



**TURUN
YLIOPISTO**

Ei-koodaavien RNA-toistojaksojen osuus hermorappeumasairauksissa

LuK-tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Biokemia

04/2024

Isabella Hyppönen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

ISABELLA HYPPÖNEN: Ei-koodaavien RNA-toistojaksojen osuus
hermorappeumasairauksissa

LuK-tutkielma, 25 s.

Biokemia

04/2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Hemorappeumasairaudet ovat hermostoa tuhoavia ja vahingoittavia sairauksia, joista osan aiheuttaa ei-koodaavat RNA-toistojaksot. Toistojaksot voivat vaikuttaa sairauksiin RNA-toksisuuden, RAN-toksisuuden sekä toimintaa vähentävän mutaation kautta. RNA-toksisuudessa toksisuuden saa aikaan RNA-toistojen muodostama RNA-foci. RAN-toksisuus tarkoittaa, että toksisuuden saa aikaan epäsuorasti AUG-aloituskodonista riippumattomassa RAN-translaatioissa muodostuneet RAN-proteiinit. Toimintaa vähentävä mutaatio tarkoittaa, että proteiinien aktiivisuus loppuu osittain tai kokonaan.

Geenin C9orf72 aiheuttamassa amyotrofisessa lateraaliskleroosissa/otsaohimolohkorappeumassa toimintaa vähentävä mutaatio ei ole pääosassa sairaudessa. Se vaikuttaa kuitenkin jonkin verran, sillä se voi tehostaa RNA-toksisuutta sekä RAN-toksisuutta ja osallistua itse patogeneesiin. Sen sijaan sairaudessa merkittävämpiä ovat RAN-toksisuus sekä RNA-toksisuus. Särö-X-esimutaatio-oireyhtymässä vaikuttaa puolestaan RAN-toksisuus, RNA-toksisuus sekä mitokondrionaalinen toimintahäiriö, eikä siinä vaikuta esiintyvän toimintaa vähentävää mutaatiota.

Avainsanat: Ei-koodaava RNA, RNA-toistojaksot, hermorappeumasairaus, amyotrofinen lateraaliskleroosi, särö-X-esimutaatio-oireyhtymä

Sisällys

1	Johdanto	2
2	Ei-koodaavien RNA-toistojen osuus hermorappeumasairauksissa	5
2.1	Toimintaa vähentävä mutaatio sekä toimintaa lisäävä mutaatio	5
2.2	RNA-toksisuus	6
2.3	RAN-toksisuus	7
3	Ei-koodaavat RNA-toistojaksot amyotrofisessa lateraaliskleroosissa/otsa-ohimolohkorappeumassa	9
3.1	Amyotrofinen lateraaliskleroosi/Otsa-ohimolohkorappeuma ja C9orf72-geeni	9
3.2	RNA-toksisuus sairaudessa	10
3.3	Toimintaa vähentävä mutaatio ja toimintaa lisäävä mutaatio sairaudessa	11
3.4	RAN-toksisuus sairaudessa	13
4	Ei-koodaavat RNA-toistojaksot särö-X-esimutaatio-oireyhtymässä	15
4.1	Särö-X-esimutaatio-oireyhtymä	15
4.2	RNA-toksisuus sairaudessa	15
4.3	Toimintaa vähentävä mutaatio ja toimintaa lisäävä mutaatio sairaudessa	16
4.4	RAN-toksisuus sairaudessa	17
4.5	Mitokondrionaalinen toimintahäiriö	18
5	Yhteenveto	19
6	Lähteet	20

1 Johdanto

Hermorappeumasairaudet ovat toistaiseksi parantumattomia, kroonisia ja pysyviä sairauksia, jotka tuhoavat ja vahingoittavat hermostoa. Koska hermorappeumasairauksiin ei ole parannuskeinoa tällä hetkellä, voidaan ainoastaan yrittää helpottaa potilaiden oireita. (Cleveland clinic 2023.) Hermorappeumasairaudet vaikuttavat rahallisesti merkittävästi yhteiskuntaan: pelkästään Yhdysvaltojen vuosittainen suora ja epäsuora hinta Alzheimerin taudille ja muille vastaaville dementioille, Parkinsonin taudille, amyotrofiselle lateraaliskleroosille (engl. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, ALS) ja selkäydinperäiselle lihassurkastumalle oli vuonna 2020 yhteensä \$655 miljardia (Thorpe ja muut 2021).

Ei-koodaavat toistojaksot aiheuttavat monia hermorappeumasairauksia (Swinnen ja muut 2020). Ei-koodaava RNA tarkoittaa RNA:ta, jota ei transloida proteiiniksi. Ihmisen genomista jopa 76–97 % koodaa ei-koodaava RNA:ta. (Nemeth ja muut 2023.) RNA-toistojakso puolestaan tarkoittaa RNA:ssa toistuvaa nukleotidijaksoa, joka pysyy jokaisessa toistossa samanlaisena.

Ei-koodaavien toistojaksojen aiheuttamia hermosairauksia on muun muassa dystrofia myotonica tyyppit 1 ja 2, ALS, särö-X-esimutaatio-oireyhtymä (engl. *Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome*, FXTAS) sekä Huntingtonin kaltainen tauti (taulukko 1). Suurin osa kyseisistä hermorappeumasairauksista alkaa vasta aikuisiässä, mutta esimerkiksi dystrofia myotonica tyyppi 1:ssä voi alkaa varhaislapsuudessa, lapsuudessa tai aikuisiässä. Monien hermorappeumasairauksien oireisiin kuuluu ataksia, liikehermosolujen oireet (engl. *motor neuron symptoms*), hermosolujen ylimääräinen osallistuminen (engl. *extra-neuronal involment*) sekä kognitiiviset toimintahäiriöt, mutta niiden lisäksi on muitakin oireita. (Swinnen ja muut 2020.)

Toistojakso voi sijaita geenissä useassa eri kohdassa: promoottorialueella, 5'-transloitumattomalla alueella (engl. *5'-untranslated region*, 5'UTR) tai 3'-transloitumattomalla alueella (engl. *3'-untranslated region*, 3'UTR), intronissa tai vaihtoehtoisessa eksonissa (taulukko 1). Useissa RNA-toistoissa on paljon GC-nukleotidejä ja toistojen pituus on kolmesta kuuteen nukleotidiä. Terveissä yksilöissä RNA-toistojaksoja on yleensä enintään noin 30 toistoa, mutta patogeenisten toistojaksojen toistojen lukumäärä on vaihteleva. Osassa hermorappeumasairauksissa

toistoja on enintään 100, osassa pari sataa ja joissain voi olla useista sadoista tuhansiin toistoa. Ainoastaan dystrofia myotonica tyypeissä 1 ja 2 on todettu, että toistojaksojen määrä vaikuttaa selkeästi siihen, kuinka aggressiivisesti sairaus ilmenee. (Swinnen ja muut 2020.)

RNA-toksisuus, RAN-toksisuus (engl. *repeat-associated non-ATG translation*) sekä toimintaa vähentävä mutaatio vaikuttavat patogeenisyyteen sairauksissa, jotka ovat saaneet aikaan ei-koodaavat toistojaksot (Swinnen ja muut 2020). Kandidaatin tutkielmassani käyn läpi yleisellä tasolla eri RNA:n mekanismeja, jotka vaikuttavat patogeenisyyteen hermorappeumasairauksissa. Tämän jälkeen keskityn kahteen hermorappeumasairauteen: amyotrofiseen lateraaliskleroosiin/otsaohimolohkorappeumaan (ALS/FTD) sekä FXTAS:ään. Lisäksi käyn läpi tarkemmin ei-koodaavien RNA-toistojaksojen osuutta kyseisissä sairauksissa.

Taulukko 1. Hermorappeumasairaudet, jotka aiheutuvat ei-koodaavista RNA-toistojaksoista.

Yleiskatsaus ei-koodaavien toistojaksojen aiheuttamista hermorappeumasairauksista ja niiden pääpiirteistä. Kliinisiä piirteitä on ikä, kun sairaus alkaa. Geneettisiä piirteitä on perinnöllisyysmalli; geeni, jossa toistojakso on; geenin toistojakson sijainti ja toistojakson sekvenssi. Toistojaksojen pituutta koskevia tietoja ovat toistojaksojen toistojen määrä terveissä yksilöissä; toistojaksojen toistojen määrä, joka on yksiselitteisesti patogeeninen sekä korreloiko fenotyyppi toistojakson toistojen määrän kanssa. Joka sairauksissa on kuvailtu kaikki mahdolliset RAN-proteiinit, jotka muodostuvat kaksisuuntaisen transkription molemmista transkripteistä (engl. *sense RNA* ja *antisense RNA*). *Sense-RNA* tarkoittaa, että RNA:lla DNA:n koodaavaan juosteen kanssa samanlainen sekvenssi. *Antisense-RNA* tarkoittaa, että RNA:lla DNA:n mallijuosteen kanssa samanlainen sekvenssi – poikkeuksina, että DNA:n T on RNA:ssa U. Tautiin liittyvät RBP:t on lueteltu taulukossa.

Lyhenteet: AD= autosomaalisesti dominantti, MD = dystrofia myotonica, FXTAS= särö-X-esimutaatio-oireyhtymä, HDL= Huntingtonin kaltainen tauti (engl. *Huntington disease-like*); MND = liikehermon rappeutuminen (engl. *motor neuron degeneration*), RBPs =RNA toistoihin sitoutuvat proteiinit (engl. *RNA-binding proteins*), SCA =spinoserebellaarinen ataksia, XL = X-linkitty.

(Muokattu taulukosta Swinnen ja muut 2020)

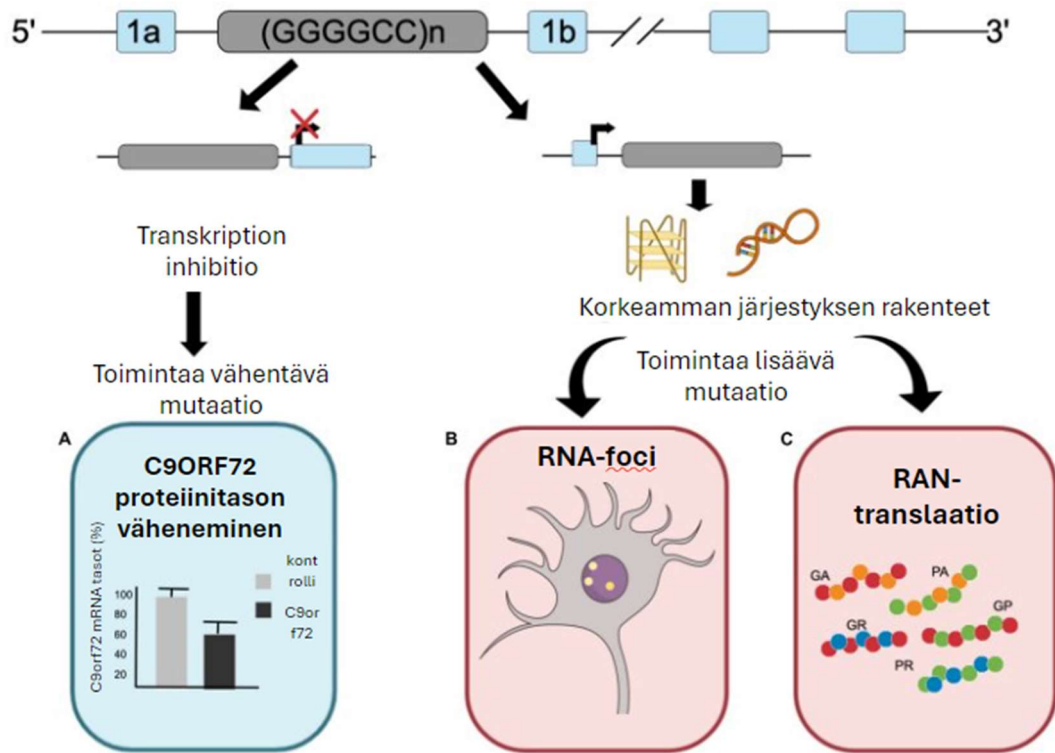
		MD 1	MD 2	FXTAS	SCA8	SCA12	SCA36	HDL-2	C9 ALS/FTD
		varhaislapsuus, lapsuus, aikuisuus	lapsuus, aikuisuus	aikuisuus	aikuisuus	aikuisuus	aikuisuus	aikuisuus	aikuisuus
Kliininen	Alkamisaika								
	Fenotyyppi	myotonia, kaihi, sydämeen kohdistuvat, endokriininen, kognitiivinen	myotonia, kaihi, sydämeen kohdistuvat, endokriininen	vapina, ataksia, kognitiivinen	ataksia, (MND)	vapina, ataksia, pikkuaivojen ulkopuolinen	ataksia, MND	korea, psykiatrinen, kognitiivinen	ALS/FTD
Geneettinen	Perinnöllisyys	AD	AD	XL	AD	AD	AD	AD	AD
	Geeni	DMPK	ZNF9	FMR1	ATXN8, ATXN8OS	PPP2R2B	NOP56	JPH3	C9ORF72
	Toiston sijainti	3'UTR	introni	5'UTR	3'UTR	promoottori	introni	vaihtoehtoinen eksoni	introni/ promoottori
	Toiston sekvenssi	CTG	CCTG	CGG	CTG	CAG	TGGGCC	CTG	GGGGCC
Toiston pituus	Normaali	5–38	<26	<25	15–50	4–32	3–15	6–28	3–30
	patogeeninen	50–1000	55–11000	55–200	80–1300	46–78	800–2500	41–58	100–4500
	Pituus - fenotyyppi	kyllä	kyllä	ei	ei	kyllä/ei	ei	kyllä/ei	ei
Ennustetut RAN-proteiinit	Sense-RNA	polyA, polyC, polyL	polyLPAC	polyA, polyG, polyR	polyA, polyC, polyL	polyA, polyQ, polyS	polyGP, polyGL, polyWA	polyA, polyC, polyL	polyGP, polyGR, polyGA
	Antisense-RNA	PolyA, polyQ, polyS	polyQAGR	polyA, polyP, polyR	polyA, polyQ, polyS	polyA, polyC, polyL	polyGP, polyAQ, polyPR	polyA, polyQ, polyS	polyGP, polyPR, polyPA
Joitakin RBP:ja		CUGCBP1, MBNL1, DDX6 ...	CUCGP1, MBNL1	CUGBP1, Drosha, PURA....	MBNL1, Staufen	NA	SRSF2	MBNL1	FUS, PURA....

2 Ei-koodaavien RNA-toistojen osuus hermorappeumasairauksissa

2.1 Toimintaa vähentävä mutaatio sekä toimintaa lisäävä mutaatio

Geneettinen muuntelu vaikuttaa geenituotteiden ominaisuuksiin, kuten RNA:n ja proteiinien ominaisuuksiin, esimerkiksi proteiineilla katalyyttiseen aktiivisuuteen. Geneettisen muuntelun toiminnalliset seuraukset voidaan jakaa kahteen pääluokkaan, joita ovat toimintaa lisäävä mutaatio (engl. *gain-of-function*, GOF) sekä toimintaa vähentävä mutaatio (engl. *loss-of-function*, LOF). Toistaiseksi ei ole laskennallisia menetelmiä, jotta GOF:n ja LOF:n aiheuttavat geenimuunnelmät voidaan erottaa toisistaan. Kokeellisia tekniikoita on erottamiseen, mutta ne ovat kalliita ja niissä on alhainen suorituskyky. (Stein ja muut 2023.)

GOF:ssä geenituote saa uuden toiminnon, sitä tuotetaan väärään aikaan tai väärässä paikassa tai geenituotteen aktiivisuus lisääntyy (Rougvie 2013). GOF-mekanismeihin kuuluu RNA-toksisuus sekä RAN-toksisuus (Schmitz ja muut 2021). LOF:ssä puolestaan proteiiniaktiivisuus loppuu osittain tai kokonaan (kuva 1A) (Stein ja muut 2023). RNA-toistojaksot voivat aiheuttaa LOF:n kolmella eri tavalla. Näihin kuuluu heikentynyt transkription aloitus, viallinen transkriptio tai lähetti-RNA:n hajotuksen lisääntyminen. (Swinnen ja muut 2020.) GOF:n ja LOF:n avulla erilaiset fenotyypit nousevat esille samassa geenissä. Tämä johtuu niiden vastakkaisista molekulaarisista mekanismeista. (Stein ja muut 2023.)



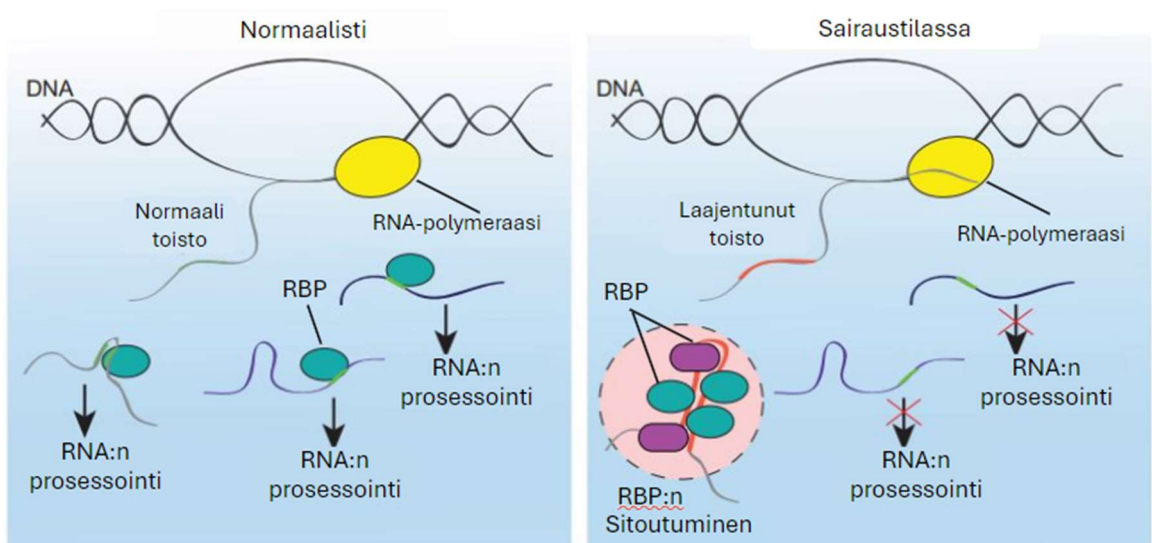
Kuva 1. Ei-koodaavien toistojaksojen mekanismit hermorappeumasairauksissa

Esimerkki C9orf72 geenin aiheuttamasta ALS/FTD:stä. A= C9orf72-proteiinitasojen vähentyminen. B= RNA-focin muodostuminen. RNA-foci sitoo itseensä RNA-toistoihin sitoutuvia proteiineja. C= RAN-translaatiolla muodostuneiden dipeptidiproteiinien kerääntyminen. (Muokattu kuvasta Schmitz ja muut 2021).

2.2 RNA-toksisuus

RNA:t, joissa on tapahtunut mutaatio, voivat olla toksisia soluille. Tällöin toksisuus aiheuttaa sairauden. (Sicot ja Gomes-Pereira 2013.) RNA-toksisuus on yksi kolmesta mekanismista, jotka ovat osallisena ei-koodaavien RNA-toistojaksosairauksien patogeenisyyteen (Swinnen ja muut 2020). RNA-toksisuudessa laajentuneet RNA-toistojaksot kertyy solun sisälle, jolloin muodostuu RNA-foci (kuva 1B) (DeJesus-Hernandez ja muut 2011). RNA-foci eristää itseensä RNA-toistoihin sitoutuvia proteiineja (engl. *RNA-binding proteins*, RBP), mikä häiritsee proteiinien normaaleja toimintoja (kuva 2) (McEachin ja muut 2020; Swinnen ja muut 2020). Tämä onkin yksi tärkeimmistä tunnusmerkeistä sairauksissa, jotka liittyvät toistojaksoihin (Glineburg ja muut 2021).

RNA-focin ominaisuudet, luonne sekä siihen liittyvät proteiinit vaihtelevat sen mukaan, mikä toistojakso on kyseessä (Glineburg ja muut 2021). Ihmisellä tiettyjä alueita genomista voidaan transkriptoida kaksisuuntaisesti, jolloin muodostuu transkripteja, joilla on DNA:n koodaavaan juosteen kanssa samanlainen sekvenssi (engl. *sense RNA*) tai DNA:n mallijuosteen kanssa samanlainen sekvenssi (engl. *antisense RNA*) – poikkeuksina, että DNA:n T on RNA:ssa U. Molemmat RNA:t voivat muodostaa RNA-foceja. (Todd ja Petrucelli 2018.)



Kuva 2. RBP:den sitoutuminen.

RNA-toistojaksot voivat kerääntyä ja muodostaa RNA-focin, joka voi sitoa RNA-toistoihin sitoutuvia proteiineja RNA-fociin. Nämä proteiinit voivat normaalisti tunnistaa toiston sekvenssin tai reagoida laajentuneisiin toistoihin. Kyseisten proteiinien normaalit toiminnot estyvät, kun ne sitoutuvat. Tällöin RNA:n prosessointiin tulee häiriöitä, jotka edesauttavat sairautta.

RBP= RNA-toistoihin sitoutuvat proteiinit

(Muokattu kuvasta Todd ja Petrucelli 2018).

2.3 RAN-toksisuus

RAN-translaatio (engl. *repeat associated non-AUG dependent translation* tai *repeat associated non-ATG translation*) tarkoittaa, että translaatio tapahtuu, vaikka AUG-aloituskodoni puuttuu (Goodman ja Bonini 2019; He ja muut 2020). RAN-translaatiossa RNA-toistot transloituvat toksisiksi RAN-proteiineiksi. (McEachin ja muut 2020; Swinnen ja muut 2020.) RAN-toksisuus tarkoittaa toksisuutta, jonka saa aikaan RAN-translaatiossa muodostuneet RAN-proteiinit (kuva 1C) (Swinnen ja muut 2020).

RAN-translaatio löydettiin ensimmäisen kerran vuonna 2011 sattumalta, kun tutkittiin geenin ATXN8:n polyG-proteiinin osuutta sairaudessa spinosebellaarinen ataksia tyyppi 8. Tutkimuksessa mutatoitiin ryhmän muodostaman ATXN8-minigeenin CAG-toistojakson 5'-alueelta ainoa ATG-aloituskodoni, jolloin huomattiin, että polyG-proteiinin tuotto ei siltikään estynyt. (Zu ja muut 2011.) Tämän jälkeen on huomattu, että useat toistojaksomutaatiot ovat käyneet läpi RAN-translaation. RAN-translaatio voi tapahtua kaikissa kolmessa lukukehyksessä sekä *sense-RNA:ssa* että *antisense-RNA:ssa*. Tällöin yhdestä mutaatiosta voi muodostua proteiinien sekoitus, jossa voi olla enintään jopa kuutta eri proteiinia. (Banez-Coronel ja Ranum 2019.) RAN-proteiinissa voi olla yhdestä viiteen aminohappoa. Tämä riippuu toiston nukleotidien lukumäärästä sekä spesifisestä toistokoodista. (Swinnen ja muut 2020.) RAN-proteiinien ilmentyminen on tärkeässä osassa RAN-translaatioon liittyvissä tutkimuksissa (Cleary ja muut 2018).

RAN-translaation välivaiheita ei vielä tiedetä hyvin, mutta todennäköisesti RAN-translaatiossa on samanlaisia vaiheita kuin perinteisen translaation aloituksen tai IRES:kseen (engl. *internal-ribosome entry site*) perustuvan aloituksen kanssa. IRES tarkoittaa kompleksista RNA-rakennetta, joka ohjaa translaation aloitusta varten 43S-ribosomaalista kompleksia, johon kuuluu aloitustekijät eIF5, eIF3, eIF2 ja ribosomaalinen alayksikkö 40S. Monet solun lähetti-RNA:t käyttävät IRES:tä translaation aloitukseen, mutta suurin osa translaation aloituksesta tapahtuu perinteisellä translaatiolla. Kuitenkin RAN-translaatio liittyy toistojaksomutaatioihin sekä se voi tapahtua jopa silloin, kun läheisiä aloituskodoneja ei ole. RAN-translaation ei tarvitse tapahtua peräkkäisissä toistoissa, vaan se voi tapahtua perinteisen lukukehyksen eri kohdissa olevissa toistoissa. Tästä seuraa, että RAN-translaatio ja perinteinen translaatio voivat tapahtua saman transkriptin eri lukukehyksissä. (Cleary ja muut 2018.)

Erilaiset stressireaktiotiet, jotka yleensä estävät translaation aloituksen, aktivoivat RAN-translaation. Näiden perusteella vaikuttaa siltä, että tietyt translaationaaliset tekijät tai vaihtoehtoiset mekanismit voivat vaikuttaa RAN-translaatioon ja sitä kautta toksisuuteen. Nykyään on saatu tunnistettua mahdollisia RAN-translaatiota sääteleviä tekijöitä, joita ovat esimerkiksi RNA-helikaasi DDX3X sekä ribosomaalinen proteiini RPS25. (Malik ja muut 2021.)

3 Ei-koodaavat RNA-toistojaksot amyotrofisessa lateraaliskleroosissa/otsa-ohimolohkorappeumassa

3.1 Amyotrofinen lateraaliskleroosi/otsa-ohimolohkorappeuma ja C9orf72-geeni

ALS on myöhäisen aikuisiän sairaus, jossa sekä ylä- että alamoitoneuronit rappeutuvat (Douglas 2018; Swinnen ja muut 2020). Sairaus etenee nopeasti asteittain, ja useimmissa tapauksissa elinaika on kolmesta viiteen vuotta diagnoosista. ALS:ään sairastuneista 5 %:lla esiintyy myös suvussa tai perheessä kyseistä tautia. Tämä viittaisi autosomaalisesti dominanttiin periytymiseen – perheiden kesken on kuitenkin vaillinaista penetranssia, joka vaikuttaa merkittävästi (Douglas 2018.) Penetranssi tarkoittaa, että genotyyppi saattaa aiheuttaa fenotyypin, genotyyppi voi aiheuttaa lukuisia erilaisia oireita tai genotyyppi voi olla myös aiheuttamatta fenotyyppejä (Kingdom ja Wright 2022). Kaikista ALS:ään sairastuneista 70 %:lla on tapahtunut mutaatio: useimmissa tapauksissa mutaatio on tapahtunut geneeissä C9orf72, FUS, TARDBP tai SOD1 (Swinnen ja muut 2020).

ALS:ään sairastuneista 5–15 %:lla diagnosoidaan FTD, jossa otsa-ohimolohkot rappeutuvat (Douglas 2018; Swinnen ja muut 2020). Kuitenkin jopa 50 %:lla on edes jonkinlaisia FTD:n oireita, joita ovat muun muassa persoonallisuuden muutokset tai kielelliset toimintahäiriöt. FTD onkin Alzheimerin ja Lewyn kappaleen -taudin jälkeen yleisin demenciasairaus. Lisäksi FTD-diagnoosin saaneista 12,5 %:lla on myös ALS. FTD:hen sairastuneista 40 %:lla on edes joitain ALS:n oireita. (Douglas 2018.)

FTD ja ALS kuuluvat samaan tautijatkumoon (McEachin ja muut 2020). Molemmilla sairauksilla on samoja patologisia pääpiirteitä. Taudit leviävät patologistesti keskushermoston kautta. ALS:ssä leviäminen tapahtuu prionimaisella tavalla. Patologinen solu tartuttaa toisen solun, jolloin tauti leviää. Synaptiset reitit myös levittävät sairautta eteenpäin. FTD leviää samankaltaisella tavalla aivossa kuin ALS. (Douglas 2018.)

Kyseisiä sairauksia aiheuttaa tiettyjen geenien mutatoituminen: yleisin niistä on C9orf72-geenin mutaatio. Kyseisessä geenissä ensimmäisen intronin GGGGCC-heksanukleotidin

toistojen lukumäärässä on tapahtunut mutaatio, jolloin 2–30 toiston sijaan heksanukleotidi toistuu satoja tai tuhansia kertoja. C9orf72 on kromosomin 9 72:s avoin lukukehys (engl. *open reading frame*). C9orf72:n haploinsuffiensi sekä RNA-toksisuuden lisääntyminen ovat taudissa sairausmekanismeja. (McEachin ja muut 2020.) Haploinsuffiensi diploidinen organismi menettää yhden alleelin, jolloin muodostuu intoleranssi geeniä kohtaan (Johnson ja muut 2019).

3.2 RNA-toksisuus sairaudessa

C9orf72-geenin aiheuttamassa ALS/FTD:ssä RNA-foci voi muodostua GGGGCC-toistoista tai CCCCGG-toistoista (DeJesus-Hernandez ja muut 2011; McEachin ja muut 2020). Lukumäärältään suurin proteiiniryhmä, joka voi sitoutua RNA-fociin, on hnRNP (Kumar ja muut 2017). Muita RBP:tä on muun muassa Pur α , SRSF1, SRDSF2, ADARBP ja nucleolin (Douglas 2018). RNA-focia on eniten tuman sisällä, mutta on huomattu, että sitä on myös tuman reunoilla sekä sytoplasmassa (Swinnen ja muut 2020).

Sense-RNA:sta ja *antisense-RNA:sta* muodostunutta RNA-focia on havaittu sijaitsevan useilla keskushermoston alueilla C9orf72 ALS/FTD-potilailla (McEachin ja muut 2020). Esimerkiksi GGGGCC-toistojen muodostamaa RNA-focia on havaittu otsalohkossa ja selkäytimessä (DeJesus-Hernandez ja muut 2011). Kyseiset RNA-focit ovat yksi sairauden patologinen tunnusmerkki. RNA-focia on runsaimmin hermosoluissa, mutta niitä voi havaita esimerkiksi perifeerisen veren leukosyyteistä, ja tämä saattaa olla merkittävä C9orf72 ALS/FTD-sairauden biomarkkeri. (McEachin ja muut 2020.) Biomarkkeri tarkoittaa lääketieteellisen tilan objektiivisia merkkejä, jotka voidaan mitata toistuvasti ja tarkasti (Strimbu ja Tavel 2010). Tällä hetkellä näyttää siltä, että RNA-foci ei yksin aiheuttaisi hermorappeumasairauksia (McEachin ja muut 2020).

Antisense-RNA-foci vaikuttaa transaktiivisen vasteen DNA:ta sitovan proteiinin 43:n (engl. *TAR DNA-binding protein 43*, TDP-43) LOF:ään (Cooper-Knock ja muut 2015). TDP-43 on tuman proteiini, joka sitoo RNA:ta ja DNA:ta ja joka säätelee transkriptiota, esimerkiksi vaikuttamalla silmukointiin (Jo ja muut 2020; McEachin ja muut 2020). Poikkeavissa tilanteissa TDP-43:t aggregoituvat ja kerääntyvät sytoplasmassa, koska ne ovat esimerkiksi hyperfosforyloitu tai ubikinoitu. Tällöin ne muodostavat TDP-43-inkluusioita. (Jo ja muut 2020.) Fosforyloidut ja ubikinoituvat TDP-43:n inkluusiot ovat tyypillisiä joissakin gliasoluissa sekä rappeutuneissa hermosoluissa ALS/FTD-potilailla.

(McEachin ja muut 2020.) Gliosolut ovat hermosoluja kemiallisesti ja fysikaalisesti tukevia soluja, joiden avulla myös ylläpidetään hermosolujen ympäristöä (Dellwo 2023).

TDP-43-inkluusioiden ja hermojen rappeutumisen välillä on merkittävä yhteys sekä lähes jokaisella C9orf72-geenin ALS/FTD:n potilaalla on poikkeavuutta TDP-43:n toiminnassa - tosin sen suuruus vaihtelee yksilöissä. TDP-43:n poikkeavuuden voi mahdollisesti aiheuttaa RNA:n aiheuttama toksisuus (engl. *RNA-mediated toxicity*) ja/tai dipeptidiproteiinit. Tämä perustuu siihen, että ennen kuin tulee oireita tai ennen kuin TDP-43:n toiminnan poikkeavuus alkaa, RNA-focin tai dipeptidi-inkluusioiden määrän on huomattu kasvavan. Kuitenkaan ei tiedetä varmuudella, miten TDP-43-poikkeavuus, dipeptidiproteiinit ja RNA:n aiheuttama toksisuus vaikuttavat toisiinsa. (McEachin ja muut 2020.)

Hermosoluissa, jotka sisältävät TDP-43 sekä p62-proteiinien inkluusioita, on huomattu olevan myös *sense-RNA:sta* ja *antisense-RNA:sta* muodostuneita RNA-foceja. Niiden välillä ei silti ole toistaiseksi havaittu olevan selkeää yhteyttä. (McEachin ja muut 2020.) Kuitenkin on huomattu, että *antisense-RNA-focin* läsnäolo vähentää merkittävästi TDP-43 toimintaa tumassa, mutta *sense-RNA-focin* läsnäololla ei ole samanlaisia vaikutuksia. *Antisense-RNA-foci* sai aikaan selkäytimen liikehermosoluissa, että 77 %:ssa kyseisissä soluissa tapahtui tuman TDP-43:n LOF. Kun puolestaan ei ollut *antisense-RNA-focia*, tuman TDP-43:n LOF oli vain 13 %. Samaa ei huomattu *sense-RNA-focin* tapauksessa. *Antisense-RNA* saattaa siis vaikuttaa merkittävästi patogeneesissä. (Cooper-Knock ja muut 2015.)

3.3 Toimintaa vähentävä mutaatio ja toimintaa lisäävä mutaatio sairaudessa

Geenin C9orf72 aiheuttama ALS/FTD aiheutuu todennäköisesti havaintojen perusteella GOF:stä, eikä LOF vaikuttaisi olevan merkittävin patogeeninen vaikuttaja tai aiheuttavan yksin sairautta (McEachin ja muut 2020; Swinnen ja muut 2020). Esimerkiksi geenin C9orf72 patogeenistä LOF:ää ei ole löydetty suuresta potilasotannasta (Harms ja muut 2013). LOF:n olisi pitänyt aiheuttaa aggressiivisen patologisen ja kliinisen fenotyypin, mutta potilailla, jotka olivat homotsygoottisia toistojaksolle, ei ilmennyt silti kyseistä fenotyyppiä (Swinnen ja muut 2020). Myös hiirillä on huomattu, että LOF ei aiheuta

patologisia oireita. (McEachin ja muut 2020). Lisäksi LOF:n hypoteesin ei ole huomattu toteutuvan useissa *in vitro* -tutkimuksissa (Swinnen ja muut 2020).

Näiden lisäksi on todettu, että C9orf72:n promoottorin hypermetylaatio suojaa hermoja. Hypermetylaatio nimittäin inhiboi transkriptiota, josta syntyisi mutatoitunutta C9orf72:n lähetti-RNA:ta, mikä vähentäisi RNA-focia sekä dipeptidien muodostamia aggregaatteja. (McMillan ja muut 2015.) Viimeinen havainto liittyy poistogeenisiin hiiri- ja rottamalleihin (engl. *knock-out murine model*) (Swinnen ja muut 2020). Poistogeeninen eläin tarkoittaa eläintä, jolla on inaktivoitu tai poistettu kokeellisesti tietty geeni. Jos kyseisiltä malleilta kytkettiin pois päältä geeni C9orf72, niille ei kehittynyt fenotyyppiä, joka olisi hermoja rappeuttava (Swinnen ja muut 2020).

Kuitenkin C9orf72:n LOF:llä voi olla jonkinlainen osuus ALS/FTD:hen, sillä se saattaa osallistua patogeneesiin ja jopa tehostaa GOF:ää (Swinnen ja muut 2020). C9orf72-proteiini vaikuttaa sekä autofaagisen että lysosomaalisen reaktioreitin välivaiheisiin (McEachin ja muut 2020). Jos hermosoluissa C9orf72:n toiminta katoaa, kerääntyvät proteiinien TDP-43:n ja p62:n aggregaatit ja autofagia heikentyy (Sellier ja muut 2016). Autofagia tarkoittaa biohajottamisprosessia, joka on tarkasti säännelty ja johon lysosomi osallistuu. Siinä hajotetaan membraanin proteiineja, soluelimiä sekä muita vanhoja proteiineja. (Ho ja muut 2019.)

Sellierin ja muiden tutkimuksessa (2016) huomattiin, että itse osittainen C9orf72:n LOF ei ole vahingollinen. Koska se silti vahvistaa proteiinin Ataxin-2 aiheuttamaa toksisuutta, viittaisi tämä, että ALS/FTD:ssä tapahtuisi kaksinkertainen patologinen mekanismi (engl. *double-hit pathological mechanism*) sen seurauksena (Sellier ja muut 2016). Myös LOF ja toistoista riippuvainen toksisuuden lisääntyminen (engl. *repeat-dependent gain of toxicity*) voivat vahvistaa toisiaan siten, että niiden yhteisvaikutus on suurempi kuin kummankaan niistä yksin. (Zhu ja muut 2020.) Lisäksi kuolleiden potilaiden aivokudoksissa huomattiin, että transkriptiotasot ovat laskeneet 50 %:lla, mikä viittaa LOF:ään (Swinnen ja muut 2020).

RNA-toistojaksot voivat vaikuttaa myös RBP:den toimintaan, jolloin muodostuu RBP:den LOF. Näiden toiminnan häiriintymisen epäillään olevan haitallista. Toistojaksot vaikuttavat muun muassa tiettyjen RBP:den jakautumiseen solun sisällä, kuten proteiinien Pur- α :n tai hnRNPH:n. Lisäksi on huomattu, että GGGGCC-toistoihin sitoutuu usein FUS-geenistä muodostuva FUS-proteiini. Vaikuttaakin siltä, että proteiinin

toimintahäiriö edistää mahdollisesti patogeneesiä. Tämän perusteella näyttää siltä, että FUS-geeni vaikuttaa myös C9orf72-geenin aiheuttamaan ALS:ään eikä ainoastaan FUS-geenin ALS:ään ja että kyseisillä sairauksilla olisi samankaltaisia mekanismeja. (Swinnen ja muut 2020.)

RBP:den avulla on myös löydetty yhteys RNA-toksisuuden sekä dipeptidiproteiinien aiheuttaman toksisuuden välillä, sillä ne molemmat saattavat aiheuttaa nukleolaarista stressiä. RBP:t vaikuttavat usein eri RNA:n aineenvaihduntaan, kuten lähetti-RNA:n transloitumiseen sekä silmukoitumiseen. Tällöin RBP:den LOF voi häiritä prosesseja, jotka tapahtuvat solun sisällä, ja aiheuttaa solustressiä. (Swinnen ja muut 2020.)

3.4 RAN-toksisuus sairaudessa

Geenin C9orf72 aiheuttamassa ALS/FTD:ssä RNA-toistot GGGGCC sekä CCCC GG voivat käydä läpi RAN-translaation. Vielä ei tiedetä tarkkaan monia RAN-translaatioon liittyviä välivaiheita. Kuitenkin kyseisen translaation on huomattu tehostuvan, kun GA-lukukehyksen lähellä on CUG-kodoni, joka voisi toimia aloituskodonina, tai kun stressivasteet lisääntyvät. (Goodman ja Bonini 2019.) Siinä voi muodostua kuutta eri dipeptidiproteiinia: GGGGCC:sta muodostuu proteiinit glysiini-alaniini sekä glysiini-arginiini ja CCCC GG:sta muodostuu proliini-alaniini sekä proliini-arginiini. Puolestaan molemmista toistoista voi muodostua glysiini-proliini-proteiinit (Green ja muut 2016.) Dipeptidiproteiineja on nähty muun muassa pikkuaivoissa, selkäytimessä, otsalohkossa sekä motorisessa aivokuoressa, kun on tutkittu kuolemanjälkeistä keskushermoston näytettä (Banez-Coronel ja Ranum 2019).

Dipeptidiproteiinit aggregoituvat enimmäkseen hermosolujen sytoplasmaan, esimerkiksi tuman lähelle, jossa niiden aggregaatteja voidaan detektoida (Banez-Coronel ja Ranum 2019; Schmitz ja muut 2021). Koska glysiini-alaniinin rakenteen ominaisuudet tunnetaan ja kyseisestä peptidiä transloidaan tehokkaasti, on sitä helpointa detektoida (Schmitz ja muut 2021). Kun aggregaatit liittyvät yhteen tiettyjen proteiinien kanssa, proteiinien normaali toiminta häiriintyy, mikä mahdollisesti lisää toksisuutta (Goodman ja Bonini 2019). Esimerkiksi Glysiini-alaniini voi liittyä yhteen Unc119-proteiinin kanssa, jolloin proteiinin normaali toiminta, kuten synaptinen signaalin siirto, häiriintyy (Schmitz ja muut 2021).

Glysiini-arginiini- ja proliini-arginiini-proteiinit eivät aggregoidu yhtä todennäköisesti kuin glysiini-alaniini-proteiinit. Niiden toksisuuden saa aikaan aggregaation sijaan enemmänkin se, että ne häiritsevät fysiologisia tapahtumasarjoja. (Schmitz ja muut 2021.) Dipeptidiproteiinien aggregaattien lukumäärän korrelaatiota kliinisten oireiden ja rappeutuvan kudoksen kanssa on myös yritetty selvittää, mutta aihe on antanut ristiriitaisia tuloksia (Goodman ja Bonini 2019).

Dipeptidiproteiineista on tehty useita *in vitro* ja *in vivo* -tutkimuksia, joissa on huomattu, että dipeptidiproteiinien muodostaminen on vähentänyt solun elinkykyä, lisännyt solukuolemaa ja usein aiheuttanut toksisuutta. Tutkimuskohteisiin kuului niin hiivasolut, soluviljelmät, *Drosophila* kuin nisäkkään primäärihermosolut. (Green ja muut 2016.) Toksisimmat dipeptidiproteiinit vaikuttaa olevan arginiinia sisältävät dipeptidiproteiinit, eli glysiini-arginiini sekä proliini-arginiini. (Balendra ja Isaacs 2018). Puolestaan proliini-alaniini ja glysiini-proliini eivät vaikuta olevan toksisia – tai ainakin ne ovat vähemmän toksisia kuin muut dipeptidiproteiinit (Balendra ja Isaacs 2018; Schmitz ja muut 2021). Glysiini-alaniini vaikuttaisi olevan vähemmän toksinen kuin arginiinia sisältävät dipeptidiproteiinit mutta toksisempi kuin glysiini-proliini ja proliini-alaniini (Schmitz ja muut 2021).

4 Ei-koodaavat RNA-toistojaksot särö-X-esimutaatio-oireyhtymässä

4.1 Särö-X-esimutaatio-oireyhtymä

FXTAS on X-kromosomissa periytyvä hermorappeumasairaus, joka etenee progressiivisesti. Sairaudella on monenlaisia oireita, joita ovat vapina, kognitiivisuuden heikentyminen, parkinsonismi sekä mahdolliset psykiatriset häiriöt. Sairaus myös aiheuttaa ataksian pikkuaivoissa, mikä vaikuttaa kävelemiseen ja joka on yksi sairauden pääoireista (Zhou ja muut 2022.) Pikkuaivojen ataksiat ovat erilaisia kävelemiseen vaikuttavia sairauksia, jotka aiheutuvat pikkuaivojen toimintahäiriöstä (Buckley ja muut 2018). Lisäksi FXTAS aiheuttaa autonomisen hermoston toimintahäiriön, jolloin potilaalle voi tulla muun muassa suoliston ja virtsarakkoon liittyviä ongelmia tai verenpaineen vaihtelua. Muita sairaudessa raportoituja oireita ovat sydänongelmat, jalkojen heikkous ja polyneuropatia. (Zhou ja muut 2022.) Polyneuropatia on ääreishermoston sairaus, jonka oireisiin kuuluu muun muassa lihasheikkous (Hanewinkel ja muut 2016).

FXTAS:n saavat aikaan CGG-toistot, jotka sijaitsevat FMR1-geenin 5'UTR-alueella (Swinnen ja muut 2020). CGG-toistojen lukumäärällä on osuus sairaudessa. 45–54 toiston lukumäärää FMR1-geenissä pidetään harmaana vyöhykkeenä, jolloin riskinä on, että kognitiivisuus heikentyy. Kun CGG-toistojen lukumäärä on 55–200, voivat ne aiheuttaa FXTAS:n. Jos CGG-toistoja on enemmän kuin 200, kyseessä on täysi mutaatio. Se voi aiheuttaa särö-X-oireyhtymän, joka vaikuttaa heikentävästi älykkyyteen. Koska FMR1-geeni sijaitsee X-kromosomissa, on FXTAS todennäköisempi miehillä kuin naisilla. Miehillä, joilla on esimutaatio, on noin 40 %:n todennäköisyys saada FXTAS. Puolestaan naisilla, joilla on esimutaatio, vastaava todennäköisyys on noin 13–16 %. Tämä johtuu siitä, että naisilla on myös yksi X-kromosomi, jossa puolestaan ei ole esimutaatiota. (Zhou ja muut 2022.)

4.2 RNA-toksisuus sairaudessa

FXTAS:ssä CGG-toistojaksot muodostavat RNA-focin, johon voi liittyä RBP:tä, kuten Pura, DGCR8 sekä hnRNP A/B1 (Zhang ja Ashizawa 2017). RBP:den liittyminen saa

aikaan sen, että yleisesti silmukoiminen sekä dendriittisen lähetti-RNA:n kuljetus heikentyvät (Zhou ja muut 2022). Onkin huomattu, että Pura, DGCR8 sekä hnRNP A/B1 tuottaminen ylimäärin estää RNA-toksisuutta ja hermojen rappeutumista (Zhang ja Ashizawa 2017). Myös TDP-43 estää hnRNP A/B1:n avulla RNA-toksisuutta (He ja muut 2014). Lisäksi CGG-toistojaksot vaikuttavat useisiin solukalvottomiin soluelimiin, sillä toistojaksot voivat häiritä näiden muodostumista sekä aktiivisuutta. Kyseinen häiritseminen edesauttaa hermojen rappeutumista. (Zhou ja muut 2022.)

Toistojaksojen läsnäolo myös saa aikaan R-luoppien muodostumisen lisääntymisen. R-luupit tarkoittavat hybridimolekyylejä, jotka koostuvat sekä lähetti-RNA:sta että DNA:sta. Tämä puolestaan voi vaurioittaa DNA:ta, jolloin DNA:han liittyvät korjausmekanismit aktivoituvat. Esimerkiksi fosforyloitunutta proteiinia H2AX:sta, jonka on osoitettu esiintyvän DNA-vaurioiden korjausmekanismien yhteydessä, on löydetty kertyminä kuoleman jälkeisten FXTAS-potilaiden aivoista. (Zhou ja muut 2022.) Hybridimolekyylien tietyt sekundääriset rakenteet vaikuttavat myös RAN-translaatioon sekä RNA-focin muodostamiseen, sillä ne voivat helpottaa tai edesauttaa kyseisiä prosesseja (Ajjugal ja muut 2021).

4.3 Toimintaa vähentävä mutaatio ja toimintaa lisäävä mutaatio sairaudessa

FXTAS:ssä ei vaikuttaisi tapahtuvan LOF:ää. Tämä perustuu siihen, että FXTAS:n piirteitä on vertailtu särö-X-oireyhtymän piirteisiin. Särö-X-oireyhtymä aiheutuu FMR1-geenin LOF:stä, eikä siinä esiinny FXTAS:n piirteitä. (Boivin ja muut 2018; Swinnen ja muut 2020.)

Sen sijaan monet havainnot todistavat, että FXTAS:ssä tapahtuukin GOF-mekanismeja. Esimerkiksi *in vivo* ja *in vitro* -tutkimuksissa on huomattu, että toksisuutta aiheuttaa CGG-toistojaksoja sisältävä RNA. (Swinnen ja muut 2020.) FXTAS-kudoksissa tumista on myös löydetty ubikinoituneita inklusioita, joissa oli CGG-toistojen transkriptejä. Transkription tuotteita oli kuitenkin vain kuolleiden FXTAS-potilaiden aivoissa eikä *Drosophilassa*, mutta jälkimmäisessä CGG-toistojen lukumäärä on yhteydessä puolestaan inklusioiden määrään. (Zhang ja Ashizawa 2017.) Lisäksi esimutaation omaavilla FMRP-proteiinin määrät pysyvät suurin piirtein samoina, vaikka geenin FMR1 lähetti-RNA:n määrä on kohonnut (Hukema ja muut 2015). Viimeinen havainto on, että

jos tuotetaan sekä CCG-toiston sisältävää RNA:ta että CGG-toiston sisältävää RNA:ta, vähenee molempien itsenäisesti muodostama toksisuus (Zhang ja Ashizawa 2017).

4.4 RAN-toksisuus sairaudessa

RNA-toksisuuden lisäksi RAN-toksisuudella on osuus sairauden patogeneesissä (Swinnen ja muut 2020). RAN-translaatio voi tapahtua kolmessa lukukehyksessä, jotka ovat CGG, GGC sekä GCG (Hukema ja muut 2015). Laajentuneiden RNA-toistojaksojen ympärille tai itse toistojaksoihin voi muodostua hiusneularakenteita (engl. *hairpin*), jolloin ribosomit sakkautuvat, mikä lopulta edesauttaa RAN-translaatiota (Zhou ja muut 2022). Kyseisten sekundäärirakenteiden sijainti AUG-aloituskodoniin vaikuttaa siihen, tapahtuuko RAN-translaatio. Jos hiusneula on 14 nukleotidiä AUG-kodonista alavirtaan, on suurin todennäköisyys, että aloitus tapahtuu muulla kuin AUG-kodonilla. (Green ja muut 2016.)

RAN-translaatiossa muodostuu tuotteita, jotka koostuvat hydrofobisten aminohappojen toistoista. RAN-translaatiossa voi muodostua polyA, polyG ja polyP -proteiineja, jotka aggregoituvat. Kun polyG aggregoituu sytosolissa, häiritsee se mitokondrion toimintaa ja vähentää solun elinkykyä. polyP ja polyA myös voivat aggregoitua tumassa ja sytoplasmassa. Siellä ne liittyvät yhteen ubikinoituneiden hermosolujen inkluusioihin. (Zhou ja muut 2022.)

polyG kerääntyy myös tumassa ubikinoituneihin inkluusioihin *Drosophilassa*, hiirimalleissa, solumalleissa sekä potilaiden aivoissa. Sen muodostuminen vaikuttaa merkittävästi hermojen rappeutumiseen *Drosophilassa*. *Drosophilassa* toksisuus vähentyikin, kun RAN-translaatio estettiin. (Todd ja muut 2013.) polyG:n vaikutusta ubikitiini-proteasomijärjestelmään (engl. *ubiquitin proteasome system*, UPS) ja sitä kautta FXTAS:ään on tutkittu *Drosophilalla* ja solumalleilla. Kun solumalleilla tehostettiin polyG:n muodostamista, lisääntyivät häiriöt UPS:ssä. Kun RAN-translaatio estettiin *Drosophilassa*, vähentyivät häiriöt UPS:ssä. polyG:n tuottaminen RAN-translaatiolla vaikuttaa aiheuttavan häiriötä UPS:ään ja muutoksia hermosolujen proteiinien tasapainotilaan. Nämä puolestaan vaikuttavat FXTAS:ään. Esimerkiksi häiriö UPS:ssä aiheutti hermojen rappeutumista *Drosophilassa*. (Oh ja muut 2015.)

4.5 Mitokondrionaalinen toimintahäiriö

Mitokondrionaalinen toimintahäiriö on CGG-toistojaksojen aiheuttamien sairauksien, kuten FXTAS:n, ominainen tunnusmerkki, joka liittyy hermojen rappeutumiseen (Gohel ja muut 2019; Zhou ja muut 2022). Toimintahäiriötä on tutkittu hiirillä, FXTAS-potilailla sekä solumalleilla (Nobile ja muut 2020). Mitokondrionaalisen toimintahäiriön muodostuminen FXTAS:ssä on kuitenkin vielä aihealue, joka tunnetaan heikosti (Gohel ja muut 2019).

Gohel työryhmineen on tutkinut polyG-proteiinin vaikutusta mitokondriossa ja tämän toiminnan sääntelyssä *in vitro* -eläinmalleissa ja solujärjestelmissä sekä tulokset varmistettiin FXTAS-potilaiden kudoksenäytteestä ja FXTAS-hiirimalleissa. Tutkimuksessa huomattiin, että polyG muodostaa mitokondrioon vaikuttavia inklusioita ja polyG:n muodostuminen saa aikaan mitokondrionaalisen toimintahäiriöiden piirteitä. Näihin piirteisiin kuuluu muun muassa, että reaktiivisia happilajeja tuotetaan enemmän ja että ATP-tasot vähentyvät. (Gohel ja muut 2019.)

Ihmisillä, joilla on FMR1-esimutaatio, on huomattu fibroblasti-solujen mitokondriossa olevan mitokondrionaalisen toimintahäiriön piirteitä. Piirteisiin kuuluu elektroninsiirtoketjun ja ATP-tuoton erkaneminen sekä mitokondrion hapenottokyvyn vähentyminen. Kaikki mitokondrionaalisen toimintahäiriön piirteet eivät tule vasta FXTAS:n oireiden muodostuttua, esimerkiksi mitokondrionaalisten proteiinien tuotto on vähentynyt ennen oireita. FXTAS:ssä puolestaan on huomattu lisääntyneitä glykolyysiä ja oksidatiivista stressiä sekä häiriötä oksidatiivisessa fosforylaatiossa, proteiinien muokkauksessa ja proteiinien kuljettamisessa. CGG-toistojaksot voivat myös aiheuttaa DNA:n vahingoittumista, mikä johtaa mitokondrionaaliseen toimintahäiriöön. (Zhou ja muut 2022.)

5 Yhteenveto

Hermorappeumasairauksien, joihin vaikuttavat ei-koodaavat RNA-toistojaksot, taustalla on kolme mekanismia: LOF, RNA-toksisuus sekä RAN-toksisuus. ALS:n aiheuttaa GGGGCC-toistojakson mutaatio ja FXTAS:n aiheuttaa CGG-toistojakson esimutaatio. Toisin kuin osassa hermorappeumasairauksissa, ALS:ssä sekä FXTAS:ssä LOF ei ole päämekanismi tai sitä ei esiintynyt välttämättä ollenkaan. Sen sijaan tärkeämmät mekanismit ovat RNA-toksisuus ja RAN-toksisuus eli GOF-mekanismit.

Ei-koodaavien RNA-toistojaksojen tutkiminen hermorappeumasairauksissa on tärkeää, sillä vieläkään ei tiedetä tarkkaan kaikkia välivaiheita, joita tapahtuu eri mekanismien taustalla. Lisäksi monesta mekanismista on epäselvää, miten se osallistuu patogeneesiin hermorappeumasairauksissa. Olisi hyvä tehdä lisää tutkimuksia, että saataisiin tarkemmin selvitettyä RNA-toksisuuden, LOF:n ja RAN-toksisuuden osuus patogeneisyydessä sekä kokonaisuudessaan hermorappeumasairauksissa.

Ei-koodaavien RNA-toistojaksojen osuudesta on vielä paljon ristiriitaista tietoa: esimerkiksi ei ole varmaa, onko proteiinien aggregaattien lukumäärällä, potilaiden oireilla ja hermoston rappeutumisella selkeää syy-yhteyttä. Kun yleisesti saadaan selvitettyä ristiriitaiset tiedot sekä saadaan vielä tarkemmin selvitettyä sairausmekanismien osuuksia sairauksissa, mahdollistaisi tämä lääkekehityksen hermorappeumasairauksiin. Elinajan odotteet ovat lyhyet monissa hermorappeumasairauksissa - ALS:ssä elinaika on usein vain kolmesta viiteen vuotta siitä, kun on saanut diagnoosin. Ei-koodaavien RNA-toistojaksojen aiheuttamia hermorappeumasairauksia tulisi tutkia laajemmin, jotta saataisiin potilaiden elinaikaa pidennettyä ja jopa parannettua tai estettyä sairaus kokonaan.

6 Läheteet

Ajjugal, Y., Kolimi, N. & Rathinavelan, T. (2021) Secondary structural choice of DNA and RNA associated with CGG/CCG trinucleotide repeat expansion rationalizes the RNA misprocessing in FXTAS. *Sci Rep* **11**:8163.

Balendra, R. & Isaacs, A. M. (2018) C9orf72-mediated ALS and FTD: Multiple pathways to disease. *Nat Rev Neurol* **14**:544–558.

Banez-Coronel, M. & Ranum, L. P. W. (2019) Repeat-associated non-AUG (RAN) translation: Insights from pathology. *Lab Invest* **99**:929–942.

Boivin, M., Willemsen, R., Hukema, R. K. & Sellier, C. (2018) Potential pathogenic mechanisms underlying Fragile X Tremor Ataxia Syndrome: RAN translation and/or RNA gain-of-function? *Eur J Med Genet* **61**:674–679.

Buckley, E., Mazzà, C. & McNeill, A. (2018) A systematic review of the gait characteristics associated with Cerebellar Ataxia. *Gait Posture* **60**:154–163.

Cleary, J. D., Pattamatta, A. & Ranum, L. P. W. (2018) Repeat-associated non-ATG (RAN) translation. *J Biol Chem* **293**:16127–16141.

Cleveland Clinic (2023) Neurodegenerative Diseases <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/24976-neurodegenerative-diseases> (luettu 17.4.2024)

Cooper-Knock, J., Higginbottom, A., Stopford, M. J., Highley, J. R., Ince, P. G., Wharton, S. B., ... Shaw, P. J. (2015) Antisense RNA foci in the motor neurons of C9ORF72-ALS patients are associated with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* **130**:63–75.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., ... Rademakers, R. (2011) Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* **72**:245–256.

Dellwo A. (2023) What Are Glial Cells and What Do They Do?

<https://www.verywellhealth.com/what-are-glial-cells-and-what-do-they-do-4159734>

(Luettu 7.2.2024)

Douglas, A. G. L. (2018) Non-coding RNA in C9orf72-related amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: A perfect storm of dysfunction. *Non-Coding RNA Res* **3**:178–187.

Glineburg, M. R., Zhang, Y., Krans, A., Tank, E. M., Barmada, S. J. & Todd, P. K. (2021) Enhanced detection of expanded repeat mRNA foci with hybridization chain reaction. *Acta Neuropathol Commun* **9**:73.

Gohel, D., Sripada, L., Prajapati, P., Singh, K., Roy, M., Kotadia, D., ... Singh, R. (2019) FMRpolyG alters mitochondrial transcripts level and respiratory chain complex assembly in Fragile X associated tremor/ataxia syndrome [FXTAS]. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* **1865**:1379–1388.

Goodman, L. D. & Bonini, N. M. (2019) Repeat-associated non-AUG (RAN) translation mechanisms are running into focus for GGGGCC-repeat associated ALS/FTD. *Prog Neurobiol* **183**:101697.

Green, K. M., Linsalata, A. E. & Todd, P. K. (2016) RAN translation—What makes it run? *Brain Res* **1647**:30–42.

Hanewinkel, R., Van Oijen, M., Ikram, M. A. & Van Doorn, P. A. (2016) The epidemiology and risk factors of chronic polyneuropathy. *Eur J Epidemiol* **31**:5–20.

Harms, M. B., Cady, J., Zaidman, C., Cooper, P., Bali, T., Allred, P., ... Baloh, R. H. (2013) Lack of C9ORF72 coding mutations supports a gain of function for repeat expansions in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* **34**:2234.e13–2234.e19.

- He, F., Flores, B. N., Krans, A., Frazer, M., Natla, S., Niraula, S., ... Todd, P. K. (2020) The carboxyl termini of RAN translated GGGGCC nucleotide repeat expansions modulate toxicity in models of ALS/FTD. *Acta Neuropathol Commun* **8**:122.
- He, F., Krans, A., Freibaum, B. D., Taylor, J. P. & Todd, P. K. (2014) TDP-43 suppresses CGG repeat-induced neurotoxicity through interactions with HnRNP A2/B1. *Hum Mol Genet* **23**:5036–5051.
- Ho, W. Y., Tai, Y. K., Chang, J.-C., Liang, J., Tyan, S.-H., Chen, S., ... Ling, S.-C. (2019) The ALS-FTD-linked gene product, C9orf72, regulates neuronal morphogenesis via autophagy. *Autophagy* **15**:827–842.
- Hukema, R. K., Buijsen, R. A. M., Schonewille, M., Raske, C., Severijnen, L.-A. W. F. M., Nieuwenhuizen-Bakker, I., ... Willemsen, R. (2015) Reversibility of neuropathology and motor deficits in an inducible mouse model for FXTAS. *Hum Mol Genet* **24**:4948–4957.
- Jo, M., Lee, S., Jeon, Y.-M., Kim, S., Kwon, Y. & Kim, H.-J. (2020) The role of TDP-43 propagation in neurodegenerative diseases: Integrating insights from clinical and experimental studies. *Exp Mol Med* **52**:1652–1662.
- Johnson, A. F., Nguyen, H. T. & Veitia, R. A. (2019) Causes and effects of haploinsufficiency. *Biol Rev* **94**:1774–1785.
- Kingdom, R. & Wright, C. F. (2022) Incomplete Penetrance and Variable Expressivity: From Clinical Studies to Population Cohorts. *Front Genet* **13**:920390.
- Kumar, V., Hasan, G. M. & Hassan, Md. I. (2017) Unraveling the Role of RNA Mediated Toxicity of C9orf72 Repeats in C9-FTD/ALS. *Front Neurosci* **11**:711.
- Malik, I., Tseng, Y., Wright, S. E., Zheng, K., Ramaiyer, P., Green, K. M. & Todd, P. K. (2021) SRSF protein kinase 1 modulates RAN translation and suppresses CGG repeat toxicity. *EMBO Mol Med* **13**:e14163.

- McEachin, Z. T., Parameswaran, J., Raj, N., Bassell, G. J. & Jiang, J. (2020) RNA-mediated toxicity in C9orf72 ALS and FTD. *Neurobiol Dis* **145**:105055.
- McMillan, C. T., Russ, J., Wood, E. M., Irwin, D. J., Grossman, M., McCluskey, L., ... Lee, E. B. (2015) C9orf72 promoter hypermethylation is neuroprotective: Neuroimaging and neuropathologic evidence. *Neurology* **84**:1622–1630.
- Nemeth, K., Bayraktar, R., Ferracin, M. & Calin, G. A. (2023) Non-coding RNAs in disease: From mechanisms to therapeutics. *Nat Rev Genet*.
- Nobile, V., Palumbo, F., Lanni, S., Ghisio, V., Vitali, A., Castagnola, M., ... Tabolacci, E. (2020) Altered mitochondrial function in cells carrying a premutation or unmethylated full mutation of the FMR1 gene. *Hum Genet* **139**:227–245.
- Oh, S. Y., He, F., Krans, A., Frazer, M., Taylor, J. P., Paulson, H. L. & Todd, P. K. (2015) RAN translation at CGG repeats induces ubiquitin proteasome system impairment in models of fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *Hum Mol Genet* **24**:4317–4326.
- Rougvie, A. E. (2013) Heterochronic Mutation. Kirjassa: Hughes, K. (toim.), Maloy, S. (toim.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics, 2. painos*, s. 442–445 Elsevier.
- Schmitz, A., Pinheiro Marques, J., Oertig, I., Maharjan, N. & Saxena, S. (2021) Emerging Perspectives on Dipeptide Repeat Proteins in C9ORF72 ALS/FTD. *Front Cell Neurosci* **15**:637548.
- Sellier, C., Campanari, M., Julie Corbier, C., Gaucherot, A., Kolb-Cheynel, I., Oulad-Abdelghani, M., ... Charlet-Berguerand, N. (2016) Loss of C9 ORF 72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. *EMBO J* **35**:1276–1297.
- Sicot, G. & Gomes-Pereira, M. (2013) RNA toxicity in human disease and animal models: From the uncovering of a new mechanism to the development of promising therapies. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* **1832**:1390–1409.

- Stein, D., Kars, M. E., Wu, Y., Bayrak, Ç. S., Stenson, P. D., Cooper, D. N., ... Itan, Y. (2023) Genome-wide prediction of pathogenic gain- and loss-of-function variants from ensemble learning of a diverse feature set. *Genome Med* **15**:103.
- Strimbu, K. & Tavel, J. A. (2010) What are biomarkers?: *Curr Opin HIV AIDS* **5**:463–466.
- Swinnen, B., Robberecht, W. & Van Den Bosch, L. (2020) RNA toxicity in non-coding repeat expansion disorders. *EMBO J* **39**:e101112.
- Thorpe, K. E., Levey, A. I. & Thomas, J. (2021) U.S BURDEN OF NEURODEGENERATIVE DISEASE. <https://www.fightchronicdisease.org/sites/default/files/May%202021%20Neurodegenerative%20Disease%20Burden%20on%20US%20-%20FINAL%20.pdf> (luettu 17.4.2024)
- Todd, P. K., Oh, S. Y., Krans, A., He, F., Sellier, C., Frazer, M., ... Paulson, H. L. (2013) CGG Repeat-Associated Translation Mediates Neurodegeneration in Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Neuron* **78**:440–455.
- Todd, T. W., Petrucelli, L., (2018) Neurodegenerative Diseases and RNA-Mediated Toxicity. Kirjassa: Wolfe, M. S. (toim), *The Molecular and Cellular Basis of Neurodegenerative Diseases*, s. 441-475. Academic Press.
- Zhang, N. & Ashizawa, T. (2017) RNA toxicity and foci formation in microsatellite expansion diseases. *Curr Opin Genet Dev* **44**:17–29.
- Zhou, Z.-D., Jankovic, J., Ashizawa, T. & Tan, E.-K. (2022) Neurodegenerative diseases associated with non-coding CGG tandem repeat expansions. *Nat Rev Neurol* **18**:145–157.
- Zhu, Q., Jiang, J., Gendron, T. F., McAlonis-Downes, M., Jiang, L., Taylor, A., ... Cleveland, D. W. (2020) Reduced C9ORF72 function exacerbates gain of toxicity from ALS/FTD-causing repeat expansion in C9orf72. *Nat Neurosci* **23**:615–624.

Zu, T., Gibbens, B., Doty, N. S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M. D., ... Ranum, L. P. W. (2011) Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci* **108**:260–265.