

Rola metylacji DNA w etiologii wysokiej krótkowzroczności u polskich dzieci

Cel badań:

Wysoka krótkowzroczność (ang. *high myopia*, HM), zaburzenie charakteryzujące się wielkością wady $-6,0$ dioptrii [D] lub wyższą oraz długością osiową gałki ocznej (AL) dłuższą niż $26,0$ mm, jest główną przyczyną ślepoty w krajach rozwijających się. HM ma wieloczynnikową etiologię, w której biorą udział czynniki genetyczne i środowiskowe takie jak praca wzrokowa z bliska, praca przy sztucznym oświetleniu, niski poziom aktywności fizycznej na świeżym powietrzu oraz wyższy poziom wykształcenia. Jak dotąd rozpoznano liczne geny i warianty sekwencji powiązane z HM, jednakże były one charakterystyczne tylko dla poszczególnych populacji, a nawet rodzin.

Metylacja DNA jest procesem epigenetycznym regulującym ekspresję genów bez zmiany sekwencji DNA. Zmiany w poziomie metylacji DNA mogą stanowić powiązanie między czynnikami środowiskowymi a HM.

Projekt jest rozszerzeniem długoletnich badań naszego zespołu w zakresie genetycznych i epigenetycznych przyczyn HM. Ostatnio, wykonaliśmy analizę całogenomowej metylacji DNA dzieci z HM i dzieci bez HM jako grupy kontrolnej. Proponowany projekt jest kontynuacją tych badań oraz projektu doktorskiego o tytule „Charakterystyka wybranych aspektów (epi)-genetycznych w wysokiej krótkowzroczności u polskich pacjentów” realizowanego przez kierownika projektu. W ramach pracy kierownik projektu przeprowadził analizę wyników metylacji DNA całego genomu i wybrał dinukleotydy CpG o zróżnicowanej metylacji u dzieci z HM w porównaniu do grupy kontrolnej, które będą stanowiły podstawę badań przewidzianych w projekcie. Są to dinukleotydy CpG w genach *GSTM1*, *PPP1R18*, *XRCC2*, *OXA1L*, *FARP2*, *ABHD13*, *SORBS2*, *SLC25A3P1*, *TANC1* i *ATXN1*. **Badania wstępne wskazują, że zmiany w poziomie metylacji tych genów mogą powodować zmiany w poziomie ich ekspresji i tym samym warunkować fenotyp HM u polskich dzieci.** W celu weryfikacji tej hipotezy planowana jest walidacja wyników metylacji DNA całego genomu z zastosowaniem techniki alternatywnej (Cel 1); analiza poziomu ekspresji genów ze zmianami metylacji (Cel 2); oszacowanie profilu metylacji i ekspresji w liniach komórkowych pochodzących z narządu wzroku (Cel 3); oraz wyszukanie wariantów sekwencji w genach ze zróżnicowaną metylacją (Cel 4).

Metodologia badań:

Materiał i izolacja kwasów nukleinowych: Badania będą prowadzone na DNA z krwi 18 polskich dzieci z HM (4–12 lat, wada wzroku $-6,0$ - $-15,0$ D przynajmniej w jednym oku, AL $26,22$ – $27,85$ mm) i 18 polskich dzieci bez HM (ten sam wiek i płeć), który był uprzednio wykorzystany w analizie całogenomowej metylacji DNA. DNA i RNA będą również izolowane z krwi nowo zrekrutowanej grupy dzieci oraz z dostępnych komercyjnie linii komórkowych wyprowadzonych z komórek siatkówki.

Cel 1: Walidacja wyników analizy całogenomowej metylacji z użyciem alternatywnej techniki: Poziom metylacji wybranych fragmentów genowych zostanie zweryfikowany z zastosowaniem metody alternatywnej z wykorzystaniem DNA od polskich dzieci.

Cel 2: Analizy ekspresji genów o zróżnicowanej metylacji: Eksperyment zostanie przeprowadzony w celu sprawdzenia zależności między metylacją a ekspresją wybranych genów.

Cel 3: Badania funkcjonalne na liniach komórkowych siatkówki - ocena profilu metylacji i ekspresji: Poziom metylacji i ekspresji wybranych genów zostanie zmierzony w liniach komórkowych siatkówki i porównywany z wynikami uzyskanymi dla badanych dzieci. By dowiedzieć się czy metylacja badanych genów może wpływać na ich ekspresję w komórkach siatkówki zostanie przeprowadzona demetylacja DNA.

Cel 4: Poszukiwanie wariantów sekwencji w genach o zróżnicowanej metylacji: Sekwencjonowanie będzie przeprowadzone w celu sprawdzenia czy same różnice w poziomie metylacji są odpowiedzialne za zmiany ekspresji badanych genów w HM czy w połączeniu z patogennymi zmianami sekwencji genów.

Wpływ projektu na rozwój dziedziny i spodziewany efekt końcowy

Oczekiwany efektem końcowym projektu jest potwierdzenie, że zmiany w poziomie metylacji analizowanych genów powodują zmiany w ich ekspresji w krwi i komórkach siatkówki i tym samym prowadzą do rozwoju HM u polskich dzieci. Nasze badania metylacji w HM są jedynymi prowadzonymi w populacji polskiej, dlatego wyniki będą cieszyły się zainteresowaniem okulistów, naukowców i studentów kierunków medycznych i biologicznych. Identyfikacja nowych przyczyn powstawania HM jest krokiem w kierunku lepszej diagnostyki molekularnej i potencjalnych metod leczenia.