

"Identyfikacja nowych genów i regionów odpowiedzialnych za powstawanie wrodzonych wad kończyn u człowieka"

Aleksander Jamsheer

Stypendysta projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

W ostatnich latach zidentyfikowanych zostało wiele genów oraz sekwencji regulatorowych sterujących rozwojem embrionalnym kończyn, w których mutacje prowadzą do wystąpienia określonego obrazu klinicznego wady. Większość z odkryć była możliwa dzięki badaniom genetycznym rodzinnych i sporadycznych przypadków pacjentów dotkniętych malformacjami kończyn. Pomimo ogromnego postępu wiedzy, nadal znaczący odsetek wrodzonych wad kończyn ma niewyjaśnione podłoże genetyczne.

Celami niniejszej pracy doktorskiej było wdrożenie do diagnostyki genetycznej badań wybranych genów lub *loci*, których mutacje są przyczyną rozwoju wrodzonych wad kończyn, identyfikacja nowych genów/regionów genomowych, w których lokalizują się geny lub elementy regulatorowe odpowiadające za rozwój zarodkowy kończyn oraz poprawa stanu diagnostyki molekularnej i poradnictwa genetycznego w grupie polskich pacjentów z wadami rozwojowymi kończyn.

Badaniami objęto 110 probandów, u których zachodziło bardzo wysokie prawdopodobieństwo genetycznego uwarunkowania wady kończyn (przypadki rodzinne oraz przypadki sporadyczne wad obustronnych). Do badań włączono zarówno probandów z izolowanym, jak i syndromicznym wystąpieniem wady kończyn. Pacjentów oceniano klinicznie, a następnie kwalifikowano na odpowiednie badania molekularne (diagnostyka przesiewowa, polegająca na analizie sekwencji lub liczby kopii regionów/genów, oraz badania porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy - aCGH).

Na potrzeby diagnostyki przesiewowej, opracowano i wdrożono badania genetyczne ok. 20 regionów i genów zaangażowanych w patogenezę kilkudziesięciu zespołów genetycznych z wrodzonymi wadami kończyn. Następnie w toku diagnostyki przesiewowej u 47 probandów (42,7%) potwierdzono w badaniach molekularnych uwarunkowanie genetyczne określonej wady/zespołu wad. U 11 probandów z polidaktylią preaksjalną typu 4

lub cefalopolisyndaktylią Greiga wykryto mutację w genie *GLI3*; u 12 probandów z rozszczepem dłoni i/lub stóp (SHFM) wykryto molekularne podłoże wady, z czego u 6 zidentyfikowano mutację w genie *TP63*, u 3 duplikację w *locus* 10q24.31-10q24.32 (SHFM3), a u 3 kolejnych duplikację w *locus* 17p13.3 (SHFLD). Ponadto u 4 probandów z SPD stwierdzono mutacje w genie *HOXD13*, u 4 z zespołem ODDS/syndaktylią typu III - mutacje w genie *GJA1*, u 4 z zespołem TAR - mikrodelekcje w regionie 1q21.1. U 2 probandów z zespołem Feingolda wykryto mutację w genie *MYCN*, u 2 probandów z zespołem Bardeta-Biedla - mutację w *BBS10*, a u kolejnych 2 z rozpoznaniem zespołu Townesa-Brocksa - mutację w genie *SALL1*. U 5 probandów rozpoznano i potwierdzono izolowaną postać brachydaktylii (u 2 probandów z BDB wykryto mutacje w genie *ROR2*, u 1 z BDC - mutację w *GDF5*, u 1 z BDE - mutację w *HOXD13* i u 1 z BDE - mutację promotorową w *PTHLH*). Dodatkowo u 1 probanda zdiagnozowano kościorost kości nadgarstka i stępu z symfalangizmem, spowodowany mutacją w genie *NOG*. W badaniach przesiewowych wykonano ogółem 227 badań molekularnych (analiza sekwencji i liczby kopii metodą qPCR lub MLPA).

U 63 probandów, u których wykluczono wszystkie znane przyczyny wady wrodzonej kończyn lub zespołu wad wykonano badanie aCGH. U 9 probandów (8,2% kohorty) wykryto znane patogenne warianty genomowe (CNV), z których jedynie 5 powiązanych było uprzednio z wystąpieniem malformacji kończynowych, przy czym w 2 przypadkach zidentyfikowano je u probandów z całkowicie odmienną od typowej manifestacją kliniczną (duplikacja w *locus* SHFM3 u pacjentki z obustronną hipoplazją kości udowych oraz delecja w *locus* TAR u pacjenta z SHFM). U 16 probandów (14,6%) zidentyfikowano nieopisywane dotychczas w piśmiennictwie CNVs, m. in. terminalną duplikację długiego ramienia chromosomu 5 pary o wielkości ok. 5,4 Mb u pacjenta z fenotypem przypominającym zespół Holt-Orama. W przypadku 3 z w/w CNVs wytypowano geny o nieznanej u człowieka funkcji, które mogą być zaangażowane w rozwój zarodkowy kończyn (geny *MEIS1*, *SCMH1*, *SALL3*). Konieczne są dalsze badania funkcjonalne lub podjęcie próby zgromadzenia większej liczby probandów z określonymi fenotypami, aby udowodnić związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy mutacjami w w/w genach a powstaniem wad rozwojowych kończyn.

Metoda aCGH okazała się skutecznym narzędziem w badaniach naukowych, identyfikującym w znaczącym odsetku przypadków pacjentów z syndromicznymi lub izolowanymi wadami kończyn znane patogenne lub całkowicie nowe CNVs. Praca potwierdziła, że wrodzone wady kończyn mogą być spowodowane zmianami o charakterze genomowym, co jest ważne dla planowania diagnostycznych i naukowych badań genetycznych dla pacjentów z tą grupą wad wrodzonych.