

1. Cel badań/Hipoteza

Obustronne wrodzone wady kończyn (WWK) są w znacznym odsetku przypadków uwarunkowane genetycznie. Pomimo postępu wiedzy w zakresie genetyki człowieka oraz ciągłego udoskonalania metod diagnostyki genetycznej, przyczyna genetyczna wady pozostaje niezidentyfikowana u ok. 40-70% pacjentów z WWK, zależnie od typu wady. W niektórych podtypach WWK (np. izolowany rozszczep rąk/stóp, brak kości promieniowych, niedorozwój kości łokciowych) uwarunkowanie genetyczne jest nieznanne u większości pacjentów. Co ważne, większość opublikowanych w ostatniej dekadzie badań naukowych odkrywających nowe genetyczne przyczyny WWK była prowadzona z wykorzystaniem metody mikromacierzy CGH (array CGH) i – jako czynniki sprawcze wady – identyfikowała tzw. warianty liczby kopii (CNVs), tj. małe ubytki lub nadatki określonych segmentów DNA. Tego rodzaju zmiany, zaburzając otoczenie regulatorowe genu lub genów, skutkowały ich nieprawidłowym działaniem w trakcie rozwoju zarodkowego. Inne badania wykonywane w ostatnich latach przy użyciu sekwencjonowania eksomowego (WES, tj. metody polegającej na analizie kodujących białka fragmentów materiału genetycznego) wykazały ograniczoną skuteczność tego podejścia diagnostycznego, sugerując że zmiany przyczynowe w WWK zlokalizowane są prawdopodobnie w niekodującym DNA. Całościowe badania interakcji wewnątrzgenomowych, przeprowadzone z wykorzystaniem metod uchwycenia konformacji chromosomów (np. Hi-C lub 4C), ujawniły, że genom ssaczy podzielony jest na „partycje” w postaci tzw. domen topologicznych (tzw. TAD). Uszkodzenie granic TAD-ów może zmieniać oddziaływania DNA-DNA w danym regionie genomu, prowadząc do zaburzeń regulacji genów rozwojowych, a w konsekwencji do rozwoju wady. W związku z powyższym zamierzamy przebadać grupę pacjentów z obustronnymi WWK, u których w kompleksowych badaniach genetycznych wykluczono wszystkie znane przyczyny wady. Planujemy wykonać badanie porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (array CGH) w połączeniu z analizą bioinformatyczną i badaniami funkcjonalnymi, po to by:

[A] zidentyfikować nowe patogenne CNVs związane z wystąpieniem WWK u ludzi,

[B] zidentyfikować nowe sekwencje regulatorowe odpowiedzialne za tworzenie się kończyn,

[C] uzyskać wgląd w mechanizmy leżące u podłoża prawidłowej i zaburzonej morfogenezy kończyn u ludzi.

2. Metoda badawcza

Grupa ok. 150 probandów z WWK (przypadki rodzinne i sporadyczne) zostanie objęta badaniami. Kolejność diagnostyki będzie zależna od fenotypu pacjenta, tj. rozpoczynana od badania genów lub regionów, w których obecność mutacji jest najbardziej prawdopodobna. W ramach projektu, planowane jest wykonanie sekwencjonowania metodą Sangera oraz analizy liczby kopii metodami MLPA lub qPCR (ilościowy PCR) wytypowanych do badań genów i regionów. Ponieważ submikroskopowe CNVs odpowiadają za ok. 10-15% przypadków wady, u wszystkich niezdiagnozowanych probandów wykonane zostanie badanie array CGH (o rozdzielczości min. 1M), jako końcowy etap badań genetycznych. Zamierzamy wykorzystać array CGH do przebadania ok. 100 probandów i qPCR do badań rodziców. Nowo zidentyfikowane, potencjalnie patogenne CNVs zostaną poddane analizie bioinformatycznej celem sprawdzenia czy naruszają one granice TAD-ów i zmieniają otoczenie regulatorowe genów, co w konsekwencji mogłoby prowadzić do zaburzeń regulacji genowej w danym locus poprzez tzw. „adopcję enhancera”. W przypadku identyfikacji obiecujących kandydatów (genów lub sekwencji regulatorowych), przeprowadzone zostaną badania funkcjonalne oraz odpowiednie badania celowane u pacjentów manifestujących określone, zbliżone klinicznie fenotypy. By udokumentować związek domniemanych mutacji regulatorowych z obecnością wady użyjemy metody 4C (ang. *circularized chromosome conformation capture*), która pozwala na identyfikację zmian oddziaływań wewnątrzchromosomowych w komórkach pacjentów (fibroblasy, LCLs) względem komórek zdrowych osób. Na koniec planujemy odwzorowywanie CNVs w modelu mysim, wykorzystując technologię CRISPR-Cas9.

3. Wpływ rezultatów

Identyfikacja nowych zmian genetycznych odpowiedzialnych za morfogenezę kończyn będzie stanowiła istotny wkład w dziedziny genetyki klinicznej, biologii rozwoju i genetyki rozwoju. Uzyskane wyniki poszerzą wiedzę o wrodzonych wadach rozwojowych człowieka, jak również pozwolą uzyskać wgląd w procesy regulacji genów rozwojowych oraz mechanizmy embriogenezy kończyn człowieka i innych kręgowców. Co więcej, dzięki wynikom badań, pacjenci z WWK i ich rodziny uzyskają lepszą opiekę medyczną i bardziej wiarygodne poradnictwo genetyczne. Oczekuje się, że wyniki projektu umożliwią opracowanie i wprowadzenie nowych, bardziej kompleksowych testów genetycznych (obejmujących także niekodujące fragmenty genomu), co poprawi stan diagnostyki genetycznej i poradnictwa, które może być w pełni wiarygodne jedynie wówczas, gdy opiera się na wynikach odpowiednich badań. Dzięki umożliwieniu polskim pacjentom/rodzinom z WWK dostępu do kompleksowej diagnostyki genetycznej, będziemy mogli osiągnąć wysoki wskaźnik sukcesu diagnostycznego, a w konsekwencji umożliwić przeprowadzenie diagnostyki prenatalnej lub preimplantacyjnej. Podsumowując, lepsze zrozumienie etiologii genetycznej WWK, oprócz istotnego wkładu w rozwój nauk podstawowych, bez wątpienia przyczyni się do poprawy stanu opieki genetycznej nad chorymi oraz umożliwi skuteczniejszą diagnostykę, prognozowanie, leczenie i poradnictwo genetyczne w tej heterogennej grupie zaburzeń rozwojowych.