

Ayça Olcay

Department of Non-coding RNAs

Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences

Loss of Function Studies of Synapse-enriched circRNAs in Neurons

Streszczenie

Dotychczasowe badania wykazały, że niekodujące RNA odgrywają istotne role w funkcjonowaniu układu nerwowego, w tym w procesach synaptogenezy. Szczególnie liczne w mózgu są koliste RNA (circular RNAs, circRNAs), które zostały powiązane z transmisją synaptyczną i plastycznością synaptyczną, jak w przypadku Cdr1as oraz circHomer1a. Podzbiór circRNAs jest wzbogacony w synaptoneurosomach, co sugeruje ich potencjalne zaangażowanie w procesy synaptyczne; jednak funkcje większości circRNAs wzbogaconych w synapsach pozostają nieznane.

Celem niniejszej pracy było zbadanie potencjalnych funkcji wybranych circRNAs wzbogaconych w synapsach w pierwotnych neuronach korowych myszy. Na podstawie danych RNA-seq początkowo wyselekcjonowano szesnaście circRNAs wzbogaconych w neuronach, synaptoneurosomach oraz korze czołowej. Spośród nich do dalszych analiz funkcjonalnych wybrano trzy kandydaty: circGigylf2(4,5,6,7,8), circDtnb(5,6,7,8) oraz circMyst4(2). Wszystkie trzy circRNAs wykazywały wyższy poziom ekspresji w pierwotnych neuronach w porównaniu do astrocytów oraz wyższy poziom ekspresji w stosunku do odpowiadających im liniowych mRNA. Miejsca połączeń back-splice zostały potwierdzone metodą sekwencjonowania Sangera, natomiast odporność na trawienie RNase R potwierdziła ich kolistą strukturę.

Analiza ekspresji wykazała, że poziom wszystkich trzech circRNAs wzrastał od dnia postnatalnego 0 do dorosłości w korze mózgu myszy, co sugeruje ich regulację rozwojową.

Badania typu loss-of-function przeprowadzone w pierwotnych neuronach wykazały, że knockdown circGigylf2(4,5,6,7,8)- w przeciwieństwie do circMyst4(2) oraz circDtnb(5,6,7,8)- prowadził do istotnego obniżenia poziomu *Dlg4* mRNA (kodującego PSD-95), *Cadm1* mRNA (kodującego SynCam1) oraz *Icam5* mRNA (kodującego telencephalin), a także do zmniejszenia poziomu białka Synapsin-1, co wskazuje na potencjalną rolę circGigylf2(4,5,6,7,8) w stabilności synaps i synaptogenezie.

W celu dalszego poznania molekularnych mechanizmów leżących u podstaw obserwowanych efektów przeprowadzono analizy *in silico*. Analiza konserwacji wykazała obecność wysoce konserwowanego rdzeniowego regionu w obrębie eksonów 4–7 circGigylf2(4,5,6,7,8) u kręgowców, co wspiera jego funkcjonalne znaczenie. Nie wykryto istotnych elementów IRES ani interakcji z miRNA. Natomiast przewidywane interakcje z białkami wiążącymi RNA FMRP oraz TDP-43- znanymi regulatorami *Dlg4* mRNA (kodującego PSD-95)- sugerują potencjalny mechanizm regulacji potranskrypcyjnej.

Podsumowując, niniejsze badania identyfikują circGigylf2(4,5,6,7,8) jako rozwojowo regulowany, wzbogacony w synapsach circRNA, który może regulować ekspresję genów synaptycznych poprzez interakcje z białkami wiążącymi RNA. Uzyskane wyniki stanowią pierwsze dowody łączące circRNA wzbogacony w synapsach z regulacją transkryptów kodujących PSD-95 oraz SynCam1, przyczyniając się do lepszego zrozumienia molekularnego krajobrazu leżącego u podstaw stabilności synaps i synaptogenezy.