

Dystrofia miotoniczna typu 2 (DM2) jest jedną z najczęstszych postaci dystrofii mięśniowej u dorosłych i pozostaje nieuleczalna. Jest to choroba autosomalna dominująca związana z wydłużaniem i niestabilnością powtórzeń tetranukleotydów CCTG w pierwszym intronie (i1) genu *CNBP*. Podczas gdy osoby zdrowe mają do 26 powtórzeń CCTG, u pacjentów z DM2 powtórzenia osiągają długość kilka tysięcy kopii. Patogeneza DM2 jest związana z ekspresją i nieprawidłowym przetwarzaniem zmutowanego pre-mRNA *CNBP* i obejmuje tzw. *RNA toxic gain-of-function* efekt. Zawierający ekspansję powtórzeń intron 1 (i1CCUG) nie ulega degradacji i gromadzi się w jądrze jako stabilne ogniska RNA tzw. *foci*. Ich obecność jest powszechnie uważana za główne źródło nieprawidłowości w komórkach DM2 i wyzwalacz patogenezy. Wpływ ekspansji CCTG na ekspresję *CNBP* jest obecnie kontrowersyjny, niektóre badania nie wykazały żadnego efektu, inne zaś wykazały spadek poziomu mRNA i białka *CNBP* w komórkach i tkankach DM2. Najnowsze wyniki oparte na wysokoprzepustowej analizie RNA-seq wykazały nieprawidłowy splicing intronu 1, i jego retencja została wykryta w DM2 w porównaniu z kontrolami. Ekspansja CCTG znajduje się w dużym intronie (12,000 pz), który jest umieszczony w 5'UTR genu *CNBP*. W zmutowanym allelu długość i1 może różnić się znacznie ze względu na niestabilny charakter powtórzeń CCTG, i w niektórych przypadkach może osiągnąć ponad 50,000 pz. Konwencjonalny model splicingu sugeruje, że prawie wszystkie introny są usuwane jako pojedyncza jednostka. Jednak opisano przykłady wycinania intronów poprzez wielokrotne cykle splicingowe na drodze tzw. recursive splicing (RS) i jak ostatnio opisano w ludzkich genach, większość intronów jest usuwana z pre-mRNA w wielu fragmentach, a nie jako całe jednostki w reakcji jednoetapowej. Proces ten skutkuje generowaniem przejściowych półproduktów splicingowych, które są źródłem końcowego mRNA. Nieprawidłowe przetwarzanie tych prekursorów może być źródłem patogenezy. W niniejszym projekcie zamierzamy przetestować hipotezę, że i1 *CNBP* ulega splicingowi na drodze niekanonicznych zdarzeń RS. Rozpoznawanie miejsc RS przez aparat spliceosomu jest zaburzone w DM2 z powodu obniżonego poziomu białek splicingowych charakterystycznego dla pacjentów i uważanego za źródło globalnych zaburzeń alternatywnego splicingu. To z kolei powoduje retencję i1 i jego zaburzoną degradację obserwowaną w komórkach i tkankach DM2 jako ogniska jądrowego RNA. Aby przetestować niniejszą hipotezę, będziemy: (i) analizować przetwarzanie transkryptów *CNBP* in vivo przy użyciu metabolicznego znakowania RNA z użyciem 4sU w różnych typach komórek DM2 oraz kontroli; sekwencjonowanie RNA typu nanopore zostanie przeprowadzone w celu określenia stopnia RS w tych komórkach; (ii) określać kategorię produktów powstających w wyniku splicingu i1 za pomocą analizy RNA-seq cząsteczek lariatów i kolistych RNA; (iii) przeprowadzimy walidację wyników uzyskanych w hodowanych komórkach wykorzystując różne typy tkanek od pacjentów z DM2 i grup kontrolnych; (iv) określać globalny zasięg RS w komórkach i tkankach ludzkich DM2 w porównaniu z grupami kontrolnymi i ich potencjalną funkcję w patogenezie DM2.