

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Petra Tabáková

Úloha m6A dráhy v regulaci ontogenetického vývoje mozku potkana

The role of the m6A pathway in the regulation of brain ontogenesis in the rat

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Petr Telenský, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze:

Podpis:

Poděkování

Mé poděkování patří především mému školiteli Mgr. Petru Telenskému, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a odborné vedení, které mi věnoval při psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu laboratoře a zejména Mgr. Barboře Černé za ochotu a pomoc kdykoliv jsem požádala. Chtěla bych poděkovat celému oddělení pana docenta Novotného a paní docentky Bendové za poskytnutí materiální podpory a také za možnost využít prostorů jejich laboratoře. Velmi děkuji své rodině a přátelům, kteří mě podporovali nejen při psaní diplomové práce, ale i v průběhu celého studia.

Provedení diplomové práce bylo finančně podpořeno projektem č. 1732218 Grantové agentury Univerzity Karlovy (GA UK), grantem PRIMUS/SCI/33 výzkumného programu Primus UK a projektem č.16-12420Y Grantové agentury České republiky (GAČR)

Abstrakt

N6-metyladenosin (m6A) je nejběžnější post-transkripční modifikace RNA, která významně ovlivňuje osud mRNA transkriptů. Mezi významnými proteiny regulující tuto takzvanou m6A dráhu patří metyltransferázy (enzymy z rodiny METTL), demetylázy (FTO, enzymy z rodiny ALKBH) a proteiny vázající se na m6A (např. rodina YTHDF), které rozpoznávají sekvence RNA v závislosti na množství a lokalizaci m6A v cílových transkriptech. Jejich navázání ovlivňuje osud mRNA transkriptů, zatímco úkolem metyltransferáz a demetyláz je zajistit dynamickou rovnováhu hladiny mRNA a patrně i dosud neobjasněné mechanismy specifity těchto tzv. epitranskriptomických značek.

Hlavním cílem této práce bylo stanovit relativní změny exprese proteinů uplatňujících se v m6A regulační dráze mozku potkana v průběhu raného postnatálního vývoje a v dospělosti. Zjistili jsme, že hladina exprese hlavních proteinů m6A dráhy postupně klesá od narození do dospělosti s výjimkou období přechodného zvýšení mezi 10. až 18. postnatálním dnem. Současně jsme pozorovali významné změny v expresi proteinů dýchacího řetězce mezi těmito postnatálními dny. Je však zapotřebí dalšího výzkumu, aby bylo možné prokázat mechanistické spojení mezi m6A dráhou a regulací energetické homeostázy mozku během raného vývoje. Poznání úlohy m6A dráhy v regulaci ontogenetického vývoje a energetického metabolismu mozku by mohlo být přínosné pro pochopení a léčbu neurologických onemocnění.

Klíčová slova:

N6-metyladenosin, FTO, postnatální vývoj, energetický metabolismus, mozek

Abstract

N6-methyladenosine (m6A) is the most ubiquitous post-transcriptional RNA modification and has an important role in determining the fate of mRNA transcripts. Among the key proteins of the m6A pathway are methyltransferases (METTL family enzymes), demethylases (FTO, ALKBH family enzymes), and m6A binding proteins (e.g., YTHDF family) which recognize RNA sequences depending on the amount and localization of m6A in target transcripts and subsequently influence the fate of mRNA transcripts. The role of methyltransferases and demethylases is to provide a dynamic balance of m6A levels and possibly to convey mechanisms of specificity for these so-called epitranscriptomic marks, which are not yet fully understood.

The main objective of this work was to determine the relative changes in the expression of key m6A pathway proteins during early postnatal development and adulthood in the rat brain. We found that the level of expression of key m6A pathway proteins decreases from birth to adulthood, with the exception of a transient increase between postnatal days 10 and 18. During this period, we also found significant changes in the expression of respiratory chain complexes. However, further research is needed to provide evidence of a mechanistic link between the m6A pathway and brain energy homeostasis during early development. Determining the role of the m6A pathway in the regulation of brain ontogeny and energy homeostasis could bring advancement in the understanding and treatment of neurological disorders.

Key words:

N6-methyladenosine, FTO, postnatal development, energy metabolism, brain

OBSAH

Abstrakt	4
Abstract	5
OBSAH	6
SEZNAM ZKRATEK	8
1. ÚVOD	11
2. m6A regulační dráha	12
2.1. Charakteristika m6A	12
2.2. Funkce a význam m6A dráhy v CNS	13
2.2.1 Rizikové alely FTO	13
2.2.2 Mechanismus a funkce FTO.....	15
2.2.3 FTO jako regulátor energetického metabolismu	15
2.2.4 Vliv m6A na vývoj mozku	16
3. Cíle diplomové práce	19
4. Materiál a Metody	20
4.1. Zvířata	20
4.2. Přístroje, pomůcky	20
4.3. Chemikálie	21
4.3.1 Roztoky a pufry	22
4.3.2 Protilátky	24
4.4. Příprava vzorků.....	25

4.4.1	Odebírání tkání	25
4.4.2	Homogenizace	25
4.5.	SDS-PAGE/ Western blot.....	25
4.5.1	Metoda BCA.....	25
4.5.2	SDS-PAGE elektroforéza	26
4.5.3	Western blot.....	27
4.6	Kvantifikace m6A v mRNA	28
4.7.	Analýza dat	30
5.	Výsledky	31
5.1.	Expres proteinů m6A dráhy ve vývojové řadě	31
5.2.	Mitochondriální respirační komplexy	35
5.3.	Metylace mRNA.....	38
6.	Diskuze.....	39
7.	Závěr	42
8.	Literatura	43

SEZNAM ZKRATEK

ALKBH	Alkylation repair homolog
ALKBH5	Alkylation repair homolog 5
ALKBH9	Alkylation repair homolog 9
APOE ϵ 4	Apolipoprotein E ϵ 4
BCA	Kyselina bincinoninová
BSA	Hovězí sérový albumin
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin dependentní proteinkináza
CI	komplex I
CII	komplex II
CIII	komplex III
CIV	komplex IV
CUX1	Cut-like homeobox 1/ transkripční faktor
CREB	Protein vázající cAMP-responzivní element
EDTA	Kyselina etylendiamintetraoctová
eIF3	Eukaryotic initiation factor
FTO	Fat mass and obesity-associated protein
g	Tíhové zrychlení
HNRNPA2B1	Heterogenní jaderný ribonukleoprotein A2/B1
HNRNPC	Heterogenní jaderný ribonukleoprotein C
IGF2BP1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1
IGF2BP2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2
IGF2BP3	Insulin-like growth factor-binding protein 3
IRX3	Iroquois homeobox protein 3

JAK	Janusova kináza 2
KIAA1429	Protein virilizer homolog
kDa	Kilodalton
METTL3	Methyltransferase-like protein 3
METTL14	Methyltransferase-like protein 14
mRNA	Mediátorová RNA
m ⁶ A	N6-metyladenosin
OBRb (LepRb)	Dlouhá isoforma leptinového receptoru
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
RNA	Ribonukleová kyselina
rpm	Revolutions per minute/otáčky za minutu
SDS	Dodecylsírán sodný
SLB	Laemmli pufr
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
STAT3	Signální transduktor a aktivátor transkripce 3
WTAP	Wilms' tumor 1- associating protein
YTHDC1	YTH doménu obsahující protein 1
YTHDC2	YTH doménu obsahující protein 2
YTHDF1	YTH domain family protein1
YTHDF2	YTH domain family protein 2
YTHDF3	YTH domain family protein 3

LITERÁRNÍ PŘEHLED

1. ÚVOD

V posledních desetiletích se neustále zvyšuje prevalence onemocnění jako obezita, diabetes 2. typu, kardiovaskulárních onemocnění, kognitivních poruch, poruch metabolismu a také neurodegenerativních onemocnění. Bohužel příčiny těchto onemocnění jsou mnohdy neznámé či ne zcela objasněné.

N6-metyladenosin (m6A) je dynamická a reverzibilní mRNA modifikace, která představuje přirozený substrát pro RNA demetylázu FTO. Genetické polymorfismy v hlavní m6A demetyláze FTO jsou silně asociovány s rizikem obezity a jsou také spojovány s diabetem, rakovinou a neurologickými onemocněními včetně Alzheimerovy choroby. Metylace RNA patrně představuje důležitý faktor ve vývoji mozku. Vyvážená funkce metyltransferáz a demetyláz v nervovém systému by mohla být jedním z významných faktorů uplatňujících se v ontogenezi mozku a ovlivňujících riziko vzniku řady neurologických onemocnění. Protein RNA demetylázy FTO je kódován FTO genem a jedna z jeho hlavních funkcí je ovlivňování regulace metabolických procesů. Exprese genu FTO probíhá v různých tkáních srdeční a kosterní svaloviny, tukové tkáně, slinivky a jater. Nejvyšší míra exprese RNA demetylázy FTO je však v mozkové tkáni.

V průběhu ontogeneze člověka dochází k výrazným změnám bioenergetické spotřeby v mozkové tkáni. Předchozí studie ukázaly, že m6A dráha, jejímž významným regulátorem je demetyláza FTO, ovlivňuje energetickou homeostázu a její dysregulace může vést ke změnám morfologie mozku a k vývojovým malformacím. Většina těchto studií se zaměřovala na hypotalamus, především na jeho jádra podílející se na řízení energetické homeostáze.

2. m6A regulační dráha

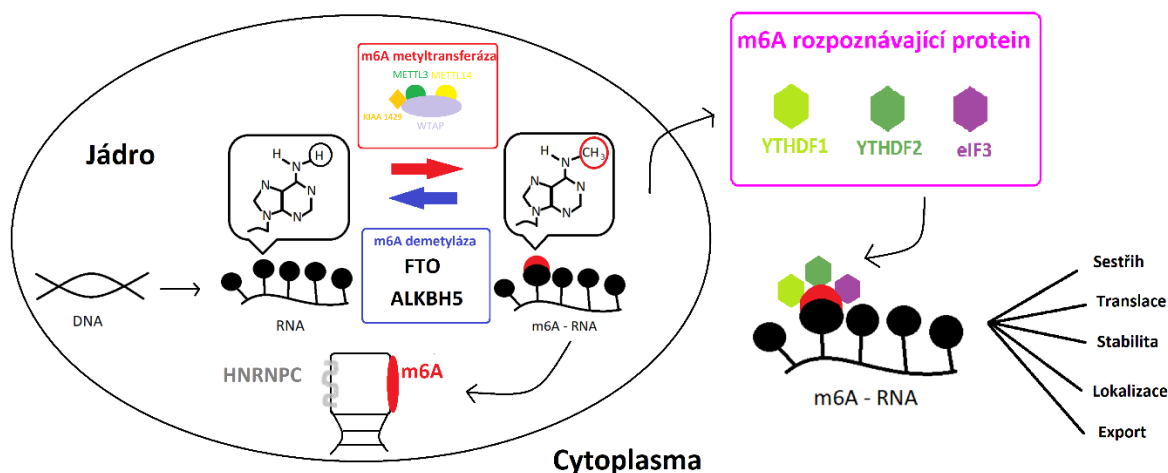
2.1. Charakteristika m6A

N6-metyladenosin je nejčastější a nejdéle známou modifikací mRNA (Wei et al. 1975). Tato mRNA modifikace je rozšířená v mnoha tkáních, zejména v mozku, kde jsou její hladiny nejvyšší (Meyer et al. 2012). Studie z roku 2017 dokazuje vysoké zastoupení m6A převážně v neuronech (Chang et al. 2017). Ke zvyšování množství N6-metyladenosinu v mozku dochází během zrání neuronů (Meyer et al. 2012). Za tuto modifikaci mRNA odpovídá metyltransferázový komplex, v němž patrně mají významnou regulační úlohu zejména podjednotky methyltransferase like 3 (MTTL3) a methyltransferase like 14 (MTTL14) a Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP) (Liu et al. 2014). Methyltransferázová aktivita celého komplexu je realizována proteiny METTL3 a METTL14 (Liu et al. 2014, Śledź et al. 2016). Komplex METTL3-METTL14 interaguje s proteinem WTAP, který neproказuje metyltransferázovou aktivitu, nicméně po jeho odstranění dochází k podstatné redukci m6A (Ping et al. 2014, Liu et al. 2014, Schwartz et al. 2014). Methyltransferázový komplex je lokalizován v tzv. jaderných skvrnách (Jia et al. 2011), za což nese zodpovědnost protein WTAP (Ping et al. 2014). KIAA1429 je dalším proteinem nacházejícím se v jaderných skvrnách společně s metyltransferázovým komplexem a proteinem WTAP (Horiuchi et al. 2013). Protein KIAA1429 integruje se složkami metyltransferázového komplexu a zároveň ovlivňuje metylaci mRNA (Schwartz et al. 2014). Změna aktivity metyltransferázy vede k podstatným změnám genové exprese (Dominissini et al. 2012) a může ovlivňovat i expresi mRNA (Ronkainen et al. 2016).

Za odstraňování metylové skupiny z RNA jsou zodpovědné demethylázy, a sice první identifikované mRNA demethylázy FTO (Jia et al. 2011) a ALKBH5 (Zheng et al. 2013), oba patřící ke skupině 2-oxoglutarát dependentních demethyláz nukleových kyselin (Gerken et al. 2007).

Methyltransferázy a demethylázy jsou primárně lokalizované v jádře. Tam také dochází k rozpoznání modifikace m6A specifickými čtecími proteiny nebo ribonukleoproteinovými částicemi (readers) HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1 nebo IGF2BP1/2/3, zatímco v cytoplazmě je m6A rozpoznána proteiny YTHDF1/2/3, YTHDC2, eIF3 a IGF2BP1/2/3 (Dominissini et al. 2012, Fu et al. 2014, Luo et al. 2018). Prostřednictvím všech těchto

proteinů m6A dokáže regulovat mj. degradaci RNA (Wang et al. 2014), jaderný transport (Zheng et al. 2013), sestřih RNA (Xiao et al. 2016) a další zpracování v buňce (Cao et al. 2016). To řadí N6-metyladenosin mezi důležité regulátory dalšího osudu mRNA. Ilustrační schéma m6A dráhy je na obrázku (Obr. 1). Některé recentní studie ukázaly, že tato modifikace mRNA se podílí na diferenciaci buněk, regulaci spermatogeneze a vývoji mozku (Mendel et al. 2018, Li et al. 2017).



Obr. 1 m6A regulační dráha. Regulační úloha metylace a demetylce mRNA prostřednictvím metyltransferázového komplexu (MTTL3, MTTL14, WTAP) a demetyláz (FTO, ALKBH5) probíhající v jádře buňky, kde se nachází i ribonukleoproteinová partikule HNRNPC rozpoznávající m6A. V cytoplasmě tuto mRNA modifikaci identifikují rozpoznávající proteiny (YTHDF1, YTHDF2, eIF3), které ovlivňují další osud mRNA. Vlastní tvorba, zdroj: (Cao et al. 2016).

2.2. Funkce a význam m6A dráhy v CNS

2.2.1 Rizikové alely FTO

Protein FTO je označován v odborné literatuře různými názvy, jako například fat mass and obesity associated protein, ALKBH9 nebo alfa-ketoglutarát-dependentní dioxygenáza FTO. Poprvé byl FTO objeven při popisu myši, které postihly vrozené vady, které měly dopad zejména na nezvyklý vývoj kraniofaciální struktury (Peters et al. 1999). V lidském genomu se gen FTO nachází na dlouhém raménku 16. chromozomu, přesněji na pozici 16q12.2. V myším genomu se tento gen nachází na 8. chromozomu.

Byly zjištěny souvislosti mezi jednonukleotidovým polymorfismem SNP (single nucleotide polymorphism) FTO genu s rizikem obezity a výskytem dalších nemocí jako diabetes 2. typu nebo s problémy kardiovaskulárního původu (Frayling et al. 2007). Nejvíce studovaným jednonukleotidovým polymorfismem FTO genu je varianta rs9939609. Tento jednonukleotidový polymorfismus FTO genu obsahuje alely A a T, kde se zdá, že riziková alela A je přímo spojena se zvýšenou akumulací tělesného tuku, zejména když se jedná o homozygota AA (Frayling et al. 2007). Rizikové alely varianty rs9939609 mohou mít negativní vliv také na některé kognitivní funkce související se zhoršením výsledků kognitivních testů verbální fluence (Benedict et al. 2011). Dalšími rizikovými alelami SNP genu FTO jsou rs1421085 a rs17817449, jejichž projevy jsou spojovány se snížením velikosti některých struktur mozku u člověka. Dochází ke snížení objemu mozku průměrně o 8 % ve frontálních lalocích a 12 % v okcipitálních lalocích v porovnání s jedinci bez přítomnosti těchto rizikových alel (Ho et al. 2010). Studie irácké obézní populace poukazuje na rs9939609 a rs17817449, jakožto polymorfismy FTO genu, které jsou spojeny s vyšším rizikem rozvoje diabetu 2. typu, zejména u nositelů homozygotního genotypu (TT) v rs9939609, kde je až třikrát vyšší riziko rozvoje tohoto onemocnění (Younus et al. 2017). Riziko rozvoje neurologických onemocnění, jako jsou poruchy kognitivních funkcí a Alzheimerova choroba, se zvyšují při přítomnosti rizikové alely FTO rs9939609 společně s alelou APOE ε4 (Keller et al. 2011). Další výzkum ukázal, že fenotypové projevy spojené s rizikovými variantami genu pro FTO jsou dány změnami v aktivitě a expresi enzymu (Church et al. 2009).

Byl prokázán vliv FTO na regulaci potravní motivace v mozku. Potravní motivace je kromě hypotalamických center hladu a sytosti významně ovlivňována také činností dopaminergních obvodů zapojených do regulace pocitů odměny a slasti. Podařilo se prokázat vliv FTO na tyto dopaminergní dráhy (Hess et al. 2013). To by mohlo znamenat, že nositelé těchto alel upřednostňují potravu s vysokou energetickou hodnotou, což přispívá k obéznímu fenotypu. U myši se zvýšenou expresí FTO se projevuje nadměrný příjem potravy a následný rozvoj obezity (Church et al. 2010). Bylo zjištěno, že mutace v sekvenci kódující myši FTO protein snižuje funkční aktivitu FTO a způsobuje sníženou hmotnost tuku a tělesnou hmotnost, přičemž příjem potravy a aktivita byla normální, ale mutantní myši měly zvýšenou metabolickou aktivitu (Church et al. 2009). Celkový útlum či ztráta funkce tohoto enzymu představuje velká rizika spojená se vznikem vývojových retardací (Fischer et al. 2009).

2.2.2 Mechanismus a funkce FTO

Mechanismus funkce FTO byl dlouhou dobu neznámý. Funkce těchto 2-oxoglutarát dependentních demetyláz zahrnují opravy nukleových kyselin a kontrolu hladin glukózy a esenciálních aminokyselin v buňce. Při nedostatku těchto živin dochází k vyvolání reakce, která vede k pozastavení buněčného cyklu a exprese celkové mRNA v buňce (Loenarz & Schofield 2008).

Jak již bylo řečeno, mechanismem působení RNA-demetylázy FTO je odstranění metylové skupiny (Jia et al. 2011). Z pohledu fyziologického významu se demetyláza FTO jeví také jako nadřazený regulátor metabolických drah v energetickém metabolismu (Fu et al. 2014). Gen pro FTO dále ovlivňuje gen pro IRX3 interakcí na delší vzdálenosti (long-range interactions; Smemo, 2014). FTO se tak může řadit mezi významné regulátory genové exprese (Jowett et al. 2010).

2.2.3 FTO jako regulátor energetického metabolismu

FTO je exprimován v periférii i v mozkové tkáni, přičemž v mozku hladina exprimovaného genu FTO dosahuje výrazně vyšších hodnot než v periférii (Madsen et al. 2010, McTaggart et al. 2011). V mozku je nejvyšší exprese FTO v hypotalamu, konkrétně v obloukovém, paraventriculárním, ventromediálním a dorsomediálním jádře. Tato hypotalamická jádra jsou významně zapojená do regulace energetické rovnováhy (Gerken et al. 2007). Díky této skutečnosti se FTO řadí mezi potenciální kandidáty ovlivňující energetický metabolismus.

V periférii se protein FTO exprimuje zejména v srdci, kosterních svalech, v tukové tkáni, játrech, slinivce nebo ledvinách savců (Gerken et al. 2007). U prasat plemena Suzhong byla prokázána nejvyšší exprese proteinu FTO v hřbetním tuku, dále v zádovém svalu *musculus longissimus dorsi* a v srdečním endometriu (Fu et al. 2013). Jestliže FTO skutečně reguluje energetickou homeostázu, může být tento protein silněji exprimován ve tkáních, které se přímo podílejí na regulaci energetické bilance. Jedna z prvních studií ukázala, že mezi periferními tkáněmi citlivými na metabolismus byla exprese FTO v játrech a kosterním svalstvu vyšší než v tukové tkáni (Wang et al. 2011).

Leptin reguluje energetickou rovnováhu v těle kontrolou procesů, které se týkají příjmu energie a jejího využití jak na periférii, tak v mozku (Ahima & Flier 2000, Villanueva & Myers 2008). Bylo prokázáno, že FTO kolokalizuje s dlouhou formou leptinového receptoru (OBRb, LepRb) v hypotalamu, a že leptin snižuje hladiny FTO proteinu (Wang et al. 2011). Jiná studie zkoumající funkční úlohu FTO v kardiomyocytech potkana zjistila, že FTO je upregulován leptinem prostřednictvím transkripčního faktoru CUX1 (cut-like homeobox 1), který je indukován JAK2/STAT3 signální drahou. Autoři proto navrhuji, že v kardiomyocytech je exprese FTO regulována leptinovou signalizací (Gan et al. 2013).

FTO je také asociována s inzulinovou rezistencí v kosterním svalu. Jeho exprese je zvýšená ve svalové tkáni pacientů s diabetem 2. typu a zřejmě se přímo podílí na snížené citlivosti svalu na inzulin a zvýšeném oxidativním stresu (Bravard 2011).

2.2.4 Vliv m6A na vývoj mozku

N6-metyladenosin hraje důležitou roli v postnatálním vývoji mozkové tkáně. Nicméně způsob, jakým m6A reguluje vývoj mozku savců zatím není ještě zcela objasněn. Nedávné studie popisují vliv některých proteinů regulujících m6A dráhu na adultní neurogenезi, učení a paměť (Li et al. 2017, Chen et al. 2019). Některé studie pozorovaly, že se celková hladina m6A modifikace v mozku během života může měnit. Hladina m6A byla v průběhu prenatálního vývoje nízká a v dospělosti se dramaticky zvyšovala (Meyer et al. 2012). Demetyláza FTO je exprimována v neurálních kmenových buňkách i v diferencovaných neuronech (Li et al. 2017). Podobně jako relativní zastoupení m6A, také míra exprese FTO v mozku není v průběhu života konstantní. Knockout FTO v hipokampu dospělých myši vede ke snížené proliferaci neurálních kmenových buněk (Li et al. 2017). Nicméně hladina exprese FTO v průběhu postnatálního vývoje nebyla dosud podrobně popsána.

FTO výrazně ovlivňuje volumetrické parametry mozku v dospělosti (Li et al. 2017). Vliv FTO na redukovaný objem některých mozkových struktur byl pozorován nejen u myši, ale i u člověka (Ho et al. 2010, Gao et al. 2010). Hladina exprese genu FTO se zjišťovala také u prasat, jakožto optimálních modelových zvířat, jejichž metabolismus, velikost orgánů a stravovací návyky se podobají těm lidským. Ukázalo se, že hladiny exprese proteinu FTO v mozku jsou nejvyšší zejména v mozečku, hipokampu a mozkové kůře (Madsen et al. 2010).

Myši s celotělovým knockoutem FTO vykazují postnatální růstové retardace, které se projevují zkrácenou délkou těla, nízkou tělesnou hmotností nebo sníženou kostní minerální densitou. Specifická delece FTO v centrálním nervovém systému se projevuje podobnými fenotypovými retardacemi růstu jako u delece v celém těle, což řadí FTO do role potenciálního centrálního regulátora postnatálního růstu (Gao et al. 2010). FTO se také jeví jako důležitý regulační protein účastnící se vývoje struktur mozku. Nedávná studie popisuje prokazatelně snížené volumetrické hodnoty mozečku u myši s deplecí FTO (Li et al. 2017).

Další známá m6A demetyláza ALKBH5 je nejvíce exprimována ve varlatech a je potřebná pro regulaci spermatogeneze (Zheng et al. 2013). U ALKBH5 knockoutu myši nebyla pozorována žádná viditelná změna ve velikosti nebo stavbě mozku, což mohlo být částečně způsobeno kompenzační funkcí FTO (Barbaric et al. 2007). V okamžiku, kdy byli potkani vystaveni hypoxii, došlo k omezení kompenzačních mechanismů a následné redukci tkáně a výskytu defektů ve vývoji mozečku (Ma et al. 2018). Exprese ALKBH5 se mění při hypoxii v mozku. Přesná fyziologická funkce ALKBH5 v mozku ale není zatím zcela objasněna.

Protein METTL3 má stejně jako FTO velký vliv na volumetrické parametry mozku. U METTL3 knockoutu myši byl prokázán vznik vývojových defektů v nervovém systému. Deplece této metyltransferázy vede k výraznému ovlivnění morfologie mozku, včetně zvětšení laterálních komor a výrazného snížení objemu mozečku. Úbytek METTL3 v mozečku způsobuje zvýšenou apoptózu nově vznikajících neuronů ve vnější granulórní vrstvě mozečku (Wang et al. 2018). Bylo prokázáno snížení hladin m6A u neurálních kmenových buněk vlivem poklesu exprese METTL3. Úbytek METTL3 inhiboval proliferaci těchto buněk v dospělém mozku u myši (Chen et al. 2019). Při redukcí METTL14 dochází k růstovým retardacím v raném embryonální věku a následnému úmrtí embrya ještě před narozením (Meng et al. 2019). To naznačuje významnou roli METTL14 v prenatálním období.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. Cíle diplomové práce

Metylace adenosinu má vliv na osud mRNA, tudíž hraje zásadní roli v regulaci některých buněčných procesů. V průběhu ontogeneze je m6A regulována, což vyvolává změny ve vývoji mozku. Různá hladina proteinů, podílejících se na regulaci m6A dráhy, ovlivňuje metabolismus v mozkové tkáni. Vzhledem k vysokému zastoupení m6A v mozku se jedná o významný regulační mechanismus spjat s bioenergetickými změnami.

V průběhu ontogeneze člověka dochází k výrazným změnám bioenergetické spotřeby v mozkové tkáni. V roce 2014 se přišlo na to, že okolo pátého roku věku mozek dosahuje nejvyšší metabolické náročnosti. Tato metabolická náročnost činí asi 66 % klidové metabolické spotřeby těla. V dospělosti mozek zodpovídá až za 20 % klidové metabolické spotřeby těla (Kuzawa et al. 2014). Výraznější pokles metabolické spotřeby v pozdní dospělosti je významným rizikovým faktorem a markerem budoucího rozvoje neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba (Mosconi 2013).

Hypotéza:

Během časného postnatálního vývoje a v průběhu dospělosti se v mozku potkana výrazně mění hladina exprese proteinů klíčových pro regulaci m6A dráhy. Tyto změny v expresi proteinů by mohly být asociovány se změnami energetického metabolismu během ontogenetického vývoje.

Cíle:

1. Stanovení úrovně proteinové exprese hlavních regulačních proteinů m6A dráhy v mozku potkana kmene Fisher 344 během časného postnatálního vývoje a v dospělosti.
2. Stanovení změn hladin mitochondriálních respiračních komplexů.
3. Stanovení míry metylace mRNA ve vybraných postnatálních dnech.

4. Materiál a Metody

4.1. Zvířata

Jako experimentální zvířecí model byli použiti samci a samice potkanů kmene Fisher 344 (F344). Potkani byli umístěni do chovných boxů, ve skupinách po 1-5 jedincích s volným přístupem k potravě a napájecí láhvi s vodou. Boxy se zvířaty se nacházely v místnosti se světelným režimem 12 h tma/12 h světlo (ranní čas rozsvěcení v 7:00 hodin), teplota vzduchu v místnosti dosahovala 23 ± 1 °C.

4.2. Přístroje, pomůcky

K zajištění experimentální části byly k dispozici přístroje v laboratořích katedry fyziologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Pipetman a pipety (Ependorff), Homogenizátor (IKA EUROSTAR power), Centrifuga (Schoeller), Analytické váhy (SCALTEC), pH metr (METTLER TOLEDO), Napájecí elektroforetické zdroje (Bio-Rad), Aparatura pro elektroforézu a blotting (Bio-Rad), Vyvolávací automat na X-ray filmů (Optimax), X-ray filmy (Agra), Autoradiografické kazety (Amersham Hypercassette), Termoblok (Techne Dri-Block DB 2A), Spektrofotometr Synergy HT (BioTek).

4.3. Chemikálie

Tab. 1 Chemikálie potřebné pro homogenizaci tkání a pro metodu SDS-PAGE/Western blot

Název	Výrobce
Bromfenolová modř	SERVA, Německo
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
Dodecylsírán sodný (SDS)	SERVA, Německo
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Etanol	SERVA, Německo
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	SERVA, Německo
Chlorid hořečnatý (MgCl ₂)	SERVA, Německo
Chlorid sodný (NaCl)	Carl Roth, Německo
Kyselina octová (CH ₃ COOH)	Lachema, Česká republika
Metanol	SERVA, Německo
Metylcelulóza	Sigma-Aldrich, USA
Mléko (sušené odstředěné)	Artifex Instant s.r.o, Česká republika
NNNN' Tetrametyletylnediamin (TEMED)	SERVA, Německo
Persíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA
Ponceau S	Merck, USA
Sacharóza	SERVA, Německo
Tris (Trizma base)	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	SERVA, Německo
Acrylamide/Bis Solution 30%	SERVA, Německo
Femtosubstráty (SuperSignal West Femto)	Thermo Scientific, USA

4.3.1 Roztoky a pufrы

Tab. 2 Roztoky a pufrы potřebné pro homogenizaci tkání a pro metodu SDS-PAGE/Western blot

Název	Složení
Homogenizační pufr TMES	20 mM Tris; 3 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA; 250 mM sacharóza; H ₂ O, pH = 7,4
APS (ammonium persulfate)	10% (w/v) APS; H ₂ O
Pufr 1 (pH 8,8)	1,5M Tris 18,17g; H ₂ O 100ml
Pufr 2 (pH 6,8)	0,5M Tris 6,05g; H ₂ O 100ml
Elektroforetický pufr (running buffer) 10x koncentrovaný	0,25M Tris 30,3g; 2M Glycin 141,1g; 35mM SDS 10g; H ₂ O 1l
Laemmli nanášecí pufr (SLB, pH 6,8)	0,24M Tris (pH 6,8); 10% (v/v) Glycerol 1ml; 28mM SDS 0,8g; 2mM DTT 0,8g; 145mM bromfenolová modř 1mg; mili-Q H ₂ O 10ml; pH=6,8
TBS pufr (pH 7,4) 10x koncentrovaný	1,5M NaCl 43.83g; 0,1M Tris 6,057g; H ₂ O 50ml; pH = 7,4
Blokující pufr 5% (blocking buffer)	10% (v/v) TBS 10ml; 0,1% (v/v) Tween 20 100μl; 5% (w/v) mléko 5g; H ₂ O 90ml
Ředící pufr 1% (diluting buffer)	10% (v/v) TBS 10ml; 0,1% (v/v) Tween 20 100μl; 1% (w/v) mléko 1g; H ₂ O 90ml
Promývací pufr (washing buffer)	10% (v/v) TBS 100ml; 0,3% (v/v) Tween 20 3ml; H ₂ O 900ml
Blotovací pufr (blotting buffer, 1l)	25 mM Tris 3,02g; 190 mM Glycin 14,26g; 20% (v/v) metanol 200ml; dH ₂ O 1000ml
Ponceau barvivo	0,1% (w/v) Ponceau S; 5% (v/v) kyselina octová; H ₂ O

Tab. 3 Roztoky reagentů potřebných pro stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Reagencie	Složení
A	8 g Na ₂ CO ₃ · H ₂ O; 1,6 g vlnanu sodného; doplněno destilovanou H ₂ O do 100 ml; pH 11,2
B	3 g BCA (bicinchoninová kyselina); doplněno destilovanou H ₂ O do 100 ml
C	0,5 g CuSO ₄ · 5H ₂ O; doplněno destilovanou H ₂ O do 10 ml

Tab. 4 Roztoky reagensií a kity potřebné pro stanovení totalní RNA, mRNA a úrovně metylace mRNA

	Název	Katalogové číslo	Výrobce
Totální RNA	RNAzol® RT RNA Isolation Reagent	E01010A	GeneCopoeia, Inc., USA
mRNA	Dynabeads™ mRNA DIRECT™ Purification Kit	61012	ThermoFisher, USA
Metylace	EpiQuik m6A RNA Methylation Quantification Kit (Colorimetric)	P-9005-96	EpiGentek Group Inc., USA

4.3.2 Protilátky

Tab. 4 Primární protilátky

Primární protilátka	Ředění	Sekundární protilátka	Číslo šarže (#lot)	Výrobce
Anti-FTO antibody (5-2H10)	10 000x	Anti-Mouse	GR 288074-20	Abcam
Anti-METTL3 antibody (EPR18810)	10 000x	Anti-Rabbit	GR 233964-2	Abcam
YTHDF1 Rabbit polyclonal antibody (17479-1-AP)	10 000x	Anti-Rabbit	44548	Proteintech
ALKBH5 Rabbit polyclonal antibody (16837-1-AP)	10 000x	Anti-Rabbit	46245	Proteintech
Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail	250x	Anti-Mouse	ab110413	Abcam

Tab. 5 Sekundární protilátky

Sekundární protilátka	Ředění	Číslo šarže (#lot)	Výrobce
Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase-linked (LNXA931V)	20 000x	16810268	GE Healthcare
Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked (NA934V)	40 000x	16836138	GE Healthcare

4.4. Příprava vzorků

4.4.1 Odebírání tkání

Potkani F344 ve stáří 1, 4, 6, 7, 10, 12, 14, 18, 21, 25, 28, 90 postnatálních dnů (n=3-5 na věkovou skupinu; neboli též P1 až P90) byli uvedeni do celkové anestezie pomocí inhalačního anestetika Isofluranu (AERRANE isofluranum, Baxter) nebo aplikací směsi injekčních roztoků Narketanu (Narketan 100 mg/ml, Vétoquinol s.r.o.) a Xylazinu (Xylazin Ecuphar 20mg/ml, BIOVETA) injikované intraperitoneálně. Následně byla odebrána mozková tkáň levé hemisféry a okamžitě zamrazena v tekutém dusíku. Tkáně byly uchovávány v mrazícím zařízení v teplotě -80 °C.

4.4.2 Homogenizace

Tkáň byla zvážena a následně vložena do homogenizačního pufru TMES (1g tkáně na 10 ml pufru TMES) společně s odpovídajícím množstvím inhibitoru proteáz (Complete protease inhibitor cocktail tablets, Roche) 25x ředěným v destilované vodě. Tkáň se v roztoku rozdělila laboratorními pinzetami na co nejmenší kousky a homogenizovala pomocí homogenizátoru při 1200 rpm. Následně proběhla centrifugace homogenátu v centrifuze nastavené na 2100 rpm, po dobu 10 min a se zrychlením 9 a zpomalením 0. Nově vzniklý supernatant byl rozalíkovován, zmrazen v tekutém dusíku a vložen do mrazícího zařízení do teploty -80 °C.

4.5. SDS-PAGE/ Western blot

4.5.1 Metoda BCA

Metoda BCA slouží ke stanovení koncentrace proteinů ve zkoumaném vzorku. Pro přípravu kalibrační křivky byly do 96jamkové destičky nanесeny standardy připraveny podle tabulky (Tab. 6). Standardy obsahovaly koncentrované roztoky tvořené z hovězího sérového albuminu (BSA 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Sigma Aldrich) a destilované vody. Homogenizované vzorky byly 100x naředěny destilovanou vodou a nanесeny na destičku v triplicátech po 100 μl pod standardy. Do všech jamek (jamy obsahující vzorky i standardy) se přidal roztok vytvořený směsí reagentů A, B, C v poměru 26:25:1 (Tab. 3, viz. kapitola 4.3.1). Následně byla destička přelepena lepící páskou a zahřáta na 60 °C na

termobloku po dobu 30 minut. Celková koncentrace proteinu se projevuje změnou barvy ze zelené na fialovou v poměru ke koncentraci proteinu. Poté byla lepicí páska odstraněna a vzorky byly změřeny na spektrofotometru Synergy HT při vlnové délce 529 nm. Výsledné množství proteinů bylo vyhodnoceno s použitím programu Gen5 1.08.

Tab. 6 Příprava standardů s různou koncentrací BSA pro vytvoření kalibrační křivky

Standard	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
obsah BSA (µg)	0	0,2	0,5	1	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
BSA (0,1 µg/µl)	/	2	5	10	15	25	40	60	100	/	/	/	/
BSA (1µg/µl)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	15	20	30	50
H2O	100	98	95	90	85	75	60	40	/	85	80	70	50
	A	B	C	D	E	F	G	H	A	B	C	D	E

Zkratky: BL, blank; BSA, hovězí sérový albumin

4.5.2 SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforéza je metoda pro separaci molekul a stanovení hladin proteinů podle jejich molekulové hmotnosti či odlišného elektrického náboje. Princip spočívá ve schopnosti pohybu nabitých částic v elektronickém poli. Polyakrylamidový gel vytváří trojrozměrnou kompaktní síť, kterou menší molekuly prochází rychleji než molekuly větší. Tyto částice jsou záporně nabitě a migrují skrz gel směrem ke kladné anodě.

Materiál:

Po stanovení koncentrace proteinů metodou BCA (viz. kapitola 4.5.1), byly vzorky smíchány s destilovanou vodou a SLB tak, aby konečná koncentrace proteinů byla 2 µg/µl. Posléze byly vzorky zdenaturovány vložení na termoblok zahřátý na 95 °C po dobu dvou minut. Tento denaturační krok byl vynechán při detekci komplexů mitochondriálního dýchacího řetězce.

Postup:

Na přípravu 10% separačního gelu byly postupně pipetovány jednotlivé roztoky do skleněné kádinky v pořadí, uvedeném v tabulce níže (Tab. 7). Následně bylo potřeba vyčistit etanolem vždy dvě skla na jeden gel s mezerou 1,5 mm. Takto nachystaná skla se uzavřela do kazet, které byly součástí speciální aparatury na elektroforézu. Do mezery mezi skly byl nalit tekutý 10% separační gel, který byl převrstven 350 µl vodou

nasyceným butanolem. Následně se gen nechal polymerizovat po dobu 40-60 minut při pokojové teplotě. Poté byl butanol slit a opláchnut destilovanou vodou z již polymerizovaného separačního gelu. Povrch separačního gelu byl opatrně vysušen filtračním papírem a převrstven zaostřovacím gelem. Do zaostřovacího gelu mezi skla byly vsunuty etanolem vyčištěné rozdělovací hřebínky, které vytvořily v gelu 15 separovaných jamek. Po 30 minutách polymerizace byla skla s gely přesunuta do aparatury na elektroforézu a naplněna elektroforetickým pufrem. Do destilovanou vodou propláchnutých jamek byly nanесeny připravené vzorky s proteiny (nanáška byla 10 μ l/1 jamka). Takto připravená aparatura byla zapojena do zdroje a spuštěna při napětí 200 V po dobu 50 minut.

Tab. 7 Složení na přípravu separačního a zaostřovacího gelu (množství potřebné pro 4 gely)

Složení	10 % separační gel	4% zaostřovací gen
Destilovaná H ₂ O	16 ml	12 ml
Pufř 1	10 ml	/
Pufř 2	/	5 ml
Acrylamide-Bis Solution 30%	13,4 ml	2,6 ml
SDS 10%	400 μ l	200 μ l
APS 10%	180 μ l	180 μ l
TEMED	16 μ l	16 μ l

4.5.3 Western blot

Metodou Western blot dochází k přenosu záporně nabitých proteinů z polyakrylamidového gelu na povrch nitrocelulózové membrány. Specifické proteiny se zviditelní reakcí s protilátkou.

Postup:

Po skončení elektroforézy byl zaostřovací gel oddělen od separačního gelu. Separační gel byl vložen na nitrocelulózovou membránu do blotovacího „sendviče“, okamžitě přemístěn do aparatury pro Western blot a blotován v blotovacím pufru při napětí 100 V po dobu 60 minut. Následně byla nitrocelulózová membrána vyjmuta z aparatury,

opláchnuta destilovanou vodou a vložena do roztoku Ponceau po dobu 10 minut. Poté byla membrána promyta v destilované vodě a oskenována pro pozdější analýzu dat v programu Image J. Membrána byla vložena do blokujícího pufru, kde se inkubovala po dobu 25 minut. Zablokovaná membrána byla přesunuta do ředícího pufru, kde se společně s primárními protilátkami (Tab. 4) inkubovala přes noc při teplotě 4 °C.

Druhý den po inkubaci byly primární protilátky opatrně vylity a membrána byla 3x propláchnuta destilovanou vodou. Následně byla membrána 3x promyta v promývacím pufru po dobu 10 minut. Poté následovala inkubace v ředícím pufru společně se sekundárními protilátkami (Tab. 5) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubační doby byla membrána převrstvena 500 µl chemiluminiscenčním roztokem luminolu a peroxidu vodíku poměru 1:1 po dobu 5 minut. Dále byla membrána uzavřena do vyvolávající kazety a vyvolána ve tmě na film, který byl vyhodnocen v programu Image J.

Opakované použití membrány

Po vyvolání filmu byly membrány vyjmuty z kazety, 3x promyty destilovanou vodou a následně 3x po dobu 10 min promývány promývacím pufrům. Poté byly membrány vloženy do blokujícím pufru po dobu 25 minut a následně inkubovány přes noc v ředícím pufru s primárními protilátkami při 4°C. Další den se opakoval postup druhého dne metody Western blottingu.

4.6. Kvantifikace m6A v mRNA

Izolace totální RNA

Pro metodu izolace totální RNA od ostatních molekul byl použit protokol RNeasy[®] RT RNA Isolation Reagents. Vzorke mozkové tkáně byly homogenizovány v tekutém dusíku na prášek. K zmrzlému prášku byl přidán RNeasy[®] RT v poměru 100mg/ml a následně také sterilizovaná Milli-Q voda v poměru 0,4ml/ml. Výsledná směs byla intenzivně protřepána po dobu 15 sekund a na 5-15 minut inkubována při pokojové teplotě. Následně byly vzorky centrifugovány při přetížení 12 000 g po dobu 15 minut. Všechny centrifugace probíhaly při teplotě 4-28 °C. Pelet s obsahem DNA, proteinů a polysacharidů se odstranil a zbylý supernatant s obsahem RNA byl odebrán a smíchán s isopropanolem v poměru 1:1.

Vzorky byly uskladněny po dobu 10 minut v pokojové teplotě a poté stočeny na centrifuze opět při přetížení 12 000 g po dobu 10 minut. V tomto kroku byl supernatant odstraněn a v nově vzniklém peletu bílé barvy byla obsažena totální RNA. Následně byl pelet promýván přidáním 75% etanolu. Poté byla několikrát za sebou provedena centrifugace peletu při přetížení 4000-8000 g, po dobu 1-3 minut. Na závěr byla přidána sterilní voda (OmniPur® Water, Sterile, Nuclease Free, Calbiochem) do peletu s RNA tak, aby konečná koncentrace RNA byla 1-2 µg/ml. Vše bylo důsledně vortexováno po dobu 2-5 minut při pokojové teplotě.

Izolace mRNA

Postup práce byl proveden podle pokynů výrobce, taktéž přesné hodnoty a poměry roztoků byly uvedeny v manuálu výrobce. Po izolaci totální RNA byl použit kit Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit pro izolaci čisté mRNA. Roztok Dynabeads® Oligo (dT)25 přidán do vzorku a inkubován za stálého míchání po dobu 3-5 minut v pokojové teplotě. Následně byl oddělen supernatant a komplex RNA byl promýván s příslušným množstvím promývacího pufru A při pokojové teplotě. Poté bylo provedeno opětovné promývání, tentokrát s příslušným množstvím promývacího pufru B, opět při pokojové teplotě. Závěrečné promývání proběhlo v enzymatickém pufru. V získaném supernatantu byla obsažena vyizolovaná mRNA.

Určení úrovně metylace mRNA

Postup práce byl proveden podle pokynů výrobce, taktéž přesné hodnoty a poměry roztoků byly uvedeny v manuálu výrobce. Pro zjištění míry metylace ve vzorcích byl použit kit EpiQuik Methylation Quantification Kit (Colorimetric). Tento kit obsahoval kompletní sadu optimalizovaných pufrů a reagensů určených ke kolorimetrické kvantifikaci množství N6-metyladenosinu (m6A) v RNA. V každém analyzovaném vzorku bylo obsaženo 250 ng mRNA. Následně byl připraven promývací pufr, který byl využit na přípravu ostatních roztoků. V kitu byl obsažena negativní kontrola (RNA bez obsahu metyladenosinu) a pozitivní kontrola (RNA s obsahem čistého metyladenosinu).

V jamkách čtecí destičky byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru Synergy HT, při vlnové délce 450 nm.

Podle následujícího výpočtu bylo stanoveno procentuální množství m6A ve vzorku:

$$\text{m6A \%} = \frac{(\text{SAMPLE OD} - \text{NC OD}) \div \text{S}}{(\text{PC OD} - \text{NC OD}) \div \text{P}} \times 100\%$$

SAMPLE OD – absorbance vzorku

NC OD – negativní kontrola

PC OD – pozitivní kontrola

P – 1 ng

S – Nanáška mRNA (250 ng)

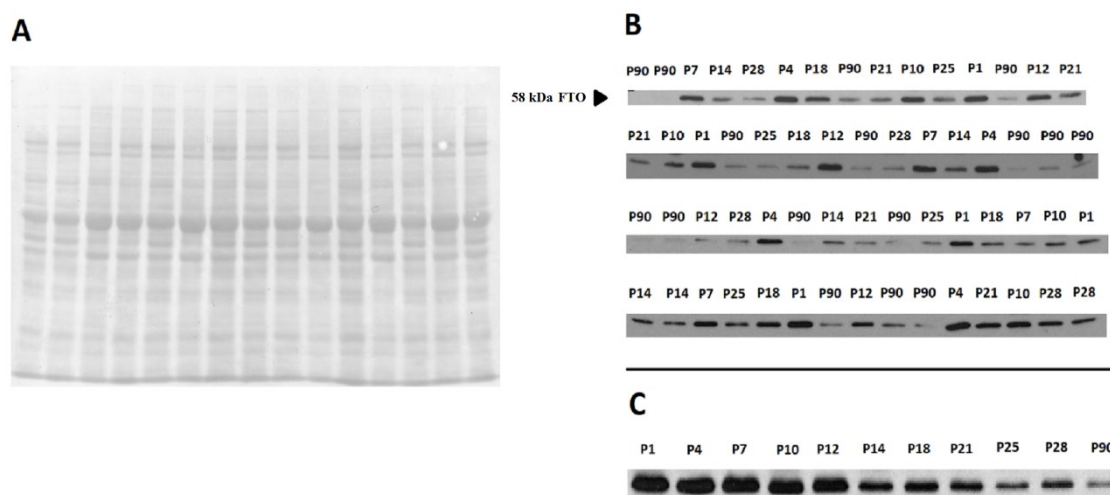
4.7. Analýza dat

Analýza dat použitých v grafech byla provedena pomocí softwaru ImageJ 1.52a (W. Rasband, US National Institutes of Health, imagej.nih.gov). Vyhodnocování dat spektrofotometricky bylo provedeno pomocí řídicího a analytického softwaru Gen5 1.08 (BioTek Æ Instruments, Inc., UK, www.biotek.com). Statistická analýza byla provedena v GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., California, USA, www.graphpad.com). Zjištěné hodnoty byly porovnány podle jednocestné a dvoucestné analýzy ANOVA.

5. Výsledky

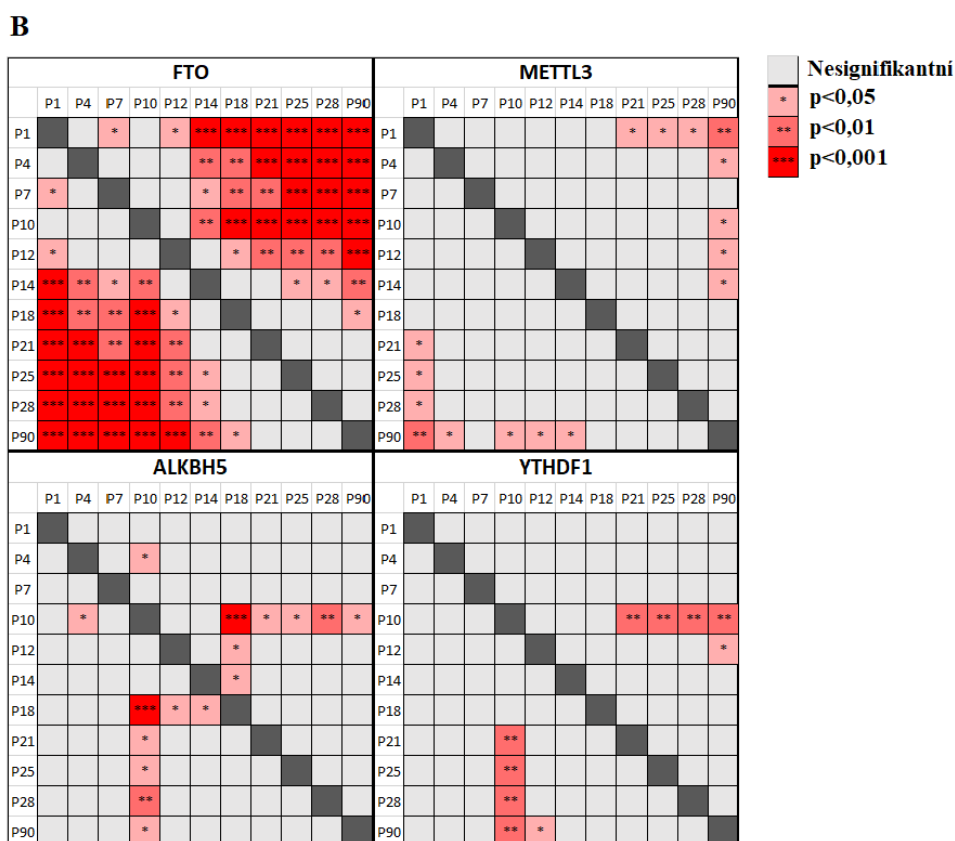
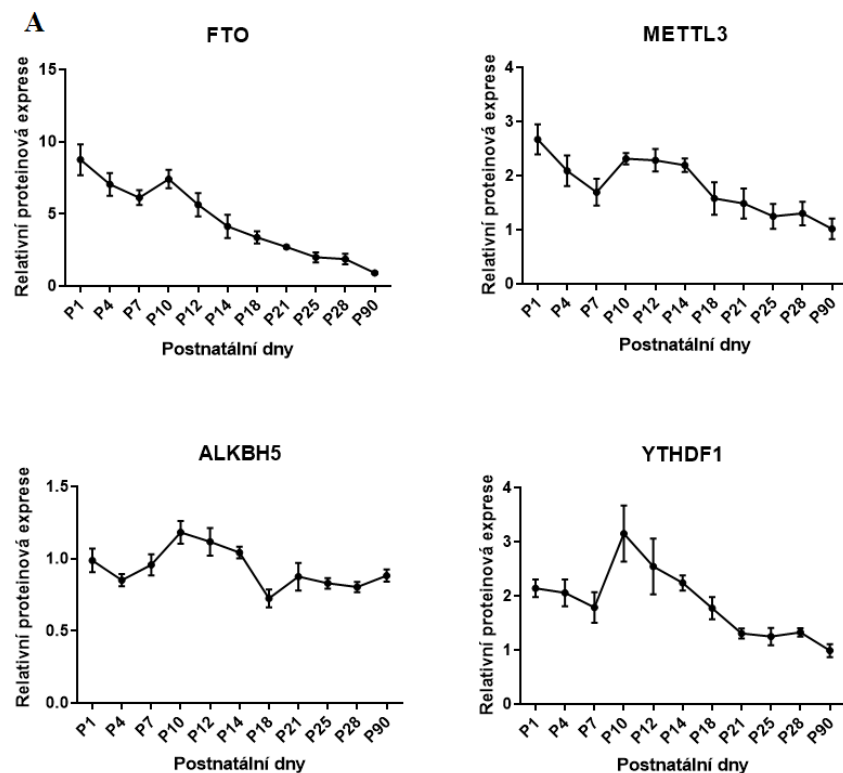
5.1. Expresa proteinů m6A dráhy ve vývojové řadě

Pomocí metod SDS-PAGE elektroforézy a Western blotu bylo provedeno několik měření, která detekovala přítomnost vybraných proteinů zapojených do m6A regulační dráhy. Pro měření změn exprese bylo použito pět blotů. Nejprve byly stanoveny jednotlivé vzorky zvlášť v randomizovaném pořadí na čtyřech blotech, na kterých byl současně i triplikát vzorku dospělého mozku (P90), který byl použit pro porovnání výsledků jednotlivých blotů. Dále byl proveden pátý kontrolní blot, ve kterém byly smíšené vzorky z jednotlivých postnatálních dnů. Schema pokusu je na obrázku (Obr. 2).

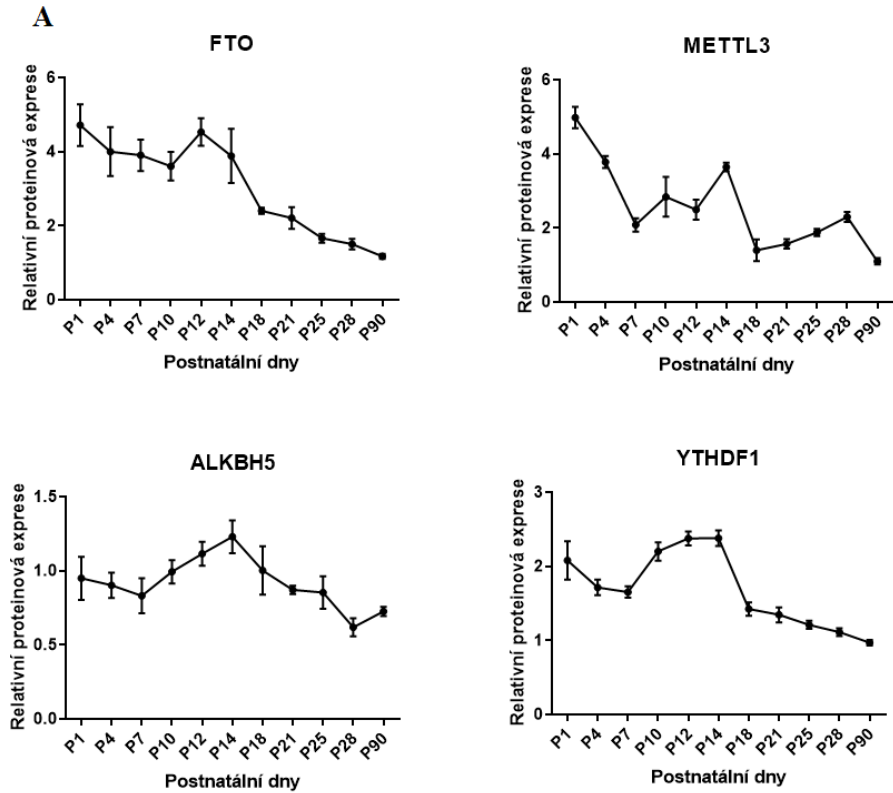


Obr. 2 Stanovení exprese proteinu FTO u samců. (A) Reprezentativní snímek membrány po barvení Ponceau. (B) Snímky imunoblotů s randomizovaným pořadím vzorků, zobrazení intenzity chemiluminiscenčního signálu proteinu na filmu. (C) Kontrolní blot ze smíšených vzorků z jednotlivých postnatálních dnů.

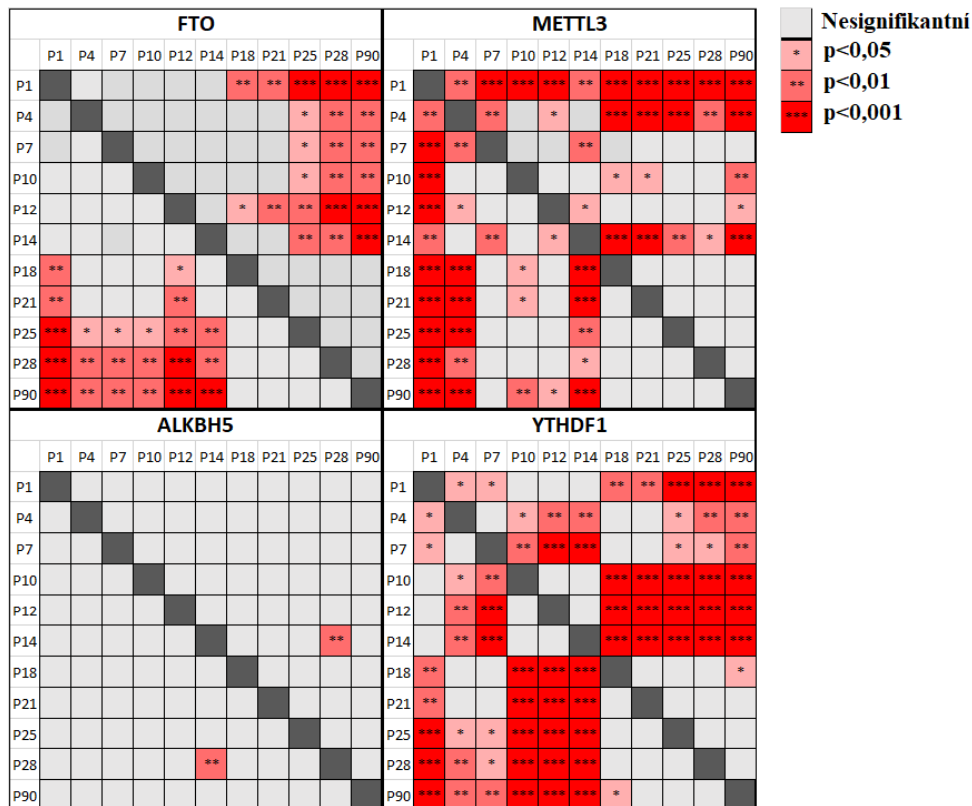
Výsledky potvrdily změny v relativní expresi proteinů FTO, METTL3, ALKBH5 a YTHDF1 u samců (Obr. 3) a samic (Obr. 4) v průběhu postnatálního ontogenetického vývoje potkanů F344. Bylo analyzováno celkem 11 věkových skupin (P1, P4, P7, P10, P12, P14, P18, P21, P28, P90), vždy se 3-4 jedinci na jednu věkovou skupinu. Nejvýraznější změny v expresi u všech 4 detekovaných proteinů byly zaznamenány u potkanů ve stáří P10-P18 postnatálních dnů. U proteinů FTO a METTL3 dosahovaly míry hladiny jejich exprese nejvyšších hodnot v brzkých postnatálních dnech krátce po narození (P1-P4). S následujícím zvyšujícím se věkem zvířete (P18-P90) se projevoval signifikantní pokles hladin proteinů FTO a METTL3. U proteinu ALKBH5 se však neprojevoval výrazné rozdíly v expresi v brzkém postnatálním období a v dospělosti. Výsledky exprese proteinu YTHDF1 napříč věky ukazovaly podobný klesající trend jako v případě FTO a METTL3, přičemž změny relativní exprese YTHDF1 byly daleko markantnější mezi 10. a 18. postnatálním dnem. Statistické testy identifikovaly pozorované změny jako signifikantní u všech pozorovaných proteinů u obou pohlaví (Obr. 3, Obr. 4).



Obr. 3 Proteiny m6A dráhy u samců. (A) Relativní exprese proteinů FTO, METTL3, ALKBH5 a YTHDF1 v průběhu vybraných postnatálních dnů. Data grafch reprezentují průměrné hodnoty s vnesením střední chyby průměru. (B) *Post-hoc* test. Newmanova–Keulsova metoda mnohonásobného porovnávání.



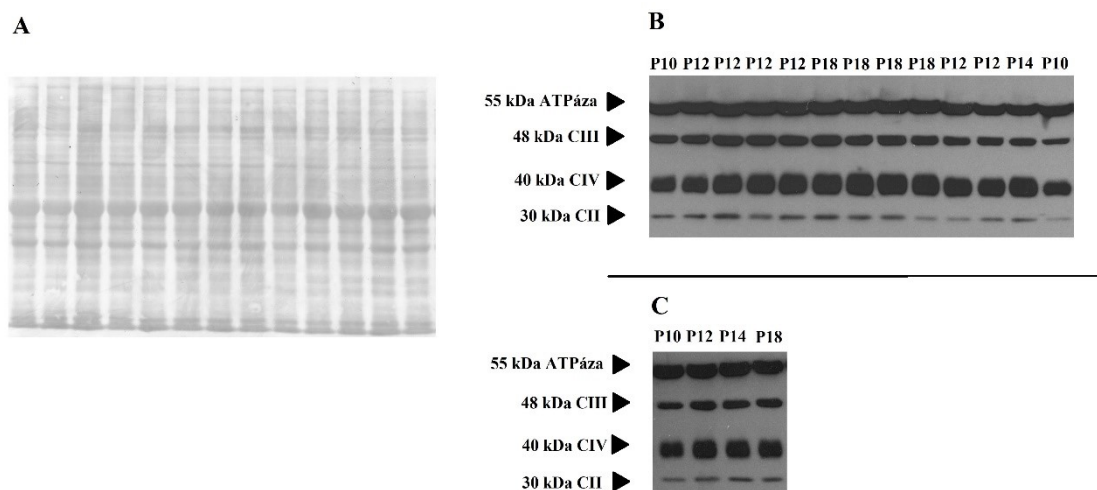
B



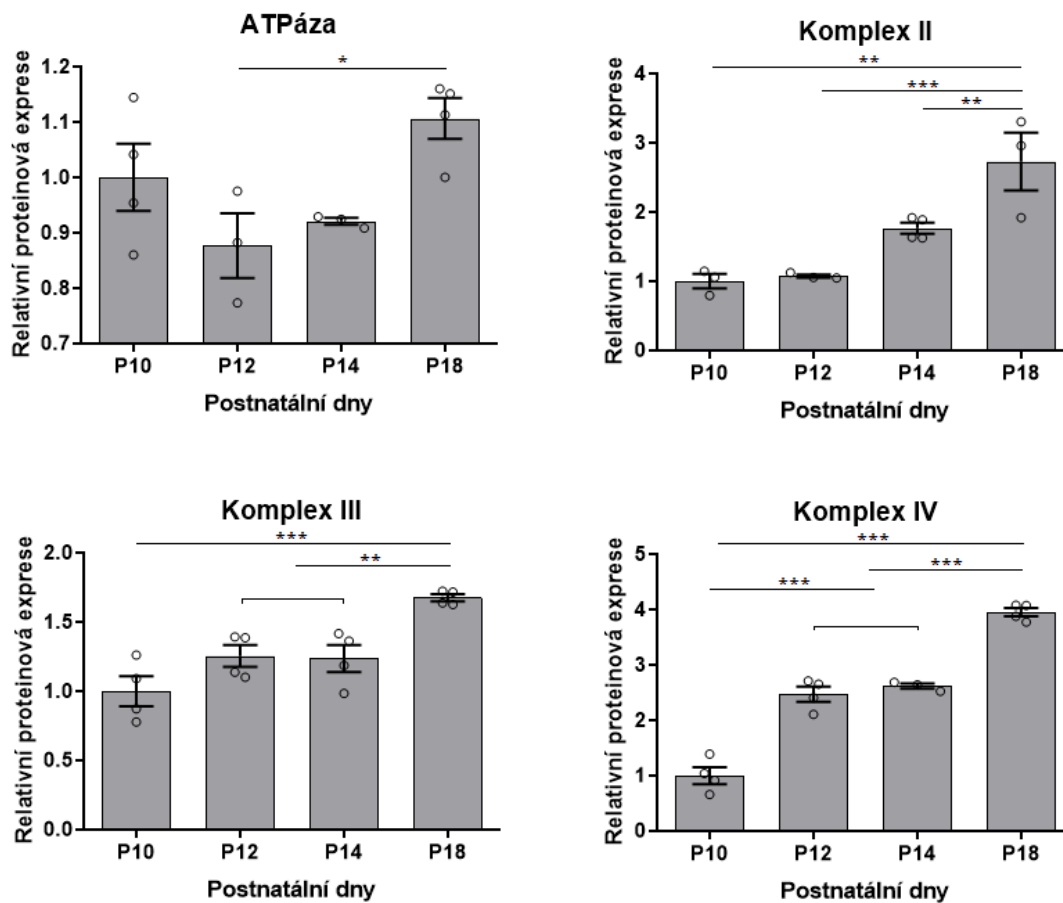
Obr. 4 Proteiny m6A dráhy u samic. (A) Relativní exprese proteinů FTO, METTL3, ALKBH5 a YTHDF1 v průběhu vybraných postnatálních dnů. Data v grafech reprezentují průměrné hodnoty s vnesením střední chyby průměru. (B) *Post-hoc* test. Newmanova–Keulsova metoda mnohonásobného porovnávání.

5.2. Mitochondriální respirační komplexy

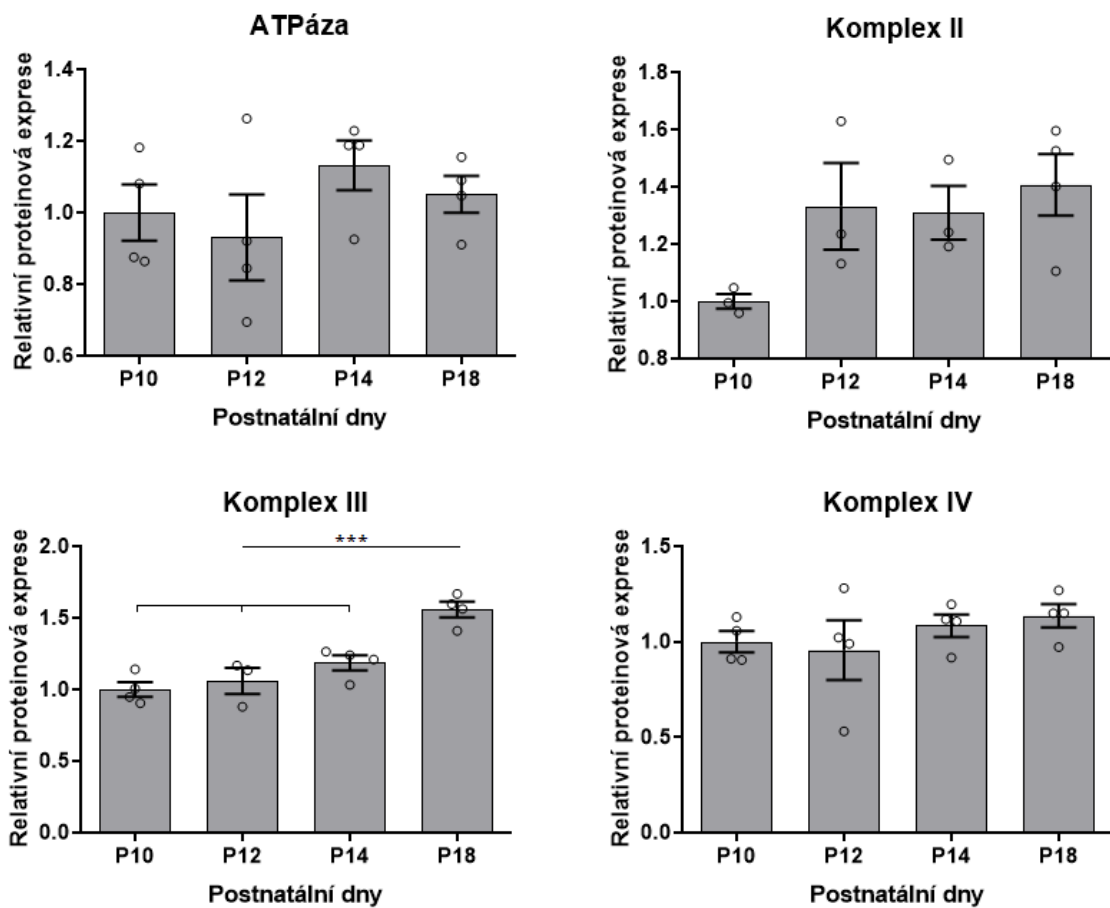
Metodou elektroforézy a Western blottingu byly stanoveny změny v hladinách relativní proteinové exprese podjednotek komplexů dýchacího řetězce mezi 10. a 18. postnatálním dnem. Jednotlivé vzorky postnatálních dnů byly na gelech náhodně rozmístěny (Obr. 5). Analýza byla provedena odděleně u samců (Obr. 6) a samic (Obr. 7). Získaná data ukazují signifikantně se zvyšující hodnoty exprese podjednotek komplexů II a IV u samců, avšak nikoli u samic. Také bylo prokázáno zvýšení exprese podjednotek komplexu III v průběhu sledovaných věků u obou pohlaví. Exprese ATP syntázy (dále ATPázy) se lišila u samců mezi 12. a 18. postnatálním dnem, u samic nebyly zaznamenány výrazné změny či trendy v expresi. Výsledky statistické analýzy při použití dvoucestné ANOVy potvrdily signifikantní mezipohlavní rozdíly u komplexu II a komplexu IV.



Obr. 5 Stanovení exprese proteinových komplexů respiračního řetězce u samic. (A) Reprezentativní snímek membrány po barvení Ponceau S. (B) Snímky imunoblotů s randomizovaným pořadím vzorků, zobrazení intenzity chemiluminiscenčního signálu ATPázy, CIII (komplex III), CIV (komplex IV) a CII (komplex II) na filmu. (C) Kontrolní blot ze smíšených vzorků z jednotlivých postnatálních dnů.



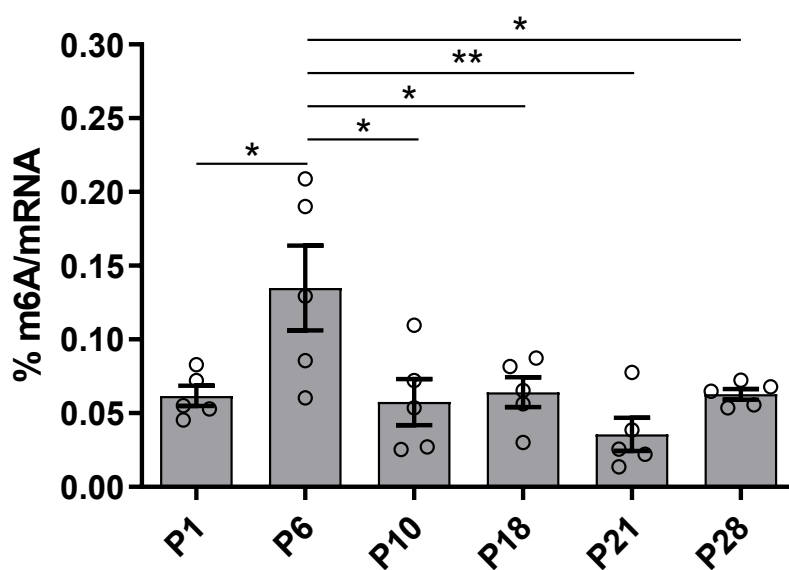
Obr. 6 Expese proteinových podjednotek komplexů respiračního řetězce ve vybraných postnatálních dnech u samců. V grafu na obrázku jsou zobrazeny všechna naměřená pozorování (n=4 na věkovou skupinu). Data v grafu představují průměrné hodnoty s vnesením střední chyby průměru. Statisticky signifikantní rozdíly jsou označeny * (p<0.05), ** (p<0,01) a *** (p<0,001).



Obr. 7 Expese proteinových podjednotek komplexů respiračního řetězce ve vybraných postnatálních dnech u samic. V grafu na obrázku jsou zobrazeny všechna naměřená pozorování (n=4 na věkovou skupinu). Naměřená data představují průměrné hodnoty s vynesemím střední chyby průměru. Statisticky signifikantní rozdíl je označen *** ($p < 0,001$).

5.3. Metylace mRNA

V průběhu různých postnatálních dnů (1, 6, 10, 18, 21, 28) byly detekovány odlišné úrovně hladin metylace mRNA (Obr. 8). Byl pozorován vrchol exprese u potkanů stáří P6, zatímco nejnižší míra metylace mRNA byla zaznamenána u P21. Tato analýza byla prováděna Mgr. Zuzanou Čočkovou.



Obr. 8 Míra metylace mRNA (v %) u samic ve vybraných postnatálních dnech. V grafu na obrázku jsou zobrazeny všechna naměřená pozorování (n=5 na věkovou skupinu). Data v grafu představují jednotlivá měření a průměrné hodnoty, chybové úsečky označují střední chyby průměru. Statisticky signifikantní rozdíly jsou označeny * ($p < 0.05$) nebo ** ($p < 0,01$).

6. Diskuze

V této práci jsme stanovili relativní změny exprese hlavních regulačních proteinů m6A dráhy v mozku potkana F344 v průběhu postnatálního vývoje. V m6A dráze hrají hlavní úlohu demetylázy, metyltransferázy a čtecí proteiny, které se v závislosti na míře výskytu m6A váží na RNA a ovlivňují další osud příslušných RNA transkriptů. Zaměřili jsme se proto na klíčové proteiny m6A dráhy, demetylázy FTO a ALKBH5, metyltransferázový protein METTL3 a RNA-vázající protein YTHDF1. Nedávné práce ukázaly, že m6A dráha významně ovlivňuje ontogenetický vývoj mozečku. Knockout demetylázy FTO a metyltransferázového proteinu METTL3 vedl ke snížení objemu mozečku (Li et al. 2017, Wang et al. 2018). V jiné recentní práci byly analyzovány profily exprese proteinů, zahrnující FTO, METTL3 a ALKBH5 ve vývojové řadě P7, P14, P21 a P60 (n=12 na skupinu). Tyto proteiny byly v nejvyšší míře exprimovány v rané fázi vývoje mozku (P7) s postupným snižováním exprese až do P60 (Ma et al. 2018). Další studie se zaměřila na relativní změny exprese proteinu FTO v hipokampu u myši (Li et al. 2017). Práce zjistila, že exprese FTO v hipokampu se postupně naopak zvyšuje od nejnižších hodnot v P1, přes postnatální týden 2 až do postnatálního týdne 8 (n=3 na věkovou skupinu). Naše práce se zaměřila na relativní změny exprese proteinů m6A dráhy v celém mozku. V souladu se studií Ma et al (2018) jsme zaznamenali nejvyšší míru exprese těchto proteinů ve věku P1 a následné snižování až do dospělosti (P90).

Pozorované změny relativní exprese proteinu FTO v celém mozku jsou v souladu s hypotézou, že FTO má zásadní regulační úlohu v raném postnatálním vývoji a růstu mozku. Na význam FTO v raném vývoji poukázal výskyt somatických růstových retardací u myších knockoutů FTO (Gao et al. 2010). Na význam FTO ve vývoji mozku ukazují změny v morfologii myšího i lidského mozku asociované s pozměněnou funkcí FTO. U myši došlo k poklesu volumetrických hodnot mozkových struktur u FTO knockoutů (Gao et al. 2010, Li et al. 2017). U lidských nositelů SNP alel FTO rs1421085 a rs17817449, které zvyšují riziko obezity, byly pozorovány změny v objemu frontálních laloků o 8 % a okcipitálních laloků o 12 % u (Ho et al. 2010). Také byl prokázán negativní vliv rizikových alel FTO na kognitivní funkce u obézních seniorů (Benedict et al., 2011) a u seniorů s kardiovaskulárními poruchami (Alosco et al., 2013). Zatím nebylo objasněno, jak genetické varianty FTO spojené s vyšším rizikem obezity ovlivňují strukturu a funkci lidského mozku. Kromě vlivu na vývoj mozku je funkce FTO spojena i s mechanismy

paměti a neurální plasticity na molekulární a buněčné úrovni (Walters et al. 2017, Widagdo et al. 2016, Li et al. 2017, Spychala & Rütther 2019). Je proto nezbytné objasnit, do jaké míry se na těchto změnách podílí funkce FTO v raném vývoji a v dospělosti.

Do skupiny m6A demetyláz se kromě FTO řadí také protein ALKBH5. Knockout genu pro ALKBH5 u myši za normálních okolností nevyvolává defektní neurální fenotyp (Barbaric et al. 2007). Exprese ALKBH5 v mozku se však mění při hypoxii. Pokud jsou mláďata myši s knockoutem genu pro ALKBH5 ve věku P5 spolu s matkami vystavena hypobarické hypoxii po dobu 48 h, dochází k defektům ve struktuře Purkyňových a gliových buněk v mozečku (Ma et al. 2018). Je proto pravděpodobné, že demetyláza ALKBH5 není esenciální pro vývoj mozku za normálních podmínek, ale její význam se projeví v absenci kompenzačních mechanismů při hypoxickém stresu. V souladu s touto hypotézou jsme u ALKBH5 zaznamenali pouze o řád menší relativní změny exprese v průběhu postnatálního vývoje.

Jelikož hladiny proteinů m6A dráhy nemusejí nezbytně odrážet globální hladinu metylace adenosinu v mRNA, považovali jsme za důležité stanovit průběh vývoje hladin m6A. Stanovili jsme hladiny m6A v mRNA v průběhu vývoje samičího mozku. Seznali jsme, že vrchol hladiny m6A nenastává v P1, ale až v šestém postnatálním dnu, po kterém následuje pokles relativního zastoupení m6A. Pro konečnou interpretaci těchto výsledků je však nezbytné doplnit naměřená data o více věkových skupin a o vývojovou řadu sameců, na což se zaměříme v příštích obdobích.

Oproti dosud publikovaným studiím bylo zajímavým zjištěním, že obecný trend poklesu exprese proteinů m6A dráhy mezi P1 a P90 je dočasně přerušen v období P10-P18, kdy byla exprese sledovaných proteinů přechodně zvýšena. Nejnápadněji je tato dočasná změna patrná v expresi čtecího proteinu YTHDF1. Toto přechodné zvýšení exprese může znamenat, že zde dochází k vývojovým změnám citlivým na regulaci m6A dráhy. Tyto změny navíc vykazují určitou pohlavní dvojtvárnost, kdy dočasný vrchol exprese proteinů m6A dráhy u samic nastává přibližně o tři dny později v porovnání se samci.

V dalších experimentech jsme se proto zaměřili na období P10-P18. Předchozí dosud nepublikovaná data z naší laboratoře poukazují na úlohu FTO v regulaci energetické homeostázy mozku v animálním modelu Alzheimerovy choroby. Regulace energetické homeostázy mozku má rovněž velký význam v postnatálním vývoji mozku člověka, kdy

k maximu energetické spotřeby dochází okolo pátého roku života dítěte a následně se postupně snižuje do dospělého věku (Kuzawa et al. 2014). Proto nás zajímalo, zda změny v postnatálním období P10-P18 mohou být asociovány se změnami exprese proteinů mitochondriálního dýchacího řetězce a zda jsou tyto změny závislé na pohlaví. V souladu s touto hypotézou jsme zjistili výrazné rozdíly v expresi komplexu II a komplexu IV, kde byly současně statisticky významné mezipohlavní rozdíly. Tato zjištění překvapivě odhalila raný mezipohlavní rozdíl v expresi klíčových proteinů bioenergetické homeostázy v souladu s raným mezipohlavním rozdílem v expresi proteinů m6A dráhy. K ověření kauzální souvislosti mezi oběma jevy však bude potřeba provedení dalších experimentů.

7. Závěr

V této práci jsme se zaměřili na úlohu m6A v regulaci ontogenetického vývoje v mozku potkana Fisher 344. Naše výsledky potvrdily změny hladin exprese proteinů účastnících se regulace m6A v průběhu časného postnatálního vývoje a v dospělosti. U proteinů FTO, METTL3, ALKBH5 a YTHDF1 byl pozorován trend poklesu exprese, který byl přerušen mezi 10. až 18. postnatálním dnem. Detekovali jsme mezipohlavní rozdíly, kdy u samic vrchol exprese nastal v pozdějších postnatálních dnech narozdíl od samců. Analýzou exprese proteinů respiračního řetězce jsme zaznamenali signifikantní mezipohlavní rozdíl v komplexu II a komplexu IV. Nakonec jsme detekovali úroveň hladin metylace v mRNA, kde nebyl pozorován žádný prokazatelný trend mezi vybranými postnatálními dny.

Charakter změn zaznamenaných v hladinách exprese proteinů zapojených do regulace m6A dráhy by mohly být mechanismem který odráží změny energetické homeostázy mozku během postnatálního vývoje.

Získané výsledky prokázaly změny v expresi proteinů zasahujících významně do m6A dráhy. Tyto výsledky nám poskytly hypotézy a preliminární data pro další výzkum. V dalších experimentech využijeme farmakologickou inhibici FTO a epitranskriptomickou analýzu k ověření hypotézy o kauzální souvislosti mezi m6A dráhou a energetickým metabolismem v raném vývoji mozku.

8. Literatura

Ahima, R. S., Flier, J. S. (2000): Leptin. *Annual Review of Physiology* 62 (1), 413-437.

Alosco, M. L., Benitez, A., Gunstad, J., Spitznagel, M. B., McCaffery, J. M., McGeary, J. E., Poppas, A., Paul, R. H., Sweet, L. H., Cohen, R. A. (2013): Reduced memory in fat mass and obesity-associated allele carriers among older adults with cardiovascular disease. *Psychogeriatrics*, 13 (1), 35-40.

Barbaric, I., Miller, G., Dear, T. N. (2007): Appearances can be deceiving: phenotypes of knockout mice. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 6 (2), 91-103.

Benedict, CH., Jacobsson, J. A., Rönnemaa, E., Sällman–Almén, M., Brooks, S., Schultes, B., Fredriksson, R., Lannfelt, L., Kilander, L., Schiöth, H. B. (2011): The fat mass and obesity gene is linked to reduced verbal fluency in overweight and obese elderly men. *Neurobiology of Aging* 32 (6), 1159.e1-1159.e5.

Bravard, A., Lefai, E., Meugnier, E., Pesenti, S., Disse, E., Vouillarmet, J., Peretti, N., Rabasa-Lhoret, R., Laville, M., Vidal, H., Rieusset, J. (2010): FTO is increased in muscle during type 2 diabetes, and its overexpression in myotubes alters insulin signaling, enhances lipogenesis and ROS production, and induces mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 60 (1), 258-268.

Cao, G., Li, H.B., Yin, Z., Flavell, R. A. (2016): Recent advances in dynamic m6A RNA modification. *Open Biology* 6 (4): 160003.

Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., Rechavi, G. (2012): Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* 485 (7397), 201-206.

Fischer, J., Koch, L., Emmerling, CH., Vierkotten, J., Peters, T., Brüning, J. C, Rüther, U. (2009): Inactivation of the FTO gene protects from obesity. *Nature* 458 (7240), 894-898.

Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R. B., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A.-M., Ness, A. R., Ebrahim, S., Lawlor, D. A., Ring, S. M., Ben-Shlomo, Y., Jarvelin, M.-R., Sovio, U., Bennett, A. J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R. J. F., Barroso, I., Wareham, N. J., Karpe, F., Owen, K. R., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Palmer, C. N. A., Doney, A. S. F., Morris, A. D., Smith, G. D., Hattersley, A. T., McCarthy, M. I. (2007): A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316 (5826), 889-894.

Fu, Y., Dominissini, D., Rechavi, G., He, Ch. (2014): Gene expression regulation mediated through reversible m6A RNA methylation. *Nature Reviews Genetics* 15 (5), 293-306.

Fu, Y., Li, L., Ren, S. (2013): Effect of FTO expression and polymorphism on fat deposition in suzhong pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 26 (10), 1365-1373.

Gao, X., Shin, J.H., Li, M., Wang, F., Tong, Q., Zhang, P., Stadler, K. (2010): The fat mass and obesity associated gene FTO functions in the brain to regulate postnatal growth in mice. *PLoS ONE* 5 (11): e14005.

Gan, X. T., Zhao, G., Huang X. C., Rowe, A. C., Purdham, D. M., Karmazyn, M., Chen, X. (2013): Identification of fat mass and obesity associated (FTO) protein expression in cardiomyocytes: regulation by leptin and its contribution to leptin-induced hypertrophy. *PLoS ONE* 8 (9): e74235..

Gerken, T., Girard, C. A., Tung, Y.C. L., Webby, C. J., Saudek, V., Hewitson, K. S., Yeo, G. S. H., McDonough, M. A., Cunliffe, S., McNeill, L. A., Galvanovskis, J., Rorsman, P., Robins, P., Prieur, X., Coll, A. P., Ma, M., Jovanovic, Z., Farooqi, I. S., Sedgwick, B., Barroso, I., Lindahl, T., Ponting, C. P., Ashcroft, F. M., O'Rahilly, S., Schofield, C. J. (2007): The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318 (5855), 1469-1472.

Hess, M. E., Hess, S., Meyer, K. D., Verhagen, L. A. W., Koch, L., Brönnek, H. S., Dietrich, M. O., Jordan, S. D., Saletore, Y., Elemento, O., Belgardt, B. F., Franz, T., Horvath, T. L., Rütther, U., Jaffrey, S. R., Kloppenburg, P., Brüning, J. C. (2013): The fat

mass and obesity associated gene (FTO) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nature Neuroscience* 16 (8), 1042-1048.

Horiuchi, K., Kawamura, T., Iwanari, H., Ohashi, R., Naito, M., Kodama, T., Hamakubo, T. (2013): Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry* 288 (46), 33292-33302.

Ho, A. J., Stein, J. L., Hua, X., Lee, S., Hibar, D. P., Leow, A. D., Dinov, I. D., Toga, A. W., Saykin, A. J., Shen, L., Foroud, T., Pankratz, N., Huentelman, M. J., Craig, D. W., Gerber, J. D., Allen, A. N., Corneveaux, J. J., Stephan, D. A., DeCarli, C. S., DeChairo, B. M., Potkin, S. G., Jack, C. R., Weiner, M. W., Raji, C. A., Lopez, O. L., Becker, J. T., Carmichael, O. T., Thompson, P. M., Weiner, M., Thal, L., Petersen, R., Jack, C. R., Jagust, W., Trojanowki, J., Toga, A. W., Beckett, L., Green, R. C., Gamst, A., Potter, W. Z., Montine, T., Anders, D., Bernstein, M., Felmlee, J., Fox, N., Thompson, P., Schuff, N., Alexander, G., Bandy, D., Koeppe, R. A., Foster, N., Reiman, E. M., Chen, K., Trojanowki, J., Shaw, L., Lee, V. M. Y., Korecka, M., Toga, A. W., Crawford, K., Neu, S., Harvey, D., Gamst, A., Kornak, J., Kachaturian, Z., Frank, R., Snyder, P. J., Molchan, S., Kaye, J., Vorobik, R., Quinn, J., Schneider, L., Pawluczyk, S., Spann, B., Fleisher, A. S., Vanderswag, H., Heidebrink, J. L., Lord, J. L., Johnson, K., Doody, R. S., Villanueva-Meyer, J., Chowdhury, M., Stern, Y., Honig, L. S., Bell, K. L., Morris, J. C., Mintun, M. A., Schneider, S., Marson, D., Griffith, R., Badger, B., Grossman, H., Tang, C., Stern, J., deToledo-Morrell, L., Shah, R. C., Bach, J., Duara, R., Isaacson, R., Strauman, S., Albert, M. S., Pedrosa, J., Toroney, J., Rusinek, H., de Leon, M. J., De Santi, S. M., Doraiswamy, P. M., Petrella, J. R., Aiello, M., Clark, C. M., Pham, C., Nunez, J., Smith, C. D., Given, II C. A., Hardy, P., DeKosky, S. T., Oakley, M., Simpson, D. M., Ismail, M. S., Porsteinsson, A., McCallum, C., Cramer, S. C., Mulnard, R. A., McAdams-Ortiz, C., Diaz-Arrastia, R., Martin-Cook, K., DeVous, M., Levey, A. I., Lah, J. J., Cellar, J. S., Burns, J. M., Anderson, H. S., Laubinger, M. M., Bartzokis, G., Silverman, D. H. S., Lu, P. H., Fletcher, R., Parfitt, F., Johnson, H., Farlow, M., Herring, S., Hake, A. M., van Dyck, C. H., MacAvoy, M. G., Bifano, L. A., Chertkow, H., Bergman, H., Hosein, C., Black, S., Graham, S., Caldwell, C., Feldman, H., Assaly, M., Hsiung, G.-Y. R., Kertesz, A., Rogers, J., Trost, D., Bernick, C., Gitelman, D., Johnson, N., Mesulam, M., Sadowsky, C., Villena, T., Mesner, S., Aisen, P. S., Johnson, K. B., Behan, K. E., Sperling, R. A., Rentz, D. M., Johnson, K. A., Rosen, A., Tinklenberg, J., Ashford, W., Sabbagh, M., Connor, D.,

Obradov, S., Killiany, R., Norbash, A., Obisesan, T. O., Jayam-Trouth, A., Wang, P., Auchus, A. P., Huang, J., Friedland, R. P., DeCarli, C., Fletcher, E., Carmichael, O., Kittur, S., Mirje, S., Johnson, S. C., Borrie, M., Lee, T.-Y., Asthana, S., Carlsson, C. M., Potkin, S. G., Highum, D., Preda, A., Nguyen, D., Tariot, P. N., Hendin, B. A., Scharre, D. W., Katakai, M., Beversdorf, D. Q., Zimmerman, E. A., Celmins, D., Brown, A. D., Gandy, S., Marenberg, M. E., Rovner, B. W., Pearlson, G., Blank, K., Anderson, K., Saykin, A. J., Santulli, R. B., Pare, N., Williamson, J. D., Sink, K. M., Potter, H., Ashok Raj, B., Giordano, A., Ott, B. R., Wu, C. K., Cohen, R., Wilks, K. L. (2010): A commonly carried allele of the obesity-related FTO gene is associated with reduced brain volume in the healthy elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (18), 8404-8409.

Chang, M., Lv, H., Zhang, W., Zeng Y.-X., Song, S., Niu, Y., Tong, W.-M. (2017): Region-specific RNA m6A methylation represents a new layer of control in the gene regulatory network in the mouse brain. *Open Biology* 7 (9). pii: 170166.

Chen, J., Zhang, Y.-CH., Huang, CH., Shen, H., Sun, B., Cheng, X., Zhang, Y.-J., Yang, Y.-G., Shu, Q., Yang, Y., Li, X. (2019): m6A Regulates Neurogenesis and Neuronal Development by Modulating Histone Methyltransferase Ezh2. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 17 (2), 154-168.

Church, CH., Lee, S., Bagg, E. A. L., McTaggart, J. S., Deacon, R., Gerken, T., Lee, A., Moir, L., Mecinović, J., Quwailid, M. M., Schofield, CH. J., Ashcroft, F. M., Cox, R. D., Barsh, G. S. (2009): A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PLoS Genetics* 5 (8): e1000599.

Church, CH., Moir, L., McMurray, F., Girard, CH., Banks, G. T., Teboul, L., Wells, S., Brüning, J. C., Nolan, P. M., Ashcroft, F. M., Cox, R. D. (2010): Overexpression of FTO leads to increased food intake and results in obesity. *Nature Genetics* 42 (12), 1086-1092.

Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, CH., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.-G., He, CH. (2011): N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology* 7 (12), 885-887.

Jowett, J. B.M., Curran, J. E., Johnson, M. P., Carless, M. A., Goring, H.H.H., Dyer, T. D., Cole, S. A., Comuzzie A. G., MacCluer, J. W., Moses, E. K., Blangero, J. (2010): Genetic variation at the FTO locus influences RBL2 gene expression. *Diabetes* 59 (3), 726-732.

Li, L., Zang, L., Zhang, F., Chen, J., Shen, H., Shu, L., Liang, F., Feng, CH., Chen, D., Tao, H., Xu, T., Li, Z., Kang, Y., Wu, H., Tang, L., Zhang, P., Jin, P., Shu, Q., Li, X. (2017): Fat mass and obesity-associated (FTO) protein regulates adult neurogenesis. *Human Molecular Genetics* 26 (13), 2398-2411.

Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., Dai, Q., Chen, W., He, CH. (2014): A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology* 10 (2), 93-95.

Loenarz, CH., Schofield, CH. J. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nature Chemical Biology* 4 (3), 152-156.

Keller, L., Xu, W., Wang, H.-X., Winblad, B., Fratiglioni, L., Graff, C. (2011): The obesity related gene, FTO, interacts with APOE, and is associated with Alzheimer's disease risk: A prospective cohort study. *Journal of Alzheimer's Disease* 23 (3), 461-469.

Kuzawa, C. W., Chugani, H. T., Grossman, L. I., Lipovich, L., Muzik, O., Hof, P. R., Wildman, D. E., Sherwood, C. C., Leonard, W. R., Lange, N. (2014): Metabolic costs and evolutionary implications of human brain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (36), 13010-13015.

Ma, CH., Chang, M., Lv, H., Zhang, Z.-W., Zhang, W., He, X., Wu, G., Zhao, S., Zhang, Y., Wang, D., Teng, X., Liu, Ch., Li, Q., Klungland, A., Niu, Y., Song, S., Tong, W.-M. (2018): RNA m6A methylation participates in regulation of postnatal development of the mouse cerebellum. *Genome Biology* 19 (1):68.

Madsen, M. B., Birck, M. M., Fredholm, M., Cirera, S. (2010): Expression studies of the obesity candidate gene FTO in pig. *Animal Biotechnology* 21 (1), 51-63.

McTaggart, J. S., Lee, S., Iberl, M., Church, CH., Cox, R. D., Ashcroft, F. M., Timpson N. J. (2011): FTO is expressed in neurones throughout the brain and its expression is unaltered by fasting. *PLoS ONE* 6 (11): e27968.

Mendel, M., Chen, K.-M., Homolka, D., Gos, P., Pandey, R. R., McCarthy, A. A., Pillai, R. S. (2018): Methylation of structured RNA by the m6A writer METTL16 is essential for mouse embryonic development. *Molecular Cell* 71 (6), 986-1000.e11.

Meng, T.-G., Lu, X., Guo, L., Hou, G.-M., Ma, X.-S., Li, Q.-N., Huang, L., Fan, L.-H., Zhao, Z.-H., Ou, X.-H., OuYang, Y.-CH., Schatten, H., Li, L., Wang, Z.-B., Sun, Q.-Y. (2019): Mettl14 is required for mouse postimplantation development by facilitating epiblast maturation. *The FASEB Journal* 33 (1), 1179-1187.

Meyer, K. D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, CH. E., Jaffrey, S. R. (2012): Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* 149 (7), 1635-1646.

Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., Schwartz, M. W. (2006): Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443 (7109), 289-295.

Mosconi, L. (2013): Glucose metabolism in normal aging and Alzheimer's disease: methodological and physiological considerations for PET studies. *Clinical and Translational Imaging* 1 (4), 217-233.

Peters, T., Ausmeier, K., Rüther, U. (1999): Cloning of fatso (FTO), a novel gene deleted by the fused toes (Ft) mouse mutation. *Mammalian Genome* 10 (10), 983-986.

Ping, X.-L., Sun B.-F., Wang L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W.-J., Adhikari, S., Shi, Y., Lv, Y., Chen, Y.-S., Zhao, X., Li, A., Yang, Y., Dahal, U., Lou, X.-M., Liu, X., Huang, J., Yuan, W.-P., Zhu, X.-F., Cheng, T., Zhao, Y.-L., Wang, X., Danielsen, J. M. R., Liu, F., Yang, Y.-G. (2014): Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Research* 24 (2), 177-189.

Ronkainen, J., Mondini, E., Cinti, F., Cinti, S., Seb  rt, S., Savolainen, M., Salonurmi, T. (2016): FTO-deficiency affects the gene and microRNA expression involved in brown adipogenesis and browning of white adipose tissue in mice. *International Journal of Molecular Sciences* 17 (11): 1851.

Schwartz, S., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Wang, T., Maciag, K., Bushkin, G. G., Mertins, P., Ter-Ovanesyan, D., Habib, N., Cacchiarelli, D., Sanjana, N. E., Freinkman, E., Pacold, M. E., Satija, R., Mikkelsen, T. S., Hacohen, N., Zhang, F., Carr, S. A., Lander, E. S., Regev, A. (2014): Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Reports* 8 (1), 284-296.

Śledź, P., Jinek, M. (2016): Structural insights into the molecular mechanism of the m6A writer complex. *ELife* 5. DOI: 10.7554/eLife.18434.

Smemo, S., Tena, J. J., Kim, K., Gamazon, E. R., Sakabe, N. J., Gómez-Marín, C., Aneas, I., Credidio, F. L., Sobreira, D. R., Wasserman, N. F., Lee, J. H., Puviindran, V., Tam, D., Shen, M., Son, J. E., Vakili, N. A., Sung, H.-K., Naranjo, S., Acemel, R. D., Manzanares, M., Nagy, A., Cox, N. J., Hui, CH.-CH., Gomez-Skarmeta, J. L., Nóbrega, M. A. (2014): Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature* 507 (7492), 371–375.

Villanueva, E.C., Myers, M.G. Jr. (2008): Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Int. J. Obes. (Lond.)*. 32 Suppl 7, 8–12.

Wang, P., Yang, F.J., Du, H., Guan, Y.-F., Xu, T.-Y., Xu, X.-W., Su, D.-F., Miao, CH.-Y. (2011): Involvement of leptin receptor long isoform (LepRb)-STAT3 signaling pathway in brain fat mass-and obesity-associated (FTO) downregulation during energy restriction. *Mol Med.* 17 (5-6), 523–532.

Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G., Ren, B., Pan, T., He, CH. (2014): N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* 505 (7481), 117-120.

Wang, CH.-X., Cui, G.-S., Liu, X., Xu, K., Wang, M., Zhang, X.-X., Jiang, L.-Y., Li, A., Yang, Y., Lai, W.-Y., Sun, B.-F., Jiang, G.-B., Wang, H.-L., Tong, W.-M., Li, W., Wang, X.-J., Yang, Y.-G., Zhou, Q., He, CH. (2018): METTL3-mediated m6A modification is required for cerebellar development. *PLoS Biology* 16 (6): e2004880.

Walters, B. J., Mercaldo, V., Gillon, C. J., Yip, M., Neve, R. L., Boyce, F. M., Josselyn, S. A. (2017): The role of the RNA demethylase FTO (fat mass and obesity-associated) and mrna methylation in hippocampal memory formation. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 42 (7), 1502–1510.

Wei, CH.-M., Gershowitz, A., Moss, B. (1975): Methylated nucleotides block 5' terminus of HeLa cell messenger RNA. *Cell* 4 (4), 379-386.

Widagdo, J., Zhao, O. Y., Kempen, M. J., Tan, M. CH., Ratnu, V. S., Wei, W., Leighton, L., Spadaro, P. A., Edson, J., Anggono, V., Bredy, T. W. (2016): Experience-dependent accumulation of N6-methyladenosine in the prefrontal cortex is associated with memory processes in mice. *Journal of Neuroscience* 36 (25) 6771-6777.

Xiao, W., Adhikari, S., Dahal U., Chen, Y.-S., Hao, Y.-J., Sun, B.-F., Sun, H.-Y., Li, A., Ping, X.-L., Lai, W.-Y., Wang, X., Ma, H.-L., Huang, Ch.-M., Yang, Y., Huang, N., Jiang, G.-B., Wang, H.-L., Zhou, Q., Wang, X.-J., Zhao, Y.-L., Yang, Y.-G. (2016): Nuclear m6A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Molecular Cell* 61 (4), 507-519.

Younus, L. A., Algenabi, A. H. A., Abdul-Zhara, M. S., Hussein, M. K. (2017): FTO gene polymorphisms (rs9939609 and rs17817449) as predictors of Type 2 Diabetes Mellitus in obese Iraqi population. *Gene* 627, 79-84.

Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, CH. M., Li, CH. J., Vågbø, C. B., Shi, Y., Wang, W. L., Song, S. H., Lu, Z., Bosmans, R. P. G., Dai, Q., Hao, Y. J., Yang, X., Zhao, W.M., Tong, W.M., Wang, X. J., Bogdan, F., Furu, K., Fu, Y., Jia, G., Zhao, X., Liu, J., Krokan, H. E., Klungland, A., Yang, Y. G., He, CH. (2013): ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Molecular Cell* 49 (1), 18-29.