

## **Aktywacja retrotranspozonów jako podłoże choroby neurodegeneracyjnej ALS związanej z mutacjami białka FUS**

Celem projektu jest lepsze zrozumienie neurodegeneracji wynikającej z aktywacji retrotranspozonów w wyniku mutacji w genie *FUS* związanej ze stwardnieniem zanikowym bocznym (ALS). *FUS* to głównie jądrowe białko wiążące DNA i RNA, zaangażowane w różne procesy komórkowe związane z regulacją i metabolizmem kwasów nukleinowych. Mutacje w *FUS* są skorelowane z rozwojem ALS i powodują błędną lokalizację białka *FUS* do cytoplazmy, gdzie tworzy ono toksyczne agregaty w neuronach ruchowych i komórkach glejowych pacjentów. ALS jest zwyrodnieniową chorobą układu nerwowego powodującą stopniową utratę neuronów ruchowych, co prowadzi do trudności w poruszaniu mięśniami.

Aktywność transpozonów, będących rodzajem ruchomych elementów genetycznych, została powiązana z chorobami neurologicznymi i zapaleniem nerwów, czym również ten projekt chciałby się zająć. Jedną z grup transpozonów są retrotranspozony LINE-1, które są zdolne do aktywnej insercji w różne miejsca genomu, stwarzając zagrożenie dla jego integralności. Jednak cząsteczki nazywane piRNA (ang. PIWI-interacting RNA), w połączeniu z białkami PIWI, tłumią aktywność retrotranspozonów i pomagają zachować integralność genomu.

Co ciekawe, nasze wstępne wyniki wykazały, że ekspresja PIWIL1, członka rodziny białek PIWI, jest zmniejszona w komórkach, w których gen *FUS* został wyciszony lub występuje w nim mutacja związana z ALS, w porównaniu do komórek typu dzikiego. Ponadto, zauważyłam wzrost ekspresji transkryptów retrotranspozonu LINE-1 w tych komórkach. Taki wzrost LINE-1 obserwowano w badaniach związanych z neurodegeneracją. Co więcej, badania wykazały zmienności w ekspresji piRNA w próbach pochodzących od zmarłych pacjentów z chorobą Parkinsona i chorobą Alzheimerera. Wcześniejsze badania przeprowadzone na muszkach owocowych (*Drosophila*) sugerują związek między nieprawidłową ekspresją ludzkiego homologa białka PIWI a patogenezą związaną z *FUS*-ALS. Dodatkowo, badania przeprowadzone na *Drosophila* wykazały udział homologu białka *FUS* w biogenezie piRNA. Jednak obecnie brak dowodów na związek między *FUS*, PIWIL1 i aktywacją retrotranspozonów w ludzkich komórkach.

Zebrane informacje skłoniły nas do zadania następujących pytań: Czy mutacje w *FUS* związane z ALS mogą prowadzić do aktywacji retrotranspozonów LINE-1? Czy regulacja PIWIL1 przez *FUS* jest zaburzona w przypadku ALS i jakie są tego konsekwencje? Czy *FUS* bierze udział w dojrzewaniu piRNA wraz z białkami PIWI i czy mutacje w *FUS* związane z ALS prowadzą do nieprawidłowego dojrzewania piRNA? Czy zapalenie nerwów następuje poprzez stymulację receptorów odporności wrodzonej w wyniku zwiększonej ekspresji retrotranspozonów? Eksperymenty w ramach tego projektu będą przeprowadzane na indukowanych pluripotentnych komórkach macierzystych (iPSC) z mutacją w genie *FUS* związaną z ALS, reprogramowanych z fibroblastów pochodzących od pacjenta z ALS. iPSC zostaną ostatecznie różnicowane do neuronów ruchowych (MN) i astrocytów, które są głównymi typami komórek dotkniętych neurodegeneracją w ALS.

Planuję odpowiedzieć na te pytania poprzez immunofluorescencyjną analizę mikroskopową, w której chcę sprawdzić, czy *FUS*, PIWIL1 i białka kodowane przez retrotranspozon LINE-1 kolokalizują w agregatach cytoplazmatycznych w *FUS*-ALS MN i astrocytach. Ponadto, poprzez wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA izolowanego z MN i astrocytów, chcę odkryć nietypowe zmiany w dojrzewaniu i ekspresji piRNA, genów zapalnych oraz transpozonów. Interesuje mnie również sprawdzenie poziomu PIWIL1 i LINE-1 oraz przetestowanie, czy PIWIL1 ma bezpośredni wpływ na ekspresję retrotranspozonu LINE-1. Zrobię to przez metody nadekspresji i wyciszenia *FUS* oraz PIWIL1. Sprawdzę również efekt wyciszenia LINE-1 na ekspresję genów związanych ze stanem zapalnym i odpornością wrodzoną.

Proponowane badania mogą przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmu neurodegeneracji z udziałem *FUS*, PIWIL1, piRNA i retrotranspozonów. Odpowiedzi na pytania postawione w ramach tego projektu przyczynią się do zrozumienia roli *FUS* w regulacji aktywności retrotranspozonów przez PIWIL1 oraz wyjaśnią wpływ aktywacji transpozonów na neurodegenerację związaną z ALS. Połączenie aktywacji retrotranspozonów z zapaleniem nerwów będzie znaczącym wkładem w tę dziedzinę i pomoże w tworzeniu potencjalnych terapii w przyszłości. Aktywowane retrotranspozony mogą być zaangażowane w stymulację genów związanych z zapaleniem poprzez ich wykrywanie przez receptory odporności wrodzonej. Podsumowując, ten projekt może potencjalnie znaleźć związek pomiędzy aktywacją transpozonów, a neurodegeneracją w chorobie ALS zależnej od *FUS*.