



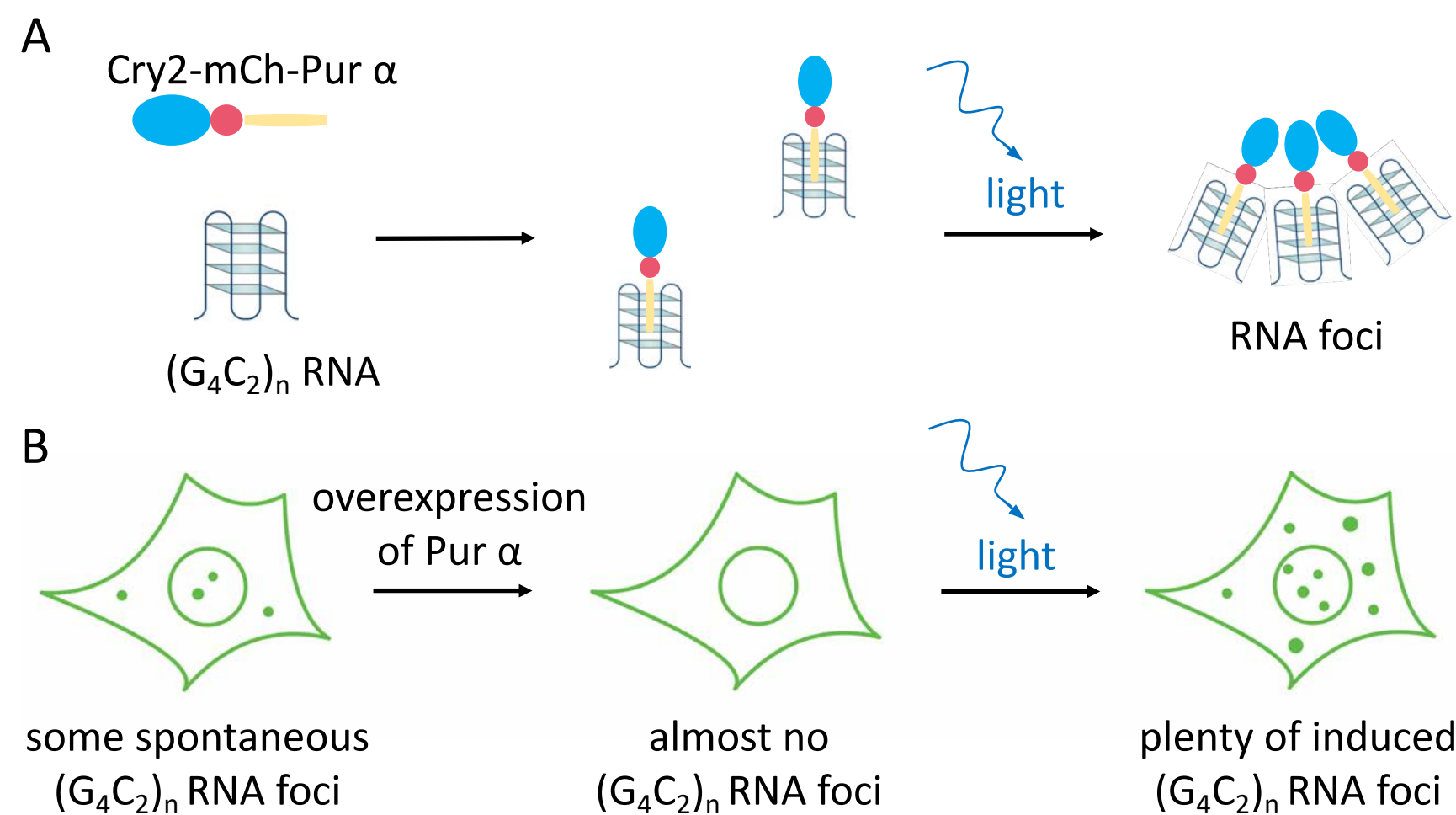
构建渐冻症相关GGGGCC重复RNA聚集体相分离诱导的光控系统

李雄¹, 潘宇寅¹, 鲁伯坝¹

¹复旦大学, 生命科学学院, 生理学和生物物理学系, 上海

Introduction

C9orf72基因的GGGGCC(G_4C_2)六核苷酸重复扩增已被证明是导致渐冻症(ALS)的主要病因之一。在患者的神经元中, G_4C_2 扩增序列会通过液-液相分离的方式形成液滴态 RNA 聚集体(RNA foci), 可能导致神经毒性, 但两者的因果关系尚未确定。本课题尝试利用蓝光激发下可产生聚集的光敏蛋白Cry 2和特异结合(G_4C_2)_n RNA的蛋白Pur α , 构建渐冻症相关 GGGGCC 重复 RNA 聚集体相分离诱导的光控系统, 以确定 G_4C_2 RNA聚集体和ALS病理表型之间的因果关系。



Methods

- 分子克隆: 构建Pur α -Cry2-mCherry融合蛋白质粒
- 活细胞共聚焦荧光显微成像: HEK293T
- 荧光漂白恢复(FRAP): 研究诱导产生的RNA foci的动态特性, 判断其状态为固态还是液态

Results

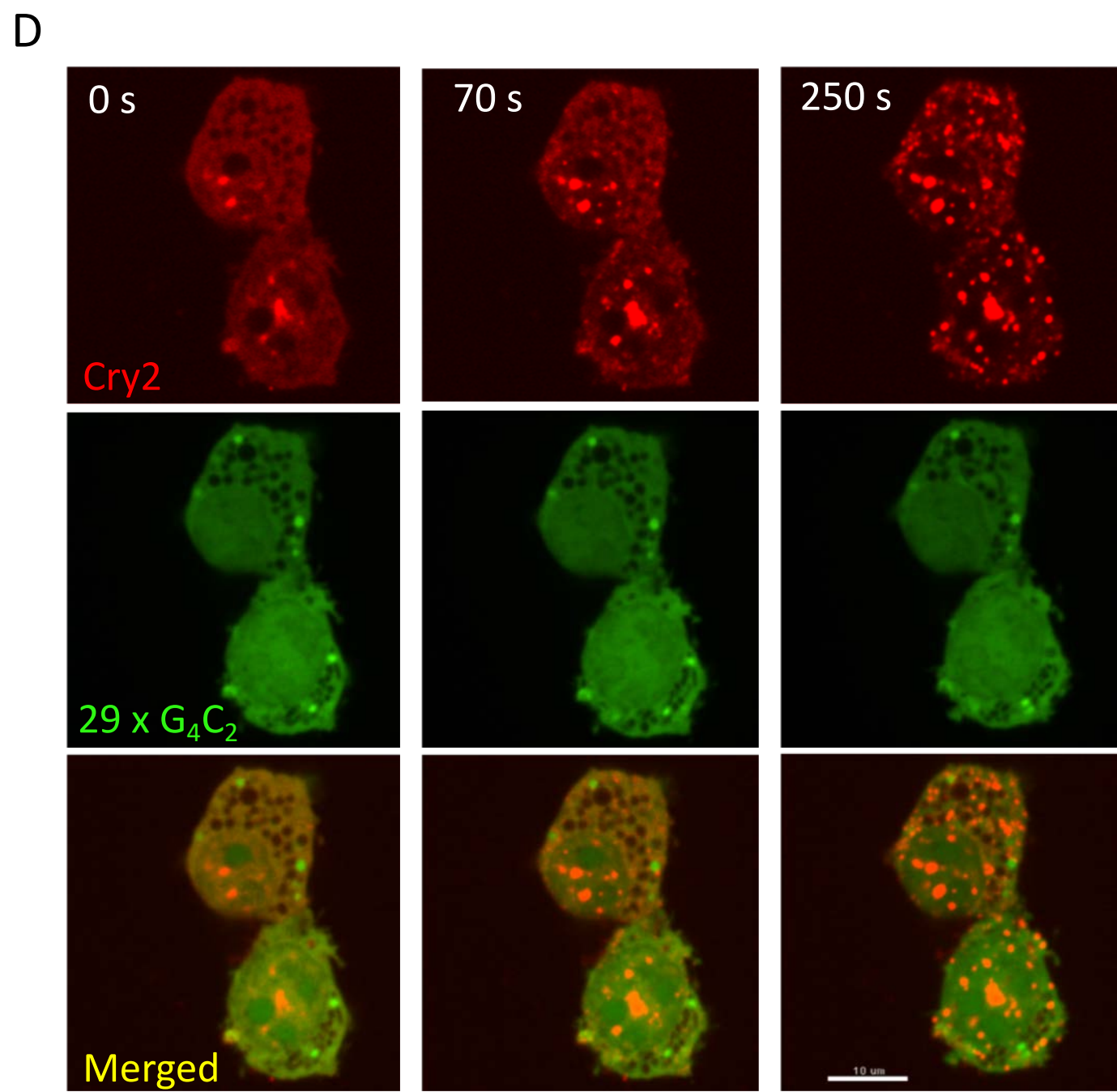
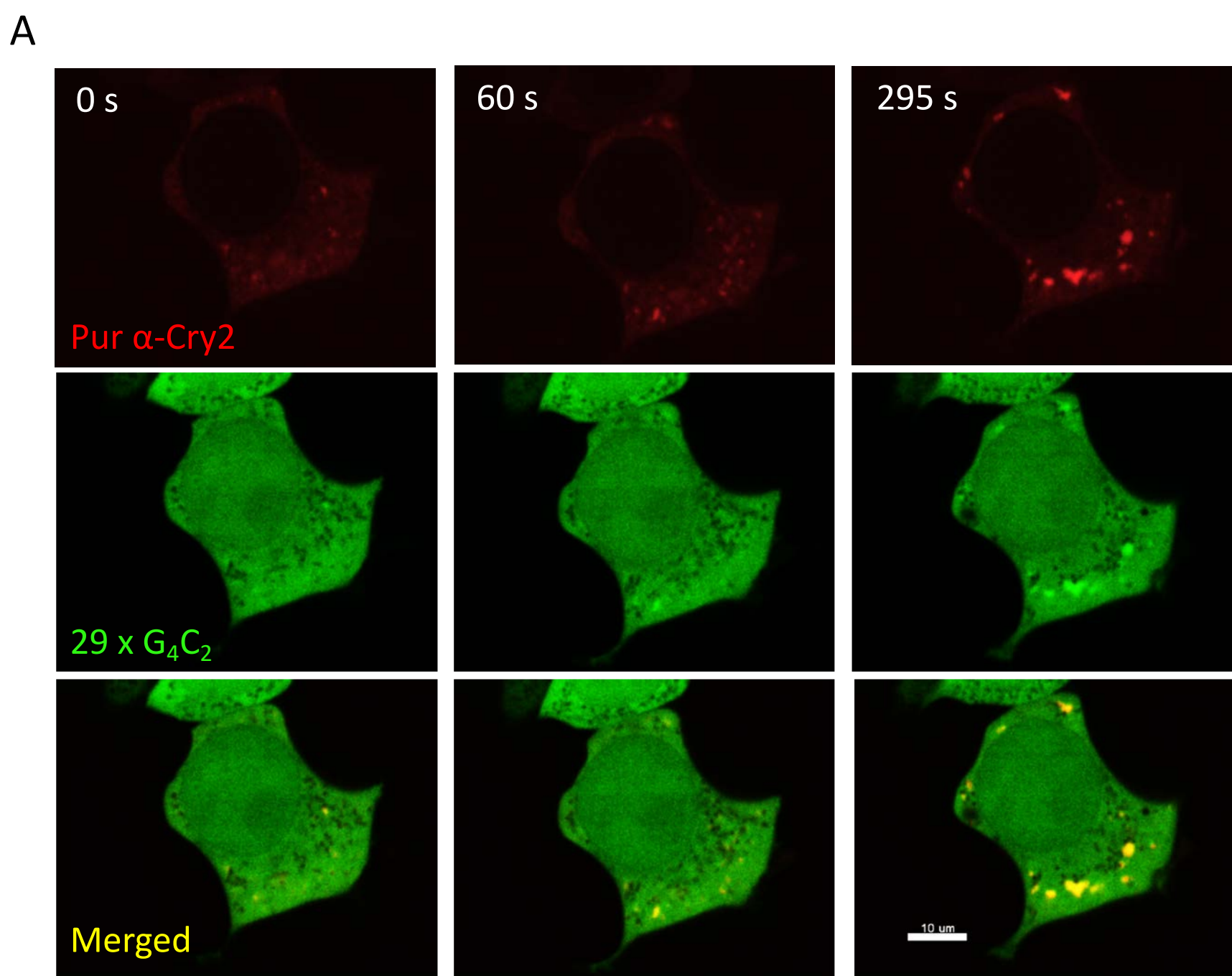


Figure 1: Pur α -Cry2在蓝光激发下诱导产生(G_4C_2)_n RNA聚集体
(A) 29x G_4C_2 产生较多RNA聚集体, 和Pur α -Cry2存在显著共定位。
(B) 5x G_4C_2 也产生和Pur α -Cry2共定位的RNA聚集体, 数量较少。
(C) 不同细胞诱导产生RNA聚集体的数量统计, 29x的数量较5x多。
(D) 在没有Pur α 的情况下, 细胞中在光照前即存在一些自发产生的RNA聚集体, 光照后Cry 2产生聚集, Cry 2和RNA聚集体不存在共定位, RNA聚集体数量没有增多。

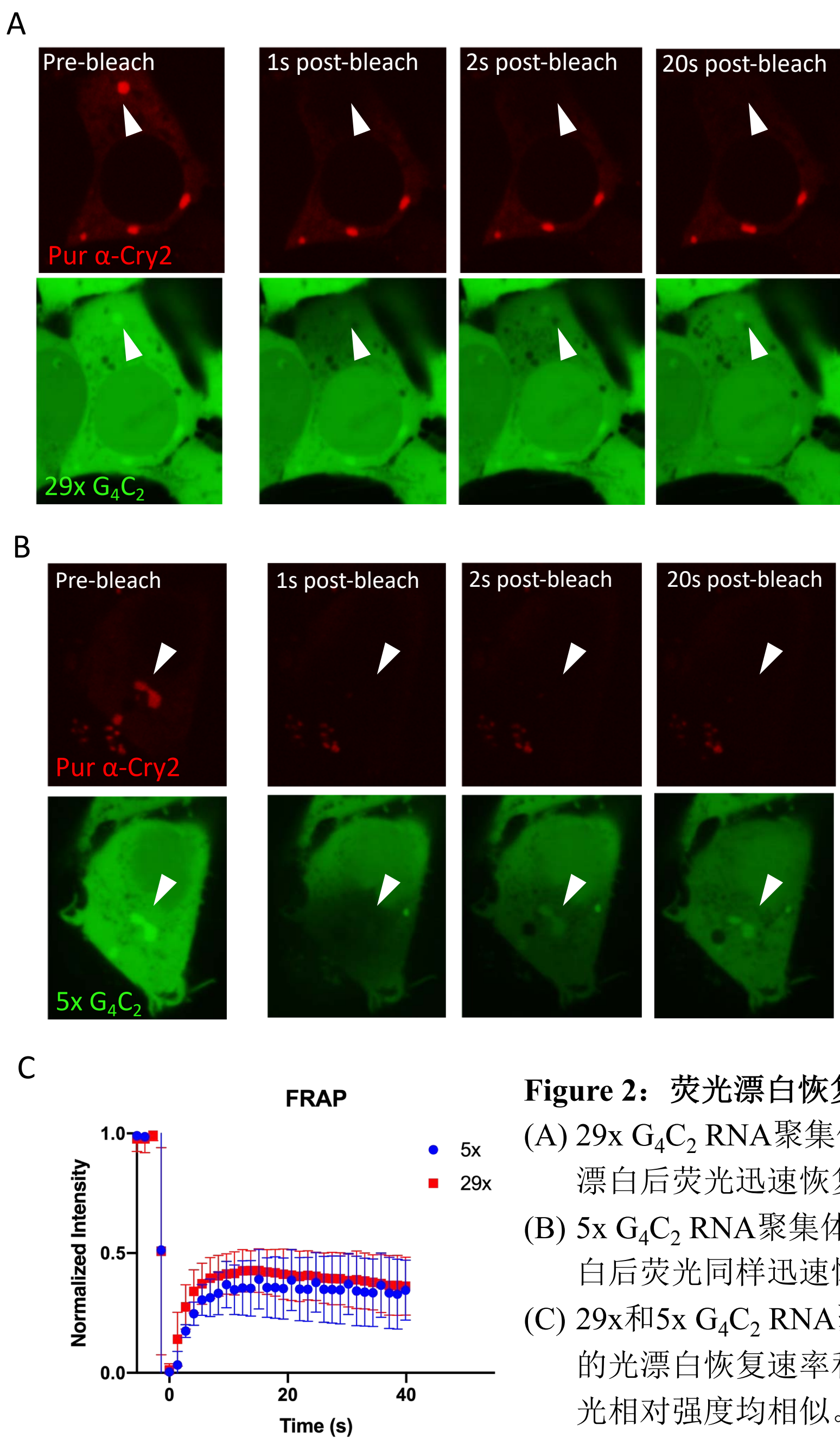


Figure 2: 荧光漂白恢复
(A) 29x G_4C_2 RNA聚集体在光漂白后荧光迅速恢复。
(B) 5x G_4C_2 RNA聚集体在光漂白后荧光同样迅速恢复。
(C) 29x和5x G_4C_2 RNA聚集体的光漂白恢复速率和恢复荧光相对强度均相似。

References

- Shin *et al.* Spatiotemporal Control of Intracellular Phase Transitions Using Light-Activated optoDroplets. *Cell* **168**, 159–171 (2017).
- Ankur Jain & Ronald D. Vale. RNA phase transitions in repeat expansion disorders. *Nature* **546**, 243–247 (2017).
- Xu, Z. *et al.* Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 7778–7783 (2013).
- Taslimi, A. *et al.* An optimized optogenetic clustering tool for probing protein interaction and function. *Nat. Commun.* 5:4925 doi: 10.1038/ncomms5925 (2014).