

TYTUŁ PROJEKTU:**Terapeutyczna aktywacja oraz determinanty sygnalizacyjne autoregulacyjnej ekspresji *MBNL1* w dystrofii miotonicznej.****WSTĘP**

Sekwestracja białek z rodziny *Muscleblind-like* (MBNL) przez cząsteczki RNA z ekspansją powtórzeń CUG (CUG^{exp}), powstałe ze zmutowanego allelu genu kinazy białkowej *DMPK*, jest centralnym punktem patomechanizmu leżącego u podstaw dystrofii miotonicznej (DM). Sekwestracja znacznie upośledza prawidłowe funkcjonowanie białek MBNL w regulacji alternatywnego składowania (*splicing*) wielu cząsteczek pierwotnego mRNA (pre-mRNA), skutkując charakterystycznymi objawami chorobowymi np. miotonią i miopatią mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego oraz zaćmą. Pomimo intensywnych badań, DM pozostaje wciąż chorobą nieuleczalną, a jedyną możliwością pomocy dla pacjentów jest rehabilitacja i łagodzenie szerokiego zakresu objawów klinicznych. Wykazano, że nadekspresja egzogenego MBNL1, najpowszechniej eksprymowanego białka z rodziny MBNL, przeciwdziała toksyczności indukowanej przez CUG^{exp}. Jednakże, pomimo znaczenia terapeutycznego, wiedza na temat czynników regulujących ekspresję genów MBNL oraz aktywujących ich komórkowych ścieżek sygnalizacyjnych jest nadal bardzo ograniczona. **Nasze ostatnie badania ujawniły, że wszystkie białka z rodziny MBNL mogą precyzyjnie regulować poziom białka MBNL1 poprzez tzw. pętlę e1, czyli autoregulacyjną pętlę sprzężenia zwrotnego opartą na alternatywnym *splicingu* pierwszego kodującego eksonu (e1) *MBNL1*. Pętla e1 jest ważnym mechanizmem homeostatycznym dostosowującym pojemność puli białek MBNL1 do potrzeb komórki, oraz odgrywa kluczową rolę w opóźnianiu wystąpienia patologicznych objawów DM. Teoretycznie, aktywacja pętli e1 mogłaby zostać wykorzystana w walce z chorobą do osiągnięcia terapeutycznego i jednocześnie fizjologicznego poziomu samoregulującego się białka MBNL1. Co istotne, dane eksperymentalne wskazują, że MBNL1 może być czujnikiem stresu autoregulującym poziom swojej ekspresji poprzez pętlę e1 w odpowiedzi na różne czynniki, aby zapobiec uszkodzeniu komórki. Ponadto, udział MBNL1 w upośledzonej odpowiedzi komórkowej na bodźce stresowe został wskazany jako kluczowy element patomechanizmu DM. Jest zatem niezwykle istotne, aby poznać ścieżki sygnalizacyjne oraz czynniki transkrypcyjne wpływające na ekspresję genu *MBNL1*, szczególnie w kontekście DM, stresu komórkowego oraz autoregulacyjnej pętli e1.**

CELE i ZNACZENIE BADAŃ

CEL 1) Wykorzystamy komórkowe oraz mysie modele DM do zaprojektowania oraz testowania zupełnie nowej strategii terapeutycznej opartej na aktywacji genu *MBNL1*, która uruchomi translację puli białka MBNL1 wystarczająco dużą do wysycenia toksycznych ekspansji CUG^{exp}, a także wiązania się z innymi docelowymi pre-mRNA aby przywrócić ich prawidłowe alternatywne składowanie. Metody molekularne które wykorzystamy w tym celu umożliwią nam porównanie potencjału terapeutycznego autoregulacyjnej ekspresji *MBNL1* związanej z pętlą e1 w celu utrzymania fizjologicznego poziomu białka w komórkach DM – jest to pomysł nie testowany dotąd w terapii DM - oraz nadekspresji wysoce funkcjonalnego MBNL1 która w dłuższej perspektywie może być toksyczna.

CEL 2) Aby uzyskać wgląd w ścieżki sygnalizacyjne które mogłyby zostać wykorzystane w terapii przeciw DM, szczególnie te determinujące autoregulację MBNL1 przez pętlę e1, scharakteryzujemy komórkowe szlaki sygnalizacyjne oraz czynniki transkrypcyjne stymulujące ekspresją *MBNL1*. Wykorzystamy w tym celu szereg technik biochemicznych, molekularnych oraz bioinformatycznych a także modele komórkowe które umożliwią analizę wpływu MBNL1 na kluczowe zdarzenia związane z losem komórki, takie jak proliferacja, migracja czy apoptoza, oraz powiązane szlaki sygnalizacyjne.

CEL 3) Przygotujemy serię uproszczonych narzędzi molekularnych służących do badania potencjalnych czynników wpływających na efektywność alternatywnego *splicingu* e1, a także oceny wzajemnego oddziaływania między wyłączeniem e1 a jego cyrkularyzacją po wycięciu z pre-mRNA (circRNA). Ponieważ circRNA reprezentują ważny poziom regulacji białka poprzez wiązanie nadmiaru MBNL, kluczowym jest ujawnienie interakcji między tymi dwoma procesami, szczególnie w kontekście DM, gdzie poziom funkcjonalnego MBNL istotnie wpływa na siłę objawów chorobowych.

Dane zdobyte w ramach projektu będą cennym aspektem w zrozumieniu regulacji ekspresji genu *MBNL1*, patomechanizmu DM oraz ujawnią nowe cząsteczki sygnalizacyjne, które mogłyby być potencjalnym celem przyszłych strategii terapeutycznych przeciwko tej chorobie.