

T-komórkowa ostra białaczka limfoblastyczna (T-ALL) stanowi rzadki podtyp ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL), będącej najczęstszym nowotworem złośliwym wieku dziecięcego. Choroba ta **charakteryzuje się dużą agresywnością oraz złą prognozą**. Jej leczenie oparte jest na chemioterapii, która niesie za sobą szereg poważnych oraz często długotrwałych skutków ubocznych, co ma szczególne znaczenie w przypadku pacjentów pediatrycznych. Diagnostyka i leczenie T-ALL generuje wysokie koszty, a mimo **to aż w 20% przypadków terapia okazuje się nieskuteczna, co prowadzi do nawrotu choroby lub śmierci**.

T-ALL u dzieci to poważny problem medyczny z konsekwencjami psychologicznymi oraz społecznoekonomicznymi. Obecnie odchodzi się od idei uniwersalnych terapii przeciwnowotworowych. Działania badaczy koncentrują się na poszukiwaniu tzw. celowanych opcji terapeutycznych, dostosowanych do cech biologicznych komórek nowotworowych i przeznaczonych dla ściśle zdefiniowanych grup pacjentów o podobnym „molekularnym profilu” nowotworu. **Terapia celowana, umożliwiającą wyłączenie nadaktywnej u pacjentów ścieżki mTOR stanowi potencjalną strategię leczniczą w T-ALL**. Ścieżka ta jest kluczowa dla funkcjonowania zdrowych komórek, pośredniczy w przekazywaniu sygnałów z otoczenia i stanowi punkt łączący wiele szlaków sygnalizacji wewnątrz komórki. W nowotworach, także w T-ALL, ta ścieżka jest nadmiernie aktywna, co przyczynia się do niekontrolowanego rozrostu białaczki. Obecnie podejmuje się próby wykorzystania inhibitorów ścieżki mTOR w leczeniu wielu nowotworów, w tym nowotworów hematologicznych. Jednak aby pacjenci z T-ALL mogli w przyszłości korzystać z tego typu rozwiązań medycznych, konieczne jest dokładne scharakteryzowanie mechanizmów deregulacji szlaku mTOR w tej białaczce.

Przez wiele lat badania nad T-ALL były skoncentrowane na poszukiwaniu zmian w obrębie sekwencji kodujących białka. Dzięki temu wiedza na temat onkogenów i genów supresorowych zaangażowanych w patogenezę T-ALL jest stosunkowo szeroka. Obecnie coraz więcej uwagi w T-ALL poświęca się znaczeniu mechanizmów epigenetycznych (głównie metylacji DNA) oraz roli cząsteczek miRNA, które biorą udział w regulacji ekspresji genów. Metylacja DNA to modyfikacja chemiczna, polegająca na dodawaniu grup metylowych (-CH₃) do zasad azotowych nukleotydów budujących nić DNA. Metylacja nie zmienia sekwencji DNA, a jedynie dostępność DNA dla białek odpowiedzialnych za ekspresję genów. miRNA to krótkie cząsteczki RNA, które wyciszają ekspresję genów poprzez bezpośrednie oddziaływanie z transkryptami tych genów. Wiadomo obecnie, że zarówno **poziom ekspresji miRNA, jak i poziom metylacji DNA** w komórkach białaczkowych jest zmieniony w stosunku do komórek prawidłowych. **Zmiany te mogą mieć bezpośredni wpływ na rozwój nowotworu, ponieważ mechanizmy te powodują obniżenie ekspresji genów powstrzymujących transformację nowotworową oraz podwyższanie poziomu ekspresji onkogenów**. Dotychczas (epi-)genetyczne mechanizmy regulacji ścieżki mTOR nie zostały zbadane w kontekście biologii T-ALL.

Celem proponowanego projektu jest: 1/ funkcjonalna charakterystyka 5-7 interakcji miRNA-mRNA bezpośrednio związanych z sygnalizacją mTOR oraz określenie wpływu tych oddziaływań na przeżycie komórek T-ALL w badaniach *in vitro* 2/ funkcjonalna charakterystyka wpływu metylacji DNA na ekspresję 4-6 genów związanych z sygnalizacją ścieżki mTOR oraz weryfikacja wpływu, jaki zaburzenia ekspresji tych genów mają na przeżycie komórek T-ALL w badaniach *in vitro*.

Badania prowadzone będą w oparciu o różne modyfikacje techniki CRISPR-dCas9, która pozwoli na ukierunkowane i precyzyjne przeprowadzenie zmiany ekspresji genów w liniach komórkowych T-ALL. Potencjał onkogenny/supresorowy badanych interakcji oraz genów zostanie oceniony w testach funkcjonalnych, oceniających przeżywalność komórek T-ALL pod wpływem wprowadzonych modyfikacji epigenetycznych.

Interakcje miRNA-mRNA oraz geny podlegające zaburzonej metylacji DNA zostały wytypowane do badań w oparciu o dane multiomiczne, pochodzące z integracji danych z kilku platform sekwencjonowania nowej generacji próbek pacjentów z T-ALL. Podjęliśmy się scharakteryzowania kilku poziomów regulacji ścieżki mTOR w celu uzyskania jak najpełniejszego obrazu jej deregulacji w białaczce T-ALL. **Połączenie kilku nowoczesnych podejść badawczych umożliwi znaczne poszerzenie stanu wiedzy na temat zaburzeń sygnalizacji mTOR w komórkach białaczkowych**.

Uzyskane w proponowanym projekcie wyniki przyczynią się do pogłębienia wiedzy na temat zależności regulatorowych ścieżki mTOR. Zidentyfikowane osi regulatorowe miRNA-mRNA oraz zaburzenia procesu metylacji DNA będą mogły stanowić punkt wyjścia do dalszych badań funkcjonalnych (w modelu mysim T-ALL), mających na celu potwierdzenie ich onkogennej/supresorowej roli *in vivo*. **Potencjalnie mogą też stanowić punkt wyjścia dla opracowania nowych strategii terapeutycznych dla pacjentów z T-ALL, ukierunkowanych na inaktywację szlaku mTOR**.