barwienia srebrem białek pozyskanych z eluatów po eksperymentach pull-down

dla *circHipk3(2)* i *circDtnb(5,6,7,8)* zaobserwowano liczne różnice w profilu białkowym w porównaniu do kontroli negatywnej (pull-down z sondą anty-gfp), co silnie sugeruje, że te cząsteczki circRNA również oddziałują z białkami w mózgu (Ryc. 50).

Szczególną uwagę poświęcono dalszej charakterystyce *circDtnb(5,6,7,8)*, dla którego uzyskano wysoką wydajność wzbogacenia (~30% z połowy mózgu, ~80% z dwóch mózgów; Ryc. 49), bliską wzbogaceniu *Cdr1as*. Dotychczasowe, nieliczne doniesienia²⁵⁷ sugerowały jego rolę w modelu ciężkiego ostrego zapalenia trzustki poprzez interakcję z miR-6938-3p i regulację genu *Calb1*. W niniejszej pracy, pomiary określające obecność ponad 500 różnych miRNA w eluatach po *circDtnb(5,6,7,8)* pull-down ujawniły tylko kilka potencjalnie oddziałujących miRNA, w tym miR-124. Analiza bioinformatyczna potwierdziła obecność przewidywanego miejsca wiązania sekwencji *seed* miR-124 w obrębie *circDtnb(5,6,7,8)*. MiR-124-3p jest jednym z najobficiej występujących miRNA w mózgu myszy, odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu neuronów, regulacji funkcji synaptycznych i jest czynnikiem inicjującym zmiany metaboliczne podczas neurogenezy^{256–261}. Sam *circDtnb(5,6,7,8)* jest również wzbogacony w zakończeniach synaptycznych. Wiązanie *circDtnb(5,6,7,8)* z miR-124 może zatem sugerować na udział tej kolistej cząsteczki w regulowaniu miR-124. Potencjalne konsekwencje tego oddziaływania muszą pozostać w sferze spekulacji, bowiem wymagają dalszych badań w tym kierunku.

W przypadku kolejnych dwóch circRNA, *circStau2(2,3,4,5)* oraz *circGigyl2(4,5,6,7,8)*, również udało się wyodrębnić docelowe cząsteczki z homogenatów mózgu, jednak zaobserwowano jednoczesne, choć w różnym stopniu, wychwytywanie mRNA pochodzących z tych samych *loci* genowych. Zastosowanie pojedynczej sondy komplementarnej do BSJ zapewniało wydajny wychwyt docelowych circRNA. Obserwowany w tych przypadkach brak specyficzności dla circRNA należy przypisać wiązaniu części sondy DNA do transkryptu mRNA.

W celu rozwiązania problemu wychwyty mRNA w circRNA pull-down i potencjalnego zwiększenia specyficzności wzbogacania docelowego circRNA, zbadano możliwość usunięcia frakcji mRNA z lizatu tkanki mózgowej przed właściwym eksperymentem circRNA pull-down. W tym celu zastosowano trawienie RNazą R, która selektywnie degraduje liniowe RNA, oraz separację na kulkach oligo(dT) w celu dalszej deplekcji mRNA. Należy zaznaczyć, że choć trawienie RNazą R było wcześniej stosowane w celu wzbogacenia frakcji circRNA, to w opublikowanych pracach stosowano je na oczyszczonym RNA wyizolowanym z linii komórkowych^{217,249,250}, a nie w lizatach tkankowych. Po przeprowadzeniu optymalizacji stężenia RNazy R i składu soli, które dodawano do lizatów tkankowych, wykazano usunięcie

około 50-80% testowanych mRNA i rRNA z lizatu tkanki mózgowej po samym trawieniu RNazą R. Dodanie etapu selekcji mRNA na kulkach oligo(dT) po trawieniu enzymatycznym zwiększyło skuteczność usuwania mRNA do 60-90%. Te wstępne optymalizacje usuwania mRNA z lizatów tkankowych dają obiecujące wyniki, lecz wymagają jeszcze dopracowania. Należy również zwrócić uwagę na pewne ograniczenia. Zaobserwowano, że niektóre duże cząsteczki circRNA (np. *Cdr1as*) mogą być częściowo trawione przez nukleazy, a przy zastosowaniu dodatkowego etapu z kulkami oligo(dT) niektóre circRNA, posiadające w swojej sekwencji dłuższe motywy zawierające kilka powtórzonych adenin (np. *circGigf2(4,5,6,7,8)*) ulegały częściowemu usunięciu. Wskazuje to na konieczność starannej optymalizacji i walidacji tej strategii dla każdego badanego circRNA indywidualnie, aby zrównoważyć korzyści płynące ze zwiększonej specyficzności z potencjalną utratą docelowej cząsteczki.

5.4. Podsumowanie wkładu pracy w poznanie funkcji circRNA i hipotezy do dalszych badań

Jak dotąd nie wykazano jednej globalnej, uniwersalnej funkcji dla wszystkich kolistych RNA. Role tych cząsteczek odkrywane są indywidualnie dla pojedynczych przykładów circRNA. Zbadano funkcje kilku kolistych RNA ważnych dla funkcjonowania mózgu i neuronów, w tym *circHomer1*, *circCwc27* i *Cdr1as*^{125,133,140–142}.

Niniejsza praca doktorska wnosi istotny wkład w zrozumienie interakcji i potencjalnych funkcji circRNA w mózgu. Po pierwsze, opracowano i zwalidowano nowatorski protokół circRNA pull-down efektywny w tkance mózgowej, umożliwiający badanie natywnych kompleksów circRNA-miRNA-białko. Po drugie, dzięki zastosowaniu tej metody, zidentyfikowano szereg nowych białek, które mogą być interaktorami *Cdr1as*, w tym białka synaptyczne i RBP takie jak PCBP1 czy CELF2, co sugeruje jego wieloaspektową rolę wykraczającą poza funkcję stabilizatora miR-7¹²⁵, obejmującą potencjalnie stabilizację białek synaptycznych i udział w transporcie, czy lokalnej translacji. Po trzecie, pokazano, że inne, mniej poznane circRNA obecne w mózgu, takie jak *circHipk3(2)* i *circDtnb(5,6,7,8)*, również oddziałują z białkami, a dla *circDtnb(5,6,7,8)* potwierdzono interakcję z kluczowym dla funkcji neuronalnych miR-124. Kolejnym ważnym odkryciem jest udział *circMbnl1(3,4,5,6)* w regulacji włączania eksonów 5 i 6 zawierających NLS do powstającego mRNA i tym samym lokalizacji białka MBNL1. Inną istotną obserwacją jest antagonistyczna zmiana poziomu ekspresji dwóch cząsteczek circRNA z *locus Mbnl* w mózgu z deficytem mieliny²²⁸.

Łącząc wcześniejsze wyniki badań z danymi uzyskanymi w prezentowanej rozprawie doktorskiej, można zauważyć pewne interesujące zależności i sformułować hipotezy do dalszych badań. Kolisty RNA często powstają z genów kodujących białka synaptyczne i same

również wykazują tendencję do lokalizacji w zakończeniach nerwowych^{92,114}. Nowe wyniki badań, przedstawione w niniejszej pracy, potwierdzają zdolność tych cząsteczek do wiązania białek (w tym prawdopodobnie białek synaptycznych) oraz ich interakcje z miRNA, które są kluczowe dla regulacji plastyczności synaptycznej. Te obserwacje mogą wskazywać na bardziej globalną rolę kolistych RNA w modulowaniu funkcji synaptycznych, poprzez jednoczesne regulowanie i/lub stabilizowanie zarówno białek, jak i mikroRNA w tych wyspecjalizowanych przedziałach komórkowych. Ponadto, obserwacje dotyczące zmian poziomów ekspresji circRNA z *locus Mbnl* mogą sugerować istnienie mechanizmów kompensacyjnych, gdzie różne cząsteczki circRNA, być może nawet pochodzące z tego samego lub spokrewnionych *loci* genowych, mogą wzajemnie wpływać na swoje poziomy lub funkcje. Obie te hipotezy, dotyczące roli circRNA w funkcji synaps oraz potencjalnych mechanizmów kompensacyjnych między nimi, stanowią ważny i ciekawy punkt wyjścia dla przyszłych badań nad funkcjami tej wciąż enigmatycznej klasy cząsteczek RNA. Dalsze badania powinny skupić się na szczegółowej charakterystyce nowo zidentyfikowanych interaktorów białkowych dla *Cdr1as* i innych circRNA, walidacji tych interakcji oraz badaniu ich konsekwencji funkcjonalnych w kontekście neuronalnym, zarówno w zdrowiu, jak i w chorobie.

6. Wnioski

Główne cele niniejszej rozprawy doktorskiej obejmowały opracowanie wysokoprzepustowych metod umożliwiających charakteryzowanie endogennych oddziaływań RNA-białko w tkance mózgowej myszy. Zoptymalizowane metody wykorzystano dalej do oceny zmian w interakcjach RNA-białko w mózgu z defektem mielinizacji oraz do przybliżenia funkcji kolistych RNA w komórkach układu nerwowego.

Uzyskane wyniki, pozwoliły wysunąć następujące wnioski:

1. Biopulweryzacja tkanki mózgowej zapewnia efektywne stabilizowanie i zachowanie integralności interakcji RNA-białko do dalszych badań natywnych oddziaływań RNA-białko w tej tkance.

Wykazano, że metoda homogenizacji mózgu poprzez biopulweryzację połączona z sieciowaniem kompleksów RNA-białko światłem UV przy długości fali 254 nm, zapewnia wydajne stabilizowanie interakcji RNA-białko, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości RNA. Potwierdzono, że metoda homogenizacji przez proszkowanie tkanki, może być z powodzeniem wykorzystana do dalszych procedur takich jak XRNAX, RNA pull-down, czy potencjalnie innych metod obejmujących naświetlanie tkanki mózgowej światłem UV przed analizą kompleksów RNA-białko, przy jednoczesnym zachowaniu fizjologicznie istotnych interakcji.

2. Wstępne etapy protokołu XRNAX można wykorzystać do oceny efektywności stabilizowania kompleksów RNA-białko w materiale tkankowym.

Za pomocą metod biologii molekularnych określono potencjał metody XRNAX poprzedzonej homogenizacją tkanki mózgowej i naświetlaniem światłem w odzyskiwaniu kompleksów RNA-białko z interfazy po separacji fazowej. Okazało się to również użyteczne dla wytypowania circRNA o potencjale wiązania białek i może zostać wykorzystane do oceny takiego potencjału dla dowolnej, interesującej cząsteczki RNA.

3. XRNAX ma zastosowanie w wysokoprzepustowych analizach interaktomu RNA-białko w tkance mózgowej.

XRNAX w połączeniu z wzbogaceniem kompleksów RNA-białko na kolumnach krzemionkowych pozwolił na identyfikację setek wysoce specyficznych dla mózgu RBP i peptydów, które znajdują się w regionach białkowych bezpośrednio zaangażowanych w wiązanie cząsteczek RNA. XRNAX nie faworyzuje odzysku RNA ze względu na obecność ogona poli(A), a zatem może zostać wykorzystany do badania interakcji pomiędzy białkami a dowolnym typem RNA.

- 4. XRNAX wykonany w mózgach myszy szczepu dzikiego i z defektem mielinizacji stanowi cenne źródło danych na temat oddziaływań RNA-białko w mózgu i pozwala na określenie zmian w funkcjonowaniu kompleksów RNA-białko w chorobach o podłożu neurologicznym.**

Protokół XRNAX został wykonany na tkance mózgowej typu WT oraz na mózgu myszy *shiverer* z wrodzonym defektem formowania mieliny. W obu przypadkach zidentyfikowano kilkaset białek, z czego zdecydowana większość stanowi znane RBP. Porównanie uzyskanych zestawów danych pozwoliło ustalić, że kilkadziesiąt białek zidentyfikowanych w obu zestawach danych XRNAX wykazuje różnicę w interakcjach z RNA (w tym białka zaangażowane w granule cytoplazmatyczne i regulację alternatywnego splicingu), co nie było widoczne na poziomie całkowitej ekspresji samego RNA czy białka. Protokół można wykorzystać do badania zmian na poziomie interakcji RNA-białko w dowolnej tkance.

- 5. Alternatywny splicing transkryptów wzbogaconych w mózgu i regulowanych przez MBNL1 jest zmieniony u myszy *shiverer* względem myszy zdrowych, co prawdopodobnie jest wynikiem zwiększonej akumulacji MBNL1 w jądrach komórkowych.**

Analiza genów, których splicing jest regulowanych przez MBNL1 ujawniła zróżnicowane wzorce tworzenia izoform mRNA *Picalm*, *Add3*, *Mbnl2* i *Sorbs1* w mózgu *shiverer* względem WT, co powiązano z akumulacją jądrową MBNL1 w mózgu deficytem mieliny.

- 6. Subkomórkowa lokalizacja MBNL1 i jego zwiększona akumulacja w jądrze komórkowym mogą być regulowane przez produkcję circRNA z genu *Mbnl1*.**

Wykazano translokację białka MBNL1 do jądra komórkowego w mózgu z defektem mielinizacji względem WT, co zostało powiązane ze zmianami ilościowymi w izoformach transkryptów generowanych z genu *Mbnl1*, a w szczególności z obniżoną ekspresją jednego z kolistych RNA, który zawiera sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) i podwyższoną ekspresją mRNA z sekwencją NLS. Te wyniki to pierwszy w literaturze światowej dowód na to, że deregulacja circRNA może wpływać na lokalizację białka kodowanego przez ten sam gen, co circRNA.

- 7. Nowy protokół circRNA pull-down można wykorzystać do wzbogacania endogennych kolistych RNA bezpośrednio z tkanki mózgowej.**

Opracowano i zoptymalizowano protokół wzbogacania endogennych circRNA z tkanki mózgowej myszy. Potwierdzono bardzo wydajne (30-80%, w zależności od wielkości

materiału wyjściowego) i specyficzne wzbogacanie circRNA *Cdr1as* protokołem RNA pull-down z tkanki mózgowej za pomocą dwóch typów sond DNA. Ponadto, zakończony powodzeniem, protokół zastosowano do badania innych endogennych kolistych RNA, w tym *circDtnb(5,6,7,8)* i *circHipk3(2)*.

8. circRNA pull-down odzyskuje koliste RNA wraz ze związanymi do nich białkami i miRNA.

Zastosowane metody biologii molekularnej oraz metody wysokoprzepustowe, potwierdziły użyteczność protokołu circRNA pull-down do wzbogacania kolistego RNA wraz ze związanymi z nim białkami, czy miRNA *in vivo* z mózgu, co można przełożyć na badania w innej interesującej tkance.

9. *Cdr1as* wiąże PCBP1 i może pełnić rolę w stabilizowaniu lub modelowaniu funkcji białek neuronalnych.

Wysokoprzepustowa analiza proteomiczna LC-MS/MS po *Cdr1as* pull-down ujawniła nowe interakcje tej cząsteczki z białkami. Wśród białek i peptydów specyficznie wzbogaconych po pull-down *Cdr1as* znalazły się białka RBP, takie jak CELF2, hnRNP R czy PCBP1. Dodatkowo wykryto znane białka synaptyczne związane z *Cdr1as*. Uzyskane wyniki wskazują na funkcję *Cdr1as* w stabilizacji białek w synapsach lub/ i na udział w lokalnej translacji mRNA w neuronach, co może pomóc wypełnić „lukę” w wiedzy dotyczącej funkcjonowania tej cząsteczki w komórkach układu nerwowego.

10. Koliste RNA *circDtnb(5,6,7,8)* wiąże miR-124-3p.

Analiza ekspresji miRNA metodą NanoString nCounter miRNA Expression Assay w eluatach po *circDtnb(5,6,7,8)* pull-down ujawniła wiązanie miR-124-3p, który jest najobficiej występującym miRNA w mózgu myszy i odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu neuronów. *CircDtnb(5,6,7,8)* może więc potencjalnie regulować funkcje miR-124 w neuronach, a dokładnie w synapsach.

7. Bibliografia

1. Corley, M., Burns, M. C. & Yeo, G. W. How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms. *Molecular Cell* **78**, 9–29 (2020).
2. Helder, S., Blythe, A. J., Bond, C. S. & Mackay, J. P. Determinants of affinity and specificity in RNA-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **38**, 83–91 (2016).
3. Lunde, B. M., Moore, C. & Varani, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 479–490 (2007).
4. Ottoz, D. S. M. & Berchowitz, L. E. The role of disorder in RNA binding affinity and specificity. *Open Biol* **10**, 200328 (2020).
5. Masuda, A., Kawachi, T. & Ohno, K. Rapidly Growing Protein-Centric Technologies to Extensively Identify Protein–RNA Interactions: Application to the Analysis of Co-Transcriptional RNA Processing. *Int J Mol Sci* **22**, 5312 (2021).
6. Rissland, O. S. Dynamics of RNA–protein interactions studied in living cells. *Nature* **591**, 39–40 (2021).
7. Sharma, D. *et al.* The kinetic landscape of an RNA-binding protein in cells. *Nature* **591**, 152–156 (2021).
8. Singh, A. RNA-binding protein kinetics. *Nat Methods* **18**, 335–335 (2021).
9. Castello, A. *et al.* System-wide identification of RNA-binding proteins by interactome capture. *Nat Protoc* **8**, 491–500 (2013).
10. Baltz, A. G. *et al.* The mRNA-Bound Proteome and Its Global Occupancy Profile on Protein-Coding Transcripts. *Molecular Cell* **46**, 674–690 (2012).
11. Perez-Perri, J. I. *et al.* The RNA-binding protein landscapes differ between mammalian organs and cultured cells. *Nat Commun* **14**, 2074 (2023).
12. Li, Y. *et al.* The landscape of RNA binding proteins in mammalian spermatogenesis. *Science* **386**, eadj8172 (2024).
13. Dominguez, D. *et al.* Sequence, Structure, and Context Preferences of Human RNA Binding Proteins. *Molecular Cell* **70**, 854–867.e9 (2018).
14. Chao, J. A. *et al.* ZBP1 recognition of β -actin zipcode induces RNA looping. *Genes Dev.* **24**, 148–158 (2010).
15. Mackereth, C. D. & Sattler, M. Dynamics in multi-domain protein recognition of RNA. *Current Opinion in Structural Biology* **22**, 287–296 (2012).
16. Beckmann, B. M. *et al.* The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nat Commun* **6**, 10127 (2015).
17. Castello, A. *et al.* Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell* **149**, 1393–1406 (2012).
18. Kwon, S. C. *et al.* The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 1122–1130 (2013).
19. Ray, D. *et al.* RNA-binding proteins that lack canonical RNA-binding domains are rarely sequence-specific. *Sci Rep* **13**, 5238 (2023).
20. Font, J. & Mackay, J. P. Beyond DNA: zinc finger domains as RNA-binding modules. *Methods Mol Biol* **649**, 479–491 (2010).
21. Lindquist, J. A. & Mertens, P. R. Cold shock proteins: from cellular mechanisms to pathophysiology and disease. *Cell Commun Signal* **16**, 63 (2018).
22. Hentze, M. W., Castello, A., Schwarzl, T. & Preiss, T. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 327–341 (2018).
23. Guillén-Boixet, J. *et al.* RNA-Induced Conformational Switching and Clustering of G3BP Drive Stress Granule Assembly by Condensation. *Cell* **181**, 346–361.e17 (2020).
24. Hubstenberger, A. *et al.* P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Molecular Cell* **68**, 144–157.e5 (2017).

25. Khong, A. *et al.* The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules. *Molecular Cell* **68**, 808–820.e5 (2017).
26. Li, P. *et al.* Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* **483**, 336–340 (2012).
27. Maharana, S. *et al.* RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science* **360**, 918–921 (2018).
28. Ninomiya, K. *et al.* LncRNA-dependent nuclear stress bodies promote intron retention through SR protein phosphorylation. *EMBO J* **39**, e102729 (2020).
29. Chong, P. A., Vernon, R. M. & Forman-Kay, J. D. RGG/RG Motif Regions in RNA Binding and Phase Separation. *J Mol Biol* **430**, 4650–4665 (2018).
30. Sanders, D. W. *et al.* Competing Protein-RNA Interaction Networks Control Multiphase Intracellular Organization. *Cell* **181**, 306–324.e28 (2020).
31. Wiedner, H. J. & Giudice, J. Author Correction: It's not just a phase: function and characteristics of RNA-binding proteins in phase separation. *Nat Struct Mol Biol* **29**, 1145–1145 (2022).
32. Hirose, T. *et al.* NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *MBoC* **25**, 169–183 (2014).
33. Langdon, E. M. *et al.* mRNA structure determines specificity of a polyQ-driven phase separation. *Science* **360**, 922–927 (2018).
34. West, J. A. *et al.* Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization. *Journal of Cell Biology* **214**, 817–830 (2016).
35. Khalil, A. M. *et al.* Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 11667–11672 (2009).
36. Lee, N. & Steitz, J. A. Noncoding RNA-guided recruitment of transcription factors: A prevalent but undocumented mechanism? *BioEssays* **37**, 936–941 (2015).
37. Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J.-J. & Lee, J. T. Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome. *Science* **322**, 750–756 (2008).
38. Gaballa, J. M. *et al.* The Role of Histone Methyltransferases and Long Non-coding RNAs in the Regulation of T Cell Fate Decisions. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
39. Lai, F. *et al.* Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. *Nature* **494**, 497–501 (2013).
40. Lai, F. & Shiekhattar, R. Where long noncoding RNAs meet DNA methylation. *Cell Res* **24**, 263–264 (2014).
41. Merry, C. R. *et al.* DNMT1-associated long non-coding RNAs regulate global gene expression and DNA methylation in colon cancer. *Hum Mol Genet* **24**, 6240–6253 (2015).
42. Fanucchi, S. & Mhlanga, M. M. Enhancer-Derived lncRNAs Regulate Genome Architecture: Fact or Fiction? *Trends Genet* **33**, 375–377 (2017).
43. Hacisuleyman, E. *et al.* Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 198–206 (2014).
44. Ma, W. *et al.* Fine-scale chromatin interaction maps reveal the cis-regulatory landscape of human lincRNA genes. *Nat Methods* **12**, 71–78 (2015).
45. Statello, L., Guo, C.-J., Chen, L.-L. & Huarte, M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 96–118 (2021).
46. Mangiavacchi, A., Morelli, G. & Orlando, V. Behind the scenes: How RNA orchestrates the epigenetic regulation of gene expression. *Front Cell Dev Biol* **11**, 1123975 (2023).
47. Hussen, B. M. *et al.* Functional interplay between long non-coding RNAs and Breast CSCs. *Cancer Cell Int* **22**, 233 (2022).

48. Siwaszek, A., Ukleja, M. & Dziembowski, A. Proteins involved in the degradation of cytoplasmic mRNA in the major eukaryotic model systems. *RNA Biology* **11**, 1122–1136 (2014).
49. Lee, S., Aubee, J. I. & Lai, E. C. Regulation of alternative splicing and polyadenylation in neurons. *Life Sci Alliance* **6**, e202302000 (2023).
50. Sakers, K. *et al.* Astrocytes locally translate transcripts in their peripheral processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E3830–E3838 (2017).
51. Sapkota, D. *et al.* Cell-Type-Specific Profiling of Alternative Translation Identifies Regulated Protein Isoform Variation in the Mouse Brain. *Cell Reports* **26**, 594–607.e7 (2019).
52. Ainsley, J. A., Drane, L., Jacobs, J., Kittelberger, K. A. & Reijmers, L. G. Functionally diverse dendritic mRNAs rapidly associate with ribosomes following a novel experience. *Nat Commun* **5**, 4510 (2014).
53. Bourke, A. M., Schwarz, A. & Schuman, E. M. De-centralizing the Central Dogma: mRNA translation in space and time. *Molecular Cell* **83**, 452–468 (2023).
54. Gebauer, F., Schwarzl, T., Valcárcel, J. & Hentze, M. W. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Nat Rev Genet* **22**, 185–198 (2021).
55. Nussbacher, J. K., Tabet, R., Yeo, G. W. & Lagier-Tourenne, C. Disruption of RNA Metabolism in Neurological Diseases and Emerging Therapeutic Interventions. *Neuron* **102**, 294–320 (2019).
56. Tsai, Y.-L. *et al.* ALS/FTD-associated protein FUS induces mitochondrial dysfunction by preferentially sequestering respiratory chain complex mRNAs. *Genes Dev* **34**, 785–805 (2020).
57. Deerlin, V. M. V. *et al.* TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *The Lancet Neurology* **7**, 409–416 (2008).
58. Sreedharan, J. *et al.* TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* **319**, 1668–1672 (2008).
59. Garcia-Montojo, M. *et al.* TDP-43 proteinopathy in ALS is triggered by loss of ASRGL1 and associated with HML-2 expression. *Nat Commun* **15**, 4163 (2024).
60. Tandon, S., Aggarwal, P. & Sarkar, S. Polyglutamine disorders: Pathogenesis and potential drug interventions. *Life Sciences* **344**, 122562 (2024).
61. Lee, J.-M. *et al.* CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* **78**, 690–695 (2012).
62. Kennedy, L. *et al.* Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* **12**, 3359–3367 (2003).
63. Shelbourne, P. F. *et al.* Triplet repeat mutation length gains correlate with cell-type specific vulnerability in Huntington disease brain. *Hum Mol Genet* **16**, 1133–1142 (2007).
64. Orr, H. T. *et al.* Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* **4**, 221–226 (1993).
65. Alluri, R. V. *et al.* Molecular Analysis of CAG Repeats at Five Different Spinocerebellar Ataxia loci: Correlation and Alternative Explanations for Disease Pathogenesis. *Molecules and Cells* **24**, 338–342 (2007).
66. Moore, S. *et al.* A role of oligodendrocytes in information processing. *Nat Commun* **11**, 5497 (2020).
67. Staugaitis, S. M. & Trapp, B. D. Diseases Involving Myelin. *Basic Neurochemistry* 691–704 (2012) doi:10.1016/B978-0-12-374947-5.00039-0.
68. Duncan, I. D. & Radcliff, A. B. Inherited and acquired disorders of myelin: The underlying myelin pathology. *Experimental Neurology* **283**, 452–475 (2016).
69. Greer, J. M. & McCombe, P. A. Role of gender in multiple sclerosis: clinical effects and potential molecular mechanisms. *J Neuroimmunol* **234**, 7–18 (2011).
70. Filippi, M. *et al.* Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 1–27 (2018).
71. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet* **359**, 1221–1231 (2002).

72. Baranzini, S. E. & Oksenberg, J. R. The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. *Trends Genet* **33**, 960–970 (2017).
73. Bar-Or, A., Banwell, B., Berger, J. R. & Lieberman, P. M. Guilty by association: Epstein–Barr virus in multiple sclerosis. *Nat Med* **28**, 904–906 (2022).
74. Bjornevik, K. *et al.* Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* **375**, 296–301 (2022).
75. Olsson, T., Barcellos, L. F. & Alfredsson, L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* **13**, 25–36 (2017).
76. Salapa, H. E., Hutchinson, C., Popescu, B. F. & Levin, M. C. Neuronal RNA-binding protein dysfunction in multiple sclerosis cortex. *Annals of Clinical and Translational Neurology* **7**, 1214–1224 (2020).
77. Salapa, H. E. *et al.* hnRNP A1 dysfunction alters RNA splicing and drives neurodegeneration in multiple sclerosis (MS). *Nat Commun* **15**, 356 (2024).
78. Otaegui, D. *et al.* Differential Micro RNA Expression in PBMC from Multiple Sclerosis Patients. *PLOS ONE* **4**, e6309 (2009).
79. Fenoglio, C. *et al.* Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4⁺ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience Letters* **504**, 9–12 (2011).
80. Martinelli-Boneschi, F. *et al.* MicroRNA and mRNA expression profile screening in multiple sclerosis patients to unravel novel pathogenic steps and identify potential biomarkers. *Neuroscience Letters* **508**, 4–8 (2012).
81. Keller, A. *et al.* Multiple Sclerosis: MicroRNA Expression Profiles Accurately Differentiate Patients with Relapsing-Remitting Disease from Healthy Controls. *PLOS ONE* **4**, e7440 (2009).
82. Cox, M. B. *et al.* MicroRNAs miR-17 and miR-20a Inhibit T Cell Activation Genes and Are Under-Expressed in MS Whole Blood. *PLOS ONE* **5**, e12132 (2010).
83. Cardamone, G. *et al.* The circular RNA landscape in multiple sclerosis: Disease-specific associated variants and exon methylation shape circular RNA expression profile. *Mult Scler Relat Disord* **69**, 104426 (2023).
84. Zurawska, A., Mycko, M. P. & Selmaj, K. W. Circular RNAs as a novel layer of regulatory mechanism in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **334**, 576971 (2019).
85. Mycko, M. P., Zurawska, A. E., Selmaj, I. & Selmaj, K. W. Impact of Diminished Expression of circRNA on Multiple Sclerosis Pathomechanisms. *Front Immunol* **13**, 875994 (2022).
86. Sanger, H. L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H. J. & Kleinschmidt, A. K. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **73**, 3852–3856 (1976).
87. Gao, Y., Wang, J. & Zhao, F. CIRI: an efficient and unbiased algorithm for de novo circular RNA identification. *Genome Biol* **16**, 4 (2015).
88. Gao, Y. *et al.* Comprehensive identification of internal structure and alternative splicing events in circular RNAs. *Nat Commun* **7**, 12060 (2016).
89. Jeck, W. R. *et al.* Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* **19**, 141–157 (2013).
90. Lu, T. *et al.* Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice. *RNA* **21**, 2076–2087 (2015).
91. Memczak, S. *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* **495**, 333–338 (2013).
92. Rybak-Wolf, A. *et al.* Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Mol Cell* **58**, 870–885 (2015).
93. Salzman, J., Chen, R. E., Olsen, M. N., Wang, P. L. & Brown, P. O. Cell-Type Specific Features of Circular RNA Expression. *PLOS Genetics* **9**, e1003777 (2013).

94. Talhouarne, G. J. S. & Gall, J. G. Lariat intronic RNAs in the cytoplasm of *Xenopus tropicalis* oocytes. *RNA* **20**, 1476–1487 (2014).
95. Venø, M. T. *et al.* Spatio-temporal regulation of circular RNA expression during porcine embryonic brain development. *Genome Biol* **16**, 245 (2015).
96. Zhang, Y. *et al.* Circular Intronic Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell* **51**, 792–806 (2013).
97. Zhang, X.-O. *et al.* Complementary Sequence-Mediated Exon Circularization. *Cell* **159**, 134–147 (2014).
98. Li, Z. *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 256–264 (2015).
99. Liang, D. & Wilusz, J. E. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes Dev* **28**, 2233–2247 (2014).
100. Ivanov, A. *et al.* Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. *Cell Rep* **10**, 170–177 (2015).
101. Aktaş, T. *et al.* DHX9 suppresses RNA processing defects originating from the Alu invasion of the human genome. *Nature* **544**, 115–119 (2017).
102. Ashwal-Fluss, R. *et al.* circRNA Biogenesis Competes with Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell* **56**, 55–66 (2014).
103. Conn, S. J. *et al.* The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell* **160**, 1125–1134 (2015).
104. Li, X. *et al.* Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection. *Mol Cell* **67**, 214–227.e7 (2017).
105. Errichelli, L. *et al.* FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons. *Nat Commun* **8**, 14741 (2017).
106. Stagsted, L. V. W., O’Leary, E. T., Ebbesen, K. K. & Hansen, T. B. The RNA-binding protein SFPQ preserves long-intron splicing and regulates circRNA biogenesis in mammals. *Elife* **10**, e63088 (2021).
107. Dattilo, D. *et al.* The m6A reader YTHDC1 and the RNA helicase DDX5 control the production of rhabdomyosarcoma-enriched circRNAs. *Nat Commun* **14**, 1898 (2023).
108. Tang, C. *et al.* m6A-dependent biogenesis of circular RNAs in male germ cells. *Cell Res* **30**, 211–228 (2020).
109. Chen, L.-L. *et al.* A guide to naming eukaryotic circular RNAs. *Nat Cell Biol* **25**, 1–5 (2023).
110. Huang, C., Liang, D., Tatomer, D. C. & Wilusz, J. E. A length-dependent evolutionarily conserved pathway controls nuclear export of circular RNAs. *Genes Dev* **32**, 639–644 (2018).
111. Ngo, L. H. *et al.* Nuclear export of circular RNA. *Nature* **627**, 212–220 (2024).
112. Song, M. *et al.* METTL3/YTHDC1-mediated m6A modification of circRNA3634 regulates the proliferation and differentiation of antler chondrocytes by miR-124486-5-MAPK1 axis. *Cellular & Molecular Biology Letters* **28**, 101 (2023).
113. Chen, R.-X. *et al.* N6-methyladenosine modification of circNSUN2 facilitates cytoplasmic export and stabilizes HMGA2 to promote colorectal liver metastasis. *Nat Commun* **10**, 4695 (2019).
114. You, X. *et al.* Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nat Neurosci* **18**, 603–610 (2015).
115. Ji, P. *et al.* Expanded Expression Landscape and Prioritization of Circular RNAs in Mammals. *Cell Reports* **26**, 3444–3460.e5 (2019).
116. Watts, M. E. *et al.* Circular RNAs arising from synaptic host genes during human neuronal differentiation are modulated by SFPQ RNA-binding protein. *BMC Biology* **21**, 127 (2023).
117. Enuke, Y. *et al.* Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic Acids Research* **44**, 1370–1383 (2016).
118. Hatzimanolis, O., Sykes, A. M. & Cristino, A. S. Circular RNAs in neurological conditions – computational identification, functional validation, and potential clinical applications. *Mol Psychiatry* **30**, 1652–1675 (2025).
119. Gruner, H., Cortés-López, M., Cooper, D. A., Bauer, M. & Miura, P. CircRNA accumulation in the aging mouse brain. *Sci Rep* **6**, 38907 (2016).

120. Cortés-López, M. *et al.* Global accumulation of circRNAs during aging in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* **19**, 8 (2018).
121. Westholm, J. O. *et al.* Genome-wide Analysis of *Drosophila* Circular RNAs Reveals Their Structural and Sequence Properties and Age-Dependent Neural Accumulation. *Cell Reports* **9**, 1966–1980 (2014).
122. Hall, H. *et al.* Transcriptome profiling of aging *Drosophila* photoreceptors reveals gene expression trends that correlate with visual senescence. *BMC Genomics* **18**, 894 (2017).
123. Kirio, K. *et al.* Circular RNAs exhibit exceptional stability in the aging brain and serve as reliable age and experience indicators. *Cell Reports* **44**, 115485 (2025).
124. Hansen, T. B. *et al.* miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J* **30**, 4414–4422 (2011).
125. Piwecka, M. *et al.* Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science* **357**, eaam8526 (2017).
126. Jia, R., Xiao, M.-S., Li, Z., Shan, G. & Huang, C. Defining an evolutionarily conserved role of GW182 in circular RNA degradation. *Cell Discov* **5**, 1–4 (2019).
127. Niaz, S. & Hussain, M. U. Role of GW182 protein in the cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **101**, 29–38 (2018).
128. Li, X. *et al.* Linking circular intronic RNA degradation and function in transcription by RNase H1. *Sci. China Life Sci.* **64**, 1795–1809 (2021).
129. Fischer, J. W., Busa, V. F., Shao, Y. & Leung, A. K. L. Structure-Mediated RNA Decay by UPF1 and G3BP1. *Mol Cell* **78**, 70–84.e6 (2020).
130. Zheng, Z.-M. Circular RNAs and RNase L in PKR activation and virus infection. *Cell Biosci* **9**, 43 (2019).
131. Tao, X. *et al.* Degradation of circular RNA by the ribonuclease DIS3. *Mol Cell* S1097-2765(25)00046–2 (2025) doi:10.1016/j.molcel.2025.01.012.
132. Hansen, T. B. *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **495**, 384–388 (2013).
133. Cerda-Jara, C. A. *et al.* miR-7 controls glutamatergic transmission and neuronal connectivity in a Cdr1as-dependent manner. *EMBO reports* **25**, 3008–3039 (2024).
134. Scoyni, F. *et al.* ciRS-7 and miR-7 regulate ischemia-induced neuronal death via glutamatergic signaling. *Cell Rep* **43**, 113862 (2024).
135. Zhang, X. *et al.* Circular RNA circNRIP1 acts as a microRNA-149-5p sponge to promote gastric cancer progression via the AKT1/mTOR pathway. *Molecular Cancer* **18**, 20 (2019).
136. Li, Y. *et al.* CircHIPK3 sponges miR-558 to suppress heparanase expression in bladder cancer cells. *EMBO Rep* **18**, 1646–1659 (2017).
137. Okholm, T. L. H. *et al.* Transcriptome-wide profiles of circular RNA and RNA-binding protein interactions reveal effects on circular RNA biogenesis and cancer pathway expression. *Genome Medicine* **12**, 112 (2020).
138. Wu, W., Zhang, J., Cao, X., Cai, Z. & Zhao, F. Exploring the cellular landscape of circular RNAs using full-length single-cell RNA sequencing. *Nat Commun* **13**, 3242 (2022).
139. Du, W. W. *et al.* Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. *Nucleic Acids Research* **44**, 2846–2858 (2016).
140. Zimmerman, A. J. *et al.* A psychiatric disease-related circular RNA controls synaptic gene expression and cognition. *Molecular Psychiatry* **25**, 2712–2727 (2020).
141. Hafez, A. K. *et al.* A bidirectional competitive interaction between *circHomer1* and *Homer1b* within the orbitofrontal cortex regulates reversal learning. *Cell Reports* **38**, 110282 (2022).
142. Song, C. *et al.* Circular RNA Cwc27 contributes to Alzheimer’s disease pathogenesis by repressing Pur- α activity. *Cell Death Differ* **29**, 393–406 (2022).

143. Yang, F. *et al.* Circ-HuR suppresses HuR expression and gastric cancer progression by inhibiting CNBP transactivation. *Mol Cancer* **18**, 158 (2019).
144. Abdelmohsen, K. *et al.* Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. *RNA Biol* **14**, 361–369 (2017).
145. Rossi, F. *et al.* Circular RNA ZNF609/CKAP5 mRNA interaction regulates microtubule dynamics and tumorigenicity. *Molecular Cell* **82**, 75–89.e9 (2022).
146. Zeng, Y. *et al.* A Circular RNA Binds To and Activates AKT Phosphorylation and Nuclear Localization Reducing Apoptosis and Enhancing Cardiac Repair. *Theranostics* **7**, 3842–3855 (2017).
147. Chen, Z. *et al.* YTHDF2-mediated circYAP1 drives immune escape and cancer progression through activating YAP1/TCF4-PD-L1 axis. *iScience* **27**, 108779 (2024).
148. Legnini, I. *et al.* Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis. *Mol Cell* **66**, 22–37.e9 (2017).
149. Zhang, M. *et al.* A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma. *Nat Commun* **9**, 4475 (2018).
150. Pamudurti, N. R. *et al.* Translation of CircRNAs. *Molecular Cell* **66**, 9–21.e7 (2017).
151. Yu, B., Pettitt, B. M. & Iwahara, J. Dynamics of Ionic Interactions at Protein–Nucleic Acid Interfaces. *Acc. Chem. Res.* **53**, 1802–1810 (2020).
152. Hoffman, M. M. *et al.* AANT: the Amino Acid–Nucleotide Interaction Database. *Nucleic Acids Research* **32**, D174–D181 (2004).
153. Han, K. & Nepal, C. PRI-Modeler: Extracting RNA structural elements from PDB files of protein–RNA complexes. *FEBS Letters* **581**, 1881–1890 (2007).
154. Treger, M. & Westhof, E. Statistical analysis of atomic contacts at RNA–protein interfaces. *Journal of Molecular Recognition* **14**, 199–214 (2001).
155. Pérez-Cano, L. & Fernández-Recio, J. Optimal protein-RNA area, OPRA: A propensity-based method to identify RNA-binding sites on proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **78**, 25–35 (2010).
156. Gerber, A. P. RNA-Centric Approaches to Profile the RNA–Protein Interaction Landscape on Selected RNAs. *Non-Coding RNA* **7**, 11 (2021).
157. Hafner, M. *et al.* CLIP and complementary methods. *Nat Rev Methods Primers* **1**, 1–23 (2021).
158. Ramanathan, M., Porter, D. F. & Khavari, P. A. Methods to study RNA-protein interactions. *Nat Methods* **16**, 225–234 (2019).
159. Metz, B. *et al.* Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with insulin. *Bioconjug Chem* **17**, 815–822 (2006).
160. Hoffman, E. A., Frey, B. L., Smith, L. M. & Auble, D. T. Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. *J Biol Chem* **290**, 26404–26411 (2015).
161. Sutherland, B. W., Toews, J. & Kast, J. Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J Mass Spectrom* **43**, 699–715 (2008).
162. Chu, C. *et al.* Systematic Discovery of Xist RNA Binding Proteins. *Cell* **161**, 404–416 (2015).
163. Poria, D. K. & Ray, P. S. RNA-protein UV-crosslinking Assay. *Bio Protoc* **7**, e2193 (2017).
164. Urdaneta, E. C. & Beckmann, B. M. Fast and unbiased purification of RNA-protein complexes after UV cross-linking. *Methods* **178**, 72–82 (2020).
165. Hafner, M. *et al.* Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129–141 (2010).
166. Kramer, K. *et al.* Mass-spectrometric analysis of proteins cross-linked to 4-thio-uracil- and 5-bromo-uracil-substituted RNA. *International Journal of Mass Spectrometry* **304**, 184–194 (2011).

167. Paradiso, P. R., Nakashima, Y. & Konigsberg, W. Photochemical cross-linking of protein . nucleic acid complexes. The attachment of the fd gene 5 protein to fd DNA. *J Biol Chem* **254**, 4739–4744 (1979).
168. Shetlar, M. D., Carbone, J., Steady, E. & Hom, K. Photochemical addition of amino acids and peptides to polyuridylic acid. *Photochem Photobiol* **39**, 141–144 (1984).
169. Jain, R. *et al.* RIP-Chip Analysis: RNA-Binding Protein Immunoprecipitation-Microarray (Chip) Profiling. in *RNA: Methods and Protocols* (ed. Nielsen, H.) 247–263 (Humana Press, Totowa, NJ, 2011). doi:10.1007/978-1-59745-248-9_17.
170. Tenenbaum, S. A., Carson, C. C., Lager, P. J. & Keene, J. D. Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 14085–14090 (2000).
171. Zhao, J. *et al.* Genome-wide Identification of Polycomb-Associated RNAs by RIP-seq. *Molecular Cell* **40**, 939–953 (2010).
172. Rinn, J. L. *et al.* Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell* **129**, 1311–1323 (2007).
173. MILL, S. & STEITZ, J. A. Evidence for reassociation of RNA-binding proteins after cell lysis: Implications for the interpretation of immunoprecipitation analyses. *RNA* **10**, 1692–1694 (2004).
174. Darnell, R. B. HITS-CLIP: panoramic views of protein-RNA regulation in living cells. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**, 266–286 (2010).
175. Licatalosi, D. D. *et al.* HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature* **456**, 464–469 (2008).
176. Anastasakis, D. G. *et al.* A non-radioactive, improved PAR-CLIP and small RNA cDNA library preparation protocol. *Nucleic Acids Research* **49**, e45 (2021).
177. Maatz, H., Kolinski, M., Hubner, N. & Landthaler, M. Transcriptome-wide Identification of RNA-binding Protein Binding Sites Using Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking Immunoprecipitation (PAR-CLIP). *Current Protocols in Molecular Biology* **118**, 27.6.1–27.6.19 (2017).
178. Huppertz, I. *et al.* iCLIP: Protein–RNA interactions at nucleotide resolution. *Methods* **65**, 274–287 (2014).
179. Van Nostrand, E. L. *et al.* Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP). *Nat Methods* **13**, 508–514 (2016).
180. Weyn-Vanhentenryck, S. M. *et al.* HITS-CLIP and Integrative Modeling Define the Rbfox Splicing-Regulatory Network Linked to Brain Development and Autism. *Cell Reports* **6**, 1139–1152 (2014).
181. Zarnegar, B. J. *et al.* irCLIP platform for efficient characterization of protein–RNA interactions. *Nat Methods* **13**, 489–492 (2016).
182. McMahon, A. C. *et al.* TRIBE: Hijacking an RNA-Editing Enzyme to Identify Cell-Specific Targets of RNA-Binding Proteins. *Cell* **165**, 742–753 (2016).
183. Brannan, K. W. *et al.* Robust single-cell discovery of RNA targets of RNA-binding proteins and ribosomes. *Nat Methods* **18**, 507–519 (2021).
184. Simon, M. D. *et al.* The genomic binding sites of a noncoding RNA. *PNAS* **108**, 20497–20502 (2011).
185. West, J. A. *et al.* The Long Noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 Bind Active Chromatin Sites. *Molecular Cell* **55**, 791–802 (2014).
186. Chu, C. & Chang, H. Y. ChIRP-MS: RNA-Directed Proteomic Discovery. *Methods Mol Biol* **1861**, 37–45 (2018).
187. Spiniello, M. *et al.* HyPR-MS for Multiplexed Discovery of MALAT1, NEAT1, and NORAD lncRNA Protein Interactomes. *J Proteome Res* **17**, 3022–3038 (2018).
188. McHugh, C. A. *et al.* The Xist lncRNA directly interacts with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature* **521**, 232–236 (2015).

189. McHugh, C. A. & Guttman, M. RAP-MS: A Method to Identify Proteins that Interact Directly with a Specific RNA Molecule in Cells. *Methods Mol Biol* **1649**, 473–488 (2018).
190. Minajigi, A. *et al.* A comprehensive Xist interactome reveals cohesin repulsion and an RNA-directed chromosome conformation. *Science* **349**, (2015).
191. Theil, K., Imami, K. & Rajewsky, N. Identification of proteins and miRNAs that specifically bind an mRNA in vivo. *Nature Communications* **10**, 4205 (2019).
192. Zielinski, J. *et al.* In vivo identification of ribonucleoprotein-RNA interactions. *PNAS* **103**, 1557–1562 (2006).
193. Moore, K. S. & von Lindern, M. RNA Binding Proteins and Regulation of mRNA Translation in Erythropoiesis. *Front Physiol* **9**, 910 (2018).
194. Ramanathan, M. *et al.* RNA–protein interaction detection in living cells. *Nature Methods* **15**, 207–212 (2018).
195. Zhang, Z. *et al.* Capturing RNA–protein interaction via CRUIS. *Nucleic Acids Res* **48**, e52 (2020).
196. Yi, W. *et al.* CRISPR-assisted detection of RNA–protein interactions in living cells. *Nature Methods* **17**, 685–688 (2020).
197. Wang, C. *et al.* Interactome analysis reveals that lncRNA HULC promotes aerobic glycolysis through LDHA and PKM2. *Nat Commun* **11**, 3162 (2020).
198. Graindorge, A. *et al.* In-cell identification and measurement of RNA-protein interactions. *Nat Commun* **10**, 5317 (2019).
199. Perez-Perri, J. I. *et al.* Discovery of RNA-binding proteins and characterization of their dynamic responses by enhanced RNA interactome capture. *Nat Commun* **9**, 4408 (2018).
200. Wessels, H.-H. *et al.* The mRNA-bound proteome of the early fly embryo. *Genome Res.* **26**, 1000–1009 (2016).
201. Mullari, M. *et al.* Characterising the RNA-binding protein atlas of the mammalian brain uncovers RBM5 misregulation in mouse models of Huntington’s disease. *Nat Commun* **14**, 4348 (2023).
202. He, C. *et al.* High-Resolution Mapping of RNA-Binding Regions in the Nuclear Proteome of Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell* **64**, 416–430 (2016).
203. Bao, X. *et al.* Capturing the interactome of newly transcribed RNA. *Nat Methods* **15**, 213–220 (2018).
204. Huang, R., Han, M., Meng, L. & Chen, X. Capture and Identification of RNA-binding Proteins by Using Click Chemistry-assisted RNA-interactome Capture (CARIC) Strategy. *J Vis Exp* (2018) doi:10.3791/58580.
205. Ren, Y. *et al.* Capture of RNA-binding proteins across mouse tissues using HARD-AP. *Nat Commun* **15**, 8421 (2024).
206. Smith, T. *et al.* Organic phase separation opens up new opportunities to interrogate the RNA-binding proteome. *Current Opinion in Chemical Biology* **54**, 70–75 (2020).
207. Trendel, J. *et al.* The Human RNA-Binding Proteome and Its Dynamics during Translational Arrest. *Cell* **176**, 391–403.e19 (2019).
208. Urdaneta, E. C. *et al.* Purification of cross-linked RNA-protein complexes by phenol-toluol extraction. *Nat Commun* **10**, 990 (2019).
209. Queiroz, R. M. L. *et al.* Comprehensive identification of RNA–protein interactions in any organism using orthogonal organic phase separation (OOPS). *Nat Biotechnol* **37**, 169–178 (2019).
210. Kristofich, J. & Nicchitta, C. V. Signal-noise metrics for RNA binding protein identification reveal broad spectrum protein-RNA interaction frequencies and dynamics. *Nat Commun* **14**, 5868 (2023).
211. Srivastava, M., Srivastava, R. & Janga, S. C. Transcriptome-wide high-throughput mapping of protein–RNA occupancy profiles using POP-seq. *Sci Rep* **11**, 1175 (2021).
212. Cao, S.-M. *et al.* Altered nucleocytoplasmic export of adenosine-rich circRNAs by PABPC1 contributes to neuronal function. *Molecular Cell* **84**, 2304–2319.e8 (2024).
213. Yu, X. *et al.* CircRNA MBOAT2 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma progression and lipid metabolism reprogramming by stabilizing PTBP1 to facilitate FASN mRNA cytoplasmic export. *Cell Death Dis* **14**, 20 (2023).

214. Pandey, P. R. *et al.* circSamd4 represses myogenic transcriptional activity of PUR proteins. *Nucleic Acids Res* **48**, 3789–3805 (2020).
215. Liu, Y. *et al.* Circular RNA circGlis3 protects against islet β -cell dysfunction and apoptosis in obesity. *Nat Commun* **14**, 351 (2023).
216. Guo, H. *et al.* Noncoding RNA circBtl1 suppresses self-renewal of intestinal stem cells via disruption of Atf4 mRNA stability. *EMBO J* **42**, e112039 (2023).
217. Xiao, M.-S. & Wilusz, J. E. An improved method for circular RNA purification using RNase R that efficiently removes linear RNAs containing G-quadruplexes or structured 3' ends. *Nucleic Acids Res* **47**, 8755–8769 (2019).
218. Sherman, B. T. *et al.* DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res* **50**, W216–W221 (2022).
219. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44–57 (2009).
220. Jones, P. *et al.* InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* **30**, 1236–1240 (2014).
221. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
222. Varadi, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res* **50**, D439–D444 (2022).
223. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682 (2012).
224. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612 (2004).
225. Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* **11**, 2301–2319 (2016).
226. Tyanova, S. *et al.* The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* **13**, 731–740 (2016).
227. Erö, C., Gewaltig, M.-O., Keller, D. & Markram, H. A Cell Atlas for the Mouse Brain. *Front. Neuroinform.* **12**, (2018).
228. Sztachera, M. *et al.* Interrogation of RNA-bound proteome with XRNAX illuminates molecular alterations in the mouse brain affected with dysmyelination. *Cell Reports* **44**, (2025).
229. Deutsch, E. W. *et al.* The ProteomeXchange consortium in 2020: enabling 'big data' approaches in proteomics. *Nucleic Acids Res* **48**, D1145–D1152 (2020).
230. Kaidzu, S. *et al.* Safety Evaluation of Far-UV-C Irradiation to Epithelial Basal Cells in the Corneal Limbus. *Photochem Photobiol* **99**, 1142–1148 (2023).
231. Paysan-Lafosse, T. *et al.* InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res* **51**, D418–D427 (2023).
232. Lee, J. E. & Cooper, T. A. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochem Soc Trans* **37**, 1281–1286 (2009).
233. Itskovich, S. S. *et al.* MBNL1 regulates essential alternative RNA splicing patterns in MLL-rearranged leukemia. *Nat Commun* **11**, 2369 (2020).
234. Tabaglio, T. *et al.* MBNL1 alternative splicing isoforms play opposing roles in cancer. *Life Sci Alliance* **1**, e201800157 (2018).
235. Weyn-Vanhentenryck, S. M. *et al.* Precise temporal regulation of alternative splicing during neural development. *Nat Commun* **9**, 2189 (2018).
236. Sta Maria, N. S. *et al.* Mbnl1 and Mbnl2 regulate brain structural integrity in mice. *Commun Biol* **4**, 1–14 (2021).
237. Lee, K.-Y., Chang, H.-C., Seah, C. & Lee, L.-J. Deprivation of Muscleblind-Like Proteins Causes Deficits in Cortical Neuron Distribution and Morphological Changes in Dendritic Spines and Postsynaptic Densities. *Front. Neuroanat.* **13**, (2019).
238. Ho, T. H. *et al.* Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J* **23**, 3103–3112 (2004).

239. Batra, R. *et al.* Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease. *Mol Cell* **56**, 311–322 (2014).
240. Wang, E. T. *et al.* Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* **150**, 710–724 (2012).
241. Wang, P.-Y., Chang, K.-T., Lin, Y.-M., Kuo, T.-Y. & Wang, G.-S. Ubiquitination of MBNL1 Is Required for Its Cytoplasmic Localization and Function in Promoting Neurite Outgrowth. *Cell Rep* **22**, 2294–2306 (2018).
242. Nutter, C. A. *et al.* Cell-type-specific dysregulation of RNA alternative splicing in short tandem repeat mouse knockin models of myotonic dystrophy. *Genes Dev* **33**, 1635–1640 (2019).
243. Nutter, C. A. *et al.* Choroid plexus mis-splicing and altered cerebrospinal fluid composition in myotonic dystrophy type 1. *Brain* **146**, 4217–4232 (2023).
244. Nitschke, L., Hu, R.-C., Miller, A. N., Lucas, L. & Cooper, T. A. Alternative splicing mediates the compensatory upregulation of MBNL2 upon MBNL1 loss-of-function. *Nucleic Acids Res* **51**, 1245–1259 (2023).
245. Gates, D. P., Coonrod, L. A. & Berglund, J. A. Autoregulated splicing of muscleblind-like 1 (MBNL1) Pre-mRNA. *J Biol Chem* **286**, 34224–34233 (2011).
246. Glažar, P., Papavasileiou, P. & Rajewsky, N. circBase: a database for circular RNAs. *RNA* **20**, 1666–1670 (2014).
247. Hildebrandt, R. P. *et al.* Muscleblind-like proteins use modular domains to localize RNAs by riding kinesins and docking to membranes. *Nat Commun* **14**, 3427 (2023).
248. Zhang, Y., Wang, J. & Xiao, Y. 3dRNA: 3D Structure Prediction from Linear to Circular RNAs. *Journal of Molecular Biology* **434**, 167452 (2022).
249. Panda, A. C. *et al.* High-purity circular RNA isolation method (RPAD) reveals vast collection of intronic circRNAs. *Nucleic Acids Res* **45**, e116 (2017).
250. Pandey, P. R., Rout, P. K., Das, A., Gorospe, M. & Panda, A. C. RPAD (RNase R treatment, polyadenylation, and poly(A)⁺ RNA depletion) method to isolate highly pure circular RNA. *Methods* **155**, 41–48 (2019).
251. Chatrikhi, R. *et al.* RNA Binding Protein CELF2 Regulates Signal-Induced Alternative Polyadenylation by Competing with Enhancers of the Polyadenylation Machinery. *Cell Reports* **28**, 2795–2806.e3 (2019).
252. Ajith, S. *et al.* Position-dependent activity of CELF2 in the regulation of splicing and implications for signal-responsive regulation in T cells. *RNA Biol* **13**, 569–581 (2016).
253. Wang, Z. *et al.* Iron Drives T Helper Cell Pathogenicity by Promoting RNA-Binding Protein PCBP1-Mediated Proinflammatory Cytokine Production. *Immunity* **49**, 80–92.e7 (2018).
254. Wang, B. *et al.* Comprehensive Analysis of Differentially Expressed lncRNA, circRNA and mRNA and Their ceRNA Networks in Mice With Severe Acute Pancreatitis. *Front. Genet.* **12**, (2021).
255. Rishik, S., Hirsch, P., Grandke, F., Fehlmann, T. & Keller, A. miRNATissueAtlas 2025: an update to the uniformly processed and annotated human and mouse non-coding RNA tissue atlas. *Nucleic Acids Research* **53**, D129–D137 (2025).
256. Son, G. *et al.* miR-124 coordinates metabolic regulators acting at early stages of human neurogenesis. *Commun Biol* **7**, 1–14 (2024).
257. Dubes, S. *et al.* miR-124-dependent tagging of synapses by synaptopodin enables input-specific homeostatic plasticity. *The EMBO Journal* **41**, e109012 (2022).
258. Cheng, L.-C., Pastrana, E., Tavazoie, M. & Doetsch, F. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci* **12**, 399–408 (2009).
259. Sanuki, R. *et al.* miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. *Nat Neurosci* **14**, 1125–1134 (2011).
260. Kutsche, L. K. *et al.* Combined Experimental and System-Level Analyses Reveal the Complex Regulatory Network of miR-124 during Human Neurogenesis. *cells* **7**, 438–452.e8 (2018).

261. Åkerblom, M. *et al.* MicroRNA-124 Is a Subventricular Zone Neuronal Fate Determinant. *J. Neurosci.* **32**, 8879–8889 (2012).
262. Tran, H. *et al.* Analysis of exonic regions involved in nuclear localization, splicing activity, and dimerization of Muscleblind-like-1 isoforms. *J Biol Chem* **286**, 16435–16446 (2011).
263. Kino, Y. *et al.* Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins. *Hum Mol Genet* **24**, 740–756 (2015).
264. Pamudurti, N. R. *et al.* circMbl functions in cis and in trans to regulate gene expression and physiology in a tissue-specific fashion. *Cell Rep* **39**, 110740 (2022).
265. Kosturko, L. D. *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E1 binds to hnRNP A2 and inhibits translation of A2 response element mRNAs. *Mol Biol Cell* **17**, 3521–3533 (2006).
266. Carson, J. H. *et al.* Multiplexed RNA trafficking in oligodendrocytes and neurons. *Biochim Biophys Acta* **1779**, 453–458 (2008).
267. Vidaki, M. *et al.* A Requirement for Mena, an Actin Regulator, in Local mRNA Translation in Developing Neurons. *Neuron* **95**, 608–622.e5 (2017).
268. Hester, M. S. & Danzer, S. C. Accumulation of abnormal adult-generated hippocampal granule cells predicts seizure frequency and severity. *J Neurosci* **33**, 8926–8936 (2013).
269. Blümcke, I. *et al.* Loss of hilar mossy cells in Ammon's horn sclerosis. *Epilepsia* **41 Suppl 6**, S174–180 (2000).
270. Bui, A. D. *et al.* Dentate gyrus mossy cells control spontaneous convulsive seizures and spatial memory. *Science* **359**, 787–790 (2018).
271. Windrem, M. S. *et al.* Neonatal chimerization with human glial progenitor cells can both remyelinate and rescue the otherwise lethally hypomyelinated shiverer mouse. *Cell Stem Cell* **2**, 553–565 (2008).
272. Kimura, M. *et al.* Overexpression of a minor component of myelin basic protein isoform (17.2 kDa) can restore myelinogenesis in transgenic shiverer mice. *Brain Res* **785**, 245–252 (1998).
273. Honda, H. *et al.* Mutated FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis involves multiple hnRNPs in the formation of neuronal cytoplasmic inclusions. *J Neuropathol Exp Neurol* **82**, 231–241 (2023).
274. Gabryelska, M. M. *et al.* Native Circular RNA Pulldown Method to Simultaneously Profile RNA and Protein Interactions. *Methods Mol Biol* **2765**, 299–309 (2024).
275. Das, D., Das, A. & Panda, A. C. Antisense Oligo Pulldown of Circular RNA for Downstream Analysis. *Bio Protoc* **11**, e4088 (2021).
276. Li, F. *et al.* Design and use of a back splicing junction probe for pulldown of circular RNA-binding proteins in cell lines. *STAR Protocols* **3**, 101702 (2022).
277. Conn, V. M. *et al.* Circular RNAs drive oncogenic chromosomal translocations within the MLL recombinome in leukemia. *Cancer Cell* **41**, 1309–1326.e10 (2023).
278. Dasgupta, T. & Ladd, A. N. The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**, 104–121 (2012).
279. MacPherson, M. J. *et al.* Nucleocytoplasmic transport of the RNA-binding protein CELF2 regulates neural stem cell fates. *Cell Reports* **35**, (2021).
280. Timchenko, L. T. *et al.* Identification of a (CUG) n Triplet Repeat RNA-Binding Protein and Its Expression in Myotonic Dystrophy. *Nucleic Acids Research* **24**, 4407–4414 (1996).
281. Rossoll, W. *et al.* Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Human Molecular Genetics* **11**, 93–105 (2002).
282. Dithmar, S., Zare, A., Salehi, S., Briese, M. & Sendtner, M. hnRNP R regulates mitochondrial movement and membrane potential in axons of motoneurons. *Neurobiology of Disease* **193**, 106454 (2024).

- 283. Zare, A. *et al.* hnRNP R promotes O-GlcNAcylation of eIF4G and facilitates axonal protein synthesis. *Nat Commun* **15**, 7430 (2024).
- 284. Briesse, M. *et al.* hnRNP R and its main interactor, the noncoding RNA 7SK, coregulate the axonal transcriptome of motoneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, E2859–E2868 (2018).
- 285. Glinka, M. *et al.* The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-R is necessary for axonal β -actin mRNA translocation in spinal motor neurons. *Human Molecular Genetics* **19**, 1951–1966 (2010).