

STRESZCZENIE

Wrodzone wady kończyn (WWK) są heterogenną klinicznie i genetycznie grupą wad wrodzonych. W ostatnich latach dokonał się znaczący postęp w rozumieniu przyczyn ich powstawania, a dzięki nowoczesnym metodom diagnostycznym i analizom funkcjonalnym możliwe jest coraz skuteczniejsze identyfikowanie i walidowanie nowo wykrytych wariantów. Badania prowadzone nad strukturą 3D genomu doprowadziły do odkrycia podstawowych jednostek funkcjonalnych genomu – domen topologicznych (TADs), których granice wyznaczają regiony tkankowo specyficznych interakcji genów i elementów *cis*-regulatorowych (REs). Przypuszcza się, że co najmniej 5-10% przypadków WWK o nieznanym podłożu genetycznym powstaje w wyniku zaburzeń środowiska regulatorowego genów, np. wskutek wystąpienia wariantu strukturalnego (SV).

Celami niniejszej pracy doktorskiej było wytypowanie nowych, nieopisanych zmian genetycznych, stanowiących prawdopodobną przyczynę wrodzonych wad kończyn człowieka, opisanie nowych patomechanizmów leżących u podstaw rozwoju wad kończyn u człowieka oraz poprawa diagnostyki molekularnej, opieki genetycznej i poradnictwa genetycznego w grupie pacjentów z WWK.

Badaniami objęto 64 probandów z izolowaną lub zespołową wadą kończyn, u których zachodziło wysokie prawdopodobieństwo genetycznego uwarunkowania wady (jej obustronne występowanie). Na podstawie oceny klinicznej wykonanej przez lekarza genetyka pacjentów kwalifikowano na badania diagnostyczne (sekwencjonowanie metodą Sangera/MLPA), a w przypadku negatywnego wyniku na badanie porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH) i/lub sekwencjonowanie całego eksomu (WES). W przypadku braku dostępnego testu diagnostycznego, wykonano w pierwszej kolejności badanie aCGH (u 10 probandów) lub WES (u 2 probandów). W toku rutynowych badań genetycznych zidentyfikowano przyczynę WWK u 8 probandów (12,5%): u 1 probanda z cefalopolisyndaktylią Greiga (GCPS) mutację w genie *GLI3*, u probanda z polidaktylią przedosiową (PPIV) mutację w genie *HOXD13*, a rodzinnym przypadku brachydaktylii typu E – w genie *PTHLH*. U 5 probandów z zespołem Holt-Orama (HOS) wykryto mutacje w genie *TBX5* (2 przypadki) i *SALL4* (1 przypadek) oraz delecję całego genu *TBX5* i *SALL4* (po 1 przypadku). U 36 probandów, u których wykluczono znane przyczyny wady wrodzonej lub zespołu wad, wykonano badanie aCGH. U 6 probandów (9,4% kohorty) wykryto nowe warianty liczby kopii (CNVs), z których patogenna była delecja w *locus* 12q24.13-q24.21, wykryta u pacjenta z nakładającym się fenotypem HOS i UMS. Pozostałe CNVs nie były wcześniej opisywane u pacjentów z WWK (*loci* 8q12.1, 13q14.2, 9q33.1-q33.2, Xp22.2, 7q31.32), jednak z uwagi na zbyt skąpe dowody na poparcie ich związku z fenotypem zostały zaklasyfikowane jako warianty o nieokreślonej patogenności (VUSs). W badaniu WES, które

wykonano u 27 probandów (42,2% kohorty) zidentyfikowano patogenny wariant w genie *SALL4* w rodzinie z polidaktylią przedosiową oraz 5 wariantów w genach kandydujących: *NCKAP1* u pacjentki z wadą wiązki promieniowej, *BTAF1* u probanda z oligodaktylią łokciową, *FGF8* u pacjenta z zespołem wad mnogich, *FZD3* w rodzinie z polidaktylią przedosiową stóp i *KBTD7* u probanda z asocjacją VACTERL.

W badaniach funkcjonalnych przeprowadzonych z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9 do edycji mysich komórek macierzystych (mESCs), odtworzono defekty genetyczne identyfikowane u pacjentów, tj. mutacje punktowe w genie *FZD3*, *KBTD7* oraz duplikację w chromosomie 7q31.32, jednak w modelu mysim nie obserwowano wad kończyn.

Badania przeprowadzone z użyciem systemu CRISPR/Cas9 pozwoliły także odtworzyć w modelu mysim duplikację w *locus* 10q24.32, nieobejmującą genu *LBX1* i obejmującą m. in. gen *FGF8*, zidentyfikowaną u 2 pacjentek z izolowaną hipoplazją kości udowych i miednicy. Otrzymane mutanty mysie miały wady kostne zbliżone do wad szkieletu obserwowanych u pacjentek, co stanowiło potwierdzenie patogenności duplikacji. Natomiast wykorzystanie techniki *Circular Chromosome Conformation Capture sequencing* (4C-seq) pozwoliło wykazać powstanie nowego regionu interakcji w *locus* 10q24.32, który zaburzył środowisko regulatorowe genu *FGF8*.