



Anna Sowińska-Seidler

Identyfikacja podłoża molekularnego rozszczepu dłoni i/lub stóp w populacji polskiej

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Anna Latos-Bieleńska

Opiekun naukowy:

Dr med. Aleksander Jamsheer

Miejsce realizacji:

Katedra i Zakład Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Praca finansowana z projektu badawczego NCN nr UMO-2011-03-D-NZ2-06136 oraz z projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Poznań 2014

Składam podziękowania
Pani Profesor Annie Latos-Bieleńskiej
za umożliwienie realizacji niniejszej pracy
oraz za cenne uwagi w trakcie jej przygotowywania.

Panu Doktorowi Aleksandrowi Jamsheerowi
dziękuję
za opiekę naukową, poświęcony czas
oraz pomoc w trakcie realizacji pracy.

Dziękuję pracownikom Katedry i Zakładu Genetyki Medycznej
oraz Centrum Genetyki Medycznej GENESIS w Poznaniu
za pomoc, wsparcie i miłą atmosferę pracy.

WYKAZ SKRÓTÓW

aCGH	porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy	(ang. <i>array based Comparative Genomic Hybridization</i>)
ADULT	zespół ADULT	ang. <i>Acro-Dermato-Ungual-Lacrima-Tooth syndrome</i>
AER	szczytowy grzebień ektodermalny	ang. <i>apical ectodermal ridge</i>
BD	brachydaktylia	ang. <i>brachydactyly</i>
bp	pary zasad	ang. <i>base pair</i>
CNV	wariant liczby kopii	ang. <i>copy number variant</i>
Cy3	cyjanina 3	
Cy5	cyjanina 5	
ddNTPs	trifosforany dideoksynukleotydów	ang. <i>dideoxynucleotide triphosphates</i>
DGV	baza danych	ang. <i>Database of Genomic Variants</i>
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy	ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	trifosforan deoksyrybonukleotydu	ang. <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EEC	ektrodaktylia-dyplazja ektodermalna-rozszczep wargi/podniebienia	ang. <i>Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia-Cleft lip/palate</i>
EEM	ektrodaktylia-dysplazja ektodermalna-zwyrodnienie plamki	ang. <i>Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia-Macular dystrophy syndrome</i>
EVS	baza danych	ang. <i>Exome Variant Server</i>
ExoI	Eksonukleaza I	
FFU	zespół kość udowa-strzałka-kość łokciowa	ang. <i>Femur-Fibula-Ulna syndrome</i>
GCAD	baza danych	ang. <i>Genoglyphix Chromosome Aberration Database</i>
GnRH	gonadoliberyna	ang. <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
HGMD	baza danych	ang. <i>Human Gene Mutation Database</i>
HS	siarczan heparanu	ang. <i>heparine sulfate</i>
kb	tysiąc par zasad	ang. <i>kilo base pairs</i>
kDa	tysiąc Daltonów	
KS	zespół Kallmanna	ang. <i>Kallmann Syndrome</i>
LMS	zespół kończynowo-sutkowy	ang. <i>Limb-Mammary Syndrome</i>

Mb	milion par zasad	ang. <i>mega base pairs</i>
MGI	baza danych	ang. <i>Mouse Genome Informatics</i>
MLPA	multipleksowa amplifikacja zależna od ligacji sond	ang. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NMD	zjawisko polegające na rozpoznawaniu i niszczeniu mRNA zawierających przedwczesny kodon STOP	ang. <i>nonsense-mediated decay</i>
OLHS	grupa wad wrodzonych charakteryzujących się malformacjami języka, żuchwy, szczęki oraz kończyn	ang. <i>Oromandibular-Limb-Hypogenesis Syndromes</i>
OMIM	baza danych	ang. <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OUN	ośrodkowy układ nerwowy	
PAP	polidaktylia pozaosiowa	ang. <i>postaxial polydactyly</i>
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy	ang. <i>polymerase chain reaction</i>
pH	ujemny logarytm ze stężenia jonów wodorowych	
PPD	polidaktylia przedosiowa	ang. <i>preaxial polydactyly</i>
PRWWR	polski rejestr wrodzonych wad rozwojowych	
PZ	strefa wzrastania	ang. <i>progress zone</i>
qPCR	ilościowa PCR	ang. <i>quantitative PCR</i>
RNA	kwas rybonukleinowy	ang. <i>ribonucleic acid</i>
rpm	obroty na minutę	ang. <i>revolutions per minute</i>
RTG	rentgenografia	
SAP	fosfataza alkaliczna pochodząca z krewetek	ang. <i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SD	syndaktylia	ang. <i>syndactyly</i>
SHFLD	rozszerzenie rąk i/lub stóp ze skróceniem kości długich	ang. <i>Split Hand-Foot with Long Bone Deficiency</i>
SHFM	rozszerzenie rąk i/lub stóp	ang. <i>Split Hand-Foot Malformation</i>
SIFT	program internetowy	ang. <i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu	ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>
SYM1	symfalangizm proksymalny	
WES	sekwencjonowanie eksomu	ang. <i>Whole Exome Sequencing</i>
ZPA	strefa aktywności polaryzacyjnej	ang. <i>zone of polarizing activity</i>

Spis treści

1. WSTĘP	7
1.1 Wrodzone wady rozwojowe	7
1.2. Klasyfikacja wrodzonych wad kończyn	8
1.3. Rozszczep rąk i/lub stóp (SHFM ang. <i>Split Hand/Foot Malformation</i>) – informacje ogólne.....	10
1.4. Etiopatogeneza rozszczepów rąk i/lub stóp	12
1.4.1. Znane <i>loci</i> SHFM.....	15
1.5. Zespoły wad wrodzonych z typowym rozszczepem rąk i/lub stóp	20
1.6. Zespoły wad wrodzonych z atypowym rozszczepem rąk i/lub stóp.....	22
1.7. Diagnostyka i poradnictwo genetyczne w SHFM	23
2. CELE PRACY	27
3. PACJENCI I METODY	28
3.1. Pacjenci – rekrutacja oraz kryteria włączenia do badań	28
3.2. Diagnostyka kliniczna.....	29
3.3. Materiał do badań	30
3.3.1. Izolacja genomowego DNA.....	30
3.3.2. Ocena ilościowa i jakościowa wyizolowanego DNA.....	31
3.4. Metody badawcze	32
3.4.1. Sekwencjonowanie metodą Sangera oraz sposób analizy wyników	34
3.4.3. Badania ilościowej PCR (qPCR ang. <i>quantitative PCR</i>).....	43
3.4.4. Badanie techniką porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydo- wej (aCGH ang. <i>array based Comparative Genomic Hybridization</i>)	47
3.4.5. Sekwencjonowanie eksomu (WES ang. <i>Whole Exome Sequencing</i>)	52
4. WYNIKI	57
4.1. Rutynowa diagnostyka genetyczna.....	57
4.2. Sekwencjonowanie genów <i>WNT10B</i> oraz <i>DLX5</i>	60
4.3. Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy oligonukleotydo- wej (aCGH).....	62
4.4. Sekwencjonowanie genów kandydujących	72
4.5. Sekwencjonowanie eksomu (WES ang. <i>Whole Exome Sequencing</i>).....	74
5. DYSKUSJA	81
5.1. Rutynowa diagnostyka genetyczna.....	81

5.2. Sekwencjonowanie genów <i>WNT10B</i> i <i>DLX5</i>	84
5.3. Badania techniką porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).....	86
5.4. Sekwencjonowanie genów kandydujących	94
5.5. Sekwencjonowanie eksomu	96
5.6. Podsumowanie	101
6. WNIOSKI	102
7. STRESZCZENIE	104
8. SUMMARY	106
9. SPIS TABEL	107
10. SPIS RYCIN	108
11. ZAŁĄCZNIK - Zgoda komisji bioetycznej na przeprowadzenie badań	111
12. PIŚMIENNICTWO	114
13. <i>CURRICULUM VITAE</i>	121
14. SPIS PUBLIKACJI.....	124

1. WSTĘP

1.1 Wrodzone wady rozwojowe

Wrodzona wada rozwojowa definiowana jest jako wewnętrzna lub zewnętrzna nieprawidłowość morfologiczna powstająca w okresie prenatalnym i obecna przy urodzeniu [Latos-Bieleńska i wsp., 2002]. Wady rozwojowe stanowią częstą przyczynę zgonów niemowląt oraz najczęstszą przyczynę niepełnosprawności fizycznej u dzieci, są więc istotnym problemem medycznym i społecznym [Latos-Bieleńska i wsp., 2002]. Zgodnie z podstawową klasyfikacją wrodzonych wad rozwojowych wyróżnia się **wady izolowane**, a więc takie, w których dana anomalia jest jedyną manifestacją czynnika patogennego oraz **wady mnogie**, charakteryzujące się współwystępowaniem kilku anomalii jednocześnie. Ponadto ze względu na stopień ciężkości wyróżnia się wady duże, czyli upośledzające czynność organizmu oraz wady małe, o nieznaczących następstwach klinicznych. Pojedyncza drobna anomalia rozwojowa występuje u ok. 14% noworodków, z dużą wadą rodzi się ok 3% żywo urodzonych noworodków, z mnogimi wadami 0,7% [Tobias i wsp., 2011].

Etiologia wrodzonych wad rozwojowych jest najczęściej wieloczynnikowa. W najbardziej ogólnym podziale, spośród czynników patogennych, wyróżnia się genetyczne (endogenne) oraz środowiskowe (egzogenne). Przyczynę genetyczną może stanowić aberracja chromosomowa, submikroskopowe zmiany genomowe, mutacja jednogenowa, a także mutacje w kilku genach lub regionach. Do grupy czynników środowiskowych o działaniu teratogennym na płód zalicza się infekcje, czynniki chemiczne, promieniowanie rentgenowskie oraz czynniki mechaniczne, czyli takie, które poprzez długotrwały ucisk wewnątrzmaciczny (np. małowodzie) lub zniszczenie struktur płodu (np. sekwencja pasm owodniowych, incydent naczyniowy) powodują odpowiednio, **deformacje** (np. stopa końsko-szpotawa) lub **przerwania** (amputacje kończyn). Do grupy wrodzonych wad rozwojowych zalicza się również **dysplazje**, a więc choroby będące skutkiem nieprawidłowości w różnicowaniu się komórek w określone tkanki (np. dysplazje ektodermalne) oraz **malformacje**, czyli wady wywołane przez pierwotne zaburzenia prawidłowego rozwoju w okresie zarodkowym (np. hipoplazje, agenezje narządów) [Korniszewski, 2005; Lupski, 1998].

Do niedawna etiologia wrodzonych wad rozwojowych była niepoznana aż w 50%. Obecnie, wraz z rozwojem technik molekularnych, odsetek ten się zmniejsza dzięki dostępności nowych testów diagnostycznych.

1.2. Klasyfikacja wrodzonych wad kończyn

Wrodzone wady kończyn są jednymi z najczęstszych wrodzonych wad rozwojowych. Występują z częstością od 1:500 do 1:1000 żywo urodzonych noworodków [Latos-Bieleńska i wsp., 2002]. Podstawą monitorowania częstości występowania wad wrodzonych, w tym wad kończyn, w populacji polskiej jest Polski Rejestr Wrodzonych Wad Rozwojowych (PRWWR), który działa na terenie kraju od 1997 roku. Rejestr gromadzi dane epidemiologiczne dotyczące wad wrodzonych na terenie Polski, wskazując na różnice regionalne oraz poszukuje czynników ryzyka i monitoruje stan diagnostyki prenatalnej. Według danych epidemiologicznych z PRWWR, regionami o najwyższej częstości wrodzonych wad kończyn u żywo urodzonych noworodków oraz dzieci do 2. roku życia były:

- w latach 1998-1999 – województwo zachodniopomorskie (częstość 31,4/10 000 żywych urodzeń)
- w latach 2000-2002 – województwo lubelskie (częstość 30,1/10 000 żywych urodzeń)
- w latach 2003-2004 – województwo lubelskie (częstość 34,2/10 000 żywych urodzeń)
- w latach 2005-2006 – województwo lubelskie (częstość 30,6/10 000 żywych urodzeń) [Latos-Bieleńska i wsp., 2002; Latos-Bieleńska i wsp., 2006; Latos-Bieleńska i wsp., 2010; Latos-Bieleńska i wsp., 2010a]

Wrodzone wady kończyn są bardzo heterogenne pod względem genetycznym i klinicznym. Najczęściej, bo w 60-70%, występują w formie izolowanej, pozostały odsetek (30-40%) to formy zespołowe, współwystępujące z innymi wadami wrodzonymi [Korniszewski, 2005]. Wrodzone wady kończyn mogą być skutkiem mutacji w pojedynczym genie, aberracji chromosomowej lub ekspozycji na teratogen *in utero*, a także uszkodzenia mechanicznego [Jamsheer, 2008]. W ocenie klinicznej, kryterium genetycznego uwarunkowania wady jest przede wszystkim jej obustronność oraz

jednoczesne zajęcie kończyn górnych i dolnych, które jest często spotykane, lecz nie jest koniecznym warunkiem w identyfikacji wady o podłożu genetycznym [Wilkie, 2003]. Większość genów sterująca rozwojem embrionalnym zawiązków kończyn górnych i dolnych jest wspólna, stąd wadzie rąk często towarzyszy wada stóp [Jamsheer, 2008]. Zdecydowana większość wad kończyn dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący.

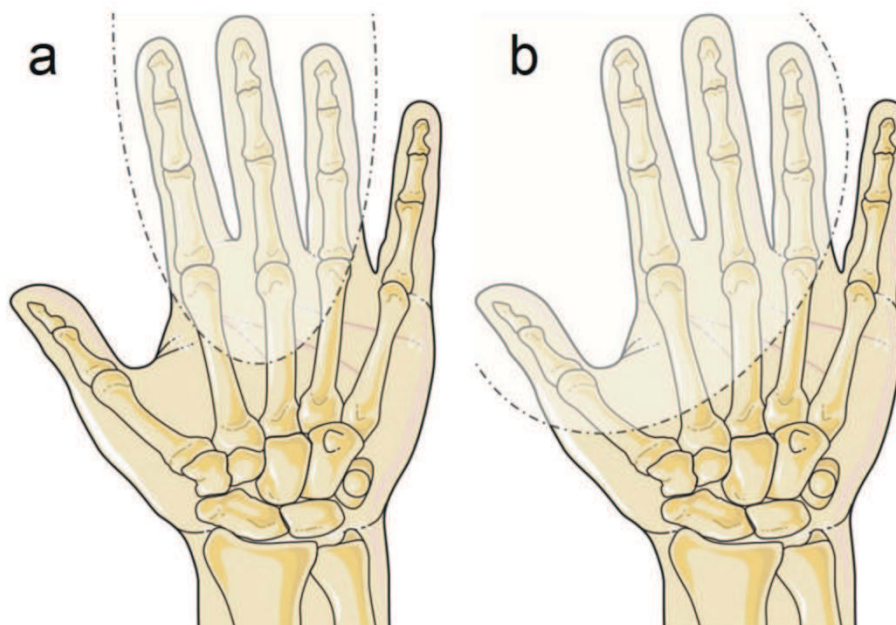
W klasyfikacji wrodzonych wad kończyn ze względu na ich fenotyp wyróżnia się:

- **Polidaktylie (Q69)** – palce nadliczbowe, w tym polidaktylie pozaosiowe, przedosiowe oraz rzadziej polidaktylie promienia środkowego. W grupie polidaktylii przedosiowych (PPD) wyróżnia się cztery typy (PPD1-PPD4), polidaktylie pozaosiowe (PAP) dzieli się na dwa typy (PAPA i PAPB). Niezwykle rzadko identyfikuje się tzw. polidaktylię skrzyżowaną (CP), określającą przypadek jednoczesnego występowania odmiennych typów polidaktylii w stopach i rękach;
- **Syndaktylie (Q70)** – zrosty palców, stanowią najczęstszą wadę rąk/stóp. Zrost dotyczy głównie tkanek miękkich (syndaktylia skórna), rzadziej tkanki kostnej. Wyróżnia się 5 typów syndaktylii (SD I-SD V). Typ VII (inaczej zespół Cenaniego-Lenza) polega na całkowitym zroście wszystkich palców (tzw. syndaktylia rękawiczkowa);
- **Brachydaktylie (Q74.8)** – skrócenie palców, wynikające ze skrócenia dystalnych, środkowych lub proksymalnych paliczków a także, w przypadku brachydaktylii typu E (BDE), ze skrócenia kości śródreżca i/lub śródstopia. Wyróżnia się 5 typów brachydaktylii (BDA-BDE). Wadzie tej często towarzyszy hipoplazja lub aplazja paznokci (przy skróceniu paliczków dystalnych) oraz inne malformacje, takie jak np. symfalangizm czy klinodaktylia;
- **Symfalangizm (Q74.8)** – zrost kostny paliczków tego samego palca, wynikający z nieprawidłowej segmentacji palców ręki lub stopy. Wyróżnia się:
 - symfalangizm proksymalny (SYM1), gdzie kościorostowi ulegają paliczki proksymalny i środkowy;
 - symfalangizm dystalny, w przypadku którego zrost dotyczy paliczków środkowego i dystalnego;
 - zespół mnogich kościorostów (SYNS, symfalangizm-brachydaktylia). W tym typie stwierdza się symfalangizm proksymalny palców ręki oraz skrócenie paliczków środkowych i kości śródreżca.
- **Oligodaktylie (Q71.89 lub Q72.89)** – zmniejszenie liczby palców. W zależności od lokalizacji wady, wyróżnia się:

- oligodaktylię promieniową, która polega na braku kciuka i/lub palca wskazującego;
- oligodaktylię łokciową, cechująca się aplazją lub hipoplazją palców po stronie łokciowej (5 i/lub 4 palec);
- oligodaktylię centralną, uwarunkowaną brakiem środkowych palców. Formą oligodaktylii centralnej jest **rozszczep rąk i/lub stóp (Q71.6; Q72.7)** [Jamsheer, 2008].

1.3. Rozszczep rąk i/lub stóp (SHFM ang. *Split Hand/Foot Malformation*) – informacje ogólne

Mianem rozszczepu rąk i/lub stóp (SHFM ang. *Split Hand/Foot Malformation*), zwanego również ektrodaktylią lub oligodaktylią centralną, określa się wrodzoną wadę kończyn, charakteryzującą się ubytkowymi zaburzeniami centralnego promienia ręki lub stopy. Wada polega na całkowitym lub częściowym braku lub niedorozwoju palców ręki i/lub stopy oraz nierzadko odpowiednich kości śródreza/śródstopia. Częstość występowania rozszczepów rąk i/lub stóp wynosi ok. 1 na 18000 żywo urodzonych noworodków, co stanowi ok. 8-17% wrodzonych malformacji kończyn [Czeizel i wsp., 1993]. Wada ze spektrum SHFM cechuje się znaczną heterogennością kliniczną i etiologiczną. Istnieją zarówno formy izolowane rozszczepu rąk/stóp, jak również współwystępujące z innymi wadami wrodzonymi - formy zespołowe. W klasyfikacji anatomicznej wady wyróżnia się dwa główne typy SHFM: **rozszczep typowy** (tzw. rozszczep typu "szczypce homara"), z brakiem centralnego promienia ręki lub stopy w efekcie czego narząd zostaje podzielony na dwie części oraz **rozszczep typu monodaktylii**, gdzie aplazji ulega centralna i promieniowa część ręki/stopy z pozostawieniem jedynie piątego palca. Obydwa typy rozszczepu mogą być spowodowane tym samym czynnikiem genetycznym i współwystępować u tego samego pacjenta w dwóch różnych kończynach oraz w przypadkach rodzinnych, u różnych członków rodziny dotkniętej wadą [Temtamy i wsp., 1978].



Rycina 1. Schemat przedstawiający dwa główne typy ektrodaktylii (a) rozszczep typowy, (b) rozszczep typu monodaktylii [na podstawie: <http://servier.com/Powerpoint-image-bank>; zmodyfikowano].

Ten prosty podział na dwa główne typy anatomiczne wady nie oddaje jej heterogenności fenotypowej. Rozszczep, ze względu na zmienną ekspresję cechy, może manifestować się w przeróżny sposób. Często ektrodaktylii towarzyszy polidaktylia, syndaktylia, klinodaktylia [Gurrieri i wsp., 2002; Temtamy i wsp., 1978]. Wada dziedziczy się głównie autosomalnie dominująco, często z niepełną penetracją. Przyczynę wystąpienia rozszczepu rąk i/lub stóp mogą stanowić czynniki środowiskowe oraz, znacznie częściej, czynniki genetyczne. Kryterium genetycznego uwarunkowania wady spełnione jest przy obustronnym wystąpieniu defektu i/lub w przypadkach rodzinnych [Schwabe i wsp., 2004].

Dotychczas zidentyfikowano 7 *loci* chromosomowych, w których mutacje odpowiadają za wystąpienie wady ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp, tak więc pod względem genetycznym SHFM można podzielić na 7 typów. Pomimo znacznego postępu wiedzy w genetyce wad kończyn, w wielu przypadkach (ok. 50%) podłoże molekularne SHFM pozostaje nieokreślone.

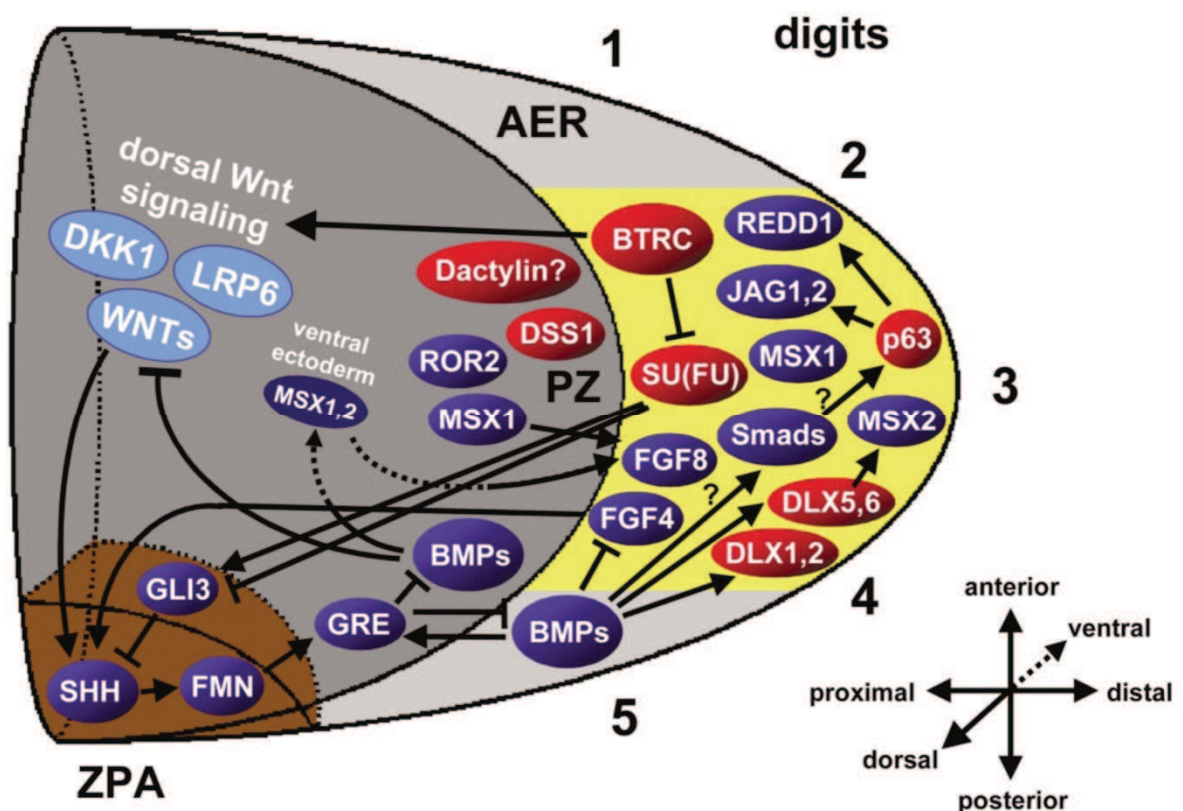
1.4. Etiopatogeneza rozszczepów rąk i/lub stóp

Etiologia rozszczepów rąk i/lub stóp jest heterogenna. Wada, podobnie jak pozostałe malformacje kończyn, może być spowodowana zarówno niezależnymi od siebie, odrębnymi zmianami genetycznymi, jak również czynnikami egzogennymi, środowiskowymi. Pomimo różnorodności czynników etiologicznych będących przyczyną ektrodaktylii, patomechanizm warunkujący charakterystyczny obraz wady jest wspólny na poziomie biologicznym (komórkowym) dla wszystkich czynników sprawczych SHFM. Bezpośrednią przyczyną wady jest bowiem apoptoza lub zmniejszona proliferacja komórek w określonych strefach oraz na określonych etapach rozwijającego się zawiązka kończyny. Istotny jest więc zarówno wymiar przestrzenny jak i czasowy działania czynnika patogenego.

Rozwój układu kostnego rozpoczyna się od procesu, w trakcie którego zostaje ustalona ilość, kształt i wielkość danego elementu tworzącego szkielet. Następnie prekursorowe komórki mezenchymalne migrują do określonych miejsc formowania się szkieletu, kondensują i różnicują się. Wzrastanie poszczególnych części szkieletu odbywa się przede wszystkim w chrząstce nasadowej, tkance chrzęstnej znajdującej się w pobliżu zakończeń rosnącej kości i stanowiącej miejsce wzrastania kości na długość. Po zakończonym wzroście chrząstka nasadowa przekształca się w kość. Komórki kości pozostają aktywne po ukończeniu fazy wzrastania aby utrzymać szkielet w homeostazie w procesie tzw. modelowania. Według Kornaka i wsp. [2003] choroby układu kostnego można podzielić na cztery główne grupy uwarunkowane zaburzeniami: a) organizacji przestrzennej elementów szkieletu, b) różnicowania się kostnych struktur prekursorowych, c) wzrastania i d) homeostazy. Według powyższej klasyfikacji ektrodaktylia należy do grupy wad wynikających z zaburzeń przestrzennej organizacji struktur kostnych kończyn [Kornak i wsp., 2003].

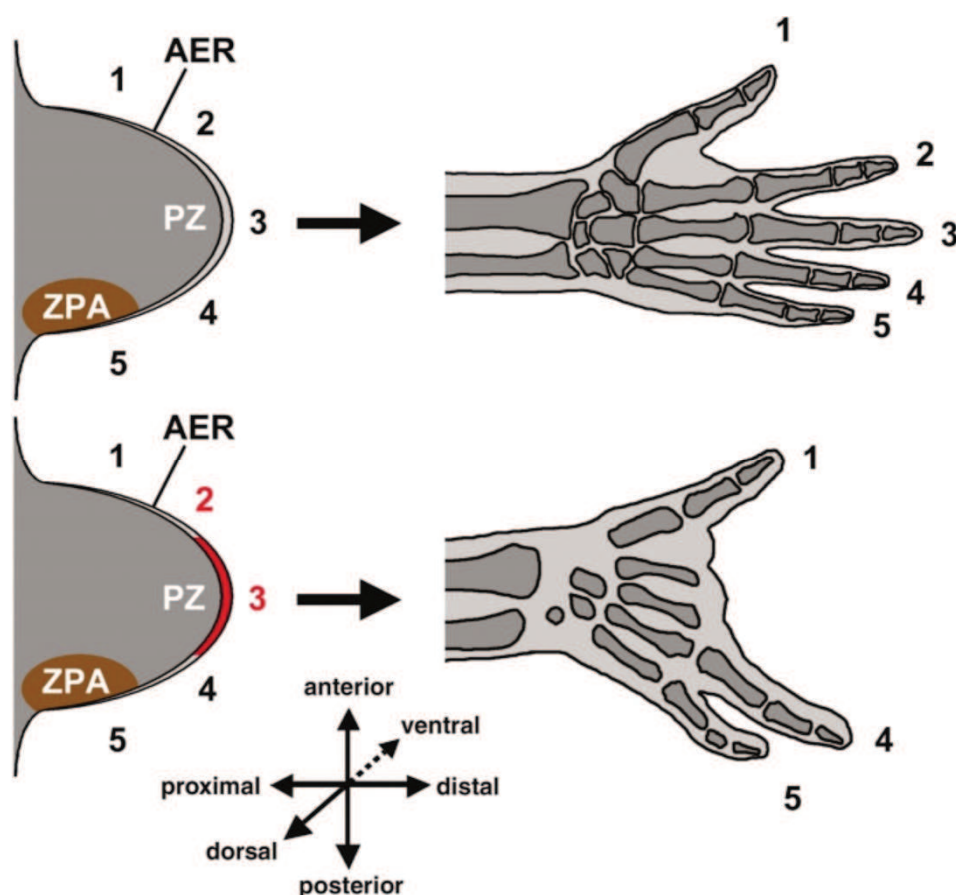
Kościec kończyn powstaje z komórek mezenchymalnych zlokalizowanych w części bocznej mezodermy stanowiącej zawiązek kończyny. Tworzy się on w wyniku serii interakcji pomiędzy mezoderma a otaczającą ją ektoderma. Komórki mezenchymalne rozwijającego się zawiązka kończyny różnicują się tworząc poszczególne tkanki i struktury kończyny. Organizacja przestrzenna tychże struktur kontrolowana jest przez gradient białek sygnalizacyjnych produkowanych przez trzy wyspecjalizowane grupy komórek zawiązka kończyny, tworzące: strefę wzrastania (**PZ** ang. *progress zone*), szczytowy grzebień ektodermalny (**AER** ang. *apical ectodermal ridge*), strefę aktywności polaryzacyjnej (**ZPA** ang. *zone of polarizing activity*). Interakcja pomiędzy tymi trzema regionami determinuje

organizację przestrzenną zawiązka kończyny w wymiarze trzech osi: **bliźszej-dalszej** (ang. *proximo-distal axis* – kierunek: ramię-palec), **przednio-tylnej** (ang. *antero-posterior axis* – kierunek: kciuk-mały palec), **grzbietowo-brzusznej** (ang. *dorso-ventral axis* – kierunek: grzbiet-wewnętrzna strona ręki). Strefa AER zbudowana jest z gęsto upakowanych komórek ektodermalnych zlokalizowanych w najdalej wysuniętym skrajnym odcinku zawiązka kończyny. Komórki te produkują białka sygnalizacyjne i czynniki transkrypcyjne takie jak min.: czynniki wzrostu fibroblastów (FGF ang. *fibroblast growth factor*), białka morfogenetyczne kości (BMP ang. *bone morphogenetic proteins*), białka szlaku WNT i MSX. Białka z rodziny FGF, w tym FGF4, FGF8, utrzymują sąsiadujące z AER komórki mezenchymalne w stanie nieodróżnionym i intensywnych podziałów dając początek strefie PZ (strefie wzrastania) [Tabin, 1995].



Rycina 2. Schemat przedstawiający interakcje pomiędzy białkami sygnalizacyjnymi w poszczególnych strefach (AER, PZ, ZPA) rozwijającego się zawiązka kończyny. Kolorem żółtym zaznaczono środkową część strefy AER o nieprawidłowej sygnalizacji komórkowej. Numery 1-5 wskazują na przyszłą lokalizację palców w ukształtowanej kończynie. Kolorem czerwonym zaznaczono białka będące produktami genów kandydujących lub o znanej roli w etiologii SHFM. Inhibitorowy oraz stymulujący efekt działania poszczególnych białek zaznaczono odpowiednio symbolami → i —| AER - szczytowy grzebień ektodermalny, PZ - strefa wzrastania, ZPA - strefa aktywności polaryzacyjnej [na podstawie: Duijf i wsp., 2003].

Nieustannie dzielące się komórki strefy PZ determinują rozwój zawiązka kończyny w osi proksymo-dystalnej. Im dłużej komórka pozostanie w strefie PZ, tym bardziej oddalona będzie jej docelowa lokalizacja w uformowanej kończynie [Gurrieri i wsp., 2002]. Przerwanie szlaku sygnalizacyjnego pomiędzy komórkami warstw AER i PZ powoduje zahamowanie podziałów komórkowych i w konsekwencji opóźnienie wzrastania środkowej części kończyny, co skutkuje nieprawidłowym formowaniem się struktur ręki/stopy (łac. *autopodium*). Tym samym bezpośrednią przyczyną wad ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp jest zaburzone funkcjonowanie AER, tj. apoptoza komórek tej strefy, a co za tym idzie, obniżona proliferacja komórek strefy wzrastania. Obok czynników genetycznych, również czynniki środowiskowe mogą powodować apoptozę komórek strefy AER, prowadząc do wystąpienia SHFM. Do takich teratogenów należą min. kwas retinowy, kadm, hydroksymocznik, metotreksat, cytarabina, etanol, kokaina, kwas walproinowy, kwas metoksyoctowy.



Rycina 3. Schemat przedstawiający fenotypową manifestację prawidłowego (górna część ryciny) oraz nieprawidłowego rozwoju strefy AER zawiązka kończyny. Zaburzenia w strefie AER (zaznaczono kolorem czerwonym) prowadzą do opóźnienia rozwoju środkowej części kończyny. Numery 1-5 wskazują na przyszłą lokalizację palców w ukształtowanej kończynie. AER - szczytowy grzebień ektodermalny, PZ - strefa wzrastania, ZPA - strefa aktywności polaryzacyjnej [na podstawie: Duijf i wsp., 2003].

1.4.1. Znane *loci* SHFM

SHFM1 (7q21)

Rozszczep rąk i stóp typu pierwszego spowodowany jest rearanżacjami w locus 7q21.3-q22.1. Zmiany te mają najczęściej charakter mutacji *de novo*, mogą być również dziedziczone w sposób autosomalny dominujący, jako cechy o niepełnej penetracji i zmiennej ekspresji. Rearanżacje genomowe w locus SHFM1 związane są zarówno z izolowaną jak i zespołową formą wady. U 35% pacjentów z SHFM1 wadzie kończyn towarzyszy niedosłuch typu odbiorczego, rzadziej stwierdza się objawy dysplazji ektodermalnej z rozszczepem wargi/podniebienia [Tackels-Horne i wsp., 2001]. Najczęstszymi opisywanymi w tym regionie aberracjami są delecje. Odnotowuje się również translokacje, inwersje oraz duplikacje. Typowy region dla SHFM1 obejmuje kilka genów związanych z rozwojem kończyn. Należą do nich *DSS1*, *DLX5* oraz *DLX6* [Crackower i wsp., 1996; Duijf i wsp., 2003]. Rola *DLX5/DLX6* w morfogenezie kończyn została wykazana w badaniach funkcjonalnych na modelu mysim, gdzie wyciszenie obydwu genów (*Dlx5/Dlx6*^{-/-}) powodowało klasyczną ektrodaktylię, jak również wady twarzoczaszki oraz ucha wewnętrznego [Robledo i wsp., 2002]. Określono również tkankowo specyficzną ekspresję *Dlx5* i *Dlx6*, identyfikując ją w strefie AER zawiązków kończyn, osteoblastach rozwijających się kości oraz w przestrzeniach międzyneuronalnych części podstawnej kresomózgowia [Simeone i wsp., 1994; Acampora i wsp., 1999; Lo Iacono i wsp., 2008]. Jednakże dopiero identyfikacja homozygotycznej patogenicznej mutacji typu *missense*, zlokalizowanej w homeodomenie genu *DLX5*, jednoznacznie potwierdziła rolę genu w etiopatogenezie rozszczepów rąk i/lub stóp u ludzi. Mutację wykryto w spokrewnionej rodzinie dotkniętej SHFM o autosomalnym recesywnym dziedziczeniu wady [Shamseldin i wsp., 2012]. Pozostałe geny znajdujące się w obrębie lub niedalekim sąsiedztwie locus SHFM1 mają status genów kandydujących. Niektóre towarzyszące wadom kończyn cechy fenotypowe, identyfikowane zarówno w przypadkach SHFM1 jak i SHFM4 (mutacje w genie *TP63*), takie jak objawy dysplazji ektodermalnej pozwalają przypuszczać, iż istnieje zależność pomiędzy czynnikami etiologicznymi w obydwu *loci*. Istotnie, wykazano, iż ekspresja genów *DLX5/6* jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny TP63, który wiąże się do elementów regulatorowych (SHFM1-BS1) obydwu genów [Lo Iacono i wsp., 2008; Kouwenhoven i wsp., 2010]. Ostatnie badania nad transkrypcyjną regulacją genów *DLX5/6* pozwoliły zidentyfikować eksonowe elementy regulatorowe (eExons) zlokalizowane

w eksonach 15 i 17 sekwencji kodującej genu *DYNC111* położonego w odległości 907,5 kb od *DLX6* oraz w odległości 922 kb od *DLX5* [Birnbauum i wsp., 2012].

SHFM2 (Xq26)

Do chwili obecnej opisano jedną rodzinę z SHFM o dziedziczeniu sprzężonym z chromosomem X [Ahmad i wsp., 1987]. Autorzy przedstawili pakistańską spokrewnioną rodzinę, w której 36 członków (33 mężczyzn i 3 kobiety) manifestowało rozszczep rąk i/lub stóp. Pacjenci byli dotknięci rozszczepem klasycznym lub typu monodaktylii w rękach oraz zróżnicowaną wadą w stopach. W późniejszych badaniach Faiyaz ul Haque i wsp. [1993] potwierdzili metodą analizy sprzężeń dziedziczenie wady sprzężone z X oraz zidentyfikowali *locus* dla SHFM2 w regionie Xq26. Dwa geny zlokalizowane w tym regionie, *FGF13* oraz *TONDU*, są potencjalnymi genami kandydującymi dla SHFM2, jednakże do tej pory nie udało się zidentyfikować mutacji w tych genach u pacjentów z SHFM [Vaudin i wsp., 1999].

SHFM3 (10q24)

Locus dla SHFM3, zlokalizowane w regionie 10q24, związane jest z tandemową duplikacją o wielkości 325-570 kb [de Mollerat i wsp., 2003; Dimitrov i wsp., 2010]. Aberracja ta jest najczęstszą przyczyną izolowanych rozszczepów rąk i/lub stóp odpowiadając za ok. 18-25% przypadków [Klopocki i wsp., 2012; Birnbauum i wsp., 2012; de Mollerat i wsp., 2003]. Zduplikowany region obejmuje kilka genów potencjalnie związanych z wystąpieniem wady, do których należą: *FBXW4*, *BTRC*, *POLL*, *FGF8* oraz *LBX1*. Duplikacja wykazuje autosomalny dominujący typ dziedziczenia. Wadom uwarunkowanym mutacją w *locus* SHFM3 często towarzyszą wady przedosiowe, takie jak trójpalcikowe lub zdwojone kciuki [Everman i wsp., 2006; Elliott i wsp., 2007]. Modelem zwierzęcym dla SHFM3 jest naturalnie występująca mysz, tzw. *Dactylaplasia (Dac) mouse*. Region odpowiedzialny za fenotyp rozszczepu rąk i/lub stóp u ludzi i myszy wykazuje znaczny stopień homologii. U myszy *Dac* obserwuje się brak środkowych palców, hipoplazję lub aplazję kości śródreza i/lub śródstopia oraz syndaktylię. SHFM u myszy dziedziczony jest w semidominująco, co oznacza, że osobniki heterozygotyczne prezentują brak środkowych palców przedniej i tylnej kończyny, natomiast osobniki homozygotyczne manifestują znacznie cięższą postać wady – monodaktylię [Sidow i wsp., 1999; Johnson i wsp., 1995].

SHFM4 (3q27; TP63)

Czwarte *locus* dla SHFM zostało zmapowane w regionie 3q27 i jest bezpośrednio związane z mutacjami w genie *TP63* [Ianakiev i wsp., 1999]. Białko kodowane przez gen *TP63* jest czynnikiem transkrypcyjnym homologicznym do genu supresorowego *TP53*. Gen *TP63* odgrywa kluczową rolę w rozwoju embrionalnym, kontrolując formowanie się strefy AER. Jest kluczowym regulatorem rozwoju ektodermalnego, działającym poprzez podtrzymywanie potencjału podziałowego komórek ektodermy. Myszy, u których wyciszono *p63*, nie wykształcają prawidłowych struktur ektodermalnych, co przejawia się anomaliami skóry, włosów, zębów, twarzoczaszki, gruczołów sutkowych oraz kończyn [Mills i wsp., 1999 ; Yang i wsp., 1999]. Mutacje w *TP63* są dziedziczone autosomalnie dominująco i odpowiadają za 10-16% przypadków izolowanych form SHFM oraz za 93% zachorowań na zespół EEC [de Mollerat i wsp., 2003a].

SHFM5 (2q31)

U pacjentów z SHFM5 opisuje się delecje w *locus* 2q31. Region ulegający delecji obejmuje cały klaster genów z rodziny *HOXD* (*HOXD1-HOXD13*), które ze względu na rolę w formowaniu się układu kostnego, były typowane jako geny kandydujące w SHFM. Jednakże Goodman i wsp. [2002] zasugerowali, że region odpowiedzialny za SHFM5 zlokalizowany jest powyżej klasteru *HOXD* i stanowi 5Mb delecję położoną centromerowo w stosunku do genu *EVX2*. W obrębie delecji zlokalizowane są dwa geny kandydujące *DLX1*, *DLX2* o potencjalnie patogennym znaczeniu w rozwoju SHFM. Obydwa geny ulegają ekspresji w strefach AER i PZ [Goodman i wsp., 2002], jednakże badania funkcjonalne przeprowadzone na modelu mysim nie potwierdzają udziału owych genów w etiopatogenezie wad kończyn [Qiu i wsp., 1997]. Ponadto u pacjentów z SHFM nie udało się do tej pory zidentyfikować patogennych mutacji w żadnym z w/w genów, dlatego też ich rola w etiopatogenezie rozszczepów rąk i/lub stóp pozostaje niepotwierdzona.

SHFM6 (12q13; WNT10B)

Do tej pory opisano jedynie 3 rodzinne i jeden sporadyczny przypadek SHFM o autosomalnym recesywnym rodzaju dziedziczenia wady [Khan i wsp., 2012; Ugur i wsp., 2008; Shamseldin i wsp., 2012; Blattner i wsp., 2010]. W jednej z rodzin wada uwarunkowana była homozygotyczną mutacją w genie *DLX5* [Shamseldin i wsp., 2012], natomiast w pozostałych, homozygotycznymi mutacjami w genie *WNT10B*, zlokalizowanym w *locus* SHFM6. Białka WNT są ligandami w szeregu ścieżek

sygnalizacyjnych i odgrywają kluczową rolę w morfogenezie kończyn [Yang i wsp., 1999]. Patogenna mutacja w genie *WNT10B* została po raz pierwszy opisana przez Ugura i wsp. [2008], którzy identyfikowali homozygotyczną zmianę typu *missense* (p.R332W) u wszystkich manifestujących wadę członków spokrewnionej tureckiej rodziny. Pozostałe dwa doniesienia opisywały sporadyczny przypadek SHFM uwarunkowany homozygotyczną duplikacją w genie *WNT10B* [Blattner i wsp., 2010] oraz przypadek rodzinnego wystąpienia wady odnotowany w spokrewnionej pakistańskiej rodzinie [Khan i wsp., 2012].

SHFM/SHFLD (17p13.3)

Rozszczep rąk i/lub stop ze skróceniem kości długich (ang. *Split Hand/Foot Malformation with Long Bone Deficiency* - SHFLD) jest najczęściej uwarunkowany duplikacją w regionie 17p13.3. Lezirovitz i wsp. [2008] zmapowali metodą analizy sprzężeń *locus* SHFLD w interwale o wielkości 814 kb, zlokalizowanym w regionie 17p13.1-17p13.3. W kolejnych badaniach Klopocki i wsp. [2012] zidentyfikowali w regionie tandemową duplikację oraz określili region krytyczny zmiany, który u wszystkich pacjentów obejmował gen *BHLHA9*. Autorzy w badaniach nad ekspresją ortologu ludzkiego *BHLHA9* u myszy i *Danio rerio* wykazali, iż ulega on ekspresji wyłącznie strefie AER mezenchymy zawiązków kończyn. W celu dalszego określenia roli *BHLHA9* w morfogenezie kończyn, autorzy przeprowadzili badania modelu *Danio rerio*, polegające na wyciszeniu *BHLHA9*, na skutek czego dochodziło do skrócenia płetwy brzusznej, potwierdzając tym samym bezwzględnie rolę *BHLHA9* w rozwoju kończyn u kręgowców. Duplikacja w *locus* 17p13.3 warunkuje ok. 90% przypadków typowego SHFLD oraz ok. 12% przypadków SHFM bez skrócenia kości długich. Jedną z ciekawszych obserwacji wynikających z analizy nosicielstwa duplikacji u członków poszczególnych rodzin dotkniętych wadą jest wysoki odsetek (50%) bezobjawowych nosicieli duplikacji oraz efekt płci, jako czynnika wpływającego na stopień penetracji cechy. Bezobjawowymi nosicielkami były głównie kobiety [Klopocki i wsp., 2012].

Zmiany genomowe w SHFM

Uwarunkowanie monogenowe wady jest częstsze w niektórych formach zespołowych SHFM (np. mutacje w genie *TP63* w zespole EEC). Dodatkowo może ono wystąpić w rzadkich przypadkach SHFM o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym (mutacje w genach *WNT10B*, *DLX5*). Zmiany odpowiedzialne za znaczny odsetek

przypadków izolowanego rozszczepu rąk/stóp mają charakter genomowy, tj. submikroskopowych wariantów liczby kopii (CNVs ang. *Copy-Number Variations*) danego fragmentu genomu (mikrodelecje, mikroduplikacje, insercje). Łagodne CNVs stanowią o zmienności międzyosobniczej, patogenne zaś odpowiadają za choroby, które można określić mianem "chorób genomowych" [Lupski, 1998].

Zmiany genomowe mogą prowadzić do ekspresji określonego fenotypu na drodze kilku różnych mechanizmów molekularnych. Duplikacja lub delecja obejmująca cały gen może, w przypadku genów wrażliwych na dawkę, powodować jego nadekspresję lub obniżoną ekspresję. Zjawisko to określa się mianem „**efektu dawki**”. Mikrorearanżacje w obrębie genu, mogą prowadzić do jego **inaktywacji**, a fenotyp będzie wówczas konsekwencją haploinsuficjencji genu. W wyniku translokacji gen może znaleźć się pod działaniem innych niż natywne sekwencji regulatorowych, które będą nadmiernie wzmacniały lub wyciszały jego ekspresję. Jest to tzw. „**efekt pozycji**” i może on zachodzić również w przypadku wystąpienia delecji lub duplikacji w obrębie genomowego otoczenia genu. W chorobach recesywnych zmiana CNV może być drugim czynnikiem (tzw. ang. „*second hit*”) odmaskowującym efekt np. heterozygotycznej mutacji punktowej w danym genie [Lupski i wsp., 2005].

Identyfikację niezrównoważonych zmian CNVs umożliwia wykorzystywana do diagnostyki wad i chorób wrodzonych technika wysokorozdzielczej porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH ang. *array Comparative Genomic Hybridisation*). Metoda aCGH pozwala na detekcję mikrorearanżacji chromosomowych zarówno w obrębie genów jak i sekwencji regulatorowych o wielkości zależnej od rozdzielczości płytki mikromacierzowej. Metoda pozwala ponadto na identyfikację nieopisanych, potencjalnie patogennych zmian, stanowiąc tym samym skuteczne narzędzie w badaniu nowych przyczyn molekularnych wady.

Niepełna penetracja/zmienna ekspresja cechy

W SHFM można wyróżnić wszystkie możliwe rodzaje dziedziczenia: autosomalny dominujący (zdecydowana większość przypadków), sprzężony z chromosomem X, autosomalny recesywny. Jednocześnie w przypadkach rodzinnych nierzadko identyfikuje się dziedziczenie odbiegające od klasycznego mendlowskiego, np. gdy członek rodziny dotkniętej wadą jest bezobjawowym nosicielem mutacji. Zjawisko to nosi nazwę **niepełnej penetracji** i odnosi się do genotypu, który nie zawsze ulega ekspresji w kierunku

spodziewanej cechy fenotypowej. W wadach rodzinnych niepełna penetracja może skutkować tym, że dana anomalia nie ujawni się w określonym pokoleniu. Przyczyną może być konieczność wystąpienia dodatkowego czynnika genetycznego (np. zmiana polimorficzna) lub środowiskowego, niezbędnego do „odmaskowania” patogennego charakteru pierwszej zmiany. Dopiero jednoczesne zadziałanie obydwu czynników skutkuje manifestacją wady. Mechanizmy prowadzące do zjawiska baraku penetracji lub jej ograniczenia mogą być związane z mutacjami dwu- lub wielogenowymi, epigenetyczną regulacją transkrypcji genów (np. *imprinting* rodzicielski), ekspresją genu modyfikatora, płcią, mutacjami w sekwencjach regulatorowych genów oraz „efektem dawki” danego genu [Cooper i wsp., 2013].

Świadomość faktu, że penetracja cechy w chorobach dominujących nie zawsze wynosi 100%, jest niezwykle ważna w trakcie rzetelnie prowadzonej konsultacji genetycznej, zwłaszcza przy szacowaniu ryzyka wystąpienia wady w kolejnych pokoleniach. *Locus* dla rozszczepów rąk i/lub stóp, w którym stosunkowo często, bo aż w 50% przypadków, obserwuje się niepełną penetrację cechy, jest SHFM/SHFLD (dup17q13.3). Prawidłowe przeprowadzenie diagnostyki genetycznej danej wady wrodzonej utrudnia dodatkowo zjawisko **zmiennej ekspresji cechy**. Oznacza to, że ten sam czynnik genetyczny powoduje różny stopień nasilenia danej cechy, która może mieć postać ciężkiej, łagodnej lub w niektórych przypadkach ledwo zauważalnej anomalii. Przyczyna tego fenomenu nie jest znana.

1.5. Zespoły wad wrodzonych z typowym rozszczepem rąk i/lub stóp

Rozszczep rąk i stóp wstępuje jako jedna z wad towarzyszących w kilku zespołach. Należą do nich m. in.:

- **Zespół EEC** – ektrodaktylia-dyplazja ektodermalna-rozszczep wargi/podniebienia (ang. *Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia-Cleft lip/palate*). Zespół wykazuje znaczną heterogenność kliniczną. Dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący, w 95% przypadków spowodowany jest mutacjami w genie *TP63* (*locus* 3q28) [Celli i wsp., 1999], może być również uwarunkowany rearanżacjami w regionie 7q21.3-q22.1 (*locus* SHFM1) [Scherer i wsp., 1994].
- **Zespół EEC bez rozszczepu wargi/podniebienia** [Wallis, 1988].

- **Zespół LMS** – kończynowo-sutkowy (ang. *Limb-Mammary Syndrome*). Zespół spowodowany jest mutacjami w genie *TP63* i dziedziczony autosomalnie dominująco. Zespół charakteryzuje się hypoplazją/aplazją gruczołów piersiowych i sutków, wadami kończyn, w tym ektrodaktylią oraz innymi anomaliaми, do których należą: atrezja przewodów łzowych, dysplazja paznokci, zmniejszona potliwość, hipodontia, rozszczep podniebienia [van Bokhoven i wsp., 1999].
- **Zespół ADULT** (ang. *Acro-Dermato-Ungual-Lacrima-Tooth syndrome*). Zespół w większości przypadków spowodowany jest mutacjami w genie *TP63* i dziedziczy się autosomalnie dominująco [Amiel i wsp., 2001]. Pewna grupa cech towarzyszących zespołowi ADULT jest wspólna z zespołami EEC oraz LMS. Do najczęstszych malformacji kończyn należy rozszczep rąk i/lub stóp oraz syndaktylia.
- **Zespół CHARGE** – nazwa choroby jest akronimem pochodzącym od angielskich nazw głównych objawów zespołu: **C** – coloboma, **H** – wady serca (ang. *heart defects*), **A** – artresia nozdrzy tylnych (ang. *choanal atresia*), **R** – opóźnienie wzrastania i rozwoju psychoruchowego (ang. *retardation of growth and development*), **G** – wady układu moczowo-płciowego (ang. *genitourinary defects*), **E** – wady uszu i /lub głuchota (ang. *ear anomalies*). U niektórych pacjentów wyżej wymienionym wadom towarzyszą wady kończyn takie jak: monodaktylia, hipoplazja kości łokciowej, aplazja kości piszczelowej, rozszczep kości udowej. Choroba wykazuje autosomalny dominujący rodzaj dziedziczenia, a przyczyną są najczęściej mutacje w genie *CHD7* (*locus* 8q12.1-q12.2) [Lalani i wsp., 2006; Jongmans i wsp., 2006]. W dwóch przypadkach przyczynę zespołu powiązano z mutacjami w genie *SEMA3E* (*locus* 7q21.11), [Lalani i wsp., 2004].
- **Zespół ektrodaktylia-niedosłuch** spowodowany jest rearanżacjami w *locus* 7q21.3 (SHFM1) [Tackels-Horne i wsp., 2001]. Typowym dla aberracji chromosomowych w tym regionie jest dziedziczenie autosomalne dominujące, natomiast wada uwarunkowana mutacjami homozygotycznymi w genie *DLX5* dziedziczy się autosomalnie recesywnie [Shamseldin i wsp., 2012].
- **Zespół Karscha-Neugebauera**. W chorobie rozszczepowi rąk i/lub stóp towarzyszy oczopląs, zmiany na dnie oka oraz zaćma. Zespół dziedziczy się autosomalnie dominująco, lecz nie znana jest jego przyczyna genetyczna [Pilarski i wsp., 1985].
- **Zespół EEM**-ektrodaktylia-dysplazja ektodermalna-zwyrodnienie plamki (ang. *Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia-Macular dystrophy syndrome*). Głównymi

objawami choroby są cechy dysplazji ektodermalnej pod postacią nieprawidłowości morfologii skóry, zębów, włosów oraz ektrodaktylia, syndaktylia i zwyrodnienie plamki. Zespół EEM dziedziczy się w sposób autosomalny recesywny i uwarunkowany jest mutacjami w genie *CDH3* [Kjaer i wsp., 2005].

1.6. Zespoły wad wrodzonych z atypowym rozszczepem rąk i/lub stóp

Atypowy rozszczep rąk i/lub stóp można określić mianem zniekształcenia zmniejszającego z oligodaktylią. Istnieje kilka zespołów z wrodzonymi nieprawidłowościami kończyn, w których wadę można zaklasyfikować jako spektrum atypowego SHFM. Należą do nich m. in.:

- **Asocjacja VATER (VACTERL)** – akronim tworzą pierwsze litery nazw wad typowych w zespole: **V** – wady kręgow (vertebral), **A** – wady odcinka odbytniczo-odbytwego (anal), **C** – wrodzone wady serca (ang. cardiac), **T** – przetoka przełykowo-tchawicza (tracheoesophagal), **E** – atrezja przełyku (esophagal), **R** – wady nerek (renal), **L** – wady kończyn (limb). Asocjacja nie stanowi odrębnego zespołu, jest skojarzeniem kilku wad współwystępujących w różnym układzie. Ok. 60% pacjentów wykazuje malformacje kończyn o charakterze wady zmniejszającej z czego największy odsetek stanowi hipoplazja/aplazja kości piszczelowej, której w ok. 20% przypadków towarzyszy skrócenie kości strzałkowej [Castori i wsp., 2008]. Etiologia asocjacji VATER jest heterogenna, jednakże częste występowanie wad kości długich sugeruje wspólny czynnik patogenny.
- **SHFLD** – Rozszczep rąk i/lub stóp ze skróceniem kości długich (ang. *Split Hand/Foot Malformation with Long Bone Deficiency*). Etiologia wady została opisana w rozdziale 1.4.1.
- **Zespół FFU** – kość udowa-strzałka-kość łokciowa (ang. *Femur-Fibula-Ulna syndrome*) jest wadą sporadyczną o nieznannej etiologii. Cechuje się zróżnicowanym zestawieniem wrodzonych wad kości udowej, strzałkowej i/lub łokciowej, którym mogą towarzyszyć wady palców po stronie strzałkowej/łokciowej. Częste w zespole FFU są amelia, hipoplazja kości ramiennej, zrost kości ramiennej i promieniowej. Istotną cechą w charakterystyce zespołu jest asymetria występowania malformacji poszczególnych kończyn. Wada manifestuje się częściej i w większym nasileniu w kończynach górnych niż dolnych oraz po prawej niż po lewej stronie ciała [Lenz i wsp., 1993].

- **OLHS** – (ang. *Oromandibular-Limb-Hypogegesis Syndromes*) to grupa wad wrodzonych charakteryzujących się malformacjami języka, żuchwy, szczęki oraz kończyn.

1.7. Diagnostyka i poradnictwo genetyczne w SHFM

Diagnostyka u pacjentów z rozszczepem rąk i/lub stóp powinna być przeprowadzona w oparciu o badanie kliniczne oraz testy molekularne (względnie cytogenetyczne). W piśmiennictwie naukowym wyróżnia się co najmniej 7 typów SHFM, które zostały szczegółowo opisane w poprzednim rozdziale. Najczęstszym rodzajem dziedziczenia wady jest autosomalny dominujący o niepełnej penetracji cechy [Duijf i wsp., 2003], jakkolwiek opisuje się również rzadsze przypadki o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym [Shamseldin i wsp., 2012; Blattner i wsp., 2010; Elliott i wsp., 2007] oraz sprzężonym z chromosomem X [Ahmad i wsp., 1987]. Przypadki sporadyczne izolowanych form rozszczepu rąk i/lub stóp są najczęściej uwarunkowane mutacjami *de novo*. W takim wypadku ryzyko powtórzenia się wady u rodzeństwa probanda jest bardzo niskie, populacyjne, natomiast prawdopodobieństwo, że wada powtórzy się u potomstwa probanda wynosi już od 30% do 50%. Biorąc pod uwagę niepełną penetrację, zmienną ekspresję oraz efekt płci [Klopocki i wsp., 2012], poradnictwo genetyczne w SHFM może stanowić wyzwanie dla lekarza genetyka, konsultującego zarówno przypadki sporadyczne jak i rodzinne. Ponadto u niektórych pacjentów z SHFM wada może być uwarunkowana dwu- lub wielogenowo. W związku z powyższym, rzetelne poradnictwo genetyczne w rozszczepach rąk i/lub stóp powinno opierać się na panelu odpowiednich testów genetycznych. Pomimo znacznego postępu wiedzy w diagnostyce molekularnej rozszczepów rąk i/lub stóp, przyczyna genetyczna ok. 50% przypadków pozostaje niewyjaśniona, co oznacza, że nie można jej określić przy wykorzystaniu rutynowych testów genetycznych. Dla tej grupy pacjentów określenie ryzyka wystąpienia wady u potomstwa jest trudne, niejednoznaczne i oparte na danych empirycznych.

Pierwszym etapem diagnostyki genetycznej u danego pacjenta z SFHM jest ocena kliniczna wady oraz sposobu jej dziedziczenia, a następnie wybór odpowiedniego testu molekularnego. Częstość określonych mutacji/aberracji jest inna dla SHFM typowego i atypowego, izolowanego i zespołowego, sporadycznego i rodzinnego. Według danych z piśmiennictwa, w tym zebranych przez Klopocki i wsp. [2012], którym udało się opisać

największą do tej pory grupę pacjentów z SHFM (56 probandów), najczęstszą przyczyną izolowanych form typowego SHFM są duplikacje w *locus* 10q24.3 (SHFM3) oraz 17p13.3 (SHFM/SHFLD), stanowiące odpowiednio 20% i 16% przypadków. W oparciu o te dane oraz badania własne autorki, identyfikacja przyczyny molekularnej u pacjenta z typowym SHFM powinna rozpocząć się od analizy liczby kopii w *locus* 10q24.3, a następnie 17p13.3. W tym przypadku metodą z wyboru powinna być porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH), ponieważ umożliwia ona nie tylko identyfikację powyższych zmian, ale również pozostałych niezrównoważonych zmian genomowych (w *loci* SHFM1, SHFM2, SHFM5). Ze względu na to, że większość zmian genomowych powodujących SHFM ma wielkość ok. kilkuset tysięcy par zasad, rozdzielczość danej płytki mikromacierzowej nie musi być szczególnie duża aby uchwycić daną zmianę. Rutynowo wykorzystywane w diagnostyce macierze o rozdzielczości ok. 180 tysięcy sond na haploidalny genom wystarczą, aby zidentyfikować patogenne CNV. Alternatywną metodą analizy liczby kopii danego *locus* SHFM jest technika MLPA (multipleksowa amplifikacja zależna od ligacji sond, ang. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) oraz qPCR (ilościowa PCR, ang. *quantitative PCR*). Niestety na chwilę obecną nie istnieją komercyjnie dostępne zestawy do analizy tych regionów (w tym SHFM3 i SHFM/SHFLD), dlatego konieczność projektowania własnych, niezwalidowanych laboratoryjnie testów utrudnia wiarygodną i rzetelną diagnostykę.

W niektórych przypadkach SHFM badanie kariotypu metodą klasyczną z zastosowaniem techniki prążków G może okazać się wystarczające dla określenia przyczyny wady. Dotyczy to dużych aberracji chromosomowych, takich jak np. delecje obejmujące *locus* 7q21-q22 (SHFM1) [Crackower i wsp., 1996; Duijf i wsp., 2003; Elliott i wsp., 2006] czy region 2q31 (SHFM5) [Goodman i wsp., 2002; Elliott i wsp., 2005]. Zaletą tej metody jest przede wszystkim niski koszt oraz możliwość wykrycia zmian zrównoważonych (np. translokacji czy inwersji), które są nierzadkie w regionie SHFM1. Klasyczna ocena chromosomów z wzorem prążkowym GTG powinna być rutynowo brana pod uwagę w zespołowych typach SHFM, zwłaszcza w przypadkach współwystępowania innych wad wrodzonych czy niepełnosprawności intelektualnej, co jest częste w SHFM5 [Elliott i wsp., 2006]. Kolejnym istotnym testem diagnostycznym jest sekwencjonowanie genu *TP63*. Mutacje w *TP63* stanowią przyczynę ok. 16% izolowanych SHFM oraz aż 95% przypadków EEC. Mutacje te mogą być zmianami występującymi *de novo* lub dziedziczonymi autosomalnie dominująco z 50% ryzykiem przekazania wady. Mutacje w *TP63* wykazują pełną penetrację ale zmienną ekspresję cechy [de Mollerat i wsp., 2003a].

Do tej pory opisano dwa *loci* chromosomowe, w których identyfikowano homozygotyczne lub złożone heterozygotyczne mutacje w genach *WNT10B* [Ugur i wsp., 2008] oraz *DLX5* [Shamseldin i wsp., 2012] odpowiadające za dziedziczenie recesywne. Ponieważ jednak przypadki wystąpienia wady o autosomalnym recesywnym rodzaju dziedziczenia są niezwykle rzadkie, dlatego sekwencjonowanie w/w genów powinno być rozpatrywane na końcowych etapach postępowania diagnostycznego.

Wiele kłopotów interpretacyjnych przysparza wada spowodowana duplikacją w regionie 17p13.3 (SHFM/SHFLD), ze względu na obniżony poniżej 50% stopień penetracji zmiany. Oznacza to, że duplikacja jest często odziedziczona po zdrowym rodzicu probanda. Wskazuje się również na efekt płci, jako czynnika wpływającego na stopień penetracji cechy, gdyż ok. 72% pacjentów stanowią mężczyźni, podczas gdy kobiety są najczęściej bezobjawowymi nosicielkami duplikacji. Oszacowano, iż ryzyko wystąpienia wady u potomstwa zdrowych nosicieli duplikacji 17p13.3 wynosi ok. 36% dla chłopców i 15% dla dziewczynek [Klopocki i wsp., 2012].

Dostępność molekularnych testów oraz technik umożliwiających identyfikację przyczyny molekularnej wady ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp przyczyniła się do poprawy jakości diagnostyki genetycznej u pacjentów dotkniętych tą oraz innymi wadami wrodzonymi kończyn. Genetyczna i kliniczna heterogenność SHFM, jak również wysoki odsetek pacjentów o wykluczonych znanych przyczynach wady sprawia, iż poradnictwo genetyczne jest dla wielu z nich wyjątkowo trudne, zwłaszcza w kontekście oceny ryzyka wystąpienia wady w kolejnych pokoleniach. Dlatego też rzetelnie przeprowadzona diagnostyka i identyfikacja mutacji sprawczej jest niezwykle istotna zarówno dla chorego, jak i dla jego rodziny. Po pierwsze, umożliwia choremu i/lub jego rodzicom zrozumienie przyczyny wady i charakteru zmiany genetycznej. Po drugie, pozwala określić rodzaj dziedziczenia mutacji i oszacować ryzyko wystąpienia wady w następnym pokoleniu, co umożliwia rodzicom świadome kształtowanie planów prokreacyjnych. Po trzecie, po wykluczeniu wszystkich znanych zmian molekularnych powodujących SHFM, odpowiednio dobrane badania molekularne (np. aCGH, sekwencjonowanie eksomu – WES ang. *whole exome sequencing*, sekwencjonowanie genomu – WGS ang. *whole genome sequencing*) stwarzają możliwość wykrycia nowych przyczyn molekularnych rozszczepów rąk i/lub stóp.

Tabela 1. Kliniczna i molekularna charakterystyka zananych *loci* w wadach ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp.

<i>Locus</i> SHFM	Rodzaj mutacji	Częstość mutacji	Rodzaj dziedziczenia	Fenotyp kończynowy	Zespół wad/wady pozakończynowe/NI	Piśmiennictwo
SHFM1	rearanżacje w <i>locus</i> 7q21.3-q22.1	brak danych	AD	SHFM	EEC/ niedosłuch typu odbiorczego, NI	Crackower i wsp., 1996
	mutacje w <i>DLX5</i>	1 rodzina	AR			Shamseldin i wsp., 2012
SHFM2	Xq26	1 rodzina	XR	SHFM, syndaktylia, niedorozwój kości śródreżca, niedorozwój kości palców	ND	Faiyaz ul Haque i wsp., 1993
SHFM3	dup10q24	20%	AD	SHFM, trójpalczkowe i/lub zdwojone kciuki,	ND	de Mollerat i wsp., 2003
SHFM4	mutacje w <i>TP63</i>	10-16% (formy niespołowe), 93% (zespół EEC)	AD	SHFM	EEC, ADULT, LADD, CHARGE, VATER/NI	van Bokhoven i wsp., 2001; de Mollerat i wsp., 2003a
SHFM5	del2q31	brak danych	AD	SHFM	NI, dysplazja ektodermalne i wady twarzoczaszki, rozszczep wargi/podniebienia	Goodman i wsp., 2002
SHFM6	mutacje w <i>WNT10B</i>	3 rodziny, 1 przypadek	AR	SHFM, skrócenie kości piszczelowych	ND	Ugur i wsp., 2008; Blattner i wsp., 2010; Khan i wsp., 2012
SHFM/SHFLD	dup17p13.3	12% (SHFM), 90% (SHFLD)	AD	SHFM, skrócenie kości długich	ND	Klopocki i wsp., 2012

SHFM – rozszczep rąk i/lub stóp; SHFLD – rozszczep rąk i/lub stóp ze skróceniem kości długich

dup10q24 – duplikacja w *locus* 10q24; del2q31 – delecja w *locus* 2q31; dup 17p13.3 – duplikacja w *locus* 17p13.3

AD – autosomalny dominujący, AR – autosomalny recesywny, XR – sprzężony z X recesywny

EEC – zespół EEC; ADULT – zespół ADULT; LADD – zespół LADD; CHARGE – zespół CHARGE; VATER – asocjacja VATER; NI – niepełnosprawność intelektualna

ND – nie dotyczy

2. CELE PRACY

Wady ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp są zróżnicowane pod względem klinicznym i genetycznym. Zmienna ekspresja cechy, niepełna penetracja czynnika patogennego oraz wysoki odsetek przypadków o nieokreślonej przyczynie genetycznej wady, mogą stanowić wyzwanie dla lekarza genetyka w ocenie jej molekularnego podłoża. Dostępne testy diagnostyczne umożliwiają identyfikację wady u ok. 50% pacjentów manifestujących rozszczep rąk i/lub stóp. Głównym założeniem niniejszej pracy było poszerzenie zakresu wiedzy dotyczącej molekularnego podłoża rozszczepów rąk i/lub stóp. W związku z powyższym, sformułowano następujące cele rozprawy doktorskiej:

1. Identyfikacja oraz analiza podłoża molekularnego wrodzonych wad rozwojowych ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp u pacjentów zakwalifikowanych do badań.
2. Ocena częstości poszczególnych mutacji w genach/regionach zidentyfikowanych u pacjentów dotkniętych typowym i atypowym rozszczepem rąk i/lub stóp.
3. W przypadku identyfikacji nowych genów i/lub regionów oraz potwierdzenia ich udziału w patogenezie rozszczepu rąk i/lub stóp opracowanie nowych testów umożliwiających diagnostykę genetyczną wady o nowo poznanym podłożu molekularnym.
4. Ocena przydatności technik porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej oraz sekwencjonowania eksomu w diagnostyce genetycznej wad kończyn o typie rozszczepu.

3. PACJENCI I METODY

3.1. Pacjenci – rekrutacja oraz kryteria włączenia do badań

W badaniach wzięli udział wyłącznie pacjenci, których rodzice lub opiekunowie prawni wyrazili świadomą zgodę na przeprowadzenie badań molekularnych. Badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Analizą objęto grupę 35 probandów ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp, z czego zdecydowaną większość (30 przypadków) stanowili pacjenci z izolowaną formą wady. W pozostałej grupie (5 pacjentów), ektrodaktylii towarzyszyła przynajmniej jedna dodatkowa wada wrodzona lub opóźnienie rozwoju psychoruchowego/niepełnosprawność intelektualna. Spośród wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do badań, 17 manifestowało typowy SHFM. U pozostałych probandów wada miała postać atypową. W tej grupie, u 12 chorych wadzie rąk i/lub stóp towarzyszyło skrócenie kości długich (SHFLD). W grupie pacjentów włączonych do badań, przypadki sporadyczne o obustronnej manifestacji wady stanowiły 86% (30 pacjentów). Pacjenci, u których wada występowała rodzinnie stanowili 14% (5 przypadków). Uznawano, że wada ma postać rodzinną w sytuacji wystąpienia malformacji kończyn u krewnych I stopnia probanda (rodzice, rodzeństwo, potomstwo), a także II lub III stopnia ze względu na możliwość niepełnej penetracji cechy w jednym pokoleniu. W przypadku rodzinnego wystąpienia wady dopuszczano również jej jednostronną manifestację. Kryterium rodzinnego uwarunkowania wady zostało ustalone przez lekarza genetyka konsultującego pacjentów (Dr n. med. Aleksander Jamsheer).

Do badań genetycznych nie włączono pacjentów, u których wada wrodzona wystąpiła na skutek uszkodzenia mechanicznego (np. sekwencja pasm owodniowych) lub potencjalnej ekspozycji na znany teratogen.

Głównym źródłem pacjentów zakwalifikowanych do badań były poradnie genetyczne, przede wszystkim NZOZ Centrum Genetyki Medycznej GENESIS w Poznaniu. Pacjentom proponowano udział w badaniach genetycznych również za pośrednictwem witryny internetowej organizacji "W naszych rękach" (www.wady-dloni.org.pl), na której umieszczony jest list informujący o możliwości bezpłatnego udziału w badaniach genetycznych na zasadach naukowych. Ponadto pacjenci rekrutowani byli z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych (PRWWR). Dzięki zawartym w formularzu

zgłoszeniowym do PRWWR informacjom o rodzaju wady, określającym m. in. jej jedno- lub obustronność, obecność wad u innych członków rodziny, a także umieszczonym danym osobowym i adresowym, możliwe było nawiązanie kontaktu z rodzicami dziecka i zaproponowanie im badań genetycznych.

Wśród pacjentów poddanych badaniom molekularnym można wyróżnić dwie grupy: pacjenci nie objęci wcześniej diagnostyką i poradnictwem genetycznym (20 probandów) oraz pacjenci, u których najczęstsze przyczyny molekularne zostały wykluczone w toku uprzednio wykonanych badań (15 probandów) [Jamsheer, 2011].

W niniejszej pracy przeprowadzono wybrane badania genetyczne na polskiej grupie kontrolnej liczącej 192 zdrowe dorosłe osoby (96 mężczyzn i 96 kobiet) bez strukturalnych wad wrodzonych, wykorzystując zasoby Katedry Genetyki Medycznej UM w Poznaniu.

3.2. Diagnostyka kliniczna

Diagnostyka kliniczna mająca na celu kwalifikację poszczególnych pacjentów do badań molekularnych oraz dobór odpowiednich testów genetycznych, została przeprowadzona przez współpracującego z autorką lekarza, specjalistę w zakresie genetyki klinicznej, z doświadczeniem w zakresie diagnostyki klinicznej i molekularnej wrodzonych wad kończyn (Dr n. med. Aleksander Jamsheer). W związku z powyższym, gromadzona do badań grupa pacjentów podlegała rzetelnej ocenie klinicznej. Współpracujący z autorką lekarz genetyk osobiście konsultował wszystkich probandów zgłaszających się do poradni genetycznej w Poznaniu i jej oddziału w Zielonej Górze oraz zdalnie, pacjentów będących pod opieką innych poradni.

Badania kliniczne obejmowały [na podstawie: Jamsheer, 2011]:

1) Wywiad, przeprowadzony przez lekarza genetyka w rozmowie z pacjentem lub jego rodzicem (rodzicami)/ opiekunem prawnym. Wywiad obejmował:

- wywiad rodzinny (ze szczególnym uwzględnieniem wystąpienia w rodzinie przypadków wrodzonych wad kończyn, innych wad wrodzonych, opóźnienia rozwoju psychoruchowego/niepełnosprawności intelektualnej);
- pokrewieństwo rodziców probanda;
- przebieg ciąży z probandem (w tym ekspozycję na czynniki teratogenne, stosowanie leków oraz infekcje przebyte przez matkę w czasie ciąży);

- przebieg porodu;
- rozwój psychoruchowy;
- obecność innych wrodzonych wad rozwojowych;
- aktualną opiekę specjalistyczną nad probandem;

2) Przegląd dotychczasowej dokumentacji medycznej pacjenta, w tym: zdjęć kończyn dotkniętych wadą, wykonanych przed ewentualną interwencją chirurgiczną, zdjęć RTG kończyn oraz wyników przeprowadzonych badań obrazowych narządów wewnętrznych (w przypadku zespołów wrodzonych wad mnogich).

3) Badanie przedmiotowe pacjenta, które służyło dokładnej ocenie fenotypu i lokalizacji wady kończyn, ocenie etiologii wady (czynniki genetyczne/ środowiskowe), identyfikacji ewentualnych wad towarzyszących, nieprawidłowości w budowie ciała, asymetrii kończyn, zaburzeń proporcji poszczególnych segmentów ciała, dysmorfii.

Ze względu na to, że wiek pacjentów nie był istotnym czynnikiem w ocenie typu malformacji kończyn, nie został on uwzględniony w opisie klinicznym pacjentów.

3.3. Materiał do badań

3.3.1. Izolacja genomowego DNA

Materiał do badań stanowił DNA wyizolowany z limfocytów 5-10 ml krwi obwodowej (1-2 ml - w przypadku noworodków i niemowląt), pobranej do jałowych probówek z antykoagulantem EDTA. Krew pobierana była od probanda i obojga jego rodziców oraz, w przypadkach rodzinnego uwarunkowania wady, od pozostałych dostępnych krewnych probanda. W dwóch przypadkach autorka nie dysponowała materiałem biologicznym rodziców pacjenta, co uniemożliwiło ocenę pochodzenia rodzicielskiego stwierdzonej zmiany.

Izolację DNA przeprowadzono z 1-10 ml krwi obwodowej metodą wysalania białek [Sambrook i wsp. 2001].

Protokół izolacji:

1. Przeprowadzono lizę erytrocytów poprzez dodanie do krwi 20 ml buforu lizującego. Próbkę mieszano przez odwracanie probówki i inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej.
2. Próbkę wirowano w 4°C przy 2600 rpm przez 30 min. Supernatant zlewano z nad osadu.
3. Osad leukocytów przemywano trzykrotnie 20 ml 1x TKM, każdorazowo wirując próbkę w 4°C przy 2600 rpm przez 30 min.
4. Osad zawieszano w 750 µl buforu TKM, rozbijano i przenoszono do probówki 2 ml.
5. Do zawiesiny komórek dodawano 400 µl 10% SDS i mieszano przez odwracanie.
6. Próbkę inkubowano w 60°C z wytrząsaniem (650 rpm) przez 20 min.
7. Do próby dodawano 800 µl 5M NaCl i wytrząsano na mieszadle typu vortex przez około 20 sek.
8. Próbkę wirowano w temp. pokojowej przez 30 min. przy 11800 rpm.
9. Supernatant przenoszono do probówki o pojemności 15 ml i dodawano 3 obj. 96% etanolu, celem wytrącenia DNA.
10. Próbkę inkubowano 15 min. w temp. pokojowej, a następnie wytrącano DNA poprzez delikatne obracanie probówki.
11. Wytrącone DNA przenoszono do probówki 1,5 ml i dwukrotnie płukano 70% etanolem (-20°C) każdorazowo wirując próbkę w temp. pokojowej przez 5 min. przy 9200 rpm.
12. Supernatant dokładnie usuwano i suszono osad w 37°C. Wysuszony osad rozpuszczano w ok. 500 µl wody przez minimum 16 godz. w temp 37°C.

3.3.2. Ocena ilościowa i jakościowa wyizolowanego DNA

Wyizolowany DNA poddawano analizie ilościowej i jakościowej poprzez pomiar jego stężenia oraz rozdział elektroforetyczny. Stężenie próby DNA mierzono przy pomocy spektrofotometru *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific) przy długości fali 260 nm, 280 nm i 320 nm. Stosunek absorbancji A_{260}/A_{280} pozwala na ocenę stopnia czystości DNA

(A_{260} - maksimum absorpcji dla kwasów nukleinowych, A_{280} - maksimum absorpcji dla białek). Graniczna wartość stosunku absorpcji A_{260}/A_{280} wynosi 1,8-2,0. Odstępstwa od tych wartości świadczą o zanieczyszczeniu próby DNA białkami lub solami. Stopień integralności wysokocząsteczkowego DNA oceniano przy pomocy rozdziału roztworu DNA na 1% żelu agarozowym (z dodatkiem bromku etydyny o stężeniu końcowym 0,1 $\mu\text{g/ml}$), względem standardu wielkości (Lambda DNA/Hind III). Elektroforezę prowadzono w buforze TAE, przy natężeniu 110 V przez 45 min. Rozdzielone DNA wizualizowano w systemie do dokumentacji żeli *Gel Doc 2000* (BIO-RAD).

3.4. Metody badawcze

Informacje uzyskane w toku badań klinicznych przeprowadzonych przez lekarza genetyka pozwoliły na wykluczenie bądź zakwalifikowanie pacjenta do badań genetycznych, mających na celu ustalenie przyczyny molekularnej wady. Ze względu na wynikający z oceny klinicznej rodzaj wady (SHFM typowy/atypowy, izolowany/zespołowy), dobierany był odpowiedni algorytm diagnostyczny, ustalający kolejność wykonywania określonych testów genetycznych u danego pacjenta.

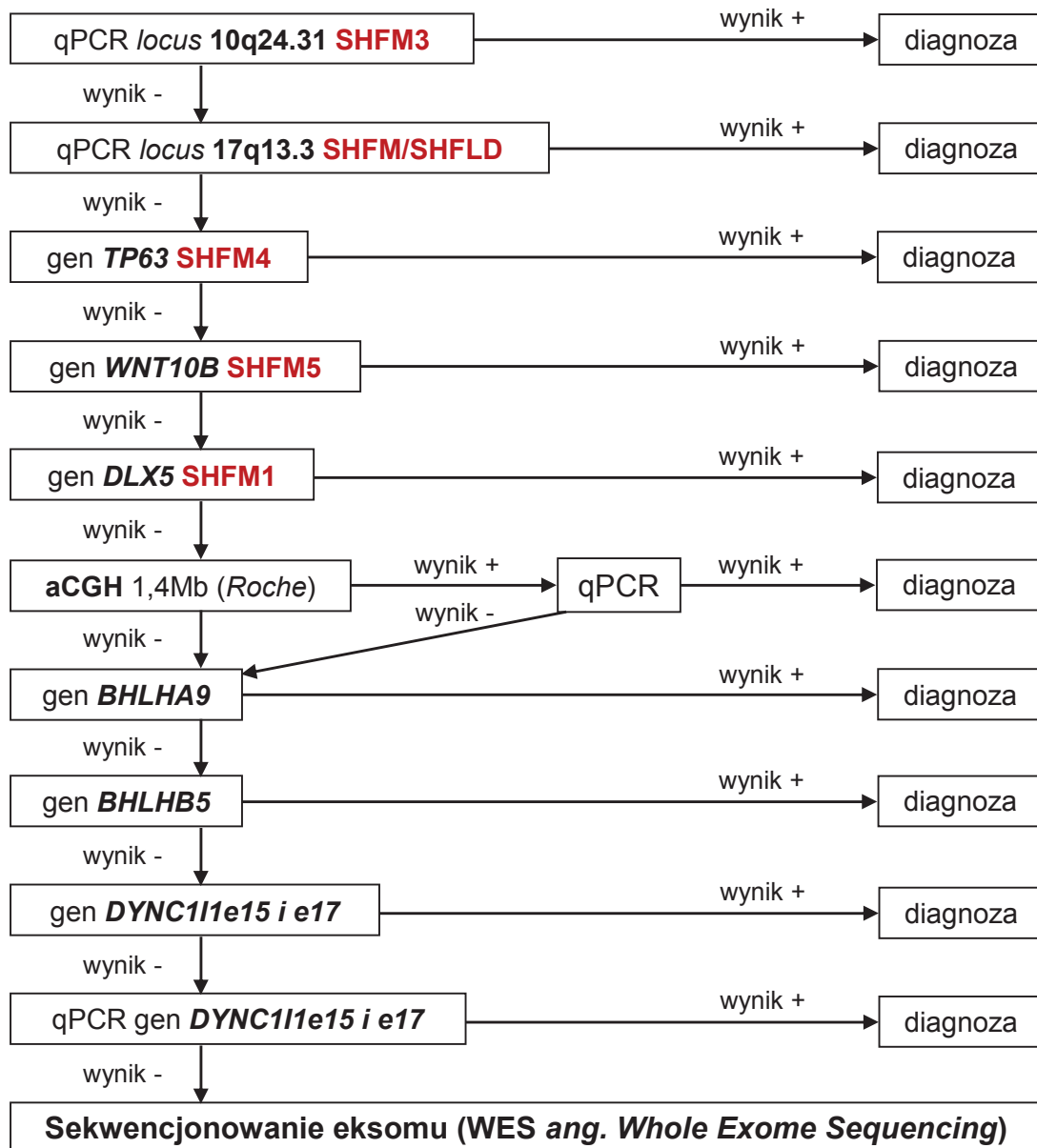
Opracowany przez autorkę ogólny **schemat postępowania diagnostycznego** zakładał przeprowadzenie następujących po sobie etapów badań genetycznych w zależności od uzyskania pozytywnego lub negatywnego wyniku analizy poprzedzającej. Zgodnie z tym założeniem, identyfikację przyczyny molekularnej wady u pacjentów ze spektrum SHFM prowadzono począwszy od najczęstszych zmian typowych dla danego typu ektrodaktylii przez zmiany rzadziej stwierdzane (np. w recesywnym uwarunkowaniu wady), zmiany genomowe, mutacje w genach kandydujących, aż po sekwencjonowanie eksomu.

Pierwszym etapem badań była diagnostyka genetyczna przeprowadzona w kierunku identyfikacji najczęstszych zmian odpowiadających za fenotyp rozszczepu rąk i/lub stóp, czyli duplikacji w regionach 10q24.31-32 (SHFM3), 17q13.3 (SHFM/SHFLD) oraz mutacji punktowych w sekwencji kodującej genu *TP63* (SHFM4). Badania te wykonano w grupie pacjentów nie objętych wcześniej diagnostyką i poradnictwem genetycznym. Następnie, u pacjentów z negatywnym wynikiem niniejszych badań, wykonano analizę sekwencyjną genów odpowiadających za recesywnie uwarunkowane typy wady (*WNT10B*, *DLX5*). Kolejnym etapem było przeprowadzenie badania porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH). Badanie to umożliwiło identyfikację

pozostałych znanych, choć rzadszych, niezrównoważonych submikroskopowych zmian genomowych stanowiących przyczynę SHFM (np. w *locus* 7q21) oraz nowych (nieopisanych), potencjalnie patogenicznych zmian. Wszystkie zmiany strukturalne wykryte w badaniu aCGH były oceniane pod względem polimorficzności lub patogeniczności w trakcie analizy bioinformatycznej. Obecność wytypowanych zmian była następnie weryfikowana niezależną metodą (qPCR) u probanda, jak również sprawdzano nosicielstwo rearanżacji u dostępnych krewnych probanda. W przypadku identyfikacji nieopisanej dotąd w piśmiennictwie patogenicznej aberracji, mapowano dokładne punkty złamań. U pacjentów z negatywnym wynikiem badań aCGH wykonano sekwencjonowanie genów kandydujących, potencjalnie zaangażowanych w patogenezę SHFM (*BHLHA9*, *BHLAB5*, *DYNCH11e15 i e17*). Dodatkowo u pacjentów z typowym SHFM przeprowadzono badanie qPCR, w celu oceny liczby kopii eksonów 15 i 17 genu *DYNCH11*. U 10 probandów z negatywnym wynikiem w/w badań przeprowadzono sekwencjonowanie eksomu, w celu identyfikacji mutacji punktowych w całej sekwencji kodującej genomu. Potencjalnie patogeniczne zmiany u probanda oraz w badaniach rodzinnych weryfikowano sekwencjonowaniem metodą Sanger.

Badania rodzinne

Wszystkie potencjalnie patogeniczne mutacje były weryfikowane w badaniach rodzinnych w celu wykluczenia nosicielstwa wykrytej zmiany u rodziców pacjenta lub jej potwierdzenia u obciążonych wadą krewnych probanda (przypadki rodzinne). W analizie wyników badania rodzinnego przyjęto zasadę, iż wykluczenie nosicielstwa wykrytej zmiany u zdrowych rodziców pacjenta lub potwierdzenie jej kosegregacji z fenotypem u krewnego dotkniętego wadą, jest silnym argumentem przemawiającym za patogenicznością wykrytej zmiany. Dopuszczano jednakże możliwość niepełnej penetracji, co w określonych przypadkach może tłumaczyć bezobjawowe nosicielstwo patogenicznej zmiany u zdrowego krewnego probanda.



Rycina 4. Przyjęty w pracy ogólny algorytm postępowania diagnostycznego w wadach ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp.

3.4.1. Sekwencjonowanie metodą Sangera oraz sposób analizy wyników

Sekwencjonowanie znanych oraz potencjalnie patogennych genów/regionów.

W celu identyfikacji u pacjentów mutacji w znanych genach zaangażowanych w patogenezę SHFM (*TP63*, *WNT10B*, *DLX5*) oraz genach kandydujących o potencjalnym znaczeniu patogennym (*BHLHA9*, *BHLAB5*, *DYNC11I*, *ROBO1*, *ODZ4*, *DLX6*, *DSS1*), zaprojektowano startery obejmujące eksony, złącza ekson-intron oraz fragmenty intronów przylegające do eksonów. Analizie sekwencji kodującej poddano wszystkie eksony genów

TP63, *WNT10B*, *DLX5*, *BHLHA9*, *BHLAB5*. W przypadku genów *DYNC111*, *ROBO1*, *ODZ4*, sekwencjonowano wybrane fragmenty. Sekwencje starterów (F – *forward*; R – *reverse*) specyficznych do danych fragmentów DNA projektowano przy użyciu programu *Primer3*, a następnie sprawdzano pod względem specyficzności przy użyciu programu *BLAST* (dostępnego na witrynie internetowej *Ensembl*). PCR amplifikacyjną przeprowadzano w objętości 10 µl na matrycy DNA pacjenta, w mieszaninie reakcyjnej o następującym składzie:

- FailSafe™ Premix J	- 5,0 µl
- startery F+R (10 pmol/µl)	- 1,0 µl
- matryca DNA (100-200 ng/ µl)	- 0,5 µl
- Polimeraza DNA HiFiTaq	- 0,1 µl
- H ₂ O	- 3,4 µl

Do amplifikacji fragmentów genu *TP63* używano programu ***multi-step PCR***:

<u>95°C</u>	<u>2 min.</u>	
94°C	30 sek.	
61°C	45 sek.	x 2 cykle
<u>72°C</u>	<u>45 sek.</u>	
94°C	30 sek.	
59°C	45 sek.	x 2 cykle
<u>72°C</u>	<u>45 sek.</u>	
94°C	30 sek.	
57°C	45 sek.	x 2 cykle
<u>72°C</u>	<u>45 sek.</u>	
94°C	30 sek.	
55°C	45 sek.	x 31 cykli
<u>72°C</u>	<u>45 sek.</u>	
72°C	10min.	
4°C	∞	

Do amplifikacji pozostałych genów/fragmentów genów używano programu ***touch-down PCR*** :

<u>95°C</u>	<u>3 min.</u>	
94°C	15 sek.	
63°C	30 sek.	(-0,2) x 40 cykli
<u>72°C</u>	<u>45 sek.</u>	
72°C	10min.	
4°C	∞	

Zamplifikowane produkty DNA sprawdzano pod względem specyficzności w trakcie rozdziału elektroforetycznego na 1,5% żelu agarozowym (z dodatkiem bromku etydyny

o stężeniu końcowym 0,1 µg/ml), wobec standardu wielkości (*GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder*). Elektroforezę prowadzono w buforze TAE, przy natężeniu 140 V przez 35 min. Produkty PCR wizualizowano w systemie do dokumentacji żeli *Gel Doc 2000* (BIO-RAD).

Wszystkie otrzymane w wyniku PCR produkty oczyszczano enzymatycznie, trawiąc jednoniciowe fragmenty DNA w reakcji z wykorzystaniem enzymu ExoI (Eksonukleaza I) oraz defosforylując nieużyte w PCR ddNTPy z wykorzystaniem enzymu SAP (fosfataza alkaliczna pochodząca z krewetek, ang. *shrimp alkaline phosphatase*)

Oczyszczanie prowadzono w 10 µl mieszaniny reakcyjnej o następującym składzie:

- produkt PCR	- 8 µl
- SAP (500U)	- 0,3 µl
- ExoI (4000U)	- 0,08 µl
- H ₂ O	- 1,62 µl

Reakcję prowadzono w warunkach:

37°C	15 min.
<u>72°C</u>	<u>15 min.</u>
4°C	∞

W drugim etapie badań, na matrycy otrzymanych produktów wykonano PCR sekwencyjną (usługa zlecona) przy użyciu zestawu *BigDyeTerm v3.1* (Applied Biosystems).

Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący:

- <i>Big Dye Terminator</i>	- 1,5 µl
- <i>BigDye v3.1</i>	- 1,0 µl
- starter F lub R (10 pmol/µl)	- 0,5 µl
- produkt PCR (matryca)	- 1,0 µl
- H ₂ O	- 6,0 µl

Reakcję prowadzono w warunkach:

<u>96°C</u>	<u>1 min.</u>	
96°C	30 sek.	
50°C	30 sek.	25 cykli
<u>60°C</u>	<u>4 min.</u>	
4-8°C	∞	

Rozdział produktów sekwencjonowania przeprowadzono na 48-kapilarnym sekwenatorze *3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems).

Wyniki sekwencjonowania analizowano w programie *BioEdit*, porównując sekwencję próby badanej do sekwencji referencyjnej. Aby określić patogenność wykrytej zmiany, w pierwszej kolejności prowadzono analizę bioinformatyczną z wykorzystaniem internetowych baz danych (*Ensembl*, HGMD, *Exome Variant Server*) oraz internetowych programów (*PolyPhen2*, SIFT, *MutationTaster*). Następnie w badaniach rodzinnych określano nosicielstwo zidentyfikowanej, potencjalnie patogennej zmiany u krewnych pacjenta.

Charakterystyka programów internetowych i baz danych, wykorzystywanych do oceny stopnia patogenności mutacji typu *missense* (adresy internetowe – patrz Tabela 5).

W przypadku identyfikacji nowych, nieopisanych mutacji typu *missense* w badanych genach, niezwykle istotne jest określenie czy dana zmiana niesynonimiczna (powodująca zamianę aminokwasu) ma charakter polimorficzny, czy potencjalnie patogenny. Analizy tej można dokonać w oparciu o internetowe programy komputerowe umożliwiające ocenę *in silico* wpływu danej mutacji na strukturę i właściwości fizykochemiczne białka. W tym celu autorka korzystała z następujących programów:

SIFT (ang. *Sorting Intolerant From Tolerant*) – program przewiduje, czy zamiana aminokwasu wpływa na funkcję białka na podstawie oceny stopnia zakonserwowania ewolucyjnego danej reszty aminokwasowej w białku. Substytucje aminokwasowe w regionach niehomologicznych nie mają najczęściej negatywnego wpływu na funkcję białek, podczas gdy zmiana w regionie o wysokim stopniu zakonserwowania ewolucyjnego może z dużym prawdopodobieństwem wykazywać charakter patogenny. Program określa stopień, w jakim dana zmiana wywiera efekt na białko, w oparciu o wyliczony współczynnik SIFT (SIFT score), którego graniczna wartość wynosi 0,05. Wynik poniżej 0,05 wskazuje na patogenny charakter zmiany, określanej jako „uszkodzająca (ang. *Damaging*)”. Wartość równa lub powyżej 0,05 świadczy o znikomym wpływie mutacji na właściwości białka, co określane jest mianem „tolerowana (ang. *Tolerated*)” [Kumar i wsp. 2009].

PolyPhen2 (ang. *Polymorphism Phenotyping v2*) – przewiduje wpływ mutacji typu *missense* na strukturę i funkcję białka w oparciu o cechy strukturalne nowego wariantu oraz stopień zakonserwowania ewolucyjnego sekwencji aminokwasowej. Program określa prawdopodobieństwo patogennego charakteru zmiany w skali 0-1, posługując się współczynnikiem (PolyPhen2 score). Nowy wariant zostaje sklasyfikowany jako

prawdopodobnie patogenny, jeśli współczynnik ma wartość powyżej 0,85. Zmiana jest dodatkowo definiowana przy pomocy określeń: „Probably damaging” – prawdopodobnie patogenna, „Possibly damaging” – możliwa patogenność, „Benign” – najprawdopodobniej łagodna. Analizę wyników przeprowadza się w oparciu o dwa zestawy danych: HumDiv i HumVar. Pierwszy model jest sporządzony na podstawie 3155 patogennych alleli z bazy UniProt, odpowiadających za ludzkie choroby jednogenowe i wpływających na stabilność i funkcję białek oraz na podstawie 6321 niepatogennych wariantów wykazujących homologię pomiędzy allelami ludzkimi i innych ssaków. Model ten powinien być używany do oceny patogenności rzadkich alleli w *loci* dla chorób wieloczynnikowych, w których warianty o nieznacznym wpływie na białko powinny być traktowane jako patogene. Drugi model HumVar zestawia wszystkie (13032) allele patogene z bazy UniProt razem z 8946 ludzkimi niesynonimicznymi SNP, występującymi z częstością powyżej 1%, o nieopisanym znaczeniu patogennym. Model powinien być stosowany w badaniach nad chorobami jednogenowymi, wymagającymi rozróżnienia pomiędzy mutacją o znaczącym wpływie na białko, a pozostałymi wariantami, w tym zmianami o niskiej szkodliwości [Adzhubei i wsp. 2010].

MutationTaster – program przewiduje patogenny charakter zmiany posługując się klasyfikatorem Bayesa. Wyliczenia mające na celu określenie czy dany wariant jest patogenną mutacją, czy łagodnym polimorfizmem opierają się na danych z bazy *HGMD Professional*, zawierającej ponad 390000 opisanych mutacji patogennych oraz bazy *1000 Genomes Project* (TGP), zawierającej ponad 6,8 miliona łagodnych polimorfizmów typu SNP i Indel.

Do oceny patogenności znanych (opisanych) zmian stosowano następujące programy i bazy danych:

HGMD Professional (ang. *Human Gene Mutation Database*) – internetowa baza zawierająca zbiór znanych (opisanych) zmian w genomie (mutacje *missense/nonsense*, mutacje splicingowe, mutacje regulatorowe, małe i duże delecje i duplikacje, zmiany typu indel, złożone rearanżacje, mutacje powtórzeniowe), odpowiedzialnych za wystąpienie ludzkich chorób dziedzicznych.

EVS (ang. *Exome Variant Server*) – serwer projektu *Exome Sequencing Project* (ESP) zawierający zbiór polimorficznych wariantów z analizy 6,5 tysiąca eksomów ludzkich.

Mapowanie punktów złamań

Dokładną lokalizację punktów złamań zmiany w *locus* 7q21, zidentyfikowanej u pacjentów w badaniu qPCR, oznaczono metodą sekwencjonowania Sangera. Startery do tej analizy zaprojektowano korzystając z internetowego programu *Primer3*.

Warunki reakcji amplifikacji dla delecji w *locus* 7q21 były następujące :

- Reakcję PCR prowadzono w 10 μ l. Skład mieszaniny reakcyjnej :

- <i>FailSafe</i> TM <i>Premix J</i> (2x)	- 5,0 μ l
- startery F+R (10 pmol/ μ l)	- 1,0 μ l
- matryca DNA (100-200 ng/ μ l)	- 0,5 μ l
- Polimeraza DNA <i>HiFiTaq</i>	- 0,1 μ l
- H ₂ O	- 3,4 μ l

- Program amplifikacji :

<u>95°C</u>	<u>3 min.</u>	
94°C	15 sek.	
60°C	30 sek.	x 40 cykli
<u>72°C</u>	<u>45 sek.</u>	
72°C	10 min.	
4°C	∞	

Warunki reakcji amplifikacji dla delecji w *locus* Xp22.31 były następujące :

- Reakcję PCR prowadzono w 10 μ l. Skład mieszaniny reakcyjnej :

- Bufor I (10x)	- 1,0 μ l
- startery F+R (10 pmol/ μ l)	- 0,6 μ l
- dNTP Mix (10 mM)	- 0,35 μ l
- matryca DNA (150 ng/ μ l)	- 1,0 μ l
- Polimeraza DNA	- 0,15 μ l
- H ₂ O	- 6,9 μ l

Odczynniki pochodziły z zestawu do reakcji *PCR Expand Long Template PCR System v.24* (Roche)

- Program amplifikacji :

<u>94°C</u>	<u>2 min.</u>	
94°C	10 sek.	
60°C	30 sek.	x 10 cykli
<u>68°C</u>	<u>2 min.</u>	
94°C	15 sek.	
60°C	30 sek.	x 25 cykli
<u>68°C</u>	<u>140 sek.</u>	
68°C	7 min.	
4°C	∞	

Otrzymany produkt PCR sprawdzano pod względem jakościowym (wielkość produktu PCR dla *locus* Xp22.31 oceniano wobec standardu wielkości *Quick-Load® 1kb DNA Ladder*), oczyszczano i sekwencjonowano w warunkach opisanych powyżej.

Tabela 2. Zestawienie starterów wykorzystanych do PCR i sekwencjonowania.

Nazwa startera	Ekson	Sekwencja startera 5'-3'	Wielkość produktu
TP63 GenBank: NM_001114978			
TP63_e1F	ekson 1	TCCCGGCTTTATATCTATATATAC	211 pz
TP63_e1R		GACACATTCATAATACACAAGGCAC	
TP63_e2F	ekson 2	TCCACTTGGGTTTTCATGATAGAG	300 pz
TP63_e2R		GTAAGCAATATTTTGACCACCCAC	
TP63_e3F	ekson 3	GCTTGTTGTTAACAACAGCATG	281 pz
TP63_e3R		GAAAAGACAGGTTTAACAGAGC	
TP63_e4F	ekson 4	GTGAAGTGCTTCCGACGTG	488 pz
TP63_e4R		TCCACCATGAACATGGAATC	
TP63_e5F	ekson 5	GTTGGTTCTCTCCTTCCTTTC	291 pz
TP63_e5R		GCCCACAGAATCTTGACCTTC	
TP63_e6F	ekson 6	CCACCAACATCCTGTTTCATGC	267 pz
TP63_e6R		GTTCTCTCAAGTCTACTCAGTCC	
TP63_e7F	ekson 7	GGAAGAAGTGAAGAAGGAACAAC	253 pz
TP63_e7R		CAGCCACGATTTCACTTTGCC	
TP63_e8F	ekson 8	CAAGTGCTTTTGGGTCCATT	401 pz
TP63_e8R		CACTTGCTGCTGAAGGTCAC	
TP63_e9F	ekson 9	ATGCATTAGTGCTTTAGAAGT	184 pz
TP63_e9R		GAAGGTAAAATGAAGCAACC	
TP63_e10F	ekson 10	TGAGGATTGACCACACTTCTAAC	287 pz
TP63_e10R		CATCAATCACCTATTGCTGATC	
TP63_e11F	ekson 11	TGAACATCATTTCATGTTTGTC	254 pz
TP63_e11R		TCACAGAGTCTTGTCCTAAGC	
TP63_e12F	ekson 12	GGACTATAACAGTATCCGCC	294 pz
TP63_e12R		CAAGATGGACCACTGGGATG	
TP63_e13F	ekson 13	CTTATCTCGCCAATGCAGTTGG	240 pz

TP63_e13R		AACTACAAGGCGGTTGTCATCAG	
TP63_e14F	ekson 14	GGGAATGATAGGATGCTGTGG	449 pz
TP63_e14R		AAGATTAAGCAGGAGTGCTT	
DLX5 GenBank: NM_005221			
DLX5_e1F	ekson 1	CTTAGACCAGAGCAGCCCC	514 pz
DLX5_e1R		ATCTACCACCCCATCTCGC	
DLX5_e2F	ekson 2	TCTATTTGAGGCCCTTCCG	339 pz
DLX5_e2R		AGTCCCATCGAGACTGAACC	
DLX5_e3F	ekson 3	GTCCGAAGATGCCTCCAGTC	519 pz
DLX5_e3R		CAGTTTTCCGAACTTCCCC	
WNT10B GenBank: NM_003394			
WNT10B_e2F	ekson 1	GTGTCTGATTGGGCAAGGTT	491 pz
WNT10B_e2R		CTCATTGCTTAGAGCCCTGG	
WNT10B_e3F	ekson 2	GGAGAGTTGGAGGGGTCTG	405 pz
WNT10B_e3R		GAAACCATCCCTTCCCGC	
WNT10B_e4F	ekson 3	TGCCTGTCAACCTTACCTCC	470 pz
WNT10B_e4R		TAACCAGGCCTCAAAGCTG	
WNT10B_e5F	ekson 4	TGTGCCTCTGTGTTCTGTCC	598 pz
WNT10B_e5R		GAAATCAGAGCAAAGGGCTG	
BHLHA9 GenBank: NM_001164405			
BHLHA9_e1aF	ekson 1	ATAAAGCCCAGCTGGAAGG	561 pz
BHLHA9_e1aR		CGTGGCACTCCAGGTGTC	
BHLHA9_e1bF	ekson 1	CTACAACGAGGCCTTCAACG	540 pz
BHLHA9_e1bR		TGCAGTCCCGGGTTTTATAG	
BHLHB5 (BHLHE22) GenBank: NM_152414			
BHLHB5_e1aF	ekson 1	GGGAAGGCGAAAAAGAAAAA	505 pz
BHLHB5_e1aR		GCCGGCTGAACCTACTAGC	
BHLHB5_e1bF	ekson 1	GACGACCTCTTCCTGCACAA	598 pz
BHLHB5_e1bR		CACTGCTACCGCTGCTGCTA	
BHLHB5_e1cF	ekson 1	CTGCTCCAATGCCACCT	634 pz
BHLHB5_e1cR		GATTTTGGGTCGGTCTTGTG	
DYNC1I1 GenBank: NM_004411			
DYNC1I1_e15F	ekson 15	TAAAGCTCCGGTTCACCTTC	380 pz
DYNC1I1_e15R		AAAGGCCGTTTTGGAGAAAG	

DYNC1H1_e17F	ekson 17	TTCCAAGGGAAACATCTGCT	298 pz
DYNC1H1_e17R		GACTTGACTGCAGACGCTGA	
ODZ4 GenBank: NM_130969			
ODZ4_e9F	ekson 9	CTTCTGCACCACATCACCAG	354 pz
ODZ4_e9R		GGGTGCAGACTGTCCAGAAC	
ROBO1 GenBank: NM_133631			
ROBO1_e23F	ekson 23	TGATGACTCGCAAAGCTACG	493 pz
ROBO1_e23R		TTTCAACATCTAGTCGAGGTGC	
DLX6 GenBank: NM_005222			
DLX6_e1aF	ekson 1	GAGCTAAGGTGGCTGCAGAG	425 pz
DLX6_e1aR		GGTTGTAGGAGTTCCCTCCG	
DLX6_e1bF	ekson 1	ATCCGCCTTCATGGAGTTC	657 pz
DLX6_e1bR		CTAACTCGTCGAACGAAGCC	
DLX6_e2F	ekson 2	GGGGCATCATAGGGATTTTT	435 pz
DLX6_e2R		CTCCTTCCATCCTTGTTGA	
DLX6_e3F	ekson 3	CCCTGAGTGACGTTAGAGGC	388 pz
DLX6_e3R		CAGATACAAGCAGGTCCCG	
DSS1 GenBank: NM_006304			
DSS1_e1F	ekson 1	GTAGTGACGGTGGCGTTTC	216 pz
DSS1_e1R		CACGGAGGCCTGAGTCAC	
DSS1_e2F	ekson 2	TGAGTGTTTCAGTAGCAAGCTTTTC	342 pz
DSS1_e2R		AATCACAGGAGATGAAGACAATATG	
DSS1_e3F	ekson 3	CAAGCAGCCCACAGATCAC	237 pz
DSS1_e3R		CTCTCCAATCCTGTGCATCC	
region 7q21			
7q21_F	ND	GCCTGCAGACGTCATGTAAA	1138 pz
7q21_R	ND	TATCTGGGGCTGAGAAGCAT	
region Xp22.31			
Xp22_F	ND	TTCAGGCAGGAATGAGGTGT	1104 pz
Xp22_R	ND	CTTGCAGTGGCAAGAGTGTC	

3.4.3. Badania ilościowej PCR (qPCR ang. *quantitative PCR*)

Technika qPCR została wykorzystana w niniejszej pracy w celu identyfikacji najczęstszych zmian genomowych powodujących SHFM (duplikacji w *loci* 10q24.3, 17p13.3) oraz do weryfikacji zidentyfikowanych w badaniu aCGH rearanżacji genomowych. Startery projektowano w programie internetowym *Primer3*. Dla każdej zmiany zaprojektowano trzy pary starterów wewnątrz zmiany oraz dwie pary flankujące (w regionach niezmienionych), jedną w kierunku centromerowym, drugą w kierunku telomerowym od zmiany. DNA pacjentów przygotowywano w odpowiedni sposób. W dzień poprzedzający nastawienie reakcji qPCR, stężoną próbę DNA rozcieńczano pięciokrotnie. Po całonocnym rozpuszczaniu mierzono stężenie roztworu DNA, który następnie rozcieńczano do wartości 2ng/μl. Reakcja qPCR była prowadzona na sprzęcie *ViiA™ 7* (Applied Biosystems) na płytkach 96 lub 384-dółkowych.

Warunki qPCR były następujące:

- PCR prowadzono w 12 μl. Skład mieszaniny reakcyjnej :

- <i>Power SYBR® Green PCR Master Mix</i>	6 μl
- Startery (F+R) 5 pmol/μl	1 μl
- DNA (2 ng/μl)	5 μl

- Program amplifikacji :

<u>95°C</u>	<u>3 min.</u>	
95°C	30 sek.	
65°C	30 sek.	x 40 cykli
<u>72°C</u>	<u>60 sek.</u>	
72°C	10min.	
4°C	∞	

W celu określenia specyficzności produktów otrzymanych w reakcji PCR, wyznaczano krzywą topnienia produktu w warunkach:

95°C	15 sek.
60°C	60 sek.
90°C	15 sek.

Ocena ilościowa została przeprowadzona w oparciu o metodę $\Delta\Delta C_t$, zawartą w oprogramowaniu do analizy wyników qPCR, dostarczonym przez producenta *ViiA7 v1.2*

(Life Technologies). Jako kalibratora używano DNA kontrolnego, w którym wykluczono, metodą aCGH, obecność delecji lub duplikacji w badanym regionie. Pierwszą kontrolę wewnętrzną stanowił gen *ALB* (albumina), występujący u człowieka zawsze w dwóch kopiach. Drugą kontrolą wewnętrzną, amplifikowaną w jednej kopii u mężczyzn, był fragment genu *F8* (czynnik VIII układu krzepnięcia krwi), który zlokalizowany jest w chromosomie X. Każda próba była amplifikowana w trzykrotnym powtórzeniu.

Tabela 3. Zestawienie starterów wykorzystanych do analizy qPCR.

Nazwa startera	Sekwencja 5'-3'	Pozycja amplikonu wg HG19	Pozycja starterów
WEWNĘRZNA KONTROLA			
ALB_F	TTTCCATTCAACACCTCAGTCGT	154227828- 15422778	Region prawidłowy
ALB_R	GCCTTGGCTTAGCGATGTTG		
F8_F	TGAAATGGCTGACTGCTGTG	74274367- 74274386	Region prawidłowy
F8_R	GGAGGTTTGGGTTGTCATCT		
REGION 17p13.3 (<i>locus</i> SHFM/SHFLD) wg Klopocki i wsp. 2012 - DUPLIKACJA			
17p13.3A_F	CACAGAAATCACACCTCCAC	861123- 861211	Region flankujący
17p13.3A_R	ACGTTCTGTGAGGAAAACAG		
17p13.3B_F	GGGAACTCATTCATGGCAAG	1175230- 1175314	Region zduplikowany
17p13.3B_R	GGAGGGGTCTCTGGATGTCT		
17p13.3C_F	TGTGTAGCCTCCGTTACGTG	1177408- 1177489	Region zduplikowany
17p13.3C_R	ATGGACACGATCTTGGGAAG		
17p13.3D_F	AGAAGCCCCAGAGATTACC	1183589- 1183672	Region zduplikowany
17p13.3D_R	ATGATGAGGGGGATGAGGTT		
17p13.3E_F	AACCATTCCGCCATTTATCC	1240778- 1240846	Region flankujący
17p13.3E_R	CCATGACAAATAAAGCACCTGT		
REGION 10q24.31-32 (<i>locus</i> SHFM3) - DUPLIKACJA			
SHFM3P1_F	CACACACCACAGTCCAAAGG	102890158-102890237	Region flankujący
SHFM3P1_R	TTCAACCAGATTGCATTCCA		
SHFM3A_F	TGAAGGGATAGGGGCTTCTT	103055079- 103055163	Region zduplikowany
SHFM3A_R	GGAACAGTCCAGCTTTCAGC		
SHFM3B_F	TTAGTGCTGCCCCAAAATCT	103210440- 103210527	Region zduplikowany
SHFM3B_R	TGGCCACACATATCACCTTG		
SHFM3D1_F	AGCGGTGTTAACCATCACCT	103329132-103329219	Region zduplikowany
SHFM3D1_R	TCATCCTGGTGCCTTTCCT		

REGION 17q25.1 (gen <i>MFSD11</i>) - DELECJA			
17q25A_F	ATGGCTTCATTTTTTCGTTTCG	74562278- 74562357	Region flankujący
17q25A_R	CCAGGTCAGTGCCTATGGAT		
17q25B_F	CCTGCCCAAGTCTGTGATTT	74748772-74748852	Region wydeletowany
17q25B_R	TGCTGAGAGAGGTGGGTCTT		
17q25C_F	GCCCCCTTAGCGTAAACTTC	74767298- 74767385	Region wydeletowany
17q25C_R	AGGCCTGGAATTCCTCAGT		
17q25D_F	TCTGATCTGGTGCCGTGAG	74767298- 74767385	Region wydeletowany
17q25D_R	ATCAAAGGCGACTTCTTCCA		
17q25E_F	GATTTGAGACACCGGAAGA	75440499- 75440588	Region flankujący
17q25E_R	ACTCAAGCTCCCCTCTCCA		
REGION 6q27 - DUPLIKACJA			
6q27A_F	CGGGTCAAGCGTCACTATTT	168862357-168862441	Region flankujący
6q27A_R	GCCTCATCTGCATGGGTATT		
6q27B_F	ACTAGTGGGAAAAGGCACCA	169307850- 169307932	Region zduplikowany
6q27B_R	CAGGGAGAGAACCATCTGGA		
6q27C_F	CAAAGGGAGTTCCATCCTCA	169439857- 169439942	Region zduplikowany
6q27C_R	TCCAGAAAGTCTGGGTCTCC		
6q27D_F	TGCCTCTCTAAGCACCTTC	169485841- 169485925	Region zduplikowany
6q27D_R	TTGTGTGGCTCTCACTACGG		
6q27E_F	GTCAGTCACGCACACTTTGG	169485841- 169967390	Region flankujący
6q27E_R	ACCTGGACTCCTCACACCTG		
REGION Xp22.31 (gen <i>KALI</i>) - DUPLIKACJA			
Xp22A_F	GGAGAAAATAAGCCCCACAA	8589850- 8589932	Region flankujący
Xp22A_R	ATAATGTGCCCTGCAGTTTG		
Xp22B_F	TTATGGGCATCCTTTGGAGT	8593717- 8593799	Region flankujący
Xp22B_R	TTATGGGCATCCTTTGGAGT		
Xp22I_F	TGCTTGTTGGATGTTTCTTGA	8594231-8594315	Region flankujący
Xp22I_R	TGGTCTAGGGATTGTTACG		
Xp22E_F	TTCTTCCTCAAGACCATTTGAA	8595089-8595177	Region zduplikowany
Xp22E_R	TGTTGGGTGTTTCTTGAGTGA		
Xp22F_F	AATCCAGAAGCTCTGCCAAG	8595504-8595587	Region zduplikowany
Xp22F_R	TGGATCTGAAGCAGGAATGC		
Xp22G_F	TCCACGAGAGGAGTGATTATGA	8596592-8596679	

Xp22G_R	CATGGCGCCTATAGGAGTTT		Region zduplikowany
Xp22C_F	TAGCACATGTGATGGCCTCT	8706029-8706114	Region flankujący
Xp22C_R	TTTCAAAAACCCACCTCCT		
Xp22H_F	AAAGTCAAATGTGGGAGGCTA	8706309-8706397	Region flankujący
Xp22H_R	TAGGGGCAAGCCAGTAACAT		
Xp22D_F	GGAAAGCACAGAACCGTCTC	8706859-8706948	Region flankujący
Xp22D_R	GGCATGATTACCCAGTCAG		
REGION 7q21.3 (<i>locus SHFM1</i>) - DELECJA			
7q21A_F	CCTTTCCAAGCATCTGGTGT	95437373-95437460	Region flankujący
7q21A_R	GTGACAGTGGCCAGTCGATA		
7q21F_F	TCAAATAACTGATGACGGTGA	95666713-95666799	Region flankujący
7q21F_R	TCTATGCCTCTCATGCCACTT		
7q21J_F	TTGCTTTACATTGGTCCATCC	95667107- 95667186	Region wydeletowany
7q21J_R	ACAAAGCCAATGCCTGCTAC		
7q21G_F	CACTGCCACACTTTGTCAT	95667475- 95667555	Region wydeletowany
7q21G_R	TAAAACATTTGGGCCTCTGG		
7q21B_F	GGGCCTACATCAATTCTCCA	95716467- 95716546	Region wydeletowany
7q21B_R	TTTCGTATGCCACTTCTCTC		
7q21C_F	GCCAACCAGAACAAATGCTT	95762432- 95762518	Region wydeletowany
7q21C_R	GAGGCATGCTTACACATCCA		
7q21D_F	TGGTGAACCAGTGAGAGCAG	95807475- 95807562	Region wydeletowany
7q21D_R	GGGTTACAGTAGCCGCTCAG		
7q21H_F	CGGACAACCTCCAGTTCTTC	95871169- 95871248	Region wydeletowany
7q21H_R	AGGGATCACATGGGGTCTAA		
7q21K_F	TTCAGGCAACCAAGCTGTAA	95871716- 95871797	Region wydeletowany
7q21K_R	TTTGAAGAGTGCCTTGCTA		
7q21L_F	AGATGGGTGGAGGATGAGC	95872706- 95872792	Region flankujący
7q21L_R	TCCAAGGCGTTGCTCTATTT		
7q21M_F	GCAGTCACAGGCACAGACTC	95873549- 95873630	Region flankujący
7q21M_R	GGAGCATCCTCTTCATCTGC		
7q21I_F	ATCCCTGGAGTGCATGTGT	95873994- 95874074	Region flankujący
7q21I_R	CACTGCAGCGAGATTTGAAC		
7q21E_F	CTGGATGGTCAGCAACAGAA	96132376- 96132461	Region flankujący
7q21E_R	ATTTTGAGAGCCTGCATGT		

GEN <i>DYNC111</i> (locus 7q21.3) eksony 15 i 17			
DYNC111_e15F	TGTGTACGATGTCATGTGGTC	95705410- 95705497	Region badany
DYNC111_e15R	GTTGAGGTTCCAGAGGTCCA		
DYNC111_e17F	CAGTCCCCACAATGATGAA	95726799- 95726881	Region badany
DYNC111_e17R	TTCCTCCTCGTATCAGCTC		
GEN <i>DLX5</i> (locus 7q21.3) eksony 1-3			
qDLX5e1_F	AACTTTGCCCGAGTCTTCAG	96653812- 96653762	Region badany
qDLX5e1_R	AAGCCGAGGTAGGAGAGCAG		
qDLX5e2_F	GACTCAGTACCTCGCCTTGC	96651544- 96651503	Region badany
qDLX5e2_R	GCGCCGTATTTACCTGTGTT		
qDLX5e3_F	CTCCGACCTCCAACCAGTC	96650178- 96650126	Region badany
qDLX5e3_R	GGTGGGAATTGATTGAGCTG		

3.4.4. Badanie techniką porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH ang. *array based Comparative Genomic Hybridization*)

Badanie aCGH przeprowadzone zostało na platformie *Roche Nimblegen* z użyciem mikromacierzy oligonukleotydowej o rozdzielczości 1,4 miliona sond na haploidalny genom *Human CGH 3x1.4M WG-T v1.0 4Pk* firmy *Roche Nimblegen*. DNA pacjentów badano względem DNA kontrolnego firmy *Promega*.

Protokół reakcji:

- **Przygotowanie barwników Cy3 i Cy5**

Liofilizowane barwniki Cy3 oraz Cy5 były rozpuszczane w 2200 µl *Random Primer Buffer* z dodatkiem 4 µl β-markaptoetanolu.

- **Znakowanie DNA**

1. Przed przystąpieniem do procedury znakowania, DNA próby badanej i kontrolnej poddawany był 45 min. inkubacji w temp. 55°C.

2. Do 500 ng DNA próby badanej i kontrolnej, przygotowanych w objętości 20 μ l, dodawano 20 μ l znacznika Cy3 (próba badana) oraz 20 μ l znacznika Cy5 (próba kontrolna).
3. Próby denaturowano przez 10 min. w temp. 98°C i natychmiast schładzano na lodzie przez minimum 2 min.
4. Do zdenaturowanych prób dodawano 10 μ l mieszaniny reakcyjnej o składzie:

- dNTP Mix 10mM	5 μ l
- fragment Klenowa (50 U/ μ l)	0,7 μ l
- H ₂ O	5,3 μ l
5. Reakcję znakowania prowadzono przez 4 godz. w temp. 37°C.
6. Po skończonej inkubacji, reakcja była zatrzymywana poprzez dodanie 10,8 μ l odczynnika *Stop Solution*.
7. Wyznakowane DNA strącano poprzez dodanie 55 μ l izopropanolu oraz 10 min. wirowanie przy obrotach 10000 rcf.
8. Osad DNA przepłukiwano jednokrotnie 80% schłodzonym etanolem.
9. Osad suszono, a następnie rozpuszczano w 15 μ l dejonizowanej wody.
10. Stężenie wyznakowanego DNA próby badanej i kontroli mierzono przy pomocy spektrofotometru *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific).
11. 31 μ g próby badanej oraz 31 μ g próby kontrolnej łączono ze sobą, a następnie suszono aż do uzyskania osadu.

Odczynniki do znakowania pochodziły z zestawu *NimbleGen Dual-Colour DNA Labeling Kit* (Roche NimbleGen).

• Hybrydyzacja

1. Uzyskany w poprzednim etapie osad DNA rozpuszczano w 5,6 μ l dejonizowanej wody i łączono z 14,4 μ l mieszaniny hybrydyzacyjnej o składzie:

- <i>Hybridization Buffer 2x</i>	35 μ l
- <i>Hybridization Component A</i>	14 μ l
- <i>Alignment Oligo</i>	1,4 μ l

Odczynniki do hybrydyzacji pochodziły z zestawu *NimbleGen Hybridization Kit* (Roche NimbleGen)

2. Próby denaturowano w temp. 95°C przez 5 min.
3. Próby nakładano na płytkę mikromacierzową za pośrednictwem miksera nakrywkowego *NimbleGen HX3 Mixer* (Roche NimbleGen). Precyzyjne przymocowanie miksera do płytki mikromacierzowej było możliwe przy pomocy kasyety *PMAT Precision Mixer Alignment Tool* (Roche NimbleGen).
4. Próby hybrydyzowano do płytki mikromacierzowej w stacji hybrydyzacyjnej *NimbleGen Hybridization System 4* (Roche NimbleGen) w temp. 42°C przez 72 godz.

• Płukanie płytki

1. Po skończonej hybrydyzacji odpłukiwano nadmiar niezhybrydyzowanego DNA z wykorzystaniem zestawu do płukania szkiełek mikromacierzowych *NimbleGen Wash Buffer Kit* (Roche NimbleGen), zawierającego zestaw 3 buforów. Płukanie przeprowadzono według następującej procedury:

- Bufor I 2 min. i 15 sek.
- Bufor II 1 min.
- Bufor III 15 sek.

2. Płytkę suszono poprzez wirowanie w wirówce *ArrayIt Microarray High-Speed* (Telechem International) przez 20 sek. przy obrotach 6000 rpm.

• Skanowanie płytki

Skanowanie prowadzono na platformie *NimbleGen MS 200* (Roche NimbleGen) przy długości fali 2 µm.

• Stripowanie płytki

Płytki jednokrotnie poddawano procedurze odpłukiwania zhybrydyzowanego DNA genomowego w celu ponownego ich użycia bezpośrednio po skanowaniu lub w przeciągu kilku dni, w trakcie których płytki przechowywano w ekcykatorze. Procedura stripowania była następująca [Ronowicz i wsp. 2012]:

1. Płytkę płukano w wodzie dejonizowanej przez 1 min., a następnie inkubowano przez 4 min. w temp. pokojowej.
 2. Płytkę umieszczano w 9M roztworze 1,3-dimetylomocznika o temp. 45°C i wytrząsano przez 1 min.
 3. Płytkę inkubowano w tych samych warunkach przez 4 godz., wytrząsając co godzinę przez 1 min.
 4. Płytkę płukano w wodzie przez 1 min., a następnie inkubowano przez 4 min. w temp. pokojowej. Procedurę płukania powtarzano jednokrotnie.
 5. Płytkę suszono w wirówce *ArrayIt Microarray High-Speed* (Telechem International) przez 20 sek. przy obrotach 6000 rpm.
- **Analiza danych**
 1. Pierwszy etap analizy polegał na wygenerowaniu plików tekstowych i graficznych oraz ocenie jakościowej obrazu uzyskanego po zeskanowaniu macierzy, co stanowiło wstępną informację o efektywności znakowania i hybrydyzacji. W tym celu posłużono się oprogramowaniem *DEVA* (Roche NimbleGen).
 2. Następnie pliki graficzne oraz tekstowe analizowano jednocześnie odpowiednio w programach *SignalMap* (Roche NimbleGen) oraz *Excel* (Microsoft Office v.2013). Pliki zapisane w programie *Excel* zawierały wykaz wszystkich zmian (delecji/duplikacji) w poszczególnych chromosomach. Każdej z wyszczególnionych zmian przypisana była pozycja chromosomowa (według sekwencji ludzkiego genomu referencyjnego HG19), wielkość zmiany, liczba sond wewnątrz zmiany (co najmniej 5) oraz wartość średniej logarytmów binarnych (\log_2) ze stosunku sygnału próby badanej do referencyjnej. Dalszej analizie poddawano wyłącznie zmiany o wartości średniej \log_2 równej lub większej od 0,4 (duplikacja) oraz równej lub mniejszej od -0,4 (delecja). Wytypowane zmiany lokalizowano na podstawie ich pozycji genomowej w określonych regionach chromosomowych, korzystając z plików graficznych w programie *SignalMap*. Program ten powiązany jest z bazami danych, zawierającymi informacje charakteryzujące wybrane geny oraz zmiany strukturalne (*Database of Genomic Variants*, *UCSC Genome Browser*, *NimbleGen CNV Regions*). Celem niniejszej analizy było oddzielenie polimorficznych CNV od

potencjalnie patogennych, korzystając dodatkowo z internetowej bazy danych GCAD (ang. *Genoglyphix Chromosome Aberration Database*).

3. Wszystkie wytypowane CNV były oceniane w kierunku obecności w ich obrębie lub sąsiedztwie genów lub regionów regulatorowych, przy pomocy internetowych baz danych (*UCSC Genome Browser, Ensemble, Evolutionary Conserved Regions Browser, Map Viewer*). Analizowano wszystkie geny znajdujące się w obrębie lub w pobliżu zmiany genomowej pod względem ich potencjalnej roli w morfogenezie układu kostnego. W tym celu posługiwano się bazami danych zawierającymi informacje o tkankowo specyficznej ekspresji danego genu u myszy (*Mouse Genome Informatics, Eurexpress, Eimage*) oraz danymi z baz *PubMed, OMIM, GeneDistiller2*.

Krótką charakterystyka wybranych baz danych (adresy internetowe – patrz Tabela 5):

- **DGV** (ang. *Database of Genomic Variants*) – internetowa baza danych zawierająca obszerne zestawienie polimorficznych, strukturalnych (większych niż 50 pz) wariantów w ludzkim genomie, które zidentyfikowane zostały u zdrowych osób z grupy kontrolnej. DGV stanowi dobre narzędzie do korelacji identyfikowanych zmian z danymi fenotypowymi.

- **GCAD** (ang. *Genoglyphix Chromosome Aberration Database*) – internetowa baza danych zawierająca zestawienie ponad 7700 zmian CNV, zidentyfikowanych u ponad 6600 osób, z których ponad 5400 to probandzi.

- **Map Viewer** – internetowe narzędzie do przeszukiwania genomu danego organizmu, zawierające mapy chromosomowe i umożliwiające analizę od poziomu chromosomu, przez informacje o genach zlokalizowanych w danej pozycji, aż po sekwencję nukleotydową badanego regionu.

- **MGI** (ang. *Mouse Genome Informatics*) – internetowa baza zawierająca zintegrowane dane genetyczne oraz biologiczne, dotyczące genomu myszy i stanowiące narzędzie badań w chorobach diagnozowanych u człowieka.

- **Eurexpress** – baza zawierająca dane o tkankowo specyficznej ekspresji genów, określonej metodą hybrydyzacji RNA *in situ* (ISH) na modelu mysim. Projekt ma na celu ustalenie atlasu transkryptomu w zarodku myszy dla ponad 20 tys. genów.
- **EMAGE** – baza tkankowo specyficznej ekspresji genów *in situ* w zarodku mysim, oznaczonej w oparciu o metodę hybrydyzacji RNA *in situ*, immunohistochemiczną i ekspresji genów reporterowych.
- **GeneDistiller2** – stanowi narzędzie do analizy najistotniejszych informacji o danym białku, w tym dotyczących wzajemnych oddziaływań z innymi białkami.

3.4.5. Sekwencjonowanie eksomu (WES ang. *Whole Exome Sequencing*)

Ze względu na brak dostępności odpowiedniej aparatury w Katedrze i Zakładzie Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, sekwencjonowanie eksomu u wybranych pacjentów przeprowadzone zostało w Instytucie Genetyki Medycznej i Genetyki Człowieka na Uniwersytecie Medycznym w Berlinie (*Charité - Universitätsmedizin Berlin*).

Sekwencjonowanie eksomu było wykonywane jednocześnie u probanda i dwójki rodziców (tzw. *trio*). Wszystkie poddane analizie próby DNA były wzbogacane z użyciem *SureSelect Human All Exon Kit V2* (Agilent). Sekwencjonowanie odcinków DNA o długości 100 pz oraz odczyt sekwencji wykonano w sekwenatorze *HiSeq 2000* (*Illumina*). Odczytaną sekwencję przyrównywano do sekwencji ludzkiego genomu referencyjnego HG19 z wykorzystaniem programu *Novoalign* (Novocraft Technologies). Wszystkie SNP oraz niewielkie insercje i delecje (tzw. *indels*) były wyodrębniane przy zastosowaniu programu *SAMtools* [Li i wsp., 2009]. Znaczenie funkcjonalne wszystkich zidentyfikowanych wariantów było określane przy zastosowaniu programu *AnnoVar* [Wang i wsp. 2010], który umożliwia m. in.:

- ocenę wpływu wykrytej zmiany SNP/SNV na sekwencję aminokwasową białka;
- lokalizację wariantu w specyficznych regionach genomowych, np. o dużym stopniu zakonserwowania ewolucyjnego, w miejscach wiązania czynników transkrypcyjnych i w regionach polimorficznych.

Filtrowanie zmian o charakterze polimorficznym (znajdujących się w bazach danych: EVS, dbSNP132 oraz *1000 Genomes Database*), artefaktów, zmian wynikających

z niskiej jakości sekwencjonowania oraz wariantów identyfikowanych w przynajmniej 4 kontrolach z wewnętrznej bazy, przeprowadzone zostało przy użyciu oprogramowania własnego, napisanego w języku Perl.

Wyodrębnione zmiany były analizowane w programie *GeneTalk*, który umożliwia m. in. segregację wyników w oparciu o zastosowanie filtrów autosomalnych dominujących (filtr *de novo*), homozygotycznych recesywnych, heterozygotycznych recesywnych (złożone heterozygoty). Schemat analizy wyodrębnionych wariantów był następujący:

1. Analiza pokrycia danego wariantu (ilość odczytów na poszczególną zmianę).
2. Ocena charakteru zmiany w programach *MutationTaster*, *Polyphen-2*, *SIFT*. Zmiany o polimorficznym charakterze nie były poddawane dalszej analizie.
3. Przeszukiwanie bazy danych *Exome Variant Server* (EVS) - warianty o potencjalnie patogennym charakterze były sprawdzane w bazie danych EVS pod względem częstości występowania w zdrowej populacji kontrolnej. Zmiany polimorficzne nie były poddawane dalszej analizie.
4. Charakterystyka genów w bazach danych *OMIM/PubMed*.
5. Ocena tkankowo specyficznej ekspresji genów na modelu mysim w bazach danych *MGI*, *Eurexpress*, *Emage*.

Potwierdzenie wyselekcjonowanych wariantów z zastosowaniem sekwencjonowania metodą Sangera u probanda, a następnie w badaniu rodzinnym.

Tabela 4. Spis odczynników użytych w pracy.

ODCZYNNIK	PRODUCENT
Agaroza	Prona
Alkohol etylowy	POCH Gliwice
BigDyeTerm v3.1 CycleSeq Kit	Applied Biosystems
Bromek etydyny	Sigma-Aldrich
dNTPs	ThermoScientific
EDTA	Sigma-Aldrich
Enzym Eksonukleaza I (E. coli)	Fermentas
Enzym SAP (Shrimp Alkaline phosphatase)	Fermentas
FailSafe™ PCR 2xPreMix J	Epicentre Biotechnologies
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas
HiFiTaq Polimeraza DNA	Novazym Polska
Izopropanol	POCH Gliwice
KCl	POCH Gliwice
KHCO ₃	POCH Gliwice
Kwas octowy	POCH Gliwice
MgCl ₂	POCH Gliwice
NaCl	POCH Gliwice
NH ₄ Cl	POCH Gliwice
NimbleGen Dual-Colorur DNA Labeling Kit	Roche NimbleGen
NimbleGen Hybridization Kit	Roche NimbleGen
NimbleGen Wash Buffer Kit	Roche NimbleGen
N,N'-dimetylomocznik	Aldrich
Nonidet™	Sigma
PCR Expand Long Template PCR System v.24	Roche
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Quick-Load® 1kb DNA Ladder	BioLabs
Reference DNA	Promega
SDS	Sigma-Aldrich
SureSelect Human All Exon Kit v2	Agilent
Tris Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich

Tabela 5. Spis podstawowych buforów użytych w pracy.

BUFOR	SKŁAD
Bufor do lizy erytrocytów	<ul style="list-style-type: none"> • bufor TKM (962,5 ml) • Nonidet™ (37,5 ml)
TAE 50x	<ul style="list-style-type: none"> • 50mM EDTA • 5,71% v/v kwas octowy • 2M Tris-HCl
TE 1x	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mM Tris • 1 mM EDTA • pH 7,0
TKM 1x	<ul style="list-style-type: none"> • 10 Mm Tris-HCL pH 7.6 • 10 Mm KCL • 10 Mm MgCl₂ • 2 mM EDTA

Tabela 6. Zestawienie internetowych baz danych oraz internetowych programów.

NAZWA	ADRES STRONY www
BAZA DANYCH	
DGV (Database of Genomic Variants)	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home
Ensemble Genome Browser	http://www.ensembl.org/
Eurexpress	http://www.eurexpress.org
Exome Variant Server	http://evs.gs.washington.edu/
GCAD (ang. Genoglyphix Chromosome Aberration Database)	https://uk.genoglyphix.com
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
GeneCards	http://www.genecards.org/
GeneDistiller 2	http://www.genedistiller.org/
HGMD (Human Genome Mutation Database)	http://www.hgmd.org/
Map Viewer	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/
MGI (Mouse Genome Informatics)	http://www.informatics.jax.org/
OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Men)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
PROGRAM	
BLAST	http://www.ensembl.org/Multi/blastview
GeneTalk	http://www.gene-talk.de
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/
PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2)	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Primer 3	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)	http://sift.jcvi.org/
---	---

Tabela 7. Programy wykorzystywane do analizy danych.

PROGRAM	PRODUCENT/AUTOR
Annovar	Wang i wsp. 2010
Bioedit v7.2.0	Tom Hall dla NCBI
DEVA v1.0	Roche NimbleGen
NimbleScan v2.6	Roche NimbleGen
Novoalign	Novocraft Technologies
SAMtools	Li i wsp. 2009
SignalMap v1.9	Roche NimbleGen
Via7 v1.2	Life Technologies

Tabela 8. Aparatura wykorzystywana w pracy.

NAZWA	PRODUCENT
ArrayIt Microarray High-Speed	Telechem International
Eppendorf vapo.protect Mastercycler pro	Eppendorf
Gel Doc 2000	BIO-RAD
HiSeq 2000	Illumina
Mix Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf
MJ Research Programmable Thermal Controller PTC-100™	MJ Research
NimbleGen Hybridization System 4	Roche NimbleGen
NimbleGen MS 200 Microarray Scanner	Roche NimbleGen

Tabela 9. Usługi obce.

RODZAJ USŁUGI	MIEJCSE
Sekwencjonowanie produktów PCR	Międzywydziałowa Pracownia Techniki Biologii Molekularnej, UAM w Poznaniu
Synteza starterów	Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, IBB PAN

4. WYNIKI

4.1. Rutynowa diagnostyka genetyczna

W wyniku przeprowadzonych u 19 probandów badań molekularnych w kierunku najczęstszych zmian genetycznych identyfikowanych w rozszczepach rąk i/lub stóp, udało się ustalić przyczynę malformacji u 3 pacjentów z izolowaną postacią wady, z czego u dwóch występowała ona sporadycznie, a u jednego rodzinnie. U wszystkich probandów stwierdzono charakterystyczną dla klasycznego SHFM duplikację w *locus* 10q24.31-32 (SHFM3).

Probandka I (ID: K58)

U probandki I (Ryc. 5) występował sporadyczny izolowany obustronny rozszczep rąk typu monodaktylii z pozostawieniem jedynie 5 palca. U pacjentki w wyniku rutynowej diagnostyki genetycznej, przeprowadzonej metodą qPCR, stwierdzono obecność zwielokrotnionej do 3 liczby kopii badanego regionu 10q24.3. Rodzice pacjentki nie byli dostępni do badań genetycznych.



Rycina 5. Obraz kliniczny rozszczepu typu monodaktylii w kończynach górnych u probandki I.

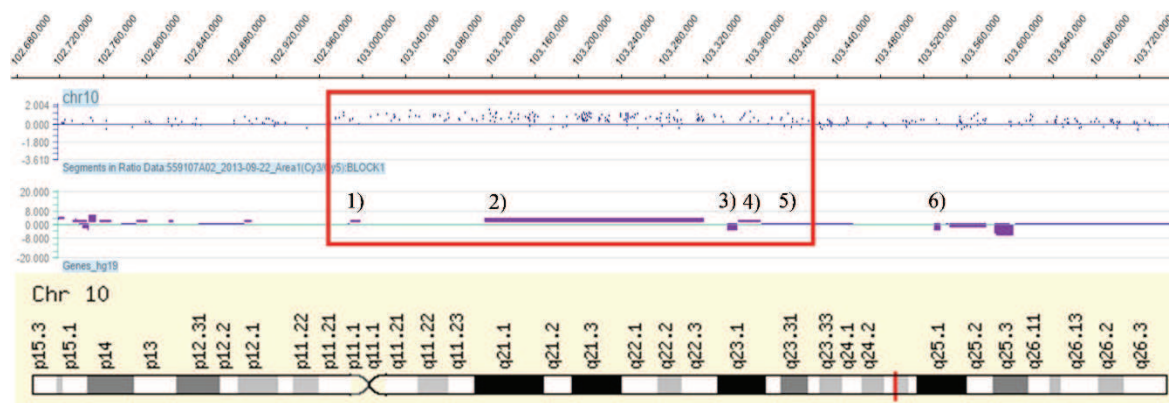
Probandka II (ID: 2568)

U probandki II (Ryc. 6) stwierdzono sporadyczne wystąpienie izolowanej czterokończynowej monodaktylii z pozostawieniem 5 palca. Wykryto duplikację w *locus* 10q24.31-32 oraz wykluczono jej obecność u zdrowej matki pacjentki (ID: 2569). Ojciec nie był dostępny do badań genetycznych.



Rycina 6. Obraz kliniczny i radiologiczny rąk (a, b) oraz stóp (c, d) u probandki II, przedstawiający czterokończynową monodaktylię.

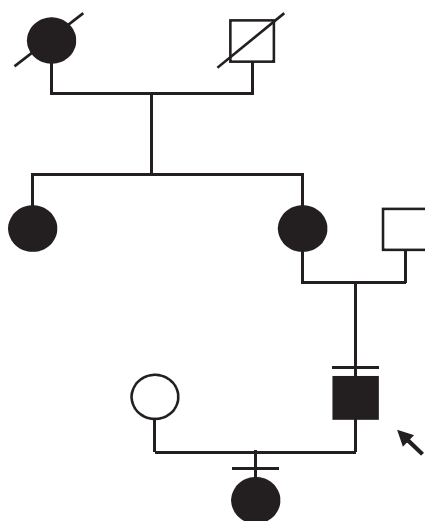
Przeprowadzone dodatkowo badanie aCGH pozwoliło określić dokładną wielkość oraz region duplikacji. W wyniku analizy stwierdzono zmianę o wielkości 419 kb, zlokalizowaną w pozycji genomowej 102975274-103413516 (wg HG19). Duplikacja obejmowała geny: *LBX1*, *BTRC*, *POLL*, *DPCD*, *FBXW4* (ryc. 7).



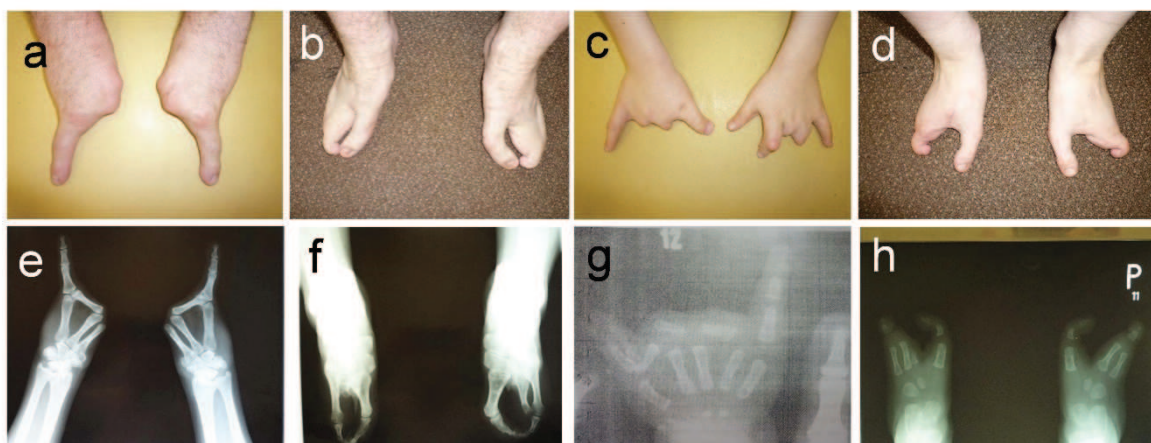
Rycina 7. Obraz interstycjalnej duplikacji stwierdzonej u probandki II w *locus* 10q24.31-32 oraz genów wewnątrz zmiany i w jej pobliżu; 1) gen *LBX1* 2) gen *BTRC*, 3) gen *POLL*, 4) gen *DPCD*, 5) gen *FBXW4*, 6) gen *FGF8*. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).

Rodzina III

W rodzinie III (ryc. 8) stwierdzono izolowaną czterokończynową ektrodaktylię u probanda III (ID: K223) i jego córki (ID: K317). U ojca stwierdzono rozszczep typu monodaktylii w rękach (ryc. 9 a, e) oraz rozszczep typowy w stopach (ryc. 9 b, f). Córka probanda manifestowała rozszczep typowy w rękach, z pozostawionymi kośćmi śródreżca (ryc. 9 c, g) oraz rozszczep typowy w stopach (ryc. 9 d, h). Metoda qPCR umożliwiła wykrycie u probanda duplikacji w *locus* 10q24 oraz potwierdzenie jej obecności u córki pacjenta.

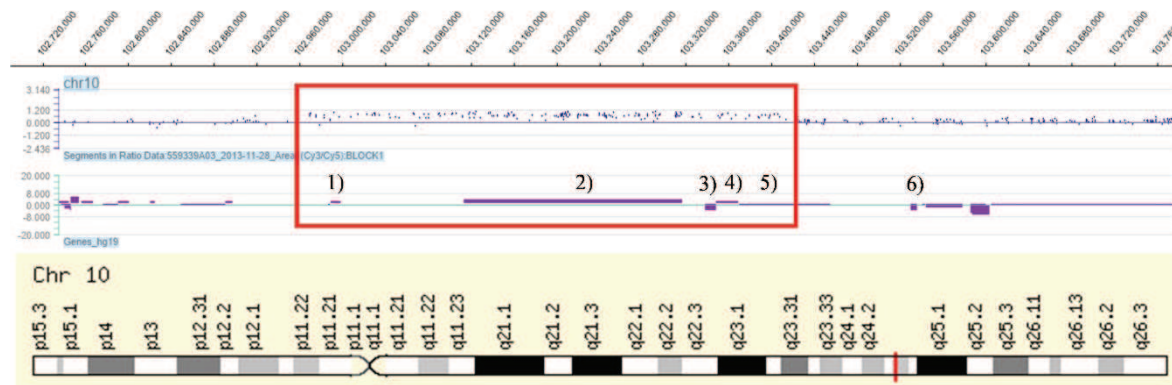


Rycina 8. Rodowód rodziny III.



Rycina 9. Obraz kliniczny i radiologiczny czterokończynowej ektro daktylii w rodzinie III; rozszczep typu monodaktylii rąk (a, e) oraz rozszczep typowy stóp (b, f) u probanda; rozszczep typowy rąk (c, g) i stóp (g, h) u córki.

Przeprowadzone dodatkowo badanie aCGH pozwoliło określić dokładną wielkość oraz region duplikacji. W wyniku analizy stwierdzono zmianę o wielkości 438 kb, zlokalizowaną w pozycji genomowej 102969795-103407994 (wg HG19). Duplikacja obejmowała geny: *LBX1*, *BTRC*, *POLL*, *DPCD*, *FBXW4* (ryc. 10).



Rycina 10. Obraz interstycjalnej duplikacji stwierdzonej u probanda III w *locus* 10q24.31-32 oraz genów wewnątrz zmiany i w jej pobliżu; 1) gen *LBX1* 2) gen *BTRC*, 3) gen *POLL*, 4) gen *DPCD*, 5) gen *FBXW4*, 6) gen *FGF8*. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).

U pozostałych 16 pacjentów, w toku rutynowej diagnostyki genetycznej, wykluczono duplikację w *loci* 10q24.3 (*SHFM3*) oraz 17p13.3 (*SHFM/SFHLD*), a także mutację w genie *TP63*.

4.2. Sekwencjonowanie genów *WNT10B* oraz *DLX5*

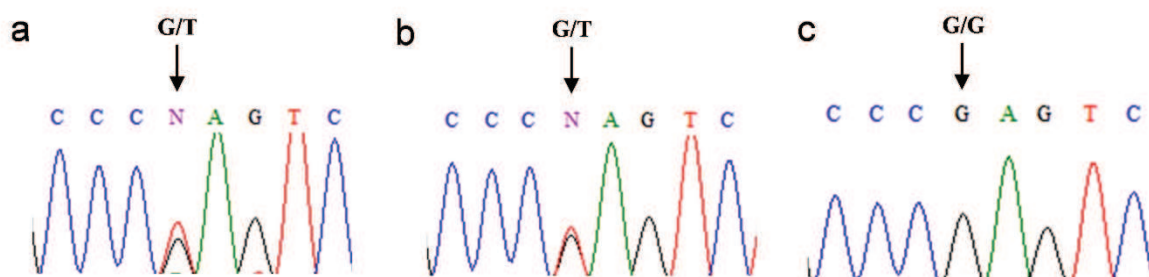
Sekwencjonowanie genów *WNT10B* oraz *DLX5* wykonano u 16 probandów z negatywnym wynikiem rutynowej diagnostyki genetycznej przeprowadzonej w toku badań własnych. Dodatkowo geny sekwencjonowano u 15 pacjentów, u których najczęstsze przyczyny molekularne zostały wykluczone w ramach uprzednio wykonanych badań [Jamsheer, 2011]. W wyniku sekwencjonowania w/w genów, udało się wykryć prawdopodobną przyczynę wystąpienia wady u jednego probanda będącego przypadkiem sporadycznym oraz w jednej rodzinie manifestującej SHFM. W obydwu przypadkach zidentyfikowano heterozygotyczną mutację c.G115T(p.E39X) typu *nonsense* w eksonie 1 genu *DLX5*.

Proband IV (ID: 2303)

U probanda IV (ryc. 11) zdiagnozowano sporadyczny przypadek izolowanego, typowego obustronnego rozszczepu rąk. W prawej i lewej ręce stwierdzono agenezję 3 palca oraz odpowiedniej kości śródreżca. W lewej ręce wadzie towarzyszył przykurcz 2, 4 i 5 palca. Po wykluczeniu zmian w ramach rutynowej diagnostyki genetycznej oraz mutacji w genie *WNT10B*, wykonano sekwencjonowanie genu *DLX5*. Heterozygotyczną mutację c.G115T(p.E39X) w genie *DLX5* stwierdzoną u probanda, wykryto również u jego zdrowej matki (ID: 2304) oraz wykluczono u zdrowego ojca (ID: 2302) (ryc. 12).



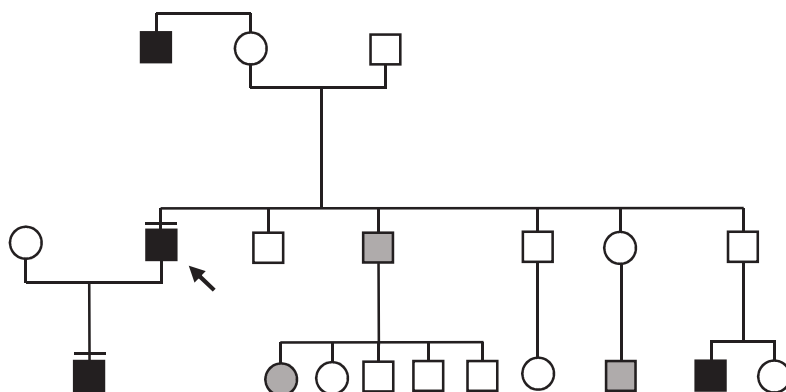
Rycina 11. Obraz kliniczny rąk probanda IV z typową obustronną ektrodaktylią.



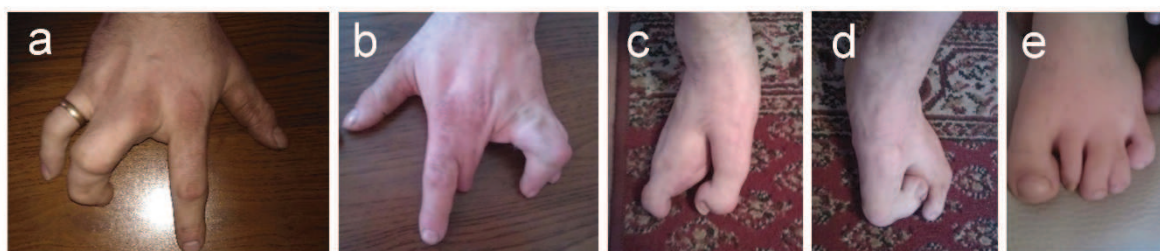
Rycina 12. Wynik analizy genu *DLX5*; heterozygotyczna mutacja c.G115T(p.E39X) u probanda IV (a); heterozygotyczna mutacja u matki (b); sekwencja prawidłowa u ojca (c).

Rodzina V

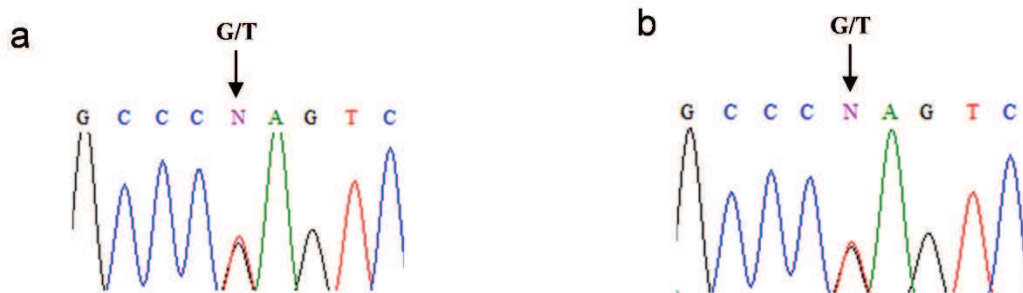
W rodzinie V (ryc. 13) stwierdzono izolowany cztero kończynowy rozszczep rąk i stóp u probanda oraz wadę lewej stopy u jego syna. Wada prawej i lewej ręki u probanda charakteryzowała się agenezją 3 palca oraz przykurczem i skróceniem 4 i 5 palca (ryc. 14 a, b). W prawej i lewej stopie stwierdzono brak 3 i 4 palca oraz odpowiednich kości śródstopia. Wada lewej stopy u syna polegała na poszerzeniu palucha, hipoplazji 2 palca, syndaktylii 3 i 4 palca oraz klinodaktylii 5 palca (ryc. 14 e). U probanda (ID: K61) w wyniku sekwencjonowania genu *DLX5* stwierdzono obecność heterozygotycznej mutacji c.G115T(p.E39X), którą zidentyfikowano również u jego syna (ID: K60) (ryc. 15). Z wywiadu rodzinnego wynika, że bratanek probanda również manifestuje wadę ze spektrum SHFM (ryc. 13). Bratanek i brat probanda nie byli dostępni do badań genetycznych.



Rycina 13. Rodzowód rodziny V. Szarym kolorem zaznaczono pacjentów, u których wykonywano badania genetyczne z innego niż wada kończyn powodu.



Rycina 14. Obraz kliniczny cztero kończynowej typowej ektrodaktylii u probanda (a-d) oraz wady lewej stopy u jego syna (e) (Rodzina V).



Rycina 15. Wynik analizy genu *DLX5*; heterozygotyczna mutacja c.G115T(p.E39X) u probanda (a) oraz jego syna (b) (Rodzina V).

U pozostałych 29 pacjentów wykluczono mutacje w genach *WNT10B* oraz *DLX5*.

4.3. Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH)

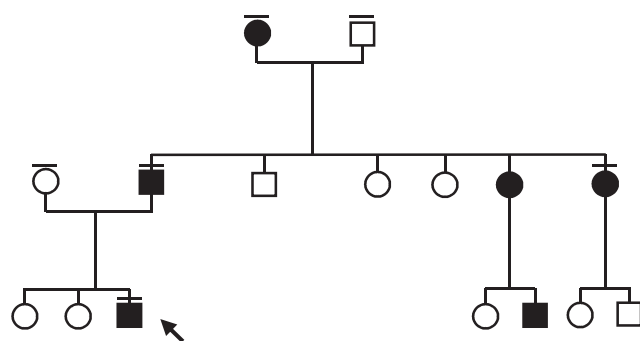
Badanie aCGH przeprowadzono u 30 pacjentów, u których stwierdzono wadę ze spektrum SHFM. W wyniku powyższej analizy udało się ustalić przyczynę molekularną wady u 2 probandów. U 5 pacjentów wykryto zmiany o potencjalnie patogennym charakterze. Ogółem przeprowadzono ocenę bioinformatyczną 2024 zmian CNV.

Rodzina VI

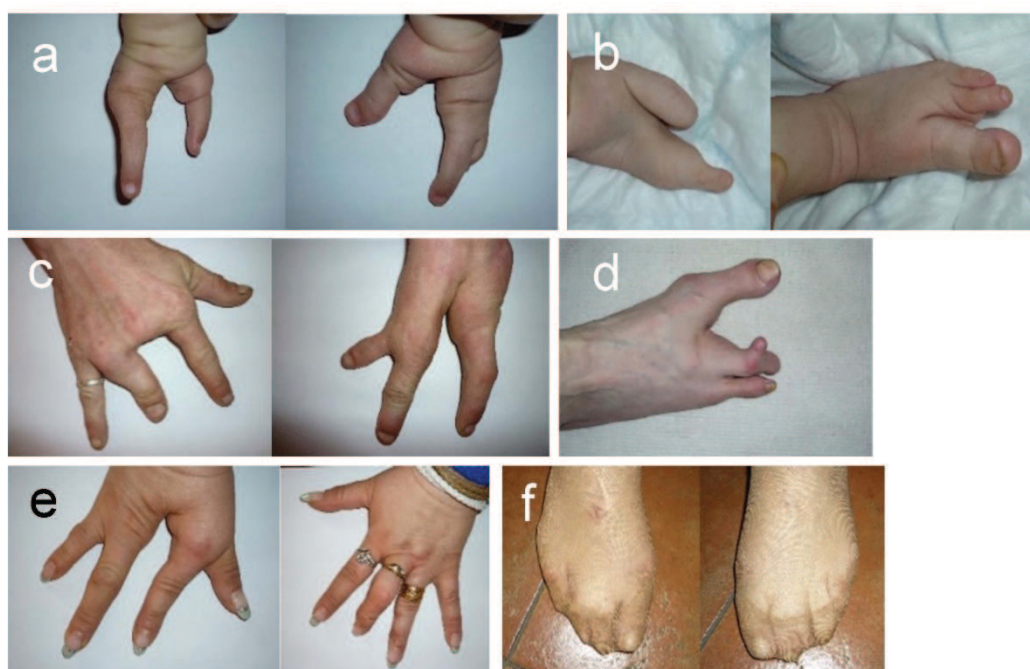
Pacjentami przebadanymi z rodziny VI (ryc. 16) byli proband (ID: K82), jego ojciec (ID: K83) oraz siostra ojca (ID: K85), u których stwierdzono izolowaną ektrodaktylię rąk i stóp. Dodatkowo analizę genetyczną przeprowadzono u dotkniętej SHFM babki probanda ze strony ojca oraz zdrowego dziadka probanda ze strony ojca probanda. Poniżej przedstawiono opis kliniczny malformacji zdiagnozowanych u pacjentów (ryc. 17):

- **Proband** – klasyczny, obustronny rozszczep rąk (ryc. 17 a), (ręka prawa – dwupalczysta; ręka lewa – zachowany szeroki, prawdopodobnie zdwojony kciuk, 4 i 5 palec), klasyczny obustronny rozszczep stóp (ryc. 17 b) (stopa prawa – dwupalczysta z hipoplazją palucha; stopa lewa - zachowany paluch, 4 i 5 palec).
- **Ojciec** – klasyczny, obustronny rozszczep rąk (ryc. 17 c), (ręka prawa – zachowany kciuk, 2, 4 i 5 palec, zachowane kości śródreżca; ręka lewa – wykształcone dwa promienie ręki, agenezja prawdopodobnie 3 i 4 promienia, obecny szczątkowy trzeci promień w postaci nieprawidłowo wykształconego, hipoplastycznego palca), klasyczny rozszczep prawej stopy cechujący się agenezją 2 palca, hipoplazją 3, 4 i 5 palca (ryc. 17 d).

- **Siostra ojca** – rozszczep prawej ręki polegający na agenezji 3 palca i odpowiedniej kości śródreżca; wada ze spektrum rozszczepu lewej ręki polegająca na hipoplazji 4 i 3 palca (ryc. 17 e). Wada ze spektrum rozszczepu w prawej i lewej stopie polegająca na braku 4. palca w prawej stopie i hipoplazji 4. palca w lewej stopie oraz syndaktylii i hipoplazji 2. i 3. palca (ryc. 17 f).



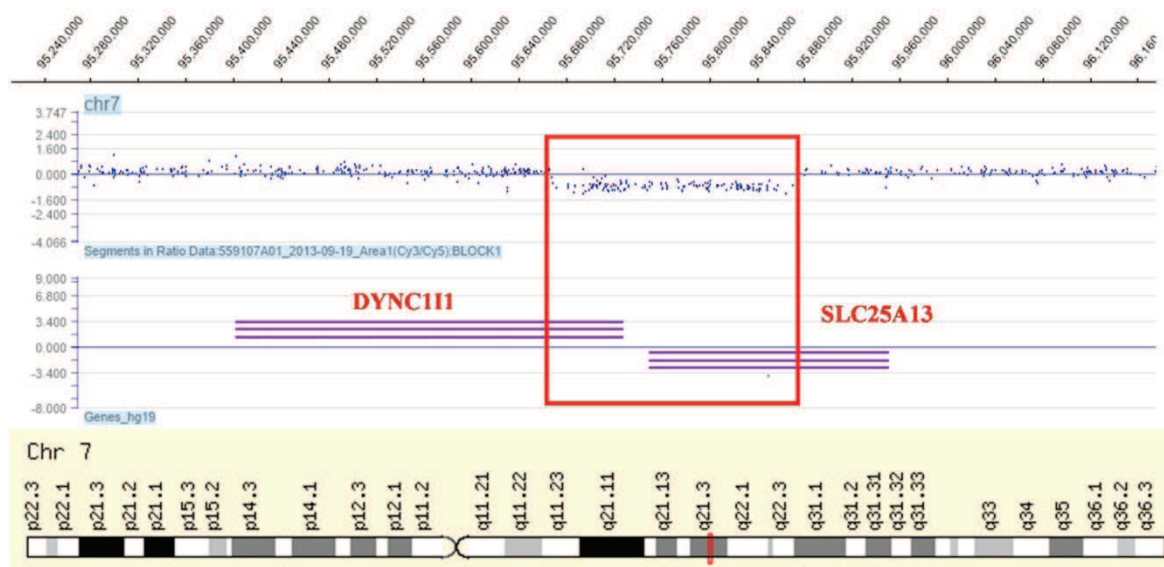
Rycina 16. Rodzowód rodziny VI.



Rycina 17. Obraz kliniczny izolowanej ektrodaktylii rąk i stóp w rodzinie VI. Rozszczep typowy prawej i lewej ręki (a) oraz prawej i lewej stopy (b) u probanda; rozszczep typowy prawej i lewej ręki (c), rozszczep typowy prawej stopy u ojca (d); rozszczep typowy prawej ręki (e) oraz wada ze spektrum rozszczepu lewej ręki u siostry ojca (f).

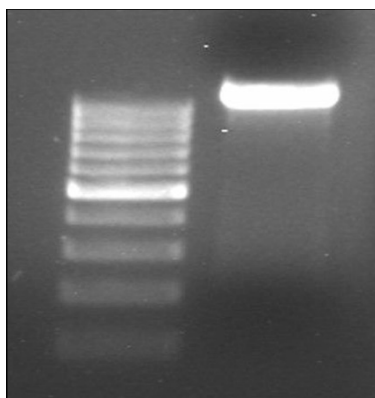
W badaniu aCGH u probanda VI wykryto interstycjalną delecję w *locus* SHFM1, w regionie 7q21.3 o wielkości 202,213 kb (pozycja genomowa wg HG19: 95667926-95870138; ryc. 18). Zmiana obejmowała fragmenty sekwencji kodującej genów *DYNC111*

oraz *SLC25A13*. Delecję potwierdzono w badaniu qPCR u probanda, u ojca, matki ojca i siostry ojca oraz wykluczono u matki probanda (ID: K84).

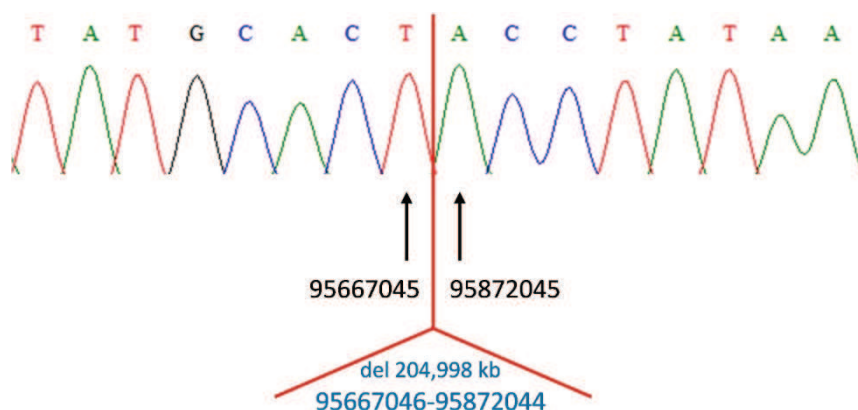


Rycina 18. Obraz interstycjalnej delecji stwierdzonej u probanda VI w *locus* 7q21.3, obejmującej fragmenty genów *DYNC111* oraz *SLC25A13*. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).

Ze względu na znacznie mniejszy od typowo identyfikowanych zmian w *locus* SHFM1 rozmiar delecji, zmapowano punkty złamań aberracji. W tym celu w pierwszej kolejności zawężono u probanda region delecji wykonując serię reakcji qPCR, a następnie zsekwencjonowano punkty złamań ustalając pozycję genomową w HG19: 95667046-95872044 oraz dokładną wielkość na 204,998 kb (ryc. 20).



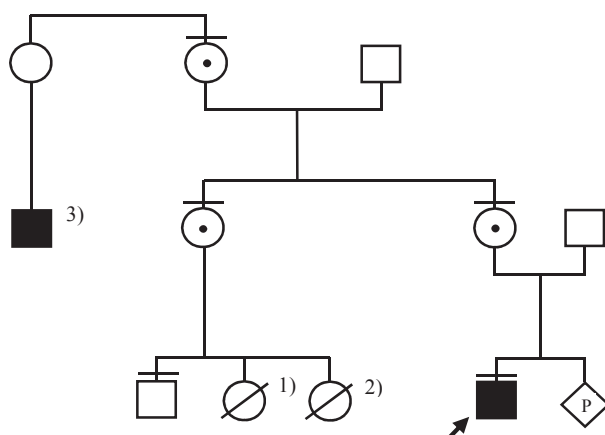
Rycina 19. Wizualizacja produktu amplifikacji fragmentu DNA flankującego delecję w *locus* 7q21.3 u probanda VI. Produkt o dł. 1138 pz, rozdzielony na 1,5% żelu agarozowym, oceniony wobec standardu wielkości *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder*.



Rycina 20. Wynik analizy miejsca delecji w *locus* 7q21.3 u probanda VI. Strzałkami oznaczono nukleotydy flankujące delecję; poniżej podano ich pozycje genomowe (wg HG19); niebieską czcionką podano wielkość oraz pozycję genomową (wg HG19) fragmentu, który uległ delecji.

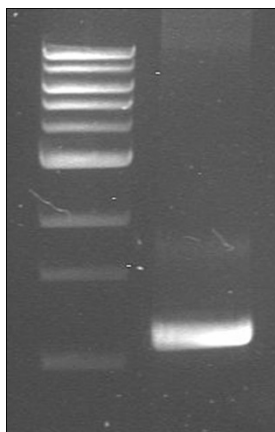
Proband VII (ID: 11198)

U probanda VII (przypadek sporadyczny) (ryc. 21) stwierdzono wystąpienie obustronnej wady kończyn dolnych oraz wady lewej ręki, wadę kręgosłupa, niedosłuch odbiorczy stopnia głębokiego (lewostronny), wnetrostwo, małe prącie, torbiel przegrody przezroczystej, torbiel lewego łuku skrzelowego, opóźniony rozwój mowy oraz cechy dysmorfii (ryc. 22 c). Nie stwierdzono hipogonadyzmu hipogonadotropowego. Atypowa wada kończyn dolnych wykazywała spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp z syndaktylią i hipoplazją palców oraz kości śródstopia (ryc. 22 d, e). Wada lewej ręki manifestowała się przykurczem 2, 3 i 4 palca (ryc. 22 a).

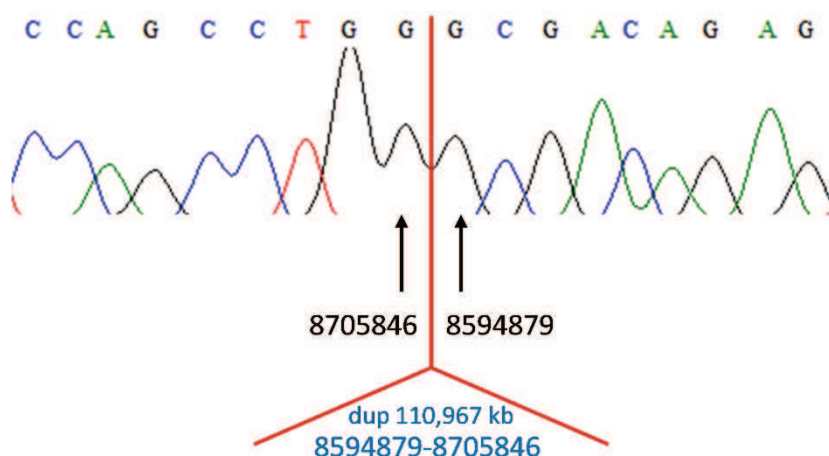


Rycina 21. Rodowód rodziny VII; 1) wytrzewienie; 2) wrodzona łamliwość kości (*osteogenesis imperfecta*) – postać letalna, 3) zespół Downa.

sekwencjonowania, ustalając region duplikacji w pozycji HG19: 8594879-8705846 oraz dokładną wielkość na: 110,967 kb.



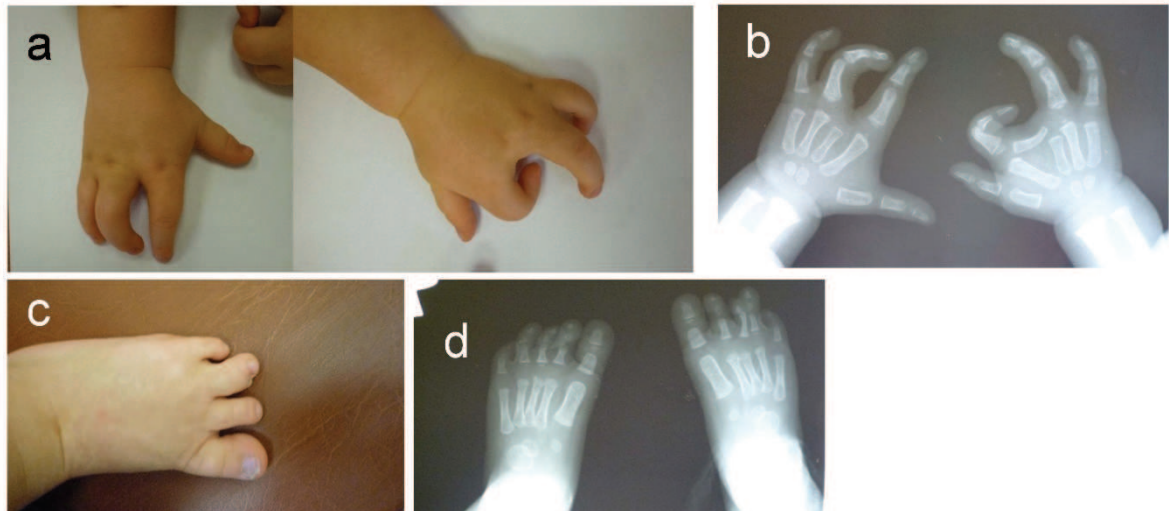
Rycina 24. Wizualizacja produktu amplifikacji fragmentu zduplikowanej sekwencji DNA w *locus* Xp22.31 u probanda VII. Produkt o dł. 1104 pz, rozdzielony na 1,5% żelu agarozowym, oceniony wobec standardu wielkości *Quick-Load® 1kb DNA Ladder*.



Rycina 25. Wynik analizy miejsca duplikacji w *locus* Xp22.31 u probanda VII. Strzałkami oznaczono punkty złamań; poniżej podano ich pozycje genomowe (wg HG19); niebieską czcionką podano wielkość oraz pozycję genomową (wg HG19) zduplikowanego fragmentu.

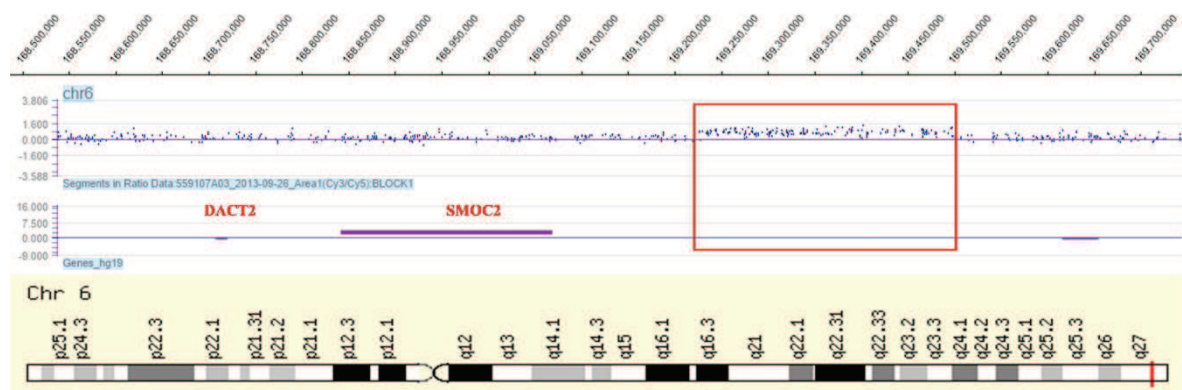
Probandka VIII (ID: 12135)

U probandki VIII stwierdzono sporadyczny przypadek obustronnej, wrodzonej wady kończyn górnych ze spektrum rozszczepu rąk oraz wadę lewej stopy. Wada obydwu rąk manifestowała się agenezją 3 palca oraz przykurczem 4 palca prawej i 2 palca lewej ręki (ryc. 26 a, b). Wada lewej stopy cechowała się zrostem 3 i 4 palca z niedorozwojem jednego z palców (ryc. 26 c, d). U pacjentki stwierdzono dodatkowo zmiany barwnikowe na skórze – plamki typu kawy z mlekiem.



Rycina 26. Obraz kliniczny i radiologiczny wad kończyn u probandki VIII, charakteryzujący się ektrodaktylią prawej i lewej ręki (a, b) oraz syndaktylią palców lewej stopy (c, d).

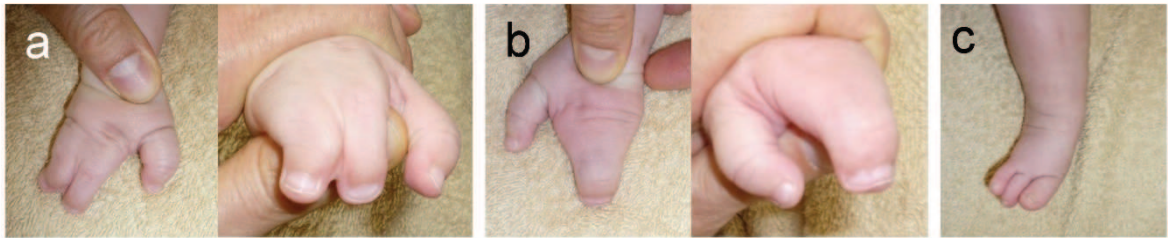
W badaniu aCGH wykryto interstycjalną duplikację w *locus* 6q27 o wielkości 270,324 kb (pozycja genomowa wg HG19: 169226530-169496853; ryc. 27). W kierunku centromerowym od zmiany, w odległości ok. 158 kb, zlokalizowany jest gen *SMOC2*, natomiast w odległości ok. 500 kb umiejscowiony jest gen *DACT2*. Duplikacja została potwierdzona u pacjentki w badaniu qPCR, które wykazało także nosicielstwo zmiany u jej zdrowego ojca (ID: 12216). Wykluczono obecność zmiany u zdrowej matki pacjentki (ID: 12218).



Rycina 27. Obraz interstycjalnej duplikacji wykrytej u probandki VIII w *locus* 6q27 oraz genów *SMOC2* i *DACT2*, zlokalizowanych w kierunku centromerowym od zmiany. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydydowej (aCGH).

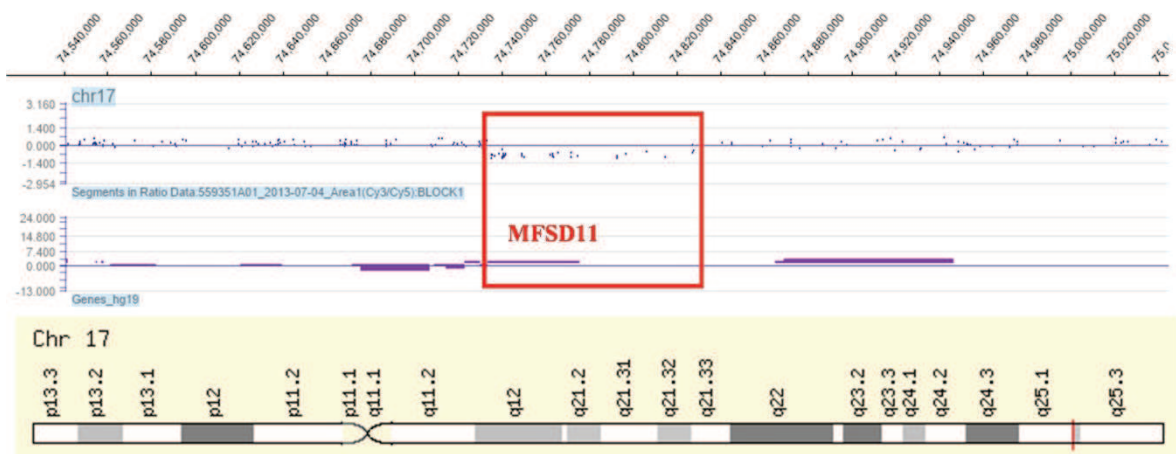
Proband IX (ID: 9040)

Proband IX był sporadycznym przypadkiem izolowanego obustronnego, atypowego rozszczepu rąk oraz oligodaktylii w prawej stopie. Wada w prawej i lewej ręce charakteryzowała się całkowitą agenezją 5 palca oraz syndaktylią 2, 3 i 4 palca (ryc. 28 a, b). Wada w stopie prawej manifestowała się całkowitą agenezją promieni palców 4 i 5 (ryc. 28 c).



Rycina 28. Obraz kliniczny wady ze spektrum SHFM u probanda IX; wada prawej ręki (a), lewej ręki (b) oraz prawej stopy (c).

W badaniu aCGH u probanda IX wykryto interstycjalną delecję w *locus* 17q25.1 o wielkości 92,321 kb (pozycja genomowa wg HG19: 74735044-74827364; ryc. 29), która obejmowała gen *MFSD11*. Badanie qPCR potwierdziło obecność delecji u probanda oraz nosicielstwo zmiany u zdrowego ojca pacjenta (ID: 9131). Wykluczono obecność zmiany u zdrowej matki pacjenta (ID: 9130).

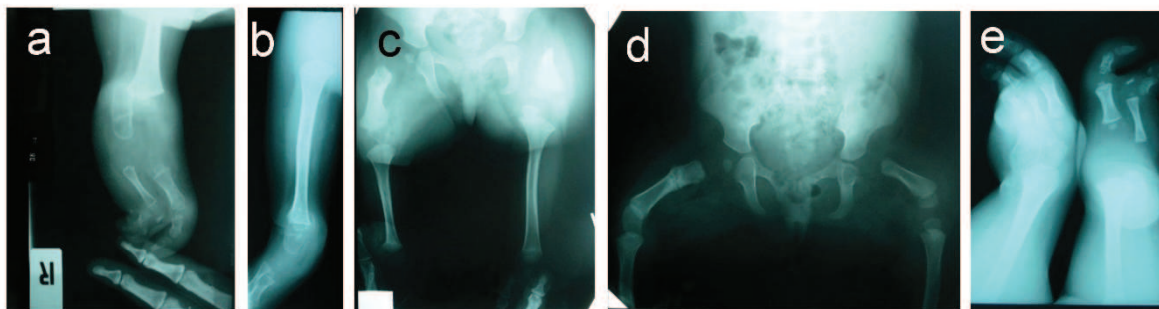


Rycina 29. Obraz interstycjalnej delecji wykrytej u probanda IX w *locus* 17q25.1, obejmującej gen *MFSD11*. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).

Probandka X (ID: K19)

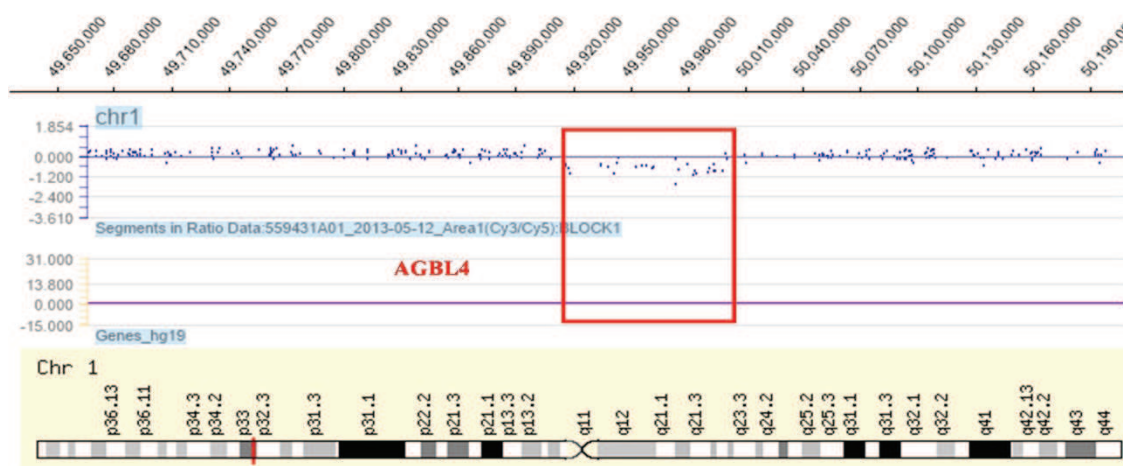
U probandki X (ryc. 30) występowała sporadyczna ektrodaktylia ze skróceniem kości długich. Fenotyp odpowiadał klasyfikacyjnie FFU. Wada manifestowała się:

- w kończynach dolnych - hipoplazją panewek stawu biodrowego, agenezją obu kości strzałkowych, ektrodaktylią stóp,
- w kończynach górnych – agenezją prawego przedramienia, ektrodaktylią lewej ręki.



Rycina 30. Obraz radiologiczny wady o fenotypie zbliżonym do SHFM (a, e) ze skróceniem kości długich (b, c) i hipoplazją panewek stawu biodrowego (d).

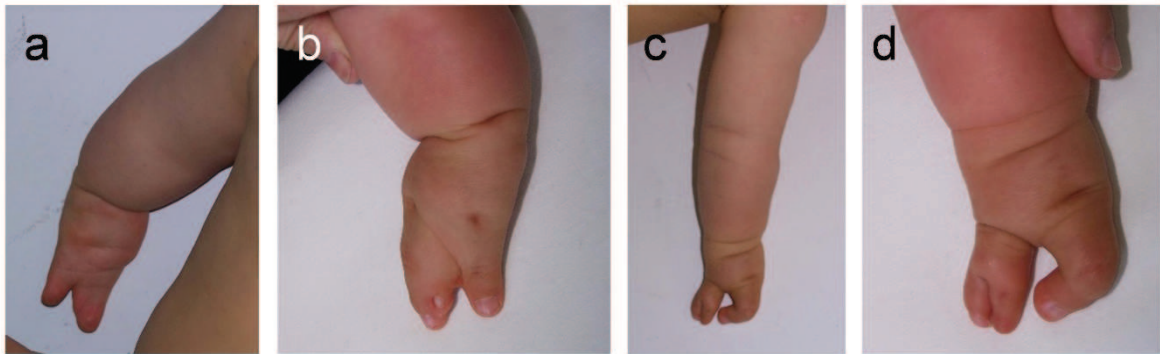
W badaniu aCGH wykryto interstycjalną delecję w *locus* 1p33 o wielkości 81,4 kb (pozycja genomowa wg HG19: 49916096- 49997501; ryc. 31), obejmującą fragment genu *AGBL4*. Ze względu na brak dostępności DNA rodziców probandki, nie można było przeprowadzić badania rodzinnego.



Rycina 31. Obraz interstycjalnej delecji w locus 1p33 obejmującej fragment genu *AGBL4* u probandki X. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).

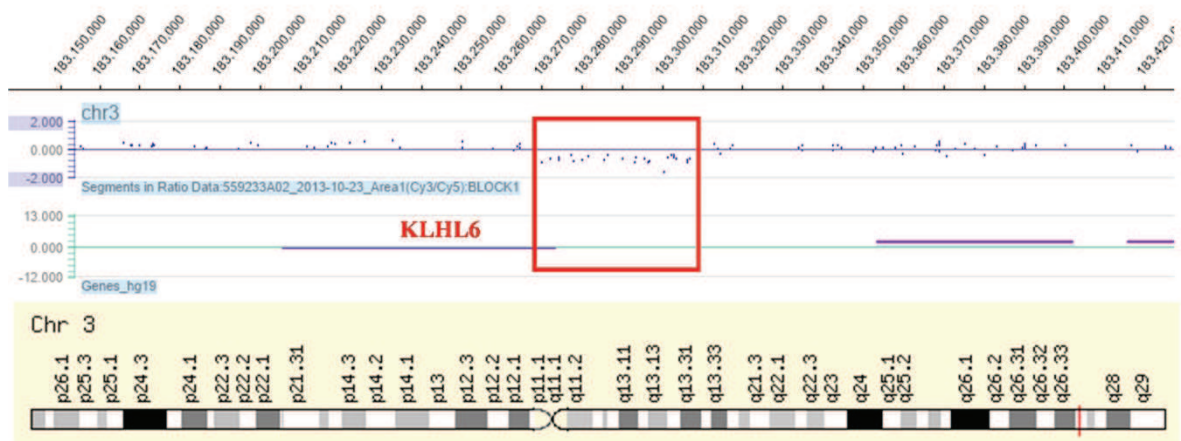
Proband XI (ID: K191)

U probanda XI (ryc. 32) zdiagnozowano sporadyczny przypadek obustronnej izolowanej wady kończyn górnych pod postacią atypowej ektrodaktylii ze skróceniem kości długich. W kończynach górnych prawej i lewej wada manifestowała się niedorozwojem kości przedramienia. Prawa i lewa ręka charakteryzowały się agenezją 2 i 3 palca, syndaktylią 4 i 5 palca, hipoplazją palców, kości śródreźca i nadgarstka oraz koślawością kciuka w lewej ręce.



Rycina 32. Obraz kliniczny wady zmniejszającej ze spektrum rozszczepu rąk u probanda XI. Kończyna prawa (a, b), kończyna lewa (c, d).

Badanie aCGH wykazało obecność interstycjalnej delecji w *locus* 3q27.1 o wielkości 37 kb (pozycja genomowa wg HG19: 183269836- 183306873; ryc. 33), obejmującej fragment genu *KLHL6*. Ze względu na brak dostępności DNA rodziców probanda, nie można było przeprowadzić badania rodzinnego.

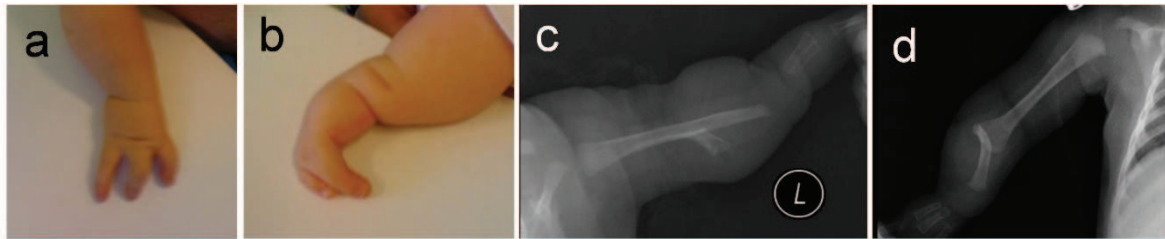


Rycina 33. Obraz przedstawiający interstycjalną delecję w *locus* 3q27.1, obejmującą fragment genu *KLHL6*, wykrytą u probanda XI. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydojowej (aCGH).

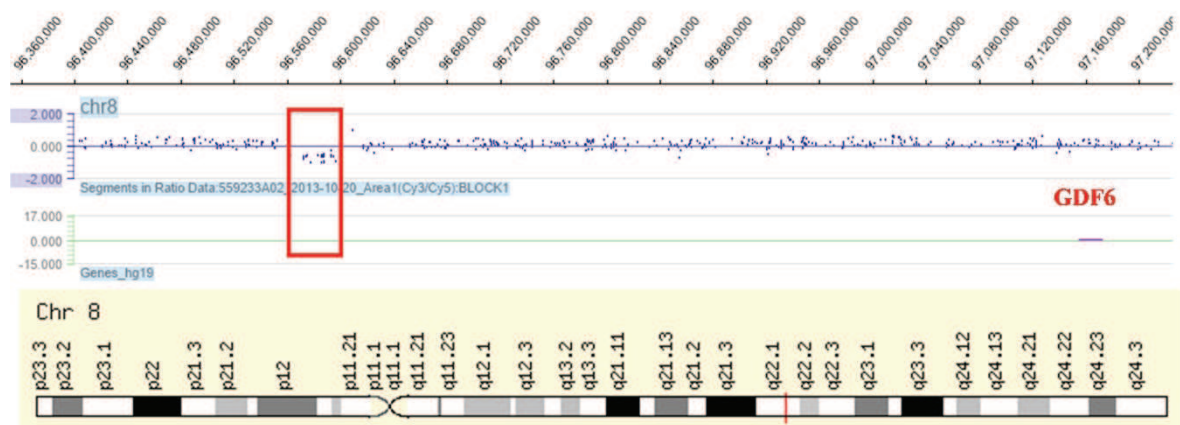
Proband XII (ID: 5781)

U probanda XII występowała sporadyczna izolowana wada kończyn górnych ze spektrum SHFM lub oligodaktylii łokciowej. W kończynie górnej prawej wada charakteryzowała się agenezją kości łokciowej, hipoplazją i łukowatym wygięciem kości promieniowej, hipoplazją kości śródreżca i nadgarstka oraz wadą rąk, manifestującą się agenezją palców 4 i 5 i odpowiednich kości śródreżca (ryc. 34 a, c). Kończyna górna lewa uległa skróceniu na skutek hipoplazji kości promieniowej i łokciowej, które dodatkowo zrósnięte były z kością ramienną. Wada lewej ręki charakteryzowała się całkowitym brakiem trzech palców oraz odpowiednich kości śródreżca (ryc. 34 b, d) W uprzednio

wykonanych badaniach u probanda wykluczono mutację w genach *TBX3* i *TP63* oraz duplikacje w *loci* 10q24 i 17p13.3 [Jamsheer, 2011]. W badaniach własnych, w wyniku analizy aCGH, u probanda wykryto interstycjalną delecję w *locus* 8q22.1 o wielkości 33,8 kb (pozycja genomowa wg HG19: 96562420-96596204; ryc. 35). W odległości ok. 560 kb w kierunku telomerowym od zmiany, zlokalizowany jest gen *GDF6*. W badaniu qPCR potwierdzono obecność delecji u probanda, a także jej nosicielstwo u zdrowego ojca (ID: #3323) pacjenta. Wykluczono obecność zmiany u zdrowej matki pacjenta (ID: #3322).



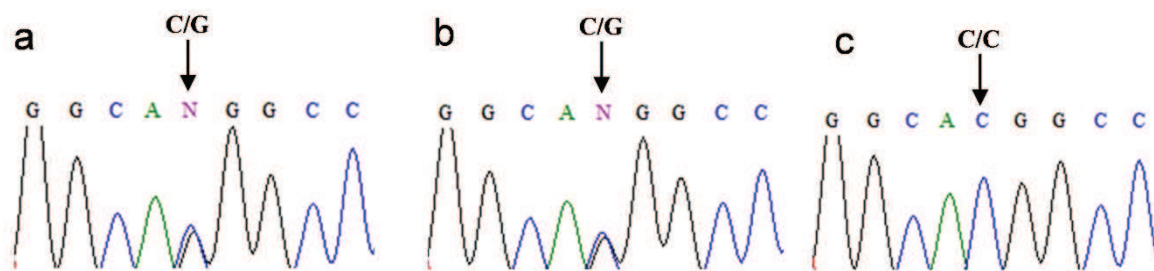
Rycina 34. Obraz kliniczny i radiologiczny wady kończyn górnych u probanda XII; oligodaktylia ręki prawej i lewej (a, b), wada skracająca kości przedramienia kończyny górnej prawej i lewej (c, d).



Rycina 35. Obraz interstycjalnej delecji w *locus* 8q22.1 wykrytej u probanda XII oraz genu *GDF6*, znajdującego się w odległości ok. 560 kb w kierunku telomerowym od zmiany. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydu (aCGH).

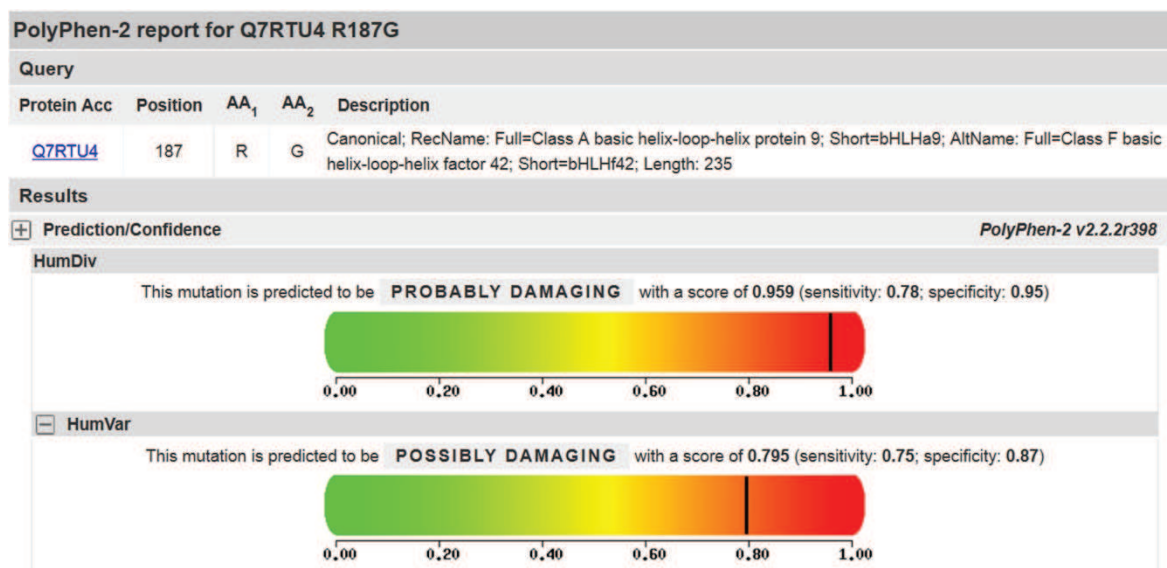
4.4. Sekwencjonowanie genów kandydujących

Sekwencjonowanie genów *BHLHA9* oraz *BHLHB5* przeprowadzono u 27 probandów, u których nie stwierdzono mutacji w ramach rutynowej diagnostyki genetycznej, w genach *WNT10B* i *DLX5* oraz w badaniu aCGH, a także u pacjentów, u których wykryto zmiany genomowe o niejednoznacznie określonej patogenności. W wyniku powyższej analizy wykryto heterozygotyczną mutację c.C559G(p.R187G) w sekwencji kodującej genu *BHLHA9* u probandki VIII (opisanej powyżej) i u jej zdrowej matki oraz wykluczono nosicielstwo mutacji u zdrowego ojca (ryc. 36).



Rycina 36. Analiza sekwencji genu *BHLHA9*; heterozygotyczna mutacja c.C559G(p.R187G) w genie *BHLHA9* u probandki (a) i jej matki (b) oraz sekwencja prawidłowa u ojca (c).

Ocena stopnia patogenności stwierdzonego wariantu została przeprowadzona przy pomocy programów internetowych. Wartości współczynników *score* wynosiły: *PolyPhen2* – 0,959 („*probably damaging*”) wg HumDiv oraz 0,795 („*possibly damaging*”) wg HumVar (ryc. 37), SIFT – 0,19 (tolerated; ryc. 38). Program *MutationTaster* sklasyfikował badany wariant jako polimorfizm („*polymorphism*”).



Rycina 37. Wynik oceny patogenności wariantu p.R187G w genie *BHLHA9* z wykorzystaniem programu PolyPhen2.

SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000375248,R187G	ENSP00000375248	187	R	G	TOLERATED	0.19	2.65	34

Rycina 38. Wynik oceny patogenności wariantu p.R187G w genie *BHLHA9* z wykorzystaniem programu SIFT.

U pozostałych probandów wykluczono mutację w badanych genach. U 9 pacjentów manifestujących klasyczny izolowany rozszczep rąk i/lub stóp wykonano

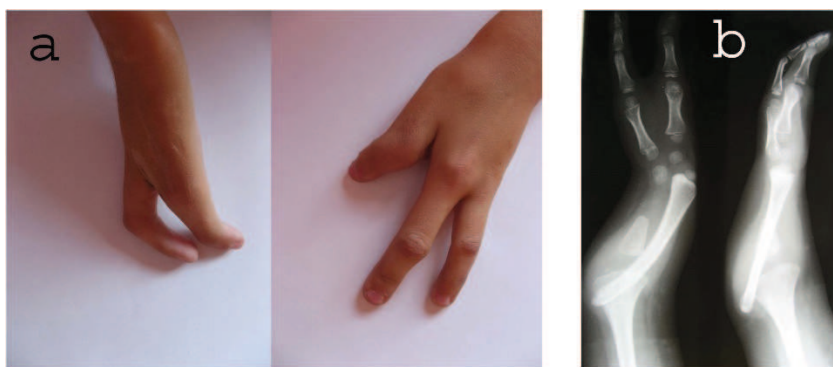
sekwencjonowanie eksonów 15 i 17 genu *DYNC111*. U żadnego z pacjentów nie stwierdzono mutacji w badanym zakresie.

4.5. Sekwencjonowanie eksomu (WES ang. *Whole Exome Sequencing*)

Badanie sekwencjonowania eksomu przeprowadzono u 10 probandów i ich rodziców (tzw. *trio*). W wyniku niniejszych badań udało się wykryć potencjalnie patogenne mutacje w dwóch genach kandydujących.

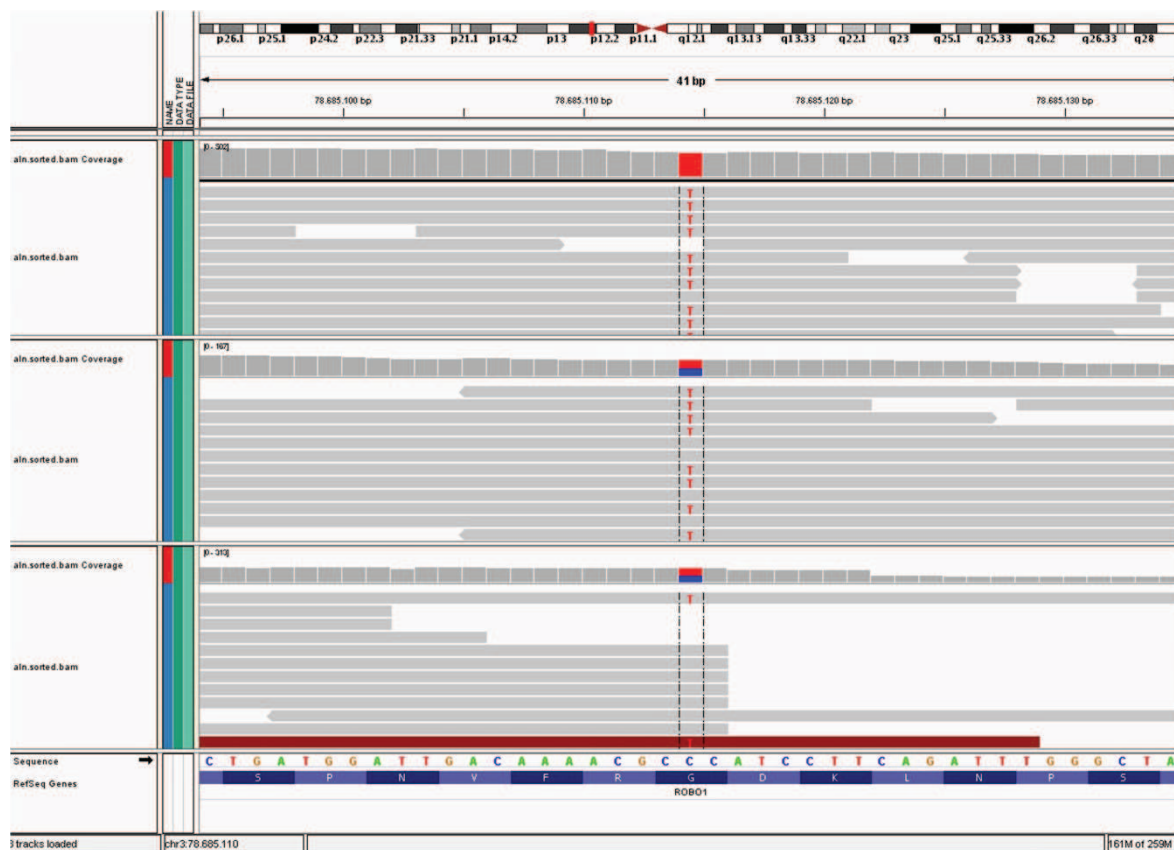
Proband XIII (ID: 5785)

U probanda XIII (ryc. 39) stwierdzono sporadyczne wystąpienie wady kończyn górnych ze spektrum SHFM lub oligodaktylii łokciowej ze skróceniem kości długich. W kończynie górnej prawej stwierdzono hipoplazję kości łokciowej, łukowato wygiętą kość promieniową, niedorozwój kości nadgarstka i śródreżca z całkowitą agenezją osi trzech palców (ręka dwupalczasta). W kończynie górnej lewej wada manifestowała się hipoplazją kości łokciowej, niedorozwojem kości śródreżca oraz całkowitym brakiem osi dwóch palców (ręka trójpalczasta).



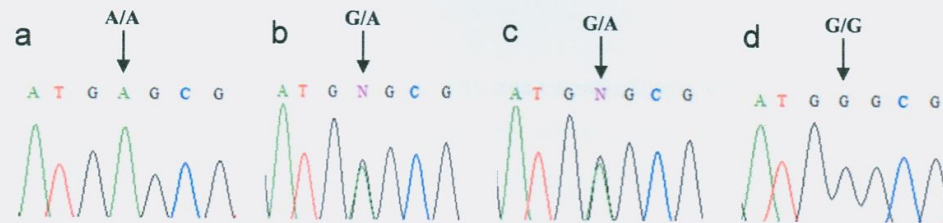
Rycina 39. Obraz kliniczny (a) i radiologiczny (b) obustronnej wady kończyn górnych u probanda XIII.

W uprzednio wykonanych badaniach u probanda wykluczono mutacje w genach *TBX3*, *TP63* oraz duplikacje w *loci* 10q24 i 17p13.3 [Jamsheer, 2011]. W badaniach własnych dodatkowo wykluczono mutacje w genach *WNT10B*, *DLX5*, *BHLHA9*, *BHLHB5* oraz patogenne mikrorearanżacje chromosomowe o wielkości powyżej 5-10 kb. W przeprowadzonym u probanda oraz jego zdrowych rodziców (ID: 3843, 3866) sekwencjonowaniu eksomu, wykryto homozygotyczną mutację typu *missense* c.G3182A(p.G1061E) w eksonie 23 sekwencji kodującej genu *ROBO1*, której nosicielstwo stwierdzono w układzie heterozygotycznym u rodziców probanda (ryc. 40).

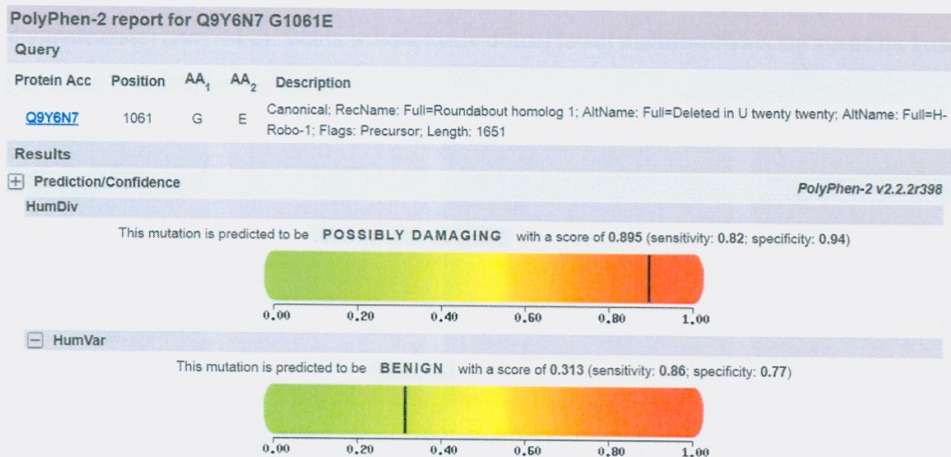


Rycina 40. Mutacja c.G3182A(p.G1061E) w genie *ROBO1* zidentyfikowana u probanda XIII w układzie homozygotycznym (320 odczytów) oraz u zdrowych rodziców w układzie heterozygotycznym (matka – 72 odczyty; ojciec – 121 odczytów).

Ocena patogenności stwierdzonego wariantu została przeprowadzona przy pomocy programów internetowych. Wartości współczynników *score* wynosiły: *PolyPhen2* – 0,895 („*possibly damaging*”) wg HumDiv oraz 0,313 („*benign*”) wg HumVar (ryc. 42), SIFT – 0,1 („*tolerated*”; ryc. 43). Program *MutationTaster* sklasyfikował badany wariant jako „*disease causing*”. Wyniki analizy eksomu zostały zweryfikowane w sekwencjonowaniu metodą Sangera, potwierdzając obecność w/w mutacji w układzie homozygotycznym u probanda oraz w układzie heterozygotycznym u obojga rodziców pacjenta. Jednocześnie niniejszej analizie poddano zdrowego brata pacjenta, u którego nie stwierdzono obecności badanej mutacji (ryc. 41).



Rycina 41. Analiza sekwencji eksonu 23 genu *ROBO1*; mutacja homozygotyczna u probanda XIII (a), mutacja heterozygotyczna u matki (b), mutacja heterozygotyczna u ojca (c), sekwencja prawidłowa u brata pacjenta (d).



Rycina 42. Wynik oceny patogenności wariantu p.G1061E w genie *ROBO1* z wykorzystaniem programu *PolyPhen2*.

SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Segs
ENSP00000420321,G1061E	ENSP00000420321	1061	G	E	TOLERATED	0.1	2.87	69

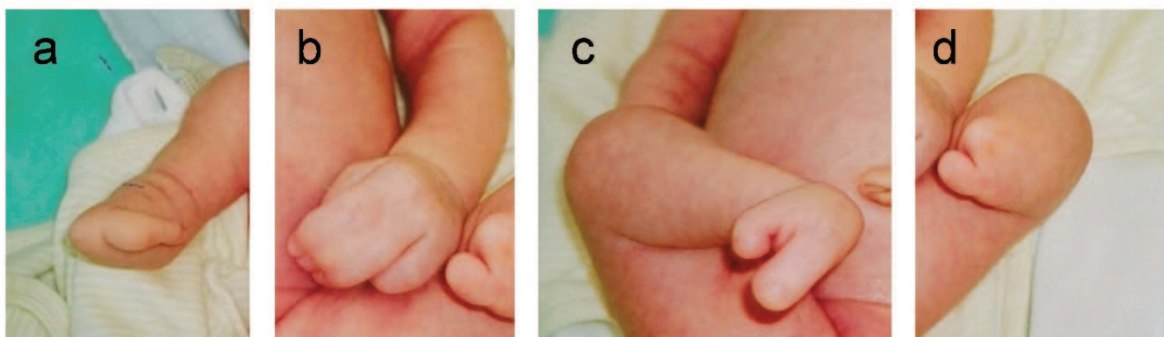
Rycina 43. Wynik oceny patogenności wariantu p.G1061E w genie *ROBO1* z wykorzystaniem programu SIFT.

Aby wykluczyć polimorficzny charakter wykrytego wariantu, badany ekson zsekwencjonowano u 192 osób z polskiej grupy kontrolnej. W żadnej próbie nie stwierdzono mutacji p.G1061E, zarówno w układzie hetero- jak i homozygotycznym.

Ze względu na podobny fenotyp, ekson 23 genu *ROBO1* zsekwencjonowano również u probanda XII, jednakże nie zidentyfikowano żadnych mutacji w badanym zakresie.

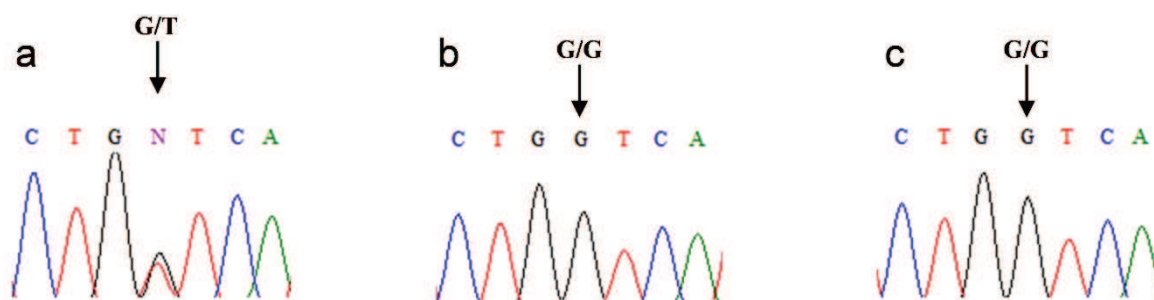
Proband XIV (ID: #1984)

U probanda XIV występowała sporadyczna czterokończynowa wada zmniejszająca z oligodaktylią (spektrum SHFM). W kończynie górnej prawej wada manifestowała się agenezją kości przedramienia oraz rąk (z zachowanym pojedynczym szczytkowym palcem). W kończynie górnej lewej kości przedramienia były prawidłowo wykształcone (ryc. 44 a), natomiast wada lewej ręki charakteryzowała się syndaktylią 2, 3 i 4 palca (ryc. 44 b). W kończynie dolnej prawej stwierdzono hipoplazję kości podudzia oraz wadę stopy ze spektrum ektrodaktylii, polegającą na agenezji palców centralnego promienia stopy (stopa dwupalczasta) (ryc. 44 c). Wada w kończynie dolnej lewej manifestowała się agenezją kości podudzia oraz stopy (ryc. 44 d).

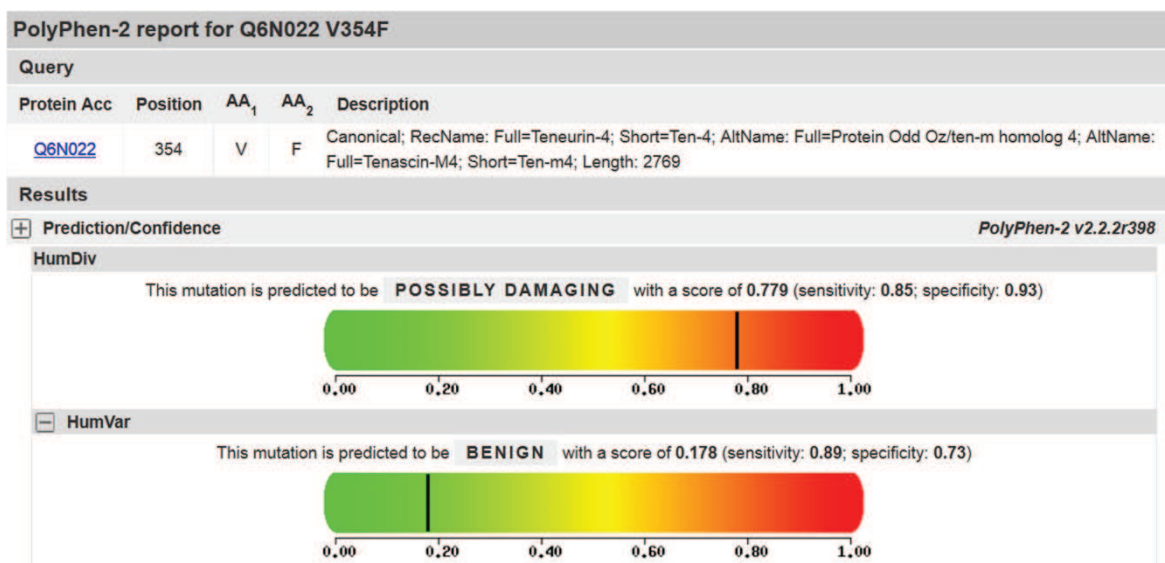


Rycina 44. Obraz kliniczny wady kończyn u probanda XIV; agenezja kości przedramienia i rąk w kończynie górnej prawej (a), syndaktylia w ręce lewej (b), hipoplazja kości podudzia oraz ektrodaktylia w kończynie dolnej prawej, agenezja kości podudzia i stopy w kończynie dolnej lewej (d).

W uprzednio wykonanych badaniach [Jamsheer, 2011] u probanda wykluczono mutacje w genach *WNT7B* (w kierunku zespołu Fuhrmanna), *TP63* oraz duplikacje w *loci* 10q24, 17p13.3, a także patogenne lub potencjalnie patogenne mikrorearanżacje o wielkości powyżej 70-100 kb. W badaniach własnych przeprowadzono sekwencjonowanie eksomu, w którym stwierdzono heterozygotyczną mutację c.G1060T(p.V354F) w eksonie 9 sekwencji kodującej genu *ODZ4*. Analiza nie wykazała obecności mutacji u zdrowych rodziców pacjenta (ID: #1985, #1986) (ryc. 48). Ocena patogenności stwierdzonego wariantu została przeprowadzona przy pomocy programów internetowych. Wartości współczynników *score* wynosiły: *PolyPhen2* – 0,779 („possibly damaging”) wg HumDiv oraz 0,178 („benign”) wg HumVar (ryc. 46), SIFT – 0 („damaging”; ryc. 47). Program *MutationTaster* sklasyfikował badany wariant jako „disease causing”. Obecność mutacji u probanda oraz jej brak u rodziców został potwierdzony niezależnym sekwencjonowaniem metodą Sangera (ryc. 45).



Rycina 45. Analiza sekwencji eksonu 9 genu *ODZ4*; mutacja heterozygotyczna c.G1060T(p.V354F) u probanda XIV (a), sekwencja prawidłowa u matki (b), sekwencja prawidłowa u ojca (c).



Rycina 46. Wynik oceny patogenności wariantu p.V354F genu *ODZ4* z wykorzystaniem programu PolyPhen2.

SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000278550,V354F	ENSP00000278550	354	V	F	*DAMAGING 0		3.26	153

Rycina 47. Wynik oceny patogenności wariantu p.V354F genu *ODZ4* z wykorzystaniem programu SIFT.



Rycina 48. Mutacja c.G1060T(p.V354F) w genie *ODZ4* zidentyfikowana u probanda XII w układzie heterozygotycznym; brak obecności mutacji u zdrowych rodziców.

Tabela 10. Podsumowanie mutacji stwierdzonych u pacjentów.

ID probanda/ rodziny	fenotyp	zapis mutacji	status dziedziczenia mutacji	klasyfikacja mutacji
P I	SHFM	dup10q24.3	<i>de novo</i>	znana patogenna
P II	SHFM	dup10q24.3	<i>de novo</i>	znana patogenna
R III: proband córka	SHFM	dup10q24.3	<i>de novo</i> odziedziczona	znana patogenna
P IV	SHFM	<i>DLX5</i> p.E39X/wt	odziedziczona od zdrowej matki	nowa prawdopodobnie patogenna
R V: proband syn	SHFM atypowa wada stopy	<i>DLX5</i> p.E39X/wt	odziedziczona	nowa prawdopodobnie patogenna
R VI: proband, ojciec, siostra ojca	SHFM	dup7q21.3	odziedziczona	znana patogenna
P VII	zespół wad, atypowy SHFM	dupXp22.31	odziedziczona od zdrowej matki	nowa prawdopodobnie patogenna
P VIII	SHFM rąk, wada l. stopy barwnikowe zm. skórne	dup6q27 <i>BHLHA9</i> p.R187G/wt	odziedziczona od zdrowego ojca odziedziczona od zdrowej matki	nowa o niejednoznacznie określonej patogenności nowa o niejednoznacznie określonej patogenności
P IX	atypowy SHFM	del17q25.1	odziedziczona od zdrowego ojca	nowa o niejednoznacznie określonej patogenności
P X	FFU ?	del1p33	brak danych	nowa o niejednoznacznie określonej patogenności
P XI	atypowy SHFM	del3q27.1	brak danych	nowa o niejednoznacznie określonej patogenności
P XII	atypowy SHFM/ oligodaktylia łokciowa	del8q22.1	odziedziczona od zdrowego ojca	nowa o niejednoznacznie określonej patogenności
P XIII	atypowy SHFLD/ oligodaktylia łokciowa	<i>ROBO1</i> p.G1061E/ p.G1061E	odziedziczona	nowa prawdopodobnie patogenna
P IV	atypowy SHFLD	<i>ODZ4</i> p.V354F/wt	<i>de novo</i>	nowa prawdopodobnie patogenna

P – proband; R – rodzina;

SHFM – rozszczep rąk i/lub stóp; SHFLD – rozszczep rąk i/lub stóp ze skróceniem kości długich;
dup – duplikacja, del – delecja; wt – allel prawidłowy

5. DYSKUSJA

Głównym założeniem niniejszej rozprawy doktorskiej była próba identyfikacji podłoża molekularnego wad ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp. Schemat postępowania diagnostycznego został opracowany przez autorkę na podstawie danych z piśmiennictwa, badań własnych oraz cech klinicznych, charakteryzujących daną wadę o typie SHFM. Ogólny algorytm postępowania diagnostycznego był w wybranych przypadkach odpowiednio modyfikowany i dostosowywany do indywidualnych cech fenotypowych probandów/rodzin.

Metodami umożliwiającymi identyfikację nowych zmian u pacjentów, u których wykluczono znane przyczyny genetyczne wady, są technika sekwencjonowania eksomu oraz całogenomowa porównawcza hybrydyzacja do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH). Metoda aCGH jest ponadto narzędziem umożliwiającym badanie hipotezy o genomowym charakterze zmian patogennych leżących u podłoża wad ze spektrum SHFM.

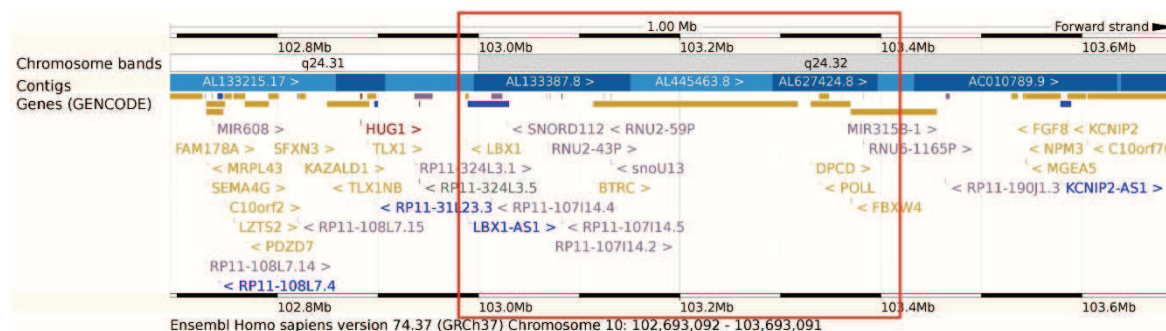
5.1. Rutynowa diagnostyka genetyczna

Rutynowa diagnostyka genetyczna przeprowadzona u 19 pacjentów nie objętych do tej pory poradnictwem genetycznym, umożliwiła wykrycie przyczyny molekularnej wady u 3 probandów oraz pozwoliła na wyodrębnienie grupy chorych o nieznannej lub rzadkiej przyczynie genetycznej wady. Ta grupa pacjentów była najbardziej interesująca pod względem naukowym, gdyż stanowiła materiał służący identyfikacji nowych, nieopisanych dotąd w piśmiennictwie naukowym, czynników etiologicznych SHFM.

Wada u probandów I, II i III, u których stwierdzono nieprawidłowy wynik rutynowej diagnostyki genetycznej, uwarunkowana była duplikacją w *locus* dla SHFM3 (10q24.31-32). Jest to najczęstsza przyczyna genetyczna niezespołowej formy klasycznej ektrodaktylii i odpowiada za 18-25% przypadków. Do tej pory opisano 23 probandów z niezespołową formą rozszczepu SHFM uwarunkowaną duplikacją w *locus* 10q24.31-32 [Kłopotcki i wsp., 2012; Everman i wsp., 2006; de Mollerat i wsp., 2003; Kano i wsp., 2005]. W badaniach własnych, probandzi spełniający kryterium wady izolowanej o typowej manifestacji, stanowili 52% (10 na 19 pacjentów poddanych badaniom rutynowym) z czego u 30% (3 probandów) stwierdzono duplikację w *locus* SHFM3. Wynik ten jest zgodny z danymi

z piśmiennictwa [Klopacki i wsp., 2012; Everman i wsp., 2006; de Mollerat i wsp., 2003; Kano i wsp., 2005]. Duplikacje w *locus* 10q24.31-32 identyfikowane są również, choć zdecydowanie rzadziej, u pacjentów z zespołową formą SHFM. Do tej pory opisano zaledwie ośmiu takich probandów, u których oprócz wad kończyn zdiagnozowano dysmorfie, niepełnosprawność intelektualną, niedosłuch, wady nerek, oligodoncję lub rozszczep podniebienia.

Wielkość duplikacji w *locus* 10q24 mieści się w granicach 325-570 kb. Zmiana typowa obejmuje geny *LBX1*, *BTRC*, *POLL* oraz fragment genu *FBXW4* [Klopacki i wsp., 2012; Kano i wsp., 2005; Everman i wsp., 2006]. Odnotowano jeden przypadek, w którym zakres zmiany był przesunięty w kierunku telomerowym, obejmując również gen *FGF8* [Dimitrov i wsp., 2010]. W innym doniesieniu opisano pacjenta, u którego duplikacja obejmowała wyłącznie dwa geny *BTRC* i *POLL*, co pozwoliło zawęzić region krytyczny dla SHFM3 do 325 kb [Lyle i wsp., 2006]. Duplikacja stwierdzona w badaniach własnych u pacjentów II i III miała zakres typowy (odpowiednio: 419 kb i 438 kb) i obejmowała geny *LBX1*, *BTRC*, *POLL* oraz fragment genu *FBXW4* (ryc. 49).



Rycina 49. Genomowa lokalizacja duplikacji w *locus* 10q24.31-32 zidentyfikowanej u probandów II i III. Ramką zaznaczono zakres zmiany. Duplikacja obejmuje geny *LBX1*, *BTRC*, *POLL* oraz fragment genu *FBXW4*.

Mechanizm powstawania malformacji ze spektrum SHFM spowodowanej duplikacją w *locus* 10q24.31-32 jest niejasny. Ponieważ bezpośrednia przyczyna wady nie jest poznana, uznaje się, iż każdy z genów znajdujących się w obrębie lub niedalekim sąsiedztwie zmiany jest potencjalnie związany z wystąpieniem wady. Gen *FBXW4* był do niedawna najbardziej obiecującym genem kandydującym ponieważ wykazuje wysoki stopień homologii (87%) w stosunku do ortologu genu *Fbxw4* u myszy. W badaniach modelu mysiego wykazano, że inaktywacja genu *Fbxw4* powoduje agenezję kości palców środkowych promieni kończyn przednich oraz hipoplazję lub syndaktylię kości śródreza i śródstopia, a więc fenotyp odpowiadający ektrodaktylii. Naturalnie występująca mysz z dziedziczną formą

ektro daktylii (tzw. *Dac mouse*), u której wada określana jest mianem „*dactylaplasia*”, stanowi zwierzęcy model w badaniach nad ludzkim *locus* SHFM3 [Crackower i wsp., 1998]. *Fbxw4* należy do rodziny białek F-Box/WD40, które są zaangażowane w kontrolę cyklu komórkowego poprzez ubikwitynację [Ivanakiev i wsp., 1999]. Sidow i wsp. [1999] wysunęli hipotezę, jakoby mysie białko *Fbxw4* utrzymywało odpowiedni poziom podziałów komórkowych w strefie AER, powodując degradację białek supresorowych. Przypuszcza się, że u myszy *Dac*, na skutek inaktywacji genu *Fbxw4*, białka supresorowe nie są degradowane, co powoduje zahamowanie podziałów komórkowych w strefie AER i manifestację fenotypu SHFM [Sidow i wsp., 1999]. Niemniej jednak jest to hipoteza, która wymaga potwierdzenia.

Zjawisk zachodzących w procesie patogenezy SHFM3 u człowieka nie można w bezpośredni sposób przełożyć na model zwierzęcy reprezentowany przez mysz *Dac*. Mechanizmy patogenne w obydwu przypadkach są bowiem zupełnie różne. U myszy mutacją przyczynową są insercje w genie *Fbxw4*, u ludzi zaś tandemowa duplikacja. Do tej pory nie udało się zidentyfikować mutacji w genie *FBXW4* u pacjentów z SHFM. Ponadto pozostałe geny w regionie krytycznym dla SHFM3, których ortologi u myszy zdają się być nienaruszone w przypadku „*dactylaplasji*”, są również istotne w prawidłowym rozwoju kończyn i mogą być potencjalnie zaangażowane w ekspresję SHFM u ludzi. Co więcej, Lyle i wsp. [2006] opisali przypadek ektro daktylii uwarunkowanej duplikacją w regionie 10q24.3, obejmującą jedynie geny *BTRC* i *POLL*, a więc o zakresie mniejszym niż typowy, oszczędzającym gen *FBXW4*.

Białko *BTRC* należy do rodziny białek F-box i jest elementem szlaku Wnt/ β -katenina oraz NF κ B. Zaburzenia w regulacji i aktywacji tych ścieżek sygnalizacyjnych w rozwijającym się zawiązku kończyny powodują degradację strefy AER i są przyczyną wad zmniejszających kończyn oraz cech dysplazji ektodermalnej [Bushdid i wsp., 1998]. Białko *IKK α* , również kodowane przez gen zawarty w *locus* SHFM3, jest inhibitorem szlaku NF κ B, a jego stężenie jest utrzymywane na niskim poziomie dzięki ubikwitynacji prowadzonej przez białko *BTRC*. Udowodniono, iż delecja genu *IKK α* u myszy powoduje malformacje kończyn i skóry [Li i wsp., 1998]. Przypuszcza się, że hipotetyczna nadekspresja genu *BTRC* spowodowana duplikacją w *locus* SHFM3 może prowadzić do zmniejszonego poziomu β -kateniny oraz *IKK α* , tym samym zaburzeń w strefie AER, a ostatecznie - do ektro daktylii [Lyle i wsp., 2006].

Gen *FGF8* nie jest zlokalizowany w obrębie typowej duplikacji 10q24.2, lecz jest usytuowany w odległości ok. 100-120 kb i może z dużym prawdopodobieństwem być

zaangażowany w patogenezę SHFM. Gen ten odgrywa ważną rolę w regulacji prawidłowego wzrastania i formowania się kończyn poprzez indukcję białka SHH, które umożliwia interakcję pomiędzy komórkami strefy AER i ZPA. Zahamowanie ekspresji *Fgf8* w komórkach struktury AER kończyn przednich powoduje agenezję pierwszego i drugiego palca wraz z odpowiednią kością śródreżca oraz agenezję lub hipoplazję kości ramiennej i hipoplazję lub fuzję kości nadgarstka. Niemniej jednak, mutacje germinalne typu utraty funkcji *Fgf8* są letalne, co wyklucza udział tych zmian w patogenezie wad kończyn [Moon i wsp., 2000].

Sugeruje się, iż za mechanizmem prowadzącym do rozwoju wady uwarunkowanej duplikacją w *locus* SHFM3 stoi zaburzenie w równowadze pomiędzy wzajemną interakcją genów i ich sekwencji regulatorowych [Friedli i wsp., 2008]. Badania nad związkiem przyczynowo-skutkowym pomiędzy stopniem ekspresji wady a wielkością duplikacji 10q24 nie wykazały istotnych korelacji. Opisany przez Dimitrova i wsp. [2010] proband z największym zakresem zmiany, obejmującym gen *FGF8*, nie wykazywał bowiem cięższego fenotypu.

Drugą co do częstości przyczyną SHFM bez skrócenia kości długich (12%) oraz pierwszą w SHFLD (90%) jest duplikacja w *locus* 17p13.3 [Klopocki i wsp., 2012]. W badaniach własnych pacjenci, u których rozszczepowi rąk i/lub stóp towarzyszyło skrócenie kości długich, stanowili 5/11 tj. ok. 50%. U żadnego z probandów poddanych rutynowej diagnostyce genetycznej nie zidentyfikowano duplikacji w *locus* 17p13.3.

Trzecim czynnikiem etiologicznym analizowanym w toku powyższych badań były mutacje w genie *TP63* odpowiadające za ok. 10% przypadków izolowanego SHFM oraz aż 90% przypadków zespołu EEC. W badanej grupie był jeden proband z rozpoznaniem klinicznie zespołem EEC, u którego wykluczono mutacje w sekwencji kodującej genu *TP63*. U pozostałych probandów również nie wykryto zmian w w/w genie.

5.2. Sekwencjonowanie genów *WNT10B* i *DLX5*

Do tej pory opisano jedynie cztery przypadki o autosomalnym recesywnym dziedziczeniu wady, w tym dwa rodzinne i jeden sporadyczny, spowodowane mutacjami w genie *WNT10B* oraz jeden rodzinny przypadek uwarunkowany homozygotyczną mutacją w genie *DLX5* [Ugur i wsp. 2008; Blattner i wsp., 2010; Khan i wsp., 2012; Shamseldin i wsp., 2012]. Pomimo tego, że wady ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp są niezwykle rzadko

uwarunkowane mutacjami recesywnymi, nie można wykluczyć, że ten rodzaj dziedziczenia może zostać zidentyfikowany u pacjentów badanych w niniejszej pracy.

Rodzinne przypadki SHFM spowodowane homozygotycznymi mutacjami w *WNT10B* opisane przez Ugura i wsp. [2008] oraz Khana i wsp. [2012] dotyczyły rodzin spokrewnionych, w których ryzyko wystąpienia chorób recesywnych jest wysokie. Wywiad rodzinny, przeprowadzony u wszystkich probandów poddanych badaniom genetycznym w niniejszej pracy, pozwolił wykluczyć pokrewieństwo rodziców. U żadnego z probandów nie stwierdzono mutacji w genie *WNT10B*. Wynik ten był zgodny z oczekiwaniami, niemniej jednak przyjęty przez autorkę schemat postępowania diagnostycznego nakazywał identyfikację lub wykluczenie wszystkich znanych przyczyn SHFM.

Niezwykłe interesująco przedstawiają się wyniki analizy sekwencji genu *DLX5*, zlokalizowanego w *locus* 7q21.3-22.1 (SHFM1). Aberracje w tym regionie są przyczyną rozszczepu rąk i/lub stóp, któremu mogą towarzyszyć cechy dysmorfii, niedosłuch typu odbiorczego oraz cechy dysplazji ektodermalnej [Tackels-Horne i wsp., 2001]. Gen *DLX5*, wraz ze zlokalizowanym w niedalekim sąsiedztwie genem *DLX6*, pełni ważną funkcję w procesie rozwoju kończyn. Tkankowo-specyficzna ekspresja obydwu genów została zidentyfikowana w strukturze AER zawiązków kończyn, osteoblastach rozwijających się kości oraz w przestrzeniach międzyneuronalnych części podstawnej kresomózgowia [Simeone i wsp., 1994; Acampora i wsp., 1999; Lo Iacono i wsp., 2008]. W modelu mysim, podwójny lecz nie pojedynczy *knock-out* genowy *Dlx5/Dlx6* wykazuje ektrodaktylię oraz wady twarzoczaszki i ucha wewnętrznego [Robledo i wsp., 2002].

U probandów IV i V wykryto tę samą heterozygotyczną mutację typu nonsense (p.E39X) w homeodomenie, w eksonie pierwszym badanego genu. Mutacja ta powoduje wprowadzenie przedwczesnego kodonu stop, co skutkuje najprawdopodobniej degradacją transkryptu w procesie NMD (ang. *nonsense-mediated decay*). Do tej pory opisano jedynie jeden rodzinny przypadek rozszczepu rąk i/lub stóp uwarunkowany mutacją w genie *DLX5*. W opisanej rodzinie przyczyną wystąpienia wady u dwóch sióstr była homozygotyczna mutacja *missense* p.Q178P w homeodomenie, w eksonie 2 genu *DLX5*. Bezobjawowi rodzice sióstr byli spokrewnieni i byli nosicielami mutacji w układzie heterozygotycznym. U jednej z sióstr malformacjom rąk i stóp towarzyszyło skrócenie kości długich, a u drugiej niedosłuch. Obie siostry manifestowały nieznaczne cechy dysmorfii [Shamseldin i wsp., 2012]. Identyfikacja mutacji patogenicznej w genie *DLX5* była pierwszym i do tej pory jedynym opisanym dowodem na bezpośredni udział mutacji punktowych genu w patogenezie wad kończyn ze spektrum SHFM.

W badaniach własnych, proband IV z obustronnym izolowanym typowym rozszczepem rąk odziedziczył mutację p.E39X od zdrowej matki, co może podważać patogenność zmiany. Jednakże częste w ektrodaktylii zjawisko niepełnej penetracji oraz niepolimorficzny (mutacja typu *nonsense*) charakter mutacji nie pozwala wykluczyć udziału tego wariantu w patogenezie wady u probanda IV. Za patogennością wykrytego wariantu przemawia również fakt wykrycia tej samej mutacji w rodzinie V. U probanda V występowała izolowana czterokończynowa ektrodaktylia. U jego syna stwierdzono dużo łagodniejszą manifestację wady, charakteryzującą się hipoplazją, syndaktylią i klinodaktylią palców stopy lewej. U probanda IV wykluczono w badaniu qPCR potencjalne zmiany liczby kopii na drugim allelu genu *DLX5* oraz mutacje punktowe w genie *DLX6*. Wykryta w rodzinach IV i V mutacja w genie *DLX5* nie ma jednoznacznie określonego udziału w rozwoju wady. Aby udowodnić rolę stwierdzonego wariantu w rozwoju SHFM konieczne byłoby zbadanie nosicielstwa zmiany u kolejnych członków obydwu rodzin oraz jej identyfikacja w większej grupie niespokrewnionych probandów. Byłby to pierwszy przypadek wystąpienia izolowanej wady ze spektrum SHFM o niepełnej penetracji, uwarunkowanej mutacją typu *nonsense* na jednym allelu genu *DLX5*.

5.3. Badania techniką porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH)

Choroby genomowe uwarunkowane rzadkimi wariantami liczby kopii (CNV) o charakterze patogennym zostały po raz pierwszy opisane w zespołach wad wrodzonych takich jak: zespół Smitha-Magenis, zespół Sotosa, zespół Wilamsa-Beurena [Girirajan i wsp., 2006; Kriek i wsp., 2006]. W okresie ostatnich kilku lat pojawia się coraz więcej doniesień opisujących nowe CNV, stanowiące przyczynę wad wrodzonych, zarówno wad izolowanych, jak i zespołów wad mnogich, których podłoże genetyczne było wcześniej nieznanne. Wynika to z coraz większej dostępności metody aCGH, która jest skutecznym narzędziem umożliwiającym identyfikację nie zrównoważonych zmian genomowych. Analiza wyników aCGH przysparza wiele trudności ze względu na ogrom danych, często trudnych do interpretacji. Odsetek polimorficznych CNV, stanowiących o zmienności międzyosobniczej, jest w genomie ludzkim zaskakująco duży. Ilość CNV wykrywanych metodą aCGH zależy od rozdzielczości mikromacierzy oligonukleotydowej. W niniejszych badaniach wykorzystywano mikromacierze o wysokiej rozdzielczości, tj. 1.4 miliona sond

na haploidalny genom, które pozwoliły na wyodrębnienie u pojedynczego probanda średnio 70 zmian CNV o wielkości powyżej 3-5 kb. Sporym wyzwaniem jest oddzielenie wariantów polimorficznych od patogennych. Umożliwiają to internetowe bazy danych, gromadzące informacje o wszystkich opisanych wariantach liczby kopii u zdrowych osobników (np. baza DGV). Ocena patogenności pozostałych, potencjalnie niepolimorficznych zmian, jest jeszcze bardziej wymagająca, zwłaszcza jeśli nie znajdują się w ich obrębie lub poblizu geny o znanej funkcji u człowieka lub których funkcja nie została określona w badaniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych. W takiej sytuacji należy polegać na wyniku badań rodzinnych lub badań przeprowadzonych na większej grupie pacjentów. Identyfikacja danej zmiany u probanda oraz u chorego krewnego lub niespokrewnionego probanda o zbliżonym fenotypie, lub jej wykluczenie u zdrowych rodziców pacjenta, jest silnym argumentem przemawiającym za patogennością wariantu. Analogicznie stwierdzenie nosicielstwa zmiany u jednego ze zdrowych rodziców probanda w znacznym stopniu podważa jej patogenny charakter. Nie można go jednakże wykluczyć ze względu na dość powszechnie występujące w wadach kończyn zjawisko niepełnej penetracji cechy.

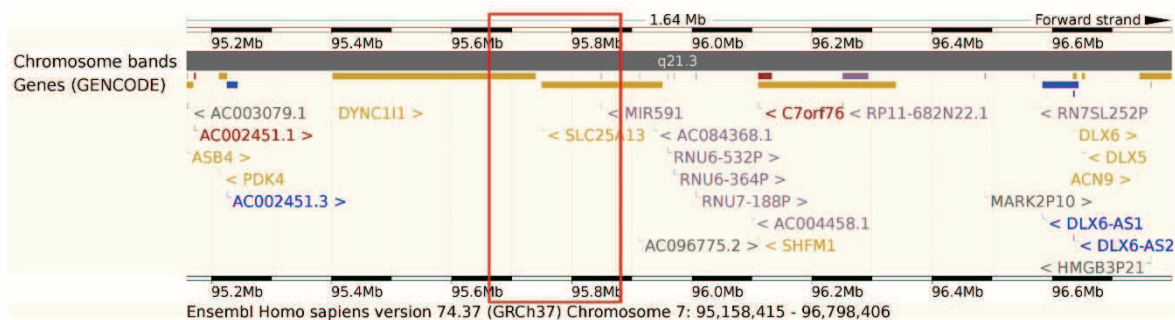
Analiza porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej przeprowadzona u 30 probandów pozwoliła na wykrycie/wykluczenie znanych zmian genomowych, odpowiadających za fenotyp oraz umożliwiła identyfikację nowych CNV o potencjalnym udziale w patogenezie wady. W wyniku powyższej analizy udało się jednoznacznie ustalić przyczynę molekularną wady u dwóch pacjentów oraz wykryć zmiany o niejednoznacznie określonej patogenności u pięciu probandów.

Rodzina VI

U probanda VI z izolowaną postacią typowego rozszczepu rąk i stóp zidentyfikowano delecję w *locus* dla 7q21.3 (SHFM1). Zmiana ta jest jedną z najmniejszych opisanych dotychczas delecji w *locus* SHFM1. Do niedawna minimalny opisywany region delecji, wspólny dla większości pacjentów z SHFM, obejmował geny *DYNC111*, *SLC25A13*, *DSS1*, *DLX5* oraz *DLX6*, z których jedynie rola *DLX5* i *DLX6* została jednoznacznie ustalona we wczesnym rozwoju kończyn. Udział genów *Dlx5/Dlx6* w patogenezie SHFM został mianowicie określony w badaniach modelu mysiego [Merlo i wsp., 2002], a identyfikacja homozygotycznej mutacji w genie *DLX5* u pacjentki z zespołową formą SHFM jednoznacznie potwierdziła jego bezpośrednią rolę w etiologii wady [Shamseldin i wsp., 2012]. Kouwenhoven i wsp. [2010] opisali przypadek pacjenta z izolowanym SHFM, u którego wada była spowodowana delecją w *locus* 7q21.3 o wielkości 880 kb, obejmującą

geny *DSS1*, *SLC25A13* oraz fragment genu *DYNClIIl*, lecz nie naruszającą *DLX5* i *DLX6*. Skłoniło to autorów do badań nad identyfikacją sekwencji regulatorowych kontrolujących ekspresję *DLX5/DLX6* w regionie zmiany. Ekspresja obydwu genów jest regulowana przez białko TP63, co jednocześnie tłumaczy podobny fenotyp u pacjentów z SHFM1 i SHFM4 [Lo Iacono i wsp., 2008]. Kouwenhoven i wsp. [2010] zlokalizowali miejsce wiązania TP63 w odległości 300 kb w kierunku 5' od genów *DLX5* i *DLX6* (SHFM1-BS1) oraz dowiedli regulatorową rolę tej sekwencji w kontroli ekspresji obydwu genów. Wykazano, iż ekspresja genów *Dlx5/Dlx6* zostaje zredukowana zarówno na skutek inaktywacji białka p63, jak i sekwencji regulatorowych kontrolowanych przez p63 [Kouwenhoven i wsp., 2010]. Ostatnie badania modelu myszy i *zebrafish* nad transkrypcyjną regulacją *DLX5/6* pozwoliły zidentyfikować dodatkowe tkankowo-specyficzne *enhancery*, których inaktywacja związana była z wadami kończyn, twarzoczaszki oraz utratą słuchu, a więc fenotypami często obserwowanymi u pacjentów z rearanżacjami w *locus* 7q21. Dwa z spośród eksonowych *enhancerów* (eExons), zlokalizowane są w eksonach 15 i 17 sekwencji kodującej genu *DYNClIIl* w odległości 900 kb w kierunku 5' od genów *DLX5/DLX6*. Gen *DYNClIIl* koduje łańcuch I podjednostki cytoplazmatycznego kompleksu białek motorycznych z rodziny dynein, odpowiedzialnych za wsteczny transport aksonalny w neuronach. Gen *DYNClIIl* nie ulega ekspresji w rozwijających się kończynach, w związku z czym jego inaktywacja spowodowana częściową delecją nie jest prawdopodobnie przyczyną wad kończyn ze spektrum SHFM [Birnbaum i wsp., 2012a; Birnbaum i wsp., 2012].

W odniesieniu do powyżej przytoczonych danych, wynik uzyskany w badaniach własnych w rodzinie VI przedstawia się niezwykle ciekawie, bowiem zakres stwierdzonej delecji jest znacznie mniejszy niż typowy. Zmiana o wielkości 205 kb nie obejmowała genów *DLX5*, *DLX6* i *DSS1*, w jej obrębie były natomiast zmapowane *enhancery* w eksonie 15 i 17 genu *DYNClIIl* (eExons 15 i 17) (ryc. 50). Wada w opisywanej rodzinie spowodowana była delecją sekwencji regulatorowych kontrolujących ekspresję genów *DLX5/6*.

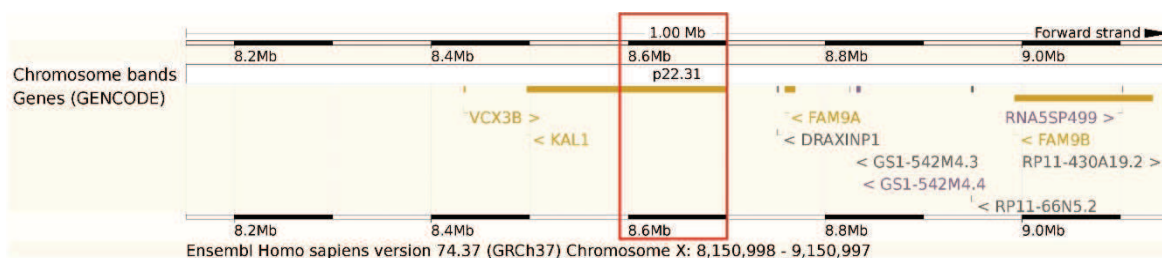


Rycina 50. Genomowa lokalizacja delecji w *locus* 7q21.3 zidentyfikowanej w rodzinie VI. Ramką zaznaczono zakres zmiany. Delecja obejmuje fragmenty genów *DYNC111* oraz *SLC25A2*.

Zgodnie z najnowszym doniesieniem ze stycznia 2014 roku, najmniejsza delecja w *locus* 7q21, spośród opisanych do tej pory, ma wielkość 106 kb i obejmuje wyłącznie eksony 11-18 genu *SLC25A13* oraz eksony 14-17 genu *DYNC111*, nie naruszając tym samym genów *DLX5/6*. Identyfikacja w/w zmiany pozwoliła ustalić minimalny region krytyczny dla SHFM1. Delecja została stwierdzona u dwóch pacjentów (proband i jego wujek) manifestujących izolowany rozszczep rąk i stóp oraz u czterech zdrowych członków tej samej rodziny. Wynik potwierdza poprzednie doniesienia na temat roli sekwencji regulatorowych w eksonach 15 i 17 genu *DYNC111* w kontroli ekspresji genów *DLX5/6* oraz wskazuje na niepełną penetrację zmiany zlokalizowanej w *locus* 7q21 [Lango i wsp., 2014]. Van Silfhout i wsp. [2009] opisali przypadek czterokończynowej typowej ektrodaktylii uwarunkowanej inwersją o wielkości 190 kb. Zmiana ta, tak samo jak u pacjenta VI oraz probanda opisanego przez Lango i wsp. [2014] oszczędzała geny *DLX5*, *DLX6* i *DSS1* oraz obejmowała fragment genu *DYNC111*, w tym *enhancery* zlokalizowane w eksonach 15 i 17. Wynik badań własnych w odniesieniu do przypadków opisanych powyżej dowodzi, iż manifestacja wady ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp wynika nie tylko z inaktywacji genów *DLX5/6*, lecz również z inaktywacji ich sekwencji regulatorowych. Wynik ten ma dużą wartość poznawczą i stanowi istotny wkład w badania nad mechanizmem patogenezy wad kończyn.

Proband VII

Bardzo interesująco przedstawiają się wyniki analizy aCGH u probanda VII, u którego zidentyfikowano duplikację w *locus* Xp22.31 o wielkości 108,316 kb. Mutacja odziedziczona od zdrowej matki probanda obejmowała całą sekwencję kodującą genu *KALI* (ryc. 51).



Rycina 51. Genomowa lokalizacja duplikacji w *locus* Xp22.31 zidentyfikowanej u probanda VII. Ramką zaznaczono zakres zmiany. Duplikacja obejmuje gen *KALI*.

W trakcie rozwoju embrionalnego, gen *KALI* ulega ekspresji w rdzeniu kręgowym, nerkach, opuszcze węchowej oraz siatkówce. Produkt genu – anosmina-1 jest wydzielniczą glikoproteiną adhezyjną, która kontroluje rozwój neuronów węchowych oraz migrację neuronów produkujących gonadoliberynę (GnRH ang. *gonadotropin-releasing hormone*). Fibronektynowe domeny typu III w strukturze anosminy-1 wykazują zdolność wiązania siarczuanu heparanu (HS, ang. *heparine sulfate*) [Cariboni i wsp., 2004].

Mutacje typu utraty funkcji w genie *KALI*, w tym delecje oraz mutacje punktowe, odpowiadają za formę zespołu Kallmanna sprzężoną z chromosomem X i stanowiącą przyczynę 10-12% wszystkich przypadków tej anomalii. Zespół Kallmanna (KS, ang. *Kallmann Syndrome*) jest heterogennym zaburzeniem, w którym występuje hipogonadyzm hipogonadotropowy wynikający z niedoboru gonadoliberyny w skojarzeniu z hiposmią lub anosmią, spowodowaną dysgenezą opuszki węchowej. Głównym cechem fenotypowym KS często towarzyszą wady dodatkowe, w tym: niedosłuch typu odbiorczego, aplazja nerek, rozszczep wargi/podniebienia oraz wady kostne [Dodé i wsp., 2003]. U probanda VII stwierdzono wadę kończyn dolnych ze spektrum rozszczepu, atypową wadę lewej ręki, wadę kręgosłupa, cechy dysmorfii, niedosłuch, wnetrostwo, małe prącie oraz opóźniony rozwój mowy. Wykluczono natomiast hipogonadyzm hipogonadotropowy. Pacjent nie wykazywał również anosmii, co zostanie zweryfikowane w planowanych badaniach węchu. Ponadto duplikacje genu *KALI* nie były do tej pory opisywane u pacjentów z KS, tak więc zarówno fenotyp, jak i genotyp probanda nie odpowiadały klinicznemu rozpoznaniu zespołu Kallmanna.

Intrygujący jest mechanizm ekspresji zespołu wad u pacjenta VII na skutek duplikacji genu *KALI*. Badania prowadzone nad molekularnymi przyczynami KS wykazały interakcję pomiędzy anosminą-1, a białkiem FGFR1 [González-Martínez i wsp., 2004]. Mutacje typu utraty funkcji w genie *FGFR1* są drugą opisaną przyczyną zespołu Kallmanna dziedziczonego autosomalnie dominująco o niepełnej penetracji i odpowiadają za ok. 10% przypadków [Dodé i wsp., 2003]. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż mutacje w *FGFR1*

warunkują wady kończyn występujące u części pacjentów z zespołem Kallmanna, m.in. zrost IV i V kości śródreżca, klinodaktylię oraz oligodaktylię [Dodé i wsp., 2003, Jarzabek i wsp., 2012]. Co ciekawe, większość cech stwierdzonych u probanda VII identyfikuje się również u pacjentów z zespołem Hartsfielda, uwarunkowanym mutacjami w *FGFR1* i charakteryzującym się współwystępowaniem holoprosencefalii i ektrodaktylii [Simonis i wsp., 2013]. Do wspólnych objawów należą: ektrodaktylia, opóźnienie rozwoju w stopniu lekkim, małe prącie, wnetrostwo oraz cechy dysmorficzne twarzy. Holoprosencefalia została wykluczona w obrazowaniu głowy metodą rezonansu magnetycznego, dlatego diagnoza w kierunku zespołu Hartsfielda nie została potwierdzona. Fenotyp pacjentów z tą anomalią jest rezultatem utraty aktywności sygnalizacyjnej białka FGFR1. Proteina ta jest receptorem typu 1 czynnika wzrostu fibroblastów, którego domena cytoplazmatyczna wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej.

Gen *FGFR1* ulega ekspresji w wielu tkankach embrionalnych i bierze udział w różnorodnych procesach rozwojowych. Wykazano, iż swoista tkankowo inaktywacja *Fgfr1* powoduje u myszy wady mózgowia wynikające z zaburzeń w formowaniu się dróg spoidłowych oraz wady kończyn polegające na syndaktylii III i IV palca, a także na agenezji palców i kości śródreżca/śródstopia w centralnej oraz przedosiowej części kończyny [Tole i wsp., 2006, Li i wsp., 2005, Verheyden i wsp., 2005, Yu i wsp., 2008]. Niewątpliwie, receptor FGFR1 pełni niezwykle istotną funkcję w morfogenezie układu kostnego oraz mózgu u kręgowców. W odniesieniu do powyżej przytoczonych danych, większość cech fenotypowych stwierdzonych u pacjenta VII (wady kostne, opóźnienie rozwoju, wnetrostwo, małe prącie, cechy dysmorfii) można przypisać zaburzeniom w sygnalizacji indukowanej przez FGFR1.

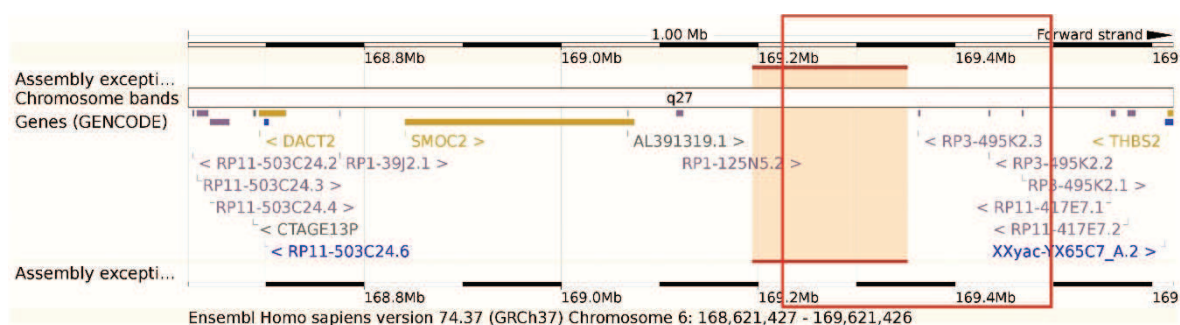
Anosmina-1 stymuluje aktywność sygnalizacyjną białka FGFR1 poprzez interakcję zależną od HS. Receptor wiąże się z ligandem FGF2 w obecności siarczanu heparanu, co skutkuje dimeryzacją receptora i aktywacją kinazy tyrozynowej. Anosmina-1 działa jako donator HS do kompleksu FGFR1-FGF2. Hu i wsp. [2009] badając migrację neuroblastów GnRH przy obniżonym poziomie ekspresji genu *Kall* u myszy wysunęli hipotezę, iż stymulacja FGFR1 jest zależna od dawki anosminy-1. W warunkach fizjologicznych aktywacja receptora zachodzi przy niskim stężeniu anosminy-1, podczas gdy wysoki poziom białka hamuje aktywność FGFR1. Zdaniem autorów zjawisko to wynika ze zdolności niezwiązanej z HS anosminy-1 do łączenia się z receptorem FGFR1, co uniemożliwia utworzenie aktywnego kompleksu FGFR1-FGF2-HS [Hu i wsp., 2009]. Dzieje się tak przy podwyższonym stężeniu anosminy-1, której nadmiar niezwiązany z siarczanem heparanu,

blokuje receptor FGFR1. Opozycyjne efekty biologiczne wynikające ze zdolności anosminy-1 do przyłączania HS bądź wiązania się z receptorem FGFR1, są odzwierciedleniem zaburzenia równowagi w ekspresji genu *KAL-1*, co może stanowić przyczynę anomalii opisanych powyżej.

W odniesieniu do przytoczonych danych, można hipotetycznie założyć, że cechy kliniczne stwierdzone u pacjenta VII wynikają z obniżenia aktywności sygnalizacyjnej FGFR1 na skutek nadekspresji genu *KALI*, będącej następstwem hemizygotycznej duplikacji w *locus* Xp22.31. Nosicielstwo mutacji u bezobjawowych matki oraz ciotki pacjenta, wskazuje na recesywny rodzaj dziedziczenia. Niemniej jednak, jednoznaczne powiązanie niniejszej aberracji z określonym zespołem wad wymaga badań przeprowadzonych na większej grupie pacjentów o zbliżonych cechach klinicznych.

Probandka VIII

U probandki VIII zidentyfikowano delecję w *locus* o wielkości 270 kb, która usytuowana jest w odległości 158 kb w kierunku 3' od genu *SMOC2* oraz w odległości 500 kb od genu *DACT2* (ryc. 52). Mutacja została odziedziczona od zdrowego ojca pacjentki.

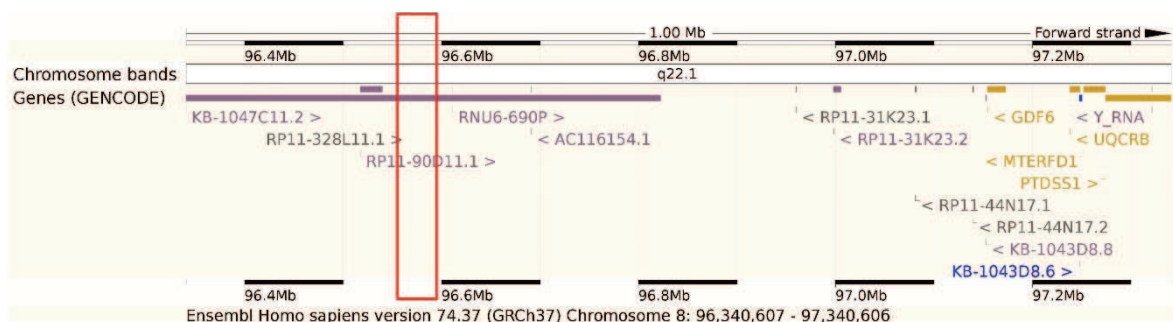


Rycina 52. Genomowa lokalizacja duplikacji w *locus* 6q27 zidentyfikowanej u probandki VIII. Ramką zaznaczono zakres zmiany. Duplikacja zlokalizowana jest w odległości ok. 158 kb od genu *SMOC2* oraz ok. 500 kb od genu *DACT2*.

Obydwa geny zaangażowane są w rozwój uzębienia. U pacjentów z oligodontcją identyfikuje się homozygotyczne mutacje w genie *SMOC2*, natomiast rola genu *DACT2* w odontogenezie polega na inhibicji szlaku Wnt/ β -katenina, kluczowego w procesie rozwoju zawiązków zębów [Bloch-Zupan i wsp., 2011; Li i wsp., 2013]. U pacjentki nie stwierdzono wad uzębienia. Wadom kończyn towarzyszyły natomiast barwnikowe zmiany skórne w postaci plamek w kolorze kawy z mlekiem. W odniesieniu do powyższych danych, rola genu *SMOC2* w patogenezie fenotypu u probandki jest mało prawdopodobna. Gen *DACT2* zdaje się być lepszym kandydatem. W ostatnich doniesieniach udowodniono bowiem, że ortolog genu u kury ulega silnej ekspresji w rozwijających się kończynach na różnych etapach

embriogenezy oraz we wczesnych etapach kostnienia. Wysoki poziom ekspresji identyfikowany był m. in. w prechondrogennych komórkach mezenchymy oraz w blastemie palców. Mechanizm, który może prowadzić do nieprawidłowości w morfogenezie kończyn w związku z nieprawidłową ekspresją genu *DACT2*, może wynikać z roli białka w kontroli sygnalizacji szlaków Wnt i TGF- β [Sensiate i wsp., 2013]. Białko *DACT2* jest inhibitorem szlaku TGF- β , a jego nadekspresja częściowo hamuje zależne od TGF- β formowanie się mezodermy, co udowodniono w badaniach modelu *Danio rerio* [Zhang i wsp., 2004]. Zidentyfikowana u pacjentki zmiana nie obejmuje omawianego genu, ale nie można wykluczyć, że w obrębie zduplikowanej sekwencji znajdują się elementy regulatorowe dla genu *DACT2*. Do chwili obecnej nie ma na ten temat żadnych doniesień w piśmiennictwie. Potencjalnie patogenny charakter stwierdzonej zmiany osłabia dodatkowo fakt identyfikacji jej nosicielstwa u zdrowego ojca pacjentki, jednakże w takim przypadku należy wziąć pod uwagę możliwość niepełnej penetracji zmiany lub obecność innego czynnika uszkodzającego drugą kopię genu.

U pozostałych pacjentów z nieprawidłowym wynikiem badań aCGH (pacjenci IX-XII) nie udało się zidentyfikować jednoznacznej przyczyny wady, przede wszystkim ze względu na brak jakichkolwiek doniesień świadczących o patogenności wykrywanych zmian oraz ze względu na brak w ich obrębie lub otoczeniu genów o ustalonej funkcji w formowaniu się układu kostnego. Wyjątek stanowi pacjent XII, u którego zidentyfikowano niewielką delecję (33,4 kb) w *locus* 8q22.1, zlokalizowaną w odległości 560 kb w kierunku 5' od genu *GDF6* (ryc. 53).



Rycina 53. Genomowa lokalizacja delecji w *locus* 8q22.1 zidentyfikowanej u probanda XII. Ramką zaznaczono zakres zmiany. Delecja zlokalizowana jest w odległości ok. 560 kb od genu *GDF6*.

Białko *GDF6* należy do rodziny białek morfogenetycznych kości oraz białek szlaku TGF- β i jest wymagane do prawidłowego formowania się kości i stawów w kończynach, czaszce i kręgosłupie. Mutacje w genie *Gdf6* powodują u myszy brachypodyzm, cechujący się skróceniem oraz zmniejszeniem liczby kości w obrębie szkieletu obwodowego [Storm i

wsp., 1994]. Stwierdzona delecja nie obejmuje jednak genu, lecz znajduje się w pewnej odległości od niego, przy czym do chwili obecnej nie ma żadnych doniesień na temat istnienia w tym regionie sekwencji regulatorowych, kontrolujących ekspresję genu *GDF6*. Ponadto biorąc pod uwagę fakt identyfikacji powyższej zmiany u zdrowego ojca probanda, jej związek z fenotypem jest niejasny. Bezobjawowe nosicielstwo stwierdzonych zmian genomowych u jednego z rodziców zostało określone również dla probandów IX i X i jest powodem podobnych trudności interpretacyjnych. Ponadto niewielki rozmiar zmian (33-92 kb) dodatkowo zmniejsza prawdopodobieństwo patogenności. Niemniej jednak należy dopuścić możliwość udziału powyższych aberracji w procesie powstawania malformacji kończyn, gdyż zidentyfikowane CNV nie były dotychczas opisywane w bazach danych jako łagodne polimorfizmy, a funkcje leżących w ich obrębie genów, jeśli nie zostały do tej pory poznane, mogą zostać określone w przyszłych badaniach. Powiązanie wykrytych zmian genomowych z malformacjami kończyn wymaga identyfikacji podobnych CNV u kolejnych pacjentów ze zbliżonym fenotypem.

5.4. Sekwencjonowanie genów kandydujących

W niniejszej pracy wykonano sekwencjonowanie dwóch genów kandydujących: *BHLHA9* oraz *BHLHB5* u wszystkich 27 probandów, u których wykluczono patogenne zmiany. Analizie sekwencyjnej poddano również eksony 15 i 17 genu *DYNClII* u 9 pacjentów manifestujących klasyczny izolowany rozszczep rąk i/lub stóp. Badanie to miało na celu:

- w przypadku genu *BHLHA9*, potwierdzenie jego bezpośredniej roli w patogenezie wad kończyn o typie rozszczepu,
- w przypadku genu *DYNClII*, identyfikację mutacji w *enhancerach*, zlokalizowanych w eksonach 15 i 17 u pacjentów z typowym rozszczepem, u których na podstawie fenotypu można było przypuszczać, iż wada związana jest z *locus SHFM1*,
- w przypadku genu *BHLHB5*, określenie jego potencjalnego znaczenia w patogenezie wad ze spektrum SHFM

Gen *BHLHB5* zmapowany został w delecji w *locus* 8q22.3 zidentyfikowanej u pacjentki z zespołą formą obustronnego rozszczepu stóp, któremu towarzyszyła

niepełnosprawność intelektualna, niedosłuch lewostronny, hipotonia mięśniowa, odstające łopatki, szeroka klatka piersiowa [Mayer, 2007]. Zasugerowano udział genu w manifestacji fenotypu u pacjentki, ze względu na to, że ulega on ekspresji w większości tkanek mózgu [Xu i wsp., 2002], co można było powiązać z niepełnosprawnością intelektualną stwierdzoną u probanda. Nieznana jest rola genu w rozwoju kończyn, jednakże zdiagnozowany u pacjenta rozszczep stóp nie pozwala wykluczyć jego potencjalnego udziału w patogenezie wad kończyn. U żadnego z badanych probandów nie stwierdzono mutacji w genie *BHLHB5*.

Sekwencjonowanie eksonów 15 i 17 w genie *DYNClII* zostało wykonane ze względu na potwierdzony w piśmiennictwie oraz badaniach własnych, patogenny charakter aberracji chromosomowych w tym regionie. Zlokalizowane są tam bowiem sekwencje regulatorowe kontrolujące ekspresję genów *DLX5* i *DLX6* i w związku z tym można było przypuszczać, iż ewentualne mutacje punktowe będą miały podobny efekt. U żadnego z poddanych analizie pacjentów nie stwierdzono zmian w analizowanym zakresie.

Region krytyczny dla duplikacji w *locus* 17p13.3 u pacjentów z SHFM/SHFLD ograniczony jest jedynie do genu *BHLHA9*. Wykazano, że ekspresja ortologu ludzkiego genu *BHLHA9* u myszy i *Danio rerio* identyfikowana jest w strefie AER mezenchymy zawiązków kończyn, a wyciszenie genu skutkuje skróceniem płetwy brzusznej u *Danio rerio* [Klopotcki i wsp., 2012]. Badania te jednoznacznie potwierdziły udział genu w procesie morfogenezy kończyn u kręgowców oraz związek przyczynowo-skutkowy duplikacji genu *BHLHA9* z SHFLD/SHFM. Do tej pory nie opisano patogennych mutacji punktowych w genie *BHLHA9*. W badaniach własnych u pacjentki VIII wykryto heterozygotyczną mutację p.R187G w eksonie 1 genu, której nosicielstwo potwierdzono u zdrowej matki probandki i wykluczono u zdrowego ojca. Analiza bioinformatyczna przeprowadzona przy pomocy programu *PolyPhen* wykazała potencjalnie patogenny charakter zmiany. Program SIFT sklasyfikował wariant jako tolerowany, program *Mutation Taster* jako polimorfizm. Wynik tej analizy nie powinien być traktowany jako bezwzględny, jednakże można stwierdzić z dużym prawdopodobieństwem, że wariant nie jest patogenny.

Mutacja w genie *BHLHA9* jest drugą, obok duplikacji w *locus* 6q27, zmianą zidentyfikowaną u probandki. Omówienie pierwszej aberracji zostało przedstawione w rozdziale 5.3. W przypadku obydwu zmian ich związek z fenotypem pacjentki jest dyskusyjny, przede wszystkim ze względu na nosicielstwo zmian u zdrowych rodziców. Mutacja w genie *BHLHA9* została odziedziczona od matki, duplikacja w *locus* 6q27 od ojca. W tym przypadku można ewentualnie rozważyć model dziedziczenia dwuczynnikowego, w którym manifestacja fenotypu uzależniona byłaby wyłącznie od jednoczesnego

wystąpienia dwóch zmian, w tym przypadku duplikacji w *locus* 6q27 oraz mutacji w genie *BHLHA9*. Teoria ta nie wyjaśnia jednak wątpliwości interpretacyjnych w powyższym przypadku, ze względu na to, że obie mutacje zlokalizowane są w odrębnych *loci* genomowych.

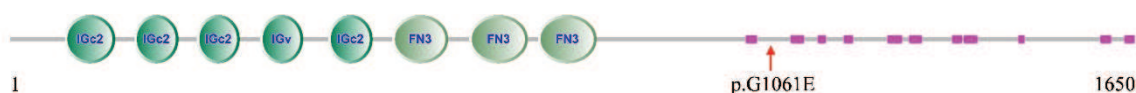
5.5. Sekwencjonowanie eksomu

W ostatnich latach nastąpił znaczny postęp techniki sekwencjonowania. Dzięki rozwijającym się technikom wysokowydajnego sekwencjonowania następnej generacji (ang. *next generation sequencing*) możliwe jest jednoczesowe określenie u probanda sekwencji wszystkich kodujących odcinków w genomie, które stanowią ok 1,5-2% całej sekwencji genomu człowieka. Sekwencjonowanie eksomu generuje ogromną ilość danych, których analiza nie byłaby możliwa gdyby nie programy bioinformatyczne, służące do filtrowania danych, a więc wyodrębniania artefaktów oraz zmian potencjalnie patogennych i polimorficznych. Metoda ta umożliwia identyfikację nowych wariantów, które mogą być zaangażowane w manifestację danego fenotypu.

Sekwencjonowanie eksomu przeprowadzono u 10 probandów, z czego u dwóch udało się zidentyfikować mutacje, które mogą potencjalnie odpowiadać za występowanie wady.

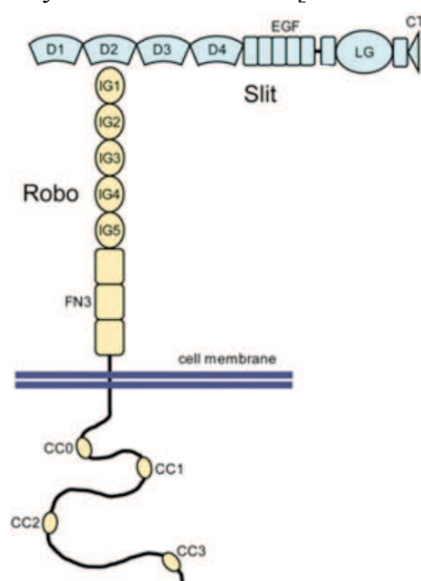
Proband XIII

U probanda XIII stwierdzono homozygotyczną mutację p.G1061E w eksonie 23 genu *ROBO1*. Nosicielstwo mutacji w układzie heterozygotycznym wykryto u zdrowych rodziców probanda oraz wykluczono u zdrowego brata probanda. W celu wykluczenia polimorficznego charakteru zmiany, zsekwencjonowano badany region u 192 osób z polskiej grupy kontrolnej, nie znajdując heterozygotycznej mutacji w żadnej z prób. Zmiany nie stwierdzono również wśród polimorficznych wariantów zgromadzonych w bazie danych EVS.



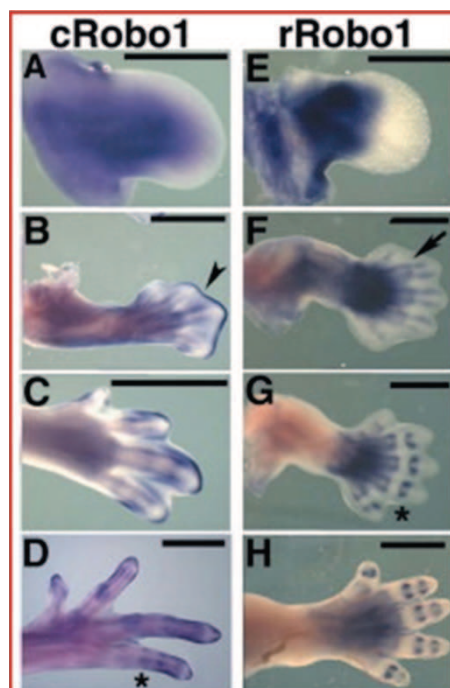
Rycina 54. Lokalizacja mutacji p.G1061E w białku ROBO1. IG – domeny immunoglobulinopodobne, FN3 – moduły fibronektyny, różowe figury – regiony o niskiej złożoności.

Białka ROBO (ang. *Roundabout*) należą do nadrodziny immunoglobulin i są transbłonowymi receptorami dla białek SLIT. Kompleks ligand-receptor kontroluje proces migracji komórek - w tym mioblastów, reguluje przewodnictwo aksonalne oraz uczestniczy w projekcji aksonów do różnych regionów ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Główną funkcją białek ROBO jest kierowanie stożków wzrostu aksonów i dendrytów na zewnątrz od linii pośrodkowej w trakcie rozwoju OUN [Seeger i wsp., 1993; Kidd i wsp., 1998]. Białko ROBO1 wykazuje wysoki stopień zakonserwowania ewolucyjnego i jest jednym z czterech białek z rodziny Robo, identyfikowanych u kręgowców (Robo1-4). Ektodomena wszystkich receptorów Robo, z wyjątkiem Robo4, jest zbudowana z pięciu domen immunoglobulinopodobnych (IG) oraz trzech powtarzających się modułów fibronektyny typu 3 (FN3) (ryc. 54). Domeny cytoplazmatyczne wykazują niski stopień zakonserwowania ewolucyjnego, wyjątek stanowią cztery motywy CC (ang. *conserved cytoplasmic*) (CC0-CC3), które występują w różnych kombinacjach w białkach Robo [Dickson i wsp., 2006]. U bezkręgowców i kręgowców mechanizm interakcji ligandu SLIT z receptorem ROBO jest wspólny i polega na połączeniu się domeny D2 białka SLIT z domeną IG1 receptora ROBO (ryc. 55), w obecności siarczanu heparanu [Morlot i wsp., 2007; Lee i wsp., 2004]. Utworzenie się kompleksu SLIT-ROBO powoduje zmianę konformacji receptora ROBO, na drodze mechanizmu, który nie jest do końca poznany, lecz prawdopodobnie polega na przemianie białka ze stanu dimerycznego do monomerycznego lub odwrotnie. Powoduje to zwiększenie dostępności cytozolowych, bogatych w prolinę domen C3 i C2 dla białek adaptorowych, które następnie inaktywują GTPazy z grupy Rho, co prowadzi do zmiany dynamiki cytoszkieletu komórki [Hussain i wsp., 2006; Wong i wsp., 2001].



Rycina 55. Schemat przedstawiający interakcję domeny D2 ligandu Slit z domeną IG1 receptora Robo [na podstawie: Hohenester, 2008; zmodyfikowano].

Aktywność kompleksu SLIT-ROBO nie jest ograniczona do układu nerwowego. U kręgowców białka te pełnią inne ważne funkcje, m. in. w rozwoju embrionalnym płuc, nerek, gruczołów sutkowych oraz kończyn [Hinck, 2004; Holmes i wsp., 1998]. Ekspresję genów z rodziny *Slit* oraz genów *Robo1* i *Robo2* opisano w kończynach u myszy i kury [Vargesson i wsp., 2001; Holmes i wsp., 1998]. Profil ekspresji badanych genów oznaczono w poszczególnych częściach mezenchymy rozwijających się zawiązków kończyn, na różnych etapach rozwoju embrionalnego. Na najwcześniejszych etapach ekspresję *Robo1* identyfikowano w strefie AER oraz w środkowej, proksymalnej części mezenchymy. Na późniejszych etapach ekspresję oznaczano dodatkowo w bocznych częściach mezenchymy oraz w komórkach chondrogenicznych. W kolejnych stadiach rozwoju zawiązków kończyn poziom ekspresji genu *Robo1* zwiększał się w dystalnej i obwodowej części. Na etapie formowania się palców, gen *Robo1* ulegał ekspresji w każdym z rozwijających się palców wzdłuż przestrzeni międzypalcowych i wzdłuż obszarów granicznych palców (ryc. 56) [Vargesson i wsp., 2001].



Rycina 56. Profil ekspresji genu *Robo1* oznaczony na różnych etapach embriogenezy na modelu kury (cRobo1) oraz myszy (rRobo1). Grot strzałki - ekspresja w dystalnej części mezenchymy, gwiazdka – ekspresja wzdłuż palców [na podstawie: Vargesson i wsp., 2001; zmodyfikowano].

Na podstawie powyższych danych można stwierdzić, że białko ROBO1 odgrywa bardzo ważną rolę w procesie morfogenezy kończyn u kręgowców, ze szczególnym uwzględnieniem formowania się dystalnych części kończyn - w tym palców.

Wykryta u probanda XIII homozygotyczna mutacja w genie *ROBO1* zlokalizowana jest w domenie cytoplazmatycznej białka. Analiza patogenności stwierdzonego wariantu przeprowadzona przy pomocy programów internetowych wykazała prawdopodobnie patogeniczny charakter zmiany (*PolyPhen*: „prawdopodobnie patogeniczny”, wartość *score* – 0,85; *Mutation Taster*: „patogeniczny”). Program SIFT określił zmianę jako „tolerowaną” co, w odniesieniu do wyników pozostałych dwóch programów podobnego typu, nie wyklucza jej patogenicznego charakteru.

Na podstawie wyników badań własnych oraz danych z piśmiennictwa na temat profilu ekspresji genu *Robo1* u kręgowców można wysunąć następujące wnioski:

- inaktywacja genu *ROBO1* może powodować wady kończyn ze spektrum SHFM lub oligodaktylii łokciowej,
- do ekspresji cechy wymagana jest zmiana patogeniczna na obydwu allelach genu,
- stwierdzona u probanda mutacja homozygotyczna w genie *ROBO1* jest najprawdopodobniej patogeniczna i przyczynia się do manifestacji wady dziedzicznej autosomalnie recesywnie.

Potwierdzenie powyższych hipotez wymaga identyfikacji podobnych zmian u innych pacjentów ze zbliżonymi fenotypami.

Proband XIV

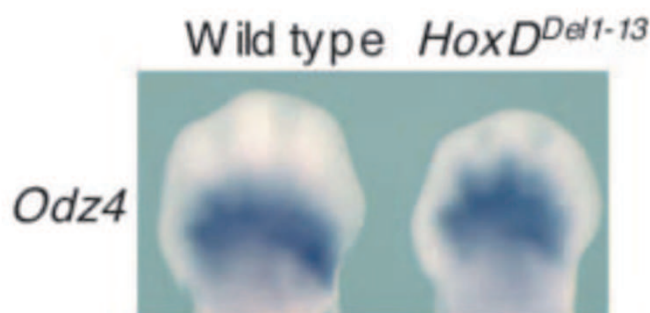
Ciekawie przedstawia się wynik sekwencjonowania eksomu u probanda XIV, u którego wykryto heterozygotyczną mutację p.V354F w eksonie 9 genu *ODZ4 (TENM4)*. Mutacja ta została wykluczona u zdrowych rodziców pacjenta, powstała więc *de novo*.

Zmiany nie stwierdzono wśród polimorficznych wariantów zgromadzonych w bazie danych EVS, co jest silnym argumentem przeciwko jej polimorficznemu charakterowi. Analiza patogenności mutacji przeprowadzona w internetowych programach wykazała jej potencjalnie patogeniczny charakter (*PolyPhen*: „prawdopodobnie patogeniczny”, wartość *score* – 0.779; SIFT: „patogeniczny” wartość *score* – 0; *Mutation Taster*: „patogeniczny”). Mutacja zlokalizowana jest w domenie transbłonowej białka.



Rycina 57. Lokalizacja mutacji p.V354F w białku ODZ4. Niebieski prostokąt – domena transbłonowa, zielone figury – domeny EGF, różowe figury – regiony o niskiej złożoności [na podstawie: <http://smart.embl-heidelberg.de/>; zmodyfikowano].

Białko ODZ4 (TENM4) należy do rodziny transbłonowych białek z grupy teneuryn o wysokim stopniu zakonserwowania ewolucyjnego. Białka te uczestniczą w sygnalizacji międzykomórkowej i pełnią funkcję transbłonowych receptorów typu II oraz, po oddzieleniu się od błony komórkowej, czynników transkrypcyjnych. Geny kodujące białka z rodziny teneuryn wykazują najsilniejszą ekspresję w rozwijającym się układzie nerwowym, ale również, choć w mniejszym stopniu, w komórkach pozanerwowych. Teneuryny pełnią istotne funkcje w podstawowych mechanizmach sygnalizacyjnych, uwarunkowanych adhezją międzykomórkową. Są to białka o dużej masie cząsteczkowej (ok. 300 kDa). W strukturze części zewnątrzkomórkowej białek wyróżnia się osiem domen EGF-podobnych o wysokim stopniu zakonserwowania ewolucyjnego oraz 26 powtórzonych motywów YD (ryc. 57). Domena cytozolowa również wykazuje wysoki stopień homologii pomiędzy poszczególnymi ortologami oraz paralogami. U myszy gen *Odz4* ulega ekspresji w najwcześniejszych etapach embriogenezy, a następnie w neuroektodermie oraz związkach ogona i kończyn. Wykazano, że ekspresja mysiego genu *Odz4* zachodzi jeszcze przed etapem gastrulacji, a podwójny *knock-out* genowy *Odz4* uniemożliwia inicjację gastrulacji i powstawanie mezodermy. Ponadto zahamowana zostaje ekspresja genów, które w normalnych warunkach są aktywne w mezodermie, w tym genów determinujących rozwój w osi przednio-tylnej (np. *Wnt*). W konsekwencji tych zdarzeń w transgenicznym zarodkach myszy nie wykształcały się żadne zróżnicowane tkanki [Nakamura i wsp., 2013]. Ponadto w eksperymentach przeprowadzonych na transgenicznym myszach, u których wyciszono cały klaster genów *Hoxd*, wykazano podwyższoną ekspresję *Odz4* w dystalnej części kończyn przednich (ryc. 58). Wynik sugeruje udział kluczowych w rozwoju kończyn genów *Hoxd* w kontroli ekspresji *Odz4* [Cobb i wsp., 2005].



Rycina 58. Profil ekspresji genu *Odz4* oznaczony w kończynach myszy typu dzikiego (Wild type) oraz myszy transgenicznej (*HoxD^{Del1-13}*) [na podstawie: Cobb i wsp., 2005; zmodyfikowano].

Przytoczone powyżej doniesienia literaturowe wskazują na istotną rolę genu *ODZ4* w procesie embriogenezy, a patogenne mutacje w jego sekwencji mogą w istotny sposób zaburzać prawidłowy rozwój.

Mutacja stwierdzona u probanda XIV najprawdopodobniej potwierdza tę hipotezę i jest przyczyną obserwowanego fenotypu, dziedziczonego autosomalnie dominująco. Podobnie jak w przypadku wykrycia mutacji w genie *ROBO1*, aby jednoznacznie powiązać obecność wady kończyn z mutacją w genie *ODZ4*, konieczne jest stwierdzenie podobnej zmiany u kolejnych pacjentów ze zbliżonym fenotypem.

5.6. Podsumowanie

W toku wszystkich wykonanych analiz w grupie 35 probandów udało się ustalić przyczynę molekularną wady u czterech pacjentów. U pięciu probandów stwierdzono prawdopodobną przyczynę malformacji kończyn oraz wskazano nowe, nieopisywane do tej pory *loci* genetyczne dla wad ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp. U pięciu probandów stwierdzono zmiany o potencjalnym udziale w patogenezie wad kończyn oraz zasugerowano geny kandydujące.

W pozostałej grupie wykluczono znane mutacje i nie wykazano obecności zmian mogących stanowić przyczynę obserwowanego u pacjentów fenotypu. U ośmiu probandów z tej grupy, w wyniku sekwencjonowania eksomu, wykluczono patogenne mutacje w całej sekwencji kodującej w genomie, co sugeruje, że przyczyną wady może być mutacja punktowa w sekwencji niekodującej lub bardziej złożony mechanizm, np. dziedziczenie dwuczynnikowe. U pozostałych pacjentów planowane jest przeprowadzenie sekwencjonowania eksomu.

Uzyskane wyniki stały się podstawą do opracowania nowych testów genetycznych opartych na:

- 1) sekwencjonowaniu genów *DLX5*, *ROBO1*, *ODZ4*, *DYNC111* (ekson 15 i 17),
- 2) analizie liczby kopii regionu Xp22.31 oraz genu *DYNC111* (ekson 15 i 17).

Testy te mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w diagnostyce wad ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp.

6. WNIOSKI

1. Rutynowe badania genetyczne w kierunku znanych przyczyn molekularnych rozszczepu rąk i/lub stóp są niezbędnym lecz niewystarczającym etapem diagnostyki tej grupy wad.
2. W przypadkach sporadycznych, identyfikacja nowej przyczyny molekularnej wady wrodzonej jest trudna. Wiele spośród zidentyfikowanych zmian genomowych było odziedziczonych od jednego ze zdrowych rodziców pacjenta, co może mieć związek z niepełną penetracją czynnika patogennego lub świadczyć o polimorficznym charakterze zamiany. Aby potwierdzić zaangażowanie genu/regionu w chorobę potrzebne są badania wielośrodkowe, zwiększające szansę na identyfikację danej zmiany w liczniejszej grupie niespokrewnionych pacjentów manifestujących podobny fenotyp. Pojedyncze zmiany wykryte u probandów w niniejszych badaniach pozwoliły sformułować następujące wnioski szczegółowe:
 - a) Patogenna delecja w regionie 7q21.3 może mieć rozmiar znacznie mniejszy od typowo identyfikowanych zmian w *locus* SHFM1, a manifestacja fenotypu może wynikać z inaktywacji elementów regulatorowych dla genu *DLX5*.
 - b) Rozszczep rąk i/lub stóp uwarunkowany mutacjami typu *nonsense* w genie *DLX5* może być dziedziczony dominująco z niepełną penetracją.
 - c) Duplikacja genu *KALI* może być przyczyną zespołu wad wrodzonych, któremu towarzyszą wady kończyn o typie rozszczepu rąk i/lub stóp.
 - d) Wady kończyn ze spektrum ektrodaktylii lub oligodaktylii łokciowej mogą być, z dużym prawdopodobieństwem, spowodowane inaktywacją obydwu alleli genu *ROBO1*.
 - e) Prawdopodobną przyczyną agenezji kości długich z oligodaktylią jest heterozygotyczna mutacja w genie *ODZ4*.
3. Sekwencjonowanie eksomu i technika porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej są skutecznymi i wiarygodnymi narzędziami diagnostycznymi umożliwiającymi identyfikację przyczyn genetycznych wad ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp. 67% wykrytych zmian miało charakter genomowy, w związku z tym metoda porównawczej hybrydyzacji genomowej do

mikromacierzy oligonukleotydowej powinna być techniką z wyboru w diagnostyce wad ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp.

4. Identyfikacja nowych zmian o potwierdzonej lub wysoce prawdopodobnej patogenności ma dużą wartość poznawczą i przyczyniła się do poprawy stanu wiedzy z zakresu genetycznego podłoża ektrodaktylii oraz opracowania nowych testów genetycznych, które mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w diagnostyce molekularnej wad ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp. Pomimo kompleksowej diagnostyki molekularnej, w 74% przypadków nie udało się ustalić znanego lub nowego podłoża molekularnego wady, co oznacza, że patogenne zmiany nie mogą być zidentyfikowane z zastosowaniem obecnie dostępnych technik.

7. STRESZCZENIE

Rozszczep rąk i/lub stóp (SHFM – ang. *Split Hand/Foot Malformation*) jest poważną wadą rozwojową prowadzącą do niepełnosprawności fizycznej i stanowiącą dyskomfort psychiczny dla chorego. Wada ta polega na całkowitym lub częściowym braku lub niedorozwoju palców rąk i/lub stóp oraz nierzadko odpowiednich kości śródreżca/śródstopia i jest bardzo zróżnicowana pod względem genetycznym i etiologicznym, a najczęściej jej przyczyną są czynniki genetyczne.

Podłoże molekularne zmian ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp jest w ok. 50% przypadków niepoznane. Znaczny postęp technologiczny, który dokonał się w rozwoju nowoczesnych metod diagnostycznych, daje możliwość identyfikacji zarówno znanych jak i nowych, nieopisanych przyczyn genetycznych w tej grupie wad.

Głównym założeniem rozprawy doktorskiej była identyfikacja przyczyn genetycznych odpowiedzialnych za powstawanie wrodzonych wad kończyn ze spektrum rozszczepu rąk i/lub stóp, w tym nowych zmian o potwierdzonym lub potencjalnym znaczeniu w patologii wady. W tym celu autorka opracowała algorytm diagnostyki genetycznej. Identyfikację przyczyny molekularnej wady u pacjentów ze spektrum ektrodaktylii prowadzono począwszy od najczęstszych zmian typowych dla danego typu ektrodaktylii, przez zmiany rzadziej stwierdzane (np. w recesywnym uwarunkowaniu wady), zmiany genomowe, mutacje w genach kandydujących, aż po sekwencjonowanie eksomu.

Do badań zakwalifikowano 35 pacjentów z izolowaną oraz zespołową formą wady, występującą zarówno rodzinnie jak i sporadycznie. Na etapie rutynowej diagnostyki genetycznej w 15% przypadków stwierdzono przyczynę molekularną malformacji, którą stanowiła duplikacja w *locus* 10q24.31-32. Była to jednocześnie najczęstsza zmiana patogeniczna spośród wszystkich wykazanych w niniejszej pracy. Sekwencjonowanie genów, w których mutacje są rzadko identyfikowane w rozszczepach rąk i/lub stóp pozwoliło wykryć nową mutację typu *nonsense* w genie *DLX5* u dwóch niespokrewnionych ze sobą probandów o prawdopodobnie patogennym charakterze. W wyniku badania aCGH u jednego probanda wykryto patogenną delecję w *locus* 7q21.3 o zakresie znacznie mniejszym od typowo identyfikowanych zmian w tym regionie. U probanda z zespołową formą ektrodaktylii stwierdzono nieopisywaną do tej pory duplikację genu *KALI* o prawdopodobnym udziale w manifestacji wady. U 10 probandów przeprowadzono

sekwencjonowanie eksomu, które u dwóch probandów pozwoliło na identyfikację mutacji punktowych w dwóch genach (*ROBO1* i *ODZ4*) o nieznanym dotychczas zaangażowaniu w patogenezę wad kończyn u człowieka. Stwierdzone warianty mają z dużym prawdopodobieństwem związek przyczynowo-skutkowy z fenotypem obydwu pacjentów.

8. SUMMARY

Split-hand/foot malformation (SHFM) is a severe congenital limb malformation that leads to physical disability and in some cases results in mental discomfort of a patient. The condition is characterized by a median cleft caused by the absence or hypoplasia of the central digits often including metacarpal and/or metatarsal bones. The malformation is clinically and etiologically heterogeneous and is caused predominantly by genetic factors.

The genetic background of approximately 50% cases is unknown. Development and dissemination of the molecular diagnostic testing allowed for the identification of both known and novel causative mutations in various groups of patients with split hand/foot malformation.

The main objective of this thesis was to identify the molecular background of split hand/foot malformations including novel genes and/or genomic regions involved in the pathogenesis of this condition. Therefore, the author has proposed a diagnostic flow-chart aimed at identifying disease causing mutation, starting from the most frequently annotated genetic lesions, through rarer changes (f. e. in recessive etiology), as well as genomic rearrangements, mutations in candidate genes, and exome sequencing.

A group of 35 familial and sporadic cases with non-syndromic and syndromic split hand/foot malformation was recruited for this study. Molecular screening of known genes and loci involved in the pathogenesis of split hand/foot malformation has revealed the genetic cause of the condition in 15% cases. All these patients harbored the same duplication in locus 10q24.31-23, which was also the most frequent mutation of all described herein. Sequencing of *DLX5* gene revealed a novel possibly pathogenic mutation in two unrelated patients. Results of array based comparative genomic hybridization (aCGH) in a proband with isolated ectrodactyly showed a pathogenic deletion in locus 7q21.3, much smaller than typically identified changes in this region. In a patient with syndromic ectrodactyly a duplication of *KALI* gene was identified with use of aCGH, which strongly suggests its involvement in the pathogenesis of split hand/foot malformation. In 10 patients whole exome sequencing was performed. In 2 sporadic cases from this group, mutations in novel genes (*ROBO1* and *ODZ4*) of unknown function in humans have been identified. The detected variants are most probably involved in the pathogenesis of limb malformation diagnosed in both patients.

9. SPIS TABEL

Tabela 1. Kliniczna i molekularna charakterystyka znanych <i>loci</i> w wadach ze spektrum rozszczepek rąk i/lub stóp.....	26
Tabela 2. Zestawienie starterów wykorzystanych do PCR i sekwencjonowania.....	40
Tabela 3. Zestawienie starterów wykorzystanych do analizy qPCR.....	44
Tabela 4. Spis odczynników użytych w pracy.....	54
Tabela 5. Spis podstawowych buforów użytych w pracy.....	55
Tabela 6. Zestawienie internetowych baz danych oraz internetowych programów.....	55
Tabela 7. Programy wykorzystywane do analizy danych.....	56
Tabela 8. Aparatura wykorzystywana w pracy.....	56
Tabela 9. Usługi obce.....	56
Tabela 10. Podsumowanie mutacji stwierdzonych u pacjentów.....	80

10. SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat przedstawiający dwa główne typy ektrodaktylii (a) rozszcep typowy, (b) rozszcep typu monodaktylii [na podstawie: http://servier.com/Powerpoint-image-bank ; zmodyfikowano].	11
Rycina 2. Schemat przedstawiający interakcje pomiędzy białkami sygnalizacyjnymi w poszczególnych strefach (AER, PZ, ZPA) rozwijającego się zawiązka kończyny. Kolorem żółtym zaznaczono środkową część strefy AER o nieprawidłowej sygnalizacji komórkowej. Numery 1-5 wskazują na przyszłą lokalizację palców w ukształtowanej kończynie. Kolorem czerwonym zaznaczono białka będące produktami genów kandydujących lub o znanej roli w etiologii SHFM. Inhibitorowy oraz stymulujący efekt działania poszczególnych białek zaznaczono odpowiednio symbolami \rightarrow i \leftarrow . AER - szczytowy grzebień ektodermalny, PZ - strefa wzrastania, ZPA - strefa aktywności polaryzacyjnej [na podstawie: Duijf i wsp., 2003].	13
Rycina 3. Schemat przedstawiający fenotypową manifestację prawidłowego (górną część ryciny) oraz nieprawidłowego rozwoju strefy AER zawiązka kończyny. Zaburzenia w strefie AER (zaznaczono kolorem czerwonym) prowadzą do opóźnienia rozwoju środkowej części kończyny. Numery 1-5 wskazują na przyszłą lokalizację palców w ukształtowanej kończynie. AER - szczytowy grzebień ektodermalny, PZ - strefa wzrastania, ZPA - strefa aktywności polaryzacyjnej [na podstawie: Duijf i wsp., 2003].	14
Rycina 4. Przyjęty w pracy ogólny algorytm postępowania diagnostycznego w wadach ze spektrum SHFM.	34
Rycina 5. Obraz kliniczny rozszcepu typu monodaktylii w kończynach górnych u probandki I.	57
Rycina 6. Obraz kliniczny i radiologiczny rąk (a, b) oraz stóp (c, d) u probandki II, przedstawiający cztero kończynową monodaktylię.	57
Rycina 7. Obraz interstycjalnej duplikacji stwierdzonej u probandki II w <i>locus</i> 10q24.31-32 oraz genów wewnątrz zmiany i w jej pobliżu; 1) gen <i>LBX1</i> 2) gen <i>BTRC</i> , 3) gen <i>POLL</i> , 4) gen <i>DPCD</i> , 5) gen <i>FBXW4</i> , 6) gen <i>FGF8</i> . Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).	58
Rycina 8. Rodowód rodziny III.	58
Rycina 9. Obraz kliniczny i radiologiczny cztero kończynowej ektrodaktylii w rodzinie III; rozszcep typu monodaktylii rąk (a, e) oraz rozszcep typowy stóp (b, f) u probanda; rozszcep typowy rąk (c, g) i stóp (g, h) u córki.	59
Rycina 10. Obraz interstycjalnej duplikacji stwierdzonej u probanda III w <i>locus</i> 10q24.31-32 oraz genów wewnątrz zmiany i w jej pobliżu; 1) gen <i>LBX1</i> 2) gen <i>BTRC</i> , 3) gen <i>POLL</i> , 4) gen <i>DPCD</i> , 5) gen <i>FBXW4</i> , 6) gen <i>FGF8</i> . Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).	59
Rycina 11. Obraz kliniczny rąk probanda IV z typową obustronną ektrodaktylią.	60
Rycina 12. Wynik analizy genu <i>DLX5</i> ; heterozygotyczna mutacja c.G115T(p.E39X) u probanda IV (a); heterozygotyczna mutacja u matki (b); sekwencja prawidłowa u ojca (c).	60
Rycina 13. Rodowód rodziny V. Szarym kolorem zaznaczono pacjentów, u których wykonywano badania genetyczne z innego niż wada kończyn powodu.	61
Rycina 14. Obraz kliniczny cztero kończynowej typowej ektrodaktylii u probanda (a-d) oraz wady lewej stopy u jego syna (e) (Rodzina V).	61
Rycina 15. Wynik analizy genu <i>DLX5</i> ; heterozygotyczna mutacja c.G115T(p.E39X) u probanda (a) oraz jego syna (b) (Rodzina V).	62
Rycina 16. Rodowód rodziny VI.	63
Rycina 17. Obraz kliniczny izolowanej ektrodaktylii rąk i stóp w rodzinie VI. Rozszcep typowy prawej i lewej ręki (a) oraz prawej i lewej stopy (b) u probanda; rozszcep typowy prawej i lewej ręki (c), rozszcep typowy prawej stopy u ojca (d); rozszcep typowy prawej ręki (e) oraz wada ze spektrum rozszcepu lewej ręki u siostry ojca (f).	63
Rycina 18. Obraz interstycjalnej delecji stwierdzonej u probanda VI w <i>locus</i> 7q21.3, obejmującej fragmenty genów <i>DYNCH11</i> oraz <i>SLC25A13</i> . Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).	64

Rycina 19. Wizualizacja produktu amplifikacji fragmentu DNA flankującego delecję w <i>locus</i> 7q21.3 u probanda VI. Produkt o dł. 1138 pz, rozdzielony na 1,5% żelu agarozowym, oceniony wobec standardu wielkości <i>GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder</i>	64
Rycina 20. Wynik analizy miejsca delecji w <i>locus</i> 7q21.3 u probanda VI. Strzałkami oznaczono nukleotydy flankujące delecję; poniżej podano ich pozycje genomowe (wg HG19); niebieską czcionką podano wielkość oraz pozycję genomową (wg HG19) fragmentu, który uległ delecji.....	65
Rycina 21. Rodowód rodziny VII; 1) wytrzewienie; 2) wrodzona łamliwość kości (<i>osteogenesis imperfecta</i>) – postać letalna, 3) zespół Downa.	65
Rycina 22. Obraz kliniczny i radiologiczny wad kończyn u probanda VII; wada lewej ręki (a, b), obustronna wada stóp (d, e), cechy dysmorfii (c).....	66
Rycina 23. Obraz interstycjalnej duplikacji wykrytej u probanda VII w <i>locus</i> Xp22.31, obejmującej fragment genu <i>KALI</i> , w tym całą sekwencję kodującą genu. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).....	66
Rycina 24. Wizualizacja produktu amplifikacji fragmentu zduplikowanej sekwencji DNA w <i>locus</i> Xp22.31 u probanda VII. Produkt o dł. 1104 pz, rozdzielony na 1,5% żelu agarozowym, oceniony wobec standardu wielkości <i>Quick-Load® 1kb DNA Ladder</i>	67
Rycina 25. Wynik analizy miejsca duplikacji w <i>locus</i> Xp22.31 u probanda VII. Strzałkami oznaczono punkty złamań; poniżej podano ich pozycje genomowe (wg HG19); niebieską czcionką podano wielkość oraz pozycję genomową (wg HG19) zduplikowanego fragmentu.....	67
Rycina 26. Obraz kliniczny i radiologiczny wad kończyn u probandki VIII, charakteryzujący się ektrodaktylią prawej i lewej ręki (a, b) oraz syndaktylią palców lewej stopy (c, d).....	68
Rycina 27. Obraz interstycjalnej duplikacji wykrytej u probandki VIII w <i>locus</i> 6q27 oraz genów <i>SMOC2</i> i <i>DACT2</i> , zlokalizowanych w położeniu centromerowym od zmiany. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).	68
Rycina 28. Obraz kliniczny wady ze spektrum SHFM u probanda IX; wada prawej ręki (a), lewej ręki (b), wada prawej stopy (c).	69
Rycina 29. Obraz interstycjalnej delecji wykrytej u probanda IX w <i>locus</i> 17q25.1, obejmującej gen <i>MFS11</i> . Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH)..	69
Rycina 30. Obraz radiologiczny wady o fenotypie zbliżonym do SHFM (a, e) ze skróceniem kości długich (b, c) i hipoplazją panewek stawu biodrowego (d).....	70
Rycina 31. Obraz interstycjalnej delecji w <i>locus</i> 1p33 obejmującej fragment genu <i>AGBL4</i> u probandki X. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH)..	70
Rycina 32. Obraz kliniczny wady zmniejszającej ze spektrum SHFM u probanda XI. Kończyna prawa (a, b), kończyna lewa (c, d).	71
Rycina 33. Obraz przedstawiający interstycjalną delecję w <i>locus</i> 3q27.1 obejmującą fragment genu <i>KLHL6</i> wykrytą u probanda XI. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).....	71
Rycina 34. Obraz kliniczny i radiologiczny wady kończyn górnych u probanda XII; oligodaktylia ręki prawej i lewej (a, b), wada skracająca kości przedramienia kończyny górnej prawej i lewej (c, d).	72
Rycina 35. Obraz interstycjalnej delecji w <i>locus</i> 8q22.1 wykrytej u probanda XII oraz genu <i>GDF6</i> znajdującego się w odległości ok. 560 kb w kierunku telomerowym od zmiany. Badanie metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH).	72
Rycina 36. Analiza sekwencji genu <i>BHLHA9</i> ; heterozygotyczna mutacja c.C559G(p.R187G) w genie <i>BHLHA9</i> u probandki (a) i jej matki (b) oraz sekwencja prawidłowa u ojca (c).	73
Rycina 37. Wynik oceny patogenności wariantu p.R187G w genie <i>BHLHA9</i> z wykorzystaniem programu PolyPhen2.....	73
Rycina 38. Wynik oceny patogenności wariantu p.R187G w genie <i>BHLHA9</i> z wykorzystaniem programu SIFT.....	73
Rycina 39. Obraz kliniczny (a) i radiologiczny (b) obustronnej wady kończyn górnych u probanda XIII.	74

Rycina 40. Mutacja c.G3182A(p.G1061E) w genie <i>ROBO1</i> zidentyfikowana u probanda XIII w układzie homozygotycznym (320 odczytów) oraz u zdrowych rodziców w układzie heterozygotycznym (matka – 72 odczyty; ojciec – 121 odczytów).	75
Rycina 41. Analiza sekwencji eksonu 23 genu <i>ROBO1</i> ; mutacja homozygotyczna u probanda XIII (a), mutacja heterozygotyczna u matki (b), mutacja heterozygotyczna u ojca (c), sekwencja prawidłowa u brata pacjenta (d).....	76
Rycina 42. Wynik oceny patogenności wariantu p.G1061E w genie <i>ROBO1</i> z wykorzystaniem programu PolyPhen2.....	76
Rycina 43. Wynik oceny patogenności wariantu p.G1061E w genie <i>ROBO1</i> z wykorzystaniem programu SIFT.....	76
Rycina 44. Obraz kliniczny wady kończyn u probanda XIV; agenezja kości przedramienia i rąk w kończynie górnej prawej (a), syndaktylia w ręce lewej (b), hipoplazja kości podudzia oraz ektrodaktylia w kończynie dolnej prawej, agenezja kości podudzia i stopy w kończynie dolnej lewej (d).	77
Rycina 45. Analiza sekwencji eksonu 9 genu <i>ODZ4</i> ; mutacja heterozygotyczna c.G1060T(p.V354F) u probanda XIV (a), wariant dziki u matki (b), sekwencja prawidłowa u ojca (c).	78
Rycina 46. Wynik oceny patogenności wariantu p.V354F genu <i>ODZ4</i> z wykorzystaniem programu PolyPhen2.	78
Rycina 47. Wynik oceny patogenności wariantu p.V354F genu <i>ODZ4</i> z wykorzystaniem programu SIFT. .	78
Rycina 48. Mutacja c.G1060T(p.V354F) w genie <i>ODZ4</i> zidentyfikowana u probanda XII w układzie heterozygotycznym; brak obecności mutacji u zdrowych rodziców.....	79
Rycina 49. Genomowa lokalizacja duplikacji w <i>locus</i> 10q24.31-32 zidentyfikowanej u probandów II i III. Ramką zaznaczono zakres zmiany. Duplikacja obejmuje geny <i>LBX1</i> , <i>BTRC</i> , <i>POLL</i> oraz fragment genu <i>FBXW4</i> .82	
Rycina 50. Genomowa lokalizacja delecji w <i>locus</i> 7q21.3 zidentyfikowanej w rodzinie VI. Ramką zaznaczono zakres zmiany. Duplikacja obejmuje fragmenty genów <i>DYNCH11</i> oraz <i>SLC25A2</i>	89
Rycina 51. Genomowa lokalizacja duplikacji w <i>locus</i> Xp22.31 zidentyfikowanej u probanda VII. Ramką zaznaczono zakres zmiany. Duplikacja obejmuje fragment genu <i>KALI</i>	90
Rycina 52. Genomowa lokalizacja duplikacji w <i>locus</i> 6q27 zidentyfikowanej u probandki VIII. Ramką zaznaczono zakres zmiany. Duplikacja zlokalizowana jest w odległości ok. 158 kb od genu <i>SMOC2</i> oraz ok. 500 kb od genu <i>DACT2</i>	92
Rycina 53. Genomowa lokalizacja delecji w <i>locus</i> 8q22.1 zidentyfikowanej u probanda XII. Ramką zaznaczono zakres zmiany. Delecja zlokalizowana jest w odległości ok. 560 kb od genu <i>GDF6</i>	93
Rycina 54. Lokalizacja mutacji p.G1061E w białku ROBO1. IG – domeny immunoglobulinopodobne, FN3 – moduły fibronktyny, różowe figury – regiony o niskiej złożoności.	96
Rycina 55. Schemat przedstawiający interakcję domeny D2 ligandu Slit z domeną IG1 receptora Robo [na podstawie: Hohenester, 2008; zmodyfikowano].....	97
Rycina 56. Profil ekspresji genu <i>Robo1</i> oznaczony na różnych etapach embriogenezy na modelu kury (cRobo1) oraz myszy (rRobo1). Grot strzałki - ekspresja w dystalnej części mezenchymy, gwiazdka – ekspresja wzdłuż palców [na podstawie: Vargesson i wsp., 2001; zmodyfikowano].....	98
Rycina 57. Lokalizacja mutacji p.V354F w białku ODZ4. Niebieski prostokąt – domena transbłonowa, zielone figury – domeny EGF, różowe figury – regiony o niskiej złożoności [na podstawie: http://smart.embl-heidelberg.de/ ; zmodyfikowano].	99
Rycina 58. Profil ekspresji genu <i>Odz4</i> oznaczony w kończynach myszy typu dzikiego (Wild type) oraz myszy transgenicznej (<i>HoxD^{Del1-13}</i>) [na podstawie: Cobb i wsp., 2005; zmodyfikowano].	100

11. ZAŁĄCZNIK - Zgoda komisji bioetycznej na przeprowadzenie badań



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 742/11

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2003 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2003, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 13, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkwalifikacyjnych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierujące się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 08 września 2011 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:

prof. dr hab. Anna Latos- Bieleńska

w sprawie prowadzenia badań w

Katedrze i Zakładzie Genetyki Medycznej UM w Poznaniu

Główny badacz: **lek. med. Aleksander Jamsheer**

Członkowie zespołu
badawczego:

dr Magdalena Badura- Stronka
mgr biol. Anna Sowińska
mgr biol. Szymon Dębicki

Temat

badania: "Identyfikacja nowych wariantów liczby kopii (CNVs) u pacjentów z obustronnymi wrodzonymi wadami rozwojowymi kończyn z zastosowaniem wysokorozdzielczej całogenomowej mikromacierzy CGH (HR arrayCGH)".

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

Podpisy członków Komisji Bioetycznej - Dotyczy Uchwały nr 742/M z dnia 08.09.2011r.

prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI

prof. dr hab. ROMAN SZULC

prof. dr hab. JANUSZ SZYMAŚ

prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI

prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI

dr hab. MACIEJ KRAWCZYŃSKI prof. UM

dr hab. ROBERT SPACZYŃSKI prof. UM

dr med. PIOTR TOMCZAK

prof. dr hab. PAWEŁ CHEĆIŃSKI

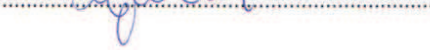
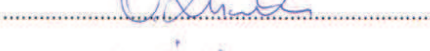
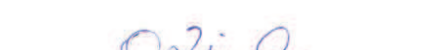
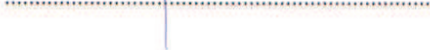
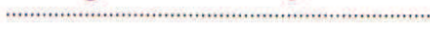

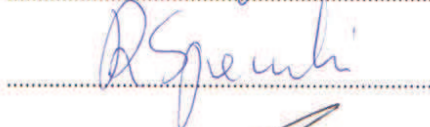
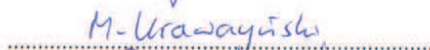
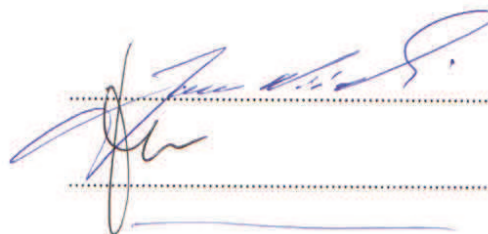
prof. dr hab. JANUSZ PALUSZAK

ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA

dr hab. JERZY W. OCHMAŃSKI prof. UAM

dr farm. OLIMPIA KLIMASZEWSKA

BARBARA LIPIAK



KOMISJA BIOETYCZNA
 przy
 UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
 im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
 61-701 Poznań, ul. Fredry 10
 tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
 fax (+48 61) 854 61 07

SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ

08.09.2011r.

z dnia

Lp	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Zygmunt Przybylski	medycyna sądowa	Katedra Medycyny Sądowej UM ul. Święcickiego 6, Poznań
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	prof. dr hab. Roman Szulc	anestezjologia i reanimacja, otolaryngologia	I Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM, ul. Długa 1/2, Poznań
4.	prof. dr hab. Janusz Szymaś	anatomia patologiczna	Katedra Patomorfologii Klinicznej UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
5.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
6.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
7.	dr hab. Maciej Krawczyński prof. UM	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
8.	dr hab. Robert Spaczyński prof. UM	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
9.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Łąkowa 1/2, Poznań
10.	prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
11.	prof. dr hab. Janusz Paluszak	fizjologia kliniczna	Katedra i Zakład Fizjologii UM, ul. Święcickiego 6
12.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, Poznań
13.	dr hab. Jerzy W. Ochmański prof. UAM	prawnik	Wydział Prawa UAM, ul. Św. Marcin 90, Poznań
14.	dr farm. Olimpia Klimaszewska	farmaceuta	Apteka „Kalifarm”
15.	Barbara Lipiak	pielęgniarka	ZOZ Grunwald

12. PIŚMIENICTWO

Acampora D., Merlo G.R., Paleari L., Zerega B., Postiglione M.P., Mantero S., Bober E., Barbieri O., Simeone A., Levi G.: Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development.*, 1999, 126(17), 3795-809.

Ahmad M., Abbas H., Haque S., Flatz G.: X-chromosomally inherited split-hand/split-foot anomaly in a Pakistani kindred. *Hum Genet.*, 1987, 75(2), 169-173.

Amiel J., Bougeard G., Francannet C., Raclin V., Munnich A., Lyonnet S., Frebourg T.: TP63 gene mutation in ADULT syndrome. *Eur J Hum Genet.*, 2001, 9(8), 642-645.

Birnbaum R.Y., Clowney E.J., Agamy O., Kim MJ, Zhao J, Yamanaka T, Pappalardo Z, Clarke SL, Wenger AM, Nguyen L, Gurrieri F, Everman DB, Schwartz CE, Birk OS, Bejerano G, Lomvardas S, Ahituv N.: Coding exons function as tissue-specific enhancers of nearby genes. *Genome Res.*, 2012a, 22(6), 1059-68.

Birnbaum R.Y., Everman D.B., Murphy K.K., Gurrieri F., Schwartz C.E., Ahituv N.: Functional characterization of tissue-specific enhancers in the *DLX5/6* locus. *Hum Mol Genet.*, 2012, 21(22), 4930-4938.

Blattner A., Huber A.R., Röthlisberger B.: Homozygous nonsense mutation in *WNT10B* and sporadic split-hand/foot malformation (SHFM) with autosomal recessive inheritance. *Am J Med Genet A.*, 2010, 153A(8), 2053-2056.

Bloch-Zupan A., Jamet X., Etard C., Laugel V., Muller J., Geoffroy V., Strauss J.P., Pelletier V., Marion V., Poch O., Strahle U., Stoetzel C., Dollfus H.: Homozygosity mapping and candidate prioritization identify mutations, missed by whole-exome sequencing, in *SMOC2*, causing major dental developmental defects. *Am J Hum Genet.*, 2011, 89(6), 773-781.

van Bokhoven H., Jung M., Smits A.P., van Beersum S., Rüschemdorf F., van Steensel M., Veenstra M., Tuerlings J.H., Mariman E.C., Brunner H.G., Wienker T.F., Reis A., Ropers H.H., Hamel B.C.: Limb mammary syndrome: a new genetic disorder with mammary hypoplasia, ectrodactyly, and other Hand/Foot anomalies maps to human chromosome 3q27. *Am J Hum Genet.*, 1999, 64(2), 538-546.

Bushdid P.B., Brantley D.M., Yull F.E., Blaeuer G.L., Hoffman L.H., Niswander L., Kerr L.D.: Inhibition of NF-kappaB activity results in disruption of the apical ectodermal ridge and aberrant limb morphogenesis. *Nature.*, 1998, 392(6676), 615-618.

Cariboni A., Pimpinelli F., Colamarino S., Zaninetti R., Piccolella M., Rumio C., Piva F., Rugarli E.I., Maggi R.: The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (*KAL1*) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *Hum Mol Genet.*, 2004, 13(22), 2781-2791.

Castori M., Rinaldi R., Cappellacci S., Grammatico P.: Tibial developmental field defect is the most common lower limb malformation pattern in *VACTERL* association. *Am J Med Genet A.*, 2008, 146A(10), 1259-1266.

Celli J., Duijf P., Hamel B.C., Bamshad M., Kramer B., Smits A.P., Newbury-Ecob R., Hennekam R.C., Van Buggenhout G., van Haeringen A., Woods C.G., van Essen A.J., de Waal R., Vriend G., Haber D.A., Yang A., McKeon F., Brunner H.G., van Bokhoven H.: Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell.*, 1999, 99(2), 143-153.

Cobb J., Duboule D.: Comparative analysis of genes downstream of the *Hoxd* cluster in developing digits and external genitalia. *Development.*, 2005, 132(13), 3055-3067.

Cooper D.N., Krawczak M., Polychronakos C., Tyler-Smith C., Kehrer-Sawatzki H.: Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet.* 2013, 132(10), 1077-1130.

Crackower M.A., Motoyama J., Tsui L.C.: Defect in the maintenance of the apical ectodermal ridge in the Dactylaplasia mouse. *Dev Biol.*, 1998, 201(1), 78-89.

- Crackower M.A.**, Scherer S.W., Rommens J.M., Hui C.C., Poorkaj P., Soder S., Cobben J.M., Hudgins L., Evans JP, Tsui LC.: Characterization of the split hand/split foot malformation locus SHFM1 at 7q21.3-q22.1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development. *Hum Mol Genet.*, 1996, 5(5), 571-579.
- Czeizel A.E.**, Vitéz M., Kodaj I., Lenz W.: An epidemiological study of isolated split hand/foot in Hungary, 1975-1984. *J Med Genet.*, 1993, 30(7), 593-596.
- Dickson B.J.**, Gilestro G.F.: Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2006, 22, 651-675.
- Dimitrov B.I.**, de Ravel T., Van Driessche J., de Die-Smulders C., Toutain A., Vermeesch J.R., Fryns J.P., Devriendt K., Debeer P.: Distal limb deficiencies, micrognathia syndrome, and syndromic forms of split hand foot malformation (SHFM) are caused by chromosome 10q genomic rearrangements. *J Med Genet.*, 2010, 47(2), 103-111.
- Dodé C.**, Levilliers J., Dupont J.M., De Paepe A., Le Dù N., Soussi-Yanicostas N., Coimbra R.S., Delmaghani S., Compain-Nouaille S., Baverel F., Pêcheux C., Le Tessier D., Cruaud C., Delpech M., Speleman F., Vermeulen S., Amalfitano A., Bachelot Y., Bouchard P., Cabrol S., Carel J.C., Delemarre-van de Waal H., Goulet-Salmon B., Kottler M.L., Richard O., Sanchez-Franco F., Saura R., Young J., Petit C., Hardelin J.P.: Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet.*, 2003, 33(4), 463-465.
- Duijf P.H.**, van Bokhoven H., Brunner H.G.: Pathogenesis of split-hand/split-foot malformation. *Hum Mol Genet.*, 2003, 12(1), 51-61.
- Elliott A.M.**, Evans J.A.: Genotype-phenotype correlations in mapped split hand foot malformation (SHFM) patients. *Am J Med Genet A.*, 2006, 140(13), 1419-1427.
- Elliott A.M.**, Reed M.H., Evans J.A.: Triphalangeal thumb in association with split hand/foot: a phenotypic marker for SHFM3? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.*, 2007, 79(1), 58-61.
- Elliott A.M.**, Reed M.H., Roscioli T., Evans J.A.: Discrepancies in upper and lower limb patterning in split hand foot malformation. *Clin Genet.*, 2005, 68(5), 408-423.
- Everman D.B.**, Morgan C.T., Lyle R., Laughridge M.E., Bamshad M.J., Clarkson K.B., Colby R., Gurrieri F., Innes A.M., Roberson J., Schrandt-Stumpel C., van Bokhoven H., Antonarakis S.E., Schwartz C.E.: Frequency of genomic rearrangements involving the SHFM3 locus at chromosome 10q24 in syndromic and non-syndromic split-hand/foot malformation. *Am J Med Genet A.*, 2006, 140(13), 1375-1383.
- Faiyaz ul Haque M.**, Uhlhaas S., Knapp M., Schüler H., Friedl W., Ahmad M., Propping P.: Mapping of the gene for X-chromosomal split-hand/split-foot anomaly to Xq26-q26.1. *Hum Genet.*, 1993, 91(1), 17-19.
- Friedli M.**, Nikolaev S., Lyle R., Arcangeli M., Duboule D., Spitz F., Antonarakis S.E.: Characterization of mouse Dactylaplasia mutations: a model for human ectrodactyly SHFM3. *Mamm Genome.*, 2008, 19(4), 272-278.
- Girirajan S.**, Vlangos C.N., Szomju B.B., Edelman E., Trevors C.D., Dupuis L., Nezarati M., Bunyan D.J., Elsea S.H.: Genotype-phenotype correlation in Smith-Magenis syndrome: evidence that multiple genes in 17p11.2 contribute to the clinical spectrum. *Genet Med.*, 2006, 8(7), 417-427.
- González-Martínez D.**, Kim S.H., Hu Y., Guimond S., Schofield J., Winyard P., Vannelli G.B., Turnbull J., Bouloux P.M.: Anosmin-1 modulates fibroblast growth factor receptor 1 signaling in human gonadotropin-releasing hormone olfactory neuroblasts through a heparan sulfate-dependent mechanism. *J Neurosci.*, 2004, 24(46), 10384-10392.
- Goodman F.R.**, Majewski F., Collins A.L., Scambler P.J.: A 117-kb microdeletion removing HOXD9-HOXD13 and EVX2 causes synpolydactyly. *Am J Hum Genet.*, 2002, 70(2), 547-555.
- Gurrieri F.**, Kjaer K.W., Sangiorgi E., Neri G.: Limb anomalies: Developmental and evolutionary aspects. *Am J Med Genet.*, 2002, 115(4), 231-244.
- Hinck L.**: The versatile roles of "axon guidance" cues in tissue morphogenesis. *Dev Cell.*, 2004, 7(6), 783-793.

- Hussain S.A.**, Piper M., Fukuhara N., Strohlic L., Cho G., Howitt J.A., Ahmed Y., Powell A.K., Turnbull J.E., Holt C.E., Hohenester E.: A molecular mechanism for the heparan sulfate dependence of slit-robo signaling. *J Biol Chem.*, 2006, 281(51), 39693-39698.
- Hu Y.**, Guimond S.E., Travers P., Cadman S., Hohenester E., Turnbull J.E., Kim S.H., Bouloux P.M.: Novel mechanisms of fibroblast growth factor receptor 1 regulation by extracellular matrix protein anosmin-1. *J Biol Chem.*, 2009, 284(43):29905-29920.
- Hohenester E.**: Structural insight into Slit-Robo signalling. *Biochem Soc Trans.*, 2008, 36(Pt 2), 251-6.
- Holmes G.P.**, Negus K., Burridge L., Raman S., Algar E., Yamada T., Little M.H.: Distinct but overlapping expression patterns of two vertebrate slit homologs implies functional roles in CNS development and organogenesis. *Mech Dev.*, 1998, 79(1-2), 57-72.
- Ianakiev P.**, Kilpatrick M.W., Dealy C., Kosher R., Korenberg J.R., Chen X.N., Tsiouras P.: A novel human gene encoding an F-box/WD40 containing protein maps in the SHFM3 critical region on 10q24. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1999, 261(1), 64-70.
- Jamsheer A.**: Genetyczne podłoże izolowanych wrodzonych wad dłoni. *Medycyna Wieku Rozwojowego.*, 2008, 12(3), 729-737.
- Jamsheer A.**: Identyfikacja nowych genów i regionów odpowiedzialnych za powstawanie wrodzonych wad kończyn u człowieka. *Rozprawa doktorska, UM w Poznaniu.*, 2011, Promotor: Prof. dr hab. med. Anna Latos-Beleńska.
- Jarzabek K.**, Wolczynski S., Lesniewicz R., Plessis G., Kottler M.L.: Evidence that FGFR1 loss-of-function mutations may cause variable skeletal malformations in patients with Kallmann syndrome. *Adv Med Sci.*, 2012, 57(2), 314-321.
- Johnson K.R.**, Lane P.W., Ward-Bailey P., Davisson M.T.: Mapping the mouse dactylaplasia mutation, Dac, and a gene that controls its expression, mdac. *Genomics.*, 1995, 29(2), 457-464.
- Jongmans M.C.**, Admiraal R.J., van der Donk K.P., Vissers L.E., Baas A.F., Kapusta L., van Hagen J.M., Donnai D, de Ravel TJ, Veltman JA, Geurts van Kessel A, De Vries BB, Brunner HG, Hoefsloot LH, van Ravenswaaij CM.: CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene. *J Med Genet.*, 2006, 43(4), 306-14.
- Kano H.**, Kurosawa K., Horii E., Ikegawa S., Yoshikawa H., Kurahashi H., Toda T.: Genomic rearrangement at 10q24 in non-syndromic split-hand/split-foot malformation. *Hum Genet.*, 2005, 118(3-4), 477-483.
- Khan S.**, Basit S., Zimri F.K., Ali N., Ali G., Ansar M., Ahmad W.: A novel homozygous missense mutation in WNT10B in familial split-hand/foot malformation. *Clin Genet.*, 2012, 82(1), 48-55.
- Kidd T.**, Brose K., Mitchell K.J., Fetter R.D., Tessier-Lavigne M., Goodman C.S., Tear G.: Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell.*, 1998, 92(2), 205-215.
- Kjaer K.W.**, Hansen L., Schwabe G.C., Marques-de-Faria A.P., Eiberg H., Mundlos S., Tommerup N., Rosenberg T.: Distinct CDH3 mutations cause ectodermal dysplasia, ectrodactyly, macular dystrophy (EEM syndrome). *J Med Genet.*, 2005, 42(4), 292-298.
- Klopocki E.**, Lohan S., Doelken S.C., Stricker S., Ockeloen C.W., Soares Thiele de Aguiar R., Lezirovitz K., Mingroni Netto R.C., Jamsheer A, Shah H., Kurth I., Habenicht R., Warman M., Devriendt K., Kordass U., Hempel M., Rajab A., Mäkitie O., Naveed M., Radhakrishna U., Anton.: Duplications of BHLHA9 are associated with ectrodactyly and tibia hemimelia inherited in non-Mendelian fashion. *J Med Genet.*, 2012, 49(2), 119-125.
- Kornak U.**, Mundlos S.: Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. *Am J Hum Genet.*, 2003, 73(3), 447-74.
- Korniszewski L.**: Dziecko z zespołem wad wrodzonych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2005.
- Kouwenhoven E.N.**, van Heeringen S.J., Tena J.J., Oti M., Dutilh B.E., Alonso M.E., de la Calle-Mustienes E., Smeenk L., Rinne T., Parsaulian L., Bolat E., Jurgelenaite R., Huynen M.A., Hoischen A., Veltman J.A., Brunner

H.G., Roscioli T., Oates E., Wilson M., Manzanares M. Gómez-Skarmeta J.L., Stunnenberg H.G., Lohrum M., van Bokhoven H., Zhou H.: Genome-wide profiling of p63 DNA-binding sites identifies an element that regulates gene expression during limb development in the 7q21 SHFM1 locus. *PLoS Genet.*, 2010, 6(8), e1001065.

Kriek M., White S.J., Szuhai K., Knijnenburg J., van Ommen G.J., den Dunnen J.T., Breuning M.H.: Copy number variation in regions flanked (or unflanked) by duplicons among patients with developmental delay and/or congenital malformations; detection of reciprocal and partial Williams-Beuren duplications. *Eur J Hum Genet.*, 2006, 14(2), 180-189.

Lalani S.R., Safiullah A.M., Fernbach S.D., Harutyunyan K.G., Thaller C., Peterson L.E., McPherson J.D., Gibbs R.A., White L.D., Hefner M., Davenport S.L., Graham J.M., Bacino C.A., Glass N.L., Towbin J.A., Craigen W.J., Neish S.R., Lin A.E., Belmont J.W.: Spectrum of CHD7 mutations in 110 individuals with CHARGE syndrome and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet.*, 2006, 78(2), 303-314.

Lalani S.R., Safiullah A.M., Molinari L.M., Fernbach S.D., Martin D.M., Belmont J.W.: SEMA3E mutation in a patient with CHARGE syndrome. *J Med Genet.*, 2004, 41(7), e94.

Lango AH., Caswell R., Xie W., Xu X., Wragg C., Turnpenny P.D., Turner C.L., Weedon M.N., Ellard S.: Next generation sequencing of chromosomal rearrangements in patients with split-hand/split-foot malformation provides evidence for DYNC111 exonic enhancers of DLX5/6 expression in humans. *J Med Genet.* 2014 [w druku].

Latos-Bieleńska A., Materna-Kiryłuk A., Badura-Stronka M., Wiśniewska K., Borszewska-Kornacka M.K., Bręborowicz G., Czerwionka-Szaflarska M., Gadzinowski J., Gajewska E., Godula-Stuglik U., Helwich E., Krawczyński M., Limon J., Mejnartowicz J.P., Rusin J., Sawulicka-Oleszczuk H., Stańczyk J., Szczapa J., Szałkiewicz-Warowicka E., Walczak M., Wysocki J.: Wrodzone Wady Rozwojowe w Polsce w latach 2005-2006. Dane z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych. *Ośrodek Wydawnictw Naukowych.*, Poznań, 2010.

Latos-Bieleńska A., Materna-Kiryłuk A., Badura-Stronka M., Wiśniewska K., Borszewska-Kornacka M.K., Bręborowicz G., Czerwionka-Szaflarska M., Gadzinowski J., Gajewska E., Godula-Stuglik U., Krawczyński M., Limon J., Mejnartowicz J., Rusin J., Sawulicka-Oleszczuk H., Stańczyk J., Szczapa J., Szałkiewicz-Warowicka E., Walczak M.: Wrodzone Wady Rozwojowe w Polsce w latach 2003-2004. Dane z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych. *Ośrodek Wydawnictw Naukowych.*, Poznań, 2010a.

Latos-Bieleńska A., Materna-Kiryłuk A., Mejnartowicz J., Balcar-Boroń A., Bręborowicz G., Czerwionka-Szaflarska M., Gajewska E., Glazar R., Krawczyński M., Limon J., Stańczyk J., Szałkiewicz-Warowicka E., Szymański W., Walczak M.: Wrodzone Wady Rozwojowe w Polsce w latach 1998-1999. Dane z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych. *Ośrodek Wydawnictw Naukowych.*, Poznań, 2002.

Latos-Bieleńska A., Materna-Kiryłuk A., Mejnartowicz J., Balcar-Boroń A., Bręborowicz G., Czerwionka-Szaflarska M., Gadzinowski J., Gajewska E., Godula-Stuglik U., Krawczyński M., Limon J., Rusin J., Sawulicka-Oleszczuk H., Szczapa J., Szałkiewicz-Warowicka E., Świetliński J., Walczak M.: Wrodzone Wady Rozwojowe w Polsce w latach 2000-2002. Dane z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych. *Ośrodek Wydawnictw Naukowych.*, Poznań, 2006.

Lee J.S., Chien C.B.: When sugars guide axons: insights from heparan sulphate proteoglycan mutants. *Nat Rev Genet.*, 2004,5(12), 923-935.

Lenz W., Zygulska M., Horst J.: FFU complex: an analysis of 491 cases. *Hum Genet.*, 1993, 91(4), 347-356.

Lezirovitz K., Maestrelli S.R., Cotrim N.H., Otto P.A., Pearson P.L., Mingroni-Netto R.C.: A novel locus for split-hand/foot malformation associated with tibial hemimelia (SHFLD syndrome) maps to chromosome region 17p13.1-17p13.3. *Hum Genet.*, 2008, 123(6), 625-631.

Li C., Xu X., Nelson D.K., Williams T., Kuehn M.R., Deng C.X.: FGFR1 function at the earliest stages of mouse limb development plays an indispensable role in subsequent autopod morphogenesis. *Development.*, 2005, 132(21), 4755-4764.

Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R.: 1000 Genome Project Data Processing Subgroup.: The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009, 25(16), 2078-2079.

- Li Q.**, Lu Q., Hwang J.Y., Buscher D., Lee K.F., Izpisua-Belmonte J.C., Verma I.M.: IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev.*, 1998, 13(10), 1322–1328.
- Li X.**, Florez S., Wang J., Cao H., Amendt B.A.: Dact2 represses PITX2 transcriptional activation and cell proliferation through Wnt/beta-catenin signaling during odontogenesis. *PLoS One.*, 2013, 8(1), w druku.
- Lo Iacono N.**, Mantero S., Chiarelli A., Garcia E., Mills A.A., Morasso M.I., Costanzo A., Levi G., Guerrini L., Merlo G.R.: Regulation of Dlx5 and Dlx6 gene expression by p63 is involved in EEC and SHFM congenital limb defects. *Development.*, 2008, 135(7), 1377-1388.
- Lupski J.R.**: Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet.*, 1998, 14(10), 417-422.
- Lupski J.R.**, Stankiewicz P.: Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet.*, 2005, 1(6), e49.
- Lyle R.**, Radhakrishna U., Blouin J.L., Gagos S., Everman D.B., Gehrig C., Delozier-Blanchet C., Solanki J.V., Patel U.C., Nath S.K., Gurrieri F., Neri G., Schwartz C.E., Antonarakis S.E.: Split-hand/split-foot malformation 3 (SHFM3) at 10q24, development of rapid diagnostic methods and gene expression from the region. *Am J Med Genet A.*, 2006, 140(13), 1384-1395.
- Mayer M.**: Poszukiwanie genów odpowiedzialnych na niepełnosprawność intelektualną: badania cytogenetyczne oraz molekularne u osób z aberracjami chromosomowymi. *Rozprawa doktorska, UM w Poznaniu.*, 2007, Promotor: Prof. dr hab. med. Anna Latos-Beleńska.
- Merlo G.R.**, Paleari L., Mantero S., Genova F., Beverdam A., Palmisano G.L., Barbieri O., Levi G.: Mouse model of split hand/foot malformation type I. *Genesis.*, 2002, 33(2), 97-101.
- Mills A.A.**, Zheng B., Wang X.J., Vogel H., Roop D.R., Bradley A.: p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature.*, 1999, 398(6729), 708-713.
- de Mollerat X.J.**, Everman D.B., Morgan C.T., Clarkson K.B., Rogers R.C., Colby R.S., Aylsworth A.S., Graham J.M. Jr, Stevenson R.E., Schwartz C.E.: P63 mutations are not a major cause of non-syndromic split hand/foot malformation. *J Med Genet.*, 2003a, 40(1), 55-61.
- de Mollerat X.J.**, Gurrieri F., Morgan C.T., Sangiorgi E., Everman D.B., Gaspari P., Amiel J., Bamshad M.J., Lyle R., Blouin J.L., Allanson J.E., Le Marec B., Wilson M., Braverman N.E., Radhakrishna U., Delozier-Blanchet C., Abbott A., Elghouzzi V., Antonarakis S., Stevenson R.E., Munnich A., Neri G., Schwartz C.E.: A genomic rearrangement resulting in a tandem duplication is associated with split hand-split foot malformation 3 (SHFM3) at 10q24. *Hum Mol Genet.*, 2003, 12(16), 1959-1971.
- Moon A.M.**, Capecchi M.R.: Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet.*, 2000, 26(4), 455-459.
- Morlot C.**, Thielens N.M., Ravelli R.B., Hemrika W., Romijn R.A., Gros P., Cusack S., McCarthy A.A.: Structural insights into the Slit–Robo complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, 104(38), 14923-14928.
- Nakamura H.**, Cook R.N., Justice M.J.: Mouse Tenm4 is required for mesoderm induction. *BMC Dev Biol.*, 2013, 13(9).
- Pilarski R.T.**, Pauli R.M., Bresnick G.H., Lebovitz R.M.: Karsch-Neugebauer syndrome: split foot/split hand and congenital nystagmus. *Clin Genet.*, 1985, 27(1), 97-101.
- Qiu M.**, Bulfone A., Ghattas I., Meneses J.J., Christensen L., Sharpe P.T., Presley R., Pedersen R.A., Rubenstein J.L.: Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol.*, 1997, 185(2), 165-184.
- Robledo R.F.**, Rajan L., Li X., Lufkin T.: The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev.*, 2002, 16(9), 1089-1101.

- Ronowicz A.**, Brzeskwiniwicz M., Madanecki P., Buckley P.G., Orłowska E., Renata Ochocka J., Limon J., Piotrowski A.: Regeneration of comparative genomic hybridization oligonucleotide microarrays with dimethylurea. *Anal Biochem.*, 2012, 426(2), 91-93.
- Sambrook J.**, Rssel W.D.: *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- Scherer S.W.**, Poorkaj P., Massa H., Soder S., Allen T., Nunes M., Geshuri D., Wong E., Belloni E., Little S. i wsp.: Physical mapping of the split hand/split foot locus on chromosome 7 and implication in syndromic ectrodactyly. *Hum Mol Genet.*, 1994, 3(8), 1345-1354.
- Schwabe G.C.**, Mundlos S.: Genetics of congenital hand anomalies. *Handchir Mikrochir Plast Chir.*, 2004, 36(2-3), 85-97.
- Seeger M.**, Tear G., Ferres-Marco D., Goodman C.S.: Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron.*, 1993, 10(3), 409-426.
- Sensiate L.A.**, Sobreira D.R., Da Veiga F.C., Peterlini D.J., Pedrosa A.V., Rirsch T., Joazeiro P.P., Schubert F.R., Collares-Buzato C.B., Xavier-Neto J., Dietrich S., Alvares L.E.: Dact gene expression profiles suggest a role for this gene family in integrating Wnt and TGF- β signaling pathways during chicken limb development. *Dev Dyn.*, 2013, ahead of print.
- Shamseldin H.E.**, Faden M.A., Alashram W., Alkuraya F.S.: Identification of a novel DLX5 mutation in a family with autosomal recessive split hand and foot malformation. *J Med Genet.*, 2012, 49(1), 16-20.
- Sidow A.**, Bulotsky M.S., Kerrebrock A.W., Birren B.W., Altshuler D., Jaenisch R., Johnson K.R., Lander E.S.: A novel member of the F-box/WD40 gene family, encoding dactylin, is disrupted in the mouse dactylaplasia mutant. *Nat Genet.*, 1999, 23(1), 104-107.
- Simonis N.**, Migeotte I., Lambert N., Perazzolo C., de Silva D.C., Dimitrov B., Heinrichs C., Janssens S., Kerr B., Mortier G., Van Vliet G., Lepage P., Casimir G., Abramowicz M., Smits G., Vilain C.: FGFR1 mutations cause Hartsfield syndrome, the unique association of holoprosencephaly and ectrodactyly. *J Med Genet.*, 2013, 50(9), 585-592.
- van Silfhout A.T.**, van den Akker P.C., Dijkhuizen T., Verheij J.B., Olderode-Berends M.J., Kok K., Sikkema-Raddatz B., van Ravenswaaij-Arts C.M.: Split hand/foot malformation due to chromosome 7q aberrations(SHFM1): additional support for functional haploinsufficiency as the causative mechanism. *Eur J Hum Genet.*, 2009, 17(11), 1432-1438.
- Simeone A.**, Acampora D., Pannese M., D'Esposito M., Stornaiuolo A., Gulisano M., Mallamaci A., Kastury K., Druck T., Huebner K., Boncinelli E.: Cloning and characterization of two members of the vertebrate Dlx gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1994, 91(6), 2250-2254.
- Storm E.E.**, Huynh T.V., Copeland N.G., Jenkins N.A., Kingsley D.M., Lee S.J.: Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature.*, 1994, 368(6472), 639-643.
- Tabin C.**: The initiation of the limb bud: growth factors, Hox genes, and retinoids. *Cell.*, 1995, 80(5), 671-674.
- Tackels-Horne D.**, Toburen A., Sangiorgi E., Gurrieri F., de Mollerat X., Fischetto R., Causio F., Clarkson K., Stevenson R.E., Schwartz C.E.: Split hand/split foot malformation with hearing loss: first report of families linked to the SHFM1 locus in 7q21. *Clin Genet.*, 2001, 59(1), 28-36.
- Temtamy S.A.**, McKusick V.A.: The genetics of hand malformations. *Birth Defects Orig Artic.*, 1978, 14(3), 1-619.
- Tobias E.S.**, Connor M., Ferguson-Smith M. Redakcja naukowa wydania Polskiego: Prof. dr hab. med. Anna Latos Bieleńska; Genetyka Medyczna. *Wydawnictwo Lekarskie PZWL*. Warszawa, 2011
- Tole S.**, Gutin G., Bhatnagar L., Remedios R., Hébert J.M.: Development of midline cell types and commissural axon tracts requires Fgfr1 in the cerebrum. *Dev Biol.*, 2006, 289(1) 141-151.
- Ugur S.A.**, Tolun A.: Homozygous WNT10b mutation and complex inheritance in Split-Hand/Foot Malformation. *Hum Mol Genet.*, 2008, 17(17), 2644-2653.
- Vargesson N.**, Luria V., Messina I., Erskine L., Laufer E.: Expression patterns of Slit and Robo family members during vertebrate limb development. *Mech Dev.*, 2001, 106(1-2), 175-180.

- Vaudin P.**, Delanoue R., Davidson I., Silber J., Zider A.: TONDU (TDU), a novel human protein related to the product of vestigial (vg) gene of *Drosophila melanogaster* interacts with vertebrate TEF factors and substitutes for Vg function in wing formation. *Development.*, 1999, 126(21), 4807-4816.
- Verheyden J.M.**, Lewandoski M., Deng C., Harfe B.D., Sun X.: Conditional inactivation of *Fgfr1* in mouse defines its role in limb bud establishment, outgrowth and digit patterning. *Development.*, 2005, 132(19), 4235-4245.
- Wang K.**, Li M., Hakonarson H.: ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38(16), e164.
- Wallis C.E.**: Ectrodactyly (split-hand/split-foot) and ectodermal dysplasia with normal lip and palate in a four-generation kindred. *Clin Genet.*, 1988, 34(4), 252-257.
- Wilkie A.**: Why study human limb malformations? *J Anat.*, 2003, 202(1), 27-35.
- Wong K.**, Ren X.R., Huang Y.Z., Xie Y., Liu G., Saito H., Tang H., Wen L., Brady-Kalnay S.M., Mei L., Wu J.Y., Xiong W.C., Rao Y.: Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase *Cdc42* in the Slit-Robo pathway. *Cell.*, 2001, 107(2), 209-221.
- Xu Z.P.**, Dutra A., Stellrecht C.M., Wu C., Piatigorsky J., Saunders G.F.: Functional and structural characterization of the human gene *BHLHB5*, encoding a basic helix-loop-helix transcription factor. *Genomics.*, 2002, 80(3), 311-318.
- Yang A.**, Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R.T., Tabin C., Sharpe A., Caput D., Crum C., McKeon F.: p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.*, 1999, 398(6729), 714-718.
- Yu K.**, Ornitz D.M.: FGF signaling regulates mesenchymal differentiation and skeletal patterning along the limb bud proximodistal axis. *Development.*, 2008, 135(3), 483-491.
- Zhang L.**, Zhou H., Su Y., Sun Z., Zhang H., Zhang L., Zhang Y., Ning Y., Chen Y.G., Meng A.: Zebrafish *Dpr2* inhibits mesoderm induction by promoting degradation of nodal receptors. *Science.*, 2004, 306(5693), 114-117.

13. CURRICULUM VITAE

Dane osobowe

Imię i Nazwisko: Anna Sowińska-Seidler
Data urodzenia: 6 lipca 1981 r.
Miejsce urodzenia: Poznań
Adres: Os. Bolesława Chrobrego 20/119, 60-681 Poznań
e-mail: asowinskaseidler@gmail.com
Telefon komórkowy: 517-453-354

Miejsce zatrudnienia

Katedra i Zakład Genetyki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
ul. Grunwaldzka 55 paw. 15, 60-352 Poznań
tel/fax.: +4861 854 76 13

Edukacja

- 2003-2005 Studia magisterskie na kierunku biotechnologia, na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu zakończone obroną pracy magisterskiej. Praca realizowana w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, w zespole mutagenezy, pod kierunkiem Prof. dr hab. Krzysztofa Szyftera. Temat pracy: „*Analiza utraty heterozygotyczności w materiale nowotworowym, tkance otaczającej i prawidłowej błonie śluzowej w preparatach pozyskiwanych od chorych na płaskonabłonkowego raka krtani*”.
- IX 2004-I 2005 Stypendium zagraniczne w ramach programu Socrates-Erasmus w Anglii na University of Luton.
- 2000-2003 Studia licencjackie na kierunku biotechnologia na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, zakończone uzyskaniem tytułu licencjata.
- 1996-2000 Nauka w VII Liceum Ogólnokształcące im. Dąbrowki w Poznaniu.

Przebieg zatrudnienia:

- VIII 2009-obecnie Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Katedra i Zakład Genetyki Medycznej (praca na stanowisku specjalisty).
- VI 2009-XII 2012 NZOZ Centrum Genetyki Medycznej GENESIS w Poznaniu (praca na stanowisku asystenta biologii molekularnej).
- X 2005-XII 2008 Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej (praca na stanowisku asystenta).
- VIII–X 2005 Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej (praca na stanowisku starszego referenta technicznego).

Staże zagraniczne:

- IX – X 2002 Francja, Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades w Paryżu, Laboratorium INSERM U.467 pod kierunkiem Prof. Aleksandra Edelmana (praktyka zawodowa).
- VII - VIII 2004 USA, Department of Environmental Medicine, NYU School of Medicine w Nowym Yorku, Laboratory of Oxidative Mechanisms in Carcinogenesis pod kierunkiem Prof. Krystyny Frenkel (praktyka zawodowa).

Granty badawcze:

- X 2013-X 2014 Kierownik i główny wykonawca projektu uczelnianego pt. "Identyfikacja i ocena patogenności mutacji punktowych w genach kandydujących u pacjentów ze spektrum rozszczepu dłoni i/lub stóp".
- IX 2012-IX 2015 Główny wykonawca grantu pt. "Identyfikacja nowych wariantów liczby kopii (CNVs) u pacjentów z obustronnymi wrodzonymi wadami kończyn z zastosowaniem wysokorozdzielczej całogenomowej mikromacierzy CGH (*array CGH*)."
- IX 2012-IX 2015 Współwykonawca grantu pt. "Badanie hipotezy płodowego incydentu naczyniowego (prenatalnej zakrzepicy) jako przyczyny występowania jednostronnych poprzecznych wad zmniejszających kończyn u człowieka."
- VII 2009-VI 2012 Współwykonawca grantu pt. "Identyfikacja nowych genów i regionów odpowiedzialnych za powstawanie wrodzonych wad kończyn u człowieka" (Projekt międzynarodowy niewspółfinansowany).
-

Stypendia i nagrody

1. Stypendium doktorskie przyznane przez Rektora UM w Poznaniu na okres 01.01.2014-31.12.2014.
2. Nagroda Rektorska za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2012/2013 (30.11.2013).
3. Stypendium doktorskie Narodowego Centrum Nauki przyznane w konkursie ETIUDA 1 na okres 01.10.2013-01.10.2014.
4. Stypendium i wsparcie towarzyszące przyznane w ramach projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”. Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.
5. Nagroda Ministra Zdrowia za cykl 5 publikacji dotyczących epigenetycznej regulacji ekspresji wybranych genów w komórkach nowotworowych (16.12.2009).
6. Pierwsza nagroda za doniesienie plakatowe pt. *„Analiza korelacji pomiędzy poziomem metylacji promotora oraz ekspresji genu CXCL12 a stopniem zaawansowania pierwotnego raka piersi”* na V Konferencji „Diagnostyka i Leczenie Raka Piersi” Warszawa – Falenty (19-21.04.2007).

14. SPIS PUBLIKACJI

- 1) Szukała K., **Sowińska A.**, Wierzbička M., Biczysko W., Szyfter W., Szyfter K.: Does loss of heterozygosity in critical genome regions predict a local relapse in patients after laryngectomy? *Mutat Res.*, 2006, 600(1-2), 67-76.
- 2) **Sowińska A.**, Jagodziński P.P.: RNA interference-mediated knockdown of DNMT1 and DNMT3B induces CXCL12 expression in MCF-7 breast cancer and AsPC1 pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Lett.*, 2007, 255(1), 153-159.
- 3) Badura-Stronka M., Jamsheer A., Materna-Kiryluk A., **Sowińska A.**, Kiryluk K., Budny B., Latos-Bieleńska A.: A Novel Nonsense Mutation in *CUL4B* Gene in Three Brothers with X-linked mental retardation syndrome. *Clin Genet.*, 2010, 77(2), 141-144.
- 4) Jamsheer A., Badura-Stronka M., **Sowińska A.**, Dębicki S., Kiryluk K., Latos-Bieleńska A.: A severe progressive oculodentodigital dysplasia due to compound heterozygous *GJA1* loss of function mutation. *Clin Genet.*, 2010, 78(1), 94-97.
- 5) Wawrocka A., Budny B., Dębicki S., Jamsheer A., **Sowińska A.**, Krawczyński M.R.: PAX6 3' deletion in a family with aniridia. *Ophthalmic Genetics.*, 2012, 33(1), 44-48.
- 6) Jamsheer A., **Sowińska A.**, Kaczmarek L., Latos-Bieleńska A.: Isolated brachydactyly type E caused by a *HOXD13* nonsense mutation: a case report. *BMC Medical Genetics.*, 2012, 13(1).
- 7) Bieganski T., Jamsheer A., **Sowińska A.**, Niedzielski K., Kozłowski K., Czarny-Ratajczak M.: Three New Patients with Fibular Aplasia/Agensis, Tibial Campomelia and Oligosyndactyly (FATCO). Phenotypic Spectrum of Fibular Aplasia with Ectrodactyly. *AJMG part A.*, 2012, 158A(7), 1542-1550.
- 8) Wu J., **Sowińska A.**, Huang X., Klein C.B., Pelle E., Frenkel K.: Impairment of antioxidant defenses as a contributor to arsenite-induced cell transformation. *Biometals.*, 2012, 25(5), 927-937.
- 9) Jamsheer A., **Sowińska A.**, Trzeciak T., Jamsheer-Bratkowska M., Geppert A., Latos-Bieleńska A.: Expanded mutational spectrum of the *GLI3* gene substantiates genotype-phenotype correlations. *J Appl Genet.*, 2012, 53(4), 415-422.
- 10) Jamsheer A., **Sowińska A.**, Jamsheer-Bratkowska M., Trzeciak T., Latos-Bieleńska A.: Bilateral radial agenesis with absent thumbs, complex heart defect, short stature, and facial dysmorphism in a patient with pure distal microduplication of 5q35.2-5q35.3. *BMC Medical Genetics.*, 2013, 14:13.
- 11) **Sowińska-Seidler A.**, Socha M., Jamsheer A.: Split-hand/foot malformation - molecular cause and implications in genetic counseling. *J Appl Genet.*, 2013, 55(1), 105-115.
- 12) Jamsheer A., Socha M., **Sowińska-Seidler A.**, Telega K., Trzeciak T., Latos-Bieleńska A.: Mutational screening of EXT1 and EXT2 genes in Polish patients with hereditary multiple exostoses. *J Appl Genet.* 2014 [w druku].
- 13) Jamsheer A., **Sowińska-Seidler A.**, Socha M., Stembalska A., Kiraly-Borri C., Latos-Bieleńska A.: Three novel *GJA1* missense substitutions resulting in oculo-dento-digital dysplasia (ODDD) - further extension of the mutational spectrum. *Gene.* 2014 [w druku].