



mgr biotech. Joanna Walczak-Sztulpa

***Identyfikacja molekularnego podłoża zespołu Sensenbrenner
(Cranioectodermal dysplasia)***

Rozprawa doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. med. Anna Latos-Bieleńska

Katedra i Zakład Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Opiekun naukowy:

Prof. Hans-Hilger Ropers

Department of Human Molecular Genetics, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin

Miejsce Realizacji:

1. Katedra i Zakład Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
2. Department of Human Molecular Genetics, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin

Poznań 2012

Prof. dr hab. n. med. Annie Latos-Bieleńskiej
za poświęcony czas i nieocenioną pomoc
w realizacji pracy doktorskiej,

Prof. Hansowi-Hilgerowi Ropersowi
za możliwość zdobycia doświadczenia
i możliwość rozwoju naukowego,

składam serdeczne podziękowania.

*Bardzo dziękuję **pracownikom Katedry i Zakładu Genetyki Medycznej** za życzliwość i miłą atmosferę oraz wszystkim **kolegom i koleżankom z Instytutu Maxa Plancka w Berlinie**: Justynie, Barbarze, Luci, Agnes, Andreasowi, Larsowi, a przede wszystkim Lii Moheb Abbassi za wsparcie i niezapomniane chwile, za godziny dyskusji naukowych i nie tylko...*

Nade wszystko dziękuję:

Moim Rodzicom

za nieustanną pomoc i motywację,

Mojemu Mężowi Patrykowi

za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość,

Mojemu Synkowi Mikołajowi

za to, że dał mi siłę

i wszystkim, którzy zawsze mnie wspierali.

Spis treści

1.	WSTĘP	4
1.1.	Wrodzone wady rozwojowe	4
1.2.	Zespół Sensenbrenner – informacje ogólne	5
1.2.1.	Podłoże genetyczne zespołu Sensenbrenner	7
1.3.	Rzęski – informacje ogólne	13
1.3.1.	Budowa rzęsek	14
1.3.2.	Podział rzęsek	15
1.3.3.	Ciliogeneza i mechanizm transportu wewnątrzrzęskowego	16
1.3.4.	Funkcje rzęsek	20
1.3.4.1.	Funkcje rzęsek ruchomych	20
1.3.4.2.	Funkcje rzęsek nieruchomych	22
1.3.4.3.	Występowanie i rola rzęsek w innych komórkach	25
1.4.	Ciliopatie	26
1.5.	Modele zwierzęce chorób człowieka	30
1.5.1.	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) jako model zwierzęcy	30
2.	CELE PRACY	32
3.	PACJENCI I METODY	33
3.1.	Pacjenci	33
3.2.	Metody	36
3.2.1.	Izolacja genomowego DNA	36
3.2.1.1.	Z krwi obwodowej z zastosowaniem kitu FlexiGene DNA	36
3.2.1.2.	Z limfocytów krwi obwodowej metodą wysalania białek	37
3.2.1.3.	Z linii komórkowych (limfocyty)	38
3.2.2.	Izolacja RNA	39
3.2.2.1.	Z linii komórkowych (limfocyty, fibroblasty) z zastosowaniem Trizolu	39
3.2.2.2.	Z krwi obwodowej przy użyciu kitu PAXgene	39
3.2.3.	Ocena ilościowa i jakościowa DNA i RNA	41
3.2.4.	Genotypowanie DNA	41
3.2.5.	Analiza sprzężeń	42
3.2.6.	Projektowanie primerów	42
3.2.7.	Reakcja łańcuchowa polimerazy	42
3.2.8.	Rozdział elektroforetyczny produktów PCR w żelu agarozowym	43
3.2.9.	Oczyszczenie produktów PCR ze składników reakcji z zastosowaniem MiniElute PCR Purification kit	43
3.2.10.	Ekstrakcja produktów PCR z żelu z zastosowaniem MiniElute Gel Extraction kit	44
3.2.11.	Sekwencjonowanie	44
3.2.12.	Analiza wyników sekwencjonowania	45
3.2.13.	Synteza cDNA	46
3.2.14.	RT-PCR	47

3.2.15.	Real-time PCR	48
3.2.16.	Hodowla komórkowa fibroblastów skóry.....	50
3.2.17.	Analiza ilości i długości rzęsek w fibroblastach skóry.....	52
3.2.18.	Ocena przebiegu cyklu komórkowego i morfologii fibroblastów skóry	53
3.2.19.	Knockdown genu <i>ift122</i> w modelu zwierzęcym <i>Danio rerio</i>	53
3.2.20.	Analiza profilu ekspresji całego genomu	54
3.2.21.	Analiza <i>in silico</i>	56
3.2.21.1.	PCR <i>in silico</i>	56
3.2.21.2.	Analiza zmian typu <i>missens</i> zidentyfikowanych w genie <i>IFT122</i>	56
3.2.21.3.	Analiza zmian w sekwencji intronowej.....	58
3.2.21.4.	Analiza m-fold DNA.....	58
3.2.21.5.	Analiza DAVID	59
4.	WYNIKI	60
4.1.	Analiza sprzężeń.....	60
4.2.	Analiza genów kandydujących.....	62
4.3.	Analiza genu <i>IFT122</i>	63
4.3.1.	Rodzina CED-01	63
4.3.2.	Rodzina CED-02	70
4.3.3.	Rodzina CED-03	73
4.3.4.	Lokalizacja zmian zidentyfikowanych w genie <i>IFT122</i>	76
4.3.5.	Polimorfizmy zidentyfikowane w genie <i>IFT122</i>	78
4.4.	Ustalenie ojcostwa w rodzinie CED-03.....	79
4.5.	RT-PCR	80
4.6.	Real-time PCR	86
4.7.	Analiza ilości i długości rzęsek w fibroblastach skóry.....	89
4.8.	Knockdown genu <i>ift122</i> w modelu zwierzęcym <i>Danio rerio</i>	91
4.9.	Analiza <i>in silico</i>	95
4.9.1.	PCR <i>in silico</i>	95
4.9.2.	Analiza zmian <i>missens</i>	95
4.9.3.	Ocena zmian w sekwencji intronowej	101
4.9.4.	Analiza m-fold DNA.....	103
4.10.	Analiza profilu ekspresji całego genomu z wykorzystaniem programu DAVID	106
4.11.	Ocena przebiegu cyklu komórkowego i morfologii fibroblastów skóry	109
4.12.	Analiza genów kandydujących <i>IFT139</i> , <i>DYNC2H1</i> oraz <i>IFT88</i>	114
5.	PODSUMOWANIE	115
6.	DYSKUSJA	116
6.1.	Identyfikacja molekularnego podłoża zespołu Sensenbrenner	116
6.2.	Polimorfizmy zidentyfikowane w genie <i>IFT122</i> w grupie pacjentów z zespołem Sensenbrenner	118

6.3.	Ocena patogenności zmian zidentyfikowanych w genie <i>IFT122</i>	118
6.4.	Ustalenie ojcostwa i heterozygota złożona w rodzinie CED-03	121
6.5.	Fenotyp rzęskowy u pacjenta CED-01/2	123
6.6.	Model myszy genu <i>Ift122</i>	123
6.7.	Model <i>Danio rerio</i> genu <i>ift122</i>	125
6.8.	Analiza bioinformatyczna DAVID	125
6.9.	Analiza cyklu komórkowego	126
6.10.	Analiza genów kandydujących spoza <i>locus</i> dla CED	127
6.11.	Heterogenność zespołu Sensenbrenner	129
6.12.	Pleiotropowy charakter zespołu Sensenbrenner i innych ciliopatii	130
6.13.	Korelacja genotyp-fenotyp w zespole Sensenbrenner i innych ciliopatiach	134
6.14.	Analiza pozostałych genów odpowiedzialnych za zespół Sensenbrenner	137
6.15.	Terapia chorób rzęskowych	138
7.	WNIOSKI	139
8.	STRESZCZENIE	140
9.	ABSTRACT	141
10.	ODCZYNNIKI I BUFORY	142
10.1.	Odczynniki	142
10.2.	Enzymy	143
10.3.	Bufory i media	143
10.4.	Zestawy i markery.....	144
10.5.	Materiały jednorazowego użytku	145
10.6.	Programy komputerowe i bazy danych	145
11.	WYKAZ STOSOWANEJ APARATURY	146
12.	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	147
13.	SPIS RYCIN	148
14.	SPIS TABEL	150
15.	BIBLIOGRAFIA	151
16.	ZAŁĄCZNIKI	158
16.1.	Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań	158
16.2.	Sekwencje primerów wykorzystanych do analizy genów (<i>IFT122</i> , <i>IFT88</i> , <i>IFT139</i> , <i>DYNC2H1</i>)	161
16.3.	Polimorfizmy zidentyfikowane w genach <i>IFT88</i> , <i>IFT139</i> , <i>DYNC2H1</i>	168
17.	Curriculum Vitae	171
18.	SPIS PUBLIKACJI	173

1. WSTĘP

1.1. Wrodzone wady rozwojowe

Wrodzone wady rozwojowe występują ogółem u około 2 do 4% noworodków i są najczęstszą przyczyną zgonów noworodków i niemowląt jak i również niepełnosprawności fizycznej i intelektualnej w okresie późniejszym. Wady wrodzone są także częstą przyczyną obumarcia zarodka lub płodu i odpowiadają za znaczący odsetek niepowodzeń rozrodu. Ze względu na stosunkowo dużą częstość występowania stanowią istotny problem medyczny, ekonomiczny i społeczny.^{1,2}

Za etiologię wrodzonych wad rozwojowych odpowiedzialne są czynniki genetyczne tj. aberracje chromosomowe, mikrorearanżacje genomowe, mutacje pojedynczych genów lub kilku genów oraz czynniki środowiskowe. Wśród czynników środowiskowych wyróżnia się czynniki biologiczne (np. wirus opryszczki), chemiczne (np. niektóre leki), fizyczne (np. promieniowanie) oraz czynniki mechaniczne (np. wczesna amiopunkcja). Wystąpienie wad wrodzonych może być również uwarunkowane wieloczynnikowo. Etiologia aż 40-50% poważnych wad rozwojowych pozostaje nieznana. W powstaniu wad wrodzonych o poznanej etiologii czynniki genetyczne odgrywają istotną rolę. Wady dzielimy na izolowane tzw. pojedyncze oraz na mnogie, charakteryzujące się współwystąpieniem dwóch lub więcej wad. Ponadto wyróżniamy wady duże upośledzające funkcjonowanie organizmu oraz wady małe, które nie mają poważnych następstw klinicznych. Wady dzielimy również na wady sporadyczne, które wystąpiły po raz pierwszy w rodzinie o nieobciążonym dotychczas wywiadzie i wady rodzinne, które występują u przynajmniej dwóch bliskich krewnych danej rodziny. Natomiast ze względu na rodzaj mechanizmu patogenetycznego wady dzielimy na: deformacje (powstające w wyniku działania czynników mechanicznych na proces rozwojowy np. stopy końsko-szpotawe), malformacje (powstające w wyniku działania czynników wewnętrznych na proces rozwojowy np. rozszczep wargi i podniebienia), dysrupcje (powstające w wyniku działania czynników zewnętrznych na pierwotnie prawidłowy proces rozwojowy np. zespół pasm owodniowych), dysplazje (powstające w wyniku nieprawidłowego różnicowania się komórek w tkanki np. dysplazje kostne, dysplazje ektodermalne).³ Najczęściej występującymi wadami wrodzonymi są wady serca oraz wady kończyn. Ze względu na duży udział czynników genetycznych w występowaniu wrodzonych wad rozwojowych istotną rolę odgrywa poznanie ich podłoża genetycznego. Obecny postęp biologii molekularnej pozwolił na identyfikację nowych genów odpowiedzialnych za wystąpienie wielu rzadkich zespołów wad wrodzonych. Identyfikacja podłoża genetycznego rzadkich chorób jest niezwykle ważna,

ponieważ pozwala na udzielenie właściwej porady genetycznej i określenie ryzyka wystąpienia choroby w rodzinie. Umożliwia również poznanie funkcji i roli genów oraz białek będących produktem ich ekspresji, pozwala także na określenie korelacji pomiędzy funkcją danego białka, a fenotypem obserwowanym u pacjentów. Zrozumienie funkcji poszczególnych genów i ich interakcji ma niewątpliwie ogromne znaczenie dla stworzenia w przyszłości terapii genowej.

1.2. Zespół Sensenbrenner – informacje ogólne

Zespół Sensenbrenner (OMIM 218330, OMIM 613610, OMIM 614099, OMIM 6134378) znany również jako Cranioectodermal dysplasia (CED) oraz jako zespół Levin I, po raz pierwszy został opisany w 1975 roku przez Judith A. Sensenbrenner. CED jest bardzo rzadkim zespołem wad wrodzonych (częstość występowania $< 1 / 1000\ 000$ urodzeń). Obecnie w piśmiennictwie opisano ponad 30 pacjentów z tym zespołem. Większość z nich to przypadki sporadyczne, opisano również kilka przypadków rodzinnych. Występowanie chorego rodzeństwa zarówno płci męskiej jak i płci żeńskiej w jednej rodzinie wskazywało na autosomalny recesywny sposób dziedziczenia choroby. Dotychczas podłoże molekularne zespołu Sensenbrenner było nieznane.

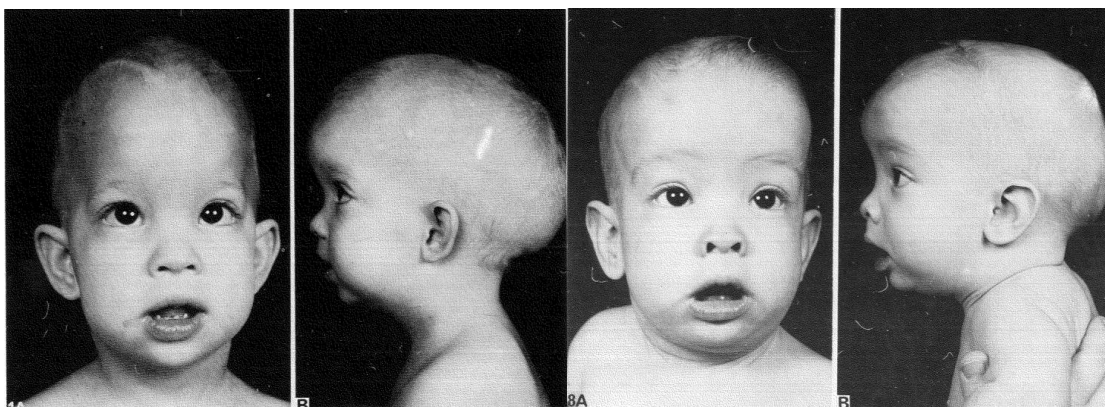
Zespół Sensenbrenner charakteryzuje się nieprawidłowościami w budowie i strukturze twarzoczaszki, układu kostnego oraz skóry. Typowymi cechami tego zespołu są: niski wzrost, skrócenie kończyn, krótka i wąska klatka piersiowa, brachydaktylia, dolichocefalia, kraniosynostoza, tubulopatia nerkowa prowadząca do niewydolności nerek oraz zmiany ektodermalne tj. rzadko i wolno rosnące włosy, cienkie płytki paznokciowe, małe i szeroko rozstawione zęby. Rozwój intelektualny osób z CED jest prawidłowy.⁴⁻²¹

Cechy kliniczne zespołu Sensenbrenner (OMIM 218330):

- autosomalny recesywny sposób dziedziczenia,
- wąska klatka piersiowa,
- szewska klatka piersiowa,
- krótkie żebra,
- krótkie kości ramieniowe,
- krótkie kości strzałkowe,
- skrócenie bliższych części kończyn (głównie rąk),
- brachydaktylia,
- krótkie i szerokie palce dłoni i stóp,
- klinodaktylia,
- pojedyncza bruzda poprzeczna dłoni,
- zwiększona ruchomość w stawach,

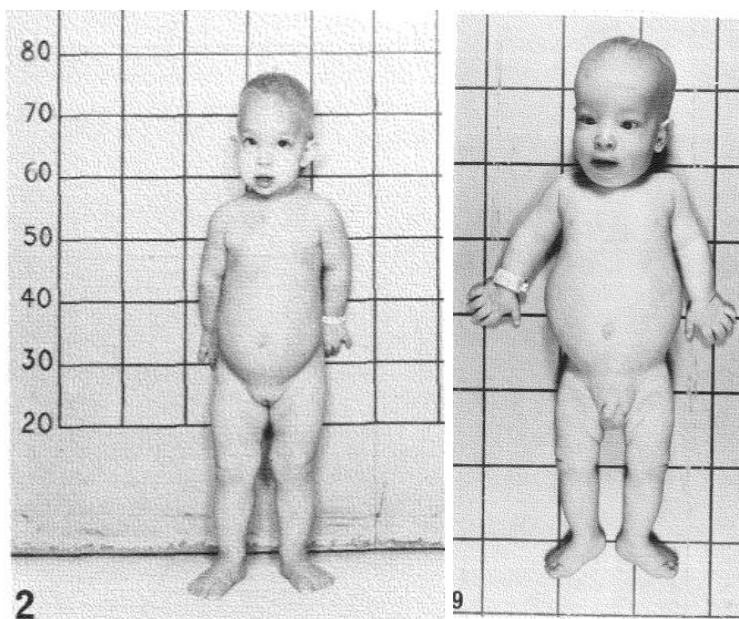
- osteoporoza,
- długogłowie, łódkogłowie,
- kraniosynostoza,
- wystające czoło,
- wystająca potylica,
- pełne policzki,
- telekantus,
- hipoteloryzm,
- zmarszczka nakątna,
- szeroka nasada nosa,
- przodopochylone nozdrza,
- wywinięta dolna warga,
- gotyckie podniebienie,
- wystający brzuch,
- dwupłatkowa zastawka aorty,
- hepatomegalia/niewydolność wątroby/zwłóknienie wątroby/torbiele wątroby,
- postępująca niewydolność nerek/zapalenie nerek,
- cienkie i krótkie paznokcie,
- hypodontia lub/i microdontia,
- niewłaściwe ustawienie zębów,
- dysplazja szkliwa,
- rzadkie i wolno rosnące włosy,
- prawidłowy rozwój intelektualny,
- w badaniach laboratoryjnych obniżony poziom wapnia we krwi.

Obraz kliniczny pacjentów z zespołem Sensenbrenner przedstawiono na rycinach (Rycina 1-3).



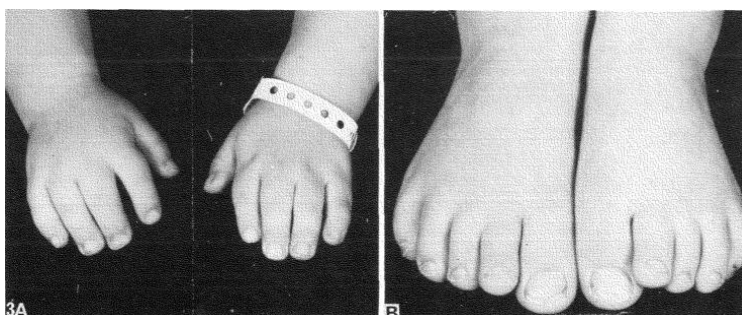
Rycina 1.

Cechy kliniczne zespołu Sensenbrenner. Lewy panel: sześćioletnia dziewczynka z zespołem Sensenbrenner. Prawy panel: czteroletni chłopiec z zespołem Sensenbrenner. Obraz kliniczny typowy dla zespołu: dolichocefalia, wystające czoło, zmarszczka nakątna, wywinięta dolna warga, pełne policzki, dysplazja dotycząca włosów i zębów.⁴



Rycina 2.

Pacjenci z zespołem Sensenbrenner. Charakterystyczne skrócenie proksymalnych części kończyn (rizomelia), mała klatka piersiowa.⁴



Rycina 3.

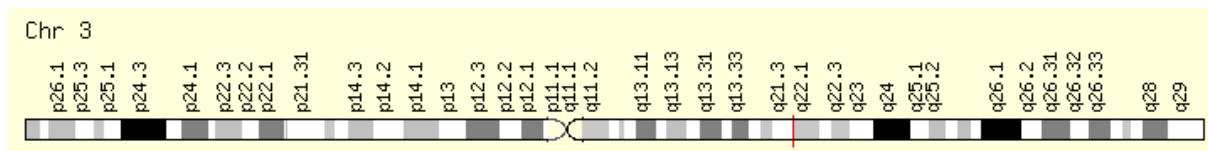
Zmiany w obrębie dłoni i stóp w zespole CED. Krótkie dłonie i stopy, szerokie paznokcie.⁴

1.2.1. Podłoże genetyczne zespołu Sensenbrenner

Do 2010 roku podłoże genetyczne zespołu Sensenbrenner nie było znane. Obecnie zidentyfikowano cztery geny, których mutacje odpowiedzialne są za wystąpienie CED: *IFT122*, *IFT121*, *IFT144* oraz *IFT43*. Wszystkie kodują białka IFT (*ang. intraflagellar transport*) należące do kompleksu A uczestniczącego w retrogradowym transporcie wewnątrzrzęskowym.²²⁻²⁷

CED1 - gen *IFT122*(*WDR10*)

Gen *IFT122* (Intraflagellar transport 122, *WDR10*) zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 3 w regionie 3q21. Lokalizację genu *IFT122* przedstawiono na rycinie (**Rycina 4**).



Rycina 4.

Lokalizacja genu *IFT122* na chromosomie 3. Źródło GeneCards.

DNA genu *IFT122* obejmuje 80,231 bp. Gen ten posiada 4 alternatywne transkrypty. Izoforma 1 zbudowana z 31 eksonów, a produktem ekspresji jest białko zbudowane z 1292 aminokwasów o masie 147,4 kDa. Izoforma 2 zawiera 30 eksonów, a produktem ekspresji jest białko o masie 141,8 kDa zbudowane z 1241 aminokwasów. Izoforma 3 i 4 zbudowane są odpowiednio 29 i 27 eksonów. Produktem ekspresji transkryptu 3 i transkryptu 4 jest białko zbudowane z 1182 aminokwasów o masie 134,9 kDa i białko zawierające 1131 aminokwasów o masie 129,4 kDa. Izoforma 1 *IFT122* posiada siedem domen WD40. Domeny WD40 zbudowane są z 40 aminokwasów i zakończone dwupeptydem Trp-Asp (W-D). Domeny WD40 pełnią ważną rolę w interakcji białka-białko i mogą tworzyć tzw. platformy dla kompleksów białkowych. Produkt ekspresji genu *IFT122* na przykładzie izoformy 1 przedstawiono na rycinie (**Rycina 5**).



Legenda:



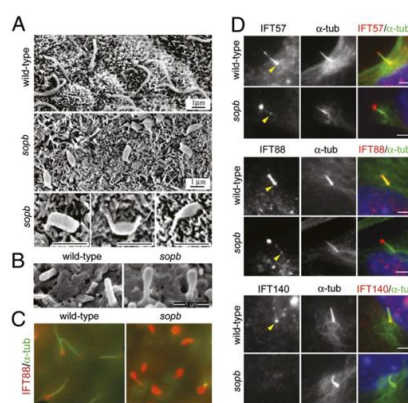
Rycina 5.

Produkt ekspresji genu *IFT122* na przykładzie izoformy 1. Rozmieszczenie oraz wielkość poszczególnych domen, zlokalizowanych kolejno w pozycji: domena WD40 1 – 39 aa, 42 – 108 aa, 110 – 156 aa, 158 – 197 aa, 199 – 238 aa, 396 – 431 aa. Źródło HPRD (Human Protein Reference Database).

Analiza przeprowadzona na fibroblastach skóry pacjenta z zespołem Sensenbrenner, u którego zidentyfikowano mutację w obrębie genu *IFT122* wykazała zmniejszoną ilość i długość rzęsek w porównaniu do kontroli.²²

Badania przeprowadzone na modelu *Tetrahymena thermophila* wykazały, iż knockout genu *IFT122A* nie zaburza w istotny sposób syntezy rzęsek, natomiast powoduje akumulację białek IFT (*Ift88p*, *Ift172p*) na końcu rzęski. Struktury rzęsek w tym modelu są obecne, natomiast występują one w zmniejszonej ilości w porównaniu do komórek typu dzikiego. Świadczy to o tym, iż *IFT122A* jest zaangażowany w retrogradowy transport odbywający się wewnątrz rzęsek.²⁸

Knockout genu *Ift122* u myszy (nazywany *sopb* - sister of open brain) w układzie homozygotycznym jest letalny około 13.5 dnia rozwoju embrionalnego. Fenotyp obserwowany w tym modelu to m.in. wady cewy nerwowej, rozszczep kręgosłupa, przerost łuków skrzelowych, niedorozwinięte oczy oraz polidaktylia przedosiowa. Ponadto mutanty *Ift122* wykazują zaburzenia w tworzeniu prawidłowej symetrii ciała. Struktury rzęsek są obecne, natomiast występują w zmniejszonej ilości w porównaniu do typu dzikiego. Analiza rzęsek przeprowadzona na embrjonalnych fibroblastach (MEFs mouse embryonic fibroblasts) wykazała, że na końcach rzęsek dochodzi do akumulacji białek *Ift88* oraz *Ift57* (należących do kompleksu B transportu IFT) oraz czynników transkrypcyjnych *Gli2* oraz *Gli3*. Zaobserwowano również brak białka *Ift140* należącego do kompleksu A transportu IFT. Akumulację białka *Ift88* na końcach rzęsek zidentyfikowano również w obrębie rzęsek znajdujących się w węźle zarodkowym. Badania te potwierdzają, iż *IFT122* pełni ważną rolę w retrogradowym transporcie z wewnątrzrzęskowym.²⁹ Zmiany w obrębie rzęsek w modelu mysim *Ift122* przedstawiono na rycinie (Rycina 6).

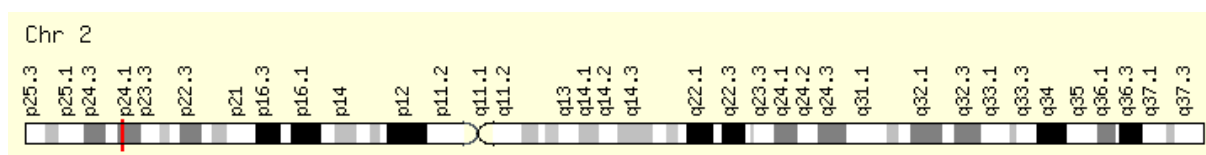


Rycina 6.

Zmiany rzęskowe w modelu mysim genu *Ift122*. A. Rzęski w węźle zarodkowym. Wild-type – typ dziki, *sopb* – mutant; skrócenie struktur rzęsek i akumulacja białek wzdłuż i na końcach rzęsek w porównaniu do typu dzikiego. B. Rzęski w neuroepitelium w 10.5 dnia rozwoju embrionalnego. C. Widoczna akumulacja białka *ift88* w obrębie rzęsek węzła zarodkowego u *sopb* w porównaniu do typu dzikiego. D. Lokalizacja białek kompleksu B IFT (*Ift88*, *Ift57*) oraz kompleksu A (*Ift140*) w mysich embrjonalnych fibroblastach. Skala: A-C 1 μ m i D 2 μ m.²⁹

CED2 - gen *IFT121*(*WDR35*)

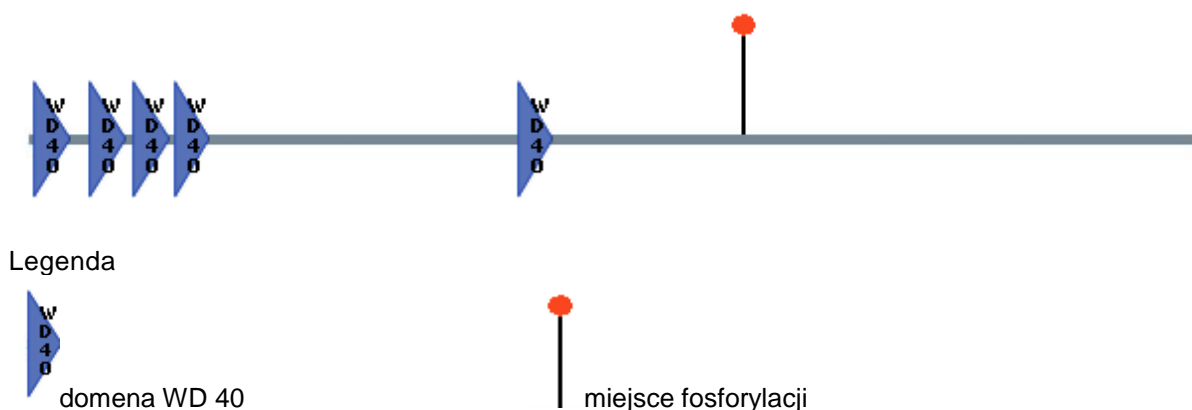
Gen *IFT121* (Intraflagellar transport 121) zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 2 w pozycji 2p24.1. Lokalizację genu przedstawiono na rycinie (**Rycina 7**).



Rycina 7.

Lokalizacja genu *IFT121* na chromosomie 2. Źródło GeneCards.

DNA genu *IFT121* obejmuje 79,872 bp. Gen ten posiada 2 alternatywne transkrypty. Izoforma 1 posiada 28 eksonów, a produktem jej ekspresji jest białko o masie 133,5 kDa zbudowane z 1181 aminokwasów. Natomiast izoforma 2 zbudowana jest 27 eksonów, a produktem jej ekspresji jest białko zawierające 1170 aminokwasów o masie 132,3 kDa. Produkt ekspresji genu na przykładzie izoformy 1, która zawiera pięć domen WD40 i jedno miejsce fosforylacji przedstawiono na rycinie (**Rycina 8**).



Rycina 8.

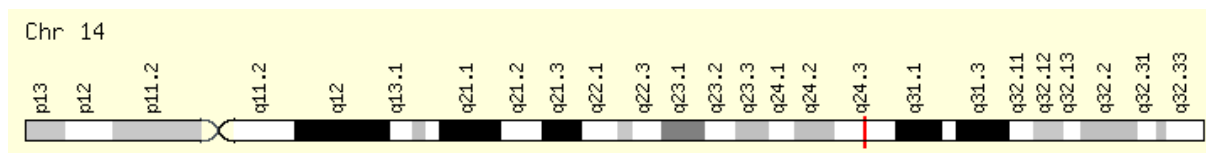
Produkt ekspresji genu *IFT121* na przykładzie izoformy 1. Rozmieszczenie oraz wielkość poszczególnych domen, zlokalizowanych kolejno, w pozycji: domena WD40 4 – 42 aa, 60 – 99 aa, 104 – 143 aa, 147 – 184 aa, 482 – 519 aa oraz jedno miejsce fosforylacji. Źródło HPRD.

Mutacje w obrębie genu *IFT121* zidentyfikowano również u pacjentów z zespołem krótkie żebro-polidaktylia typu V (SRP, ang. Short rib polydactyly type V).²⁵

Knockout genu *Wdr35* u myszy (nazywany *yeti*) jest letalny około 12.5 dnia po zapłodnieniu. W modelu obserwowano m.in. polisindaktylię, hypoplastyczne płuca, obrzęk serca. Knockout *Wdr35* charakteryzuje się cechami typowymi dla defektów szlaku przekąźnikowego Hedgehog, pełniącego istotną rolę w procesie embriogenezy. Endogenny *WDR35* zlokalizowany jest w rzęskach oraz centrosomach. Analiza przeprowadzona na fibroblastach mysich i ludzkich wykazała, iż brak białka *WDR35* powoduje brak struktur rzęsek w tych komórkach.²⁵

CED3 - gen *IFT43*(*C14ORF179*)

Gen *IFT43* (Intraflagellar transport 43) zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 14 w pozycji 14q24.3. Lokalizację genu przedstawiono na rycinie **(Rycina 9)**.

**Rycina 9.**

Lokalizacja genu *IFT143* na chromosomie 14. Źródło GeneCards.

Gen *IFT43* posiada dwa alternatywne transkrypty 1 i 2 zbudowane odpowiednio z 8 i 9 eksonów. Produktem transkryptu 1 jest białko o masie 239,2 kDa składające się z 213 aminokwasów. Natomiast produkt ekspresji transkryptu 2 to białko o masie 235,3 kDa zbudowane z 208 aminokwasów. Produkt ekspresji genu *IFT43* na przykładzie izoformy 1 przedstawiono na rycinie **(Rycina 10)**.

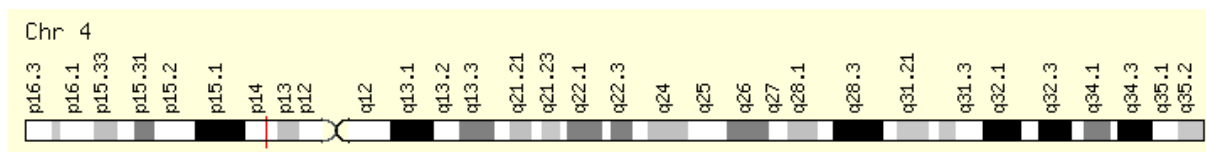
**Rycina 10.**

Produkt ekspresji genu *IFT43* na przykładzie izoformy 1. Źródło HPRD.

Analiza przeprowadzona na fibroblastach pacjenta z zespołem Sensenbrenner wykazała akumulację białek (IFT88, IFT57) należących do kompleksu B transportu wewnątrzrzęskowego, co potwierdza ważną rolę białka IFT43 w transporcie retrogradowym.²⁴

CED4 - gen *IFT144*(*WDR19*)

Gen *IFT144* (Intraflagellar transport 144) zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 4, w pozycji 4p14. Lokalizację genu przedstawiono na rycinie **(Rycina 11)**.

**Rycina 11.**

Lokalizacja genu *IFT143* na chromosomie 4. Źródło GeneCards.

IFT144 zbudowany jest z 37 eksonów. Produktem ekspresji jego jest białko o masie 15,2 kDa zawierające 1342 aminokwasy. Izofорма 1 posiada sześć domen WD40 oraz dwie domeny przez błonowe TM (ang. *transmembrane domain*). Produkt ekspresji genu *IFT144* na przykładzie izoformy 1 przedstawiono na rycinie (**Rycina 12**).



Legenda



domena WD 40



domena TM

Rycina 12.

Produkt ekspresji genu *IFT144* na przykładzie izoformy 1. Rozmieszczenie oraz wielkość poszczególnych domen, zlokalizowanych kolejno, w pozycji: domena WD 8 – 42 aa, 48 – 83 aa, 91 – 125 aa, 131 – 166 aa, 267 – 301 aa, 312 – 346 aa; domena TM 201 – 221 aa, 350 – 372 aa. Źródło HPRD.

Analiza struktur rzęsek przeprowadzona na fibroblastach pacjenta z zespołem Sensenbrenner wykazała zmniejszoną ilość i długość rzęsek w porównaniu do kontroli. Mutacje w obrębie genu *IFT144* zidentyfikowano również u pacjenta z zespołem Jeune oraz u pacjentów nefronoftyzą.²⁶

Mutacje zidentyfikowane u pacjentów z zespołem Sensenbrenner

Geny, których mutacje zidentyfikowano u pacjentów z zespołem Sensenbrenner (*IFT122*, *IFT121*, *IFT43*, *IFT144*) należą do kompleksu A uczestniczącego w retrogradowym transporcie wewnątrzrzęskowym. Większość zidentyfikowanych zmian to mutacje typu *missens* lub mutacje *missens* w kombinacji z mutacją typu *nonsens*, zmiany ramki odczytu lub mutacją splicingową.²²⁻²⁷ Mutacje zidentyfikowane u pacjentów z zespołem Sensenbrenner przedstawiono w tabeli (**Tabela 1**).

Tabela 1. Mutacje zidentyfikowane u pacjentów z zespołem Sensenbrenner.

Gen	Mutacja	Lokalizacja	Piśmiennictwo
IFT122 (WDR10)	p.H143VfsX4 + p.W7C (heterozygota złożona) p.S373F p.V553G	intron 6 + ekson 1 ekson 11 ekson 15	<i>Walczak-Sztulpa et al. (2010)</i>
IFT121 (WDR35)	p.I9TfsX7 + p.E626G (heterozygota złożona) p.S168R + p.L641X (heterozygota złożona) p.A875T + p.P964LfsX15 (heterozygota złożona) p.L520P p.Y971C	intron 2 + ekson 17 ekson 6 + ekson 18 ekson 23 + ekson 25 ekson16 ekson 25	<i>Gilissen et al. (2011)</i> <i>Hoffer et al. (2012)</i> <i>Gilissen et al. (2011)</i> <i>Bacino et al. (2012)</i> <i>Hoffer et al. (2012)</i>
IFT43 (C14ORF179)	p.M1_V21del	ekson 1	<i>Arts et al. (2011)</i>
IFT144 (WDR19)	p.L710S + p.R1103X (heterozygota złożona)	ekson 18 + ekson 20	<i>Bredrup et al. (2011)</i>

1.3. Rzęski – informacje ogólne

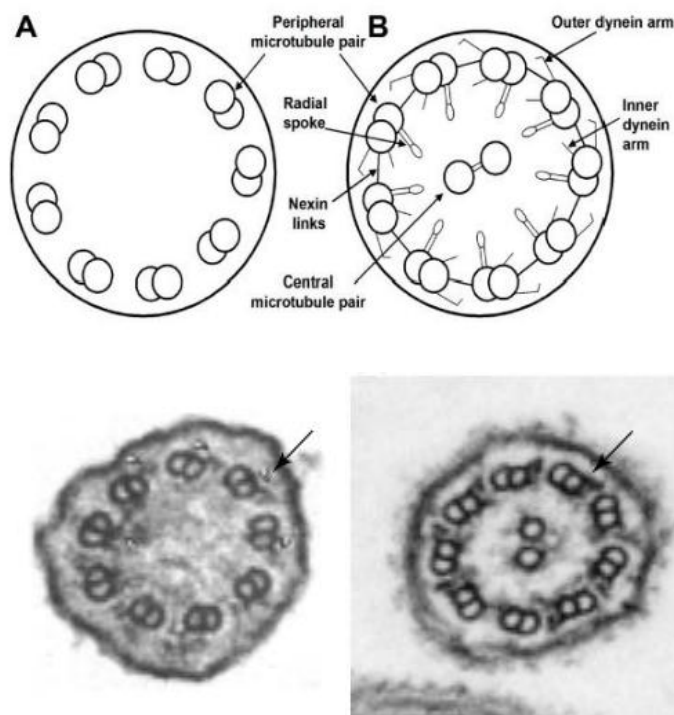
Rzęski (łac. *cilia*) to ewolucyjnie wysoce konserwatywne organelle komórkowe, które występują u większości organizmów eukariotycznych. Wyjątek stanowią rośliny wyższe oraz grzyby. U kręgowców wystają one ze szczytowej powierzchni prawie wszystkich typów komórek, natomiast u bezkręgowców ich obecność ograniczona jest jedynie do komórek nerwowych. Wysoka konserwatywność sekwencji, składu białkowego i ich struktury oraz funkcji sugeruje, iż rzęski powstały w początkowym okresie ewolucji komórek eukariotycznych. Istnieje kilka hipotez wyjaśniających pochodzenie rzęsek. Jedna mówi, iż rzęski pochodzą od bakteryjnych endosymbiontów. Druga hipoteza to tzw. model autogeniczny powstania centrioli oraz struktur rzęsek wewnątrz ewoluującej eukariotycznej cytoplazmy, z kolei trzecia hipoteza mówi, iż rzęski powstały na skutek dalszej specjalizacji cytoszkieletu. Znaczna część wiedzy dotycząca biologii rzęsek kręgowców pochodzi z badań nad organizmami modelowymi tj. *Chlamydomonas*

reinhardtii oraz *Caenorhabditis elegans*. W zrozumieniu procesu powstawania rzęsek oraz ich prawidłowego funkcjonowania, a także w poznaniu funkcji wielu genów rzęskowych w ostatnich latach ogromne znaczenie zyskały modele *Mus Musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* oraz *Danio rerio*.³⁰⁻³³

1.3.1. Budowa rzęsek

W 1835 roku Purkinje i Valentin opublikowali pierwszą pracę naukową dotyczącą badań nad rzęskami ssaków. Dzięki odkryciu mikroskopu elektronowego w 1954 roku Fawcett i Porter scharakteryzowali ich strukturę.³⁴

Rzęski otoczone są błoną komórkową. Szkielet rzęski tzw. aksonema położona jest w środkowej części i posiada 9 par mikrotubul A i B zbudowanych odpowiednio z 13 i 11 protofilamentów. W środku walca znajdują się 2 mikrotubule połączone mostkiem łączącym oraz otoczone osłonką centralną. Daje to charakterystyczny układ mikrotubul w aksonemie (9+2). Obwodowe pary mikrotubul połączone są ze sobą białkiem neksyną. Na mikrotubuli A znajdują się zewnętrzne i wewnętrzne ramiona dyneinowe, które są niezbędne do generowania siły motorycznej. Od par mikrotubul, odchodzą promieniście ku środkowi białkowe struktury tzw. szprychy utrzymujące pary mikrotubul w odpowiedniej pozycji i kontrolujące kierunek ruchu rzęsek. Aksonema zagłębia się do cytoplazmy i łączy się z ciałkiem podstawowym, będącym zmodyfikowaną centriolą. W miejscu połączenia nazywanym strefą przejściową do par mikrotubul dodawana jest jeszcze jedna mikrotubula tworząc tzw. triplety mikrotubul. W strefie tej występują także włókna przejściowe, łączące pary mikrotubul z błoną komórkową, zwaną w tym miejscu pierścieniem rzęskowym. W 1956 roku De Robertis i w 1957 roku Porter odkryli, iż rzęski w niektórych typach komórek pozbawione są pary centralnej mikrotubul (9+0) i ramion dyneiny oraz nie posiadają zdolności ruchu.³⁴⁻³⁷ Strukturę rzęsek przedstawiono na rycinie **(Rycina 13)**.



Rycina 13.

Struktura rzęsek. A. struktura rzęski (9+0) B. struktura rzęski (9+2)
 Peripheral microtubule pair – zewnętrzna para mikrotubul, central microtubule pair – centralna para mikrotubul, outer dynein arm – zewnętrzne ramię dyneinowe, inner dynein arm – wewnętrzne ramię dyneinowe, nexin links – połączenia neksynowe, radial spoke – szprycha.³⁶⁻³⁷

Większość typów komórek ludzkich posiada jedną rzęskę (*ang. primary cilium*). Znane są również komórki wysoce urzęsione, które zawierają nawet 200-300 rzęsek, np. nabłonek wyściełający jajowód, czy tchawicę. Na proteom rzęskowy składa się ponad 1000 różnych białek.³⁸

1.3.2. Podział rzęsek

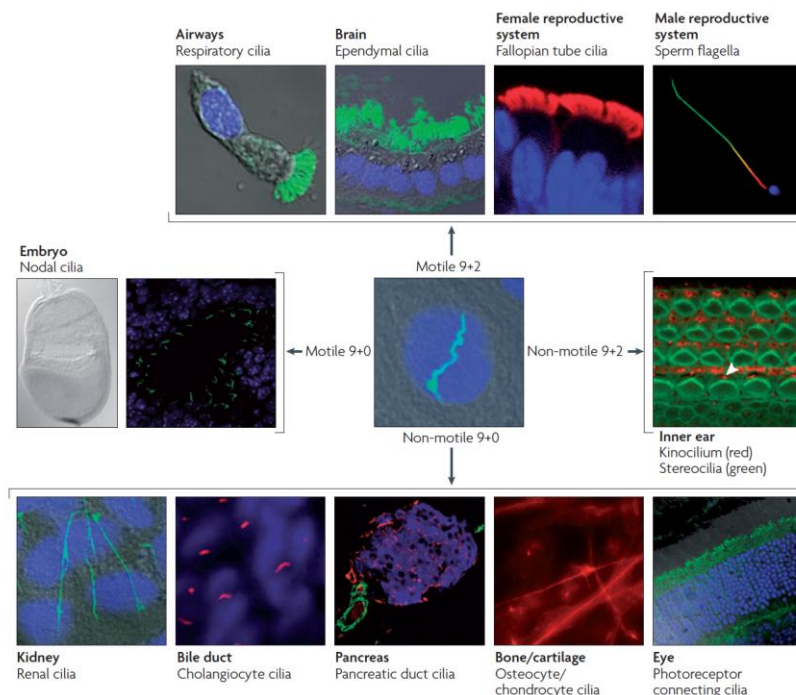
Rzęski ruchome

- (9+2) - np. rzęski na powierzchni komórek nabłonka dróg oddechowych, jajowodu, ependymocytów,
- (9+0) - np. rzęski występujące na powierzchni komórek wężła zarodkowego.

Rzęski nieruchome

- (9+0) - np. rzęski występujące na powierzchni komórek nerek, wątroby, trzustki, kości, siatkówki oka,
- (9+2) - np. stereocilium, kinocilia występujące uchu wewnętrznym.

Występowanie rzęsek ruchomych i nieruchomych w różnych komórkach przedstawiono na rycinie (**Rycina 14**).



Rycina 14.

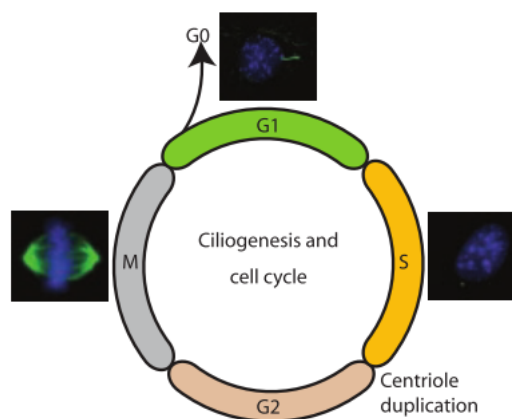
Występowanie rzęsek ruchomych i nieruchomych w różnych tkankach.

Airways (respiratory cilia) - drogi oddechowe (rzęski na powierzchni komórek nabłonka dróg oddechowych), brain (ependymal cilia) - mózg (rzęski na powierzchni ependymocytów), female reproductive system (fallopian tube cilia) - żeński układ rozrodczy (rzęski występujące w nabłonku jajowodu), male reproductive system (sperm flagella) - męski układ rozrodczy (wić plemnika), embryo (nodal cilia) - embrion (rzęski występujące na powierzchni komórek węzła zarodkowego), inner ear (kinocilium, stereocilia) - ucho wewnętrzne (kinocilium, stereocilia), kidney (renal cilia) - nerki (rzęski występujące w tubulach nerkowych), bile duct (cholangiocyte cilia) - przewod żółciowy (rzęski na powierzchni cholangiocytów), pancreas (pancreatic duct cilia) - trzustka (rzęski w przewodach trzustkowych), bone/cartilage (osteocyte/chondrocyte cilia) - kość/chrzątka (rzęski na powierzchni osteocytów/chondrocytów), eye (photoreceptor connecting cilia) - oko (rzęski łączące występujące w obrębie fotoreceptorów).³⁹

1.3.3. Ciliogeneza i mechanizm transportu wewnątrzrzęskowego

W komórkach, na powierzchni których stwierdzono obecność pojedynczej rzęski, proces ciliogenezy jest ściśle powiązany z cyklem komórkowym. Formowanie rzęski odbywa się w interfazie i rozpoczyna się wtedy, kiedy centrosom migruje do apikalnej części komórki, a matczyna centriola zakotwicza się w błonie komórkowej, tworząc ciało podstawowe. Inicjacja procesu następuje w fazie G1. Rzęski formowane są wtedy komórki znajdują się w fazie stacjonarnej (G_0). W początkowych etapach tworzenia się rzęski, z białek syntetyzowanych w aparacie Golgiego powstaje trzon aksonemy. Dalsze wydłużanie rzęski wymaga sprawnego systemu transportu odpowiedzialnego za przemieszczanie się materiałów niezbędnych do jej budowy. Wiedzy na temat tego bardzo skomplikowanego procesu, zwanego transportem wewnątrzrzęskowym IFT (ang. *intraflagellar transport*), dostarczyły badania nad algą *Chlamydomonas reinhardtii*.

Rozpoczęcie kolejnego podziału komórkowego wiąże się z „demontażem” rzęski. W fazie S dochodzi do duplikacji centrioli, które osiągają dojrzałość w fazie G₂/M cyklu komórkowego. Następnie centrosomy migrują do przeciwległych biegunów komórki i uczestniczą w tworzeniu się wrzeciona podziałowego.^{34,40-46} Mechanizm formowania i resorpcji rzęski przedstawiono na rycinie (**Rycina 15**).



Rycina 15.

Cykl komórkowy, a mechanizm formowania i resorpcji rzęski. Ciliogenesis and cell cycle – ciliogeneza i cykl komórkowy; Centriole duplication – duplikacja centrioli; G₀, G₁, G₂, S, M – fazy cyklu komórkowego.⁴⁶

Transport IFT odbywa się w dwóch kierunkach na mikrotubulach, których koniec (+) znajdują się w części apikalnej rzęski, a koniec (-) w ciałku podstawowym. Za transport w kierunku końca (+) tzw. transport anterogradowy oraz w kierunku końca (-), tzw. transport retrogradowy, odpowiedzialne są dwie rodziny białek motorycznych, odpowiednio kinezyiny oraz dyneiny. Do generacji ruchu wymagają energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Białka uczestniczące w transporcie wewnątrzrzęskowym należą do dwóch kompleksów. Kompleks A uczestniczący w retrogradowym transporcie wewnątrzrzęskowym i kompleks B uczestniczący w anterogradowym transporcie wewnątrzrzęskowym. Białka należące do kompleksu A to IFT43, IFT121, IFT122, IFT139, IFT140, IFT144. Natomiast białka należące do kompleksu B to IFT20, IFT27, IFT46, IFT52, IFT57, IFT72/74, IFT80, IFT81, IFT88, IFT172. Porównawcza analiza genomów wykazała, iż geny kodujące białka IFT charakteryzują się wysokim stopniem konserwatywności wśród organizmów eukariotycznych posiadających rzęski tj. *C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus* oraz *H. sapiens* oraz wykazała brak tych genów u organizmów eukariotycznych nie posiadających rzęsek takich jak wyższe rośliny i grzyby (*Arabidopsis thaliana* oraz drożdże). Wskazuje to, iż transport IFT jest wysoce konserwatywnym procesem niezbędnym do formowania i dojrzewania struktur rzęsek.^{37,40,42,47-52}

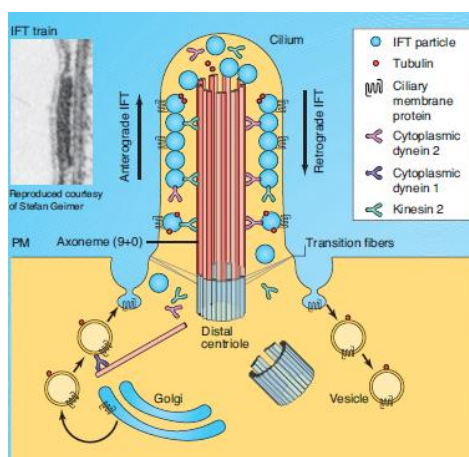
Transport anterogradowy

Przebiega przy udziale białek należących do rodziny kinezyn, heterotrimerycznej kinezyny-2 zbudowanej z dwóch podjednostek motorycznych KIF3A i KIF3B oraz dodatkowo podjednostki KAP (*ang. kinesin-associated protein*) oraz heterodimerycznej kinezyny-2 (KIF17). W transport ten zaangażowane są także cząsteczki IFT kompleksu B. Transport w kierunku części apikalnej rzęski przebiega wolniej w porównaniu z transportem retrogradowym. Mutacje w genach, których produkty białkowe biorą udział w transporcie anterogradowym, prowadzą na ogół do powstania komórek pozbawionych rzęsek.^{37,47-51}

Transport retrogradowy

Przebiega przy udziale białek należących do rodziny dynein, cytoplazmatycznej dyneiny 2, będącej kompleksem zbudowanym z 4 różnych podjednostek: łańcucha ciężkiego, zwanego DYNC2H1/DHC2 oraz łańcucha pośredniego-lekkiego DYNC2LI1/D2LIC oraz łańcucha pośredniego WD34 i łańcucha lekkiego LC8. W transport ten zaangażowane są cząsteczki IFT kompleksu A. Mutacje w genach, które kodują wyżej wymienione białka prowadzą na ogół do powstania krótszych i nieprawidłowo funkcjonujących rzęsek, z nagromadzonymi w ich części szczytowej cząsteczkami IFT.^{37,47-51}

Transport wewnątrzrzęskowy odbywa się w sposób ciągły. Mechanizm regulujący włączenie i wyłączenie poszczególnych białek motorycznych nie został jeszcze dokładnie poznany. Najprawdopodobniej związany jest z aktywacją/fosforylacją i dezaktywacją/defosforylacją białek. Białka uczestniczące w aktywacji kinezyny i dezaktywacji dyneiny zlokalizowane są u podstawy rzęski. Natomiast białka uczestniczące w dezaktywacji kinezyny i aktywacji dyneiny zlokalizowane są w na szczycie rzęski.^{47,51} Mechanizm transportu wewnątrzrzęskowego przedstawiono na rycinie **(Rycina 16)**.



Rycina 16.

Mechanizm transport wewnątrzrzęskowego. Cilium – rzęska, anterograde IFT – transport anterogradowy, retrograde IFT – transport retrogradowy, PM (plasma membrane) – błona komórkowa, axoneme (9+0) – aksonema (9+0), transition fibers – włókna przejściowe, distal centriole – centriola dystalna, vesicle – pęcherzyk, Golgi – aparat Golgiego, IFT particle – cząsteczka IFT, tubulin – tubulina, Ciliary membrane protein – białko związane z błoną rzęski, cytoplasmic dynein 2 – cytoplazmatyczna dyneina 2, cytoplasmic dynein 1 – cytoplazmatyczna dyneina 1, kinesin 2 – kinezyzna 2.⁴⁵

Transport IFT umożliwia rzęskom również wykonywanie powierzonych im funkcji. Utrzymuje ich prawidłową strukturę oraz zdolność ruchu. Ze względu na to, iż na rzęskach zlokalizowanych jest wiele receptorów, mają one zdolność przekazywania sygnałów, a tym samym współuczestnictwa w kilku ważnych szlakach przekąźnikowych. Na podstawie badań na mutantach IFT stwierdzono, że mutacje w genach kodujących cząsteczki IFT, czy białka motoryczne, upośledzają proces wydłużania i/lub utrzymywania prawidłowej budowy rzęski, a nawet powodują ich brak, co w konsekwencji może prowadzić do wielu zaburzeń, takich jak torbiele nerek, wątroby, trzustki, retinopatia barwnikowa, zaburzenia lateralizacji, przewlekłe choroby dróg oddechowych, wady układu kostnego, które są typowymi objawami szeregu znanych zespołów chorobowych należących do tzw. ciliopatii. Obecność rzęsek w niemalże wszystkich ludzkich komórkach powoduje, że wady powstałe na skutek ich dysfunkcji dotyczą wielu tkanek i organów.^{39,53-56}

1.3.4. Funkcje rzęsek

1.3.4.1. Funkcje rzęsek ruchomych

Ich główną rolą jest transport płynów zewnątrzkomórkowych. Przypuszcza się, że mogą one także pełnić funkcje sensoryczne.^{39,53,57,58}

Rzęski na powierzchni komórek wyściółki ependymocytów

Pośredniczą w przepływie płynu mózgowo-rdzeniowego, a ich ruch najprawdopodobniej zapobiega powstawaniu wodogłowia. Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, iż mutacje w genach odpowiedzialnych za prawidłowy ruch rzęsek powodują u myszy rozwój wodogłowia. Hydrocefalia jest jedną z wad rozwojowych występujących u pacjentów z pierwotną dyskinezą rzęsek. Jednak dokładny mechanizm nie został jeszcze poznany.^{32,39,53,58}

Rzęski na powierzchni komórek nabłonka wyściełającego drogi oddechowe

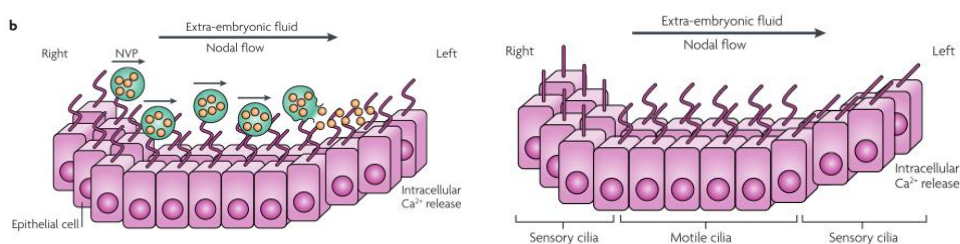
Zsynchronizowany i uporządkowany ruch rzęsek znajdujących się na powierzchni komórek nabłonka wyściełającego drogi oddechowe umożliwia ich oczyszczenie oraz transport śluzu. U pacjentów z PCD upośledzenie lub brak ruchu rzęsek prowadzi do przewlekłych chorób układu oddechowego takich jak zapalenie zatok, zapalenie ucha środkowego, przewlekłego kaszlu oraz astmy. Za pomocą mikroskopii elektronowej zidentyfikowano, iż większość defektów dotyczy całkowitego, bądź częściowego zaniku ramion dyneiny, zaniku pary centralnej i defektów szprych promienistych.^{32,39,59}

Rzęski a układ rozrodczy

U mężczyzn z pierwotną dyskinezą rzęsek niepłodność najczęściej związana jest z brakiem ruchliwości witek plemników, których struktura jest bardzo podobna do klasycznej struktury rzęsek ruchomych. Natomiast u kobiet proces ten jest bardziej złożony. Dotyczy on dysfunkcji rzęsek komórek nabłonka wyściełającego jajowód, których ruch uczestniczy w transporcie oocytu, bądź zarodka do macicy. Przypuszcza się także, że rzęski te pełnią dodatkowo funkcje sensoryczne odbioru bodźców ze środowiska zewnętrznego. Jednak mechanizm, w którym nabłonek jajowodu odpowiada na różnego rodzaju stymulację hormonalną, nie został całkowicie poznany.^{34,39,58}

Rzęski w węźle zarodkowym

Rzęski obecne na powierzchni komórek węzła zarodkowego uczestniczą w procesie ustalania prawidłowego położenia organów, czyli ich wewnętrznej asymetrii. Odwrotne ułożenie trzewi tzw. *situs inversus*, określa stan, w którym narządy znajdują się po przeciwnej stronie w stosunku do ich prawidłowej lokalizacji. Często nieprawidłowe położenie organów ciała jest jedynie częściowe. Odwrotne położenie trzewi jest jednym z częstych symptomów występujących w chorobach rzęskowych, a w szczególności zespołu Kartagenera. Istnieją dwie hipotezy opisujące prawidłowy proces lateralizacji. Model „dwóch rodzajów rzęsek”, który zakłada, że w węźle zarodkowym ruchome rzęski znajdują się w jego części centralnej i generują lewostronny przepływ płynu, który w skutek mechanicznej stymulacji pobudza rzęski nieruchome położone na obrzeżu i wywołuje kaskadę sygnałów niezbędną do ustalenia się prawidłowej pozycji narządów. Model gradientu morfogenu, który zakłada obecność jedynie rzęsek ruchomych, które generują lewostronny przepływ hipotetycznego morfogenu oraz zawartych w nim struktur pęcherzykowych, zawierających między innymi kwas retinowy oraz białka ważne dla procesu sonic hedgehog. Modele te zostały potwierdzone badaniami na organizmach modelowych (m.in. myszy *Ird*, *iv*). Jednak mechanizm ten nie został jeszcze jednoznacznie wyjaśniony.^{32,39,59-62} Model dwóch rodzajów rzęsek i model gradientu morfogenu przedstawiono na rycinie (**Rycina 17**).



Rycina 17.

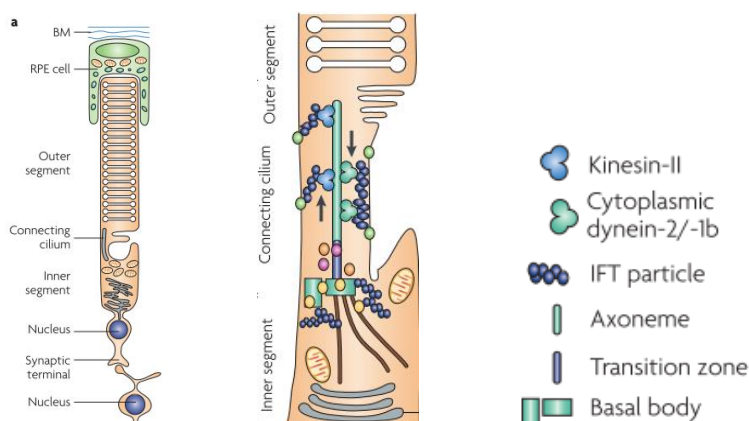
Funkcja rzęsek w procesie lateralizacji. Model dwóch rodzajów rzęsek i model gradientu morfogenu. Right - prawy, left - lewy, NVP (nodal vesicular parcel) – pęcherzykowy ładunek węzła zarodkowego, extra embryonic fluid – dodatkowy płyn embrionalny, nodal flow – przepływ w węźle zarodkowym, epithelial cell – komórka epitelialna, intracellular Ca^{2+} release – wewnątrzkomórkowe uwolnienie Ca^{2+} , sensory cilia – rzęski sensoryczne, motile cilia – rzęski ruchome.³⁹

1.3.4.2. Funkcje rzęsek nieruchomych

Ich funkcją jest odczytywanie sygnałów ze środowiska zewnętrznego. Stanowią swojego rodzaju antenę umożliwiającą odpowiedź na stymulację mechaniczną lub chemiczną. Ze względu na to, że na ich powierzchni zlokalizowane są różnego rodzaju receptory, są także ważnym elementem kilku istotnych szlaków przekąźnikowych tj. Hh, Wnt, PCP oraz PDGFR α .^{39,53,57,58}

Rzęski a narząd wzroku

W komórkach pręcików i czopków siatkówki oka występują rzęski (*ang. connecting cilium*) o budowie aksonemy (9+0) łączące segment wewnętrzny zawierający jądro komórkowe, rybosomy i inne struktury komórkowe z segmentem zewnętrznym zawierającym rodopsynę i inne barwniki wzrokowe. Wszystkie komponenty niezbędne do budowy i prawidłowego funkcjonowania segmentu zewnętrznego są syntetyzowane w segmencie wewnętrznym, a następnie transportowane wzdłuż rzęski za pomocą transportu wewnątrzrzęskowego IFT. Dysfunkcje w transporcie IFT powodują obumieranie komórek fotoreceptorów i postępującą utratę wzroku. Retinopatia barwnikowa lub dystrofia czopkowo-pręcikowa są typowymi cechami klinicznymi wielu znanych ciliopatii, jak np. zespołu Bardeta-Biedla, zespołu Meckela oraz zespołu Alstroma.^{32,39,53,63,64} Strukturę komórki pręcika oraz przebieg transportu wewnątrzrzęskowego przedstawiono na rycinie (**Rycina 18**).

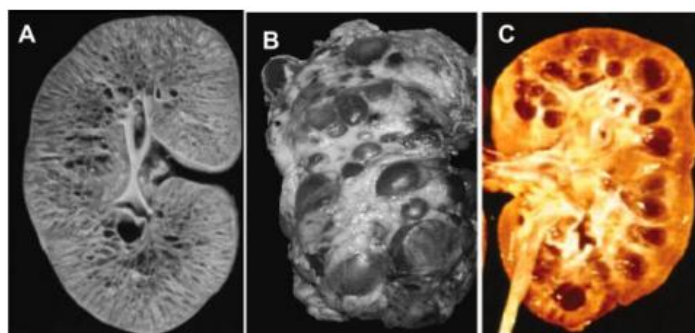


Rycina 18.

Struktura komórki pręcika siatkówki. Nucleus – jądro, synaptic terminal – zakończenie synaptyczne, inner segment – segment wewnętrzny, connecting cilium – rzęska łącząca, outer segment – segment zewnętrzny, RPE (retinal pigment epithelium) cell – komórka nabłonka siatkówki zawierające pigment, BM (Brusch's membrane) – błona Bruscha, kinesin II – kinezyzna II, cytoplasmic dynein-2/-1b – cytoplazmatyczna dyneina-2/-1b, IFT partice – cząsteczki IFT, axoneme – aksonema, transition zone – strefa przejściowa, basal body – ciało podstawowe.³⁹

Odbiór bodźców mechanicznych

Badania przeprowadzone na organizmach modelowych oraz liniach komórkowych wskazują, że rzęski występujące na powierzchni komórek budujących struktury kanalikowate takie jak np. kanaliki nerkowe, przewód żółciowy w wątrobie i przewód trzustkowy są zdolne do odpowiedzi na bodźce mechaniczne. U pacjentów z wielotorbielowatością nerek (*ang. polycystic kidney disease, PKD*) zidentyfikowano mutacje w genach kodujących policystynę-1 i policystynę-2. Są to białka budujące kanał jonowy selektywny względem jonów wapnia i są zlokalizowane w błonie rzęskowej. W prawidłowych warunkach uginanie się rzęsek na powierzchni komórek nabłonka kanalików nerkowych pod wpływem przepływu moczu powoduje otwarcie kanału jonowego, a tym samym wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} . Kontrolowany przepływ wapnia bierze udział w regulacji różnicowania się, proliferacji i apoptozy komórek. Zaburzenia tych procesów mogą prowadzić do nadmiernych podziałów komórkowych oraz wytworzenia torbieli wypełnionych płynem, które stopniowo zastępują zdrową tkankę, a w konsekwencji prowadzą do zwyrodnienia wielotorbielowatego nerek. Podobny mechanizm jest odpowiedzialny za wytworzenie cyst w obrębie wątroby i trzustki. Zaburzenia ze strony nerek występują w większości zespołów rzęskowych takich jak np. zespół wielotorbielowatości nerek dziedziczony w sposób autosomalny recesywny oraz autosomalny dominujący, zespół Bardeta-Biedla, Meckela, Jubert, Jeune oraz zespół Sensenbrenner.^{32,39,46,49,53,59,65,66} Morfologię nerek w różnych zespołach rzęskowych przedstawiono na rycinie (**Rycina 19**).



Rycina 19.

Morfologia nerek w zespołach rzęskowych. A. nerka dziecka z zespołem wielotorbielowatości nerek dziedziczonym w sposób autosomalny recesywny (ARPKD) B. nerka osoby dorosłej z zespołem wielotorbielowatości nerek dziedziczonym w sposób autosomalny dominujący C. Nerka pacjenta z nefronoftyzą.⁶⁶

Kontrola szlaków przekąźnikowych

Sygnaly pochodzące ze środowiska zewnętrznego jak np. odbiór bodźców mechanicznych, czy związanie ligandów z receptorami na powierzchni błony rzęskowej mogą zostać przekształcone wewnątrz rzęski w kaskadę sygnalów. Prawidłowe funkcjonowanie i struktura rzęsek ma wpływ na przebieg trzech ważnych ścieżek przekąźnikowych tj. Hedgehog (Hh), Wingless (Wnt) i receptor płytkowego wzrostu alfa (PDGFR α), pełniących bardzo ważną rolę podczas procesu embriogenezy.

67-69

Hedgehog (Hh)

Pełni bardzo ważną rolę w rozwoju embrionalnym, uczestnicząc w procesie lateralizacji, neurogenezy, rozwoju kości, serca poprzez regulację proliferacji i różnicowania się komórek. U organizmów dorosłych pełni ważną funkcję w dojrzewaniu tzw. niszy komórek macierzystych oraz w utrzymaniu homeostazy tkanek. W procesie zasadniczą rolę odgrywa ligand hedgehog oraz dwa receptory zlokalizowane na membranie rzęski: Patched-1 (Ptch1) oraz Smoothened (Smo) oraz czynniki transkrypcyjne glioma (Gli). Zaburzenia szlaku Hh prowadzą do rozwoju polidaktylii, defektów twarzowo-czaszkowych, wad rozwojowych kośćca oraz do raka podstawnokomórkowego skóry, najczęściej występującego nowotworu u człowieka. Niewłaściwa aktywacja onkogenów Gli może powodować transformacje komórek poprzez bezpośrednią regulację ekspresji genów kontrolujących wzrost komórek, sugerując, iż niewłaściwy przebieg procesu Hh pełni ważną rolę w procesie nowotworzenia wielu tkanek takich jak np. mózgu, płuc i trzustki.^{35,39,57,63,67-70}

Wingless (Wnt)

Wnt odgrywa bardzo ważną rolę w procesie embriogenezy. Sygnał zależny od białek należących do rodziny Wnt jest przekazywany w komórce poprzez różne ścieżki. Dwie z nich są bezpośrednio związane z rzęskami. Ścieżka kanoniczna, która zależna jest od β -kateniny i kontroluje proces proliferacji komórek oraz przebieg cyklu komórkowego. Natomiast ścieżka niekanoniczna kontroluje migrację i polaryzację komórek, wpływając na prawidłową morfogenezę narządów. U pacjentów z zaburzeniami szlaku Wnt stwierdza się m.in. encefalopatie, wady cewy nerwowej, otwarte powieki oraz torbiele nerek.^{63,67-69,71}

Receptor płytkowego czynnika wzrostu alfa (PDGFR α)

PDGFR α (ang. *Platelet derived growth factor receptor alpha*) reguluje procesy apoptozy, proliferacji, migracji komórek podczas embriogenezy i podczas rozwoju postnatalnego. Uczestniczy także w dojrzewaniu, wzroście tkanek oraz gojeniu ran u osobników dorosłych. Odgrywa także istotną rolę w utrzymaniu homeostazy tkanek. Receptor PDGFR α zlokalizowany jest w obrębie rzęski. Zaburzenia szlaku PDGFR α prowadzą m.in. do śmierci zarodka, wad rozwojowych centralnego układu nerwowego, wad narządowych oraz do rozwoju nowotworów i do chorób naczyniowych.^{57,60,67-69,72}

1.3.4.3. Występowanie i rola rzęsek w innych komórkach

Struktury rzęsek zlokalizowane są w obrębie neuronów odbierających bodźce zapachowe, które obecne są w blaszce sitowej mózgu. Zaburzenia rzęsek uczestniczących w odbiorze bodźców zapachowych powodują anosmię charakteryzującą się całkowitym brakiem węchu lub hiposmię związaną ze zmniejszoną zdolnością odczuwania zapachów. Zaburzenia związane z odczuwaniem zapachów stwierdzono w pacjentów z zespołem Bardeta-Biedla.^{39,69}

Rzęski obecne są w rozwijających się kościach zarówno w komórkach ektodermalnych jak i mezenchymie, uczestnicząc w przekazywaniu sygnałów ważnych dla rozwoju embrionalnego. Rzęski nieruchome (9+0) obecne są w osteocytach i chondrocytach. Ich występowanie oraz pełniona funkcja związana jest z pojawieniem się zaburzeń w obrębie układu kostnego w zespołach rzęskowych takich jak np. zespół Sensenbrenner, Jeune i zespół Ellisa van Crevelda.^{53,73}

Obecność rzęsek w różnych rodzajach neuronów związana jest z wystąpieniem niepełnosprawności intelektualnej u pacjentów, np. z zespołem Bardeta-Biedla oraz Jubert.⁵³

Rzęski obecne są również w neuronach podwzgórza, które związane są z regulacją łaknienia, co może być powodem wystąpienia otyłości u pacjentów z zespołem Bardeta-Biedla oraz Alstroma. Mechanizm odpowiedzialny za powstanie otyłości nie został jeszcze szczegółowo poznany.⁶¹

Obecność rzęsek stwierdzono również w komórkach odontoblastów i ameloblastów gdzie biorą udział w prawidłowej morfogenezie zębów.⁷³⁻⁷⁵ Natomiast obecność rzęsek w skórze jest związana z prawidłowym wytworzeniem mieszków włosowych.^{76,77}

Rzęski obecne są również w takich komórkach jak kardiomiocyty, gdzie pełnią ważną rolę w procesie morfogenezy serca, co może mieć związek z wystąpieniem np. kardiomiopatii u pacjentów z zespołem Alstroma.^{78,79}

Struktury rzęsek (9+0) obecne są także w embrionalnych komórkach macierzystych. Ich funkcja w tych komórkach nie została jeszcze dokładnie scharakteryzowana, ale najprawdopodobniej uczestniczą one w procesie różnicowania i proliferacji komórek.⁶⁵

1.4. Ciliopatie

Ciliopatie (*ang. ciliopathies, cilia-related diseases*) jest to grupa chorób, w których patogenezie zasadniczą rolę odgrywa nieprawidłowe funkcjonowanie rzęsek. Posiadają one wiele wspólnych cech klinicznych tj. torbiele nerek czy zwyrodnienie siatkówki, które obecne są w większości zespołów rzęskowych. Choroby te charakteryzują się wysoką heterogennością oraz plejotropowością. Do znanych ciliopatii zalicza się m.in. pierwotną dyskinezę rzęsek, zespół wielotorbielowatości nerek, zespół Bardeta-Biedla, zespół Meckela oraz zespół Jubert.^{58,61,80-86} Manifestację kliniczną oraz charakterystykę poszczególnych zespołów rzęskowych przedstawiono na rycinie (**Rycina 20**) oraz w tabeli (**Tabela 2**). Według analizy przeprowadzonej na podstawie obrazu klinicznego 127 różnych zespołów stwierdzono, iż najprawdopodobniej istnieje około 102 różnych chorób rzęskowych, z których dotychczas około 14 zostało udowodnionych.⁵⁵

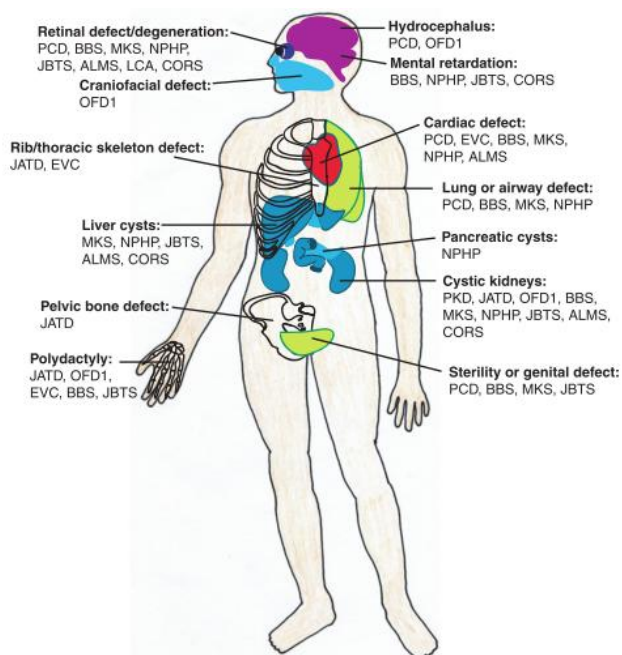
Podział ciliopatii:

1. Dotyczące dysfunkcji rzęsek ruchomych (9+2)

- zespół Kartagener (PCD, Kartagener syndrome)

2. Dotyczące dysfunkcji rzęsek nieruchomych (9+0)

- zespół wielotorbielowatości nerek (ARPKD/ADPKD, Autosomal recessive/dominant polycystic kidney disease)
- zespół Alstroma (ALSM, Alstrom syndrome)
- zespół Bardeta-Biedla (BBS, Bardet-Biedl syndrome)
- zespół Jeune (JATD, Jeune syndrome)
- zespół Joubert (JBS, Joubert syndrome)
- zespół Meckela (MKS, Meckel syndrome)
- zespół nefronoftyza (NPHP, Nephronophthisis)
- zespół Seniora-Loken (SNLS, Senior-Loken syndrome)
- zespół Ellisa van Crevelda (EVC, Ellis van Creveld syndrome)
- zespół Sensenbrenner/Cranioectodermal dysplasia (CED, Sensenbrenner syndrome)
- zespół ustno-twarzowo-palcowy typu I (OFD1, Orofaciodigital syndrome 1)
- zespół krótkie żebro-polidaktylia (SRP, Short-rib polydactyly syndrome)



Rycina 20.

Manifestacja kliniczna poszczególnych zespołów rzęskowych. Hydrocephalus - wodogłowie, mental retardation - niepełnosprawność intelektualna, cardiac defect - wady serca, lung and airways defect - wady płuc oraz układu oddechowego, cystic kidneys - torbielowatość nerek, sterility or genital defect - bezpłodność lub wady narządów rozrodczych, polydactyly - polidaktylia, pelvic bone defect - defekty kości miednicy, liver cyst - torbiele wątroby, rib/thoracic defect - wady układu kostnego żeber i klatki piersiowej, craniofacial defect - wady twarzoczaszki, retinal defect/degeneration - wady siatkówki. Torbiele nerek oraz zwyrodnienie siatkówki są charakterystyczne dla większości ciliopatii takich jak np. JATD, BBS, MKS, NPHP, JBTS, ALMS oraz CED. Natomiast zmiany w obrębie układu szkieletowego są charakterystyczne dla JATD, OFD1, EVC, ALMS oraz CED.⁸⁰

Charakterystyka poszczególnych ciliopatii

Tabela 2. Przegląd znanych ciliopatii.^{58,61,80-89}

Nazwa zespołu	Cechy kliniczne	Gen(y)
Pierwotna dyskineza rzęsek	situs inversus, zapalenie zatok, rozszerzenie oskrzeli, bezplodność	<i>DNAI1, DNAH5, DNAH11, DNAI2, KTU, TXNDC3, LRRC50, DNAL1, RSPH9, RSPH4A, CCDC40, CCDC39</i>
Zespół wielotorbielowatości nerek	torbiele nerek zwłóknienie wątroby	<i>PKD1 PKD2 PKHD1</i>
Zespół Alstroma	otyłość, niski wzrost, zwyrodnienie siatkówki, utrata słuchu, cukrzyca typu 2, hipogonadyzm, kardiomiopatia,	<i>ALMS1</i>
Zespół Bardeta-Biedla	otyłość, torbiele nerek, zwyrodnienie siatkówki, niepełnosprawność intelektualna	<i>BBS1-16, THM1</i>
Zespół Jeune	niski wzrost, skrócenie kończyn, skrócenie żeber, wąska klatka piersiowa, brachydaktylia, polidaktylia, torbiele nerek, zwyrodnienie siatkówki	<i>IFT80 IFT144 DYNC2H1 THM1</i>
Zespół Joubert	ataksja, opóźnienie umysłowe nadciśnienie, rozszczep wargi i podniebienia, barwnikowe zwyrodnienie siatkówki	<i>JBTS1-10, KIF7, TCTN2, ATXN10, THM1</i>

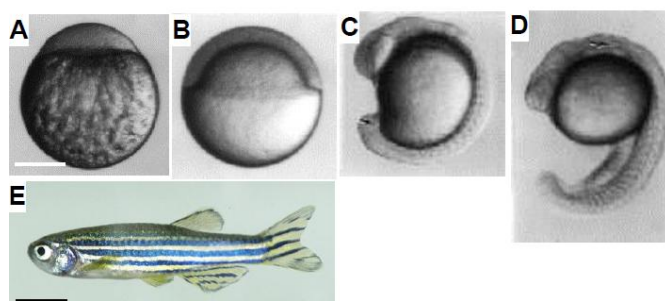
Zespół Meckela	torbiele nerek, wady rozwojowe ośrodkowego układu nerwowego, zwłóknienie wątroby, wrodzone wady serca, polidaktylia, rozszczip podniebienia	<i>MKS1-6, MKS8, THM1</i>
Nefronoftyza	torbiele nerek	<i>NPHP1-11, THM1</i>
Zespół Seniora-Loken	torbiele nerek, retinopatia barwnikowa	<i>NPHP1, NPHP4-6, NPHP10</i>
Zespół Ellisa van Crevelda	niski wzrost, skrócenie żeber, polidaktylia, zmiany ektodermalne, zaburzenia sercowo-naczyniowe	<i>EVC1 EVC2</i>
Zespół Sensenbrenner	dysmorfia twarzy, kraniosynostoza, dolichcefalia, brachydaktylia, skrócenie kończyn, zaburzenia ze strony nerek, zmiany ektodermalne	<i>IFT122 IFT121 IFT43 IFT144</i>
Zespół ustno-twarzowo-palcowy typu I	rozszczip wargi i podniebienia, wady w obrębie twarzoczaszki, polidaktylia, syndaktylia, torbiele nerek, niepełnosprawność intelektualna	<i>OFD1</i>
Zespół krótkie żebro-polidaktylia	hipoplazja klatki piersiowej, polidaktylia, skrócenie kości długich	<i>DYNC2H1 NEK1 IFT121</i>

1.5. Modele zwierzęce chorób człowieka

W badaniach nad zrozumieniem patogenezы wielu chorób człowieka zarówno na poziomie komórkowym jak i molekularnym wykorzystuje się modele zwierzęce. Najczęściej wykorzystywanymi modelami chorób człowieka są modele mysie (*Mus musculus*), muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), nicieni (*Caneorhabditis elegans*) oraz żaby szponiastej (*Xenopus laevis*). W ostatnim czasie bardzo popularne stały się również modele rybki danio (*Danio rerio*).

1.5.1. Danio pręgowany (*Danio rerio*) jako model zwierzęcy

Danio pręgowany jest słodkowodną rybą z rodziny karpiowatych, występującą w północnych Indiach, Pakistanie i Nepalu. Wykorzystywany jest jako model w badaniach nad rozwojem i fizjologią kręgowców oraz chorób człowieka. W stosunku do innych organizmów modelowych tj. *Mus Musculus*, *Drosophila melanogaster* oraz *Caneorhabditis elegans* posiada wiele zalet. Rozwój *Danio rerio* jest bardzo podobny do embriogenezy wyższych kręgowców, także człowieka. Charakteryzuje się łatwym procesem rozmnażania i krótkim cyklem życiowym oraz dużą liczbą potomstwa. Stadium od jaja do larwy osiąga w okresie poniżej trzech dni, natomiast dojrzałość płciową w ciągu trzech miesięcy. Etapy embriogenezy *Danio rerio* przedstawiono na rycinie (**Rycina 21**). Ponadto jego ciało na wczesnych etapach rozwoju jest przejrzyste, co pozwala na obserwację procesu embriogenezy oraz organów wewnętrznych. Dotychczas w oparciu o *Danio rerio* stworzono szereg modeli chorób oraz zespołów o podłożu genetycznym występujących u człowieka tj. choroby układu krwiotwórczego, choroby nerek, serca, oczu oraz wiele innych. Ponadto modele zebrafish mogą być również wykorzystywane w celu tworzenia oraz testowania nowych leków oraz efektywnej terapii dla wielu chorób występujących u człowieka.^{90,91}



Rycina 21.

Etapy embriogenezy *Danio rerio*. A. stadium jednej komórki; B. stadium kopuły (5hpf- 5h po zapłodnieniu); C. 12 somitów (15h); D. 20 somitów (20h); E. Dorosły Danio pręgowany. Skala A-D= 200µm; E=0.5cm. Źródło <http://www.zfin.org> oraz <http://www.bio.umass.edu>

Jednym ze sposobów stworzenia modelu rybiego danio (*Danio rerio*) jest zastosowanie antysensownego oligonukleotydu morfolino (MO), modyfikującego poziom ekspresji badanego genu. MO są analogami DNA, najczęściej o długości 25 nukleotydów i są komplementarne do sekwencji RNA danego genu. W swojej strukturze zamiast deoksyrybozy posiadają morfolinę, a zamiast grupy fosforanowej fosforamid. Charakteryzują się wysoką stabilnością biologiczną i nie są podatne na degradację enzymatyczną. Zastosowanie oligonukleotydów MO pozwala na obniżenie poziomu ekspresji od 70% do nawet 98%. MO wprowadza się do cytoplazmy rozwijającego się embrionu w stadium 1 do 4 komórek. Następnie dany oligonukleotyd jest odziedziczony przez każdą nową komórkę powodując zmniejszenie poziomu ekspresji danego białka. MO mogą obniżać ekspresję badanego genu przez wiązanie się do kodonu start AUG w mRNA lub powyżej kodonu AUG. Alternatywnie MO mogą blokować proces składania transkryptu poprzez wiązanie się do miejsca donorowego lub miejsca akceptorowego w miejscu łączenia intron-ekson. W ten sposób może powstać dojrzały mRNA, który nie zawiera danego eksonu lub zawiera w swojej sekwencji intron. W obu przypadkach powoduje to przesunięcie ramki odczytu i powstanie niefunkcjonalnego białka. Modele danio stworzono dla większości zespołów rzęskowych np. zespołu Bardeta-Biedla oraz zespołu Jeune.⁹²⁻⁹⁴

2. CELE PRACY

Celem pracy było określenie podłoża molekularnego zespołu Sensenbrenner.

Cele cząstkowe obejmowały:

1. Ustalenie, w którym chromosomie i w którym regionie jest zlokalizowany gen, którego mutacje są przyczyną zespołu Sensenbrenner.
2. Zidentyfikowanie genu dla zespołu Sensenbrenner wśród genów kandydujących zlokalizowanych w danym regionie określonego chromosomu.
3. Określenie typu i lokalizacji mutacji prowadzących do zespołu Sensenbrenner.
4. Wykazanie, że wykryte mutacje mają związek przyczynowy z zespołem Sensenbrenner.

3. PACJENCI I METODY

3.1. Pacjenci

W badaniach wzięli udział wyłącznie pacjenci, których rodzice lub opiekunowie prawni wyrazili świadomą zgodę na przeprowadzenie badań molekularnych.

Ze względu na to, iż pacjenci pochodzili z różnych ośrodków na całym świecie, zgodę na badania otrzymywano w danej jednostce badawczej lub klinice. Na przeprowadzenie badań uzyskano również zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (**Załącznik1**).

Badaniami molekularnymi została objęta grupa 13 pacjentów ze zdiagnozowanym zespołem Sensenbrenner pochodząca z 12 rodzin. Badana grupa obejmowała ośmiu pacjentów sporadycznych oraz pięciu pacjentów rodzinnych (z czego trzech pacjentów pochodziło z dwóch rodzin spokrewnionych). Siedmiu z 13 pacjentów z zespołem Sensenbrenner stanowili pacjenci płci męskiej, pozostałych sześciu stanowili pacjenci płci żeńskiej. Dane kliniczne pacjentów z zespołem Sensenbrenner przedstawiono w tabeli (**Tabela 3**).

Tabela 3. Dane kliniczne pacjentów z zespołem Sensenbrenner.

[F - kobieta, M - mężczyzna, R - rodzinny, S - sporadyczny, P – prawidłowy, D – opóźniony, NA - brak danych]

Rodzina/Pacjent	CED-01/1	CED-01/2	CED-02/3	CED-03/4	CED-04/5	CED-05/6
Wiek w momencie badania	4-8 lat	od urodzenia	12 mc-y	4.5 lat	NA	4 lata
Płeć	F	M	M	M	F	M
Wywiad rodzinny	R	R	R	S	R	R
Rozwój psychomotoryczny	P	P	P	P	P	P
Dolichocefalia	+	+	+	+	+	+
Charakterystyczne rysy twarzy	+	+	+	+	+	+
Zmiany w obrębie zębów	+	+	+	+	+	+
Rzadkie włosy	+	+	+	-	+	+
Krótka/wąska klatka piersiowa	+	+	+	+	+	+
Skrócenie kończyn	+	+	+	+	+	+
Brachydaktylia	+	+	+	+	+	+
Obustronna przepuklina pachwinowa	+	+	+	+	NA	-
Nadmiernie elastyczna skóra	+	+	+	+	NA	-
Zaburzenia ze strony nerek	+	+	+	+	NA	+
Zaburzenia ze strony wątroby	-	Hepato-megalia	NA	Zwłóknienie wątroby	NA	-
Dystrofia siatkówki	-	-	-	-	NA	+

Rodzina/Pacjent	CED-06/7	CED-07/8	CED-08/9	CED-09/10	CED-10/11	CED-11/12	CED-12/13
Wiek w momencie badania	1 rok i 3 mc-e	7 lat	5 lat	2 lata	4 lata	6 lat	2 lata i 3 mc-e
Płeć	F	F	M	M	F	F	M
Wywiad rodzinny	S	S	S	S	S	S	S
Rozwój psychomotoryczny	P	D	P	P	P	P	D
Dolichocefalia	+	-	+	+	+	+	NA
Charakterystyczne rysy twarzy	+	+	+	+	+	+	+
Zmiany w obrębie zębów	+	+	+	+	+	+	+
Rzadkie włosy	+	+	+	+	+	+	NA
Krótka/wąska klatka piersiowa	+	+	+	+	+	+	NA
Skrócenie kończyn	+	+	+	+	+	+	+
Brachydaktylia	+	+	+	+	+	+	+
Obustronna przepuklina pachwinowa	-	-	-	-	-	-	NA
Nadmiernie elastyczna skóra	-	-	NA	NA	+	+	NA
Zaburzenia ze strony nerek	+	+	+	+	+	+	+
Zaburzenia ze strony wątroby	-	-	-	-	-	-	-
Dystrofia siatkówki	-	-	NA	-	-	-	-

3.2. Metody

3.2.1. Izolacja DNA

3.2.1.1. Izolacja genomowego DNA z krwi obwodowej z zastosowaniem kitu FlexiGene DNA firmy Qiagen

1. Do izolacji pobierano 5 ml krwi obwodowej.
2. Do 50 ml probówki typu falkon odpipetowano 12,5 ml buforu FG1, następnie dodano 5 ml krwi obwodowej i wymieszano odwracając probówkę góra-dół 5 razy.
3. Następnie próby zwirowano przez 5 min. przy prędkości 2000 x g.
4. Supernatant usuwano, osad suszono umieszczając odwróconą probówkę typu falkon na papierze przez 2 min.
5. Do osadu dodano 2,5 ml buforu FG2/proteza Qiagen i wytrząsano, aż do całkowitego rozpuszczenia osadu.
6. Następnie przeprowadzono inkubację w 65°C przez 5 min.
7. Dodano 2,5 ml izopropanolu, wymieszano celem precypitacji DNA.
8. Próby wirowano przez 10 min. przy prędkości 2300 x g.
9. Supernatant usuwano, osad suszono umieszczając odwróconą probówkę typu falkon na ręczniku papierowym.
10. Dodano 2,5 ml 70% etanolu i wytrząsano przez 5 sek.
11. Próby wirowano 10 min. przy prędkości 2000 x g.
12. Supernatant usuwano, osad suszono umieszczając odwróconą probówkę na ręczniku papierowym przez 5 min.
13. DNA suszono w temperaturze pokojowej przez przynajmniej przez 5 min.
14. Następnie dodano 500 µl buforu FG3 i wytrząsano przez 5 sek.
15. DNA inkubowano w temperaturze 65°C przez 1 h celem rozpuszczenia.
16. Następnie dokonano analizy jakościowej i ilościowej DNA.
17. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze 4°C.

3.2.1.2. Izolacja genomowego DNA z limfocytów krwi obwodowej metodą wysalania białek

1. Do izolacji pobierano 2-10 ml krwi do probówek z EDTA, zapobiegającym krzepnięciu krwi (stężenie końcowe EDTA wynosiło 0,1%).
2. Przeprowadzono wstępną lizę komórek dodając do krwi 30 ml buforu do lizy schłodzonego do temperatury poniżej 10°C, mieszaninę inkubowano 45 min. na lodzie, kilkakrotnie mieszając.
3. Mieszaninę zwirowano w temperaturze 4°C, przez 30 min. przy prędkości 2500 rpm. Supernatant usuwano pozostawiając zawiesinę na dnie probówki.
4. Osad przemywano 3-krotnie 10 ml buforu do lizy, wirując przy prędkości 2500 rpm przez 20 min.
5. Osad zawieszono w 5 ml buforu SE, silnie wytrząsano, po czym dodano 500 µl 10% SDS oraz 30 µl wodnego roztworu proteinazy K o stężeniu wyjściowym 10 mg/ml. Mieszaninę inkubowano przez noc w temperaturze 56°C.
6. Po całonocnej inkubacji do mieszaniny dodano 1,5 ml M roztworu NaCl, silnie wytrząsano celem wytrącenia białek, a następnie wirowano w temperaturze 20°C przez 30 min. przy prędkości 3600 rpm.
7. Do mieszaniny dodano 750 µl NaCl, silnie wytrząsano, wirowano w temperaturze 20°C przez 30 min. przy prędkości 3600 rpm.
8. Następnie mieszaninę silnie wytrząsano i wirowano w temperaturze 20°C przez 30 min. przy prędkości 3600 rpm.
9. Przesącz przenoszono do nowych probówek, a następnie DNA wytrącano schłodzonym 96% etanolem w stosunku objętościowym supernatant/etanol 1;2,5.
10. DNA przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf, a następnie przemywano 2-krotnie 1 ml schłodzonego 70% etanolu (mikrowirówka, 5min., 9200 rpm).
11. Wytrącony DNA suszono (termomixer, 37°C, 30 min., 500 rpm), a następnie rozpuszczono w 500 µl dejonizowanej i sterylnej wody.
12. Następnie dokonano analizy jakościowej i ilościowej DNA.
13. Wyizolowany DNA przechowywano w temperaturze 4°C.

3.2.1.3. Izolacja genomowego DNA z linii komórkowych (limfocyty)

1. Do osadu komórek dodano 20 ml buforu do lizy (bufor B) i wytrząsano.
2. Następnie dodano 30 μ l Rnazy A o stężeniu 10 mg/ml. Próby inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 h.
3. Następnie dodano 5 ml buforu C (5M Na-perchlorat), wymieszano góra-dół 10-15 razy.
4. Pod dygestorium dodano 20 ml schłodzonego chloroformu i wymieszano góra-dół 10-15 razy, a następnie zwirowano 10 min. przy prędkości 4000 rpm (aż do rozdzielenia faz).
5. Zebrano fazę wodną i przeniesiono ją do nowej probówki typu falkon.
6. W celu wytrącenia DNA do fazy wodnej dodano 100% schłodzony etanol w stosunku objętościowym 1:1.
7. DNA przeniesiono do nowej probówki, dodano 1 ml 70% etanolu, a następnie wirowano 1 min, 7500 rpm. Po zwirowaniu etanol usuwano.
8. Dodano 500 μ l 70% etanolu, wirowano 1 min., 7500 rpm.
9. Po zwirowaniu etanol usuwano. DNA suszono w temperaturze 50°C przez 10 min.
10. Następnie DNA zawieszono w 500 μ l buforu TE i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez noc.
11. Następnie dokonano analizy jakościowej i ilościowej DNA.
12. Wyizolowany DNA przechowywano w temperaturze 4°C.

3.2.2. Izolacja RNA

3.2.2.1. Z linii komórkowych (limfocyty, fibroblasty) z zastosowaniem Trizolu

1. Do osadu komórek dodano 10 ml Trizolu, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min.
2. Po zawieszeniu komórek, roztwór przeniesiono do specjalnych probówek (wolnych od Rnaz) o objętości 30 ml.
3. Następnie dodano 2 ml chloroformu i energicznie mieszano przez 15 sek.
4. Próby pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 2-3 min. i zwirowano w temperaturze 4°C przez 20 min. przy prędkości 5000 rpm.
5. Supernatant przeniesiono do świeżej 30 ml probówki.
6. Dodano 5 ml alkoholu izopropanowego, wymieszano i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 5-10 min., a następnie zwirowano w temperaturze 4°C przez 20 min. przy prędkości 5000 rpm.
7. Supernatant usuwano.
8. Do osadu dodano 10 ml 70% alkoholu etylowego, wymieszano i ponownie zwirowano w temperaturze 4°C przez 20 min. przy prędkości 5000 rpm.
9. Supernatant usuwano.
10. Osad suszono umieszczając odwróconą probówkę na ręczniku papierowym.
11. Następnie dodano 600 µl wody z dodatkiem DEPC w celu rozpuszczenia RNA.
12. Rozpuszczone RNA pozostawiono na lodzie przez 10 min., a następnie inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 min. Po przeprowadzonej inkubacji RNA umieszczono na lodzie.
13. Następnie dokonano analizy jakościowej i ilościowej RNA.
14. Wyizolowany RNA przechowywano w zamrożeniu w temperaturze -80°C.

3.2.2.2. Z krwi obwodowej przy użyciu kitu PAXgene

1. Do izolacji pobierano krew obwodową w ilości 2-3 ml RNA. Krew pobierano do specjalnych probówek BRT (Blood RNA tube) zawierających bufor stabilizujący.
2. Po pobraniu krwi obwodowej próbówki BRT inkubowano przez minimum 2 h w temperaturze pokojowej (15-25°C) celem całkowitej lizy komórek.
3. Następnie probówki BRT wirowano przez 10 min. przy prędkości 6000 rpm.
4. Supernatant usuwano przez odpipetowanie.
5. Do osadu dodano 4 ml wody (wolnej od Rnaz - RNFW).

6. Następnie próby wytrząsano, aż do widocznego rozpuszczenia osadu. Próby zwirowano przez 10 min. przy prędkości 6000 rpm.
7. Po zwirowaniu supernatant usuwano i dodano 350 μ l buforu BR1 i wytrząsano, aż do całkowitego rozpuszczenia osadu.
8. Próby przeniesiono do 1,5 ml probówek MCT (microcentrifuge tube) i dodano 300 μ l buforu BR2 i 40 μ l proteinazy K. Wymieszano przez wytrząsanie 5 sek., następnie próby inkubowano przez 10 min. w temperaturze 55°C na wytrząsarce przy obrotach 400-1400 rpm.
9. Lizat przeniesiono bezpośrednio na kolumnkę PSC (PAXgene Shredder spin column), którą umieszczono w próbówce PT o objętości 2 ml, wirowano przez 3 min. przy prędkości 13000 rpm.
10. Supernatant przeniesiono do nowej próbówki MCT.
11. Następnie dodano 300 μ l 96-100% alkoholu etylowego. Wymieszano przez wytrząsanie i zwirowano 1-2 sek. (500-1000 x g).
12. Odpipetowano 700 μ l próby na kolumnkę PRC (PAXgene RNA spin column) i umieszczono w próbówce PT, potem zwirowano przez 1 min. przy prędkości 13000 rpm. Po zwirowaniu kolumnkę umieszczono w nowej próbówce PT.
13. Odpipetowano pozostałą część próbki na kolumnkę PRC i wirowano przez 1 min. przy prędkości 13000 rpm. Po zwirowaniu kolumnkę umieszczono w nowej próbówce PT.
14. Następnie dodano 350 μ l buforu BR3, wirowano przez 1 min. przy prędkości 13000 rpm. Po zwirowaniu kolumnkę umieszczono w nowej próbówce PT.
15. Do próbówki MCT dodano 10 μ l roztworu DNase I (RNDF) i 70 μ l buforu RDD (digestion buffer) następnie dokładnie wymieszano.
16. Odpipetowano 80 μ l mieszaniny RNDF bezpośrednio na kolumnkę PRC i pozostawiono w temperaturze 20-30°C przez 15 min.
17. Na kolumnkę PRC naniesiono 350 μ l buforu BR3 i zwirowano 1 min., 13000 rpm. Po zwirowaniu kolumnkę umieszczono w nowej próbówce PT.
18. Następnie dodano 500 μ l buforu BR4, zwirowano 1 min., 13000 rpm. Po zwirowaniu kolumnkę umieszczono w nowej próbówce PT.
19. Ponownie dodano 500 μ l buforu BR4, zwirowano 3 min., 13000 rpm.
20. Po zwirowaniu kolumnkę umieszczono w nowej próbówce PT i wirowano 1 min. przy prędkości 13000 rpm.
21. Kolumnkę PRC umieszczono w nowej próbówce MCT i dodano bezpośrednio na membranę 40 μ l buforu do elucji BR5. W celu elucji RNA próby zwirowano przez 1 min. przy prędkości 13000 rpm.

22. Eluat inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 min., po czym natychmiast schłodzono na lodzie. Po izolacji dokonano analizy jakościowej i ilościowej RNA.
23. Wyizolowany RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

3.2.3. Ocena ilościowa i jakościowa DNA i RNA

Oceny jakościowej oraz ilościowej DNA i RNA dokonano na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego absorbancji przy długości fali 260nm, 280nm, 320nm. Pomiaru dokonano przy użyciu spektrofotometru Nanodrop. Do pomiaru pobierano 1µl próby. Ilość DNA/RNA wyrażano w ng/µl. Stopień odbiałczenia preparatów DNA określano na podstawie stosunku absorbancji:

$$A_{260}/A_{280}$$

A_{260} - maksimum absorbancji dla kwasów nukleinowych

A_{280} - maksimum absorbancji dla białek

A_{260}/A_{280} w przedziale od 1,8 do 2,0 oznacza, że preparaty są wystarczająco oczyszczone, natomiast wartość równa 1,5 oznacza, że w badanym preparacie DNA jest 50% białka.

Oceny ilości i jakości preparatów DNA/RNA dokonano również na podstawie rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym (z dodatkiem bromku etydyny o stężeniu końcowym 0,1 µg/ml) z zastosowaniem markera DNA [Lambda DNA/HindIII firmy Fermentas] i markera RNA [0.24-9.5 Kb RNA ladder firmy Invitrogen].

3.2.4. Genotypowanie DNA

Do genotypowania przygotowano próby DNA w objętości 50 µl o stężeniu 50 ng/µl. Następnie próby wysyłano do analizy. Genotypowanie przeprowadzono w oparciu o komercyjnie dostępne kity GeneChip® human Mapping 10K SNP oraz 250K SNP Array firmy Affymetix.

3.2.5. Analiza sprzężeń

Na podstawie wyników genotypowania przeprowadzono parametryczną i nieparametryczną analizę sprzężeń. Parametryczna wielopunktowa analiza sprzężeń przeprowadzona była w oparciu o program GeneHunter, Allegro oraz Merlin. Haplotyp stworzono w oparciu o program Merlin z wykorzystaniem programu HaploPainter.⁹⁵⁻⁹⁹

3.2.6. Projektowanie primerów

Primery użyte do reakcji PCR zaprojektowano przy użyciu programu ExonPrimer oraz Primer3. Primery wykorzystane w reakcji RT-PCR, real-time PCR zaprojektowano przy użyciu programu Primer 3. Wszystkie primery były zaprojektowane tak, aby ich temperatura anealingu była na poziomie 60°C.

3.2.7. Reakcja łańcuchowa polimerazy - PCR

Reakcję PCR przeprowadzono amplifikując sekwencje kodujące wybranych genów oraz fragmenty sekwencji flankujących (ok. 50 bp). Wykaz primerów wykorzystanych w reakcjach PCR przedstawiono w załączniku (**Załącznik 2**). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli (**Tabela 4**).

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do reakcji PCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej	1 reakcja
DNA (~100ng)	1 µl
H ₂ O	9.5 µl
BIO-X-ACT	12.5 µl
Primer F (10mM)	1 µl
Primer R (10mM)	1 µl
Całkowita objętość reakcji	25 µl

Warunki reakcji PCR były następujące:

1. 96°C – 3 min.
2. 94°C – 30 sek.
3. 65°C – 30 sek. ⇒ 55 °C (-0.5°C na każdy cykl)
4. 72°C – 1 min.
5. go to step 2 – **20x**
6. 94°C – 30 sek.
7. 55°C – 30 sek.
8. 72°C – 1 min.
9. go to step 6 – **30x**
10. 72°C – 10 min.
11. 4°C – ∞

3.2.8. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR w żelu agarozowym

Produkty reakcji PCR w ilości 5 µl rozdzielano w 1,6%-1,8% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (o stężeniu końcowym 0,1 µg/ml). Na żel nanoszono marker wielkości Hyper Ladder IV firmy Bioline.

3.2.9. Oczyszczanie produktów PCR ze składników reakcji z zastosowaniem zestawu MinElute PCR purification kit firmy Qiagen

1. Na każde 100 µl próby dodano 500 µl buforu PBI i wymieszano przez pipetowanie.
2. Mieszaninę przeniesiono do kolumnki umieszczonej w probówce o objętości 2 ml i zwirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 13000 rpm przez 1 min.
3. Przesącz usunięto z próbki, umieszczono w niej kolumnkę.
4. Następnie dodano 750 µl buforu PE i zwirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 13000 rpm przez 1 min.
5. Przesącz ponownie usunięto z próbki i umieszczono w niej kolumnkę
6. Próby zwirowano w temperaturze pokojowej przy prędkości 13000 rpm przez 1 min. w celu usunięcia resztek buforu z kolumnki.
7. Umieszczono kolumnkę w probówce typu Eppendorf, dodano 50 µl wody, inkubowano przez 1 min. w temperaturze pokojowej, a następnie próby zwirowano przy prędkości 13000 rpm, przez 1 min. w temperaturze pokojowej.
8. Przesącz zawierał oczyszczony produkt.

3.2.10. Ekstrakcja produktów PCR z żelu z zastosowaniem MinElute Gel Extraction kit firmy Qiagen

1. Odpowiedni prążek wycinano z żelu agarozowego przy pomocy skalpela.
2. Po usunięciu nadmiaru agarozy fragment żelu umieszczono w probówce Eppendorf i zważono. Na każde 100 mg żelu dodano 300 µl buforu QG.
3. Żel inkubowano w temperaturze 50 °C przez 10 min. Próbę worteksowano co 2-3 min. w celu całkowitego rozpuszczenia żelu.
4. Na każde 100 mg żelu dodano 100 µl izopropanolu i delikatnie mieszano.
5. W celu związania DNA z membraną mieszaninę przeniesiono na kolumnkę umieszczoną w probówce o objętości 2 ml i zwirowano w temperaturze pokojowej przy prędkości 13000 rpm, przez 1 min.
6. Przesącz usunięto z próbki i umieszczono w niej kolumnkę.
7. Następnie dodano 500 µl buforu QG i zwirowano w temperaturze pokojowej przy prędkości 13000 rpm przez 1 min.
8. Przesącz usunięto z próbki i umieszczono w niej kolumnkę.
9. Dodano 750 µl buforu PE i zwirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 13000 rpm przez 1 min.
10. Ponownie usunięto przesącz z próbki i umieszczono w niej kolumnkę i zwirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 13000 rpm przez 1 min. celem usunięcia resztek buforu z kolumnki.
11. Kolumnkę umieszczono w probówce typu Eppendorf, dodano 10 µl wody, inkubowano 1 min. w temperaturze pokojowej. Następnie próby zwirowano w temperaturze pokojowej przy prędkości 13000 rpm przez 1 min.
12. Przesącz zawierał oczyszczony produkt reakcji PCR.

3.2.11. Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie prowadzono metodą enzymatycznej syntezy (dideoksy Sangera). Przed przygotowaniem mieszaniny reakcyjnej przygotowano optymalne stężenia matrycy do sekwencjonowania, wynoszące 2-5ng produktu PCR na każde 100 bp. W celu uzyskania odpowiedniej jakości sekwencji reakcje prowadzono wg. zmodyfikowanego protokołu, w obecności 5M betainy. Reakcje prowadzono na 96-dołkowych płytkach przeznaczonych do sekwencjonowania. Objętość końcowa reakcji wynosiła 10µl. Dla każdego produktu PCR prowadzono sekwencjonowanie w dwóch kierunkach, z primerem forward i primerem revers. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli (**Tabela 5**).

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do sekwencjonowania.

Skład mieszaniny reakcyjnej	1 reakcja
DNA (~2-5ng/μl/100bp)	1 μl
H ₂ O	3 μl
Betaina (5M)	1 μl
Buffer 5x	2 μl
BigDye®	2 μl
Starter	1 μl
Całkowita objętość reakcji	10 μl

Po dodaniu produktu PCR, wody i betainy próby inkubowano w temperaturze 96°C przez 2 min.

Warunki reakcji PCR sekwencyjnego były następujące:

1. 95°C – 3 min.
2. 95°C – 10 sek.
3. 58°C – 5 sek.
4. 60°C – 4 min.
5. Go to step 2 – 29x
6. 4°C – ∞

3.2.12. Analiza wyników sekwencjonowania

Wyniki sekwencjonowania analizowano z wykorzystaniem programu CodonCode Aligner®. Sekwencje porównywano z sekwencjami referencyjnymi z UCSC Genome Browser.

3.2.13. Synteza cDNA

cDNA syntetyzowano z wykorzystaniem kitu SuperScript III Reverse Transcriptase (firmy Invitrogen) z wykorzystaniem primerów „random hexamers” (firmy Promega).

1. Do syntezy cDNA użyto 1000ng całkowitego komórkowego RNA. Skład mieszaniny reakcyjnej do syntezy cDNA przedstawiono w tabeli (**Tabela 6**).
2. Po dodaniu wszystkich składników próby inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 min., a następnie schłodzono na lodzie przez 1 min.
3. Następnie do prób dodano 9 µl mieszaniny do syntezy cDNA. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli (**Tabela 7**).
4. Następnie przeprowadzono syntezę cDNA.

Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej 1 użytej do syntezy cDNA.

Skład mieszaniny reakcyjnej	1 reakcja
RNA	1 µg
Random primers	2 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
H ₂ O	x µl
Całkowita objętość reakcji	21 µl

Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej 2 użytej do syntezy cDNA.

Skład mieszaniny reakcyjnej	1 reakcja
5 x First Strand Buffer	6 µl
0.1 M DTT	1 µl
RNasin	1 µl
SS III - RT	1 µl
Całkowita objętość reakcji	9 µl

Warunki syntezy cDNA przedstawiono poniżej:

1. Inkubacja w temperaturze 25°C przez 5 min.
2. Inkubacja w temperaturze 50°C przez 1 h.
3. Inkubacja w temperaturze 70°C przez 15 min.

Następnie przeprowadzono reakcję RT-PCR z primerami kontrolnym celem sprawdzenia syntezy cDNA oraz z primerami specyficznymi dla badanego genu. Tak uzyskany cDNA wykorzystywano w reakcji RT-PCR oraz real-time PCR.

3.2.14. RT-PCR

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej w reakcji RT-PCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej	1 reakcja
cDNA	1 µl
H ₂ O	9.5 µl
BIO-X-ACT	12.5 µl
Primer F (10mM)	1 µl
Primer R (10mM)	1 µl
Całkowita objętość reakcji	25 µl

Warunki reakcji RT-PCR:

1. 94°C – 1 min.
2. 94°C – 30 sek.
3. 55°C – 45 sek.
4. 72°C – 45 sek.
5. go to step 2 – **35x**
6. 15°C – ∞

Tabela 9. Sekwencje primerów wykorzystanych w reakcji RT-PCR.

	Nazwa primera	Sekwencja
A.	IFT122_RT-5'UTR-1-f	GGTAACGCAGGTAGCCAAAG
B.	IFT122_RT-ex7-r	GATCTTGCTGCTTGATTTGTG
C.	IFT122_RT-ex10_11-r	CCAATCTGTTTTCCAATCAGC
D.	IFT122_RT-ex6-r	GCCAGTTGATGAGTAATAGGATTG
E.	IFT122_RT-ex3_7-r	GAGACCACAACCCATCCTTC
F.	IFT122_RT-ex4_7-r	CACAACCGTGTACTTCAGAATG

Kombinacje primerów wykorzystanych reakcji RT-PCR:

1. A+ B kombinacja primerów, z którymi można amplifikować wszystkie transkrypty genu *IFT122*.
2. A+C kombinacja primerów, z którymi można amplifikować wszystkie transkrypty genu *IFT122*.
3. A+D specyficzne dla nowego transkryptu N z pominięciem eksonu 6 genu *IFT122*.
4. A+E specyficzne dla izoformy 4 genu *IFT122*.
5. A+F specyficzne dla izoformy 3 genu *IFT122*.

3.2.15. Real-time PCR

W celu oceny ilości poszczególnych transkryptów genu *IFT122* przeprowadzono reakcję real-time PCR z primerami specyficznymi dla transkryptu 3, 4 oraz nowego transkryptu N (transkryptu z pominięciem eksonu 6 genu *IFT122*). Reakcje przeprowadzono w specjalnych płytkach (96-Well Optical Reaction Plates) na urządzeniu Applied Biosystems 7900 (Applied Biosystems). Do reakcji wykorzystano cDNA pacjenta CED-03/4 oraz trzech kontroli. Objętość końcowa reakcji wynosiła 30 µl. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli (**Tabela 10**). Każda z prób analizowana była w trzech powtórzeniach. Normalizacji wyników dokonano na podstawie poziomu ekspresji GAPDH. Sekwencje primerów wykorzystanych w reakcji przedstawiono w tabeli (**Tabela 11**).

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej w reakcji real-time PCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej	1 reakcja
cDNA (rozcieńczenie 1:10)	10 µl
Primer F (2.5µM)	5 µl
Primer R (2.5µM)	5 µl
SYBR®Green PCR Master Mix	15 µl
Całkowita objętość reakcji	30 µl

Warunki reakcji były następujące:

1. 50°C – 2 min.
2. 95°C – 10 min.
3. 95°C – 15 sek.; 55°C – 1 min. -> 40 cykli
4. 95°C – 15 sek.; 60°C – 15 sek.; 95°C – 15 sek.

Tabela 11. Sekwencje primerów wykorzystanych w reakcji real-time PCR.

	Izoformy	Nazwa primera	Sekwencja	Wielkość produktu
1	Izoforma 3	IFT122_izofoma3_ex6_7_f	TCCAGTGACTTTGGGTTGTG	
2		IFT122_izofoma3_ex8_10_r	GATGTCATTACGTTCTCTTG	246 bp
3	Transkrypt N	IFT122_transkrypt_N_ex4_7_f	GCATTCTGAAGTACACGGTTG	
4		IFT122_transkrypt_N_ex8_r	CAGCGCCAGGTA CTGACC	114 bp
5	Izoforma 4	IFT122_izofoma4_ex2_3_f	GCAGATTACTGGTTTATGACACCTC	
6		IFT122_izofoma4_ex3_7_r	GAGACCACAACCCATCCTTC	108 bp

Istotność uzyskanych wyników obliczono na podstawie testu t-studenta.

$$t = \frac{\bar{x}_{p1} - \bar{x}_{p2}}{\sqrt{\frac{\sigma_{p1}^2}{n_1} + \frac{\sigma_{p2}^2}{n_2}}}$$

\bar{x} - wartość mean

σ - odchylenie standardowe (St.dev)

n - liczba prób

Wartości poziomu istotności uzyskanych wyników obliczono z wykorzystaniem kalkulatora do obliczeń dla testu t-studenta.

3.2.16. Hodowla linii komórkowych (fibroblastów skóry)

Rozmrażanie komórek

1. Komórki rozmrażano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez ok. 1 min.
2. Po rozmrożeniu komórki przenoszono do probówki typu falkon zawierającej 10 ml medium hodowlanego (DMEM zawierającego 10% FCS, glutaminę oraz mieszaninę antybiotyków penicylina/streptomycyna). Medium przed użyciem podgrzano do temperatury 37°C.
3. Komórki zawieszono w medium hodowlanym przez pipetowanie góra-dół.
4. Następnie komórki zwirowano w temperaturze pokojowej przez 5 min., 1000 rpm.
5. Supernatant zebrano, a osad komórek zawieszono w 3 ml medium DMEM.
6. Do naczynia hodowlanego (o powierzchni 75 cm²) dodano 12 ml medium hodowlanego i dodano komórki.
7. Naczynie hodowlane umieszczono w inkubatorze i inkubowano w temperaturze 37°C przez noc.
8. Następnego dnia medium wymieniano na świeże (15 ml) i oceniano wzrost komórek.

Pasażowanie komórek

1. Po osiągnięciu przez komórki właściwego stanu konfluencji przeprowadzono pasażowanie komórek.
2. Usuwano stare medium i przemywano komórki 10 ml sterylnego 1x PBS.
3. Dodano 2 ml trypsyny i prowadzono inkubację w temperaturze 37°C. przez 3 min. celem odklejenia komórek od podłoża naczynia hodowlanego.
4. Następnie dodano 10 ml świeżego medium hodowlanego w celu zatrzymania procesu trypsynizacji.
5. Komórki pasażowano dodając po 4 ml zawiesiny do nowego naczynia hodowlanego i uzupełniano 11 ml świeżego medium DMEM.
6. Codziennie oceniano wzrost komórek pod mikroskopem i wymieniano medium na świeże.
7. Komórki pasażowano 3 razy w tygodniu.

Pomiar ilości komórek

1. Do pomiaru ilości komórek pobierano 100 µl hodowli.
2. Pomiaru ilości komórek dokonano na urządzeniu CASY1 system.

Zamrażanie komórek

1. Z naczynia hodowlanego usuwano medium.
2. Komórki przemywano 5 ml buforu 1x PBS.
3. Następnie prowadzono trypsynizację przez dodanie 2 ml trypsyny.
4. Próby inkubowano w temperaturze 37°C przez 3 min. celem odklejenia komórek od podłoża naczynia hodowlanego.
5. Następnie dodano 10 ml świeżego medium hodowlanego w celu zatrzymania procesu trypsynizacji.
6. Zawiesinę przenoszono do 15 ml probówki i wirowano w temperaturze pokojowej przez 5 min., 1000rpm.
7. Supernatant usuwano, a komórki zawieszono w 1,5 ml medium do mrożenia komórek.
8. Zawiesinę przenoszono do specjalnych probówek i umieszczono w pojemniku do mrożenia w temperaturze -80°C i przechowywano przez przynajmniej 24 h. Następnie próby umieszczono w ciekłym azocie.

3.2.17. Analiza ilości i długości rzęsek w fibroblastach skóry

Badania wykonane zostały we współpracy z Prof. Jonathanem Eggenschwiller'em, Department of Molecular Biology, Princeton University, USA.

W celu wykonania badań podczas operacji przepuklin pachwinowych pobrano od pacjenta CED-01/2 fragment skóry, tkanki podskórnej oraz fragment worka przepuklinowego z których założono linie komórkowe. W eksperymencie wykorzystano trzy linie fibroblastów skóry pacjenta CED-01/2 oraz trzech linie komórkowe fibroblastów skóry pochodzące od osób zdrowych.

Fibroblasty skóry pacjenta oraz kontroli były hodowane w medium DMEM zawierającym 10% płodową surowicę bydlęcą (FBS), glutaminę oraz mieszaninę antybiotyków penicylinę/streptomycynę.

1. Komórki umieszczono na szkiełkach nakrywkowych pokrytych żelatyną oraz na szkiełkach pokrytych fibronektyną w ilości $10^5/\text{cm}^2$.
2. Następnie zmieniono medium hodowlane DMEM na medium optiMem i prowadzono hodowlę przez 72 h.
3. Komórki utrwalono i blokowano w 10% surowicy.
4. W celu wizualizacji struktur rzęsek w komórkach prowadzono inkubację z przeciwciałami barwiącymi acetylowaną α -tubulinę (mouse anti-acetylated α -tubulin, 1:2500) w temperaturze 4°C przez noc.
5. Następnego dnia preparaty przemyto i inkubowano przez noc z przeciwciałami drugorzędowymi (Cy2) oraz barwnikiem TO-PRO-3 pozwalającym na wizualizację jąder komórkowych.
6. Próby przemyto i umieszczono na szkiełku i poddano analizie.
7. Analizowano trzy szkiełka dla każdej z 6 linii komórkowych (trzy kontrolne linie komórkowe oraz trzy linie komórkowe pacjenta).
8. Próby analizowano na mikroskopie konfokalnym (PerkinElmer RS3 Spinning Disk Confocal Microscope) zawierającym kamerę (EMCCD, Hamamatsu C9100-13).
9. Dla każdego szkiełka wykonano 5 zdjęć, na podstawie których przeprowadzono analizę ilości i długości rzęsek.

W celu oceny liczby rzęsek obliczono stosunek liczby rzęsek do liczby jąder komórkowych dla każdego szkiełka (dla szkiełek pokrytych żelatyną i fibronektyną). Długość rzęsek mierzono z wykorzystaniem programu NIH ImageJ. Oceny istotności uzyskanych wyników dokonano na podstawie obliczeń statystycznych (test t-studenta).

3.2.18. Ocena cyklu komórkowego i morfologii fibroblastów skóry

Do oceny przebiegu cyklu komórkowego wykorzystano fibroblasty skóry pacjenta CED-01/2 oraz fibroblasty skóry pochodzące od osoby zdrowej, które stanowiły próbę kontrolną.

1. Hodowlę fibroblastów skóry prowadzono na płytkach 12-dołkowych zawierających szkiełka nakrywkowe. Ilość komórek użytych do eksperymentu wynosiła $10^4/1$ ml/ na 1 dołek.
2. Hodowlę prowadzono przez 24 h.
3. Komórki utrwalano dodając 4% PFM.
4. Do prób dodano 150 μ l roztworu blokującego NGS (Normal Goat Serum, 1:10) i próby inkubowano w temperaturze 4°C przez 1-2 h (lub przez noc).
5. Po przeprowadzonej inkubacji usuwano NGS, próby przemywano 400 μ l PBST.
6. Następnie dodano przeciwciała pierwszorzędowe specyficzne dla α -tubuliny (rat anti-acetylated α -tubulin 1:500) oraz falloidynę (1:15) skoniugowaną z fluoroforem i barwiącą aktywną. Próby inkubowano z przeciwciałami przez 1 h w temperaturze 4°C.
7. Po zakończonej inkubacji szkiełka przemywano trzykrotnie roztworem PBST i dodano odpowiednie przeciwciała drugorzędowe Alexa (1:1000).
8. Próby inkubowano przez 1 h w temperaturze 4°C. Po 50 min. inkubacji do każdej z prób dodano 10 μ l DAPI barwiącego jądra komórkowe.
9. Szkiełka nakrywkowe umieszczono i przytwierdzono na szkiełku podstawowym.
10. Próby analizowano na mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM510 meta.

3.2.19. Knockdown genu *ift122* w modelu zwierzęcym *Danio rerio*

Badania wykonane zostały we współpracy z Prof. Philip'em Beales'em, Molecular Medicine Unit, University College London (UCL) Institute of Child Health, UK.

1. Hodowle *Danio rerio* prowadzono (AB x Tup Longfin) według standardowych procedur.¹⁰⁰
2. Do embrionów w stadium 1-2 komórek wprowadzono 4-8 ng morfolino i inkubowano w temperaturze 28.5 °C aż do osiągnięcia odpowiedniego wieku.
3. Do analiz immunofluorescencyjnych wykorzystano przeciwciała dla α - i γ -tubuliny (Sigma, T6793 i T6667, w rozcieńczeniu 1:500). Przeciwciała dla α -tubuliny były wykorzystane w celu uwidocznienia struktur rzęsek, natomiast przeciwciała rozpoznające γ -tubulinę były wykorzystane w celu uwidocznienia centrosomów.

Próby utrwalono 4% PFA. Jako przeciwciała drugorzędowe wykorzystano odpowiednie przeciwciała Alexa (w rozcieńczeniu 1:1000).

4. Hybrydyzacja *in situ* dla *shha7* oraz *ptc18* była wykonana według standardowych technik.¹⁰¹
5. Wyniki analizowano na mikroskopie fluorescencyjnym Zeiss LSM710.

3.2.20. Analiza profilu ekspresji całego genomu

Analizę profilu ekspresji całego genomu wykonano z zastosowaniem chipu Whole-Genome Gene Expression Profiling (6-sample BeadChip Illumina). Do badań wykorzystano RNA wyizolowane z fibroblastów skóry pacjenta (CED-01/2) oraz kontroli. Amplifikację RNA wykonano z zastosowaniem zestawu Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit firmy Ambion.

I. Izolacja RNA z zastosowaniem trizolu.

II. Przygotowanie cRNA.

A. Odwrotna transkrypcja i synteza pierwszej nici cDNA.

1. 500 ng RNA zawieszono w końcowej objętości 11 µl wody wolnej od Rnaz.
2. Dodano 9 µl mieszaniny *Reverse Transcription Master Mix**.
3. Mieszaninę inkubowano przez 2 h w temperaturze 42°C.

B. Synteza drugiej nici cDNA.

1. Do każdej próby dodano 80 µl mieszaniny *Sekond Strand Master Mix**.
2. Mieszaninę inkubowano przez 2 h w temperaturze 16°C.

C. Oczyszczanie cDNA.

1. Wodę wolną od Rnaz podgrzano do temperatury 50-55°C.
2. Do każdej próby dodano 250 µl *cDNA Binding Buffer**.
3. Mieszaninę naniesiono na kolumnę *cDNA Filter Cartridge*.
4. Dodano 500 µl buforu *Wash*.
5. cDNA wymyto z kolumny przy użyciu 75 µl wody wolnej od Rnaz.

D. Transkrypcja *in vitro*, synteza cRNA.

1. Do każdej próby dodano 7,5 µl *IVT Master Mix*, a następnie wymieszano.
2. Próby inkubowano przez 4-14 h w temperaturze 37°C.
3. Następnie do każdej próby dodano 75 µl wody wolnej od Rnaz.

E. Oczyszczanie cRNA.

1. Wodę wolną od Rnaz podgrzano do temperatury 50-55°C.
2. Do każdej próby dodano 350 µl *cRNA Binding Buffer*.
3. Następnie do każdej próby dodano 250 µl etanolu i wymieszano 3 razy.
4. Próby naniesiono na kolumny cRNA Filter Cartridge.
5. Próby przemyto 650 µl buforu Wash.
6. cRNA wymyto z kolumny przy użyciu 100 µl wody wolnej od Rnaz.

III. Hybrydyzacja

1. Do 1.5 µg RNA dodano 20 µl wody wolnej od Rnaz i wymieszano.
2. Próby inkubowano przez 10 min. w temperaturze pokojowej celem rozpuszczenia cRNA.
3. Bufor HYBE1 inkubowano w temperaturze 55°C przez 10 min.
4. Przygotowano mieszaninę do hybrydyzacji (dodano 165 µl wcześniej przygotowanego buforu HybE1 i 99 µl formamidu, mieszaninę wytrząsano).
5. Do każdej próby cRNA dodano 40 µl mieszaniny do hybrydyzacji (HybE1 + formamid, próby wytrząsano).
6. Na BeadChip naniesiono 60 µl każdej próby, które wcześniej inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 min.
7. Hybrydyzację prowadzono przez 16-20 h w temperaturze 55 °C.
8. Następnie przygotowano bufor 1x High-Temp Wash (50 ml 10x Stock + 450 ml wody wolnej od Rnaz), bufor inkubowano przez noc w temperaturze 55°C.
9. Następnego dnia przygotowano roztwór Wash E1BC (3 ml buforu E1BC + 1l wody wolnej od Rnaz).
10. Przygotowano bufor Block E1 (2 ml/chip) zawierający streptawidynę-Cy3 (2 µl ze stoku 1 mg/ml/chip) i przechowywano w ciemności.
11. BeadChip inkubowano w temperaturze pokojowej w 250 ml roztworu Wash E1BC.
12. Następnie przeprowadzono inkubację przez 10 min. w buforze High-Temp Wash.
13. BeadChip przemyto w 250 ml roztworu Wash E1BC w temperaturze pokojowej z zastosowaniem orbitalnego mieszacza przez 5 min.
14. BeadChip przemyto 250 ml 100% etanolu z zastosowaniem orbitalnego mieszacza przez 10 min.
15. BeadChip przemyto w 250 ml roztworu Wash E1BC w temperaturze pokojowej z zastosowaniem orbitalnego mieszacza przez 2 min.
16. Blokowanie - BeadChip inkubowano przez 10 min. w 4 ml buforu Block E1.

17. Detekcja - BeadChip inkubowano w przez 10 min. w 2 ml buforu Block E1 + streptawidyna-Cy3.
18. BeadChip przemyto w 250 ml roztworu Wash E1BC w temperaturze pokojowej z zastosowaniem orbitalnego mieszacza przez 5 min.

IV. Suszenie.

BeadChip wirowano w temperaturze pokojowej przez 4 min. przy prędkości 275 rcf.

V. Skanowanie.

VI. Analiza wyników z wykorzystaniem programu Bead Studio firmy Illumina.

3.2.21. Analiza *in silico*

3.2.21.1. PCR *in silico*

W celu sprawdzenia specyficzności zaprojektowanych primreów do reakcji PCR przeprowadzono analizę UCSC *in silico* PCR, która pozwała na określenie, czy z wykorzystaniem danej pary primerów można specyficznie zamplifikować określoną sekwencję.

3.2.21.2. Analiza zmian *missens* zidentyfikowanych w obrębie genu *IFT122*

Na podstawie danych zawartych w HapMap Consortium w genomie człowieka znajduje się około 10 milionów polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs), które występują z dużą częstością (>1%). 67 000 – 200 000 z nich to nsSNPs (nonsynonumous coding SNPs), które powodują zmianę aminokwasu w danym białku. Dlatego w przypadku identyfikacji zmiany typu *missens* w danym genie bardzo ważne jest scharakteryzowanie czy dany wariant jest polimorfizmem i czy może mieć negatywny wpływ na białko. W takiej sytuacji w celu wykluczenia, że dana zmiana jest rzadkim, dotychczas nie zidentyfikowanym polimorfizmem, przeprowadza się analizę DNA w dużej grupie kontrolnej (minimum 100 kontroli). W przypadku potwierdzenia, że dany wariant nie jest rzadkim polimorfizmem należy sprawdzić czy ma on wpływ na białko. Ze względu na to, że przeprowadzenie badań funkcjonalnych jest stosunkowo drogie i czasochłonne stworzono programy komputerowe służące do przewidywania *in silico* czy dana zmiana może mieć wpływ na określone białko. Programy te analizują wpływ zmian *missens* na białko na podstawie sekwencji lub na podstawie struktury danego białka.¹⁰²

Program SIFT (*Sorting Tolerant From Intolerant*)

Program SIFT dokonuje oceny wpływu danej zmiany *missens* na białko na podstawie analizy homologii sekwencji badanego białka. Analiza w oparciu o program SIFT pozwala określić czy dana zmiana ma negatywny wpływ na białko („Damaging“) czy jest tolerowana przez białko („Tolerated“). Decyduje o tym współczynnik SIFT (SIFT score), kiedy jego wartość jest poniżej 0.05 to świadczy to o patogennym charakterze danego wariantu na analizowane białko.¹⁰³

Program Polyphen-2 (Polymorphism Phenotyping v2)

Program Polyphen służy do wykonywania analiz *in silico*, przewidywania i określania wpływu substytucji aminokwasów na strukturę oraz funkcję w obrębie danego białka na podstawie konserwatywności sekwencji oraz struktury danego białka.¹⁰⁴

Oceny dokonuje się na trzech poziomach:

1. „Probably damaging“ - oznacza, że dana substytucja najprawdopodobniej ma istotny wpływ na strukturę oraz funkcję określonego białka.
2. „Possibly damaging“ - oznacza, że dana substytucja prawdopodobnie ma wpływ na strukturę oraz funkcję określonego białka.
3. „Benign“ - oznacza, że dana substytucja najprawdopodobniej nie ma istotnego wpływu na strukturę oraz funkcję określonego białka.

Analizę przeprowadza się na podstawie dwóch modeli:

1. **HumDiv** – analiza na podstawie oceny występowania rzadkich alleli (zawiera m.in. 3155 alleli z bazy UniProt o patogennym charakterze powodujących choroby u człowieka i wpływających na funkcje danego białka oraz z 6321 alleli, które nie mają patogennego wpływu na białko).
2. **HumVar** – analizy na podstawie rozróżnienia pomiędzy mutacjami mającymi znaczący wpływ na białko od pozostałych zmian o małym i średnim wpływie na białko (zawiera 13 032 różnych mutacji z bazy UniProt powodujących choroby u człowieka i 8946 nsSNPs nie mających wpływu na wystąpienie choroby, które traktowane są jako nie mające wpływu na dane białko).

3.2.21.3. Ocena zmian w sekwencji intronowej

Podobnie jak w przypadku oceny wpływu zmian typu *missens* na białko, istnieją również programy służące do określenia wpływu zmian zidentyfikowanych w sekwencji intronowej DNA na miejsca donorowe i akceptorowe pełniące ważną rolę w prawidłowym przebiegu procesu składania pierwotnego transkryptu (splicingu).

Program ESE (exonic splicing enhancer finder)

Program ESE pozwala na identyfikację miejsc donorowych, akceptorowych i miejsca rozgałęzienia w analizowanej sekwencji DNA oraz określenie czy dane miejsce splicingowe jest aktywne.^{105,106}

Program NetGene2 Server (Center for Biological Sequence Analysis CBS)

Program NetGene2 server pozwala na analizę sekwencji DNA i występujących w niej miejsc donorowych oraz akceptorowych u organizmów takich jak *C. elegans*, *A. thaliana* oraz *H.sapiens*. Analizowana sekwencja powinna mieć więcej niż 200 nukleotydów (preferowana długość sekwencji powinna być > 250 nt) i krótsza niż 80 000 nt.^{107,108}

3.2.21.4. Analiza m-fold (DNA folding form)

Poprawność zaprojektowanych primerów wykorzystanych w reakcji real-time PCR sprawdzano przy użyciu programu m-fold.¹⁰⁹ Sekwencje analizowano pod względem powstawania tzw. pętli (*ang. stem loops*) głównie w regionie wiązania się primerów. Sekwencje produktu analizowano (*in silico*) przy następujących parametrach:

- temperatura fałdowania - 58°C
- stężenie Na⁺ - 50 mM
- stężenie Mg⁺⁺ - 1,5 mM
- dG > - 2

3.2.21.5. Analiza DAVID

Wyniki uzyskane na podstawie analizy profilu ekspresji całego genomu z wykorzystaniem chipu Whole-Genome Gene Expression profiling (6-sample BeadChip Illumina) poddano analizie z wykorzystaniem programu BeadStudio, który pozwolił na stworzenie listy genów, które uległy zwiększonej oraz zmniejszonej ekspresji w stosunku do kontroli. Do dalszej analizy *in silico* uzyskanych wyników wykorzystano program DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).^{110,111}

W celu przeprowadzenia analizy stworzono listę genów, które uległy zwiększonej oraz zmniejszonej ekspresji w porównaniu do próby kontrolnej.

Listę genów przygotowano według wytycznych:

- Detection score > 0.99/Detection p value < 0.01,
- Diff. score > 20 (dla genów o zwiększonym poziomie ekspresji),
- Diff. score < -20 (dla genów o zmniejszonym poziomie ekspresji).

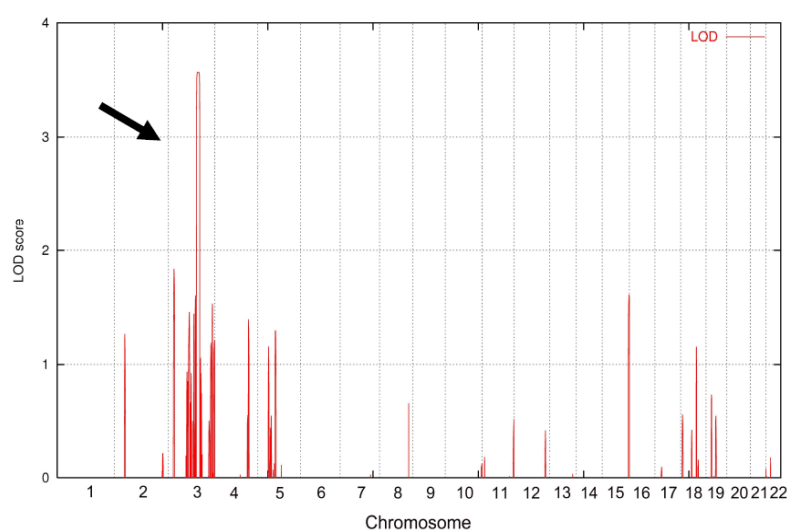
Tak uzyskane listy poddano analizie bioinformatycznej w oparciu o tzw. functional annotation clustering, pozwalający na zgrupowanie genów pod względem podobieństwa pełnionej funkcji lub pod względem udziału w tym samym procesie jak np. cykl komórkowy czy udział w tym samym szlaku przekazywania informacji w komórce.

4. WYNIKI

4.1. Analiza sprzężeń

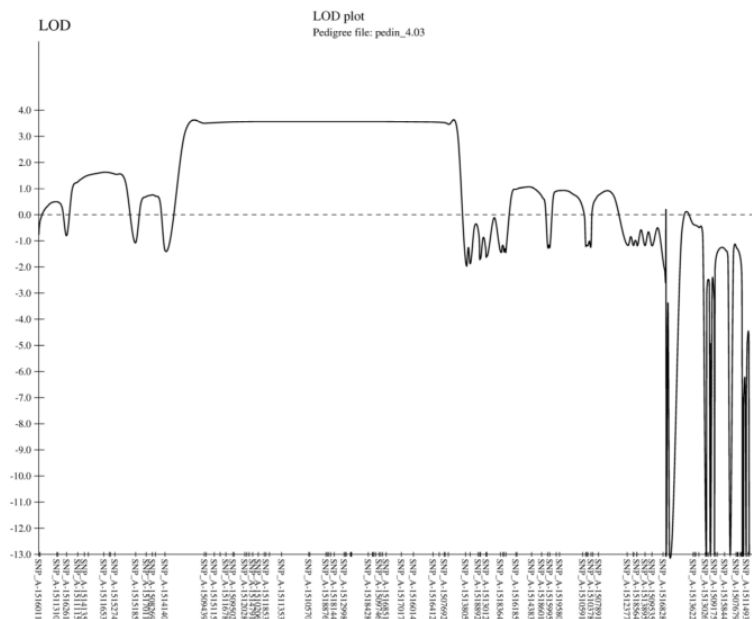
W celu identyfikacji *locus* dla zespołu Sensenbrenner przeprowadzono analizę sprzężeń oraz mapowanie homozygotyczne. Próby DNA wszystkich członków rodziny CED-01 były genotypowane z zastosowaniem komercyjnego chipu GeneChip® Human Mapping 10K Array firmy Affymetrix.

Wielopunktowa, parametryczna analiza sprzężeń została przeprowadzona z zastosowaniem programu Merlin oraz Genehunter, zakładając autosomalny recesywny sposób dziedziczenia choroby oraz to, że rodzice są spokrewnieni na poziomie kuzynostwa czwartego stopnia. Przeprowadzona analiza zarówno z wykorzystaniem programu Merlin jak i programu Genehunter pozwoliła na zidentyfikowanie jednego regionu homozygotycznego ze współczynnikiem Lod score 3.57 świadczącym o sprzężeniu. Wynik analizy sprzężeń przeprowadzony w oparciu o program Merlin przedstawiono na rycinie (**Rycina 22**), natomiast wyniki analizy sprzężeń przeprowadzone w oparciu o program Genehunter przedstawiono na rycinie (**Rycina 23**). Zidentyfikowany interwał sprzężenia zlokalizowany jest na chromosomie 3q21-3q24 pomiędzy markerami rs977683 i rs1992093 (126,913,874-143,689,472). Rodzice są heterozygotami dla zidentyfikowanego regionu. Haplotyp interwału sprzężenia przedstawiono na rycinie (**Rycina 24**). Region homozygotyczny obejmuje 16.7 Mbp i zawiera 124 geny kodujące białka i zawierające sekwencje referencyjną (RefSeq). Lokalizację *locus* dla zespołu Sensenbrenner przedstawiono na rycinie (**Rycina 25**).

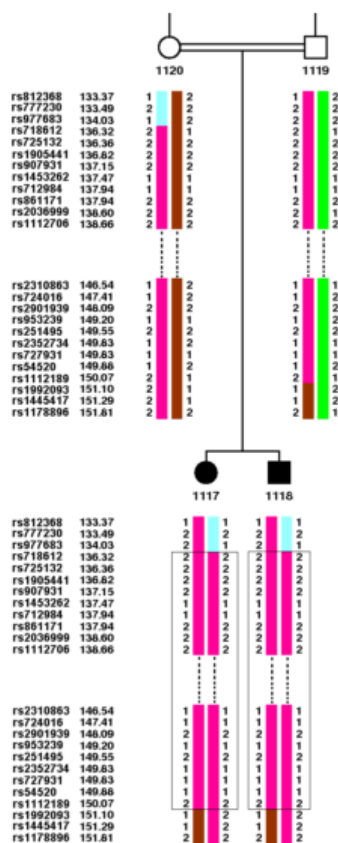


Rycina 22.

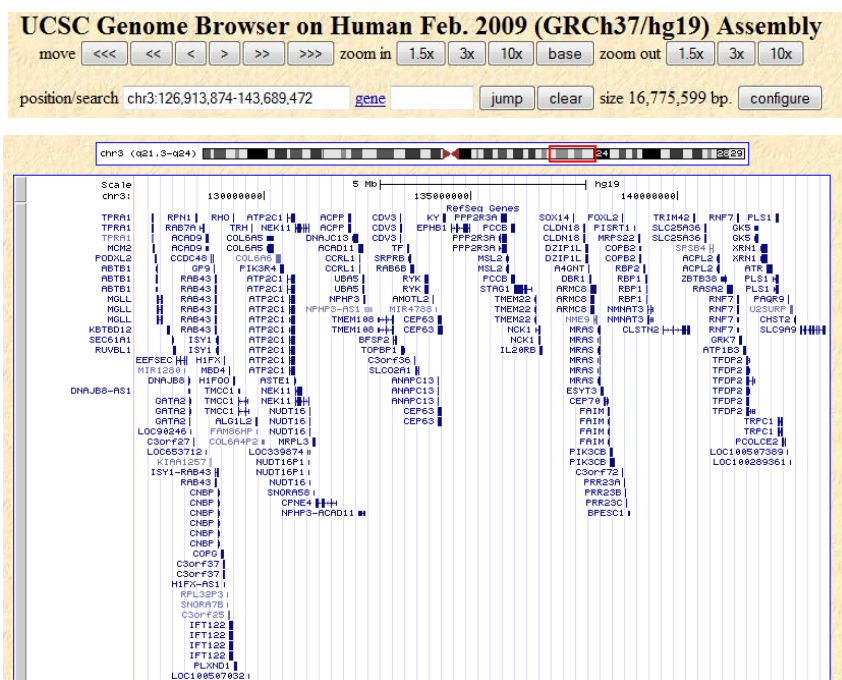
Wynik parametrycznej analizy sprzężeń. Program Merlin. Lokalizacja jedyne interwału sprzężenia na chromosomie 3. Oznaczono strzałką. Lod score 3.57.



Rycina 23. Wynik parametrycznej analizy sprzężeń. Program Genehunter. Lokalizacja jedynego interwału sprzężenia na chromosomie 3. Lod score 3.57.



Rycina 24. Haplotyp interwału sprzężenia. Region homozygotyczny zlokalizowany jest pomiędzy markerami rs977683 i rs1992093.



Rycina 25.

Lokalizacja regionu homozygotycznego na chromosomie 3q21.3-q24. W obrębie interwału występują 124 geny zawierające sekwencje referencyjne (UCSC Genome Browser).

4.2. Analiza genów kandydujących

Listę genów kandydujących z regionu homozygotycznego, które poddano analizie przedstawiono w tabeli (Tabela 12).

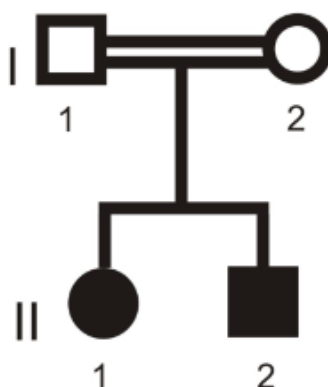
Tabela 12. Lista genów kandydujących z locus dla CED, które poddano analizie.

1.	A4GNT	21.	DZIP1L	41.	MSL2L1	61.	RPN1
2.	ABTB1	22.	EEFSEK	42.	NCK1	62.	RUVBL1
3.	ACPL2	23.	EPHB1	43.	NMNAT3	63.	RYK
4.	ACPP	24.	FAIM	44.	NPHP3	64.	SEK61A1
5.	AMOTL2	25.	FAM62C	45.	NUDT16	65.	SLC25A36
6.	ANAPC13	26.	FLJ35880	46.	PAQR9	66.	SLCO2A1
7.	ARMC8	27.	FOXL2	47.	PCCB	67.	SOX14
8.	ASTE	28.	GATA2	48.	PCOLCE2	68.	SRPRB
9.	ATP1B3	29.	GK5	49.	PIK3CB	69.	STAG1
10.	BFSP2	30.	GRK7	50.	PLS1	70.	TF
11.	C3orf36	31.	H1FX	51.	PODXL2	71.	TFDP2
12.	CDV3	32.	IFT122	52.	PPP2R3A	72.	TMEM108
13.	CEP63	33.	IL20RB	53.	RAB43	73.	TMEM22
14.	CEP70	34.	KLHDC6	54.	RAB6B	74.	TOPBP1
15.	CHST2	35.	KY	55.	RAB7A	75.	TRH
16.	CLDN18	36.	MBD4	56.	RASA2	76.	TRIM42
17.	CLSTN2	37.	MGLL	57.	RBP1	77.	TRPC1
18.	CNBP	38.	MRAS	58.	RBP2	78.	TXNDC6
19.	COPB2	39.	MRPL3	59.	RHO	79.	UBE1DC1
20.	DBR1	40.	MRPS22	60.	RNF7		

4.3. Analiza genu *IFT122*

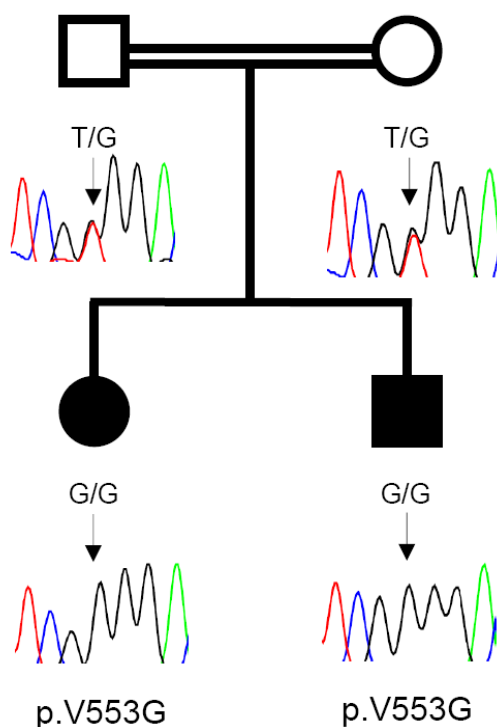
4.3.1. Rodzina CED-01

Rodzina CED-01 obejmuje polskie rodzeństwo z zespołem Sensenbrenner, zdrowych, daleko spokrewnionych rodziców.



Rycina 26.
Rodowód rodziny CED-01.

Przeprowadzona analiza genu *IFT122* w rodzinie CED-01 pozwoliła na identyfikację homozygotycznej zmiany T->G w eksonie 15 genu *IFT122* u pacjentów z zespołem Sensenbrenner. Rodzice natomiast są heterozygotami dla zidentyfikowanego wariantu. Substytucja T->G powoduje zmianę wysoce konserwatywnej waliny na glicynę we wszystkich czterech izoformach białka IFT122. Substytucja ta nie jest znanym polimorfizmem SNP (UCSC Genome Browser). Zmiany tej nie zidentyfikowano również wśród 340 kontrolnych chromosomów. Na tej podstawie wykluczono, iż wariant ten jest rzadkim polimorfizmem.

**Rycina 27.**

Rodzowód rodziny CED-01. Wynik analizy genu *IFT122*. Analiza kosegragacji zidentyfikowanej zmiany p.V553G.

Opis kliniczny pacjentów z rodziny CED-01

Pacjent 1 (proband), dziewczynka z ciąży pierwszej, zdrowych rodziców. W trakcie badań molekularnych wykazano później, że rodzice są ze sobą spokrewnieni. W momencie urodzenia dziecka matka miała 16 lat, natomiast ojciec miał 25 lat. Przeprowadzona analiza kariotypu rodziców wykazała, iż matka (46,XX,inv(9)(p.11q.13)) ma prawidłowy kariotyp żeński, przy czym jest nosicielką inwersji w chromosomie 9, będącej polimorfizmem, natomiast ojciec ma prawidłowy kariotyp męski (46,XY).

Dziewczynka urodzona o czasie, z ciąży bez powikłań. Masa urodzeniowa wynosiła 3,6 kg (50 centyl), długość ciała 57 cm (97 centyl), obwód głowy 35 cm (50 centyl), a obwód klatki piersiowej 34 cm (50 centyl). W badaniu stwierdzono obniżone napięcie mięśniowe oraz zaznaczone cechy dysmorfii tj. skrócenie kończyn, wystający brzuch, brachydaktylia, dolichocefalia, wysokie czoło, wydatne małżowiny uszne, pełne policzki, telekantus, szeroka nasada nosa, nisko osadzone i odstające uszy, obustronną przepuklinę pachwinową. W badaniu klinicznym stwierdzono również obecność zmian ektodermalnych typowych dla zespołu Sensenbrenner tj. małe i niewłaściwie rozmieszczone zęby, cienkie włosy, nadmiernie elastyczną skórę

oraz zmiany w obrębie paznokci. U dziewczynki stwierdzono okresowy niedosłuch ze względu na bardzo wąskie przewody słuchowe. Pacjentka jest pod stałą opieką audiologa. W pierwszym roku życia pacjentka miała częste infekcje układu oddechowego. Obustronna przepuklina pachwinowa została zoperowana w wieku dwóch lat. Pierwsze oznaki niewydolności nerek stwierdzono w wieku czterech lat. Badanie ultrasonograficzne wykazało prawidłową wielkość obu nerek z zatartą granicą koro-rdzeniową. U pacjentki zdiagnozowano pierwszy stopień przewlekłej choroby nerek. Przeprowadzone badania nie wykazały zmian w obrębie wątroby. W wieku pięciu lat masa ciała wynosiła 14.5 kg (5 centyl), wzrost 104 cm (25 centyl), a obwód głowy wynosił 49.5cm (50 centyl). Rozwój psychomotoryczny jest prawidłowy. Badanie okulistyczne dna oka nie wykazało zmian w obrębie siatkówki. Przeprowadzona analiza kariotypu wykazała prawidłowy kariotyp żeński (46,XX). Obraz kliniczny pacjenta 1 przedstawiono na rycinach (Rycina 28-31).



Rycina 28.

Proband (pacjent 1) z rodziny CED-01 w wieku trzech lat. Skrócenie kończyn (głównie górnych), wąska i krótka klatka piersiowa, wystający brzuch i charakterystyczna dla zespołu Sensenbrenner dysmorfia twarzy. Dolichocefalia i łódkogłowie, wydatne i wysokie czoło, nisko osadzone odstające uszy, pełne policzki, szeroka i niska nasada nosa, skośno-górne ustawienie szpar powiekowych, niewielkie zmarszczki nakątne, telekantus, długa i gładka rynienka podnosowa, mała żuchwa.



Rycina 29.

Nieprawidłowości dłoni i stóp u pacjenta 1. Brachydaktylia, klinodaktylia (głównie drugiego i piątego palca dłoni), niewielka jednostronna syndaktylia drugiego i trzeciego palca stóp. Szeroki odstęp pomiędzy pierwszym a drugim palcem stóp.



Rycina 30.

Zmiany ektodermalne u pacjenta 1. Cienkie i rzadkie włosy z nieprawidłowym wirem włosów, małe zęby o nieprawidłowym kształcie. Ponadto widoczna łódkowata czaszka.



Rycina 31.

Nadmiernie elastyczna skóra u pacjenta 1.

Pacjent 2, brat probandki. Chłopiec urodzony o czasie z ciąży bez powikłań. Masa urodzeniowa wynosiła 3,5 kg (50 centyl), długość ciała 54 cm (90 centyl). Cechy dysmorfii były prawie identyczne jak te stwierdzone u pacjentki 1. Analiza echokardiograficzna wykazała prawidłowy obraz serca. Badanie ultrasonograficzne brzucha przeprowadzone w wieku siedmiu miesięcy wykazało zatartą granicę koro-rdzeniową nerki oraz prawidłowy obraz wątroby, trzustki oraz śledziony. W kolejnych badaniach USG stwierdzono powiększoną i niejednorodną strukturę wątroby z hipoechogenicznymi pasmowatymi ogniskami, układającymi się wzdłuż silnie echogenicznych naczyń wrotnych oraz wzmożoną echogenicznością i zmniejszenie rozmiaru obu nerek. Występująca u pacjenta obustronna przepuklina pachwinowa została zoperowana. W wieku dwóch lat u pacjenta zdiagnozowano nadciśnienie tętnicze i rozpoczęto terapię obniżającą ciśnienie. Cechy niewydolności nerek narastały bardzo szybko, w wieku 3,5 lat stwierdzono końcowy stopień niewydolności nerek i rozpoczęto dializy otrzewnowe. W maju 2012 roku przeprowadzono transplantację nerek. Rozwój umysłowy jest prawidłowy. Przeprowadzone badanie okulistyczne dna oka nie wykazało zmian. Analiza kariotypu wykazała prawidłowy kariotyp męski (46,XY). Obraz kliniczny pacjenta 2 przedstawiono na rycinach (**Rycina 32-36**).



Rycina 32.

Pacjent 2 w wieku pięciu miesięcy. Skrócenie kończyn, lejkowata klatka piersiowa, obustronna przepuklina pachwinowa.



Rycina 33.

Obraz kliniczny pacjenta 2. Dolichocefalia i łódkogłowie, wydatne i wysokie czoło z wysoką czołową linią włosów, nisko osadzone i odstające uszy, pełne policzki, szeroka i niska nasada nosa, ukośne szpary powiekowe, niewielka zmarszczka nakątna, telekantus, długa i gładka rynienka podnosowa, mała żuchwa, pełna wywinięta dolna warga.



Rycina 34.

Brachydaktylia dłoni u pacjenta 2.



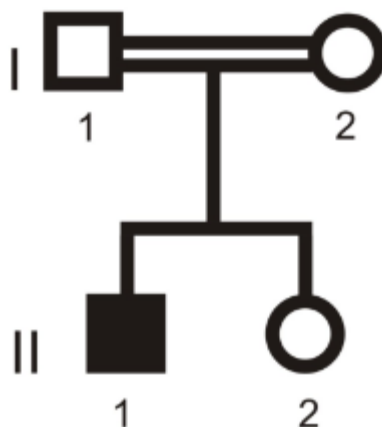
Rycina 35.
Głębokie i nieprawidłowe bruzdy dłoniowe i podeszwowo u pacjenta 2.



Rycina 36.
Zmiany ektodermalne u pacjenta 2. Nadmiernie elastyczna skóra i nieprawidłowości zębów.

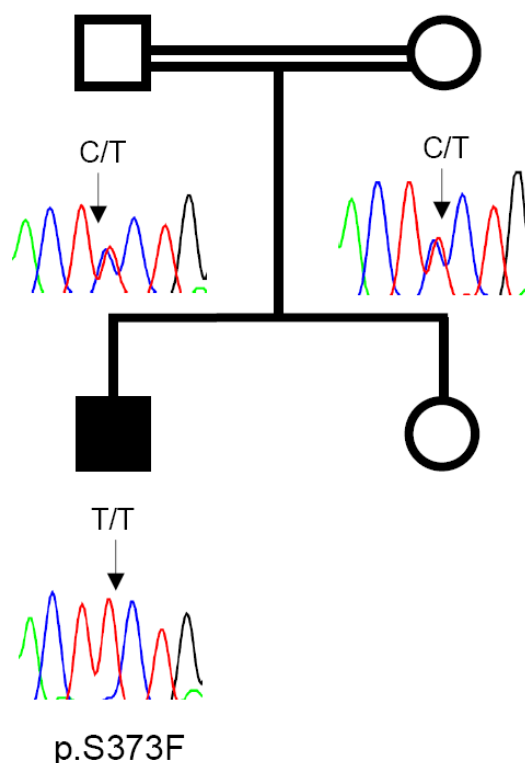
4.3.2. Rodzina CED-02

Rodzina CED-02 pochodząca z Norwegii. Proband (pacjent 3), pierwsze dziecko daleko spokrewnionych zdrowych rodziców.



Rycina 37.
Rodowód rodziny CED-02.

Skrining genu *IFT122* w rodzinie CED-02 pozwolił na identyfikację homozygotycznej zmiany C->T w eksonie 11 genu *IFT122* u pacjenta z zespołem Sensenbrenner. Rodzice natomiast są heterozygotami dla zidentyfikowanego wariantu. Substytucja C->T powoduje zmianę wysoce konserwatywnej seryny na fenyloalaninę we wszystkich czterech izoformach białka IFT122. Substytucja ta nie jest znanym polimorfizmem SNP (UCSC Genome Browser). Zmiany tej nie zidentyfikowano również wśród 340 kontrolnych chromosomów. Na tej podstawie wykluczono, iż wariant ten jest rzadkim polimorfizmem.

**Rycina 38.**

Rodowód rodziny CED-02. Wynik analizy genu *IFT122*. Analiza kosegragacji zidentyfikowanej zmiany p.S373F.

Opis kliniczny pacjenta 3 z rodziny CED-02

Proband (pacjent 3) urodzony w 38 tygodniu ciąży przez cesarskie cięcie. U matki dziecka stwierdzono jedynie łagodną, nadmierną ruchomość stawów. Masa urodzeniowa wynosiła 5.02 kg (>99 centyla), długość ciała 50 cm (50-75 centyl). W badaniu stwierdzono uogólniony obrzęk podskórny, obniżone napięcie mięśniowe, nadmierną ruchomość stawów, krótkie palce z obustronną klinodaktylią piątego palca, nisko osadzone i odstające uszy oraz nadmierne fałdy skórne. W badaniu echokardiograficznym stwierdzono strukturalnie prawidłowe serce, natomiast w badaniu ultrasonograficznym stwierdzono słabą demarkację pomiędzy korą a rdzeniem nerki. W wieku 11 miesięcy długość ciała i masa pacjenta były poniżej 2 centyla (odpowiednio 70 cm; 7.9 kg), natomiast obwód głowy wynosił 50 cm (98 centyl). Duża obustronna przepuklina pachwinowa została zoperowana chirurgicznie. W drugim roku życia u pacjenta stwierdzono rzadkie włosy, małe zęby, krótkie kończyny oraz dolichocefalię, kraniosynostozę i wydatne czoło. Rozwój psychomotoryczny był prawidłowy. W wieku 2.5 lat w badaniu laboratoryjnym stwierdzono białkomocz.

Przeprowadzona biopsja nerek wykazała martwicę i zanik kanalików nerkowych. W badaniu okulistycznym nie stwierdzono cech barwnikowego zwyrodnienia siatkówki. W badaniu RTG stwierdzono wąską klatkę piersiową i krótkie żebra. Przeprowadzona analiza kariotypu wykazała prawidłowy kariotyp męski 46,XY. Proband ma młodszą zdrową siostrę. Obraz kliniczny pacjenta 2 przedstawiono na rycinach (**Rycina 39-40**).



Rycina 39.

Obraz kliniczny pacjenta 3 w wieku 12 miesięcy. Kraniosynostoza, wydatne czoło, nisko osadzone i odstające uszy, mała żuchwa, zmarszczka nakątna, telekantus, długa i gładka rynienka podnosowa.

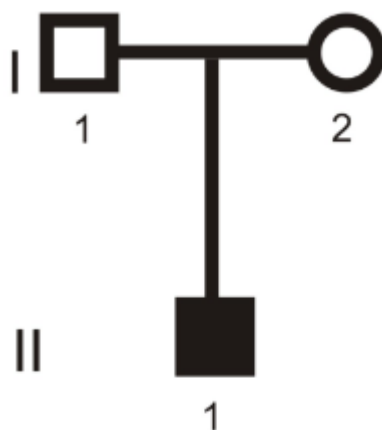


Rycina 40.

Obustronna przepuklina pachwinowa u pacjenta 3.

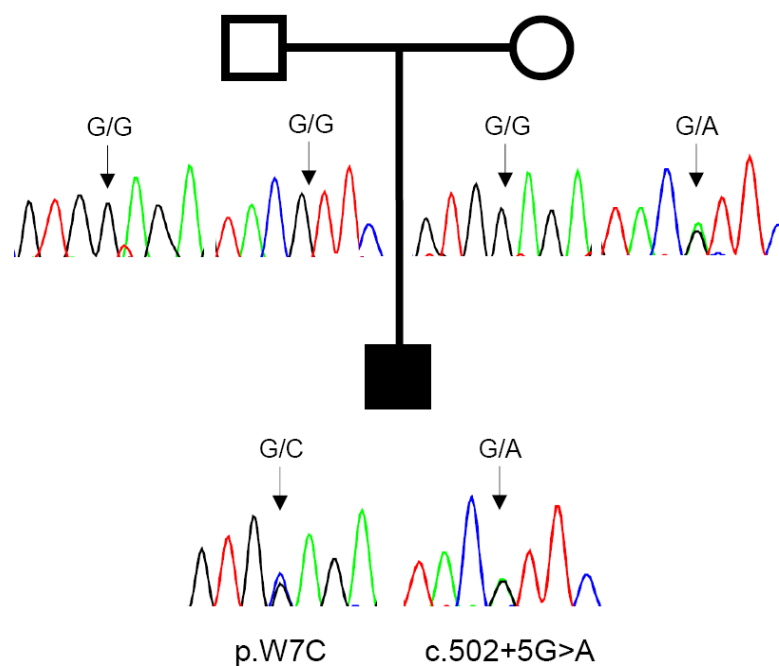
4.3.3. Rodzina CED-03

Pacjent 4 to przypadek sporadyczny. Chłopiec, pierwsze dziecko zdrowych rodziców, pochodzących z tej samej małej miejscowości na południu Włoch.



Rycina 41.
Rodowód rodziny CED-03.

Analiza genu *IFT122* w rodzinie CED-03 pozwoliła na identyfikację heterozygotycznej zmiany G->C w eksonie 1 oraz heterozygotycznej zmiany G->A w intronie 6 genu *IFT122* u pacjenta z zespołem Sensenbrenner. Substytucja G->C zlokalizowana w eksonie 1 powoduje zmianę wysoce konserwatywnego tryptofanu na cysteinę we wszystkich czterech izoformach białka IFT122. Ze względu na to, że zmiana typu *missens* W->C nie została zidentyfikowana u żadnego z rodziców przeprowadzono analizę ojcostwa w celu potwierdzenia, że mutacja ta wystąpiła u pacjenta *de novo*. Natomiast zmiana G->A w intronie 6 znajdująca się w obrębie miejsca donorowego powoduje zmianę wysoce konserwatywnego nukleotydu w transkrypcie 1, 2 oraz 3 genu *IFT122*. Wariant ten został odziedziczony od matki. Zmiany te nie są znanymi polimorfizmami SNP (UCSC Genome Browser) i nie zidentyfikowano ich wśród 340 kontrolnych chromosomów. Na tej podstawie wykluczono, iż mogą one być rzadkim polimorfizmami.

**Rycina 42.**

Rodowód rodziny CED-03. Wynik analizy genu *IFT122*. Analiza kosegragacji zidentyfikowanej zmiany p.W7C oraz c502+G>A.

Opis kliniczny pacjenta 4 z rodziny CED-03

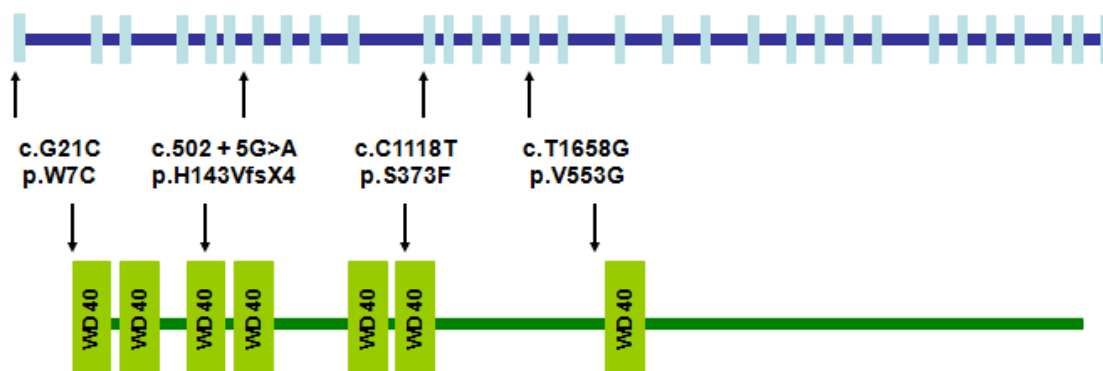
Proband (pacjent 4), po urodzeniu stwierdzono skrócenie kończyn, dolichocefalię, zmarszczkę nakątną, wąską klatkę piersiową, a podczas kolejnych wizyt niski wzrost oraz hypodontię i microdontię oraz rozmiękczenie chrząstek tchawicy, co wymagało tracheostomii do czwartego roku życia. U pacjenta występowała obustronna przepuklina pachwinowa, która została zoperowana chirurgicznie. W wieku 2.2 lat stwierdzono zaburzenia w funkcjonowaniu nerek. U pacjenta zdiagnozowano również zwłóknienie w obrębie wątroby. Kiedy pacjent był w wieku 3 lat rozpoczęto dializę otrzewnową. W wieku 4.5 lat masa pacjenta wynosiła 13 kg (< 3 centyla), a wzrost 89 cm (< 3 centyla). Badanie dna oka oraz badanie elektretinograficzne nie wykazały zmian w obrębie siatkówki. Pacjent jest po przeszczepie wątroby i nerek. Wynik badania radiologicznego przedstawiono na rycinie **(Rycina 43)**.

**Rycina 43.**

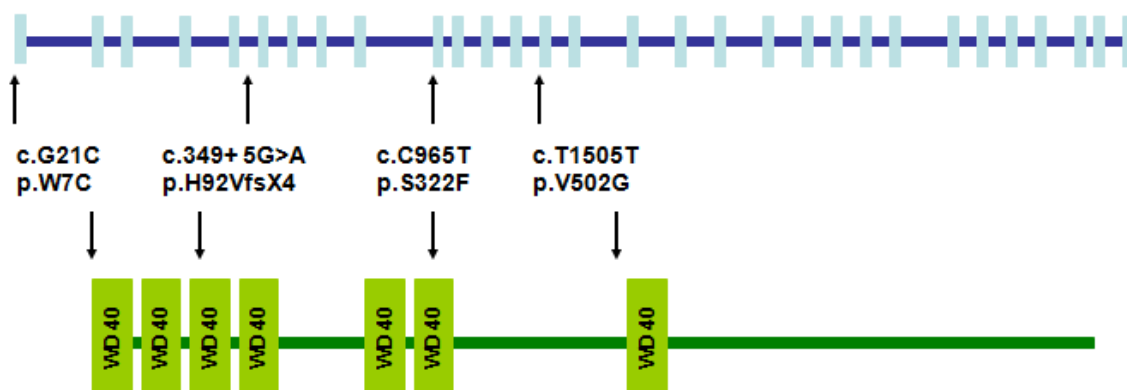
Badanie radiologiczne pacjenta CED-03/4 w wieku trzech lat. Widoczne łódkogłowie, skrócenie kończyn górnych i dolnych, skrócenie paliczków dłoni.¹⁹

4.3.4. Lokalizacja zmian zidentyfikowanych w genie *IFT122*

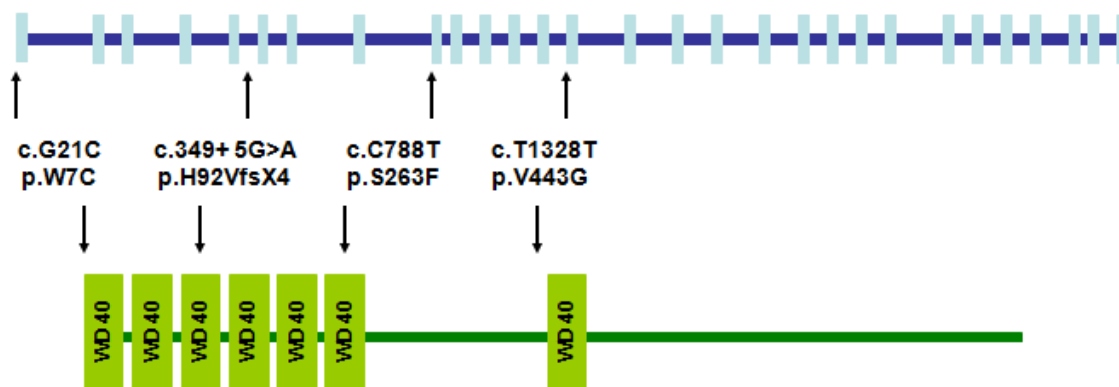
Izoforma 1



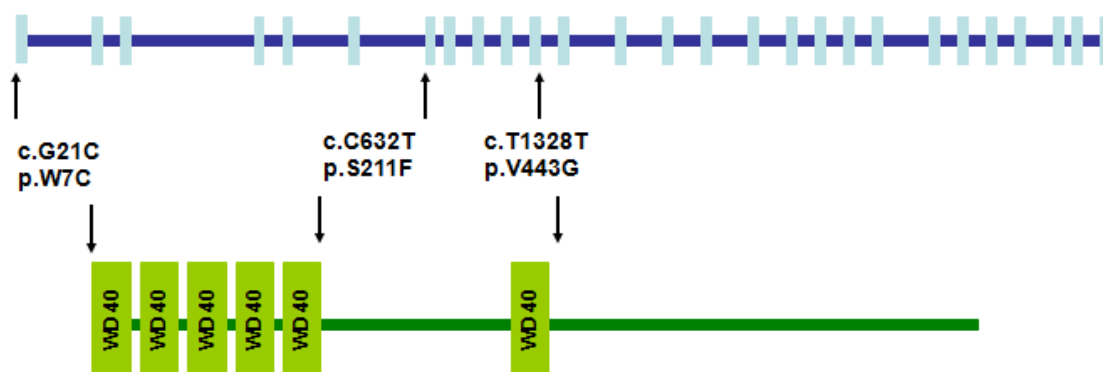
Izoforma 2



Izoforma 3



Izoforma 4

**Rycina 44.**

Lokalizacja zmian zidentyfikowanych w genie *IFT122*, na poziomie DNA (górny panel) oraz na poziomie białka (dolny panel).

W obrębie genu *IFT122* zidentyfikowano trzy zmiany typu *missens*, z których dwie W->C oraz S->F zlokalizowane są w domenach WD, natomiast zmiana V->G zlokalizowana jest w pobliżu domeny WD. Domeny WD pełnią bardzo ważną rolę w interakcji białko-białko. Wszystkie zmiany typu *missens* obecne są we wszystkich czterech izoformach genu *IFT122*. Natomiast zidentyfikowana zmiana splicingowa zlokalizowana jest w intronie 6 genu *IFT122* w transkrypcie 1, 2 oraz 3 tego genu. U pozostałych ośmiu pacjentów z zespołem Sensenbrenner nie zidentyfikowano mutacji w obrębie genu *IFT122*.

4.3.5. Polimorfizmy SNP zidentyfikowane w genie *IFT122*

Tabela 13. Polimorfizmy SNP zidentyfikowane w genie *IFT122* w grupie pacjentów z zespołem Sensenbrenner.

Pacjent		1	2	3	4	5	6	7
Gen	SNP							
<i>IFT122</i>	Homo SNP	rs6805886	rs6805886	rs6805886	rs6805886	rs6805886	rs6805886	rs6805886 rs6770233 rs2285354
	Hetero SNP	-	-	-	-	-	-	rs2301570

Pacjent		8	9	10	11	12	13
Gen	SNP						
<i>IFT122</i>	Homo SNP	rs6805886	rs6805886	rs6805886	rs6805886	rs6805886	rs6805886
	Hetero SNP	-	-	-	-	-	-

Analiza genu *IFT122* w grupie 13 pacjentów z zespołem Sensenbrenner pozwoliła na identyfikację 4 różnych polimorfizmów SNP. Najczęstszym polimorfizmem występującym w badanej grupie był wariant rs6805886, który zidentyfikowano w układzie homozygotycznym u wszystkich pacjentów. Uzyskane wyniki są zgodne z informacjami zawartymi w bazach danych, które podają, iż częstość występowania tego allelu w układzie homozygotycznym wynosi 100% dla populacji europejskiej. U pacjenta oznaczonego numerem 7 wykryto 4 różne polimorfizmy SNP, z czego jeden (rs2301570) w układzie heterozygotycznym.

4.4. Ustalenie ojcostwa w rodzinie CED-03

W celu potwierdzenia ojcostwa w rodzinie CED-03 przeprowadzono genotypowanie prób DNA pochodzących od matki, ojca i dziecka. Analizę 250 000 SNP przeprowadzono w oparciu o mikromacierz Affymetrix 250K SNP array. Wynik genotypowania dla 45 wybranych SNP (próba 2240 – matka, 2238 – dziecko, 2239 – ojciec). Wyniki genotypowania w rodzinie CED-03 przedstawiono na rycinie (Rycina 45).

2240		2238		2239	
SNPID	Confidence	SNPID	Confidence	SNPID	Confidence
AFFX-2315060	AA	AFFX-2315060	AA	AFFX-2315060	AA
AFFX-2315061	AB	AFFX-2315061	AA	AFFX-2315061	AB
AFFX-2315062	BB	AFFX-2315062	AB	AFFX-2315062	AB
AFFX-2315057	AA	AFFX-2315057	AA	AFFX-2315057	AB
AFFX-2315058	AB	AFFX-2315058	BB	AFFX-2315058	BB
AFFX-2315059	AA	AFFX-2315059	AA	AFFX-2315059	AB
AFFX-2315063	AB	AFFX-2315063	AB	AFFX-2315063	AB
AFFX-2315064	AB	AFFX-2315064	AB	AFFX-2315064	AB
AFFX-2315065	AB	AFFX-2315065	AB	AFFX-2315065	AA
AFFX-2315066	AB	AFFX-2315066	AB	AFFX-2315066	BB
AFFX-2315067	AB	AFFX-2315067	AB	AFFX-2315067	AB
AFFX-2315068	AA	AFFX-2315068	AA	AFFX-2315068	AA
AFFX-2315069	AB	AFFX-2315069	AA	AFFX-2315069	AB
AFFX-2315070	AB	AFFX-2315070	BB	AFFX-2315070	BB
AFFX-2315071	AB	AFFX-2315071	AB	AFFX-2315071	AB
AFFX-2315072	AA	AFFX-2315072	AA	AFFX-2315072	AA
AFFX-2315073	AB	AFFX-2315073	AB	AFFX-2315073	AA
AFFX-2315074	AB	AFFX-2315074	BB	AFFX-2315074	BB
AFFX-2315075	AA	AFFX-2315075	AA	AFFX-2315075	AA
AFFX-2315076	AB	AFFX-2315076	AB	AFFX-2315076	BB
AFFX-2315077	AB	AFFX-2315077	BB	AFFX-2315077	BB
AFFX-2315078	AB	AFFX-2315078	AB	AFFX-2315078	AB
AFFX-2315079	AB	AFFX-2315079	AB	AFFX-2315079	AB
AFFX-2315080	AB	AFFX-2315080	AB	AFFX-2315080	AA
AFFX-2315081	AA	AFFX-2315081	AB	AFFX-2315081	AB
AFFX-2315082	AA	AFFX-2315082	AB	AFFX-2315082	AB
AFFX-2315083	AB	AFFX-2315083	AB	AFFX-2315083	BB
AFFX-2315084	AB	AFFX-2315084	AB	AFFX-2315084	AA
AFFX-2315085	AA	AFFX-2315085	AB	AFFX-2315085	AB
AFFX-2315086	AB	AFFX-2315086	AB	AFFX-2315086	AB
AFFX-2315087	BB	AFFX-2315087	AB	AFFX-2315087	AB
AFFX-2315088	AB	AFFX-2315088	AA	AFFX-2315088	AA
AFFX-2315089	BB	AFFX-2315089	AB	AFFX-2315089	AB
AFFX-2315090	AA	AFFX-2315090	AB	AFFX-2315090	AB
AFFX-2315091	AB	AFFX-2315091	AA	AFFX-2315091	AB
AFFX-2315092	BB	AFFX-2315092	BB	AFFX-2315092	AB
AFFX-2315093	BB	AFFX-2315093	AB	AFFX-2315093	AA
AFFX-2315094	AB	AFFX-2315094	AB	AFFX-2315094	AA
AFFX-2315095	AB	AFFX-2315095	BB	AFFX-2315095	BB
AFFX-2315096	AA	AFFX-2315096	AA	AFFX-2315096	AA
AFFX-2315047	AB	AFFX-2315047	AB	AFFX-2315047	AB
AFFX-2315048	AB	AFFX-2315048	AA	AFFX-2315048	AB
AFFX-2315049	BB	AFFX-2315049	AB	AFFX-2315049	AB
AFFX-2315050	BB	AFFX-2315050	BB	AFFX-2315050	AB
AFFX-2315051	AB	AFFX-2315051	AA	AFFX-2315051	AB

Rycina 45.

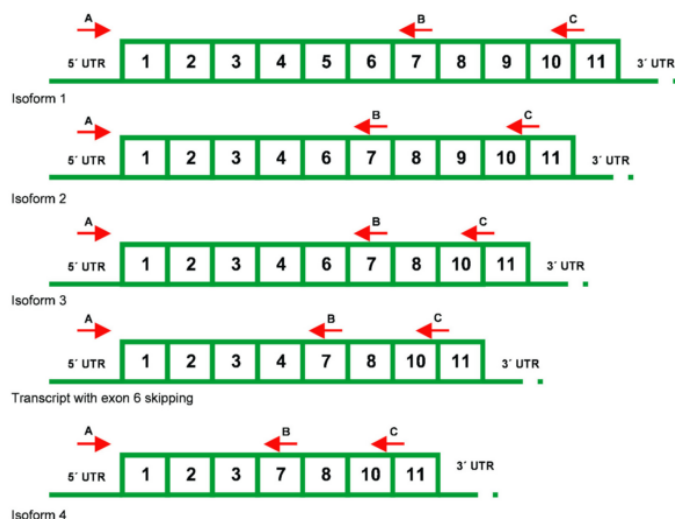
Wynik genotypowania w rodzinie CED-03 potwierdzający ojcostwo.

Spośród przykładowych 45 SNP przedstawionych na rycinie, 13 SNP było nieinformatywnych (zaznaczono na czerwono). Na podstawie analizy segregacji pozostałych 32 SNP można stwierdzić, że w poszczególnej parze alleli jeden allel jest dziedziczony od matki a drugi od ojca, co jednoznacznie pozwala na potwierdzenie ojcostwa w rodzinie CED-03. Wynik tej analizy wskazuje również, iż zidentyfikowana zmiana typu *missens* W->C w eksonie 1 genu *IFT122* wystąpiła w pacjenta 4 *de novo*.

W celu potwierdzenia, iż zmiana odziedziczona od matki, zlokalizowana w intronie 6 genu *IFT122* ma wpływ na proces składania pierwotnego transkryptu oraz że zmiana *missens* zlokalizowana jest na chromosomie oddziedziczonym od ojca, a pacjent jest złożoną heterozygotą przeprowadzono analizę RT-PCR oraz real-time PCR.

4.5. RT-PCR

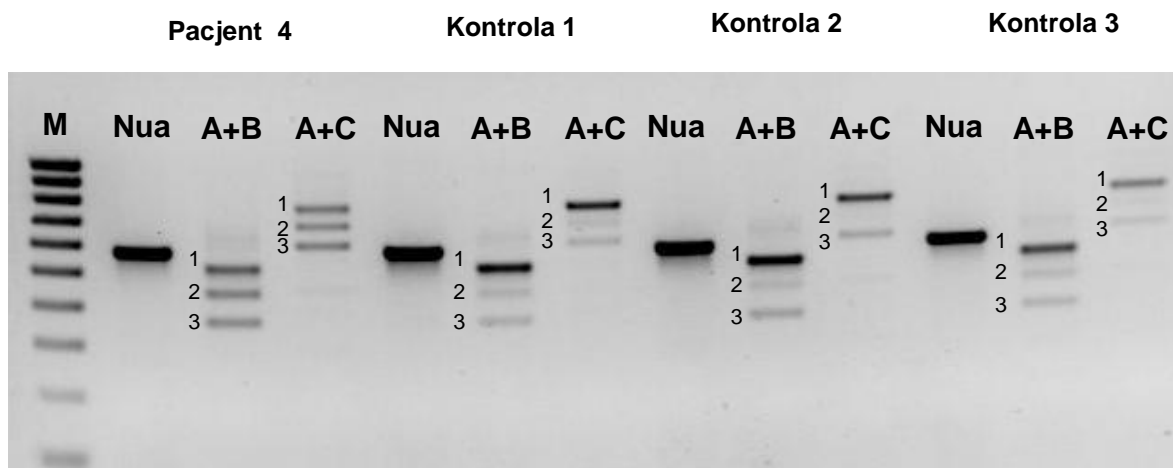
Reakcje RT-PCR przeprowadzono z różnymi kombinacjami primerów na cDNA uzyskanym z RNA wyizolowanego z krwi obwodowej pacjenta CED-03/4 i trzech kontroli. Gen *IFT122* posiada 4 transkptyy ulegające ekspresji w wielu tkankach (Genome Browser, Human Protein Reference Database). W reakcji zastosowano dwie kombinacje primerów (A+B oraz A+C) pozwalające na amplifikację wszystkich czterech transkryptów. Lokalizację poszczególnych primerów przedstawiono na rycinie (**Rycina 46**).



Rycina 46.

Lokalizacja poszczególnych primerów wykorzystanych w reakcji RT-PCR.

W reakcji wykorzystano również primery NUA w celu sprawdzenia przebiegu syntezy cDNA. Marker Hyper Ladder IV (Biolone) wykorzystano jako standard wielkości produktów RT-PCR. Wynik reakcji RT-PCR przedstawiono na rycinie (**Rycina 47**).

**Rycina 47.**

Wynik reakcji RT-PCR.

Reakcja RT-PCR przeprowadzona z primerami A+B:

Izoforma 1 (wielkość produktu 668 bp): brak prążka/brak ekspresji

1 = izoforma 2 and 3 (wielkość produktu 515 bp),

2 = nowy transkrypt N z pominięciem eksonu 6 (wielkość produktu 438 bp),

3 = izoforma 4 (wielkość produktu 359 bp).

Reakcja RT-PCR przeprowadzona z primerami A+C:

Izoforma 1 (wielkość produktu 1084 bp): brak prążka/bark ekspresji

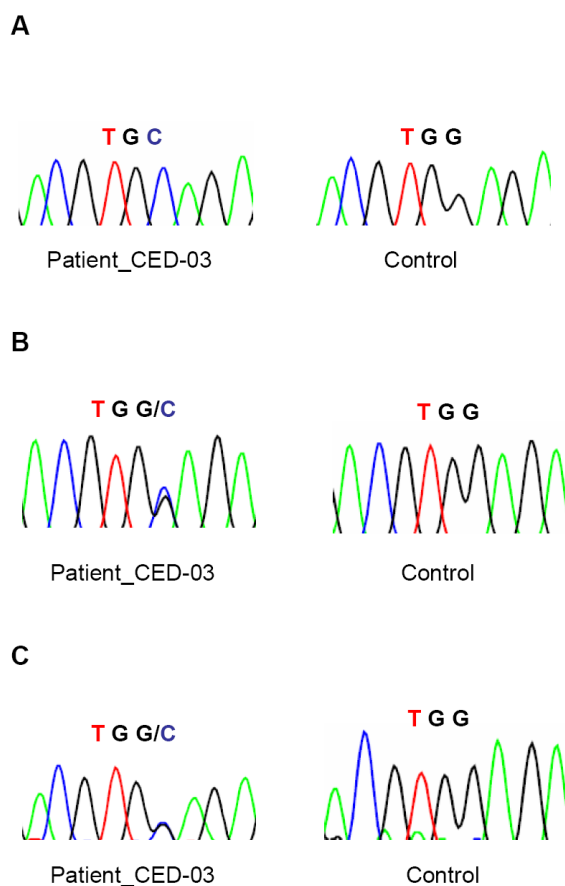
Izoforma 2 (wielkość produktu 931 bp): brak prążka/bark ekspresji

1 = izoforma 3 (wielkość produktu 754 bp),

2 = nowy transkrypt N z pominięciem eksonu 6 (wielkość produktu 677 bp),

3 = izoforma 4 (wielkość produktu 598 bp).

Produkty uzyskane w reakcji RT-PCR wycięto z żelu i zsekwencjonowano. Przeprowadzona reakcja RT-PCR wykazała, że we krwi obwodowej ekspresji ulega izoforma 3 (posiadające eksony 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11) izoforma 4 (posiadająca eksony 1, 2, 3, 7, 8, 10, 11) oraz nowy transkrypt N (zawierający eksony 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11). Analiza wyników sekwencjonowania wykazała, że u pacjenta 4 amplikon specyficzny dla izoformy 3 zawiera homozygotyczną zmianę *missens* zidentyfikowaną w eksonie 1 (p.W7C) sugerując, iż ta izoforma ulega ekspresji z jednego allelu zlokalizowanego na chromosomie odziedziczonym od ojca. Amplikony odpowiadające nowemu transkryptowi N (nie zawierającego eksonu 6) oraz izoformie 4 były w układzie heterozygotycznym dla danej zmiany *missens*, co wskazuje na to, że ulegają one ekspresji z obu alleli. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników przeprowadzono reakcję RT-PCR z primerami specyficznymi dla trzech transkryptów ulegających ekspresji w krwi obwodowej. Wyniki sekwencjonowania przeprowadzone u pacjenta i kontroli przedstawiono na rycinie (**Rycina 48**).

**Rycina 48.**

Wyniki skwencjonowania poszczególnych produktów reakcji RT-PCR. A. Izoforma 3. B. Nowy transkrypt N. C. Izoforma 4.

Uzyskane wyniki sugerują, że pacjent 4 (CED-03) jest złożoną heterozygotą zawierającą heterozygotyczną mutację typu *missens* (W->C) zlokalizowaną w eksonie 1 powstałą *de novo* w kombinacji z heterozygotyczną mutacją G->A zlokalizowaną w intronie 6 genu *IFT122*. Na podstawie wyników reakcji RT-PCR widoczna jest również różnica w poziomie ekspresji poszczególnych transkryptów. U pacjenta izoforma 3 ulega niższej ekspresji w porównaniu do trzech kontroli, ponieważ ulega ekspresji tylko z jednego allelu, co jest widoczne na podstawie intensywności świecenia prążka na żelu odpowiadającego izoformie 3. Natomiast ekspresja nowego transkryptu N (nie zawierającego eksonu 6) ulega zwiększonej ekspresji u pacjenta w porównaniu do trzech kontroli, ponieważ dodatkowo transkrypt ten ulega ekspresji z allelu zawierającego zmianę G->A w intronie 6, co również jest widoczne na podstawie intensywności świecenia prążka na żelu odpowiadającego temu transkryptowi. Dodatkowo wyniki te wskazują, że zmiana w intronie 6 ma wpływ na prawidłowy przebieg procesu składania pierwotnego transkryptu i jej obecność powoduje pominięcie eksonu 6. Analiza sekwencji genu *IFT22* wykazała, iż pominięcie eksonu 6 powoduje przesunięcie ramki odczytu i przedwczesną terminację procesu translacji spowodowanej pojawieniem

się kodonu stop. Natomiast poziom ekspresji transkryptu 4 jest na tym samym poziomie u pacjenta i trzech analizowanych kontroli, co jest związane z tym, że zmiana w intronie 6 dotyczy tylko transkryptu 1, 2 oraz 3 genu *IFT122*. Wyniki analizy sekwencji z pominięciem eksonu 6 genu *IFT122* przedstawiono poniżej.

Fragment izoformy 1 genu *IFT122*

Sekwencja DNA

ATGAGGGCCGTGTTGACGTGGAGAGATAAAGCCGAGCACTGTATAAATGACATCGC
 ATTTAAGCCTGATGGAACCTCAACTGATTTTGGCTGCCGGAAGCAGATTACTGGTTTAT
 GACACCTCTGATGGCACCTTACTTCAGCCCCCTCAAGGGACACAAAGACACTGTGTAC
 TGTGTGGCATATGCGAAGGATGGCAAGCGCTTTGCTTCTGGATCAGCTGACAAAAGC
 GTTATTATCTGGACATCAAACCTGGAAGGCATTCTGAAGTACACATCTTGGTCTGTGA
 TGTCTTCATTGCACCTCCATCTTCCATTTCTGGGCCTCCACAAAACAGTAAGAGTAAC
 AGCCACAGATAAAGCACCTAAAGGCCAAGGTGGGAGGATTGATTGCTTGAGGCCAA
 GCGTTCAAACCAACCTGGCCAAAAGCACAATGATGCTATAACAATGTGTCTCCTACAA
 TCCTATTACTCATCAACTGGCATCTTGTTCTCCAGTGACTTTGGGTTGTGGTCTCCT
 GAACAGAAGTCTGTCTCAAACACAAATCAAGCAGCAAGATCATCTGCTGCAAGCTGG
 ACAAATGATGGTCAGTACCTGGCGCTGGGGATGTTCAATGGGATCATCAGCATACGG
 AACAAAAATGGCGAGGAGAAAGTAAAGATCGAGCGGCCGGGGGGCTCCCTCTCGCC
 AATATGGTCCATCTGCTGGAACCCCTCAAG

Sekwencja białka

Met RAVLTWRDKAEHCINDIAFKPDGTQLILAAGSRLLVYDTS D
 GTLLQPLKGHKDTVYCVAYAKDGKRFASGSADKSVIIWTSKL
 EGILKYTSWSV **Met** SSLHLHLPFLGLHKTVRVTATDKAPKGQG
 GRIDCLRPSVQNPQGQKHNDAIQCVSYNPITHQLASCSSSDF
 GLWSPEQKSVSKHKSSSKIICCSWTNDGQYLALG **Met** FNGIISI
 RNKNGEEKVKIERPGGSLSPIWNSICWNPS

Fragment izoformy 1 genu IFT122 z pominięciem eksonu 6

Sekwencja DNA

ATGAGGGCCGTGTTGACGTGGAGAGATAAAGCCGAGCACTGTATAAATGACATCGC
 ATTTAAGCCTGATGGAACCTCAACTGATTTTGGCTGCCGGAAGCAGATTACTGGTTTAT
 GACACCTCTGATGGCACCTTACTTCAGCCCCTCAAGGGACACAAAGACACTGTGTAC
 TGTGTGGCATATGCGAAGGATGGCAAGCGCTTTGCTTCTGGATCAGCTGACAAAAGC
 GTTATTATCTGGACATCAAACTGGAAGGCATTCTGAAGTACACATCTTGGTCTGTGA
 TGTCTTCATTGCACCTCCATCTTCCATTTCTGGGCCTCCACAAAACAGTAAGAGTAAC
 AGCCACAGATAAAGCACCTAAAGGCCAAGGTGGGAGGATTGATTGCTTGAGGCCAA
 GCGTTCAAACCAACCTGGCCAAAAGGTTGTGGTCTCCTGAACAGAAGTCTGTCTCC
 AAACACAAATCAAGCAGCAAGATCATCTGCTGCAGCTGGACAAATGATGGTCAGTAC
 CTGGCGCTGGGGATGTTCAATGGGATCATCAGCATAACGGAACAAAAATGGCGAGGA
 GAAAGTAAAGATCGAGCGGCCGGGGGGCTCCCTCTCGCCAATATGGTCCATCTGCT
 GGAACCCTTCAAG

Sekwencja białka

Met RAVLTWRDKAEHCINDIAFKPDGTQLILAAGSRLLVYDTS
 GTLLQPLKGHKDTVYCVAYAKDGKRFASGSADKSVIIWTSKL
 EGILKYTSWSV **Met** SSLHLHLPFLGLHKTVRVTATDKAPKGGQ
 GRIDCLRPSVQNPQPGQKVVVS **Stop** TEVCLQTQIKQQDHLLQL
 DK **Stop** WSVPGAGDVQWDHQHTEQKWRGESKDRAAGGLPLA
 N **Met** VHLLLEPFK

Lokalizacja mutacji na poziomie DNA oraz białka: c.502 + 5G>A; p.H143VfsX4.

Fragment izoformy 2 i 3 genu IFT122

Sekwencja DNA

ATGAGGGCCGTGTTGACGTGGAGAGATAAAGCCGAGCACTGTATAAATGACATCGC
 ATTTAAGCCTGATGGAACCTCAACTGATTTTGGCTGCCGGAAGCAGATTACTGGTTTAT
 GACACCTCTGATGGCACCTTACTTCAGCCCCTCAAGGGACACAAAGACACTGTGTAC
 TGTGTGGCATATGCGAAGGATGGCAAGCGCTTTGCTTCTGGATCAGCTGACAAAAGC
 GTTATTATCTGGACATCAAACTGGAAGGCATTCTGAAGTACACGCACAATGATGCTA
 TACAATGTGTCTCCTACAATCCTATTACTCATCAACTGGCATCTTGTTCTCCAGTGA
 CTTTGGTTGTGGTCTCCTGAACAGAAGTCTGTCTCAAACACAAATCAAGCAGCAA
 GATCATCTGCTGCAGCTGGACAAATGATGGTCAGTACCTGGCGCTGGGGATGTTCAA
 TGGGATCATCAGCATAACGGAACAAAAATGGCGAGGAGAAAGTAAAGATCGAGCGGC
 CGGGGGGGCTCCCTCTCGCCAATATGGTCCATCTGCTGGAACCCTTCAAG

Sekwencja białka

Met RAVLTWRDKAEHCINDIAFKPDGTQLILAAGSRLLVYDTS
 GTLLQPLKGHKDTVYCVAYAKDGKRFASGSADKSVIIWTSKL
 EGILKYTHNDAIQCVSYNPITHQLASCSSSDFGLWSPEQKSV
 SKHKSSSKIICCSWTNDGQYLALG **Met** FNGIISIRNKNGEEKVK
 IERPGGSLSPIWSICWNPS

Fragment izoformy 2 i 3 genu IFT122 z pominięciem eksonu 6

Sekwencja DNA

ATGAGGGCCGTGTTGACGTGGAGAGATAAAGCCGAGCACTGTATAAATGACATCGC
ATTTAAGCCTGATGGAACCTCAACTGATTTTGGCTGCCGGAAGCAGATTACTGGTTTAT
GACACCTCTGATGGCACCTTACTTCAGCCCCTCAAGGGACACAAAGACTGTGTAC
TGTGTGGCATATGCGAAGGATGGCAAGCGCTTTGCTTCTGGATCAGCTGACAAAAGC
GTTATTATCTGGACATCAAACTGGAAGGCATTCTGAAGTACACGGTTGTGGTCTCCT
GAACAGAAGTCTGTCTCAAACACAAATCAAGCAGCAAGATCATCTGCTGCAGCTGG
ACAAATGATGGTCAGTACCTGGCGCTGGGGATGTTCAATGGGATCATCAGCATAACGG
AACAAAAATGGCGAGGAGAAAGTAAAGATCGAGCGGCCGGGGGGCTCCCTCTCGCC
AATATGGTCCATCTGCTGGAACCCTTCAAG

Sekwencja białka

Met R A V L T W R D K A E H C I N D I A F K P D G T Q L I L A A G S R L L V Y D T S D
G T L L Q P L K G H K D T V Y C V A Y A K D G K R F A S G S A D K S V I I W T S K L
E G I L K Y T V V V S **Stop** T E V C L Q T Q I K Q Q D H L L Q L D K **Stop** W S V P G A
G D V Q W D H Q H T E Q K W R G E S K D R A A G G L P L A N **Met** V H L L E P F K

Lokalizacja mutacji na poziomie DNA oraz białka: c.349+ 5G>A; p.H92VfsX4.

W celu oceny ilościowej ekspresji transkryptu 3, transkryptu N oraz transkryptu 4 przeprowadzono reakcję real-time PCR z primerami specyficznymi dla tych transkryptów.

4.6. Real-time PCR

Istotność uzyskanych wyników obliczono na podstawie testu t-studenta. Jako kontrolę wykorzystano RNA wyizolowane z krwi obwodowej od trzech zdrowych osób.

Izoforma 3

Kontrola

Mean₁ = 1.15861

St.dev₁ = 0.190531

n₁ = 3

Pacjent

Mean₂ = 0.268185

St.dev₂ = 0.008487

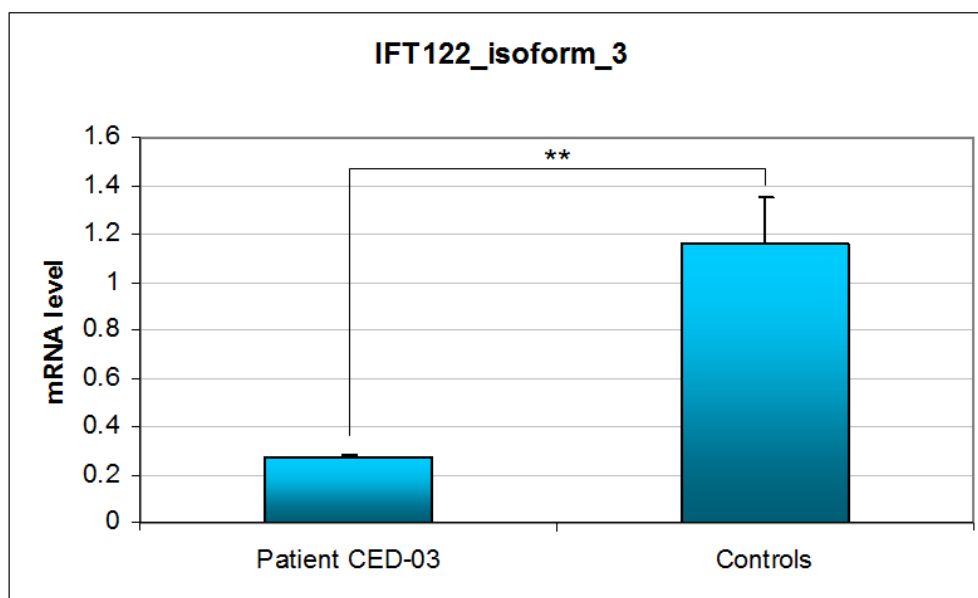
n₂ = 3

t = 8.0866

Degrees of freedom = 4

p = 0.001271

Wyniki reakcji real-time dla izoformy 3 genu *IFT122* przedstawiono na rycinie (**Rycina 49**).



Rycina 49.

Wyniki reakcji real-time PCR dla izoformy 3 genu *IFT122*. Poziom ekspresji izoformy 3 u pacjenta CED-03/4 jest niższy w porównaniu do trzech kontroli. Wynik wysoce istotny statystycznie.

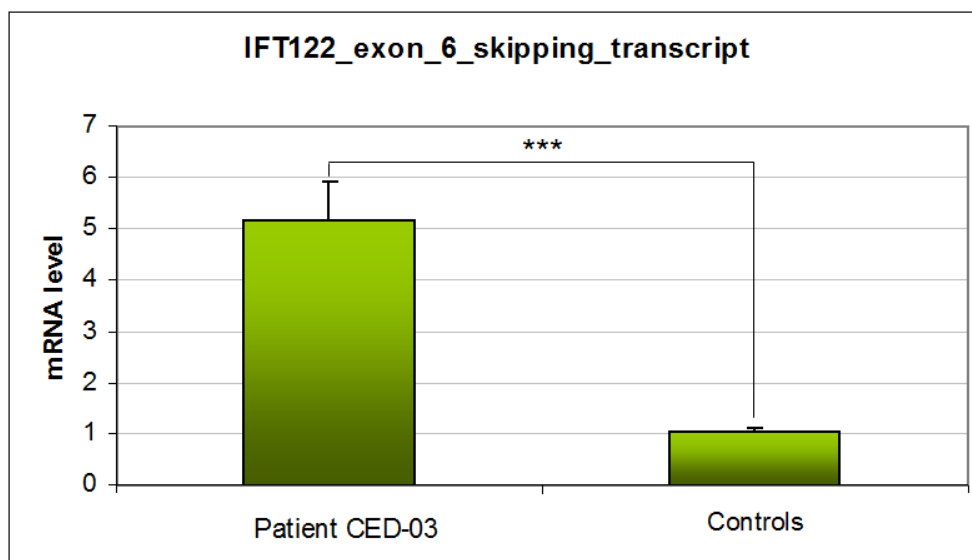
Transkrypt NKontrolaMean₂ = 1.039782St.dev₂ = 0.075442N₂ = 3PacjentMean₁ = 5.185978St.dev₁ = 0.754636n₁ = 3

t = 9.4742

Degrees of freedom = 4

p = 0.000692

Wyniki reakcji real-time dla nowego transkryptu N genu *IFT122* przedstawiono na rycinie (**Rycina 50**).

**Rycina 50.**

Wyniki reakcji real-time PCR dla nowego transkryptu N genu *IFT122*. Poziom ekspresji nowego transkryptu N u pacjenta CED-03/4 jest wyższy w porównaniu do trzech kontroli. Wynik wysoce istotny statystycznie.

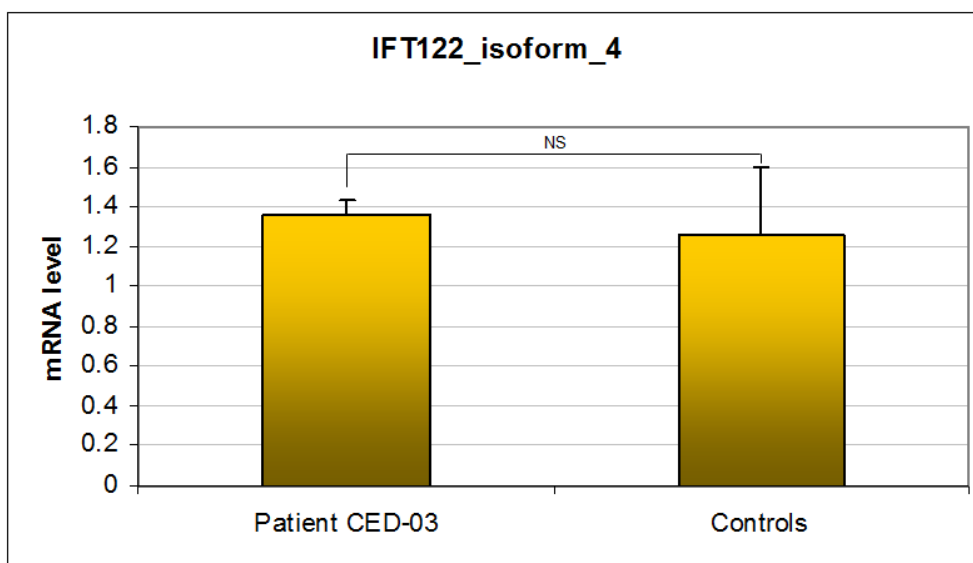
Izoforma 3KontrolaMean₁ = 1.15861St.dev₁ = 0.190531n₁ = 3PacjentMean₂ = 0.268185St.dev₂ = 0.008487n₂ = 3

t = 8.0866

Degrees of freedom = 4

p = 0.001271

Wyniki reakcji real-time dla izoformy 4 genu *IFT122* przedstawiono na rycinie (Rycina 51).

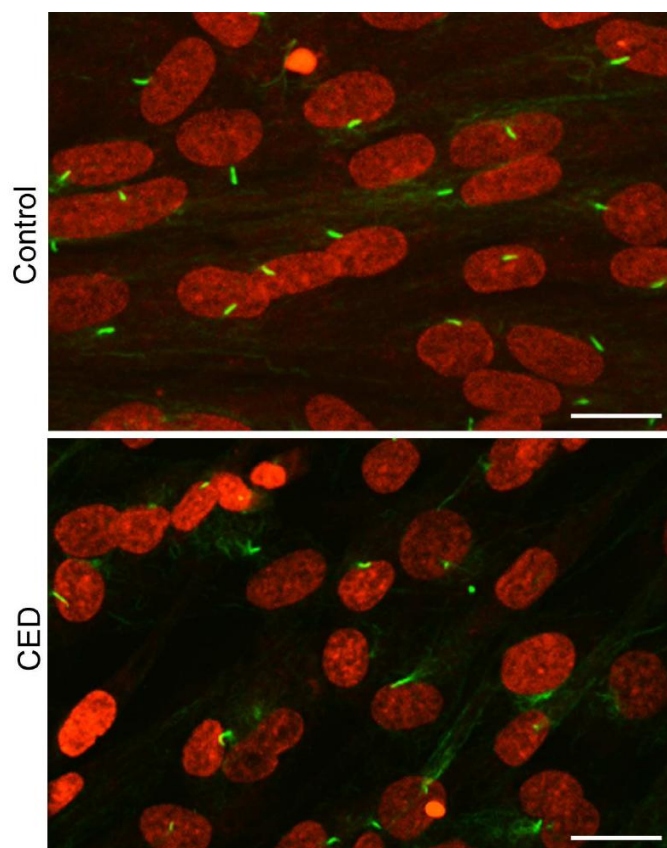
**Rycina 51.**

Wyniki reakcji real-time PCR dla izoformy 4 genu *IFT122*. Brak różnicy w poziomie ekspresji izoformy 4 u pacjenta CED-03/4 w porównaniu do trzech kontroli.

Przeprowadzona analiza real-time PCR wykazała, że poziom ekspresji izoformy 3 jest mniejszy u pacjenta CED-03/4 w porównaniu do trzech kontroli (wynik wysoce istotny statystycznie $p < 0.01$). Poziom ekspresji nowego transkryptu N był wyższy u pacjenta w porównaniu do trzech kontroli (wynik ekstremalnie istotny statystycznie $p < 0.001$). Natomiast ocena poziomu ekspresji izoformy 4 nie wykazała istotnych różnic pomiędzy ekspresją tej izoformy u pacjenta a kontrolami, co jest związane z tym, iż mutacja splicingowa zlokalizowana w intronie 6 genu *IFT122* nie dotyczy transkryptu 4.

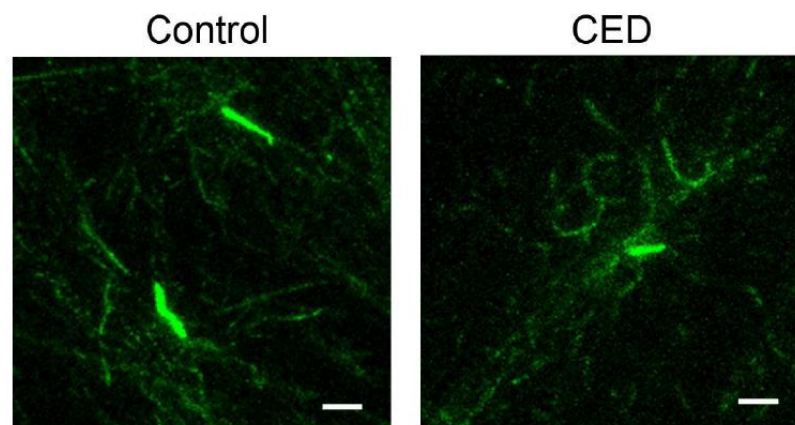
4.7. Analiza ilości i długości rzęsek w fibroblastach skóry

W celu oceny fenotypu rzęskowego oraz wpływu zidentyfikowanej zmiany w białku IFT122 przeprowadzono analizę morfologii oraz częstości rzęsek w fibroblastach skóry pacjenta CED-01/2 oraz kontroli. Eksperyment przeprowadzono w dwóch różnych warunkach. W celu wykonania badań podczas operacji przepuklin pachwinowych pobrano od pacjenta fragment skóry, tkanki podskórnej oraz fragment worka przepuklinowego z których założono linie komórkowe. Analizie poddano trzy linie komórkowe fibroblastów pacjenta. Kontrolę natomiast stanowiły trzy linie komórkowe fibroblastów skóry osób zdrowych. Przeprowadzone badania wykazały znacząco statystycznie zmniejszenie długości ($p < 0.05$) oraz częstości występowania rzęsek ($p < 0.001$) w fibroblastach skóry pacjenta w porównaniu do kontroli. Wyniki przedstawiono na rycinach (**Rycina 52-54**).

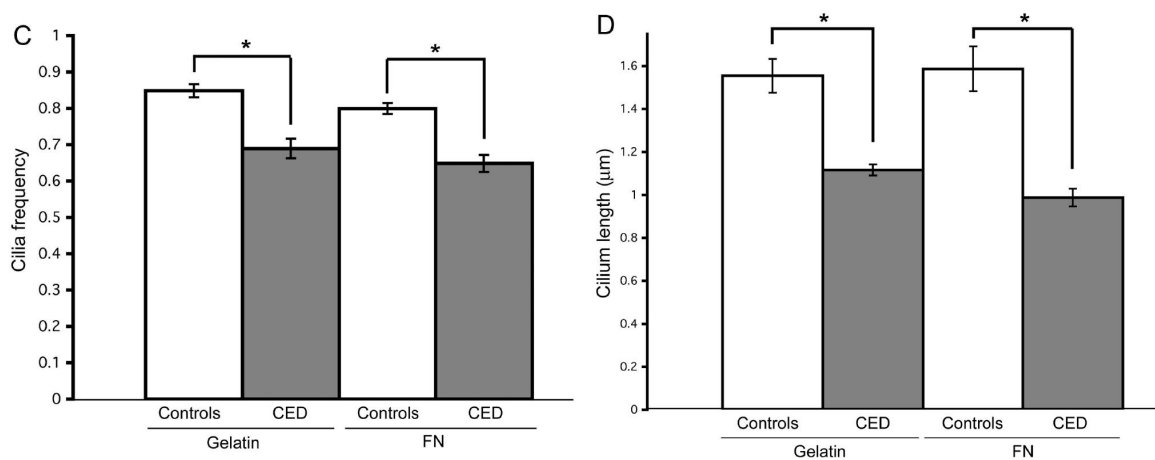


Rycina 52.

Analiza częstości występowania rzęsek w fibroblastach. Control – kontrola. CED – pacjent. Anti-acetylowana tubulina (zielony), jądra komórkowe TO-PRO-3 (czerwony). Skala 10 μ m. Zmniejszenie częstości występowania rzęsek w fibroblastach skóry pacjenta w porównaniu do kontroli.

**Rycina 53.**

Analiza długości rzęsek w fibroblastach. Control – kontrola. CED – pacjent. Anti-acetylowana tubulina (zielony). Skala: 1 μ m. Zmniejszenie długości rzęsek w fibroblastach skóry pacjenta w porównaniu do kontroli.

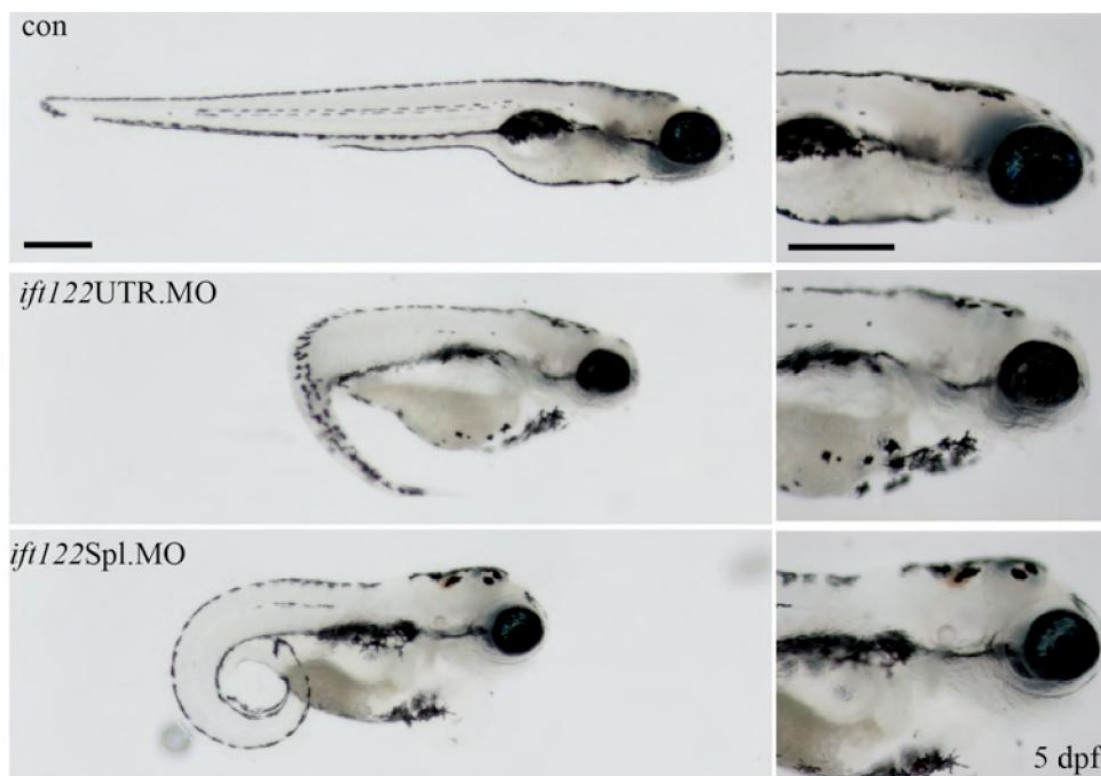
**Rycina 54.**

C. Ocena częstości występowania rzęsek w fibroblastach. D. Ocena długości rzęsek. Przeprowadzone badania wykazały znacząco statystycznie zmniejszenie długości ($p < 0.05$) oraz częstości występowania rzęsek ($p < 0.001$) w fibroblastach skóry pacjenta w porównaniu do kontroli.

4.8. Knockdown genu *ift122* w modelu *Danio rerio*

W celu potwierdzenia hipotezy, że mutacje zidentyfikowane w genie *IFT122* u pacjentów są funkcjonalnie ważne i odpowiedzialne za wystąpienie zespołu Sensenbrenner w ramach prowadzonych badań stworzono model zebrafish z obniżoną ekspresją *ift122*. Model ten został uzyskany z zastosowaniem antysensownego morfolino skierowanego na 5' UTR (5'-AAATCACGGCGTTTCCGAAAGCCGC-3') zaraz powyżej kodonu start ATG oraz morfolino skierowanego na miejsce splincingowe łączenia Ekson1-Intron1 (5'-TATTGGTCTCTTTACCAGAACTCTG-3').

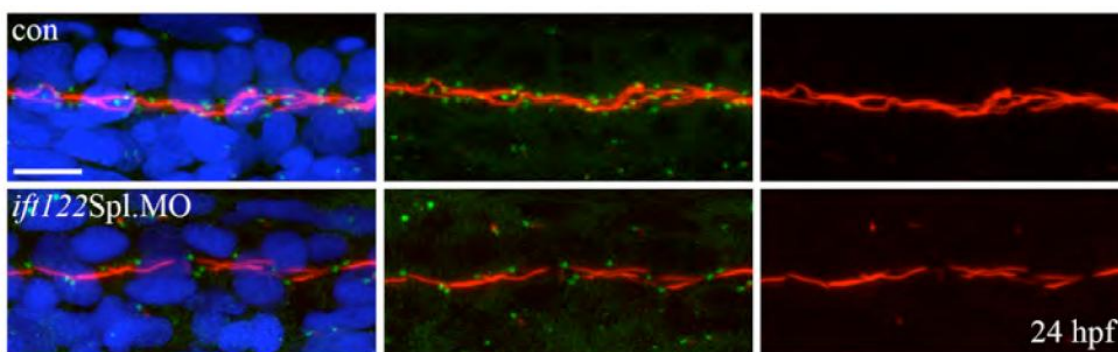
Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że utrata *ift122* u *Danio rerio* powoduje wystąpienie fenotypu rzęskowego. W 80 godzinie po zapłodnieniu (80 hpf, ang. *hours post fertilization*) w embrionach obserwowano skrócenie osi ciała, obrzęk serca i małe oczy. Dodatkowo w piątym dniu po zapłodnieniu (5 dpf, ang. *days post fertilization*) u morfantów zaobserwowano wystąpienie cyst w obrębie pronefronów (**Rycina 55**).



Rycina 55.

Fenotyp modelu zebrafish *ift122*. Skala: 400 μ m. W 80 godzinie po zapłodnieniu (80 hpf) w embrionach obserwowano skrócenie osi ciała, obrzęk serca i małe oczy. W piątym dniu po zapłodnieniu (5 dpf) u morfantów zaobserwowano wystąpienie cyst w obrębie pronefronów.

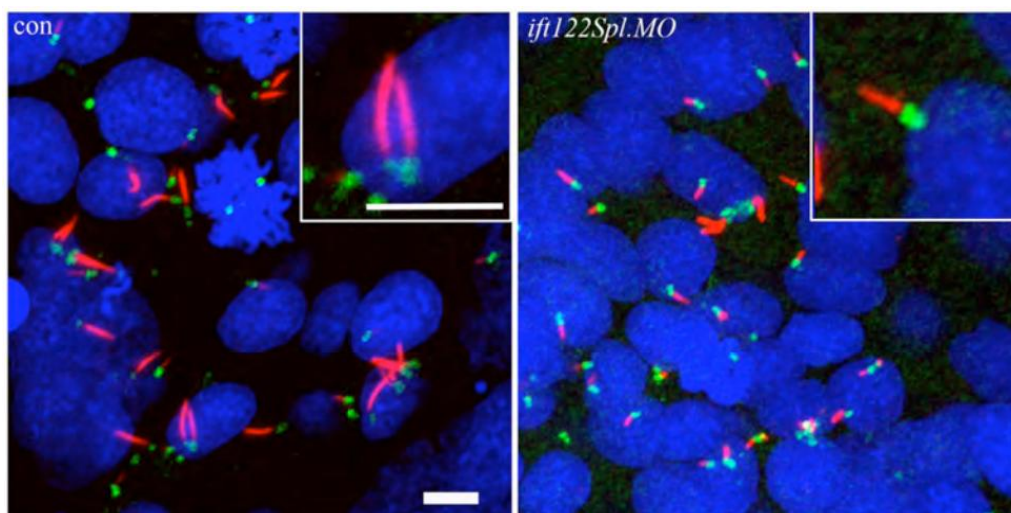
Ze względu na to, że pacjenci z CED cierpią na niewydolność nerek, a dysfunkcje rzęsek związane są z wystąpieniem torbieli w obrębie nerek, przeprowadzono analizę struktury rzęsek w przewodach pronefrycznych (PND) w modelu zebrafish *ift122*. Przeprowadzony eksperyment wykazał zmniejszoną liczbę centrosomów i skrócenie rzęsek u mutantów *ift122* w 24 godzinie po zapłodnieniu (hpf) w porównaniu do kontroli. Otrzymane wyniki przedstawiono na rycinie (**Rycina 56**).



Rycina 56.

Analiza rzęsek w przewodach pronefrycznych. Rzęski (acetylowana α -tubulina, czerwony), centrosomy (γ -tubulina, zielony), jądro komórkowe (DAPI, niebieski). Skala: 10 μ m. Zmniejszona liczba centrosomów i skrócenie rzęsek u mutantów *ift122* w 24 godzinie po zapłodnieniu w porównaniu do kontroli.

Analiza w obrębie pęcherzyka Kupffer'a (KV, odpowiednik węzła zarodkowego) wykazała skrócenie struktur rzęsek w modelu zebrafish *ift122* w porównaniu do kontroli. Wyniki przedstawiono na rycinie (**Rycina 57**).

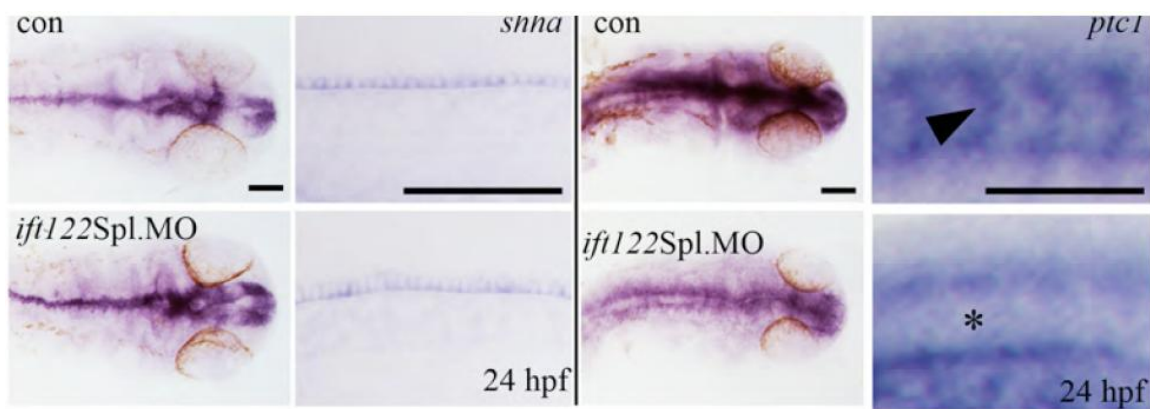


Rycina 57.

Analiza rzęsek w pęcherzyku Kupffer'a. Skala: 5 μ m. Skrócenie struktur rzęsek w modelu zebrafish *ift122* w porównaniu do kontroli.

Ponieważ u pacjentów z zespołem Sensenbrenner występuje brachydaktylia, która może być związana z uszkodzeniem szlaku sonic hedgehog (shh) oraz że w proces shh zaangażowany jest transport wewnątrzrzęskowy IFT przeprowadzono analizę szlaku shh w modelu zebrafish *ift122*.^{40,67}

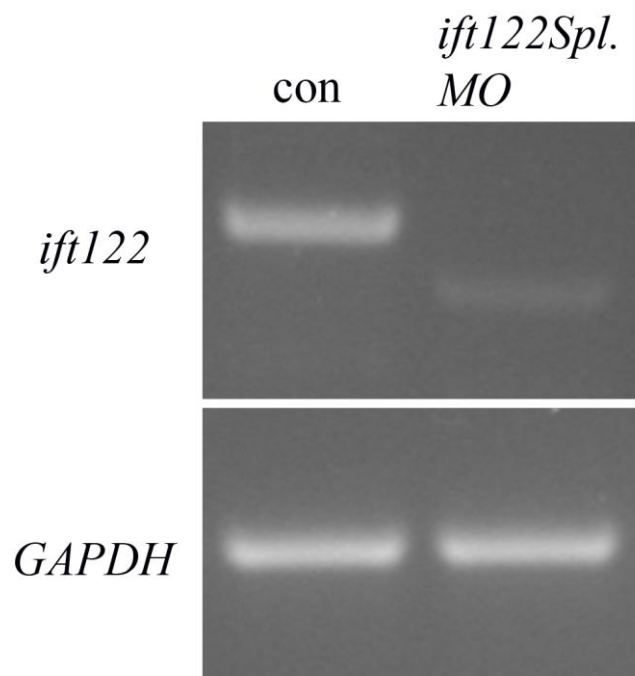
Eksperymenty wykazały łagodną redukcję szlaku Hh w modelu *ift122*. W badaniach przeprowadzono hybrydyzację *in situ* dla *shha* oraz *ptc1*. Embriony były analizowane w 24 godzinie po zapłodnieniu (hpf). *Shha* jest akumulowany w małych ilościach w dolnej części cewy nerwowej i w strunie grzbietowej zarówno w modelu *ift122* jak i w kontroli. Natomiast poziom *Ptc1* jest zmniejszony u morfantów w porównaniu do kontroli. Wyniki przedstawiono na rycinie (**Rycina 58**).



Rycina 58.

Analiza szlaku shh w modelu zebrafish *ift122*. Skala: 100 μ m. W 24 godzinie po zapłodnieniu (hpf) *shha* jest akumulowany w małych ilościach w dolnej części cewy nerwowej i w strunie grzbietowej zarówno w modelu *ift122* jaki w kontroli. Natomiast poziom *Ptc1* jest zmniejszony u morfantów w porównaniu do kontroli.

W celu potwierdzenia zmniejszonej ilości RNA *Ift122* w modelu *Danio rerio* przeprowadzono specyficzną reakcję RT-PCR. Wyniki przedstawiono na rycinie (Rycina 59).



Rycina 59.

Wyniki reakcji RT-PCR specyficznej dla *ift122*. Con – kontrola, *ift122Spl.MO.* – morfolino splicingowy *ift122*, kontrola ekspresji genu metabolizmu podstawowego *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego.

4.9. Analiza *in silico*

4.9.1. PCR *in silico*

Specyficzność zaprojektowanych primerów do reakcji amplifikacji wszystkich eksonów genu *IFT122* sprawdzono z wykorzystaniem programu PCR *in silico* (UCSC Genome Browser). Wyniki analizy przedstawiono na przykładzie eksonu 1 genu *IFT122*.

Sekwencje primerów zaprojektowanych dla eksonu 1 genu *IFT122*:

1. *IFT122_ex1_f* CACCAATCAAATCCATTCTCG
2. *IFT122_ex1_r* CCCCTCAAACACGCTGC

UCSC In-Silico PCR

```
>chr3:129158865+129159296 432bp CACCAATCAAATCCATTCTCG CCCCTCAAACACGCTGC
CACCAATCAAATCCATTCTCGaggaagacgcaccgccccacacgccccg
accaatcgctcgcgctctggttgcgctggcgcccttaggggctccagtgcc
accattgcttttgcgcttttctggctttccctttcggacatgcgcgctc
ggagcaaggcgccctcgactcagcttaccgcatgtacgttgccaggg
gtaacgcaggtagccaaagtggcttgtggagtggcgaccgtagtgaggc
ggttgcgtagacagacgctgaggcgggtaggaggagcccagccgtaagg
gaagccgtgatgagggccggtgtgacgtggagagataaagccgagcactg
gtgaggagcggggcggttcgcgaagagcaggaggtcgagtcctcgcgggg
agtgcgcgagccgctGCAGCGTGTTTGAGGGG
```

Primer Melting Temperatures

```
Forward: 60.3 C caccaatcaaatccattctcg
Reverse: 61.4 C cccctcaaacacgctgc
```

Przeprowadzona analiza PCR *in silico* wykazała, że primery zaprojektowane do reakcji amplifikacji metodą PCR wszystkich eksonów genu *IFT122* są specyficzne.

4.9.2. Analiza *in silico* zmian *missens* zidentyfikowanych w genie *IFT122*

Analiza genu *IFT122* pozwoliła na identyfikację trzech zmian typu *missens*. Zidentyfikowane zmiany są zlokalizowane we wszystkich 4 izoformach genu *IFT122*.

Izofroma 1:

1. p.W7C; 2. p.S373F; 3. p.V553G

Izofroma 2:

1. p.W7C; 2. p.S302F; 3. p.V502G

Izofroma 3:

1. p.W7C; 2. p.S263F; 3. p.V443G

Izofroma 4:

1. p.W7C; 2. p.S211F; 3. p.V391G

W celu oceny wpływu zidentyfikowanych zamian typu *missens* na produkt ekspresji genu *IFT122* przeprowadzono analizę komputerową *in silico* z wykorzystaniem dwóch programów SIFT oraz PolyPhen. Analizę przeprowadzono dla wszystkich czterech izoform genu *IFT122*. Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiono poniżej.

Wyniki analizy z wykorzystaniem programu SIFT

Izoforma 1

SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000296266,W7C	ENSP00000296266	7	W	C	DAMAGING	0	2.91	34
ENSP00000296266,S373F	ENSP00000296266	373	S	F	DAMAGING	0	2.69	94
ENSP00000296266,V553G	ENSP00000296266	553	V	G	DAMAGING	0	2.44	108

Izoforma 2

SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000324005,W7C	ENSP00000324005	7	W	C	DAMAGING	0	2.55	73
ENSP00000324005,S322F	ENSP00000324005	322	S	F	DAMAGING	0	2.53	88
ENSP00000324005,V502G	ENSP00000324005	502	V	G	DAMAGING	0	2.39	105

Izoforma 3

SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000323973,W7C	ENSP00000323973	7	W	C	DAMAGING	0	2.27	101
ENSP00000323973,S263F	ENSP00000323973	263	S	F	DAMAGING	0.02	1.84	180
ENSP00000323973,V443G	ENSP00000323973	443	V	G	DAMAGING	0.04	1.89	172

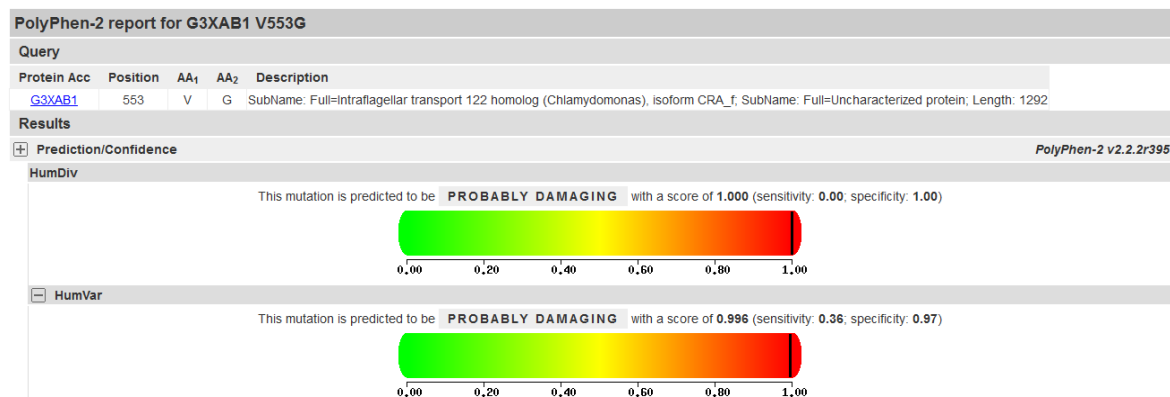
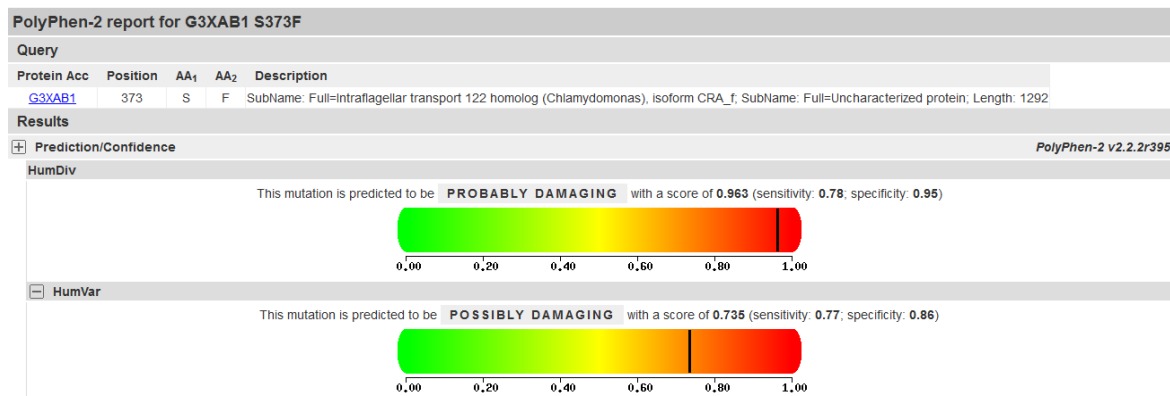
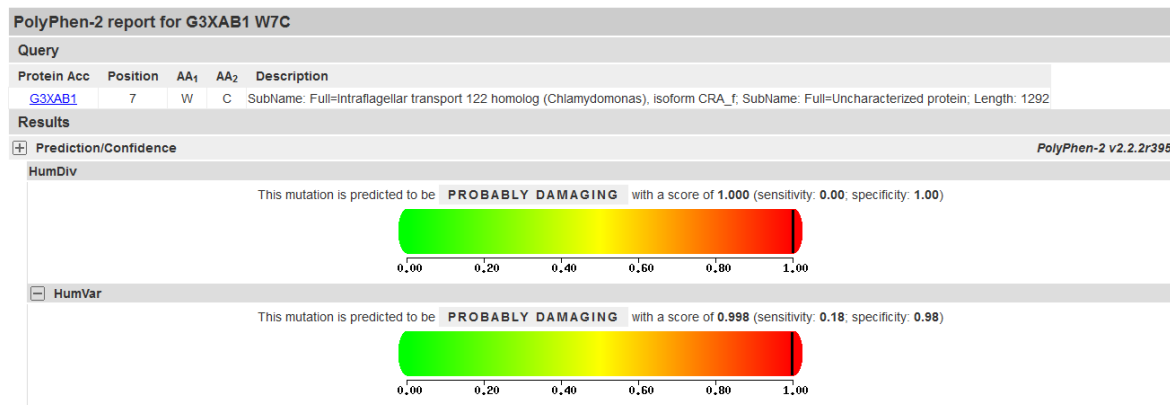
Izoforma 4

SIFT: PREDICTIONS

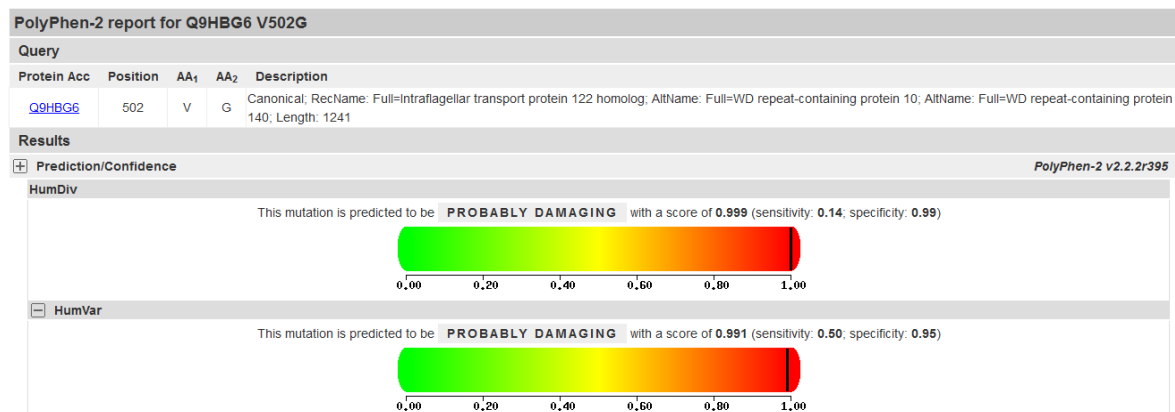
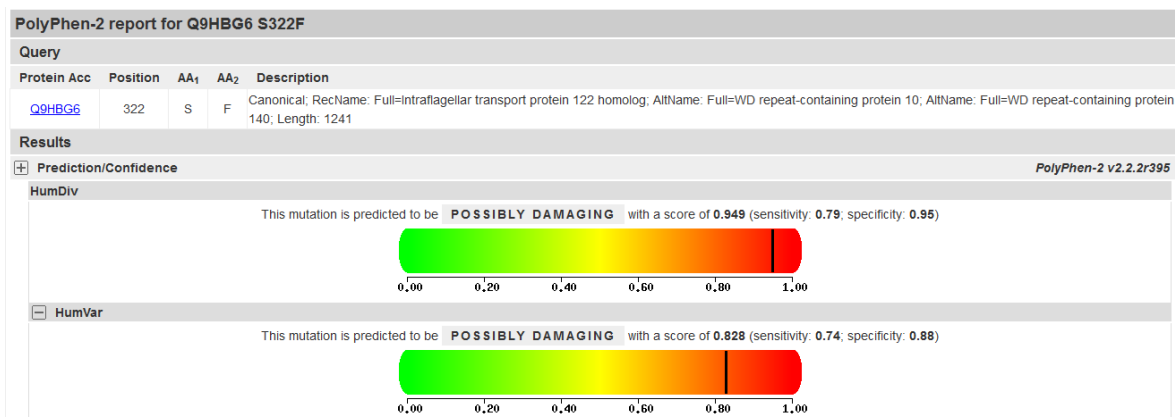
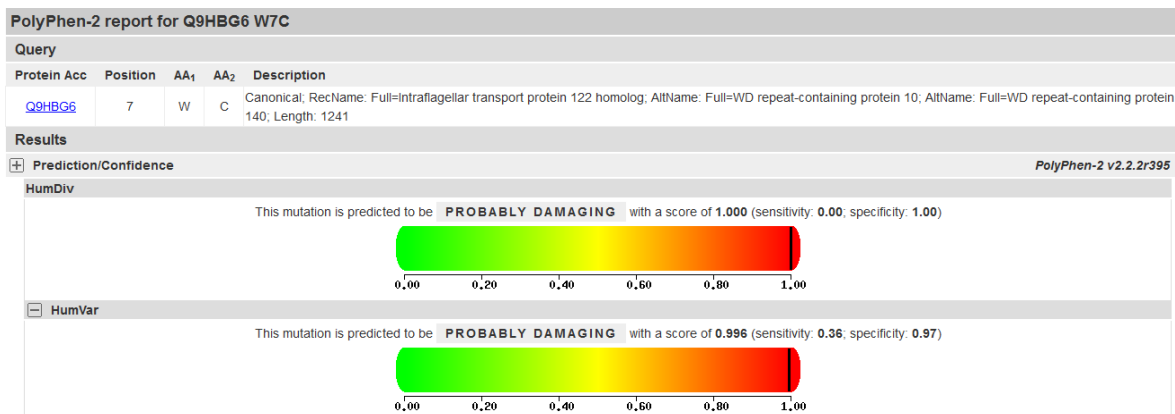
User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000324165,W7C	ENSP00000324165	7	W	C	DAMAGING	0	2.55	95
ENSP00000324165,S211F	ENSP00000324165	211	S	F	DAMAGING	0.02	1.81	179
ENSP00000324165,V391G	ENSP00000324165	391	V	G	DAMAGING	0.01	1.83	174

Wyniki analizy z wykorzystaniem programu PolyPhen

Izoforma 1



Izoforma 2



Izoforma 3

PolyPhen-2 report for Q9HBG6-3 W7C

Query

Protein Acc	Position	AA ₁	AA ₂	Description
Q9HBG6-3	7	W	C	Isoform 3 of Intraflagellar transport protein 122 homolog OS=Homo sapiens GN=IFT122

Results

Prediction/Confidence PolyPhen-2 v2.2.2r395

HumDiv

This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of **1.000** (sensitivity: **0.00**; specificity: **1.00**)

HumVar

This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of **1.000** (sensitivity: **0.00**; specificity: **1.00**)

PolyPhen-2 report for Q9HBG6-3 S263F

Query

Protein Acc	Position	AA ₁	AA ₂	Description
Q9HBG6-3	263	S	F	Isoform 3 of Intraflagellar transport protein 122 homolog OS=Homo sapiens GN=IFT122

Results

Prediction/Confidence PolyPhen-2 v2.2.2r395

HumDiv

This mutation is predicted to be **POSSIBLY DAMAGING** with a score of **0.831** (sensitivity: **0.84**; specificity: **0.93**)

HumVar

This mutation is predicted to be **POSSIBLY DAMAGING** with a score of **0.789** (sensitivity: **0.76**; specificity: **0.87**)

PolyPhen-2 report for Q9HBG6-3 V443G

Query

Protein Acc	Position	AA ₁	AA ₂	Description
Q9HBG6-3	443	V	G	Isoform 3 of Intraflagellar transport protein 122 homolog OS=Homo sapiens GN=IFT122

Results

Prediction/Confidence PolyPhen-2 v2.2.2r395

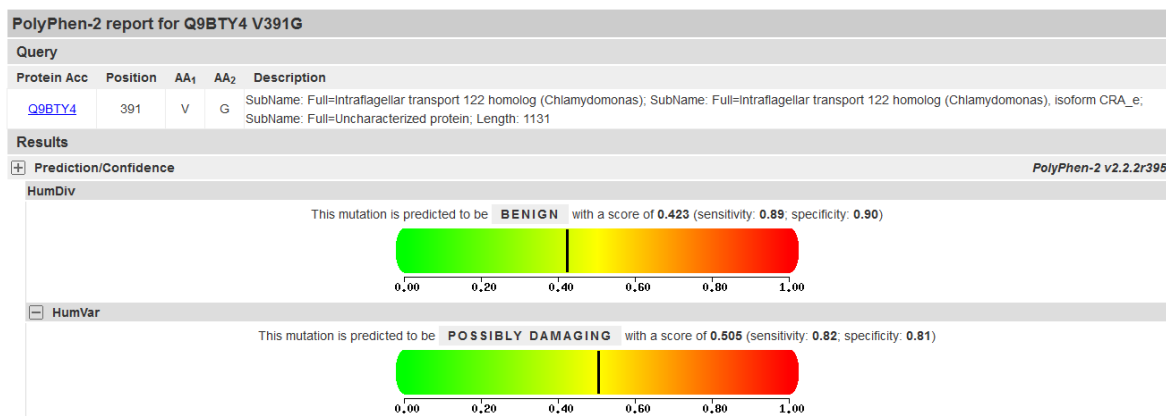
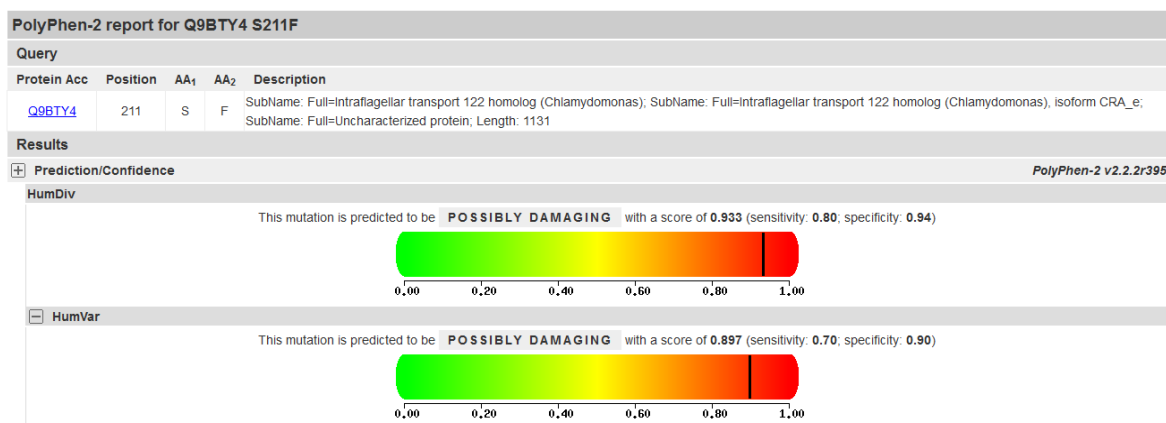
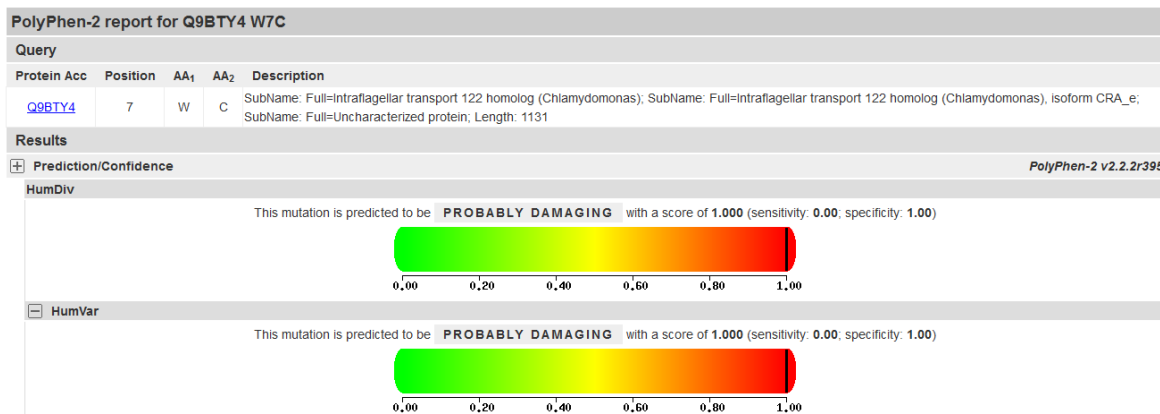
HumDiv

This mutation is predicted to be **POSSIBLY DAMAGING** with a score of **0.692** (sensitivity: **0.86**; specificity: **0.92**)

HumVar

This mutation is predicted to be **POSSIBLY DAMAGING** with a score of **0.594** (sensitivity: **0.81**; specificity: **0.83**)

Izoforma 4



Analiza z wykorzystaniem programu SIFT wykazała, iż wszystkie zmiany typu *missens* (W->C; S->F oraz V->G) zidentyfikowane w obrębie genu *IFT122* mają negatywny wpływ na produkt ekspresji tego genu. Współczynnik SIFT dla wszystkich analizowanych zmian dla wszystkich czterech izoform wynosił <0.05.

Natomiast analiza oceny wpływu zidentyfikowanych substytucji aminokwasowych z wykorzystaniem programu PolyPhen wykazała, że zmiana tryptofanu na cysteinę najprawdopodobniej ma istotny wpływ („probably damaging“) na wszystkie cztery izoformy genu *IFT122* zarówno dla modelu HumDiv jak i HumVar.

Ocena wpływu zmiany seryny na fenyloalaninę w czterech transkryptach badanego genu ma prawdopodobnie („possibly damaging“) wpływ na białko będące produktem ekspresji genu *IFT122*. Analiza przeprowadzona dla izoformy 1 genu *IFT122*, w oparciu o model HumDiv wykazała, że zmiana ta ma najprawdopodobniej istotny („probably damaging“) wpływ na białko IFT122.

Natomiast zmiana waliny na glicynę ma najprawdopodobniej istotny („probably damaging“) wpływ na izoformę 1 i 2 dla obu analizowanych modeli. Natomiast dla izoformy 3 ma prawdopodobnie („possibly damaging“) wpływ zarówno dla modelu HumDiv jak i HumVar. Podczas gdy dla izoformy 4 analiza z wykorzystaniem tego programu wykazała, że dla modelu HumDiv zmiana ta najprawdopodobniej nie ma istotnego wpływu („benign“) na produkt genu *IFT122*. Natomiast dla modelu HumVar ma prawdopodobnie („possibly damaging“) negatywny wpływ na białko IFT122.

4.9.3. Ocena wpływu zmiany w sekwencji intronowej

Ponieważ zmiana G->A w intronie 6 genu *IFT122* (c.502+5G>A) zidentyfikowana u pacjenta 4 zlokalizowana jest w obrębie miejsca donorowego pełniącego ważną rolę w prawidłowym przebiegu procesu splicingu przeprowadzono analizę *in silico* oceny wpływu zidentyfikowanej zmiany z wykorzystaniem programu ESE oraz Net2gene.

Analizowane sekwencje:

WT

```
ggagtaggagaattaatttctgtgcttttgttggtcactgcagaagagcatgtggtctaaagtcagaggctgtgggctcattatt
aaaatctcagttgtagccactgaaatcttgggttgctgcatagtaactacagttgttacttcccagGCACAATGATG
CTATACAATGTGTCTCCTACAATCCTATTACTCATCAACTGGCATCTTGTTCCCTCCAGT
GACTTTGgtacgttctgattcctgatgtcctgtcctggaataactgaaaatctgggctaaaaatgctaaaatgcattcagaat
atggtgatttat
```

MUT

ggagtaggagaattaatttctgtgcttttgttggtcactgcagaagagcatgtggtctaaagtcagaggctgtgggctcattatt
 aaaatcttcagttgtagccactgaaatctttgtggttgctgcataagtaactacagttgttactcccagGCACAATGATG
 CTATACAATGTGTCTCCTACAATCCTATTACTCATCAACTGGCATCTTGTTCCCTCCAGT
 GACTTTGgtacattctgattcctgatgtcctgtcctggaataactgaaaatctgggctaaaaatgctaaaatgattcagaat
 atggtgatttat

Program ESE

Matrices and threshold used:

number of motifs: 3

#1:5SS_U2_human	5' splice sites (donor) of human (U2 type)	6.67	active
#2:3SS_U2_human	3's splice sites (acceptor) of human (U2 type)	6.632	active
#3:BranchSite	Mammalian branch site (U2 type)	0	active

ESEfinder result:

Seq	Motif	Position	Site	Score
WT	5SS_U2_human	222	CCTCCAGTGACTTTGgtacgttctgattcc	6.47120
WT	3SS_U2_human	145	ttgtttacttcccagGCACAATGATGCTAT	9.95480
WT	BranchSite	106	cactgaa 5.62260	
MUT	5SS_U2_human	49	agcatgtggtctaaagtcagaggctgtggg	4.00050
MUT	3SS_U2_human	145	ttgtttacttcccagGCACAATGATGCTAT	9.95480
MUT	BranchSite	106	cactgaa 5.62260	

Program Net2gene**WT**

```
***** NetGene2 v. 2.4 *****

The sequence: Sequence has the following composition:

Length: 325 nucleotides.
25.8% A, 18.5% C, 20.9% G, 34.8% T, 0.0% X, 39.4% G+C

Donor splice sites, direct strand
-----
           pos 5'->3'  phase strand  confidence  5'      exon intron  3'
           237         0      +         0.00    AGTGACTTTG^GTACGTTCTG

Donor splice sites, complement strand
-----
No donor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, direct strand
-----
           pos 5'->3'  phase strand  confidence  5'      intron exon  3'
           159         1      +         0.28    TACTTCCCAG^GCACAATGAT

Acceptor splice sites, complement strand
-----
No acceptor site predictions above threshold.
```

Mut

```

***** NetGene2 v. 2.4 *****

The sequence: Sequence has the following composition:

Length: 325 nucleotides.
26.2% A, 18.5% C, 20.6% G, 34.8% T, 0.0% X, 39.1% G+C

Donor splice sites, direct strand
-----
No donor site predictions above threshold.

Donor splice sites, complement strand
-----
No donor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, direct strand
-----
pos 5'->3' phase strand confidence 5' intron exon 3'
159 1 + 0.27 TACTTCCCAG^GCACAATGAT

Acceptor splice sites, complement strand
-----
No acceptor site predictions above threshold.

```

Analiza z wykorzystaniem program ESE oraz Net2gene wykazała i zmiana G->A w intronie 6 genu *IFT122* powoduje zanik miejsca donorowego niezbędnego dla przebiegu prawidłowego procesu splicingu.

4.9.4. Analiza m-fold DNA

Przeprowadzona reakcja RT-PCR pozwoliła na określenie, iż w krwi obwodowej ekspresji ulega transkrypt 3, nowy transkrypt N (z pominięciem eksonu 6) oraz transkrypt 4 genu *IFT122*. W celu oceny poziomu ekspresji poszczególnych transkryptów u pacjenta CED-03/4 w porównaniu do prób kontrolnych przeprowadzono reakcję real-time PCR. W celu sprawdzenia poprawności zaprojektowanych primerów przeprowadzono analizę z użyciem programu m-fold. Wyniki analizy przedstawiono na rycinach (**Rycina 60-62**).

1. Primery specyficzne dla transkryptu 3 genu *IFT122*.

Analizowana sekwencja:

CTGAAGTACACGCACAATGATGCTATACAATGTGTCTCCTACAATCCTATTACTCATCAACTGG
CATCTTGTTCCTCCAGTGACTTTGGTTGTGGTCTCCTGAACAGAAGTCTGTCTCCAAACACA
AATCAAGCAGCAAGATCATCTGCTGCAGCTGGACAAATGATGGTCAGTACCTGGCGCTG

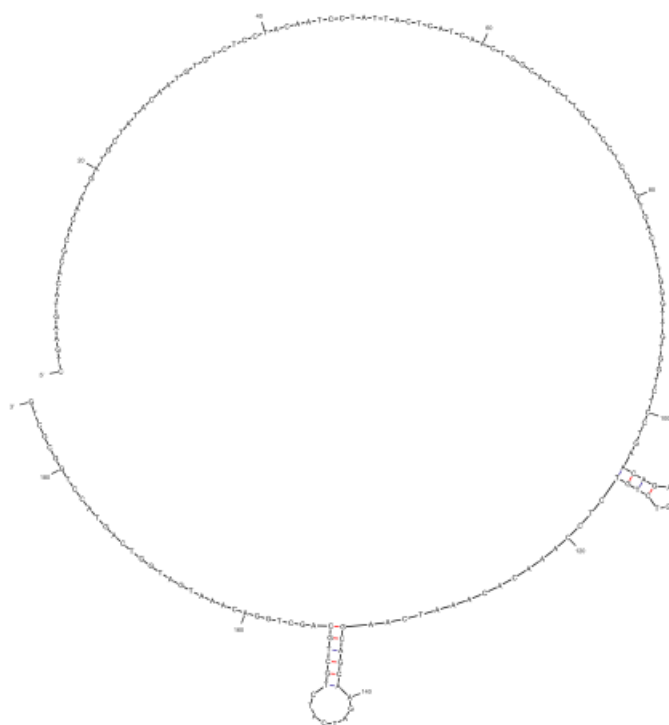
Sekwencje zaprojektowanych primerów:

Forward 4_6 CTGAAGTACACGCACAATGATG

Revers_8 CAGCGCCAGGTAAGTACTGACC

Wielkość produktu: 186 bp

Wynik m-fold: dG = -1.51 kcal/mol

**Rycina 60.**

Wynik analizy m-fold dla transkryptu 3 genu *IFT122*.

2. Primery specyficzne dla nowego transkryptu N genu *IFT122*

Analizowana sekwencja:

GCATTCTGAAGTACACGGTTGTGGTCTCCTGAACAGAAGTCTGTCTCCAAACACAAAT
CAAGCAGCAAGATCATCTGCTGCAGCTGGACAAATGAT**GGTCAGTACCTGGCGCTG**

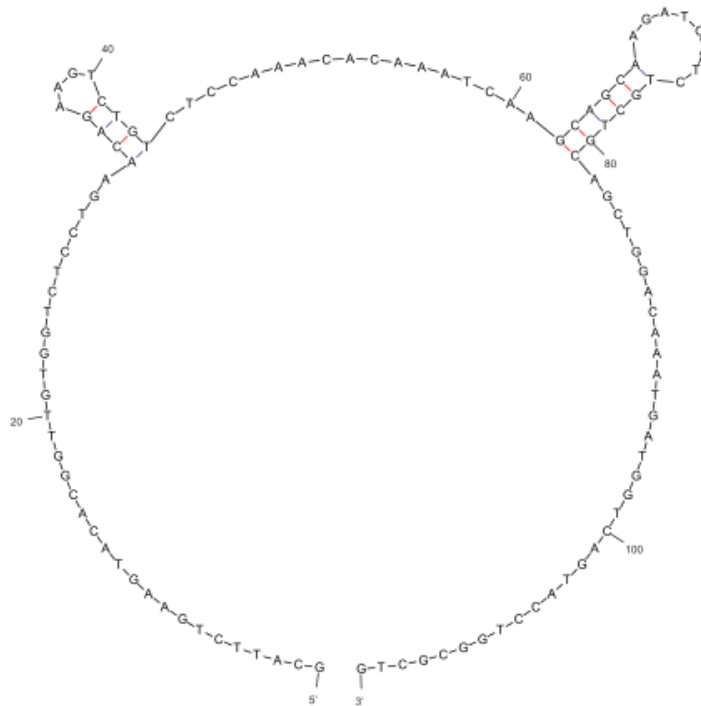
Sekwencje zaprojektowanych primerów:

Forward_4_7_new GCATTCTGAAGTACACGGTTG

Revers_8 CAGCGCCAGGTAAGTAC

Wielkość produktu: 114 bp

Wyniki m-fold: $dG = -1.51$ kcal/mol

**Rycina 61.**

Wynik analizy m-fold dla nowego transkryptu N (z pominięciem eksonu 6) genu *IFT122*.

3. Primery specyficzne dla transkryptu 4 genu *IFT122*

Analizowana sekwencja:

GCAGATTACTGGTTTATGACACCTCTGATGGCACCTTACTTCAGCCCCTCAAGGGACACAAAG
 ACACTGTGTACTGTGTGGCATATGCCAAGGATGGGTTGTGGTCTC

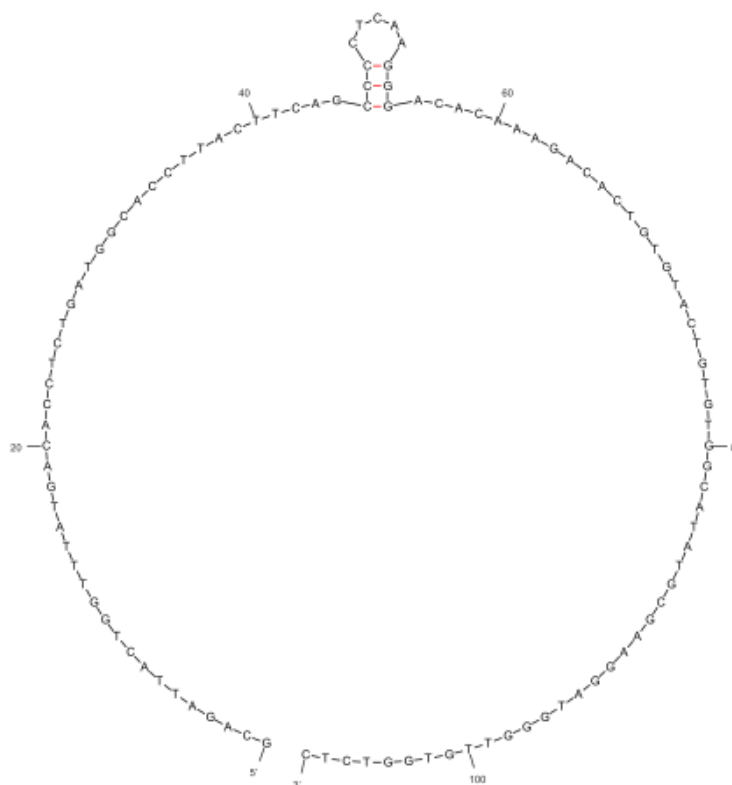
Primery specyficzne dla izoformy 4:

Forward 2_3 GCAGATTACTGGTTTATGACACCTC

Revers 3_7 GAGACCACAACCCATCCTTC

Wielkość produktu PCR: 108 bp

Wynik m-fold: dG = -0.64 kcal/mol

**Rycina 62.**

Wynik analizy m-fold dla transkryptu 4 genu *IFT122*.

Analiza z wykorzystaniem programu m-fold wykazała, iż w miejscu wiązania się primerów zaprojektowanych dla trzech analizowanych transkryptów genu *IFT122* nie dochodzi do wytworzenia się struktur, które mogłyby ograniczyć wiązanie się primerów do danej sekwencji.

4.10. Analiza profilu ekspresji całego genomu z wykorzystaniem programu DAVID

Przeprowadzona analiza profilu ekspresji całego genomu pacjenta (CED-01/2) i kontroli wykazała, że u pacjenta ponad 1300 genów ulega zmniejszonej ekspresji (Diff. score < -20), a ponad 1200 genów ulega zwiększonej ekspresji (Diff. Score > 20) w porównaniu do kontroli. Na tej podstawie stworzono listy genów ze zmienioną ekspresją. W celu interpretacji uzyskanych wyników przeprowadzono analizę z wykorzystaniem programu DAVID.

Wyniki dla listy zawierającej geny o zmniejszonym poziomie ekspresji w stosunku do kontroli.

Functional annotation clustering

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 10.94			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	cytoskeleton	RT		92	1.4E-13	2.2E-11
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	cytoskeleton	RT		160	7.2E-12	4.0E-9
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	microtubule cytoskeleton	RT		82	2.1E-11	5.8E-9
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	non-membrane-bounded organelle	RT		257	2.8E-11	5.2E-9
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	intracellular non-membrane-bounded organelle	RT		257	2.8E-11	5.2E-9
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	cytoskeletal part	RT		118	1.3E-10	1.9E-8
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 9.97			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	cell cycle	RT		72	2.3E-12	2.8E-10
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell cycle phase	RT		70	7.1E-12	1.2E-8
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	mitosis	RT		40	1.4E-11	1.5E-9
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	mitotic cell cycle	RT		64	2.4E-11	2.7E-8
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	M phase	RT		59	3.6E-11	3.1E-8
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	M phase of mitotic cell cycle	RT		46	7.4E-11	5.1E-8
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell cycle	RT		104	8.7E-11	5.0E-8
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	mitosis	RT		45	1.4E-10	6.9E-8
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	nuclear division	RT		45	1.4E-10	6.9E-8
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	cell division	RT		47	3.0E-10	2.7E-8
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	organelle fission	RT		45	5.4E-10	2.3E-7
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell cycle process	RT		81	6.3E-10	2.4E-7
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	spindle	RT		33	3.2E-9	3.0E-7
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell division	RT		51	3.4E-9	1.1E-6
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 6.75			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	microtubule-based process	RT		43	1.1E-7	2.7E-5
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	spindle organization	RT		16	1.9E-7	4.0E-5
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	microtubule cytoskeleton organization	RT		30	2.7E-7	5.1E-5

Wyniki dla listy zawierającej geny o zwiększonym poziomie ekspresji w stosunku do kontroli.

Functional annotation clustering

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 11.62			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	endoplasmic reticulum	RT		98	4.2E-16	2.4E-13
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	endoplasmic reticulum	RT		114	8.8E-13	3.8E-10
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	endoplasmic reticulum part	RT		49	3.9E-8	3.4E-6
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 9.39			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	lysosome	RT		34	9.4E-12	2.6E-9
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	lytic vacuole	RT		40	2.0E-10	4.3E-8
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	lysosome	RT		40	2.0E-10	4.3E-8
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	vacuole	RT		42	3.7E-9	4.0E-7
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	Lysosome	RT		28	8.6E-9	1.5E-6
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 7.52			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	pigment granule	RT		24	1.4E-9	2.0E-7
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	melanosome	RT		24	1.4E-9	2.0E-7
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	membrane-bounded vesicle	RT		68	5.4E-8	3.9E-6
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	vesicle	RT		75	1.6E-7	9.9E-6
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	cytoplasmic membrane-bounded vesicle	RT		65	1.8E-7	9.8E-6
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	cytoplasmic vesicle	RT		72	2.7E-7	1.3E-5

Wyniki dla listy zawierającej geny o zmniejszonym oraz zwiększonym poziomie ekspresji w stosunku do kontroli.

Functional annotation clustering

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 7.64		Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	vasculature development	RT	70	3.5E-10	5.1E-7
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	blood vessel development	RT	66	5.5E-9	4.0E-6
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	blood vessel morphogenesis	RT	55	3.8E-7	9.1E-5
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	angiogenesis	RT	43	3.8E-7	8.8E-5
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 7.39		Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	cell cycle	RT	109	2.6E-12	6.5E-10
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell cycle	RT	160	6.3E-10	6.8E-7
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell cycle phase	RT	96	7.5E-9	4.7E-6
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell cycle process	RT	121	1.1E-8	5.9E-6
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	cell division	RT	65	1.9E-8	2.0E-6
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	mitotic cell cycle	RT	87	2.1E-8	9.1E-6
<input type="checkbox"/>	SP_PIR_KEYWORDS	mitosis	RT	49	8.7E-8	7.2E-6
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	M phase of mitotic cell cycle	RT	58	2.2E-7	6.0E-5
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_FAT	spindle	RT	43	2.5E-7	2.0E-5
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	nuclear division	RT	57	2.8E-7	7.1E-5
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	mitosis	RT	57	2.8E-7	7.1E-5
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	M phase	RT	75	7.9E-7	1.5E-4
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	organelle fission	RT	57	1.1E-6	1.6E-4
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell division	RT	68	1.8E-6	2.4E-4
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 7.18		Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cytoskeleton organization	RT	105	1.4E-10	3.0E-7
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	actin filament-based process	RT	59	1.3E-6	1.8E-4
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	actin cytoskeleton organization	RT	56	1.6E-6	2.2E-4

Przeprowadzona analiza bioinformatyczna z wykorzystaniem programu DAVID pozwoliła na stworzenie tzw. grup genów o podobnej funkcji lub biorących udział w przebiegu tego samego procesu (tzw. functional annotation clustering), w obrębie ponad 2000 genów o zmienionym poziomie ekspresji w stosunku do kontroli. Analizę przeprowadzono w oparciu o listę zawierającą geny o zmniejszonym poziomie ekspresji i w oparciu o listę genów o zwiększonym poziomie ekspresji oraz w oparciu o listę zawierającą zestawienie wszystkich genów o zmienionej ekspresji.

Wyniki przeprowadzonej analizy wykazały, że zmiennej ekspresji ulegają głównie geny zaangażowane w cykl komórkowy, organizację cytoszkieletu i wrzeciona podziałowego oraz geny uczestniczące w przekazywaniu sygnałów w komórce. Zwiększonej ekspresji ulegają takie geny jak np. *PDGF α* , *PDGFC*, *PDGFD*, *PDGFRL*, *FGFRL1*, *BMP6*, *CCND2*, *CCND3*.

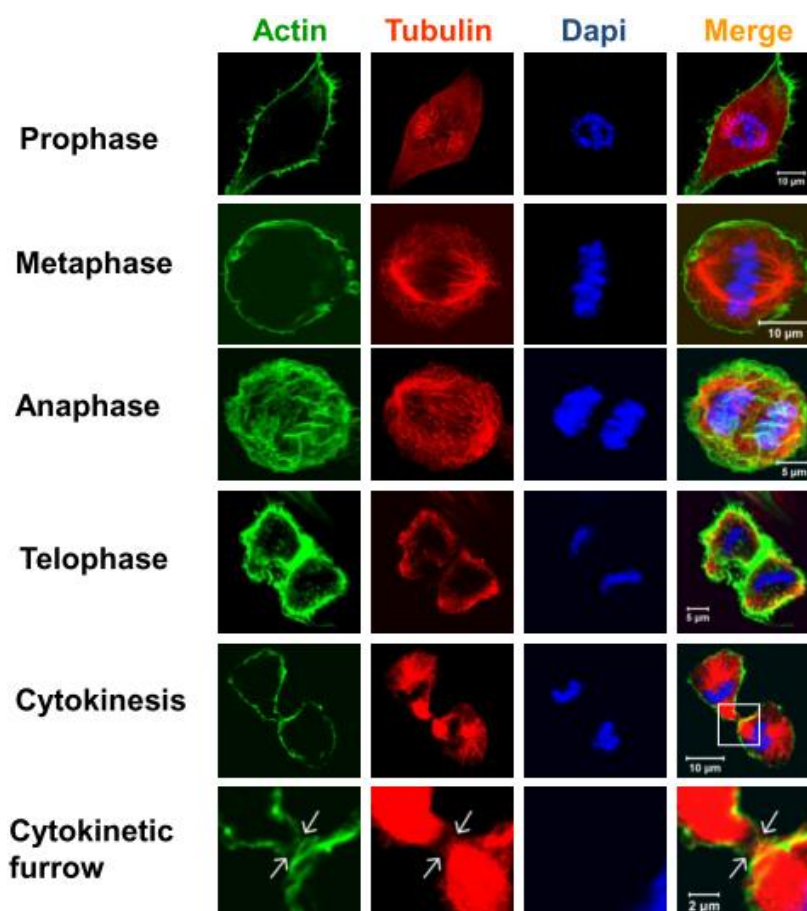
Zmniejszonej ekspresji ulegają natomiast takie geny jak np. *WNT2*, *WNT5A*, *WNT5B*, *PDGFR β* , *FGF9*, *MAP3K8*, *MAPK3*, *CCND1*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CDKN3*, *CDKN1B*, *IFT47* oraz *IFT122*. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników konieczne jest przeprowadzenie dalszych analiz tj. ilościowy qPCR dla wybranych genów o zmienionym poziomie ekspresji.

Ze względu na to, że w przeprowadzonym badaniu ekspresji całego genomu zidentyfikowano zmiany w poziomie ekspresji genów ważnych dla przebiegu cyklu komórkowego przeprowadzono analizę procesu mitozy w komórkach fibroblastów skóry pacjenta oraz kontroli.

4.11. Ocena przebiegu cyklu komórkowego i morfologii fibroblastów skóry

Na podstawie wyników otrzymanych w badaniach ekspresji całego genomu przeprowadzonej na fibroblastach skóry pacjenta oraz kontroli i na podstawie analizy bioinformatycznej, która wykazała zmienioną ekspresję szeregu genów zaangażowanych i ważnych dla przebiegu cyklu komórkowego przeprowadzono analizę podziału mitotycznego fibroblastach skóry kontroli oraz pacjenta CED-01/2. Wyniki przedstawiono na rycinach (Rycina 63-64).

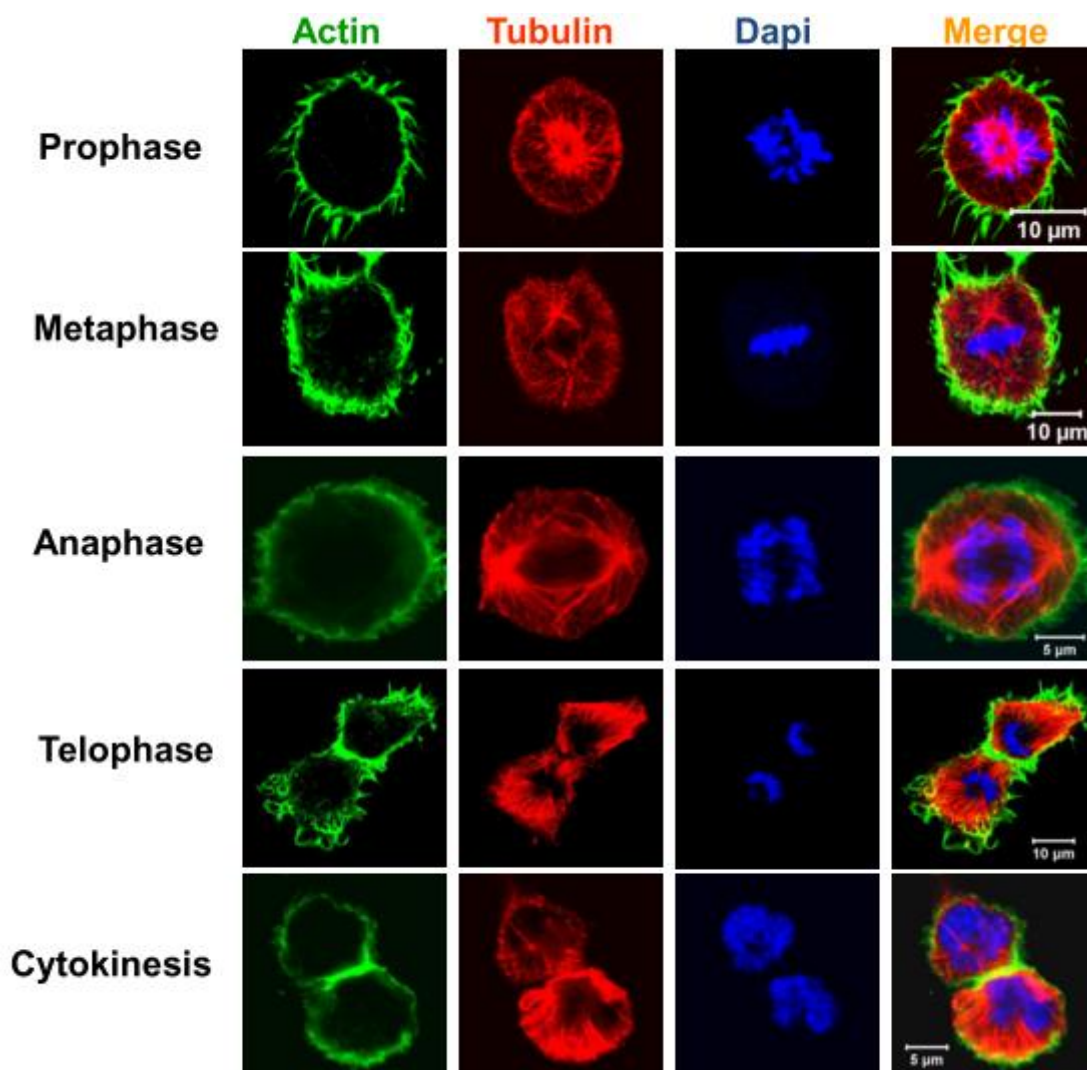
WT



Rycina 63.

Przebieg procesu mitozy na przykładzie linii komórkowej fibroblastów skóry kontroli. Prophase – profaza, methapase – metafaza, anaphase – anafaza, telophase – telofaza, cytokinesis – cytokineza, cytokinetic furrow – bruzda podziałowa. Actin – aktyna, tubulin – tubulina, DAPI, merge – zestawienie.

MUT

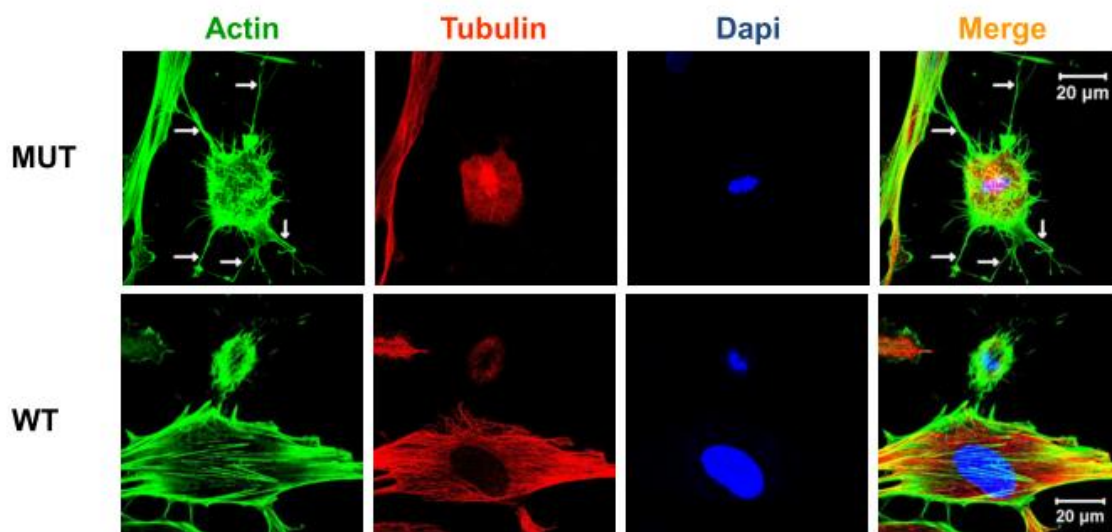


Rycina 64.

Przebieg procesu mitozy na linii komórkowej fibroblastów skóry pacjenta CED-01/2. Prophase – profaza, methapase – metafaza, anaphase – anafaza, telophase – telofaza, cytokinesis – cytokineza. Actin – aktyna, tubulin – tubulina, DAPI, merge – zestawienie.

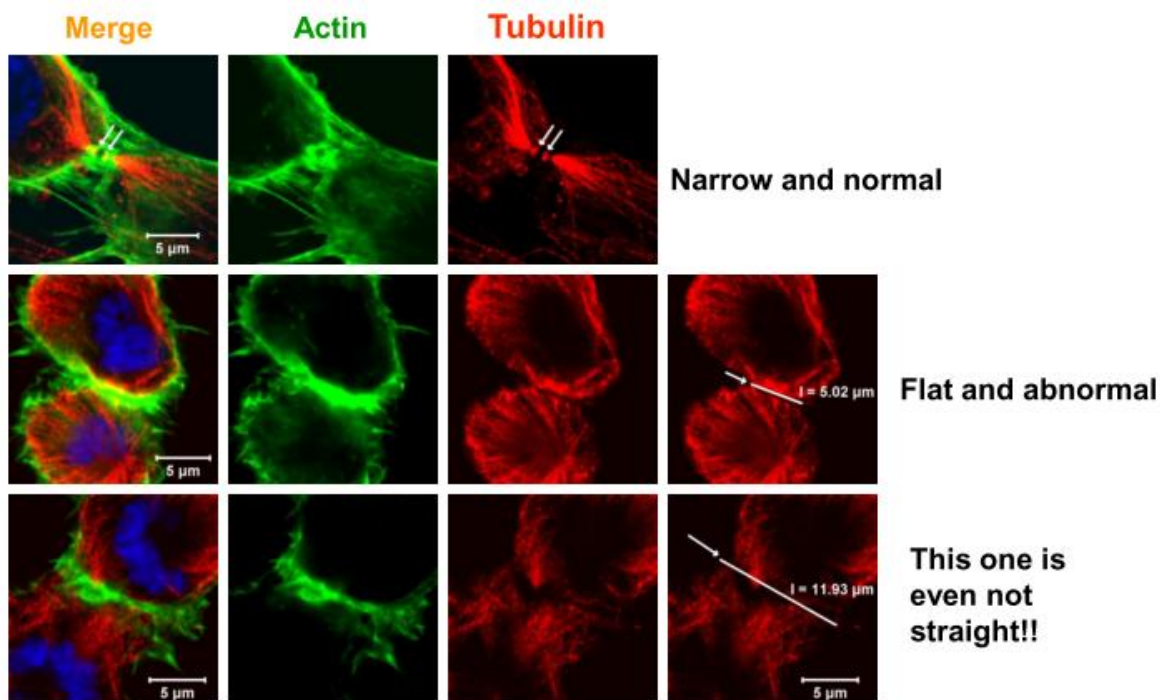
Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że zarówno w komórkach kontrolnych jaki i w komórkach pacjenta podział chromosomów przebiega prawidłowo. Przeprowadzony eksperyment wykazał, że w metafazie komórki pacjenta wykazują niepełną retrakcję w porównaniu do komórek kontrolnych. Wyniki przedstawiono na rycinie (**Rycina 65**). Analiza cyklu komórkowego wykazała również, iż komórki z pacjenta wykazują mieszany fenotyp na etapie cytokinezy, w momencie tworzenia się bruzdy podziałowej. W tej fazie widoczne są komórki z prawidłowo i nieprawidłowo

wytworzoną bruzdą podziałową (w niektórych komórkach bruzda podziałowa nie jest prosta, w niektórych jest płaska). Wyniki przedstawiono na rycinie (Rycina 66).



Rycina 65.

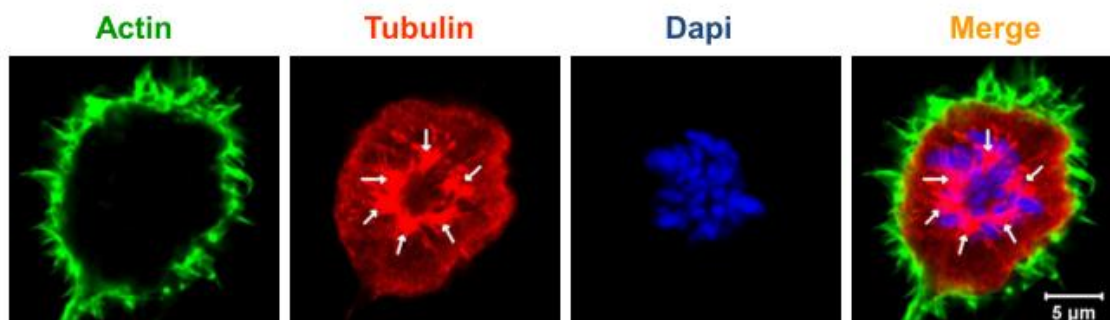
Komórki fibroblastów w metafazie. Actin – aktyna, tubulin – tubulina, DAPI, merge – zestawienie. W metafazie komórki pacjenta wykazują niepełną retrakcję w porównaniu do komórek kontrolnych.



Rycina 66.

Bruzda podziałowa w komórkach pacjenta. Merge – zestawienie, actin – aktyna, tubulin – tubulina. Komórki z pacjenta wykazują mieszany fenotyp na etapie cytokinezy, w momencie tworzenia się bruzdy podziałowej. W tej fazie widoczne są komórki z prawidłowo i nieprawidłowo wytworzoną bruzdą podziałową (w niektórych komórkach bruzda podziałowa nie jest prosta, w niektórych jest płaska).

Badania te wykazały również, że w niektórych komórkach pacjenta obecne są więcej niż dwa centra organizacji mikrotubul (MTOC) w profazie cyklu komórkowego. Wyniki przedstawiono na rycinie (**Rycinie 67**).

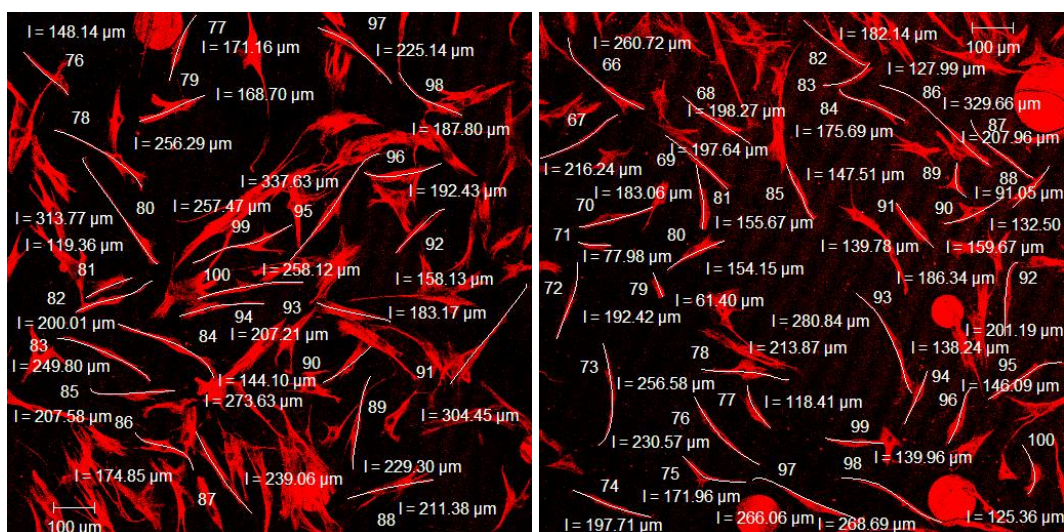


Rycina 67.

Profaza cyklu komórkowego fibroblastów skóry pacjenta. W niektórych komórkach pacjenta obecne są więcej niż dwa centra organizacji mikrotubul (MTOC) w profazie cyklu komórkowego.

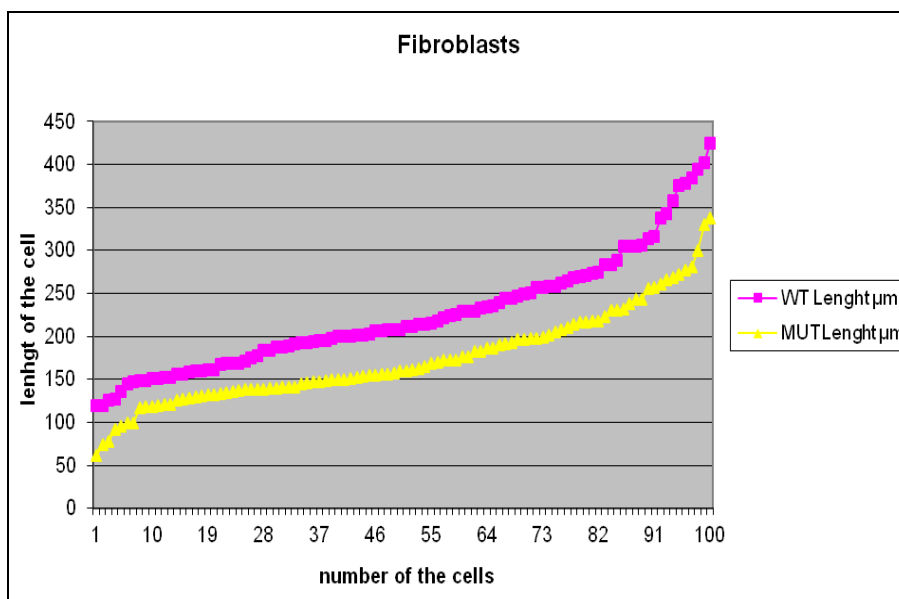
Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że zarówno w komórkach kontrolnych jak i w komórkach pacjenta podział chromosomów przebiega prawidłowo. Natomiast w niektórych komórkach pacjenta stwierdzono nieprawidłowości w strukturze bruzdy podziałowej, co sugeruje, że proces właściwej cytokinezy może być opóźniony. Analiza wykazała również niekompletną retrakcję w metafazie oraz obecność więcej niż dwóch centrów organizacji mikrotubul (MTOC) w profazie cyklu komórkowego w niektórych komórkach pacjenta. Ze względu na to, że zmiany obserwowano tylko w niektórych komórkach pacjenta należy przeprowadzić dodatkowe badania, które pozwoliłyby określić odsetek komórek, w których występują zidentyfikowane nieprawidłowości.

W ramach badań przeprowadzono również analizę morfologii fibroblastów skóry pacjenta oraz kontroli, w której zmierzono długości poszczególnych komórek. Analizowano 100 komórek pacjenta i 100 komórek kontrolnych. Badanie nie wykazało różnic w długości komórek pacjenta w porównaniu do kontroli. Wyniki przedstawiono na rycinach (**Rycina 68-69**).



Rycina 68.

Analiza długości komórek fibroblastów skóry pacjenta CED-01/2 oraz kontroli. Lewy panel – kontrola, prawy panel – pacjent. Brak istotnych różnic w długości komórek pacjenta w porównaniu do kontroli.



Rycina 69.

Wynik analizy długości komórek fibroblastów skóry pacjenta CED-01/2 oraz kontroli.

4.12. Analiza genów kandydujących spoza *locus* dla CED

W przeprowadzonej analizie sekwencji kodujących genów kandydujących *THM1*, *DYNC2H1* oraz *IFT88* spoza *locus* dla zespołu Sensenbrenner nie zidentyfikowano mutacji. Szczegółowe wyniki analizy genów przedstawiono w załączniku (**Załącznik 3**).

IFT139 (THM1)

Skryning genu *THM1* pozwolił na identyfikację dwunastu różnych polimorfizmów SNP. Najczęściej identyfikowanym polimorfizmem SNP był rs10930190 oraz rs7592429, którego wykryto u wszystkich dziewięciu analizowanych pacjentów. Najrzadziej identyfikowanym polimorfizmem był rs2163648 oraz rs62177816, które zidentyfikowano odpowiednio u pacjenta 10 i 11.

DYNC2H1

Analiza genu *DYNC2H1* pozwoliła na wykrycie trzydziestu trzech różnych polimorfizmów SNP. Najczęściej identyfikowanym polimorfizmem SNP był rs688906, którego wykryto u wszystkich dziewięciu analizowanych pacjentów. Polimorfizmami SNP, które wykryto tylko raz w badanej grupie były rs2671333, rs313407, rs657936, rs654061, rs648387, rs6333970, rs2245404, rs6189976, rs12574626, rs11225578, rs11225584 oraz rs586592.

IFT88

Przeprowadzona analiza genu *IFT88* pozwoliła na zidentyfikowanie sześciu różnych polimorfizmów SNP. Najczęściej identyfikowanym polimorfizmem SNP był rs1329519, którego wykryto u siedmiu spośród dziewięciu analizowanych przypadków, a najrzadziej identyfikowanym rs2442455, którego wykryto tylko u jednego pacjenta.

5. PODSUMOWANIE

1. Analiza genu *IFT122* pozwoliła na identyfikację trzech mutacji typu *missens* i jednej mutacji splicingowej.
2. Wszystkie 4 zidentyfikowane zmiany nie były obecne wśród 340 kontrolnych chromosomów.
3. Zidentyfikowane zmiany typu *missens* obecne są we wszystkich czterech transkryptach, a analiza *in silico* z wykorzystaniem programu PolyPhen oraz SIFT wykazała, iż mają negatywny wpływ na białko IFT122.
4. Mutacja splicingowa powoduje pominięcie eksonu 6 genu *IFT122* i przedwczesną terminację procesu translacji.
5. Analiza przeprowadzona na fibroblastach skóry pacjenta wykazała zmniejszoną ilość i długość rzęsek w porównaniu do kontroli.
6. Analiza knockdown genu *ift122* w modelu zwierzęcym (*Danio rerio*) wykazała charakterystyczny fenotyp obserwowany w wielu modelach zespołów rzęskowych tj. w zespole Bardeta-Biedla, Jeune i nefronoftyzie.

6. DYSKUSJA

W przedstawionej pracy przeprowadzono badania mające na celu identyfikację podłoża molekularnego zespołu Sensenbrenner, który jest bardzo rzadkim zespołem wrodzonych wad rozwojowych. Obecnie w piśmiennictwie opisano ponad 30 pacjentów z tym zespołem. Dotychczas podłoże molekularne zespołu Sensenbrenner było nieznane.

6.1. Identyfikacja podłoża molekularnego zespołu Sensenbrenner

W celu identyfikacji podłoża genetycznego zespołu Sensenbrenner zebrano grupę 13 pacjentów z CED pochodzących z 12 rodzin. W małej polskiej spokrewnionej rodzinie przeprowadzono analizę sprzężeń, która pozwoliła na identyfikację *locus* dla zespołu Sensenbrenner zlokalizowanego na chromosomie 3q21-24. Region ten obejmuje prawie 17Mbp i zawiera 124 geny kodujące białka. Spośród tych genów wyselekcjonowano geny kandydujące i przeprowadzono ich analizę. W ramach projektu przebadano 79 genów z *locus* dla CED.

W 2007 roku w *Nature Genetics* ukazała się publikacja autorstwa Prof. P. Beales'a, w której opisano pierwszy gen *IFT80* (ang. *Intaflagellar transport 80*), którego mutacje są odpowiedzialne za wystąpienie zespołu Jeune. Gen ten zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 3q25.33, a przeprowadzone badania pozwoliły na identyfikację dwóch mutacji typu *missens* (H105Q, A701P) oraz delecji pojedynczego aminokwasu (L459del) w obrębie genu *IFT80* u pacjentów z JATD.¹¹² Zespół Jeune oraz zespół Sensenbrenner posiadają wiele wspólnych cech klinicznych tj. niski wzrost, skrócenie kończyn, wąska klatka piersiowa, niewydolność nerek oraz ten sam autosomalny recesywny sposób dziedziczenia. W zespole JATD brak jest natomiast zmian ektodermalnych typowych dla zespołu CED. Podobieństwo cech klinicznych pomiędzy zespołami przedstawiono na rycinie **(Rycina 70)**.

Ze względu na podobieństwo pomiędzy zespołem Jeune i zespołem Sensenbrenner wybrano gen z rodziny IFT, *IFT122* (intraflagellar transport 122), znajdujący się w obrębie zidentyfikowanego *locus* dla CED jako gen kandydujący i przeprowadzono jego skrining.

**Rycina 70.**

Cechy kliniczne wspólne dla zespołu JATD oraz CED: niski wzrost, skrócenie kończyn, brachydaktylia, wąska klatka piersiowa. Lewy panel: pacjenci z zespołem JATD.¹¹² Środkowy panel: pacjenci z CED (rodzina CED-01). Prawy panel: pacjenci z CED (źródło Gorlin et al., „Syndromes of Head and Neck”).¹¹³

Analiza genu *IFT122* pozwoliła na identyfikację homozygotycznej mutacji typu *missens* (p.V553G) w eksonie 15 w polskiej spokrewnionej rodzinie (CED-01). Przeprowadzona analiza genu u pozostałych pacjentów umożliwiła identyfikację kolejnej homozygotycznej mutacji typu *missens* (p.S373F) w eksonie 11 w drugiej spokrewnionej rodzinie z Norwegii (CED-02) oraz heterozygotycznej mutacji typu *missens* (p.W7C) w eksonie 1 w kombinacji z heterozygotyczną mutacją splicingową w intronie 6 (c.502+5G>A) genu *IFT122* u sporadycznego pacjenta z Włoch (CED-03). Analiza kosegregacji potwierdziła, że zidentyfikowane mutacje p.V553G oraz p.S373F kosegregują z chorobą, a rodzice są heterozygotami dla tych zmian. Natomiast analiza ta przeprowadzona w rodzinie CED-03 wykazała, że mutacja zlokalizowana w intronie 6 genu *IFT122* została odziedziczona od matki, podczas gdy zmiana p.W7C nie była obecna u żadnego z rodziców sugerując, że mogła ona powstać u pacjenta *de novo*.

Zidentyfikowane zmiany typu *missens* p.W7C oraz p.S373F zlokalizowane są w domenach funkcjonalnych białka IFT122 (domena WD), natomiast zmiana p.V553G zlokalizowana jest w pobliżu domeny WD. Domeny WD pełnią bardzo ważną rolę w interakcji białko-białko poprzez tworzenie struktur pełniących funkcję platformy dla białek wiążących.¹¹⁴ Wszystkie zmiany typu *missens* obecne są we wszystkich czterech

izoformach genu *IFT122*. Natomiast zidentyfikowana zmiana splicingowa zlokalizowana jest w intronie 6 genu *IFT122*, obecna jest w transkrypcie 1, 2 oraz 3 tego genu. Następnie przeprowadzono analizę 170 kontrolnych DNA. Żadna z czterech zidentyfikowanych zmian nie jest znanym polimorfizmem SNP (UCSC Genome Browser) i nie była obecna wśród 340 analizowanych kontrolnych chromosomów potwierdzając, że zidentyfikowane mutacje nie są rzadkimi i dotychczas nieopisanymi w bazach danych polimorfizmami SNP.

6.2. Polimorfizmy SNP zidentyfikowane w genie *IFT122* w grupie pacjentów z zespołem Sensenbrenner

Analiza genu *IFT122* w grupie 13 pacjentów z zespołem Sensenbrenner pozwoliła również na identyfikację 4 różnych polimorfizmów SNP. Najczęstszym polimorfizmem występującym w badanej grupie był wariant rs6805886, który zidentyfikowano w układzie homozygotycznym u wszystkich pacjentów. Uzyskane wyniki są zgodne z informacjami zawartymi w bazach danych, które podają, iż częstość występowania tego allelu w układzie homozygotycznym wynosi 100% dla populacji europejskiej. Natomiast u pacjenta oznaczonego numerem 7 wykryto 4 różne polimorfizmy SNP, z czego jeden (rs2301570) w układzie heterozygotycznym. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że gen *IFT122* charakteryzuje się niskim poziomem polimorficzności w obrębie SNP.

6.3. Ocena patogenności mutacji zidentyfikowanych w genie *IFT122*

Identyfikacja mutacji w nowych genach odpowiedzialnych za wystąpienie danej jednostki chorobowej wymaga potwierdzenia, że dany gen i zidentyfikowane w jego sekwencji zmiany mają związek z fenotypem obserwowanym u pacjenta. Pierwszym etapem takich badań jest analiza segregacji zmiany w rodzinie, podczas której sprawdza się czy dany wariant segreguje z chorobą. Kolejnym etapem jest sprawdzenie w dostępnych bazach danych czy zidentyfikowana zmiana jest znanym polimorfizmem. Następnie przeprowadza się analizę prób kontrolnych w celu wykluczenia, że dany wariant jest bardzo rzadkim i dotychczas nieopisanym polimorfizmem. Na podstawie informacji z piśmiennictwa analizuje się również czy zaburzenie funkcji danego białka może mieć wpływ na fenotyp obserwowany u pacjenta. Dalsza strategia postępowania uzależniona jest od rodzaju zidentyfikowanej zmiany. W przypadku mutacji typu *missens* określa się lokalizację zmiany na poziomie białka sprawdzając czy jest ona zlokalizowana np. w domenę funkcjonalnej. Ponieważ mutacje zmiany sensu powodują

zamianę aminokwasów, na podstawie współczynnika Granthama określa się różnice we właściwościach fizykochemicznych poszczególnych aminokwasów. W przypadku mutacji *missens* i mutacji splicingowych można również przeprowadzić analizę *in silico* z wykorzystaniem specjalnych programów komputerowych, za pomocą których można przewidzieć czy dana zmiana może mieć patogeniczny wpływ na produkt ekspresji badanego genu lub na prawidłowy przebieg procesu składania genu (splicingu). Kolejnym etapem jest przeprowadzenie badań funkcjonalnych. Strategia tych badań uzależniona jest od funkcji danego genu, rodzaju mutacji, poziomu ekspresji oraz od dostępności linii komórkowych od pacjenta/pacjentów, u których zidentyfikowano zmiany. W badaniach poznawczych i funkcjonalnych bardzo ważną rolę odgrywa także stworzenie modeli zwierzęcych tj. *Mus musculus*, *Drosophila Melanogaster* czy *Danio rerio*.

Ocena różnic właściwości fizykochemicznych pomiędzy poszczególnymi aminokwasami – współczynnik Granthama

Współczynnik Granthama pozwala na określenie różnic fizykochemicznych pomiędzy poszczególnymi aminokwasami.¹¹⁵ Najbardziej podobnymi pod względem fizykochemicznym są leucyna i izoleucyna, dla których najniższy wskaźnik Granthama wynosi 5, natomiast najbardziej odległymi aminokwasami są tryptofan i cysteina, dla których współczynnik ten wynosi 215. Dla zidentyfikowanych zmian w genie *IFT122* współczynniki te wynosiły 215 dla zmiany zlokalizowanej w eksonie 1 (tryptofan-cysteina), 155 dla zmiany zidentyfikowanej w eksonie 11 (seryna-feniloalanina) oraz 109 dla wariantu w eksonie 15 (walina-glicyna). Uzyskane wyniki wskazują, że w przypadku zidentyfikowanych substytucji doszło do zamiany na aminokwasy różniące się właściwościami fizykochemicznymi, co sugeruje, że mogą one mieć patogeniczny wpływ na białko IFT122.

Analiza *in silico* wpływu zmian typu *missens* zidentyfikowanych w genie *IFT122*

W celu sprawdzenia wpływu zidentyfikowanych zmian typu *missens* (transkrypt 1 - p.W7C, p.S373F, p.V553G; transkrypt 2 - p.W7C, p.S302F, p.V502G; transkrypt 3 - p.W7C, p.S263F, p.V443G; transkrypt 4 - p.W7C, p.S211F, p.V391G) w obrębie genu *IFT122* na produkt ekspresji tego genu przeprowadzono analizę *in silico* z wykorzystaniem programów SIFT i PolyPhen.

SIFT

Współczynnik SIFT dla trzech analizowanych zmian typu *missens* w obrębie wszystkich czterech izoform IFT122 wynosił <0.05, co wskazuje, iż wszystkie zmiany typu *missens* zidentyfikowane w genie *IFT122* mają negatywny wpływ na produkt ekspresji tego genu.

PolyPhen

Natomiast analiza oceny wpływu zidentyfikowanych substytucji aminokwasowych z wykorzystaniem programu PolyPhen wykazała, że zmiana tryptofanu na cysteinę najprawdopodobniej ma istotny wpływ („probably damaging“) na wszystkie cztery izoformy genu *IFT122* zarówno dla modelu HumDiv jak i HumVar.

Ocena wpływu zmiany seryny na fenyloalaninę w czterech transkryptach badanego genu ma prawdopodobnie („possibly damaging“) wpływ na białko będące produktem ekspresji genu *IFT122*. Analiza przeprowadzona dla izoformy 1 genu *IFT122*, w oparciu o model HumDiv wykazała, że zmiana ta ma najprawdopodobniej istotny („probably damaging“) wpływ na białko IFT122.

Natomiast zmiana waliny na glicynę ma najprawdopodobniej istotny („probably damaging“) wpływ na izoformę 1 i 2 dla obu analizowanych modeli. Natomiast dla izoformy 3 ma prawdopodobnie („possibly damaging“) wpływ na białko IFT122 zarówno dla modelu HumDiv jak i HumVar. Podczas gdy dla izoformy 4 analiza z wykorzystaniem tego programu wykazała, że dla modelu HumDiv zmiana ta najprawdopodobniej nie ma istotnego wpływu („benign“) na produkt genu *IFT122*. Natomiast dla modelu HumVar ma prawdopodobnie („possibly damaging“) negatywny wpływ na białko IFT122. Według informacji dotyczących modeli stosowanych w programie PolyPhen model HumVar powinien być stosowany w przypadku diagnostyki dotyczącej chorób genetycznych o Mendelowskim charakterze dziedziczenia. Natomiast model HumDiv powinien być stosowany w przypadku fenotypów o złożonym charakterze. Dlatego też wyniki dla poszczególnych modeli mogą wykazywać różnice.¹⁰⁴

Analiza *in silico* wpływu zmiany zidentyfikowanej w intronie 6 genu *IFT122*

W celu sprawdzenia czy zidentyfikowana zmiana u pacjenta CED-03/4 występująca w układzie heterozygotycznym w intronie 6 w obrębie miejsca donorowego genu *IFT122* (c.502+5G>A), która została odziedziczona od matki może mieć wpływ na prawidłowy przebieg procesu splicingu przeprowadzono analizę *in silico* z wykorzystaniem programów ESE oraz Net2gene.

Przeprowadzona analiza z wykorzystaniem programu ESE oraz Net2gene wykazała i zmiana G->A w intronie 6 genu *IFT122* powoduje zanik miejsca donorowego

niezbędnego dla przebiegu prawidłowego procesu splicingu. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników przeprowadzono analizę RT-PCR oraz real-time PCR.

6.4. Ustalenie ojcostwa i heterozygota złożona w rodzinie CED-03

Ustalenie ojcostwa

Ze względu na to, iż zmiana zidentyfikowana w intronie 6 odziedziczona została od matki, a zmiana typu *missens* nie była obecna u żadnego z rodziców przeprowadzono analizę ojcostwa w celu potwierdzenia, iż zmiana w eksonie 1 genu *IFT122* powstała u pacjenta *de novo*. Próby DNA pochodzące od rodziców i pacjenta poddano analizie genotypowania z wykorzystaniem komercyjnego chipu firmy Affymetrix (250K SNP Array). Spośród analizowanych 45 polimorfizmów SNP 13 SNP było nieinformatywnych, co oznacza, że nie można było określić od którego z rodziców został odziedziczony dany allel. Na podstawie analizy segregacji pozostałych 32 SNP można stwierdzić, że w poszczególnej parze alleli jeden allel jest dziedziczony od matki a drugi od ojca, co jednoznacznie pozwala na potwierdzenie ojcostwa w rodzinie CED-03. Wynik tej analizy potwierdził również, iż zidentyfikowana zmiana typu *missens* p.W7C w eksonie 1 genu *IFT122* wystąpiła w pacjenta 4 *de novo*.

Heterozygota złożona (pacjent CED-03/4)

W celu potwierdzenia, iż zmiana odziedziczona od matki, zlokalizowana w intronie 6 genu *IFT122* ma wpływ na proces składania genu oraz że zmiana p.W7C powstała u pacjenta *de novo* i zlokalizowana jest na chromosomie oddziedziczonym od ojca, a pacjent jest złożoną heterozygotą, przeprowadzono analizę RT-PCR oraz real-time PCR. Reakcje RT-PCR przeprowadzono z różnymi kombinacjami primerów na cDNA uzyskanym z RNA wyizolowanego z krwi obwodowej pacjenta oraz trzech kontroli.

W reakcji zastosowano dwie kombinacje primerów pozwalające na amplifikację fragmentów wszystkich czterech transkryptów *IFT122* (Genome Browser, Human Protein Reference Database). Produkty uzyskane w reakcji RT-PCR wycięto z żelu i zsekwencjonowano. Przeprowadzona reakcja RT-PCR oraz sekwencjonowania wykazały, że we krwi obwodowej ekspresji ulega izoforma 3 (posiadająca eksony 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11) izoforma 4 (posiadająca eksony 1, 2, 3, 7, 8, 10, 11) oraz nowy transkrypt N (zawierający eksony 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11). Analiza wyników sekwencjonowania wykazała, że u pacjenta CED-03/4 amplikon specyficzny dla izoformy 3 zawiera

homozygotyczną zmianę *missens* zidentyfikowaną w eksonie 1 (p.W7C) sugerując, iż ta izoforma ulega ekspresji u pacjenta tylko z jednego allelu, podczas gdy amplikony odpowiadające nowemu transkryptowi N (nie zawierającego eksonu 6) oraz izoformie 4 występowały w układzie heterozygotycznym dla danej zmiany *missens*, co wskazuje, że ulegają one ekspresji z obu alleli.

Na podstawie uzyskanych wyników reakcji RT-PCR widoczna jest również różnica w poziomie ekspresji poszczególnych transkryptów. U pacjenta izoforma 3 ulega niższej ekspresji w porównaniu do trzech kontroli, ponieważ ulega ekspresji tylko z jednego allelu, co jest widoczne na podstawie intensywności świecenia prążka na żelu odpowiadającego izoformie 3. Natomiast ekspresja nowego transkryptu N (nie zawierającego eksonu 6) ulega zwiększonej ekspresji u pacjenta w porównaniu do trzech kontroli, co wskazuje, że dodatkowo transkrypt ten ulega ekspresji z allelu zawierającego zmianę G->A w intronie 6 odziedziczoną od matki. Różnice w poziomie ekspresji nowego transkryptu N pomiędzy pacjentem, a trzema analizowanymi kontrolami są widoczne na podstawie intensywności świecenia prążków na żelu odpowiadającym temu transkryptowi. Natomiast w przypadku transkryptu 4 na podstawie intensywności świecenia prążków w żelu nie są widoczne różnice w poziomie ekspresji pomiędzy pacjentem i trzema analizowanymi kontrolami. Jest to związane z tym, że mutacja w intronie 6 nie dotyczy transkryptu 4 ponieważ, transkrypt ten nie posiada eksonu 6. Uzyskane wyniki wskazują, że mutacja w intronie 6 w obrębie miejsca donorowego genu *IFT122* zaburza prawidłowy przebieg procesu składania pierwotnego transkryptu (splicing), powodując pominięcie eksonu 6 oraz że zidentyfikowana mutacja *missens* w eksonie 1 powstała *de novo* na chromosomie pochodzenia ojcowskiego.

W celu oceny ilościowej różnic w poziomie ekspresji poszczególnych transkryptów u pacjenta CED-03/4 i trzech kontroli przeprowadzono reakcję qPCR. Przeprowadzona analiza wykazała, że poziom ekspresji izoformy 3 jest mniejszy u pacjenta w porównaniu do trzech kontroli (wynik wysoce istotny statystycznie $p < 0.01$). Poziom ekspresji nowego transkryptu N był wyższy u pacjenta w porównaniu do trzech kontroli (wynik ekstremalnie istotny statystycznie $p < 0.001$). Natomiast ocena poziomu ekspresji izoformy 4 nie wykazała istotnych różnic pomiędzy ekspresją tej izoformy u pacjenta i kontroli, ponieważ ekson 6 jest obecny tylko w izoformie 1, 2 oraz 3 badanego genu.

Otrzymane wyniki potwierdzają, że pacjent 4 (CED-03) jest złożoną heterozygotą zawierającą heterozygotyczną mutację typu *missens* (p.W7C) zlokalizowaną w eksonie 1 powstałą *de novo* na chromosomie odziedziczonym od ojca w kombinacji z heterozygotyczną mutacją splicingową (c.502+5G>A) w intronie 6 genu *IFT122*, która została odziedziczona od matki. Dodatkowo wyniki te wskazują, że zmiana w intronie 6 ma wpływ na prawidłowy przebieg procesu składania i jej obecność powoduje

pominięcie eksonu 6. Analiza sekwencji genu *IFT22* wykazała, iż pominięcie eksonu 6 powoduje przesunięcie ramki odczytu i przedwczesną terminację procesu translacji spowodowanej pojawieniem się kodonu stop.

6.5. Fenotyp rzęskowy u pacjenta CED-01/2

Ze względu na to, iż zidentyfikowane zmiany zlokalizowane są w genie *IFT122*, którego produkt ekspresji należy do białek uczestniczących w transporcie wewnątrzrzęskowym, odgrywającym kluczową rolę w procesie prawidłowego tworzenia i funkcjonowania struktur rzęsek, przeprowadzono analizę morfologii oraz częstość występowania rzęsek w fibroblastach skóry pacjenta CED-01/2 oraz kontroli. Eksperyment przeprowadzono w dwóch różnych warunkach na trzech liniach komórkowych fibroblastów skóry osób zdrowych oraz trzech liniach komórkowych fibroblastów skóry pacjenta. W celu wykonania badań podczas operacji przepuklin pachwinowych pobrano od pacjenta fragment skóry, tkanki podskórnej oraz fragment worka przepuklinowego, z których założono linie komórkowe. Przeprowadzone badania wykazały zmniejszenie długości (wynik istotny statystycznie $p < 0.05$) oraz częstości występowania rzęsek (wynik ekstremalnie istotny statystycznie $p < 0.001$) w fibroblastach pacjenta w porównaniu do trzech kontroli. Uzyskane wyniki potwierdzają, że zidentyfikowana zmiana w genie *IFT122* jest odpowiedzialna za wystąpienie fenotypu rzęskowego, a białko IFT122 pełni ważną rolę w prawidłowym formowaniu struktur rzęsek.

Fenotyp obserwowany w fibroblastach skóry pacjenta z CED jest zgodny z wynikami przeprowadzonymi na modelu orzęska *Tetrahymena thermophila*, które wykazały, iż knockout genu *IFT122A* nie zaburza w istotny sposób syntezy rzęsek. Struktury rzęsek w tym modelu są obecne, natomiast występują one w zmniejszonej ilości w porównaniu do komórek typu dzikiego. Przeprowadzone badania wykazały również, iż w modelu tym dochodzi do akumulacji białek IFT (Ift88p, Ift172p) na końcach rzęsek.²⁸

6.6. Model myszy genu *Ift122*

Dotychczas w piśmiennictwie opisano dwa modele mysie genu *Ift122*. Pierwszy model myszy tego genu został opisany w 2008 roku. Knockout genu *Ift122* jest letalny. W modelu tym stwierdzono między innymi eksencefalię, dekstrokardię oraz zaburzenia w rozwoju kości. Analiza rzęsek w węźle zarodkowym wykazała brak struktur rzęsek u homozygot *Ift122^{-/-}*, podczas gdy w heterozygot *Ift122^{+/-}* stwierdzono skrócenie struktur rzęsek w porównaniu do kontroli (*Ift122^{+/+}*). Analiza przeprowadzona

na embrionalnych mysich fibroblastach wykazała również brak struktur rzęsek u homozygot *Ift122*^{-/-}.¹¹⁶

Drugi model mysiego genu *Ift122* (*sopb* - sister of open brain) został opisany w 2011 roku jest również letalny i wykazuje wiele cech typowych dla zaburzeń w prawidłowym przebiegu procesu embriogenezy tj. wady cewy nerwowej, rozszczep kręgosłupa, przerost łuków skrzelowych, niedorozwinięte oczy oraz polidaktylię przedosiową u homozygot *Ift122*^{-/-}. Mutanty *Ift122* wykazują także zaburzenia w tworzeniu prawidłowej asymetrii ciała. Struktury rzęsek występują w fibroblastach embrionalnych w zmniejszonej ilości w porównaniu do kontroli. Rzęski te są również krótsze i wykazują akumulację białek uczestniczących w anterogradowym transporcie wewnątrzrzęskowym (np. *Ift88*, *ift57*) w częściach szczytowych rzęsek. Akumulację białka *Ift88* na końcach rzęsek zidentyfikowano również w obrębie rzęsek znajdujących się w węźle zarodkowym, potwierdzając, iż *Ift122* pełni ważną rolę w retrogradowym transporcie wewnątrzrzęskowym.²⁹

Różnice pomiędzy fenotypem obserwowanym w obu modelach mysich mogą wynikać z faktu, iż w pierwszym modelu poza brakiem genu *Ift122* został również usunięty sąsiadujący gen *Med1/Mbd4*, który pełni ważną rolę w procesie naprawy DNA. Ponadto geny zawierające domenę MBD (metyl-CpG-binding domain) uczestniczą w regulacji procesu transkrypcji.¹¹⁶⁻¹¹⁷ Model mysiego obejmujący tylko konckout genu *Mbd4* nie jest letalny, mutanty *Mbd4*^{-/-} rozwijają się prawidłowo, a szczegółowa analiza histopatologiczna tkanek nie wykazała nieprawidłowości.¹¹⁸⁻¹²⁰ Dlatego też knockout obu genów *Mbd4* oraz *Ift122* może skutkować wystąpieniem cięższego fenotypu w porównaniu do modelu z konckoutem obejmującym tylko gen *Ift122*. Różnice pomiędzy fenotypem obserwowanym w modelach mysich *Ift122*^{*sopb*} oraz *Ift122*^{*Med1Δ1-3*} mogą również wynikać z wykorzystania w badaniach różnych linii myszy laboratoryjnych, odpowiednio C3Heb/FeJ oraz C57BL/6.²⁹

Fenotyp rzęskowy obserwowany w fibroblastach skóry pacjenta CED-01/2, charakteryzujący się skróceniem i zmniejszeniem ilości struktur rzęsek, jest zgodny fenotypem obserwowanym w modelu mysim, w którym występuje tylko konckout genu *Ift122*. Ponieważ dotychczas zidentyfikowane mutacje w genie *IFT122* u pacjentów z zespołem Sensenbrenner nie są letalne, może to świadczyć o tym, iż powodują one tylko częściową utratę funkcji białka IFT122 i powodują powstanie hipomorficznej formy białka, która zaburza prawidłowe formowanie i funkcjonowanie rzęsek. Tak samo jak w przypadku modelu mysiego brak białka IFT122, wystąpienie mutacji nonsensownej na obu allelach może mieć u człowieka efekt letalny.

6.7. Model *Danio rerio* genu *ift122*

Ze względu na to, że otrzymane wyniki oraz dane z piśmiennictwa wskazują, iż zmiany w obrębie białka IFT122 są odpowiedzialne za wystąpienie fenotypu rzęskowego w ramach prowadzonych badań stworzono model Zebrafish z knockdownem genu *ift122*. W celu potwierdzenia braku RNA *Ift122* w modelu *Danio rerio* przeprowadzono specyficzną reakcję RT-PCR potwierdzając, że zastosowane morfolino powodują obniżenie poziomu ekspresji *ift122*.

Ze względu na to, że pacjenci z CED cierpią na niewydolność nerek, a dysfunkcje rzęsek związane są z wystąpieniem torbieli w obrębie nerek, przebadano struktury rzęsek w przewodach pronefrycznych w modelu zebrafish *ift122*. Przeprowadzony eksperyment wykazał, zmniejszoną liczbę centrosomów i skrócenie rzęsek u mutantów *ift122* w porównaniu do kontroli.

Ponieważ u pacjentów z zespołem Sensenbrenner występuje brachydaktylia, która może być związana z uszkodzeniem szlaku sonic hedgehog (*shh*) oraz że w proces *shh* zaangażowany jest transport wewnątrzrzęskowy IFT, przeprowadzono analizę szlaku *shh* w modelu zebrafish *ift122*.^{40,67,121} Eksperymenty wykazały łagodną redukcję szlaku *Hh* w modelu *ift122*. W badaniach przeprowadzono hybrydyzację *in situ* dla *shha* oraz *ptc1*. *Shha* jest akumulowany w małych ilościach w dolnej części cewy nerwowej i w strunie grzbietowej zarówno w modelu *ift122* jaki w kontroli. Natomiast poziom *Ptc1* jest zmniejszony u mutantów w porównaniu do kontroli.

Przeprowadzona analiza potwierdza, iż *ift122* jest niezbędny dla przebiegu szlaku *shh* i może tłumaczyć obecność zmian w obrębie układu kostnego obserwowanych u pacjentów z zespołem Sensenbrenner. Analiza typu knockdown genu *ift122* w modelu zwierzęcym (*Danio rerio*) wykazała charakterystyczny fenotyp obserwowany w wielu modelach zespołów rzęskowych tj. w zespole Bardeta-Biedla, Jeune i nefronoftyzie potwierdzając, że zespół Sensenbrenner należy grupy chorób zwanych ciliopatiami, w których patogenezie zasadniczą rolę odgrywa nieprawidłowe funkcjonowanie struktur rzęsek.¹²²⁻¹²⁴

6.8. Analiza bioinformatyczna DAVID

W ramach badań przeprowadzono pilotażową analizę profilu ekspresji całego genomu u pacjenta (CED-01/2) oraz kontroli. Badania te przeprowadzono w oparciu o komercyjnie dostępny chip firmy Illumina. Analiza ta wykazała, że ponad 1300 genów ulega zmniejszonej ekspresji (Diff. score < -20), a ponad 1200 genów ulega zwiększonej ekspresji (Diff. Score > 20) u pacjenta w porównaniu do kontroli. Na tej podstawie

stworzono listy genów ze zmienioną ekspresją. W celu interpretacji uzyskanych wyników przeprowadzono analizę bioinformatyczną z wykorzystaniem programu DAVID.

Przeprowadzona analiza pozwoliła na stworzenie tzw. grup genów o podobnej funkcji lub biorących udział w przebiegu tego samego procesu (tzw. functional annotation clustering), w obrębie ponad 2000 genów o zmienionym poziomie ekspresji w stosunku do kontroli. Analizę przeprowadzono w oparciu o listę zawierającą geny o zmniejszonym poziomie ekspresji i w oparciu o listę genów o zwiększonym poziomie ekspresji oraz w oparciu o listę zawierającą zestawienie wszystkich genów o zmienionej ekspresji. Wyniki przeprowadzonej analizy wykazały, że zmienionej ekspresji ulegają głównie geny zaangażowane w cykl komórkowy, organizację cytoszkieletu i wrzeciona podziałowego oraz geny uczestniczące w przekazywaniu sygnałów w komórce. Zwiększonej ekspresji ulegają takie geny jak np. *PDGF α* , *PDGFC*, *PDGFD*, *PDGFRL*, *FGFRL1*, *BMP6*, *CCND2*, *CCND3*. Zmniejszonej ekspresji ulegają natomiast takie geny jak np. *WNT2*, *WNT5A*, *WNT5B*, *PDGFR β* , *FGF9*, *MAP3K8*, *MAPK3*, *CCND1*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CDKN3*, *CDKN1B*, *IFT47* oraz *IFT122*. Uzyskane wyniki potwierdzają dane literaturowe, iż ekspresja i resorpcja rzepek ma ścisły związek z przebiegiem cyklu komórkowego oraz iż rześki pełnią ważną rolę w przekazywaniu sygnałów w komórce, regulując ich proliferację oraz różnicowanie.^{34,40-45,47,67-69}

W celu potwierdzenia uzyskanych wyników konieczne jest przeprowadzenie dalszych analiz tj. ilościowy qPCR w celu potwierdzenia zmienionego poziomu ekspresji wybranych genów.

6.9. Analiza cyklu komórkowego

Ze względu na to, że w przeprowadzonym badaniu ekspresji całego genomu zidentyfikowano zmiany w poziomie ekspresji genów ważnych dla przebiegu cyklu komórkowego przeprowadzono analizę procesu mitozy w komórkach fibroblastów skóry pacjenta (CED-01/2) oraz kontroli.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że zarówno w komórkach kontrolnych jak i w komórkach pacjenta podział chromosomów przebiega prawidłowo. Przeprowadzony eksperyment wykazał również, że w metafazie komórki pacjenta wykazują niepełną retrakcję w porównaniu do komórek kontrolnych. Analiza cyklu komórkowego wykazała również, iż komórki pacjenta wykazują mieszany fenotyp na etapie cytokinezy, w momencie tworzenia się bruzdy podziałowej. W tej fazie widoczne są komórki z prawidłowo i nieprawidłowo wytworzoną bruzdą podziałową (w niektórych komórkach bruzda podziałowa nie jest prosta, w niektórych jest ona płaska),

co sugeruje, że proces właściwej cytokinezy może być opóźniony. Badania te wykazały również, że w niektórych komórkach pacjenta obecne są więcej niż dwa centra organizacji mikrotubul (MTOC) w profazie cyklu komórkowego.

Ze względu na to, że zmiany obserwowano tylko w niektórych komórkach pacjenta należy przeprowadzić dodatkowe badania uzupełniające, które pozwoliłyby określić procent komórek, w których występują zidentyfikowane nieprawidłowości.

W ramach badań przeprowadzonych na fibroblastach skóry pacjenta CED-01/2 oraz kontroli analizowano również morfologię fibroblastów, w której zmierzono ich długości. Analizowano 100 komórek pacjenta i 100 komórek kontrolnych. Badania te nie wykazały istotnych różnic w długości komórek pacjenta w porównaniu do kontroli wskazując, że mutacje w genie *IFT122* najprawdopodobniej nie mają wpływu na morfologię fibroblastów skóry.

6.10. Analiza genów kandydujących spoza *locus* dla CED

W grupie pacjentów, u których nie zidentyfikowano mutacji w obrębie genu *IFT122* przeprowadzono analizę trzech genów rzęskowych spoza *locus* zidentyfikowanego dla CED.

Gen IFT139

Gen *IFT139* (*THM1*) zbudowany jest z 29 eksonów, produktem ekspresji jest białko zbudowane z 1316 aminokwasów. Gen ten ulega silnej ekspresji m.in. w nerkach, wątrobie, trzustce, sercu, płucach, mózgu, rdzeniu kręgowym oraz skórze normalnych tkanek. Lokalizacja komórkowa białka THM1 to głównie aksonem rzęsek oraz ciało podstawowe. HPRD, UCSC Genome Browser Badania na modelu mysim alien (*aln*), z mutacją typu 'null' genu *THM1* wskazały na aktywność jego produktu białkowego w szlaku przekąźnikowym Sonic Hedgehog, który stanowi fundamentalny element rozwoju zarodkowego ssaków.⁸⁷ Ponadto białko THM1, jako cząsteczka IFT kompleksu A uczestniczy w retrogradowym transporcie wewnątrzrzęskowym, odgrywając tym samym zasadniczą rolę w procesie budowy i prawidłowego funkcjonowania rzęsek.

Mutacje w obrębie genu *IFT139* zidentyfikowano u 5% spośród 753 pacjentów z różnymi zespołami rzęskowymi tj. nefronoftyza, zespół Meckela, Jubert, Bardeta–Biedla oraz zespołu Jeune. Ze względu na stosunkowo dużą częstość mutacji w genie *THM1* w obrębie ciliopatii oraz ze względu na występowanie wspólnych cech klinicznych z zespołem Sensenbrenner gen *IFT139* wyselekcjonowano jako gen kandydujący i poddano go analizie w grupie dziewięciu pacjentów z CED.⁸⁵

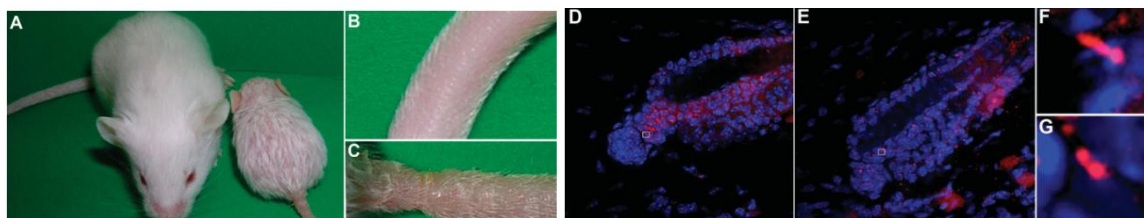
Gen *DYNC2H1*

Najdłuższy transkrypt (transkrypt 2) genu *DYNC2H1* zbudowany jest z 90 eksonów. Produktem ekspresji jest białko zbudowane z 4314 aminokwasów. Gen ten ulega silnej ekspresji m.in. w nerkach, wątrobie, trzustce, sercu, płucach, mózgu, rdzeniu kręgowym oraz skórze normalnych tkanek. Lokalizacja komórkowa białka *DYNC2H1* to aksonema rzęsek, ciało podstawowe, aparat Golgiego, cytoplazma oraz błona komórkowa.^{HPRD} Białko *DYNC2H1* należy do kompleksu białek motorycznych uczestniczących w retrogradowym transporcie wewnątrzrzęskowym. Mutacje w genie *DYNC2H1* prowadzą do szerokiego spektrum zaburzeń związanych z upośledzonym funkcjonowaniem rzęsek pierwotnych tj. polidaktylii, wad szkieletowych oraz wielotorbielowatości nerek.^{UCSC Genome Browser} Dotychczas mutacje w genie *DYNC2H1* zidentyfikowano u pacjentów z zespołem krótkie żebro-polidaktylia (SRP) oraz zespołem Jeune.^{88,89}

Ze względu na podobieństwo cech klinicznych pomiędzy zespołem SRP, JATD i CED oraz ze względu na to, iż mutacje w genie *IFT121* zidentyfikowano zarówno u pacjentów z CED jak i u pacjentów z zespołem SRP, a mutacje w genie *IFT144* wykryto u pacjentów zespołem Sensenbrenner oraz z zespołem JATD i nefronoftyzą przeprowadzono analizę genu *DYNC2H1* w grupie pacjentów z CED.^{25,26,126}

Gen *IFT88*

Najdłuższy transkrypt (transkrypt 1) genu *IFT88* zbudowany jest z 28 eksonów, produktem ekspresji jest białko zbudowane z 833 aminokwasów. Białko *IFT88* wchodzi w skład kompleksu B uczestniczącego w anterogradowym transporcie wewnątrzrzęskowym. W modelu mysim ORPK (Oak Ridge Polycystic Kidney Mouse) z hypomorficzną mutacją w genie *Ift88*, częściowo obniżającą jego ekspresję stwierdzono m.in. wodogłowie, zwyrodnienie siatkówki, cysty w obrębie nerek oraz wątroby, anosmię, ataksję, infekcje układu oddechowego, zmiany w obrębie układu szkieletowego oraz zmiany ektodermalne tj. defekty skóry oraz mieszków włosowych (**Rycina 71**).



Rycina 71.

Model myszy genu *Ift88*. A. Typ dziki (widoczny po lewej stronie) oraz mysz ORPK (widoczna po prawej stronie). B. Typ dziki. C. Mysz ORPK. Sucha i łuszcząca się skóra oraz rzadkie futro widoczne w modelu ORPK w porównaniu do typu dzikiego. Rzęski w mieszkach włosowych w modelu ORPK (E,G) są krótsze w porównaniu do rzęsek obecnych u kontroli (D,F).¹²⁵

Zmiany ektodermalne są charakterystyczne dla dwóch zespołów rzęskowych, zespołu Ellisa van Crevelda oraz zespołu Sensenbrenner. Ze względu na obecność wielu cech wspólnych pomiędzy zespołem Sensenbrenner, a modelem mysim genu *Ift88*, przeprowadzono analizę tego genu w grupie pacjentów z CED.¹²⁵

Przeprowadzona analiza sekwencji kodujących genów kandydujących *IFT139*, *DYNC2H1*, *IFT88* spoza *locus* dla CED w badanej grupie dziewięciu pacjentów z zespołem Sensenbrenner wykazała brak mutacji w obrębie analizowanych genów. Może wynikać to z faktu, iż analizowana kohorta pacjentów była bardzo mała i obejmowała tylko dziewięciu pacjentów z CED. Dlatego też uzasadnionym jest przeprowadzenie analizy tych genów na większej grupie pacjentów. Ze względu na to, że zespół ten jest niezwykle rzadki, a częstość występowania wynosi < 1 na 1000 000 urodzeń, są ograniczone możliwości w zebraniu dużej grupy pacjentów z tym zespołem.

6.11. Heterogenność zespołu Sensenbrenner

Mutacje w genie *IFT122* zidentyfikowano u 4 spośród 13 analizowanych pacjentów. Przeprowadzone badania wskazują na to, iż zespół Sensenbrenner jest heterogeny genetycznie oraz że podłoże molekularne w pozostałych przypadkach najprawdopodobniej dotyczy mutacji w genach ważnych dla funkcjonowania i budowy struktury rzęsek. Poza genem *IFT80* odpowiedzialnym za zespół Jeune, gen *IFT122* był drugim genem z rodziny IFT, w którym zidentyfikowano mutacje. Dotychczas zidentyfikowane mutacje w genie *IFT122* nie są letalne. Świadczy to, że powodują one tylko częściową utratę funkcji białka IFT122, które zaburza prawidłowe formowanie i funkcjonowanie rzęsek, a uzyskane wyniki wskazują, że mutacje występujące w układzie homozygotycznym w genie *IFT122* są odpowiedzialne za wystąpienie zespołu Sensenbrenner.^{22,112}

Obecnie poznano już cztery geny *IFT122*, *IFT121*, *IFT43*, *IFT144*, których mutacje odpowiedzialne są za wystąpienie zespołu Sensenbrenner. Produkty ekspresji tych genów należą do kompleksu A uczestniczącego w retrogradowym transporcie wewnątrzrzęskowym, a przeprowadzone badania potwierdzają, że zespół Sensenbrenner jest ciliopatią, za którą odpowiedzialne są mutacje w genach rzęskowych.²²⁻²⁷

6.12. Plejotropowy charakter zespołu Sensenbrenner i innych ciliopatii

Zaburzenia w funkcjonowaniu i formowaniu rzęsek są odpowiedzialne za wystąpienie fenotypu o charakterze plejotropowym, co jest związane z obecnością rzęsek praktycznie w każdej komórce i ich rolą w przekazywaniu sygnałów w komórce niezbędnych dla prawidłowego przebiegu procesu embriogenezy. Ich funkcją jest odczytywanie sygnałów ze środowiska zewnętrznego. Stanowią one swojego rodzaju antenę umożliwiającą odpowiedź na stymulację mechaniczną lub chemiczną. Ze względu na to, że na ich powierzchni zlokalizowane są różnego rodzaju receptory, są także ważnym elementem kilku istotnych szlaków przekąźnikowych tj. Hedgehog (Hh), Wingless (Wnt) i płytkowego receptora wzrostu alfa (PDGFR α), pełniących bardzo ważną rolę podczas procesu embriogenezy. Sygnały pochodzące ze środowiska zewnętrznego mogą zostać przekształcone we wnętrzu rzęski w kaskadę sygnałów.^{39,53,57,58,67-69}

Hedgehog (Hh) pełni bardzo ważną rolę w rozwoju embrionalnym, uczestnicząc w procesie lateralizacji, neurogenezy, rozwoju kości, serca poprzez regulację proliferacji i różnicowania się komórek. U organizmów dorosłych pełni ważną funkcję w dojrzewaniu tzw. niszy komórek macierzystych oraz w utrzymaniu homeostazy tkanek. Zaburzenia szlaku Hh prowadzą do rozwoju polidaktylii, defektów twarzowo-czaszkowych, wad rozwojowych kośćca oraz do raka podstawnokomórkowego skóry. Niewłaściwa aktywacja onkogenów Gli może powodować transformacje komórek poprzez bezpośrednią regulację ekspresji genów kontrolujących wzrost komórek sugerując, iż niewłaściwy przebieg procesu Hh pełni ważną rolę w procesie nowotworzenia wielu tkanek tj. mózgu i płuc. Ponieważ ekspresja i resorpcja rzęsek jest ściśle powiązana z przebiegiem cyklu komórkowego, a zaburzenia w kontroli przebiegu cyklu komórkowego są podstawą procesu onkogenezy. Prawdopodobne rzęski mogą pełnić funkcję supresora poprzez hamowanie rozpoczęcia cyklu komórkowego. Z drugiej strony obecność rzęsek w komórkach nowotworowych skóry zaprzecza tej hipotezie. Z piśmiennictwa wynika, iż mutacje w genach rzęskowych nie zwiększają predyspozycji do nowotworów. Dlatego też w celu dokładnego poznania korelacji pomiędzy rzęskami, procesem nowotworzenia i cyklem komórkowym niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań eksperymentalnych.^{35,36,39,57,58,63,67-70}

Wingless (Wnt) odgrywa również bardzo ważną rolę w procesie embriogenezy. Sygnał zależny od białek z rodziny Wnt jest przekazywany w komórce poprzez różne ścieżki. Dwie z nich są bezpośrednio związane z rzęskami. Ścieżka kanoniczna, która zależna jest od β -kateniny i kontroluje proces proliferacji komórek oraz przebieg cyklu komórkowego. Natomiast ścieżka niekanoniczna kontroluje migrację i polaryzację komórek, wpływając na prawidłową morfogenezę narządów. U pacjentów z zaburzeniami

szlaku Wnt stwierdzono: encefalopatie, wady cewy nerwowej, otwarte powieki, torbiele nerek.^{63,67-69,71}

Receptor płytkowego czynnika wzrostu alfa (PDGFR α) reguluje natomiast procesy apoptozy, proliferacji, migracji komórek podczas embriogenezy i podczas rozwoju postnatalnego. Uczestniczy także w dojrzewaniu, wzroście tkanek oraz gojeniu ran u osobników dorosłych. Odgrywa także istotną rolę w utrzymaniu homeostazy tkanek. Receptor PDGFR α zlokalizowany jest w obrębie rzęski. Zaburzenia szlaku PDGFR α prowadzą m.in. do śmierci zarodka, wad rozwojowych centralnego układu nerwowego, wad narządowych oraz do rozwoju nowotworów oraz chorób naczyniowych.^{57,60,67-69,72}

Do najczęściej stwierdzanych cech klinicznych w obrębie ciliopatii zaliczamy m.in. zaburzenia ze strony nerek i wątroby, retinopatię, niepełnosprawność intelektualną, zaburzenia dotyczące wewnętrznej asymetrii ciała, zmiany w szkieletowe, polidaktylię oraz zmiany w obrębie twarzoczaszki. Świadczy o tym, iż mutacje w genach rzęskowych są odpowiedzialne za szerokie spektrum cech fenotypowych.^{46,55,126}

Badania przeprowadzone na liniach komórkowych oraz organizmach modelowych wskazują, że rzęski występują na powierzchni komórek budujących kanaliki takie jak np. kanaliki nerkowe, przewód żółciowy w wątrobie i przewód trzustkowy. U pacjentów z wielotorbielowatością nerek wykryto mutacje w genach kodujących policystynę-1 i policystynę-2. Są to białka budujące kanał jonowy selektywny względem jonów wapnia i są zlokalizowane w błonie rzęskowej. W prawidłowych warunkach uginanie się rzęsek na powierzchni komórek nabłonka kanalików nerkowych pod wpływem przepływu moczu powoduje otwarcie kanału jonowego, a tym samym wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca²⁺. Kontrolowany przepływ wapnia bierze udział w regulacji różnicowania się, proliferacji i apoptozy komórek. Zaburzenia tych procesów mogą prowadzić do nadmiernych podziałów komórkowych oraz wytworzenia torbieli wypełnionych płynem, które stopniowo zastępujących zdrową tkankę i w konsekwencji prowadzą do zwyrodnienia wielotorbielowatego nerek. Podobny mechanizm jest odpowiedzialny za wytworzenie cyst w obrębie wątroby i trzustki.

Zaburzenia ze strony nerek stwierdzono u większości zespołów rzęskowych tj. zespół wielotorbielowatości nerek dziedziczony w sposób autosomalny recesywny oraz autosomalny dominujący, zespół Bardeta-Biedla, Meckela, Jubert, Jeune oraz zespołu Sensenbrenner, co jednoznacznie potwierdza, iż rzęski pełnią ważną rolę w odbiorze bodźców mechanicznych, a defekty w genach rzęskowych są odpowiedzialne za wystąpienie cech typowych dla nieprawidłowego przebiegu tego procesu.

^{32,39,46,49,53,59,65,66}

Obecność rzęsek w wątrobie oraz trzustce związane jest z wystąpieniem dysfunkcji wątroby oraz cukrzycy w zespołach rzęskowych. Dysfunkcje w obrębie wątroby stwierdza się w większości zespołów rzęskowych m.in. u pacjentów z BBS, MKS, JBTS, JATD oraz u pacjentów z zespołem Sensenbrenner. Natomiast cukrzyca występuje u pacjentów z ALMS oraz z BBS.⁴⁶

Rzęski na powierzchni komórek wyściółki ependymocytów pośredniczą w przepływie płynu mózgowo-rdzeniowego, a ich ruch najprawdopodobniej zapobiega powstawaniu wodogłowia. Przeprowadzone badania na modelach zwierzęcych wykazały, iż mutacje w genach odpowiedzialnych za prawidłowy ruch rzęsek (*Dnahc5*, *Ift88*, *Hy3*) powodują u myszy rozwój wodogłowia. Hydrocefalia jest także jedną z częstszych wad rozwojowych u pacjentów z pierwotną dyskinezą rzęsek.^{32,39,53,58}

Rzęski występują również na powierzchni komórek nabłonka wyściełającego drogi oddechowe, a ich uporządkowany i zsynchronizowany ruch umożliwia oczyszczenie dróg oddechowych i transport śluzu. U pacjentów z PCD upośledzenie lub brak ruchu prowadzi do przewlekłych chorób układu oddechowego takich jak zapalenie zatok, zapalenie ucha środkowego, przewlekłego kaszlu oraz astmy.^{32,39,59} Natomiast u pacjentów z CED stwierdza się częste i powtarzające się infekcje dróg oddechowych.⁴⁻²⁷

Rzęski są obecne także w układzie rozrodczym. U mężczyzn z pierwotną dyskinezą rzęsek niepłodność najczęściej związana jest z brakiem ruchliwości witek plemników, których struktura jest bardzo podobna do klasycznej struktury rzęsek ruchomych. Natomiast u kobiet proces ten jest bardziej złożony. Dotyczy on dysfunkcji rzęsek komórek nabłonka wyściełającego jajowód, których ruch uczestniczy w transporcie oocytu, bądź zarodka do macicy. Przypuszcza się także, że rzęski te pełnią dodatkowo funkcje sensoryczne odbioru bodźców ze środowiska zewnętrznego. Jednak mechanizm, w którym nabłonek jajowodu odpowiada na różnego rodzaju stymulację hormonalną, nie został całkowicie poznany.^{34,39,58} Dotychczas u pacjentów z zespołem Sensenbrenner nie opisano zaburzeń związanych z płodnością. Wynika to niewątpliwie z faktu, że w piśmiennictwie opisano tylko około 30 pacjentów z CED, a dotychczas opisane przypadki to małe dzieci.⁴⁻²⁷

Rzęski obecne na powierzchni komórek wężła zarodkowego uczestniczą w procesie ustalania prawidłowego położenia organów, czyli ich wewnętrznej asymetrii. Odwrotne ułożenie trzewi tzw. *situs inversus*, określa stan, w którym narządy znajdują się po przeciwnej stronie w stosunku do ich prawidłowej lokalizacji. Odwrotne położenie trzewi jest jednym z częstych symptomów występujących w chorobach rzęskowych, a w szczególności w zespole Kartagenera.^{32,39,59,60-62} Natomiast u pacjentów z CED nie stwierdza się zaburzeń dotyczących wewnętrznej asymetrii ciała.⁴⁻²⁷

W komórkach pręcików i czopków siatkówki oka występują rzęski łączące segment wewnętrzny zawierający jądro komórkowe, rybosomy i inne struktury komórkowe z segmentem zewnętrznym zawierającym rodopsynę i inne barwniki wzrokowe. Wszystkie komponenty niezbędne do budowy i prawidłowego funkcjonowania segmentu zewnętrznego są syntetyzowane w segmencie wewnętrznym, a następnie transportowane wzdłuż rzęski za pomocą transportu wewnątrzrzęskowego IFT. Zaburzenia w transporcie IFT powodują obumieranie komórek fotoreceptorów i postępującą utratę wzroku. Retinopatia barwnikowa lub dystrofia czopkowo-pręcikowa są typowymi cechami klinicznymi wielu znanych ciliopatii, jak np. zespołu Bardeta-Biedla, zespołu Meckela oraz zespołu Alstroma.^{32,39,53,63,64} W zespole CED opisano dotychczas tylko kilku pacjentów, u których stwierdzono retinopatię. Z danych z piśmiennictwa wynika, że retinopatia nie jest cechą często stwierdzaną w tym zespole.⁴⁻²⁷

Struktury rzęsek zlokalizowane są w obrębie neuronów odbierających bodźce zapachowe, które obecne są w blaszce sitowej mózgu. Zaburzenia rzęsek uczestniczących w odbiorze bodźców zapachowych powodują anosmię charakteryzującą się całkowitym brakiem węchu lub hiposmię związaną ze zmniejszoną zdolnością odczuwania zapachów. Zaburzenia związane z odczuwaniem zapachów stwierdzono u pacjentów z zespołem Bardeta-Biedla.^{39,69} Dotychczas w piśmiennictwie u pacjentów z CED nie opisano występowania anosmii lub hiposmii.⁴⁻²⁷

W strukturze ucha wewnętrznego zlokalizowane są dwa rodzaje rzęsek nieruchomych o strukturze (9+2) tzw. stereocilia oraz pojedyncze kinocilium. Jedynie u pacjentów z zespołem Ushera stwierdza się występowanie głuchoty, co najprawdopodobniej ma związek z tym, że większość białek z rodziny USH pełni ważną rolę w stereociliach.³⁹

Rzęski nieruchome (9+0) obecne są w osteocytach i chondrocytach. Rzęski te uczestniczą w przekazywaniu sygnałów ważnych dla rozwoju kości. Ich występowanie oraz pełniona funkcja związana jest z pojawieniem się zaburzeń w obrębie układu kostnego w zespołach rzęskowych tj. np. zespół Sensenbrenner, zespół krótkie żebro-polidaktylia, zespół Jeune i zespół Ellisa van Crevelda.^{53,73}

Obecność rzęsek w różnych rodzajach neuronów związana jest z wystąpieniem niepełnosprawności intelektualnej u pacjentów z mutacjami w genach rzęskowych takich jak np. w zespole Bardeta-Biedla, Meckela oraz w zespole Jubert.⁵³ Natomiast u większości pacjentów z zespołem Sensenbrenner rozwój intelektualny jest prawidłowy. W piśmiennictwie opisano jednego pacjenta, u którego poziom rozwoju intelektualnego był powyżej przeciętnej (IQ 134) i dwóch pacjentów z mutacją w genie *IFT121*, u których stwierdzono niepełnosprawność intelektualną.⁴⁻²⁷

Rzęski obecne są również w neuronach podwzgórza, które związane są z regulacją łaknienia, co może być powodem wystąpienia otyłości u pacjentów z zespołem Bardeta-Biedla oraz Alstroma.⁶¹ Natomiast u pacjentów z CED dotychczas nie stwierdzono występowania otyłości.⁴⁻²⁷

Obecność rzęsek stwierdzono również w komórkach odontoblastów i ameloblastów, gdzie biorą udział w prawidłowej morfogenezie zębów.⁷³⁻⁷⁵ Zmiany w obrębie zębów tj. małe zęby, dysplazję szkliwa oraz niewłaściwe rozmieszczenie zębów są typowymi cechami występującymi u większości pacjentów z CED.⁴⁻²⁷

Natomiast obecność rzęsek w skórze jest związana między innymi z prawidłowym wytworzeniem mieszków włosowych.^{76,77} Zmiany w obrębie włosów tj. cienkie i wolno rosnące włosy oraz nadmiernie elastyczną skórę stwierdza się u większości pacjentów z zespołem Sensenbrenner.⁴⁻²⁷

Rzęski obecne są również w takich komórkach jak kardiomiocyty, gdzie pełnią ważną rolę w procesie morfogenezy serca, co może mieć związek z wystąpieniem np. kardiomiopatii u pacjentów np. z zespołem Alstroma.^{78,79} Dotychczas w piśmiennictwie opisano jednego pacjenta z CED, u którego stwierdzono dwupłatkową zastawkę aorty, natomiast jeden pacjent zmarł z powodu zaburzeń rytmu serca. Świadczy o tym, że zaburzenia ze strony serca nie są cechą często stwierdzaną w zespole Sensenbrenner.^{8,14}

Cechą często stwierdzaną w zespołach rzęskowych są zmiany w obrębie twarzoczaszki, które stwierdza się w takich zespołach jak BBS, MKS, JBTS, EVC oraz CED, co wskazuje, że rzęski poprzez udział w szlakach Shh i Wnt pełnią bardzo ważną w procesie rozwoju twarzoczaszki.^{126,127}

Struktury rzęsek (9+0) obecne są także w embrionalnych komórkach macierzystych. Ich funkcja w tych komórkach nie została jeszcze dokładnie scharakteryzowana, ale najprawdopodobniej uczestniczą one w procesie różnicowania i proliferacji komórek.⁶⁵

6.13. Korelacja genotyp-fenotyp w zespole Sensenbrenner i innych ciliopatiach

Ocena korelacji pomiędzy genotypem a fenotypem w chorobach rzęskowych wydaje się niezwykle trudna. Jednym z powodów jest to, że ciliopatie charakteryzuje duża heterogenność genetyczna. Mutacje w różnych genach odpowiedzialne są za wystąpienie tego samego zespołu i mutacje w tych samych genach rzęskowych odpowiedzialne są za różne zespoły rzęskowe. Przykładem są homozygotyczne mutacje w genie *NPHP1*, które odpowiedzialne są za wystąpienie nefronoftyzy, podczas gdy mutacje w genie

NPHP6 za zespół Meckela. Natomiast mutacje w genie *IFT121* zidentyfikowano zarówno u pacjentów z CED jak i u pacjentów z zespołem SRP, a mutacje w genie *IFT144* wykryto u pacjentów zespołem Sensenbrenner oraz z zespołem JATD i nefronoftyzą.^{25,26,128} Interesujący wydaje się również przykład mutacji w genie *IFT139*, w którym zidentyfikowano mutacje u pacjentów z różnymi zespołami rzęskowymi tj. nefronoftyza, zespół Meckela, Jubert, Bardeta–Biedla oraz zespół Jeune. Innym czynnikiem od którego zależy fenotyp jest allelizm wielokrotny, czyli rodzaj mutacji zidentyfikowanej lub rodzaj mutacji zidentyfikowanych u danego pacjenta. Na przykład obecność dwóch mutacji nonsensownych w genach *NPHP3*, *NPHP6*, *NPHP8* czy *NPHP11* jest odpowiedzialna za wystąpienie zespołu Meckela, podczas gdy obecność jednej mutacji typu *missens* powoduje wystąpienie zespołu Jubert charakteryzującego się lżejszym fenotypem w porównaniu do zespołu Meckela.

Duże znaczenie w ekspresji danego fenotypu mają również czynniki modyfikujące jak np. u pacjentów z homozygotyczną delecją w genie *NPHP1* w kompozycji z heterozygotyczną mutacją w genie *NPHP6* lub *NPHP8* obserwuje się wystąpienie dodatkowo odpowiednio retinopatii lub zmian w obrębie mózdzku.

Czwartym czynnikiem mającym wpływ na obraz fenotypowy jest sytuacja, kiedy dwie mutacje w układzie heterozygotycznym w różnych genach rzęskowych są odpowiedzialne za wystąpienie danego zespołu. Taki mechanizm został zaproponowany w niektórych przypadkach zespołu Bardeta-Biedla oraz nefronoftyzy.¹²⁸⁻¹³¹

Obraz kliniczny obserwowany u pacjentów uzależniony jest od tego, w którym genie została zidentyfikowana mutacja, od poziomu ekspresji danego genu w określonych tkankach oraz od interakcji z innymi białkami ulegającymi ekspresji w tych tkankach. Kombinacja wszystkich wymienionych czynników wpływa na to jakie cechy fenotypowe są obserwowane w konkretnym przypadku.⁵³

Dotychczas przebadano bardzo małą grupę pacjentów z zespołem Sensenbrenner co powoduje, że bardzo trudno jest jednoznacznie ocenić korelacje pomiędzy genotypem a fenotypem obserwowanym u pacjentów.

Większość mutacji zidentyfikowanych w genach *IFT122*, *IFT121*, *IFT43* oraz *IFT144* odpowiedzialnych za wystąpienie zespołu Sensenbrenner to mutacje typu *missens*.

W przypadku heterozygot złożonych zidentyfikowano mutacje *missens* w kombinacji z mutacją nonsensowną, mutacją powodującą przesunięcie ramki odczytu lub mutacją splicingową. Dotychczas u pacjentów z zespołem Sensenbrenner nie zidentyfikowano mutacji powodujących przedwczesną terminację procesu translacji, które byłyby zlokalizowane na obu allelach. Jedynie w genie *IFT43* zidentyfikowano homozygotyczną delecję p.M1_21 zlokalizowaną w eksonie 1, która powoduje powstanie krótszej formy białka IFT43.²²⁻²⁷

W przypadku mutacji zidentyfikowanych w genie *IFT122* homozygotyczne mutacje typu *missens* są odpowiedzialne za wystąpienie nieco łagodniejszego fenotypu, podczas gdy u pacjenta będącego złożoną heterozygotą, u którego wykryto zmianę typu *missens* w kombinacji ze zmianą splicingową powodującą przesunięcie ramki odczytu i przedwczesną terminację procesu translacji zdiagnozowano niewydolność wątroby, która wymagała przeprowadzenia przeszczepu tego narządu. U trzech pacjentów, u których zidentyfikowano zmiany typu *missens* dotychczas nie stwierdzono poważnych zaburzeń ze strony wątroby, poza wystąpieniem u jednego z nich hepatomegalii.²²

Natomiast mutacje w genie *IFT121*, który odpowiedzialny jest za wystąpienie zespołu Sensenbrenner oraz zespołu SRP charakteryzującego się cięższym obrazem klinicznym, najczęściej identyfikuje się heterozygoty złożone posiadające na jednym allelu mutacje typu *missens*, a na drugim mutacje powodującą przedwczesną terminację procesu translacji. Dlatego też w przypadku genu *IFT121* na fenotyp ma wpływ niewątpliwie lokalizacja mutacji w obrębie tego genu. Poza lokalizacją mutacji ma także wpływ rodzaj mutacji, ponieważ u pacjentów z CED stwierdza się obecność homozygotycznych zmian typu *missens*, podczas gdy w jednej rodzinie z SRP zidentyfikowano delecję eksonu 5, znajdującej się w ramce odczytu.^{23,25,27,132}

Mutacje identyfikowane w obrębie genu *IFT144* to najczęściej heterozygoty złożone posiadające na jednym allelu mutacje typu *missens*, a na drugim mutacje powodującą przedwczesną terminację procesu translacji, które stwierdza się u pacjentów z zespołem Sensenbrenner oraz z nefronoftyzą. Natomiast u pacjenta z zespołem Jeune zidentyfikowano homozygotyczną mutację typu *missens*. Co sugeruje, że w przypadku genu *IFT144* na fenotyp obserwowany u pacjentów zasadniczą rolę odgrywa lokalizacja mutacji.²⁶

W dotychczas poznanych genach odpowiedzialnych za wystąpienie zespołu Sensenbrenner nie opisano mutacji typu stop zlokalizowanych na obu allelach. Może to sugerować, że wystąpienie takiego genotypu jest letalne tak jak np. w przypadku modelu mysiego z knockoutem genu *lft122*, *lft121* oraz *lft144*.^{25,26,29} U pacjentów z mutacjami zidentyfikowanymi w obrębie genów odpowiedzialnych za CED stwierdza się szerokie spektrum cech fenotypowych typowych dla zespołu Sensenbrenner.

Wydaje się również, że występują pewne różnice w obrazie klinicznym u pacjentów w zależności od genu, w którym zidentyfikowano mutacje. U trzech pacjentów z mutacjami w genie *IFT121* stwierdzono wystąpienie niepełnosprawności intelektualnej, która nie jest cechą typową dla tego zespołu. U innych dwóch pacjentów z mutacjami w tym genie nie zdiagnozowano zaburzeń ze strony nerek, które z kolei są typowe

dla zespołu Sensenbrenner, co może być również spowodowane tym, że zaburzenia ze strony nerek mogą pojawić się u pacjentów w okresie późniejszym.

Natomiast retinopatię, która wydaje się nie być cechą charakterystyczną dla tego zespołu stwierdzono tylko u pacjentów z mutacją w genie *IFT144*.^{24-27,132} Wyniki te potwierdzają, iż w przypadku chorób rzęskowych ocena korelacji genotyp-fenotyp wydaje się być niezwykle trudna. Jest tak przede wszystkim ze względu na dużą liczbę genów rzęskowych i na to, że na fenotyp obserwowany u pacjentów ma wpływ rodzaj i liczba mutacji oraz ich położenie w danym genie lub/i genach.⁸¹

6.14. Analiza pozostałych genów odpowiedzialnych za zespół Sensenbrenner

W grupie pacjentów, u których nie zidentyfikowano mutacji w genie *IFT122* konieczne jest przeprowadzenie analizy pozostałych trzech znanych genów *IFT121*, *IFT43* oraz *IFT144* odpowiedzialnych za wystąpienie CED.

W przypadku wykluczenia mutacji w znanych genach można zastosować technikę sekwencjonowania nowej generacji NGS (ang. *Next generation sequencing*) całego genomu lub eksomu w celu identyfikacji nowego genu odpowiedzialnego za wystąpienie zespołu Sensenbrenner. Zastosowanie tej techniki pozwoliło i pozwoli w stosunkowo krótkim czasie na identyfikację nowych genów, których mutacje odpowiedzialne są za wystąpienie wielu chorób o dotychczas nieznanym podłożu genetycznym. Możliwe jest również w oparciu o technikę NGS stworzenie i sekwencjonowanie tzw. paneli dla określonych chorób uwarunkowanych genetycznie. Dzięki zastosowaniu techniki NGS możliwa była identyfikacja kolejnych genów i mutacji odpowiedzialnych za wystąpienie zespołu Sensenbrenner.^{23,133} W miarę redukcji kosztów i upowszechnienia metody możliwe będzie sekwencjonowanie NGS całego genomu lub eksomu pacjenta w celach diagnostycznych.

Ze względu na duże zróżnicowanie kliniczne w obrębie ciliopatii i ich heterogenność genetyczną oraz ze względu na dużą liczbę genów rzęskowych i ich wielkość wydaje się, że zastosowanie technologii sekwencjonowania NGS eksomu rzęskowego jest jedyną strategią, która pozwoli w stosunkowo tani sposób przeprowadzić diagnostykę u pacjentów z rozpoznany z zespołem rzęskowym. Metoda NGS posiada wiele zalet tj. uzyskanie w szybkim czasie informacji dotyczącej sekwencji genomu, eksomu lub wybranych fragmentów jest stosunkowo tania i wymaga bardzo małych ilości DNA do przeprowadzenia analizy. Wymaga ona jednak stworzenia odpowiedniej infrastruktury. Ze względu na to, iż zastosowanie technik NGS wiąże się z wytworzeniem ogromnej ilości danych konieczne jest zapewnienie serwerów komputerowych o bardzo dużej pojemności. Następnym ważnym elementem jest przeprowadzenie analizy

bioinformatycznej uzyskanych danych z zastosowaniem specjalnego systemu filtrowania, który pozwoli na odróżnienie wariantów od tych zmian, które potencjalnie mogą mieć charakter patogenny. W celu wprowadzenia techniki NGS do rutynowej diagnostyki niezbędne jest również stworzenie programów komputerowych, które pozwolą na łatwą interpretację uzyskanych wyników i nie będą wymagały skomplikowanych analiz bioinformatycznych. Zastosowanie metody NGS wiąże się z możliwością identyfikacji wielu zmian zarówno tych o znaczeniu klinicznym jak i takich, których znaczenie kliniczne nie zostało jeszcze poznane. Może stwarzać to problemy w interpretacji uzyskanych wyników oraz w przypadku konieczności udzielenia porady genetycznej. Niemniej jednak w niedalekiej przyszłości technika NGS stosowana w celach rutynowej diagnostyki genetycznej stanie się metodą z wyboru.^{80,132}

6.15. Terapia chorób rzęskowych

Ze względu na to, że obraz klinicznych ciliopatii jest bardzo złożony i zmiany występują w obrębie wielu narządów, obecnie głównym celem terapii jest łagodzenie objawów choroby i ograniczenie czynników powodujących jej postęp. Najczęstszą cechą stwierdzaną w tej grupie chorób są zaburzenia ze strony nerek. Obecnie jedyną terapią tego typu schorzeń jest leczenie nerkozastępcze. Dlatego na szeroką skalę prowadzone są badania na modelach zwierzęcych mające na celu stworzenie terapii powodującej zahamowanie lub spowolnienie tworzenia torbieli w obrębie nerek. Badania przeprowadzone na modelu zwierzęcym *Danio rerio* pokazały, że zastosowanie rapamycyny i roskowityny powoduje spowolnienie powstawania cyst i polepsza pojemność filtrującą nerek. Rapamycyna jest lekiem immunosupresyjnym stosowanym między innymi w transplantologii. Rapamycyna jest inhibitorem szlaku mTOR (ang. *mammalian target of rapamycine*) i reguluje proliferację komórek. Natomiast roskowityna jest inhibitorem cyklu komórkowego działającym poprzez kinazy zależne od cyklin CDK (ang. *cyclin-dependent kinases*). Rapamycyna została również przetestowana z podobnym efektem na kilku modelach mysich. Uzyskane wyniki wskazują, iż dzięki ogromnemu postępowi i dzięki uzyskanym wynikom badań nad modelami zwierzęcymi w najbliższym czasie podobną terapię będzie można zastosować u pacjentów z chorobami rzęskowymi.^{61,81,122} Ogromny postęp naukowy nad badaniem podłoża genetycznego ciliopatii pozwolił na identyfikację nowych genów rzęskowych, a prowadzone badania funkcjonalne nad zrozumieniem ich funkcji oraz interakcji pomiędzy poszczególnymi białkami i stworzenie modeli zwierzęcych z pewnością pozwoli w przyszłości na rozszerzenie terapii chorób, w których patogenezie zasadniczą rolę odgrywa nieprawidłowe funkcjonowanie rzęsek.

7. WNIOSKI

1. Przyczyną zespołu Sensenbrenner u części chorych są mutacje w genie *IFT122* zlokalizowanym w chromosomie 3 w regionie q21-q24.
2. Mutacje w genie *IFT122* prowadzące do zespołu Sensenbrenner są mutacjami punktowymi typu zmiany sensu oraz zaburzającymi składanie pierwotnego transkryptu i mogą występować w różnych miejscach genu.
3. Zespół Sensenbrenner należy do chorób rzęskowych (ciliopatii), a plejotropowe działanie genu *IFT122* tłumaczy bogatą symptomatologię zespołu Sensenbrenner.
4. Zespół Sensenbrenner jest heterogenny genetycznie – mutacje w genie *IFT122* odpowiadają tylko za część przypadków zespołu.

8. STRESZCZENIE

Zespół Sensenbrenner (Cranioectodermal dysplasia) jest bardzo rzadkim zespołem wad wrodzonych dziedziczonym w sposób autosomalny recesywny. Typowymi cechami tego zespołu są: niski wzrost, skrócenie kończyn, krótka i wąska klatka piersiowa, brachydaktylia, dolichcefalia, kraniosynostoza, tubulopatia nerkowa prowadząca do niewydolności nerek oraz zmiany ekodermalne. Rozwój intelektualny osób z CED jest prawidłowy. W celu identyfikacji podłoża molekularnego zespołu Sensenbrenner zebrano grupę 13 pacjentów pochodzących z 12 rodzin. W małej, polskiej spokrewnionej rodzinie przeprowadzono analizę sprzężeń, która pozwoliła na identyfikację locus dla CED zlokalizowanego na chromosomie 3q21-24. Analiza 79 genów kandydujących z tego regionu pozwoliła na identyfikację homozygotycznej mutacji typu *missens* (V->G) w eksonie 15 genu *IFT122*. Przeprowadzona analiza tego genu u pozostałych pacjentów umożliwiła identyfikację kolejnej homozygotycznej mutacji typu *missens* (S->F) w eksonie 11 w drugiej spokrewnionej rodzinie z Norwegii oraz heterozygotycznej mutacji typu *missens* (W->C) w eksonie 1 w kombinacji z heterozygotyczną mutacją splicingową w intronie 6 u sporadycznego pacjenta z Włoch. Żadna z czterech zidentyfikowanych mutacji nie była obecna wśród 340 analizowanych kontrolnych chromosomów. Białko IFT122 jest zaangażowane w proces budowy i tworzenia eukariotycznych rzęsek. Analiza struktury rzęsek przeprowadzona na fibroblastach skóry pacjenta wykazała zmniejszoną ilość i długość rzęsek w porównaniu do kontroli. Analiza typu knockdown genu *ift122* w modelu zwierzęcym (*Danio rerio*) wykazała charakterystyczny fenotyp obserwowany w wielu modelach zespołów rzęskowych. Ponieważ mutacje w genie *IFT122* zidentyfikowano u 4 spośród 13 analizowanych pacjentów, przeprowadzone badania wskazują, iż zespół Sensenbrenner jest heterogenny oraz że identyfikacja podłoża molekularnego w pozostałych przypadkach najprawdopodobniej dotyczy mutacji w genach ważnych dla funkcjonowania i budowy struktury rzęsek. Obecnie poznano cztery geny *IFT122*, *IFT121*, *IFT43*, *IFT144*, których mutacje odpowiedzialne są za wystąpienie zespołu Sensenbrenner. Ich produkty ekspresji należą do kompleksu A uczestniczącego w retrogradowym transporcie wewnątrzrzęskowym.

9. ABSTRACT

Cranioectodermal dysplasia (CED) is a disorder characterized by craniofacial, skeletal, and ectodermal abnormalities. Most cases reported to date are sporadic, but a few familial cases support an autosomal recessive inheritance pattern. Aiming at the elucidation of the genetic basis of CED, we collected 13 patients with CED symptoms from 12 independent families. In one family with consanguineous parents two siblings were affected, permitting linkage analysis and homozygosity mapping. This revealed a single region of homozygosity with a significant LOD score (3.57) on chromosome 3q21-3q24. By sequencing candidate genes from this interval we found a homozygous missense mutation in the *IFT122* (WDR10) gene that co-segregated with the disease. Examination of *IFT122* in our patient cohort revealed one additional homozygous missense change in the patient from a second consanguineous family. In addition, we found compound heterozygosity for a donor splice site change and a missense change in one sporadic patient. All mutations were absent in 340 control chromosomes. As *IFT122* plays an important role in the assembly and maintenance of eukaryotic cilia, we investigated patient fibroblasts and found significantly reduced frequency and length of primary cilia as compared to controls. Furthermore, we transiently knocked down *ift122* in zebrafish embryos and observed the typical phenotype found in other models of ciliopathies. Since not all our patients harboured mutations in *IFT122*, CED seems to be genetically heterogeneous. Still, by identifying CED as a ciliary disorder our study suggests that the causative mutations in the unresolved cases most likely affect primary cilia function too. To date four genes *IFT122*, *IFT121*, *IFT43* and *IFT144* have been identified to be associated with Sensenbrenner syndrome all encoding for proteins that are part of the intraflagellar transport complex A, which is involved in retrograde ciliary transport.

10. ODCZYNNIKI I BUFORY

10.1 Odczynniki

Nazwa odczynnika	Producent
Acetic acid	Merck
Agaroz	Invitrogen
Akrylamid	Sigma
Amonium persulfate	Sigma
Ampicylima	Sigma
APS (Amonium persulfate)	Sigma
Aqua ad inectabilia	Baxter
Betaina	Sigma
Bromophenol Blue	Sigma
BSA	Sigma
Chloroform	Sigma, Merck
Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
DAPI (4,6-diamino-2phenylindole-2HCl H ₂ O)	Serva
DEPC (Diethylpyrocarbonate)	Aldrich
DMEM	Lonza
DMSO	Sigma
dNTPs	Roth, Fermentas
EDTA	Merck
Etanol	Merck
EtBr (Bromek etydyny)	Serva, Sigma
Fenol	Sigma
Fibronektyna	R&D Systems
Formamid	Flucka Biochemika
Glicerol	Roth
L-Glutamine (200mM/ml)	Cambrex
Glycin	Merck
Izopropanol	Merck
Magnesium chloride	Merck
Metanol	Merck
Milk powder	Protifar
OptiMem	Glibco
Penicillin-Streptomycin (1000U/ml Pen., 10mg/ml Strep.)	Cambrex
PFA (Paraformaldehyd)	Merck
SDS	Roth
RPMI medium	Lonza
Sodium Acetate	Sigma-Aldrich
Sodium Chloride	Roth
Sodium Hydroxide	Merck
Sodium Perchlorate	Merck
TEMED	Gibco
TO-PRO-3	Invitrogen
Triton X100	Invitrogen

Tris	Merck
TRIzol	Gibco BRL
Trypsyna EDTA (500mg/ml Trypsin, 200 mg/ml EDTA)	Cambrex
Tween 20	Invitrogen
Żelatyna	Chemicon

10.2. Enzymy

Nazwa	Producent
Proteinaza K	Fermentas
RNasin	Promega
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen

10.3. Bufory i media

Nazwa	Skład
APS 10%	10% w/v APS w wodzie, przechowywanie -20°C
Bufor blokujący	3% milk powder w PBST
Bromek etydyny	10mg/ml EtBr w wodzie
woda DEPC	0.1% DEPC rozpuszczony w wodzie, autoklawowany
DMEM do hodowli fibroblastów	Lonza +10% FCS + 100 U/ml Penicylin + 100µg/ml Streptomycyn + 2mM L-Glutamine
FCS (Fetal Calf Serum)	Sigma
PBS 1x	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10,1mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8mM KH ₂ PO ₄
PBST	1xPBS; 1:1000 Tween 20
TAE 50x	50mM EDTA, 5,71% v/v acetic acid, 2M Tris-HCl
TE	10mM Tris-HCl (pH 7,5); 1mM EDTA
Freezing bufor	10% DMSO; 70%RPMI; 20%FCS
1M Tris-HCl pH 7.6	120g Tris base; ad 900ml dH ₂ O adjust pH 7.6 with 37% HCl ad 1000ml dH ₂ O
1x TBS	10mM Tris-HCl (pH 8.0); 150mM NaCl
1x TBST	10mM Tris-HCl (pH 8.0); 150mM NaCl; 0,05% Tween 20

Bufory Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit

Reverse Transcription Master Mix

Składniki	1 reakcja
T7 Oligo(dT) Primer	1 µl
10x First Strand Buffer	2 µl
dNTP Mix	4 µl
RNase Inhibitor	1 µl
ArrayScript	1 µl

Sekond Strand Master Mix

Składniki	1 reakcja
Nuclease free water	63 µl
10x Sekond Strand Buffer	10 µl
dNTP Mix	4 µl
Polimeraza DNA	2 µl
RNase H	1 µl

IVT Master Mix

Składniki	1 reakcja
T7 10x Reaction Buffer	2.5 µl
T7 Enzyme Mix	2.5 µl
Biotin-NTP Mix	2.5 µl

10.4. Zestawy markery

Nazwa odczynnika	Producent
0.24-9.5 Kb RNA ladder	Invitrogen
BidDye Terminatormix	Applied Biosystems
Bio-X-ACT PCR Kit	Bioline
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen
Hyper Ladder I	Bioline
Hyper Ladder IV	Bioline
Lambda DNA/HindIII marker	Fermentas
MiniElute PCR purification Kit	Qiagen
PAX gene blood RNA kit	PreAnalytiX
pUCMix marker, 8	Fermentas
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR purification Kit	Qiagen
Random primers	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Superscript™ III Reverse Transcriptase	Invitrogen
SYBRGreen PCR master mix	Applied Biosystems

10.5. Materiały jednorazowego użytku

Nazwa	Producent
0.025 µm filters	Millipore
Adhesive PCR film	Abgene
Cell culture flask (75&100 cm ²)	TTP
Cell scraper	TTP
Chromatography paper	Whatman
Falcon tube	Greiner BioOne
Glass coverslip	Menzel-Glaser
Hamilton syringe	Hamilton
Microscope slides	Roth
Parafilm	Pechiney Plastic Packing
Pasteur pipette	Roth
PCR plate (96 well)	Abgene
Tipsy do pipet (0.1-10, 1-20, 20-200 & 1000µl)	Biozyme
Robówki (1.5 & 2ml)	Eppendorf
Rnase ZapWipes	Ambion
Skalpel	Aesculap
Steril plastic disposables for cell culture	TRP

10.6. Programy komputerowe i bazy danych

Nazwa	Link
BeadStudio	http://www.illumina.com/
CodoneCode	http://www.codoncode.com/
Cyrillic 2.1.3	http://www.cyrillicsoftware.com/
DAVID	http://david.abcc.ncifcrf.gov/
Ensembl	http://ensembl.org
ExonPrimer	http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html
ExPaSy	http://www.expasy.org/
ESEfinder2.0	http:// http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi
GeneRunner v3,05	http://www.generunner.net/
GeneBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/
Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
m-fold	http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/
OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim
Panther	http://pantherdb.org/
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/
PolyPhen	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/
PosMed	http://omicspace.riken.jp/PosMed/
SDS 2.1	http://www.appliedbiosystems.com/
SIFT	http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html
Webcutter	http://ma.lundberg.gu.se/cutter2/
Zeiss LSM image examiner	Provided with Zeiss laser scanning microscope

11. WYKAZ STOSOWANEJ APARATURY

Nazwa	Producent
Aparat do elektroforezy Horizon® 11.14 and 20.25	Life technologies
Aparat do mini-żeli	Bio-Rad
CASY1 system	Scharffe system
Clean bench Herasafe	Heraeus
Curix 60 – maszyna do wywoływania kliszy	Agfa
E.A.S.Y. 440K Gel Documentation System	Herolab
Inkubator	Forma Scientific
Inkubator 371	Thermo Elektron Corp.
Kamera EMCCD C9100-13	Hamamatsu
Koncentrator 5301	Eppendorf
Laminar, CA/REV 6	Clean Air
Mikroskop, Eclipse TS100	Nikon
Mikroskop konfokalny RS3 Spinning Disk	PerkinElmer
Pipeta wielokanałowa	Rainin
Pipett boy	Integra biosciences
pH-metr	Knick
PTC-225 Tetrad and Dyad Thermal cycler	Bio-Rad
REAX 2000 vortexer	Heidolph
Rotor TLA120.1, TLS-55, SW40	Beckmann
Sekwencjator - Capillary Sequencer ABI 377	Applied Biosystems
Skaner, Expression 1680 Pro	Epson
SPD 111V Speed Vac	Savant
Spektrofotometr NanoDrop ND-1000	PEQLAB
Termomixer 5436	Eppendorf
ThermoForma 758 Ultrafreezer	Thermo Elektron Corp.
Ultrawirówka L8-70M	Beckmann
Ultrawirówka TL100	Beckmann
UV trasilluminator	UVPinc
Wirówka 5810R	Eppendorf
Wirówka 5415C	Eppendorf
Wirówka Rotina 46R/Rotina 4R	Hettich zentrifugen
Wirówka Rotina 48R	Hettich zentrifugen
Wirówka Sorvall RC-5B	Du Pont instrument
Zasilacz do elektroforezy	Heathkit
Zasilacz Power Pac 300	Bio-Rad
Zestaw pipet	Eppendorf

12. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ALMS	zespół Alstroma (ang. <i>Alstrom syndrome</i>)
BBS	zespół Bardeta-Biedla (ang. <i>Bardet-Biedl syndrome</i>)
bp	pary zasad (ang. <i>base pair</i>)
CDK	kinazy zależne od cyklin (ang. <i>cyclin dependent kinases</i>)
cDNA	komplementarny DNA (DNA uzyskany poprzez odwrotną transkrypcję na matrycy mRNA)
CED	zespół Sensenbrenner (ang. <i>Cranioectodermal dysplasia</i>)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
EVC	zespół Ellisa van Crevelda (ang. <i>Ellis van Creveld syndrome</i>)
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
IFT	transport wewnątrzrzęskowy (ang. <i>intraflagellar transport</i>)
IQ	iloraz inteligencji (ang. <i>intelligence quotient</i>)
JATD	zespół Jeune (ang. <i>Jeune asphyxiating thoracic dystrophy</i>)
JBTS	zespół Joubert (ang. <i>Joubert syndrome</i>)
Kbp	tysiąc par zasad
MEF	mysie embrionalne fibroblasty (ang. <i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
MKS	zespół Meckela (ang. <i>Meckel syndrome</i>)
MTOC	centrum organizacji mikrotubul (ang. <i>microtubule organization center</i>)
NGS	sekwencjonowanie nowej generacji (ang. <i>next generation sequencing</i>)
nt	nukleotyd
NPHP	nefronoftyza (ang. <i>nephronophthisis</i>)
OFD1	zespół ustno-twarzowo-palcowy typu I (ang. <i>oral-facial-digital type I</i>)
PCD	pierwotna dyskineza rzęsek (ang. <i>primary ciliary dyskinesia</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PKD	zespół wielotorbielowatości nerek (ang. <i>polycystic kidney diseases</i>)
PND	przewody pronefryczne (ang. <i>pronephric ducts</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy
rpm	obroty na minutę (ang. <i>revolutions per minute</i>)
RTG	rentgenografia
SNLS	zespół Seniora-Loken (ang. <i>Senior-Loken syndrome</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SRP	zespół krótkie żebro-polidaktylia (ang. <i>short rib-polydactyly syndrome</i>)
USG	ultrasonografia

13. SPIS RYCIN

- Rycina 1.** Cechy kliniczne zespołu Sensenbrenner.
- Rycina 2.** Pacjenci z zespołem Sensenbrenner.
- Rycina 3.** Zmiany w obrębie dłoni i stóp w zespole CED.
- Rycina 4.** Lokalizacja genu *IFT122* na chromosomie 3.
- Rycina 5.** Produkt ekspresji genu *IFT122* na przykładzie izoformy 1.
- Rycina 6.** Zmiany rzęskowe w modelu mysim genu *lft122*.
- Rycina 7.** Lokalizacja genu *IFT121* na chromosomie 2.
- Rycina 8.** Produkt ekspresji genu *IFT121* na przykładzie izoformy 1.
- Rycina 9.** Lokalizacja genu *IFT143* na chromosomie 14.
- Rycina 10.** Produkt ekspresji genu *IFT43* na przykładzie izoformy 1.
- Rycina 11.** Lokalizacja genu *IFT144* na chromosomie 4.
- Rycina 12.** Produkt ekspresji genu *IFT144* na przykładzie izoformy 1.
- Rycina 13.** Struktura rzęsek.
- Rycina 14.** Występowanie rzęsek ruchomych i nieruchomych w różnych tkankach.
- Rycina 15.** Cykl komórkowy a mechanizm formowania i resorpcji rzęski.
- Rycina 16.** Mechanizm transport wewnątrzkomórkowego.
- Rycina 17.** Funkcja rzęsek w procesie lateralizacji.
- Rycina 18.** Struktura komórki pręcika siatkówki.
- Rycina 19.** Morfologia nerek w zespołach rzęskowych.
- Rycina 20.** Manifestacja kliniczna poszczególnych zespołów rzęskowych.
- Rycina 21.** Etapy embriogenezy *Danio rerio*.
- Rycina 22.** Wynik parametrycznej analizy sprzężeń. Program Merlin. Lokalizacja jedyne go interwału sprzężenia na chromosomie 3. Lod score 3.57.
- Rycina 23.** Wynik parametrycznej analizy sprzężeń. Program Genehunter. Lokalizacja interwału sprzężenia na chromosomie 3. Lod score 3.57.
- Rycina 24.** Haplotyp interwału sprzężenia. Region homozygotyczny zlokalizowany jest pomiędzy polimorfizmami rs977683 i rs1992093.
- Rycina 25.** Lokalizacja regionu homozygotycznego na chromosomie 3q21.3-q24.
- Rycina 26.** Rodowód rodziny CED-01.
- Rycina 27.** Rodowód rodziny CED-01. Wynik analizy genu *IFT122*. Analiza kosegregacji zidentyfikowanej zmiany.
- Rycina 28.** Proband (pacjent 1) z rodziny CED-01 w wieku trzech lat i dziewięciu miesięcy.
- Rycina 29.** Defekty dłoni i stóp u pacjenta 1.
- Rycina 30.** Zmiany ektodermalne u pacjenta 1.
- Rycina 31.** Nadmiernie elastyczna skóra u pacjenta 1.
- Rycina 32.** Pacjent 2 w wieku pięciu miesięcy.
- Rycina 33.** Obraz kliniczny pacjenta 2.
- Rycina 34.** Brachydaktylia dłoni u pacjenta 2.
- Rycina 35.** Głębokie i nieprawidłowe bruzdy dłoniowe i podeszwowe u pacjenta 2.
- Rycina 36.** Zmiany ektodermalne u pacjenta 2.
- Rycina 37.** Rodowód rodziny CED-02.
- Rycina 38.** Rodowód rodziny CED-02. Wynik analizy genu *IFT122*. Analiza kosegregacji zidentyfikowanej zmiany.
- Rycina 39.** Obraz kliniczny pacjenta 3 w wieku 12 miesięcy.

- Rycina 40.** Obustronna przepuklina pachwinowa u pacjenta 3.
- Rycina 41.** Rodowód rodziny CED-03.
- Rycina 42.** Rodowód rodziny CED-03. Wynik analizy genu *IFT122*. Analiza kosegregacji zidentyfikowanej zmiany.
- Rycina 43.** Badanie radiologiczne pacjenta CED-03/4 w wieku trzech lat.
- Rycina 44.** Lokalizacja zmian zidentyfikowanych w genie *IFT122*, na poziomie DNA (górny panel) oraz na poziomie białka (dolny panel).
- Rycina 45.** Wynik genotypowania w rodzinie CED-03 potwierdzający ojcostwo.
- Rycina 46.** Lokalizacja poszczególnych primerów wykorzystanych w reakcji RT-PCR.
- Rycina 47.** Wyniki reakcji RT-PCR.
- Rycina 48.** Wyniki sekwencjonowania poszczególnych produktów reakcji RT-PCR.
- Rycina 49.** Wyniki reakcji real-time dla izoformy 3 genu *IFT122*.
- Rycina 50.** Wyniki reakcji real-time dla nowego transkryptu N genu *IFT122*.
- Rycina 51.** Wyniki reakcji real-time dla izoformy 4 genu *IFT122*.
- Rycina 52.** Analiza częstości występowania rzęsek w fibroblastach.
- Rycina 53.** Analiza długości rzęsek w fibroblastach.
- Rycina 54.** C. Ocena częstości występowania rzęsek w fibroblastach.
D. Ocena długości rzęsek.
- Rycina 55.** Fenotyp modelu zebrafish *ift122*.
- Rycina 56.** Analiza rzęsek w przewodach pronefrycznych.
- Rycina 57.** Analiza rzęsek w pęcherzyku Kupffer'a.
- Rycina 58.** Analizę szlaku *shh* w modelu zebrafish *ift122*
- Rycina 59.** Wyniki reakcji RT-PCR specyficznej dla *ift122*.
- Rycina 60.** Wynik analizy m-fold dla transkryptu 3 genu *IFT122*.
- Rycina 61.** Wynik analizy m-fold dla nowego transkryptu N (z pominięciem eksonu 6) genu *IFT122*.
- Rycina 62.** Wynik analizy m-fold dla transkryptu 4 genu *IFT122*.
- Rycina 63.** Przebieg procesu mitozy na przykładzie linii komórkowej fibroblastów skóry kontroli.
- Rycina 64.** Przebieg procesu mitozy na linii komórkowej fibroblastów skóry pacjenta CED-01/2.
- Rycina 65.** Komórki fibroblastów w metafazie.
- Rycina 66.** Bruzda podziałowa w komórkach pacjenta.
- Rycina 67.** Profaza cyklu komórkowego fibroblastów skóry pacjenta.
- Rycina 68.** Analiza długości komórek fibroblastów skóry pacjenta CED-01/2 oraz kontroli.
- Rycina 69.** Wynik analizy długości komórek fibroblastów skóry pacjenta oraz kontroli.
- Rycina 70.** Cechy kliniczne wspólne dla zespołu JATD oraz CED.
- Rycina 71.** Model myszy genu *lft88*.

14. SPIS TABEL

- Tabela 1.** Mutacje zidentyfikowane u pacjentów z zespołem Sensenbrenner.
- Tabela 2.** Przegląd znanych ciliopatii.
- Tabela 3.** Dane kliniczne pacjentów z zespołem Sensenbrenner.
- Tabela 4.** Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do reakcji PCR.
- Tabela 5.** Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do sekwencjonowania.
- Tabela 6.** Skład mieszaniny reakcyjnej 1 użytej do syntezy cDNA.
- Tabela 7.** Skład mieszaniny reakcyjnej 2 użytej do syntezy cDNA.
- Tabela 8.** Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej do reakcji RT-PCR.
- Tabela 9.** Sekwencje primerów wykorzystanych w reakcji RT-PCR.
- Tabela 10.** Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej w reakcji real-time PCR.
- Tabela 11.** Sekwencje primerów wykorzystanych w reakcji real-time PCR.
- Tabela 12.** Lista genów kandydujących z *locus* dla CED, które poddano analizie.
- Tabela 13.** Polimorfizmy SNP zidentyfikowane w genie *IFT122* w grupie pacjentów z zespołem Sensenbrenner.

15. BIBLIOGRAFIA

1. Latos-Bielenska, A. and A. Materna-Kirylyuk, *Polish Registry of Congenital Malformations - aims and organization of the registry monitoring 300 000 births a year*. J Appl Genet, 2005. **46**(4): p. 341-8.
2. Latos-Bielenska, A., et al., *Wrodzone wady rozwojowe w Polsce w latach 1998-1999*. Ośrodek Wydawnictw Naukowych w Polsce, 2002.
3. Korniszewski, L. *Dziecko z zespołem wad wrodzonych*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2005.
4. Sensenbrenner, J.A., J.P. Dorst, and R.P. Owens, *New syndrome of skeletal, dental and hair anomalies*. Birth Defects Orig Artic Ser, 1975. **11**(2): p. 372-9.
5. Levin, L.S., et al., *A heritable syndrome of craniosynostosis, short thin hair, dental abnormalities, and short limbs: cranioectodermal dysplasia*. J Pediatr, 1977. **90**(1): p. 55-61.
6. Gellis, S., M. Feingold, and D. Dubner, *Cranioectodermal dysplasia*. Am J Dis Child, 1979. **133**(12): p. 1275-6.
7. Lang, G.D. and I.D. Young, *Cranioectodermal dysplasia in sibs*. J Med Genet, 1991. **28**(6): p. 424.
8. Young, I.D., *Cranioectodermal dysplasia (Sensenbrenner's syndrome)*. J Med Genet, 1989. **26**(6): p. 393-6.
9. Genitori, L., et al., *Cranioectodermal dysplasia with sagittal craniosynostosis (Sensenbrenner's syndrome): case report and review of the literature*. Br J Neurosurg, 1992. **6**(6): p. 601-6.
10. Lammer, E.J., H. Baden, and R.J. Margolis, *Phenotype of cranioectodermal dysplasia with different hair and bone abnormalities*. Am J Med Genet, 1993. **45**(1): p. 9-13.
11. Eke, T., G. Woodruff, and I.D. Young, *A new oculorenal syndrome: retinal dystrophy and tubulointerstitial nephropathy in cranioectodermal dysplasia*. Br J Ophthalmol, 1996. **80**(5): p. 490-1.
12. Tsimaratos, M., et al., *Renal and retinal involvement in the Sensenbrenner syndrome*. Am J Med Genet, 1998. **77**(4): p. 337.
13. Amar, M.J., R. Sutphen, and B.G. Kousseff, *Expanded phenotype of cranioectodermal dysplasia (Sensenbrenner syndrome)*. Am J Med Genet, 1997. **70**(4): p. 349-52.
14. Savill, G.A., et al., *Chronic tubulo-interstitial nephropathy in children with cranioectodermal dysplasia*. Pediatr Nephrol, 1997. **11**(2): p. 215-7.
15. Costet, C., et al., *[Pigmentosum retinis and tubulo-interstitial nephronophthisis in Sensenbrenner syndrome: a case report]*. J Fr Ophtalmol, 2000. **23**(2): p. 158-60.
16. Zannolli, R., et al., *Cranioectodermal dysplasia: a new patient with an inapparent, subtle phenotype*. Pediatr Dermatol, 2001. **18**(4): p. 332-5.
17. Tamai, S., et al., *Intrafamilial phenotypic variations in cranioectodermal dysplasia: propositus with typical manifestations and her brother with perinatal death*. Am J Med Genet, 2002. **107**(1): p. 78-80.
18. Obikane, K., et al., *Renal failure due to tubulointerstitial nephropathy in an infant with cranioectodermal dysplasia*. Pediatr Nephrol, 2006. **21**(4): p. 574-6.
19. Zaffanello, M., et al., *Sensenbrenner syndrome: a new member of the hepatorenal fibrocystic family*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(21): p. 2336-40.

20. Konstantinidou, A.E., et al., *Cranioectodermal dysplasia: a probable ciliopathy*. Am J Med Genet A, 2009. **149A**(10): p. 2206-11.
21. Fry, A.E., et al., *Connective tissue involvement in two patients with features of cranioectodermal dysplasia*. Am J Med Genet A, 2009. **149A**(10): p. 2212-5.
22. Walczak-Sztulpa, J., et al., *Cranioectodermal Dysplasia, Sensenbrenner syndrome, is a ciliopathy caused by mutations in the IFT122 gene*. Am J Hum Genet, 2010. **86**(6): p. 949-56.
23. Gilissen, C., et al., *Exome sequencing identifies WDR35 variants involved in Sensenbrenner syndrome*. Am J Hum Genet, 2010. **87**(3): p. 418-23.
24. Arts, H.H., et al., *C14ORF179 encoding IFT43 is mutated in Sensenbrenner syndrome*. J Med Genet, 2011. **48**(6): p. 390-5.
25. Mill, P., et al., *Human and mouse mutations in WDR35 cause short-rib polydactyly syndromes due to abnormal ciliogenesis*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(4): p. 508-15.
26. Bredrup, C., et al., *Ciliopathies with skeletal anomalies and renal insufficiency due to mutations in the IFT-A gene WDR19*. Am J Hum Genet, 2011. **89**(5): p. 634-43.
27. Hoffer, J., et al., *Novel WDR35 mutations in patients with cranioectodermal dysplasia (Sensenbrenner syndrome)*. Clin Genet, 2012.
28. Tsao, C.C. and M.A. Gorovsky, *Tetrahymena IFT122A is not essential for cilia assembly but plays a role in returning IFT proteins from the ciliary tip to the cell body*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 4): p. 428-36.
29. Qin, J., et al., *Intraflagellar transport protein 122 antagonizes Sonic Hedgehog signaling and controls ciliary localization of pathway components*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(4): p. 1456-61.
30. Gerdes, J.M., E.E. Davis, and N. Katsanis, *The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease*. Cell, 2009. **137**(1): p. 32-45.
31. Satir, P., D.R. Mitchell, and G. Jekely, *How did the cilium evolve?* Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 63-82.
32. Ibanez-Tallon, I., N. Heintz, and H. Omran, *To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease*. Hum Mol Genet, 2003. **12 Spec No 1**: p. R27-35.
33. Duldulao, N.A., J. Li, and Z. Sun, *Cilia in cell signaling and human disorders*. Protein Cell, 2010. **1**(8): p. 726-36.
34. Satir, P. and S.T. Christensen, *Structure and function of mammalian cilia*. Histochem Cell Biol, 2008. **129**(6): p. 687-93.
35. Satir, P. and S.T. Christensen, *Overview of structure and function of mammalian cilia*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 377-400.
36. D'Angelo, A. and B. Franco, *The dynamic cilium in human diseases*. Pathogenetics, 2009. **2**(1): p. 3.
37. Pazour, G.J. and J.L. Rosenbaum, *Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(12): p. 551-5.
38. Boldt, K., et al., *Disruption of intraflagellar protein transport in photoreceptor cilia causes Leber congenital amaurosis in humans and mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2169-80.
39. Fliegauf, M., T. Benzing, and H. Omran, *When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 880-93.
40. Pedersen, L.B. and J.L. Rosenbaum, *Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling*. Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 23-61.
41. Pan, J., *Cilia and ciliopathies: from Chlamydomonas and beyond*. Sci China C Life Sci, 2008. **51**(6): p. 479-86.

42. Pedersen, L.B., et al., *Assembly of primary cilia*. Dev Dyn, 2008. **237**(8): p. 1993-2006.
43. Seeley, E.S. and M.V. Nachury, *The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 4): p. 511-8.
44. Pan, J. and W. Snell, *The primary cilium: keeper of the key to cell division*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1255-7.
45. Satir, P., L.B. Pedersen, and S.T. Christensen, *The primary cilium at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 4): p. 499-503.
46. Cardenas-Rodriguez, M. and J.L. Badano, *Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2009. **151C**(4): p. 263-80. Rosenbaum, J., *Intraflagellar transport*. Curr Biol, 2002. **12**(4): p. R125.
47. Rosenbaum, J., *Intraflagellar transport*. Curr Biol, 2002. **12**(4): p. R125.
48. Hao, L. and J.M. Scholey, *Intraflagellar transport at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 7): p. 889-92.
49. Cole, D.G. and W.J. Snell, *SnapShot: Intraflagellar transport*. Cell, 2009. **137**(4): p. 784-784 e1.
50. Scholey, J.M. and K.V. Anderson, *Intraflagellar transport and cilium-based signaling*. Cell, 2006. **125**(3): p. 439-42.
51. Silverman, M.A. and M.R. Leroux, *Intraflagellar transport and the generation of dynamic, structurally and functionally diverse cilia*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(7): p. 306-16.
52. Taschner, M., S. Bhogaraju, and E. Lorentzen, *Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis*. Differentiation, 2011. **83**(2): p. S12-22.
53. Badano, J.L., et al., *The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006. **7**: p. 125-48.
54. Toriello, H.V. and M.A. Parisi, *Cilia and the ciliopathies: an introduction*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2009. **151C**(4): p. 261-2.
55. Baker, K. and P.L. Beales, *Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2009. **151C**(4): p. 281-95.
56. Drummond, I.A., *Cilia functions in development*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **24**(1): p. 24-30.
57. Christensen, S.T., et al., *Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease*. Traffic, 2007. **8**(2): p. 97-109.
58. Sharma, N., N.F. Barbari, and B.K. Yoder, *Ciliary dysfunction in developmental abnormalities and diseases*. Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 371-427.
59. Bisgrove, B.W. and H.J. Yost, *The roles of cilia in developmental disorders and disease*. Development, 2006. **133**(21): p. 4131-43.
60. Sutherland, M.J. and S.M. Ware, *Disorders of left-right asymmetry: heterotaxy and situs inversus*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2009. **151C**(4): p. 307-17.
61. Quinlan, R.J., J.L. Tobin, and P.L. Beales, *Modeling ciliopathies: Primary cilia in development and disease*. Curr Top Dev Biol, 2008. **84**: p. 249-310.
62. Basu, B. and M. Brueckner, *Cilia multifunctional organelles at the center of vertebrate left-right asymmetry*. Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 151-74.
63. Ramamurthy, V. and M. Cayouette, *Development and disease of the photoreceptor cilium*. Clin Genet, 2009. **76**(2): p. 137-45.

64. Rosenbaum, J.L., D.G. Cole, and D.R. Diener, *Intraflagellar transport: the eyes have it*. J Cell Biol, 1999. **144**(3): p. 385-8.
65. Veland, I.R., et al., *Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease*. Nephron Physiol, 2009. **111**(3): p. p39-53.
66. Gunay-Aygun, M., *Liver and kidney disease in ciliopathies*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2009. **151C**(4): p. 296-306.
67. Eggenchwiler, J.T. and K.V. Anderson, *Cilia and developmental signaling*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 345-73.
68. Goetz, S.C. and K.V. Anderson, *The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(5): p. 331-44.
69. Berbari, N.F., et al., *The primary cilium as a complex signaling center*. Curr Biol, 2009. **19**(13): p. R526-35.
70. Wong, S.Y. and J.F. Reiter, *The primary cilium at the crossroads of mammalian hedgehog signaling*. Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 225-60.
71. Gerdes, J.M. and N. Katsanis, *Ciliary function and Wnt signal modulation*. Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 175-95.
72. Christensen, S.T., et al., *The primary cilium coordinates signaling pathways in cell cycle control and migration during development and tissue repair*. Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 261-301.
73. Haycraft, C.J. and R. Serra, *Cilia involvement in patterning and maintenance of the skeleton*. Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 303-32.
74. Thivichon-Prince, B., et al., *Primary cilia of odontoblasts: possible role in molar morphogenesis*. J Dent Res, 2009. **88**(10): p. 910-5.
75. Magloire, H., et al., *Odontoblast: a mechano-sensory cell*. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2009. **312B**(5): p. 416-24.
76. Lehman, J.M., et al., *An essential role for dermal primary cilia in hair follicle morphogenesis*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(2): p. 438-48.
77. Paus, R. and G. Cotsarelis, *The biology of hair follicles*. N Engl J Med, 1999. **341**(7): p. 491-7.
78. Slough, J., L. Cooney, and M. Brueckner, *Monocilia in the embryonic mouse heart suggest a direct role for cilia in cardiac morphogenesis*. Dev Dyn, 2008. **237**(9): p. 2304-14.
79. Clement, C.A., et al., *The primary cilium coordinates early cardiogenesis and hedgehog signaling in cardiomyocyte differentiation*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 17): p. 3070-82.
80. Lee, J.E. and J.G. Gleeson, *A systems-biology approach to understanding the ciliopathy disorders*. Genome Med, 2011. **3**(9): p. 59.
81. Tobin, J.L. and P.L. Beales, *The nonmotile ciliopathies*. Genet Med, 2009. **11**(6): p. 386-402.
82. Waters, A.M. and P.L. Beales, *Ciliopathies: an expanding disease spectrum*. Pediatr Nephrol, 2011. **26**(7): p. 1039-56.
83. Adams, M., et al., *Recent advances in the molecular pathology, cell biology and genetics of ciliopathies*. J Med Genet, 2008. **45**(5): p. 257-67.
84. Ferkol, T.W. and M.W. Leigh, *Ciliopathies: the central role of cilia in a spectrum of pediatric disorders*. J Pediatr, 2012. **160**(3): p. 366-71.
85. Davis, E.E., et al., *TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum*. Nat Genet, 2011. **43**(3): p. 189-96.
86. Bergmann, C., *Educational paper : Ciliopathies*. Eur J Pediatr, 2011.

87. Tran, P.V., et al., *THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog Signac transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia*. Nat Genet, 2008. **40**(4): p. 403-10.
88. Merrill, A.E., et al., *Ciliary abnormalities due to defects in the retrograde transport protein DYNC2H1 in short-rib polydactyly syndrome*. Am J Hum Genet, 2009. **84**(4): p. 542-9.
89. Dagoneau, N., et al., *DYNC2H1 mutations cause asphyxiating thoracic dystrophy and short rib-polydactyly syndrome, type III*. Am J Hum Genet, 2009. **84**(5): p. 706-11.
90. Lieschke, G.J. and P.D. Currie, *Animal models of human disease: zebrafish swim into view*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(5): p. 353-67.
91. Dooley, K. and L.I. Zon, *Zebrafish: a model system for the study of human disease*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(3): p. 252-6.
92. Heasman, J., *Morpholino oligos: making sense of antisense?* Dev Biol, 2002. **243**(2): p. 209-14.
93. Nasevicius, A. and S.C. Ekker, *Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 216-20.
94. Summerton, J.E., *Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity*. Curr Top Med Chem, 2007. **7**(7): p. 651-60.
95. Matsuzaki, H., et al., *Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays*. Nat Methods, 2004. **1**(2): p. 109-11.
96. Kruglyak, L., et al., *Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach*. Am J Hum Genet, 1996. **58**(6): p. 1347-63.
97. Gudbjartsson, D.F., et al., *Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 12-3.
98. Abecasis, G.R., et al., *Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees*. Nat Genet, 2002. **30**(1): p. 97-101.
99. Thiele, H. and P. Nurnberg, *HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes*. Bioinformatics, 2005. **21**(8): p. 1730-2.
100. Westerfield, M. *The Zebrafish Book - a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, 1995.
101. Coutelle, O., et al., *Hedgehog signalling is required for maintenance of myf5 and myoD expression and timely terminal differentiation in zebrafish adaxial myogenesis*. Dev Biol, 2001. **236**(1): p. 136-50.
102. Thusberg, J. and M. Vihinen, *Pathogenic or not? And if so, then how? Studying the effects of missense mutations using bioinformatics methods*. Hum Mutat, 2009. **30**(5): p. 703-14.
103. Kumar, P., S. Henikoff, and P.C. Ng, *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm*. Nat Protoc, 2009. **4**(7): p. 1073-81.
104. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations*. Nat Methods, 2010. **7**(4): p. 248-9.
105. Cartegni, L., et al., *ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3568-71.
106. Smith, P.J., et al., *An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(16): p. 2490-508.

107. Brunak, S., J. Engelbrecht, and S. Knudsen, *Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence*. J Mol Biol, 1991. **220**(1): p. 49-65.
108. Hebsgaard, S.M., et al., *Splice site prediction in Arabidopsis thaliana pre-mRNA by combining local and global sequence information*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(17): p. 3439-52.
109. Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3406-15.
110. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
111. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(1): p. 1-13.
112. Beales, P.L., et al., *IFT80, which encodes a conserved intraflagellar transport protein, is mutated in Jeune asphyxiating thoracic dystrophy*. Nat Genet, 2007. **39**(6): p. 727-9.
113. Gorlin, R.J., Cohen, M.M., Hennekam, R.C.M. *Syndromes of Head and Neck*. Oxford University Press. 4th edition 2001.
114. Orlicky, S., et al., *Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase*. Cell, 2003. **112**(2): p. 243-56.
115. Grantham, R., *Amino acid difference formula to help explain protein evolution*. Science, 1974. **185**(4154): p. 862-4.
116. Cortellino, S., et al., *Defective ciliogenesis, embryonic lethality and severe impairment of the Sonic Hedgehog pathway caused by inactivation of the mouse complex A intraflagellar transport gene *lft122/Wdr10*, partially overlapping with the DNA repair gene *Med1/Mbd4**. Dev Biol, 2009. **325**(1): p. 225-37.
117. Roloff, T.C., H.H. Ropers, and U.A. Nuber, *Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins*. BMC Genomics, 2003. **4**(1): p. 1.
118. Millar, C.B., et al., *Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice*. Science, 2002. **297**(5580): p. 403-5.
119. Wong, E., et al., *Mbd4 inactivation increases Cright-arrowT transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14937-42.
120. Cortellino, S., et al., *The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15071-6.
121. Niedermaier, M., et al., *An inversion involving the mouse *Shh* locus results in brachydactyly through dysregulation of *Shh* expression*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 900-9.
122. Tobin, J.L. and P.L. Beales, *Restoration of renal function in zebrafish models of ciliopathies*. Pediatr Nephrol, 2008. **23**(11): p. 2095-9.
123. Gerdes, J.M., et al., *Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response*. Nat Genet, 2007. **39**(11): p. 1350-60.
124. Oishi, I., et al., *Regulation of primary cilia formation and left-right patterning in zebrafish by a noncanonical Wnt signaling mediator, *duboraya**. Nat Genet, 2006. **38**(11): p. 1316-22.
125. Lehman, J.M., et al., *The Oak Ridge Polycystic Kidney mouse: modeling ciliopathies of mice and men*. Dev Dyn, 2008. **237**(8): p. 1960-71.

-
126. Brugmann, S.A., D.R. Cordero, and J.A. Helms, *Craniofacial ciliopathies: A New classification for craniofacial disorders*. Am J Med Genet A, 2010. **152A**(12): p. 2995-3006.
 127. Zaghoul, N.A. and S.A. Brugmann, *The emerging face of primary cilia*. Genesis, 2011. **49**(4): p. 231-46.
 128. Huber, C. and V. Cormier-Daire, *Ciliary disorder of the skeleton*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2012. **160C**(3): p. 165-74.
 129. Hildebrandt, F., T. Benzing, and N. Katsanis, *Ciliopathies*. N Engl J Med, 2011. **364**(16): p. 1533-43.
 130. Arts, H.H. and N.V. Knoers, *Current insights into renal ciliopathies: what can genetics teach us?* Pediatr Nephrol, 2012.
 131. Hoefele, J., et al., *Evidence of oligogenic inheritance in nephronophthisis*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(10): p. 2789-95.
 132. Desai, A.N. and A. Jere, *Next-generation sequencing: ready for the clinics?* Clin Genet. 2012. **81**(6): p. 503-10.
 133. Bacino, C.A., et al., *WDR35 mutation in siblings with Sensenbrenner syndrome: A ciliopathy with variable phenotype*. Am J Med Genet A, 2012. **158A**(11): p. 2917-24.

16.1

KBE1

KBE2

KBE3

16.2. Sekwencje primerów wykorzystanych do analizy genów (*IFT122*, *IFT88*, *IFT139*, *DYNC2H1*)

Sekwencje primerów wykorzystanych w reakcjach PCR dla genu *IFT122*

Ekson	Nazwa startera	Sekwencja startera	Wielkość produktu PCR
1	<i>IFT122_ex1_f</i> <i>IFT122_ex1_r</i>	CACCAATCAAATCCATTCTCG CCCCTCAAACACGCTGC	432 bp
2	<i>IFT122_ex2_f</i> <i>IFT122_ex2_r</i>	CATTAGCAGACTTCATCATTTTGG AAATAGCCCATTTCCATCCC	284 bp
3	<i>IFT122_ex3_f</i> <i>IFT122_ex3_r</i>	AAAATAGCAGTAGCAACCCTGC GAACTTGCAACTTGTACTCCAGC	275 bp
4	<i>IFT122_ex4_f</i> <i>IFT122_ex4_r</i>	TTCTCTCTGGGAAATGCTGG TTTCTAAGAGGCTTTTGTCTGC	214 bp
5_6	<i>IFT122_ex5_6_f</i> <i>IFT122_ex5_6_r</i>	ACTAAAACGGGTTGAGACGC CCCTCAGCCATTGAAGGTAG	665 bp
7	<i>IFT122_ex7_f</i> <i>IFT122_ex7_r</i>	CTGGAGATCCATCTAAGTTGTTG CACAAGACCTTCTCTGCTGC	266 bp
8	<i>IFT122_ex8_f</i> <i>IFT122_ex8_r</i>	ACCTTCTGTGGGGTGCCTC TTTGAATGTAGGGAGACCTCAG	287 bp
9	<i>IFT122_ex9_f</i> <i>IFT122_ex9_r</i>	CTCCTGATCTCGAGCGATTC TCTGTCCTGGCAAGTCTGTG	412 bp
10	<i>IFT122_ex10_f</i> <i>IFT122_ex10_r</i>	GCCAGGACTTCCTTGTTC GCAAATGCTCAATAAGCAGG	289 bp
11_12	<i>IFT122_ex11_12_f</i> <i>IFT122_ex11_12_r</i>	TTGCAATGGTTATGGATTCG TTTCAAGTGCCCTGTCACC	623 bp
13	<i>IFT122_ex13_f</i> <i>IFT122_ex13_r</i>	TTAATTTCTCTGCCTTGACCC TGGGCACCCTATCACTGG	342 bp
14	<i>IFT122_ex14_f</i> <i>IFT122_ex14_r</i>	GAAAGATCTCCTTGGGGAGG CTAGACGGGTCAACCACG	279 bp
15	<i>IFT122_ex15_f</i> <i>IFT122_ex15_r</i>	AGAGCACATGGGATTCCAAC AGGGACTGGGAAGCTAGAGG	322 bp
16	<i>IFT122_ex16_f</i> <i>IFT122_ex16_r</i>	AAGCCCAGGGTGGTTCTC CTGGTCTTGTGAGCCTTGC	297 bp
17	<i>IFT122_ex17_f</i> <i>IFT122_ex17_r</i>	TTCCATGGCTCTGAAAACAG CTGCAGTCTATGGCCTCTCC	392 bp
18	<i>IFT122_ex18_f</i> <i>IFT122_ex18_r</i>	CTTGCTCCCTTCTCTCCTC CTGCCCTAAAACAGGAACC	241 bp
19	<i>IFT122_ex19_f</i> <i>IFT122_ex19_r</i>	CCTTTGTAAAGGCTGCTTCC GACACCGCACGTGAGAATAC	294 bp
20	<i>IFT122_ex20_f</i> <i>IFT122_ex20_r</i>	TGCTGCTAGAAAAGCCTGATG TGCTTGTGCAATCTCTGTG	399 bp
21	<i>IFT122_ex21_f</i> <i>IFT122_ex21_r</i>	AATGAATGGACATACGGCTTG CCTGTGTCCCAGGGCTC	300 bp
22	<i>IFT122_ex22_f</i> <i>IFT122_ex22_r</i>	GCCAAGTACAGTGTTCATGG TGCTTGGCAGTAACCTCTCC	230 bp
23	<i>IFT122_ex23_f</i> <i>IFT122_ex23_r</i>	CTGCCTCTGTGTGACTTCC ATCTTGGTGTGAGAGTGGGG	259 bp
24	<i>IFT122_ex24_f</i> <i>IFT122_ex24_r</i>	AGTTGGCAGCCACAGACAC CTTTAGATATGCCCGGGACC	224 bp
25	<i>IFT122_ex25_f</i>	TTATTGGTGTCTGCCTTTTGG	240 bp

	<i>IFT122_ex25_r</i>	TCTTGGGGCCATTAGACAAG	
26	<i>IFT122_ex26_f</i> <i>IFT122_ex26_r</i>	ACTCCAAGGACAGGCAGTG GCAAGAAGGCATGAGATGG	305 bp
27	<i>IFT122_ex27_f</i> <i>IFT122_ex27_r</i>	ACCCAAGTGACAGGGCTTG CTCTCTTTCTGGGGCATTG	592 bp
28	<i>IFT122_ex28_f</i> <i>IFT122_ex28_r</i>	AAGCAACTCTGTGGTCACCC CCCAGACCCCTCACACAG	266 bp
29	<i>IFT122_ex29_f</i> <i>IFT122_ex29_r</i>	TGGAGGCTAGGGTCTGTCTC GTGCACAGGAGAAGGGATG	201 bp
30	<i>IFT122_ex30_f</i> <i>IFT122_ex30_r</i>	ACAGATGTCTCACTGTGGCTG AGAGGGACATTTGGGCAAG	293 bp
31	<i>IFT122_ex31_f</i> <i>IFT122_ex31_r</i>	CAGGCGTAGGGCTGATG ATTCCGTGGTTACACAAGGC	297 bp

Sekwencje primerów wykorzystanych w reakcjach PCR dla genu *IFT88*

Ekson	Nazwa startera	Sekwencja startera	Wielkość produktu PCR
1	<i>IFT88_ex1_f</i> <i>IFT88_ex1_r</i>	GGCTGCCTTCTCTGACC GATGCGCCACACAGGAC	321 bp
2_3	<i>IFT88_ex2_3_f</i> <i>IFT88_ex2_3_r</i>	ATGTCCCAAGTCCAGTCAC GGACAGTCTACTTCAAGCTTTTCC	587 bp
4	<i>IFT88_ex4_f</i> <i>IFT88_ex4_r</i>	CTGGGCAACAGAGCAAGAC AATCCACAGTCTTCATAAACCAG	250 bp
5	<i>IFT88_ex5_f</i> <i>IFT88_ex5_r</i>	TTATAGAGGCTCTTGAGTACAAAC CAGGTGAAAATGGTTAATCTGG	237 bp
6	<i>IFT88_ex6_f</i> <i>IFT88_ex6_r</i>	CAGATCGTTCAAAGTCCCC GTCAACGAACACAGGGTTTAC	533 bp
7	<i>IFT88_ex7_f</i> <i>IFT88_ex7_r</i>	TGTTTATTTGCCGATAGAATGAAG TTTGGTAGTAAATCCAAGTCACAAG	219 bp
8	<i>IFT88_ex8_f</i> <i>IFT88_ex8_r</i>	AGGTGTGTGTAATGTGCAGAAC TCATCCTTTTCCTTTCTTAATGG	300 bp
9	<i>IFT88_ex9_f</i> <i>IFT88_ex9_r</i>	GCTTATGCGAGGTTTTATATTTTC GCCAAGATCGCATCACTG	291 bp
10	<i>IFT88_ex10_f</i> <i>IFT88_ex10_r</i>	CCTGGGCAACCAAGTAAGAC AAGACCAGTCAACGGCAAAC	325 bp
11	<i>IFT88_ex11_f</i> <i>IFT88_ex11_r</i>	CAGGGGTGTCTTGAGGAATC GACTCTGGAACCCATTAACCC	296 bp
12	<i>IFT88_ex12_f</i> <i>IFT88_ex12_r</i>	TGAAAGGGGCCTAAAGTGG TTTTAAGGAAGCATAAAATGAAGAGAC	243 bp
13	<i>IFT88_ex13_f</i> <i>IFT88_ex13_r</i>	AGACTTCATAACTGAGAAATGCTTC TCAACCCACTGAAAACAGGTC	313 bp
14	<i>IFT88_ex14_f</i> <i>IFT88_ex14_r</i>	TTGTGAATGGTTTGAATGCC CCAAGAAGTCATCTATTCTGGC	392 bp
15	<i>IFT88_ex15_f</i> <i>IFT88_ex15_r</i>	CTGCAGCCTGGGCAATAG AACAGAATGCACATTCACCC	323 bp
16	<i>IFT88_ex16_f</i> <i>IFT88_ex16_r</i>	GAAATGAACACCGTTGACCC TTCCTATCTTACCAGACCACTGTC	588 bp
17	<i>IFT88_ex17_f</i> <i>IFT88_ex17_r</i>	CTGTGTTGGAGCAAATCGAG AAAAGAAACGACAAACAGGC	442\ bp

18	<i>IFT88_ex18_f</i> <i>IFT88_ex18_r</i>	CTTTTCCCCGACCATAAGC GATCCTTGGGCAGAAATTTAG	227 bp
19	<i>IFT88_ex19_f</i> <i>IFT88_ex19_r</i>	GAATCAGACTATCAAGACCAAGATATG TTCCGTTAGAAGGAAGTCAACTC	459 bp
20	<i>IFT88_ex20_f</i> <i>IFT88_ex20_r</i>	AAAACCTGAGTTCATCTTCATTTTC GCCAGATTATCCTCATCACTTACTTC	378 bp
21	<i>IFT88_ex21_f</i> <i>IFT88_ex21_r</i>	TACTGCTGCATTCCATCTCC TTTAAAGCCTTGCTGCCTTC	389 bp
22	<i>IFT88_ex22_f</i> <i>IFT88_ex22_r</i>	CAAGAAGTAAATTATATGTTGCCATTG AACATCTGTTCTTGAATTTACTAGGTC	283 bp
23	<i>IFT88_ex23_f</i> <i>IFT88_ex23_r</i>	AAATATGACAAGCAATACTGAGGG AAACAGATATGCAACTGGATCAC	317 bp
24	<i>IFT88_ex24_f</i> <i>IFT88_ex24_r</i>	AAAACATGAAACCTTTCTATTAACC TCACAAATTATAGGTTGGTATTTACG	304 bp
25	<i>IFT88_ex25_f</i> <i>IFT88_ex25_r</i>	TCCCAAAGACTGAGTTCCTG TCACACATTTGAGCTATAGAAGGC	269 bp
26	<i>IFT88_ex26_f</i> <i>IFT88_ex26_r</i>	ATGATGGGTTAGTCCTAAGGG GCAAGATGTTTCCAGAAGCC	258 bp
27	<i>IFT88_ex27_f</i> <i>IFT88_ex27_r</i>	CAACCTGCTTGTTCCTGGC TTTTGGCCATCTCACCATTTC	283 bp
28	<i>IFT88_ex28_f</i> <i>IFT88_ex28_r</i>	TGGGAGACCATTTCTGTTTAC CCATGAAATCAATGTAGTGGC	623 bp

Sekwencje primerów wykorzystanych w reakcjach PCR dla genu *IFT139*

Ekson	Nazwa startera	Sekwencja startera	Wielkość produktu PCR
1	<i>IFT139_ex1_f</i> <i>IFT139_ex1_r</i>	GCTCCATTACAGCAGATCC GGGACCAGCAATTCAGAAAC	463 bp
2,3	<i>IFT139_ex2_3_f</i> <i>IFT139_ex2_3r</i>	GCTTCTTAGAGTATTTTCAGAGCACC TCAGACTGAATGACTTGGTAACTG	481 bp
4	<i>IFT139_ex4_f</i> <i>IFT139_ex4_r</i>	TTTTTGCCCTTGTTAATTATCTGACC CCATAAATGGGTTAAAATAAAGCTG	396 bp
5	<i>IFT139_ex5_f</i> <i>IFT139_ex5_r</i>	TTCCCAAGACACTAGGCTGG AGTGATTGCTCATTGTCCTACAC	474 bp
6	<i>IFT139_ex6_f</i> <i>IFT139_ex6_r</i>	AAAAGTGATAACTGCTCCTCACAG ATTTCTCGTTCCACACTG	414 bp
7	<i>IFT139_ex7_f</i> <i>IFT139_ex7_r</i>	GGCAAGCAAACCAACTTTTC GATTTGAGAAGCTGACCTCTTTG	351 bp
8	<i>IFT139_ex8_f</i> <i>IFT139_ex8_r</i>	GGGTAATGCTTTGTTAGTGTGTATG TCCCTGCTTCCACCTTTTC	267 bp
9	<i>IFT139_ex9_f</i> <i>IFT139_ex9_r</i>	GAATATAAACTCTTTCTTGATGCATTG AAACCACAAAATCCATGTGTTTC	478 bp
10	<i>IFT139_ex10_f</i> <i>IFT139_ex10_r</i>	AGAGTGCATCCCTGAATTGG TGCTTTACAGCCATTACAAAAC	250 bp
11	<i>IFT139_ex11_f</i> <i>IFT139_ex11_r</i>	GCACATTATATGCATTTGAAATCTAAG TTTTAAGATGCCGATATAGTCTAATG	391 bp
12	<i>IFT139_ex12_f</i> <i>IFT139_ex12_r</i>	GCTGAACAAGAGCCATTATTTG AATTCGCTTAAGCCACACAAG	565 bp
13	<i>IFT139_ex13_f</i> <i>IFT139_ex13_r</i>	TTCCCTCTCAGATCTCCATTTTC AATATGTAAGCTTTCAAGGAGGG	281 bp
14	<i>IFT139_ex14_f</i> <i>IFT139_ex14_r</i>	TTTGATGGATTGTAATTATGTGTTG CTGGGCAGCTTTTCATTTTC	378 bp

15	<i>IFT139_ex15_f</i> <i>IFT139_ex15_r</i>	TTCTGCGTTATGAGAAAATCTCC TTGTGAAGCAGTTGAAAGAAAG	417 bp
16	<i>IFT139_ex16_f</i> <i>IFT139_ex16_r</i>	GGCTACTGGCTAACTAAAATAAGGG ACTGTGATGGCTGGATCTTC	300 bp
17	<i>IFT139_ex17_f</i> <i>IFT139_ex17_r</i>	CCTGTGCTTTAATATATGCCAAGTC TGAAGCTTCTCGAGGACAGG	312 bp
18	<i>IFT139_ex18_f</i> <i>IFT139_ex18_r</i>	CCTGGGTGATGGAGTGAGAC AACAAGGCAAATGGAATTCATAG	780 bp
19	<i>IFT139_ex19_f</i> <i>IFT139_ex19_r</i>	CAACTGATTGAGAAAATTTAACCG GCCAAAAGAGATTGCTTTCC	340 bp
20	<i>IFT139_ex20_f</i> <i>IFT139_ex20_r</i>	TGCTGTGTGTGAGTTACGGAG TGCACCCTGCCTACATCTTC	371 bp
21	<i>IFT139_ex21_f</i> <i>IFT139_ex21_r</i>	CCCACGTATTTTCCTCATTG GAGCCATGCCTCATCATC	277 bp
22	<i>IFT139_ex22_f</i> <i>IFT139_ex22_r</i>	TGCTAAATCTTGATTGGAAGAAC AAGGAGAAAAGGGAGGGGTG	212 bp
23	<i>IFT139_ex23_f</i> <i>IFT139_ex23_r</i>	ACCAGCCTAGCCCAAACCTG GGCATCATTTGTTCTCCAG	578 bp
24	<i>IFT139_ex24_f</i> <i>IFT139_ex24_r</i>	CAGTATTGTAAGGACTGTATCTTTGG AACTATTCTCTGAAACAGGCAATG	544 bp
25	<i>IFT139_ex25_f</i> <i>IFT139_ex25_r</i>	GAGTGCCCAGAGCTTTTGTG GGGGACATTGTGTATGCC	446 bp
26	<i>IFT139_ex26_f</i> <i>IFT139_ex26_r</i>	TAGCTTGAGGGTACTTGATGTG TGCTTGTTCCTGATTGTGG	546 bp
27	<i>IFT139_ex27_f</i> <i>IFT139_ex27_r</i>	TGCAGATATGTGATGGAGACTTG GGACAAGTTTGAACCTCAGG	526 bp
28	<i>IFT139_ex28_f</i> <i>IFT139_ex28_r</i>	TGGGATGGCAGCTTTCTAAC CCACCTCTTAATCCTACTCCTTTC	642 bp
29	<i>IFT139_ex29_f</i> <i>IFT139_ex29_r</i>	GCTGTATAAAAGTCACTCTCTAAGGG TGACAGCAGCAACCTCTGC	579 bp

Sekwencje primerów wykorzystanych w reakcjach PCR dla genu *DYNC2H1*

Ekson	Nazwa startera	Sekwencja startera	Wielkość produktu PCR
1	<i>DYNC2H1_ex1_f</i> <i>DYNC2H1_ex1_r</i>	CAAAGCTCCTCTCTCCCTTCACTTC TCCTGAAAAGGATCTGGTTGGTAAAG	395 bp
2	<i>DYNC2H1_ex2_f</i> <i>DYNC2H1_ex2_r</i>	AAGGAAAGAAGAGATAAATTGGTTTT TGCATTTTATACCTTTCTCCAATTTTC	524 bp
3	<i>DYNC2H1_ex3_f</i> <i>DYNC2H1_ex3_r</i>	TGTTTTGGGAAGCCAATTTGATTAG CCTATGCTCAGAGAAATCCAAAAG	326 bp
4	<i>DYNC2H1_ex4_f</i> <i>DYNC2H1_ex4_r</i>	TGACTCAAATATTTTGTCTCTCTGC AGGCTGTAAAAATTGAATCCCAAAG	281 bp
5	<i>DYNC2H1_ex5_f</i> <i>DYNC2H1_ex5_r</i>	GGCAAATATTAGAGTTGTGGCAGTTG TGCTACATGATTTGCTTTAAGAGTTAC	381 bp
6	<i>DYNC2H1_ex6_f</i> <i>DYNC2H1_ex6_r</i>	CATGCATGTGGTATTTTCATAGATCC TCTCACAAAATAATTTCCAGCAGATG	487 bp
7,8	<i>DYNC2H1_ex7_8_f</i> <i>DYNC2H1_ex7_8_r</i>	TGGACTAGAGTTTCAGTTTTATTGG ATCCCAACGGATCAACTCAG	596 bp
9	<i>DYNC2H1_ex9_f</i> <i>DYNC2H1_ex9_r</i>	TCAGAAATCAAGACAGTCCACAGC TCAGCATGAAAATGTCAGAAAAATG	377 bp
10	<i>DYNC2H1_ex10_f</i> <i>DYNC2H1_ex10_r</i>	TGACATAGTGCTTGGTACGTGGAAG GACAGACATGCCAAGGAAAACAGAG	326 bp

11	DYNC2H1_ex11_f DYNC2H1_ex11_r	GAATCACAGATCAGAGAAGGGGACTC GGAGGAGTAGCAAGTTTGAGAAAGG	374 bp
12	DYNC2H1_ex12_f DYNC2H1_ex12_r	TTGGATATTGCAGTTTGTTC CACAGCTGGCAGTGCTATTC	517 bp
13	DYNC2H1_ex13_f DYNC2H1_ex13_r	ACTTGGCAAATTGTAGGAACTC CCTGGAAGCAAACAAAATCTA	419 bp
14	DYNC2H1_ex14_f DYNC2H1_ex14_r	GCAGGTCAGAGTTGGGGATAGTTG GCAAATGGGAATTGTGATTTCTCTG	399 bp
15	DYNC2H1_ex15_f DYNC2H1_ex15_r	GGTGGTATCTGTCAGGTTTCTCCAC TGTA AATTGATTGTTTCATATGTGGTC	366 bp
16,17	DYNC2H1_ex16_17_f DYNC2H1_ex16_17_r	TTAAATGAAAAATCCATTCTACTGC TCTACGAATCCAGCTCTCTGCTTTG	657 bp
18	DYNC2H1_ex18_f DYNC2H1_ex18_r	TTTCTGTTTATTCTTTAGGCTGTGC CAAGAAGCTGATGTGACTTCAATGC	400 bp
19	DYNC2H1_ex19_f DYNC2H1_ex19_r	TGTGCTTAAAGATCACCATATTACTGC AATGATTGAATATGGACTTTTCCTG	400 bp
20	DYNC2H1_ex20_f DYNC2H1_ex20_r	TGTA CTGATTACTTCTACCACCCCTTG TTACCTAATTTAAACATTTTCCATGC	296 bp
21	DYNC2H1_ex21_f DYNC2H1_ex21_r	AACAACTGTTTAAATGCAAAAATC AAACCTGGGCTATAAAGGAATAAAAG	373 bp
22	DYNC2H1_ex22_f DYNC2H1_ex22_r	GAAAGAAAAGTATGAACCCAAAATG AAAAAGTGATGAAGTTTATGAGGAAAG	395 bp
23,24	DYNC2H1_ex23_24_f DYNC2H1_ex23_24_r	CACACATAACAAGGATTGCAGTTAAG CATAAGATGAAAGCTCCAAACATTG	514 bp
25	DYNC2H1_ex25_f DYNC2H1_ex25_r	TGTGTGCCATGGCAACATTTAATC TTACTTTTTGATGAAAGCTGATTCC	493 bp
26	DYNC2H1_ex26_f DYNC2H1_ex26_r	TTTTGCCTTATGGTGAAAAGC GTAATTTGCCTGTATTAAGCACTTC	587 bp
27,28	DYNC2H1_ex27_28_f DYNC2H1_ex27_28_r	TGTTACCTTTAGTTCATTTAAGCAG TGGGTACAGGAAGTATTTGG	587 bp
29	DYNC2H1_ex29_f DYNC2H1_ex29_r	TTTCCCTCAATAGGACATTTAACAC AACCAACTTTACCCTCTAAATTGAC	384 bp
30	DYNC2H1_ex30_f DYNC2H1_ex30_r	CCCCGTCTTGAAATAACAGTATAGAG TTATCTGAGCCTCCTGGCTTCTAGG	320 bp
31	DYNC2H1_ex31_f DYNC2H1_ex31_r	GGTTCCAGTATGACATTAAGATGGAG TTCCTCGAGTAATCACCACACAG	400 bp
32	DYNC2H1_ex32_f DYNC2H1_ex32_r	CCATTTAAATTCATGGAGAAATCAC TTCTTATGTGACACCTTTCTAATTCTG	471 bp
33	DYNC2H1_ex33_f DYNC2H1_ex33_r	TTTAACCTGTTTGTGCATTTTTATC ACAACCTCTGTCCATTTTACATTTT	451 bp
34	DYNC2H1_ex34_f DYNC2H1_ex34_r	TTGAAATCAACCTGGGTTTTGAAAG CAGATTAGAAACACGGATGTCAGGAG	470 bp
35	DYNC2H1_ex35_f DYNC2H1_ex35_r	TGTTGGCAGCATATTTTATGTTTATAG ATGTGCATGCTAAAGCCTTTCATAG	500 bp
36	DYNC2H1_ex36_f DYNC2H1_ex36_r	ATGATTATTTTGTGTGGTTGCTTCC AATTGGGGCAGGGTATACAGTAATC	400 bp
37	DYNC2H1_ex37_f DYNC2H1_ex37_r	AGTAAGCTTGCCAATTCATGTGATG GAAGACTTCCCTGAGCAAGTGAG	491 bp
38	DYNC2H1_ex38_f DYNC2H1_ex38_r	GGCAATACCTTCCACTGAAGAAATC TGTCATGTAGAAGTCTTGACAAAG	492 bp
39	DYNC2H1_ex39_f DYNC2H1_ex39_r	GATTGCGCATGGGTTCTTCAG TTTTACTTAATATGAAACCAGGACAG	414 bp

40	DYNC2H1_ex40_f DYNC2H1_ex40_r	TGTGCGTAGAATAATGTTTATTGGAG AGCAGTGACAAAATCCACCTCTCAC	359 bp
41	DYNC2H1_ex41_f DYNC2H1_ex41_r	TGAGTTTTAAAAATGGTTCTTGAAAAGG CAAATCATTGTGTTTTGGCAGTTAAG	347 bp
42	DYNC2H1_ex42_f DYNC2H1_ex42_r	TTGGAAC TAAGATGATTTACTTTTGG ACAAAAGCCATTAATCAATTAGGG	438 bp
43	DYNC2H1_ex43_f DYNC2H1_ex43_r	GAGTATAAAATGATTTTTGTTGGTTGC CCAAATGAAGAATGAATATTTTCTAAG	400 bp
44	DYNC2H1_ex44_f DYNC2H1_ex44_r	TGAAACTTAGGCCAAAAATATCCTTTATC ATTGCCTATATTTTGAGAAGGGTAGG	394 bp
45	DYNC2H1_ex45_f DYNC2H1_ex45_r	TAGAGCAGCACAGTTTCAAACCAC AACAGGAAAGTAAAGCCTGGGTGTC	354 bp
46	DYNC2H1_ex46_f DYNC2H1_ex46_r	CAGTTCATCTACAGGTAGAAATTGG TGACAATCATAACAGTTTGAAGAAG	394 bp
47	DYNC2H1_ex47_f DYNC2H1_ex47_r	TTCCTTTCTCCATTTATCTGATGC GACCTATAAAATCATGCTCTGGGTAAG	383 bp
48	DYNC2H1_ex48_f DYNC2H1_ex48_r	TTCTGGAGATGATCTTATTTGGATT AAGATAAGAACCAGCTTTGCCTATT	374 bp
49	DYNC2H1_ex49_f DYNC2H1_ex49_r	GCCAATATATTTATCCAGGATTACC AAACCAAATAAAGCAAAGAGAGTG	464 bp
50	DYNC2H1_ex50_f DYNC2H1_ex50_r	CCAAATTATGTGGCTAAAGTTTGAT AAAAATGGAGTCTCTCAATTCTCCT	444 bp
51	DYNC2H1_ex51_f DYNC2H1_ex51_r	GGTGTGTTGAATTTTATCAAATGAGG GGTGTTACTTTCTAAAAGCTCCAGA	424 bp
52	DYNC2H1_ex52_f DYNC2H1_ex52_r	ATTGTGCTCGTTTTAAGAAACAAC GAAGAAAACAGACATTTCCAAACAT	405 bp
53	DYNC2H1_ex53_f DYNC2H1_ex53_r	TGTCTCTTAGTCTGGAATGAATCCT TTTGCATCAGAAGAAATCTAATTTTG	356 bp
54	DYNC2H1_ex54_f DYNC2H1_ex54_r	GGAGCTGTGAATAGTTGTCTAGGAA AAACCTACAGGGCAATATAGGTAGG	501 bp
55	DYNC2H1_ex55_f DYNC2H1_ex55_r	CACACTTAACATGTTTGCTTGATTC AATATAGGAAAATACCATGCCCTTC	418 bp
56	DYNC2H1_ex56_f DYNC2H1_ex56_r	TGGAAACTCTTGTGCATAGATTCA GGCTTTCTTCTTGTCTCTTTTAC	418 bp
57	DYNC2H1_ex57_f DYNC2H1_ex57_r	ACCTTGTATGATTGAAAGCATTGTTG ATGAAGTGCATTTTGAAAAACAATA	418 bp
58	DYNC2H1_ex58_f DYNC2H1_ex58_r	TGGATTAAGTATTGCATACACCA TAATGCTTCCCAAGTGAATTCCTA	376 bp
59	DYNC2H1_ex59_f DYNC2H1_ex59_r	TGCCCAAATAAAGTGTGTTAGA TGAGTTGGTTCTCTCTCCT	410 bp
60	DYNC2H1_ex60_f DYNC2H1_ex60_r	CTTCTAATTTTAGCGTTGCTTTTCA CACAGCATCATCTGACATAAGAGTC	371 bp
61	DYNC2H1_ex61_f DYNC2H1_ex61_r	GTGTGTGGGTTTGTCTCTTCTAT GCAAATTAATGGATCTTTCTCTCCT	393 bp
62	DYNC2H1_ex62_f DYNC2H1_ex62_r	CAGCAGAGTCTGAGATCTTTTGTGAT GGTATCCTTGAACCCATATAAAAT	457 bp
63	DYNC2H1_ex63_f DYNC2H1_ex63_r	GAAGAATGGGTTTCAAGTAAGGACT CTAAGTGAATCATTGATGGGTTTTTC	388 bp
64	DYNC2H1_ex64_f DYNC2H1_ex64_r	TCTGGAGACGTAAAATAAGATGACA TGTAATACTCGAAGCACAATGATGT	318 bp
65	DYNC2H1_ex65_f DYNC2H1_ex65_r	CATGGTTGTATTTTGTGTTCTCCA CAGTAGGACCCAGTGTGAATCTAT	346 bp

66	<i>DYNC2H1_ex66_f</i> <i>DYNC2H1_ex66_r</i>	TCTGAACATAAGCAGAGTAGGGTTC ACACATATTGCTGAAGGAAGTAAGC	438 bp
67	<i>DYNC2H1_ex67_f</i> <i>DYNC2H1_ex67_r</i>	TATCTCAGGTAACCCAACCTTTTGC ATAAAGCTCGAAAAGATTCCAAGG	354 bp
68	<i>DYNC2H1_ex68_f</i> <i>DYNC2H1_ex68_r</i>	TCATCAGATGTAATTGTTGAAGGTG ACATAGCTCCCCTTCTTGTTAGAAT	453 bp
69	<i>DYNC2H1_ex69_f</i> <i>DYNC2H1_ex69_r</i>	AAGTTGCCATAAACATCAAATGAAT AACTAGAATCAAACCCAATGTTCTG	390 bp
70	<i>DYNC2H1_ex70_f</i> <i>DYNC2H1_ex70_r</i>	CATCATCTTCATTTGTTTTATGTGC TTACATGTGGTCTTTTGGACATAA	420 bp
71	<i>DYNC2H1_ex71_f</i> <i>DYNC2H1_ex71_r</i>	TAGTCCCTTGAATTTGATGGTTAAA AATGCTATAAGGCATTCCAGTTAAA	377 bp
72	<i>DYNC2H1_ex72_f</i> <i>DYNC2H1_ex72_r</i>	TTAACGACTATGCTTTTCCAAAGAC CACAGGGAAGTAGAACTAGGAATCA	306 bp
73	<i>DYNC2H1_ex73_f</i> <i>DYNC2H1_ex73_r</i>	GAAGAAGTGGAAGATGGAAATGAG GAACACCTCTGAAGCAAATTATACC	274 bp
74	<i>DYNC2H1_ex74_f</i> <i>DYNC2H1_ex74_r</i>	AGAATTTTACCATGGTGACTTGTA AACACTGATTACGAATAAGGAGCAC	329 bp
75	<i>DYNC2H1_ex75_f</i> <i>DYNC2H1_ex75_r</i>	ACAAGGCAACACAAAGTAGAAGAGT ATTTAATTGTCAATAAGGTGGCAAA	425 bp
76	<i>DYNC2H1_ex76_f</i> <i>DYNC2H1_ex76_r</i>	CCTATTGTGACAGTTTAAAGCACAG GCCGAGAATTATTTTTCTAAACAG	399 bp
77	<i>DYNC2H1_ex77_f</i> <i>DYNC2H1_ex77_r</i>	TGAGATTACAACCTCACCTGGGTATT CCATGGAAAATAACATATCCACAGT	434 bp
78	<i>DYNC2H1_ex78_f</i> <i>DYNC2H1_ex78_r</i>	GCCAGTTAGGAAGGTTTAGGG TCTTCTAAGCTTCCCTGTCAATC	493 bp
79	<i>DYNC2H1_ex79_f</i> <i>DYNC2H1_ex79_r</i>	CCAGAGCATTAAAGAAATACATCAGAA TGTA AAAAGAGTTGTGTGTTCTGT	350 bp
80	<i>DYNC2H1_ex80_f</i> <i>DYNC2H1_ex80_r</i>	ATTTAACTCAAACCCGGTAAGC CTCCCACAGTACTGGGATTACA	390 bp
81	<i>DYNC2H1_ex81_f</i> <i>DYNC2H1_ex81_r</i>	TACTTTTTCATGCTATGGCCAGTTA CAAGCAAATTTTGTGATAGGAAGTT	387 bp
82	<i>DYNC2H1_ex82_f</i> <i>DYNC2H1_ex82_r</i>	AAATATAACTCAAGGCAGGAATTTAG GCCTCACTAAAGTTGAAAGAATCAA	447 bp
83	<i>DYNC2H1_ex83_f</i> <i>DYNC2H1_ex83_r</i>	TTAATGACAGAATACTTCCCACAGA TAAATAAAGCTTGTGGGGTCTACAG	385 bp
84	<i>DYNC2H1_ex84_f</i> <i>DYNC2H1_ex84_r</i>	TGTTTTTGTACCTATGTTCTTTCTTCC AGAAATGGGGAGCACATGG	267 bp
85	<i>DYNC2H1_ex85_f</i> <i>DYNC2H1_ex85_r</i>	GCTGACTTAATACATTTGACCGTTT TTGGATTCTTCAGTTACATCAGTCA	527 bp
86	<i>DYNC2H1_ex86_f</i> <i>DYNC2H1_ex86_r</i>	TCATGCTGTCTCTACTGTTCAATTT CAAAAATAACAATGGCAGAATAATG	401 bp
87	<i>DYNC2H1_ex87_f</i> <i>DYNC2H1_ex87_r</i>	TTCTAGCTACCATTTTCCAGAGCATTT AATCAAGGGCAGTGTAAATAGGAAGT	315 bp
88	<i>DYNC2H1_ex88_f</i> <i>DYNC2H1_ex88_r</i>	GCTTTGAAAATTTAGTGTGAACCTCTG GTTGTTTTCATGCCAAATCTTATTTT	419 bp
89	<i>DYNC2H1_ex89_f</i> <i>DYNC2H1_ex89_r</i>	TGGAAAGCATAGCTCTTAAGGTAGA GGTGAGATTAGAAAGCAAACAAAAA	321 bp
90	<i>DYNC2H1_ex90_f</i> <i>DYNC2H1_ex90_r</i>	ATAGGCCATGTGTTTCATTTTGT AAATGTAGACTGACCACATGTTTGA	409 bp

16.3. Załącznik 3

Polimorfizmy SNP zidentyfikowane w genie *IFT88*.

Pacjent		5	6	7	8	9	10	11	12	13
Gen	SNP									
<i>IFT88</i>	Homo SNP	rs1329519 rs9509307	rs1329519 rs9509307	rs1329519 rs9509307 rs2987988 rs9552244	rs1329519 rs2987988	-	rs1329519 rs9509307 rs59556709	rs1329519 rs9509307	rs59556709	-
	Hetero SNP	-	-	-	-	-	rs9552244	-	rs1329519 rs2442455	-

Polimorfizmy SNP zidentyfikowane w genie *THM1*.

Pacjent		5	6	7	8	9	10	11	12	13
Gen	SNP									
<i>THM1</i>	Homo SNP	rs6716946 rs71892567 rs10930190 rs7592429 rs1560597 rs1347041	rs6716946 rs71892567 rs10930190 rs7592429 rs1432273 rs1560597	rs6716946 rs71892567 rs10930190 rs7592429 rs1432273 rs1560597	rs6716946 rs10930190 rs7592429	rs6716946 rs71892567 rs10930190 rs7592429	rs6716946 rs71892567 rs10930190 rs7592429 rs1432273 rs2163648	rs6716946 rs71892567 rs10930190 rs7592429 rs1347041	rs10930190 rs7592429 rs1560597	rs6716946 rs10930190 rs7592429 rs1432273 rs1560597 rs1347041
	Hetero SNP	rs6750044 rs10176588	rs34701755	-	rs6750044 rs10176588	rs6750044	-	rs6750044 rs10176588 rs62177816	rs6750044 rs10176588	rs34701755

Homozygotyczne polimorfizmy SNP zidentyfikowane w genie *DYNC2H1*.

Pacjent		5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Gen	SNP										
<i>DYNC2H1</i>	Homo SNP	rs2514006	rs2514006						rs2514006	rs2514006	
		rs688094	rs688094								
		rs688906	rs688906				rs688906			rs688906	rs688906
		rs585692	rs585692				rs585692	rs585692	rs585692	rs585692	rs585692
		rs658804	rs658804				rs658804			rs658804	
		rs586592	rs586592				rs586592			rs586592	
		rs589623	rs589623				rs589623			rs589623	rs589623
		rs670464	rs670464				rs670464	rs670464	rs670464	rs670464	rs670464
		rs2566913	rs2566913				rs670464			rs2566913	
						rs2566913 rs2671333 rs313407	rs10895417 rs501413		rs10895391 rs10895417		
										rs657936 rs654061	

Heterozygotyczne polimorfizmy SNP zidentyfikowane w genie *DYNC2H1*.

Pacjent		5	6	7	8	9	10	11	12	13
Gen	SNP									
<i>DYNC2H1</i>	Hetero SNP	-	-	rs688906 rs2245404	rs688906 rs2245404 rs17301028 rs658804		rs688906 rs17301750 rs658804	rs688906 rs2245404 rs17301750 rs658804	-	
				rs658804 rs589623	rs650238	rs650238	rs688094	rs688094 rs650238 rs12576037		
				rs650238	rs650238		rs12576037	rs12576037		
				rs633970 rs4754906	rs4754906			rs4754906		rs11225578 rs586592
						rs2566913	rs11225578 rs586592 rs17394217 rs11225634	rs586592 rs17394217 rs11225634 rs2566913 rs648387		
						rs2245404				
							rs6189976 rs12574626			rs11225584 rs586592

17. CURRICULUM VITAE**Dane osobowe**

Imię i nazwisko: Joanna Walczak-Sztulpa
 Adres zamieszkania: Wargowo 82n, 64-605 Wargowo
 Data urodzenia: 1981-07-23
 Miejsce urodzenia: Poznań, Polska
 Stan cywilny: mężatka
 e-mail: jsztulpa@umed.poznan.pl

Edukacja

2008- Studium doktoranckie - Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra i Zakład Genetyki Medycznej. Temat pracy doktorskiej: "Identyfikacja molekularnego podłoża zespołu Sensenbrenner (Cranioectodermal dysplasia)".

2005-2010 Instytut Genetyki Molekularnej im. Maxa Plancka, Departament Genetyki Molekularnej Człowieka, Berlin, Niemcy.

2004-2005 Praca magisterska - Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra i Zakład Genetyki Medycznej. Tytuł pracy: "Analiza genu ARX w grupie mężczyzn z zespołową i niespecyficzną formą niepełnosprawności intelektualnej".

2000-2005 Uniwersytet Przyrodniczy im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, kierunek: biotechnologia; specjalizacja: diagnostyka molekularna

1996-2000 IX Liceum Ogólnokształcące im. Karola Libelta w Poznaniu.

Sympozja, konferencje, szkolenia

11/2011 Sympozjum naukowe „Genetyczne zaburzenia funkcji rzęsek oddechowych”, Warszawa, Polska. „Zespół Sensenbrenner – ciliopatia spowodowana mutacjami w genie IFT122” - wystąpienie ustne.

09/2011-03/2012 Gilupi GmbH, Golm, Niemcy

11/2010 Sympozjum Polskiego Towarzystwa Neonatologicznego Poznań - Kiekrz.

09/2010 III Polski Kongres Genetyki, Lublin.

06/2010 Konferencja - The European Society of Human Genetics, Gothenburg, Szwecja - przyznane wystąpienie ustne: "*Cranioectodermal dysplasia is a ciliary disorder caused by defects in the IFT122 gene*".

03/2010 Konferencja - The German Society of Human Genetics, Hamburg, Niemcy - wystąpienie ustne "*Cranioectodermal dysplasia is a ciliary disorder caused by mutations in the IFT122 gene*".

01/2010 Spotkanie - The Scientific Advisory Board, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Niemcy.

10/2009 Cartagena Bench Training session for the CHERISH Consortium, Leuven, Belgia.

02/2009	Day of Science Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Niemcy.
03/2008	Day of Science Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Niemcy.
09/2007	II Polski Kongeres Genetyki, Warszawa – prezentacja plakatowa.
08/2007	Warsztaty naukowe: Molecular Interactions, Berlin, Niemcy.
06/2007	Konerencja - The European Society of Human Genetics, Nicea, Francja - prezentacja plakatowa.
03/2007	Konferencja - The German Society of Human Genetics, Bonn, Niemcy - prezentacja plakatowa.
03/2007	Day of Science Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Niemcy.
03/2006	Day of Science Max Planck Institute for Molecular Genetics Berlin, Niemcy.
10/2006	Spotkanie - The Scientific Advisory Board, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Niemcy.
2002 – 2005	Praktyka - Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra i Zakład Genetyki Medycznej.

18. SPIS PUBLIKACJI

1. **Walczak-Sztulpa J**, Eggenschwiler J, Osborn D, Brown D, Emma F, Klingenberg C, Hennekam RC, Torre G, Garshasbi M, Tzschach A, Szczepanska M, Krawczynski M, Zachwieja J, Zwolinska D, Beales PL, Ropers HH, Latos-Bielenska A and Kuss AW. The American Journal of Human Genetics 2010, June 11: 86(6). *Cranioectodermal Dysplasia, Sensenbrenner Syndrome, Is a Ciliopathy Caused by Mutations in the IFT122 Gene.* **IF: 11.68 KBN/MNiI: 32.000**
2. **Walczak-Sztulpa J**, Wisniewska M, Latos-Bielenska A, Linné M, Kelbova C, Belitz B, Pfeiffer L, Kalscheuer V, Erdogan F, Kuss AW, Ropers HH, Ullmann R, Tzschach A. The American Journal of Medical Genetics A. 2008 Feb 1;146(3):337-42. *Chromosome deletions in 13q33-34: Report of four patients and review of the literature.* **IF: 2.555, KBN/MNiI: 20.000**