

## **Cel projektu**

Celem projektu jest poszukiwanie genetycznych uwarunkowań schorzeń neurorozwojowych w grupie pacjentów bez zidentyfikowanych wariantów sprawczych po sekwencjonowaniu całoeksomowym (WES).

Projekt oparty jest na założeniu, że analiza ekspresji genów u pacjentów pozwoli na wytypowanie nieprawidłowych szlaków metabolicznych, a tym samym wskazanie genów „kandydatów”. Sekwencje nukleotydowe wytypowanych regionów będą szczegółowo analizowane pod kątem wytypowania rzadkich wariantów w sekwencji niekodującej, których rezultatem jest zmieniona ekspresja genu należącego do danego szlaku.

## **Opis badań**

W projekcie planowana jest analizę 10 niespokrewnionych rodzin z przypadkami chorób neurorozwojowych. U wszystkich zakwalifikowanych do badania osób z objawami choroby neurorozwojowej uprzednio została wykonana analiza WES, na podstawie której nie wytypowano wariantów sprawczych. U pięciu pacjentów wykonano dodatkowo sekwencjonowanie całogenomowe (WGS), które również nie ujawniło istotnych zmian, które mogą zostać uznane jednoznacznie za sprawcze dla choroby.

Pierwszym etapem badań będzie wykonanie sekwencjonowania całogenomowego u pozostałych pięciu zakwalifikowanych pacjentów.

Kolejnym krokiem będzie wykonanie analizy ekspresji genów z wykorzystaniem materiału pozyskanego z fibroblastów pacjentów. W tym celu pobrane zostaną wycinki skóry pacjentów oraz zostanie przeprowadzona hodowla fibroblastów. Z pozyskanych fibroblastów zostanie wyizolowany RNA, następnie przygotowane zostaną biblioteki RNA-seq. Biblioteki RNA-seq zostaną poddane sekwencjonowaniu następnej generacji (do głębokości ok. 50 mln odczytów dla każdej próby).

Dane z sekwencjonowania będą analizowane z wykorzystaniem najnowszych, dostępnych algorytmów bioinformatycznych, tak aby ostatecznie uzyskać pełną informację o ekspresji genów w badanych próbkach. Otrzymane wyniki zostaną porównane z danymi o ekspresji genów w próbce kontrolnej. Wykonana zostanie analiza jakościowa i ilościowa otrzymanych danych, a różnice pomiędzy próbką kontrolną a próbką badaną zostaną zaraportowane i odnotowane. Wytypowane różnice zostaną zweryfikowane w badanych próbkach w danej rodzinie.

Na podstawie wykrytych odmierności w ekspresji genów dla każdego pacjenta zostaną stworzone listy genów związanych z wytypowanymi szlakami metabolicznymi. Sekwencje tych regionów zostaną szczegółowo przeanalizowane z wykorzystaniem danych z WGS, ze szczególnym uwzględnieniem regionów niekodujących. Wytypowane warianty genetyczne zostaną zweryfikowane u wszystkich chorych i zdrowych członków rodziny celem oceny segregacji wytypowanego wariantu z chorobą. Na podstawie wyników analizy segregacji wybrane zostaną warianty skutkujące nieprawidłowościami na poziomie RNA, a tym samym sprawcze dla zaburzeń neurorozwojowych.

## **Powody podjęcia tematyki badawczej**

Występowanie w rodzinie co najmniej dwóch przypadków tej samej choroby mocno sugeruje, że u jej podłoża leżą zaburzenia genetyczne. Dotychczas złotym standardem w poszukiwaniu mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie chorób genetycznych były analizy WES. Wraz z rozwojem technologii, możliwości takiego podejścia powoli się wyczerpują. Jest wiele przypadków bez zidentyfikowanego podłoża genetycznego, zatem przyczyn powstania choroby należy upatrywać w innych regionach genomu niż sekwencje kodujące. Na przestrzeni ostatnich lat, coraz więcej mówi się o istotności sekwencji niekodujących, w szczególności sekwencji regulatorowych, w patogenezie chorób o podłożu genetycznym. W związku z tym, należy poszukiwać metod i narzędzi, które pozwolą eksplorować te regiony i wspomogą interpretację znalezionych w nich zmian. Wynikiem WGS są miliony wariantów odmiennych od sekwencji referencyjnej, których istotność biologiczną niezwykle trudno jest oceniać. Z kolei RNA-seq umożliwia wytypowanie transkryptów, które są nieprawidłowe. Nałożenie wyników obu sekwencjonowań pozwoli zatem na lepszą ocenę i analizę funkcjonalną wariantów wytypowanych przez sekwencjonowanie całogenomowe, a tym samym pozwoli na identyfikację przyczyn rozwoju choroby u pacjenta.

## **Najważniejsze spodziewane efekty**

Najważniejszym spodziewanym efektem projektu jest poszerzenie istniejącego stanu wiedzy o roli sekwencji niekodujących (w tym elementów regulatorowych) w patogenezie chorób neurorozwojowych. Ponadto przewidujemy również uzyskanie nowych informacji o wpływie sekwencji niekodujących na ekspresję genów.