

Stożek rogówki (ang. *keratoconus*, KTCN), to choroba oczu charakteryzująca się postępującym ścięciem rogówki i jej specyficznym uwypukleniem. Nieprawidłowości strukturalne w poszczególnych warstwach rogówki powodują zmiany refrakcji i znaczne pogorszenie widzenia. Częstość występowania KTCN wynosi od 1/375 do 1/2000 osób w populacji ogólnej. Pierwsze objawy KTCN pojawiają się zwykle w drugiej lub na początku trzeciej dekady życia. Postępowanie terapeutyczne w KTCN zależy od stopnia zaawansowania choroby i obejmuje korekcję wzroku za pomocą soczewek kontaktowych, zabieg sieciowania kolagenu rogówki (CXL) lub przeszczep rogówki. Na rozwój choroby wpływają czynniki środowiskowe, takie jak pocieranie oczu lub noszenie soczewek kontaktowych. Ważną rolę w KTCN odgrywają również czynniki genetyczne.

Ludzka rogówka zbudowana jest z pięciu warstw: nabłonka, błony granicznej przedniej, istoty właściwej rogówki (zrębu), blaszki granicznej tylnej i śródbłonka. W przypadku stożka rogówki w każdej warstwie rogówki można zaobserwować nieprawidłowości. Co więcej, te zmiany są różne w poszczególnych regionach każdej warstwy, co jest najbardziej widoczne w nabłonku rogówki, w postaci ścięcia w miejscu szczytu stożka, otoczonego zgrubieniem.

Uważa się, że rolę w patogenezie KTCN odgrywają liczne zmiany w genach. Jednak na podstawie naszych dotychczasowych badań wnioskujemy, że obraz molekularny choroby jest niepełny i należy go uzupełnić o dodatkowy element – całogenomowe badanie metylomu.

Na aktywność genów wpływa wiele czynników, nie ograniczających się wyłącznie do sekwencji DNA. Metylacja DNA jest jednym z mechanizmów epigenetycznych modelującym ekspresję genów, obejmującym obecność grup metylowych w dinukleotydach CpG poprzez modyfikację pozycji C5 cytozyny w celu utworzenia 5-metylocytozyny poprzez dodanie grupy metylowej. Nieprawidłowe poziomy (wzrosty lub spadki) metylacji DNA nazywane są odpowiednio hipermetylacją lub hipometylacją. Wysokie poziomy metylacji DNA w regionach promotorowych genów są zazwyczaj skorelowane negatywnie z ekspresją genów. W trakcie rozwoju, profil metylacji DNA zmienia się w efekcie procesów metylacji i demetylacji *de novo*. Zatem dojrzałe (zróżnicowane) komórki posiadają unikalny profil metylacji DNA odpowiadający za ekspresję genów specyficzną dla danej tkanki.

W naszych badaniach stawiamy hipotezę, że metylacja DNA działa jak modulator ekspresji genów w poszczególnych warstwach i regionach rogówki w KTCN. Ponieważ zależność pomiędzy metylacją a fenotypem KTCN pozostaje niejasna, szczegółowe badanie trzech obszarów *topograficznych* nabłonka, zrębu i śródbłonka rogówki pozwoli odpowiedzieć na pytania dotyczące wskaźników epigenetycznych KTCN oraz aspektów mechanistycznych w procesie tworzenia stożka.

Celem tego projektu jest znalezienie miejsc o zróżnicowanej metylacji w sekwencji całego genomu oraz wskaźników epigenetycznych KTCN.

Badanie zostanie przeprowadzone na ludzkich rogówkach pobranych od 22 pacjentów z KTCN poddawanych przeszczepowi rogówki oraz 22 rogówkach z banku tkanek, pochodzących od zmarłych osób stanowiących grupę kontrolną. W celu identyfikacji i rozdzielenia warstw oraz regionów *topograficznych* rogówki wykonana zostanie laserowa mikrodysekcja. Ocena metylomu zostanie przeprowadzona z wykorzystaniem metody enzymatycznej i sekwencjonowania całogenomowego. Analizy bioinformatyczne będą prowadzone w kierunku selekcji miejsc o zróżnicowanej metylacji, zwłaszcza tych zlokalizowanych w wyspach CpG, promotorów, UTR i enhancerów. Dodatkowe analizy, integracyjne, obejmą zebrane dane transkryptomyczne (RNA-Seq, transkryptomika przestrzenna), proteomiczne (MALDI-MS), genomiczne (WGS, ES) i inne dane epigenomiczne (ATAC-Seq) pochodzące z tego samego materiału biologicznego. Wyniki zostaną najpierw zweryfikowane z użyciem metody pirosekwencjonowania, a następnie funkcjonalnie za pomocą systemu edycji epigenomu dCas9 CRISPR.

Badanie umożliwi zrozumienie roli metylacji DNA w patogenezie KTCN. Kompleksowy model badania obejmujący multi-omikę, w tym analizy integracyjne, umożliwi identyfikację wskaźników epigenetycznych KTCN.