

***Zależna od FUS obróbka snoRNA do sdRNA i regulacja modyfikacji potranskrypcyjnych rybosomowego RNA - powiązania ze stwardnieniem zanikowym bocznym (ALS)***

FUS jest białkiem wiążącym DNA/RNA, zaangażowanym w wiele etapów metabolizmu RNA. Mutacje w obrębie sygnału lokalizacji jądrowej (NLS, ang. nuclear localization signal) białka powodują błędną lokalizację FUS w cytoplazmie i w konsekwencji tworzenie agregatów cytoplazmatycznych, co jest powiązane z chorobą neurodegeneracyjną stwardnienie zanikowe boczne, ALS (ang. amyotrophic lateral sclerosis). Małe jąderkowe RNA (snoRNA) to rodzina małych niekodujących RNA, które są zaangażowane w 2'-O-metylację (2'-O-Me) i pseudourydylację rybosomowego RNA (rRNA) i małych jądrowych RNA (snRNA). Te modyfikacje epitranskryptomiczne zapewniają stabilność i zachowanie wiernej struktury rybosomów. Co ciekawe, wbrew wcześniejszemu przekonaniu, około dwie trzecie miejsc w rRNA jest zmodyfikowanych częściowo; zapewnia to dodatkowy poziom generowania heterogeniczności rybosomów. Oprócz funkcji w nadawaniu modyfikacji rRNA i U snRNA, snoRNA klasy C/D i H/ACA mogą być procesowane do mniejszych, stabilnych fragmentów, zwanych sdRNA (ang. snoRNA-derived RNAs, RNA pochodzące ze snoRNA). Częsteczki sdRNA mogą działać jako mikroRNA i regulować ekspresję genów na poziomie transkrypcji i translacji. Co istotne, rola FUS w biogenezie mikroRNA jest znana i dobrze udokumentowana, nie ma natomiast danych na temat udziału białka FUS w regulacji ekspresji snoRNA i ich dalszej obróbce do sdRNA.

W niniejszej pracy, z zastosowaniem technik wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA, wykazano, że FUS reguluje poziom snoRNA w komórkach linii ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y. Następnie, ponieważ snoRNA biorą udział w potranskrypcyjnych modyfikacjach rRNA i snRNA, wykorzystano ilościowe techniki oparte na sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS, ang. next generation sequencing) typu RiboMeth-seq i HydraPsiSeq, do mapowania zmian w poziomach 2'-O-Me i pseudourydyny, w komórkach typu dzikiego i komórkach pozbawionych białka FUS. W wielu miejscach 2'-O-Me w rybosomowych RNA, które były zmodyfikowane częściowo, obserwowano wzrost poziomu modyfikacji w komórkach pozbawionych FUS. Równocześnie podwyższonej ekspresji ulegała też grupa snoRNA klasy C/D, biorąca udział we wprowadzaniu tych modyfikacji. Ponadto, zaobserwowano drobne zmiany w poziomie pseudourydylacji w komórkach pozbawionych FUS, które również wykazywały tendencję wzrostową, podobnie jak zmiany w ekspresji odpowiedzialnych za te modyfikacje snoRNA klasy H/ACA. W kolejnych analizach, w których wykorzystano komórki SH-SY5Y niosące mutację FUS R495X związaną z ALS, prowadzącą do syntezy białka pozbawionego sygnału NLS, również obserwowano znaczące zmiany w poziomach snoRNA oraz 2'-O-Me i pseudourydyny, w porównaniu z kontrolą typu dzikiego. W badaniach wykorzystano również fibroblasty pochodzące od pacjentów z ALS z mutacjami FUS oraz, jako kontrole, fibroblasty pochodzące od dopasowanych wiekiem i płcią osób zdrowych. Zgodnie z oczekiwaniami, w fibroblastach pochodzących od osób z „silną” mutacją FUS P525L, zaobserwowano największą liczbę znacząco zmienionych miejsc 2'-O-Me, podczas gdy w fibroblastach pochodzących od osób z „łagodnymi” mutacjami FUS R521C i R521L, zmienionych miejsc było mniej. Wyniki te uzupełniono danymi dotyczącymi 2'-O-Me z izogenicznej pary indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych z mutacją FUS P525L, różnicowanych następnie do neuronalnych komórek progenitorowych i neuronów ruchowych. Co ciekawe, większość miejsc ze zmienionym profilem 2'-O-Me i pseudourydylacji położona jest w zewnętrznych partiach rybosomu 80S, sugerując, że te częściowo zmodyfikowane miejsca, w zależności od poziomu ich modyfikacji, mogą wpływać na oddziaływania z białkami rybosomalnymi i z innymi czynnikami.

Jak wspomniano wyżej, analiza danych pochodzących z sekwencjonowania małych cząsteczek RNA wykazała, że wiele cząsteczek snoRNA ulega zróżnicowanej ekspresji w komórkach SH-SY5Y z wyciszeniem białka FUS. Ponadto, zidentyfikowano liczną grupę sdrRNA powstających ze snoRNA klasy C/D i H/ACA. Wiele sdrRNA pochodzących ze snoRNA klasy C/D zawierało zakonserwowane motywy „C” lub „D”. Co więcej, z jednego snoRNA mogły powstawać różne sdrRNA, wykazujące różne poziomy ekspresji. Profil sdrRNA był inny w przypadku proliferujących i zróżnicowanych komórek SH-SY5Y, co sugeruje, że zewnętrzne sygnały, takie jak traktowanie kwasem retinowym, mogą również wpływać na produkcję sdrRNA ze snoRNA. Wyniki te wskazują, że białko FUS wpływa na ekspresję snoRNA i modyfikację rybosomalnego RNA. Co więcej, snoRNA są procesowane do sdrRNA w sposób zależny od FUS. Jednakże, funkcja tych sdrRNA pozostaje wciąż niezbadana. Konieczne są dalsze badania funkcjonalne, aby określić wpływ poszczególnych miejsc modyfikacji rRNA na translację i wpływ mutacji FUS związanej z ALS na ten proces.

Słowa kluczowe – snoRNA, ALS, FUS, 2'-O-Me, pseudourydyna, sdrRNA.