

## **Rola metylacji DNA w terapii zwiększającej aktywność kanału CFTR w mukowiscydozie**

Mukowiscydoza (CF) jest najczęstszą chorobą autosomalną recesywną, charakteryzującą się mutacjami w genie CFTR (ang. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), które mają poważny wpływ na układ oddechowy, pokarmowy, hormonalny, rozrodczy i kostny. Średnią długość życia polskich pacjentów w 2018 r. obliczono na  $24,5 \pm 8,9$  roku. Wynikało to głównie z niskiego wykorzystania zasobów zdrowotnych, gdyż program lekowy umożliwiający terapię modulatorami CFTR został wdrożony dopiero niedawno, w 2022 roku. Co ciekawe, nasilenie choroby różni się u poszczególnych pacjentów, w szczególności u rodzeństwa i bliźniąt posiadających identyczne mutacje. Geny modyfikujące i inne czynniki mają wpływać na postęp choroby. Podczas gdy genetyczne podłoże mukowiscydozy jest dobrze poznane, mechanizmy molekularne innych czynników przyczyniających się do choroby są nadal nieznane. Hipoteza naukowa tego projektu zakłada, że modyfikacje epigenetyczne, w szczególności metylacja DNA, mogą wyjaśniać zmienność fenotypową w mukowiscydozie, a zmiany w metylacji mogą być odpowiedzialne za różny postęp i ciężkość choroby. Co więcej, leczenie modulatorami CFTR może dodatkowo zmienić wzór metylacji.

Projekt ten ma na celu kompleksowe zbadanie wzorców metylacji w różnych grupach pacjentów z mukowiscydozą (pediatrycznych i dorosłych) oraz zdrowych osób z grupy kontrolnej, aby wyjaśnić czynniki epigenetyczne wpływające na nasilenie choroby, jej progresję i odpowiedź na leczenie. Grupy pacjentów są następujące: (1) pacjenci homozygotyczni dla mutacji F508del przed i po 12-miesięcznym leczeniu modulatorami CFTR (Kalydeco z Symkevi lub Kaftrio) (2) heterozygotyczni dla mutacji F508del (a) przed i po 12-miesięcznym leczeniu modulatorami CFTR (Kalydeco z Symkevi lub Kaftrio) (b) bez leczenia modulatorami CFTR (3) mutacje inne niż F508del bez leczenia modulatorami CFTR. Porównując próbki pobrane od osób zdrowych i pacjentów z różnymi mutacjami, a także przed i po leczeniu modulatorami CFTR, zamierzamy zidentyfikować specyficzne zmiany epigenetyczne związane ze zmiennością fenotypową, postępem choroby i odpowiedzią terapeutyczną, zapewniając wgląd w mechanizmy molekularne leżące u podstaw patogenezy CF.

Planujemy wyizolować DNA z próbek krwi obwodowej od zdrowych osób z grupy kontrolnej i grupy odkrywczej pacjentów pediatrycznych, aby przeprowadzić sekwencjonowanie całego genomu po reakcji z wodorosiarczynem (WGBS). Dane uzyskane z WGBS zostaną zweryfikowane za pomocą pirosekwencjonowania na innym materiale (wymazy z nosogardzieli) w celu potwierdzenia, czy metylacja DNA jest również zmieniana lokalnie w drogach oddechowych. Ponadto planujemy przeanalizować za pomocą pirosekwencjonowania wybrane regiony/geny ze zmienioną metylacją w większej grupie replikacyjnej, składającej się zarówno z dzieci, jak i dorosłych, a także zdrowych osób z grupy kontrolnej. Planujemy również sprawdzić, czy zmiana metylacji wpływa na ekspresję wybranych genów i białek. Na koniec planujemy zbadać wpływ reaktywnych form tlenu i stanu zapalnego na metylację DNA w modelu hodowli komórkowej ludzkiego nabłonka dróg oddechowych, a także czy modulatory CFTR mogą modyfikować przebieg tych procesów.

Nowością tego projektu jest założenie, że metylacja DNA może wyjaśniać zmienność fenotypową w mukowiscydozie, podczas gdy zmiany w metylacji mogą być odpowiedzialne za różny postęp i ciężkość choroby. Zgodnie z naszą wiedzą, wcześniejsze badania nie analizowały, czy leczenie modulatorami CFTR wpływa na wzorce metylacji całego genomu. Ponadto większość badań przeprowadzono na osobach dorosłych, podczas gdy nasza grupa badawcza obejmuje również dzieci, co pozwala na zbadanie wczesnego wpływu choroby i jej leczenia na zmiany metylacji.

Projekt ten odkryje dynamiczne zmiany w metylacji DNA, które są związane z postępem choroby, jej ciężkością i leczeniem u pacjentów z mukowiscydozą. Wczesna diagnoza mukowiscydozy i identyfikacja czynników, które mogą wpływać na jej leczenie (zarówno klinicznych, jak i molekularnych, zwłaszcza markerów epigenetycznych) poprawiłaby wczesną terapię, ułatwiłaby dalszy rozwój spersonalizowanych strategii terapeutycznych i zapobiegałaby lub opóźniała nieodwracalne zmiany w drogach oddechowych, co ma kluczowe znaczenie dla wydłużenia życia pacjentów i poprawy ich jakości życia.