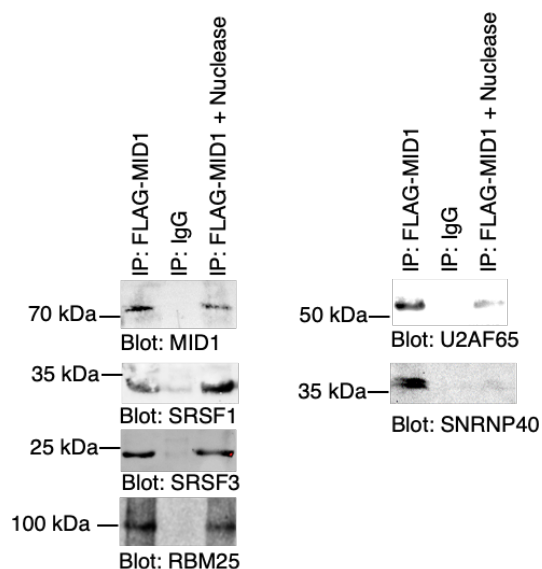


## Gefördertes Projekt: Dysregulation des Spleißens bei Morbus Huntington: ein wichtiger RNA-abhängiger Pathomechanismus

Morbus Huntington ist eine neurodegenerative Erkrankung, für die es bis heute keine kausale Therapie gibt. Um innovative Therapie-Ansätze zu entwickeln, ist ein genaues Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen unabdingbar. Aufbauend auf unseren vorläufigen Studien, die nahelegen, dass fehlerhaftes Spleißen ein wichtiger RNA-abhängiger Pathomechanismus bei Morbus Huntington ist (Nalavade et al., 2013; Schilling et al., 2019), erforschen wir in diesem Projekt die molekularen Zusammenhänge, die dem dysregulierten Spleißen bei Morbus Huntington zugrunde liegen. Beim Spleißen werden aus der prä-mRNA die nicht-kodierenden Abschnitte eines Gens (Introns), ausgeschnitten und die kodierenden Abschnitte (Exons) zusammengefügt. Dieser Prozess wird von verschiedenen RNA-bindenden Proteinen, sogenannten Spleißfaktoren, durchgeführt. Bei Morbus Huntington ist der Prozess des Spleißens gestört: Die mutierte HTT-mRNA bindet aberrant an verschiedene Spleißfaktoren und verändert somit deren Aktivität (Schilling et al., 2019). Unsere vorherigen Studien zeigen außerdem, dass das MID1-Protein an die mutierte HTT mRNA rekrutiert wird (Krauss et al., 2013) und die MID1-Expression im Huntington-Gehirn signifikant erhöht ist, was nahelegt, dass MID1 ein wichtiges krankheitsmodifizierendes Protein ist (Heinz et al., 2021). Interessanterweise zeigen unsere vorherigen Studien auch, dass im MID1-Interaktom auch diverse Spleißfaktoren nachweisbar sind (Matthes et al., 2018). Basierend auf unseren bisherigen Forschungsergebnissen untersuchen wir in diesem Projekt die Interaktion zwischen 18 Spleißfaktoren, die aberrant an mutierte HTT-RNA binden, und Interaktionspartner von MID1 sind. Ziel des Projekts ist es, ein besseres Verständnis über die RNA-abhängigen molekularen Mechanismen der zellulären Dysfunktion bei Morbus Huntington zu erreichen. Die hier gewonnen Erkenntnisse könnten den Grundstein innovativer Therapie-Ansätze bilden.

In unserem ersten Arbeitspaket analysieren wir die Bindung des MID1-Proteins an die 18 verschiedenen Spleißfaktoren. Hierzu führen wir eine Co-Immunpräzipitation durch. Durch Zugabe einer Nuklease (einem Enzym, das RNA degradiert) zu einem solchen Ansatz, können wir ferner schließen, ob die Proteine RNA-abhängig oder RNA-unabhängig aneinander binden. Bislang konnten wir hierbei für 15 Spleißfaktoren validieren, dass diese an MID1 binden, wobei 9 RNA-abhängig und 6 RNA-unabhängig binden. Die verbleibenden 3 Spleißfaktoren werden derzeit noch analysiert. Ferner laufen derzeit sogenannte RNA-Pulldown-Experimente, in denen wir zeigen werden, ob die Bindung der 18 Spleißfaktoren an die mutierte HTT-RNA durch das MID1-Protein beeinflusst wird. Um im zweiten Arbeitspaket Auswirkungen der Interaktion zwischen MID1, den Spleißfaktoren und der mutierten HTT-RNA auf aberrantes Spleißen zu untersuchen, haben wir aus Zellen mit unterschiedlichen MID1-Mengen (in denen MID1 entweder depletiert oder überexprimiert wurde) RNA isoliert, die derzeit in einem RNA-Sequenzierungs-Experiment auf veränderte Spleißmuster hin untersucht wird. Sobald alle Daten aus den ersten beiden Arbeitspaketen vorliegen, werden wir gezielt anormale Spleißvorgänge im Huntington-Gehirn validieren.



**Abbildung:** Westernblotanalysen der Co-Immunpräzipitation von MID1 mit verschiedenen Spleißfaktoren in Abwesenheit (jeweils linke Spur), oder Anwesenheit einer Nuklease (jeweils rechte Spur). Hierbei wurde MID1-FLAG mithilfe von Anti-FLAG-Agarose aufgereinigt und die jeweiligen Spleißfaktoren, die sich in den aufgereinigten MID1-Komplexen befinden mittels spezifischer Antikörper auf den gezeigten Blots detektiert. Die mittlere Spur zeigt die Negativkontrollen. Im linken Teil der Abbildung sind Spleißfaktoren, die RNA-unabhängig an MID1 binden, gezeigt, die rechts dargestellten Westernblots zeigen Beispiele von Spleißfaktoren, die RNA-abhängig an MID1 binden.