

Marta Sztachera

Zakład Niekodujących RNA

ICHB PAN

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

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.