

Alina Kuźniacka

**Analiza mutacji punktowych i dużych rearanżacji genu *NIPBL*  
u chorych z zespołem Cornellii de Lange (CdLS).**

(rozprawa doktorska)

Praca wykonana

w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

**Kierownik i Promotor:** prof. dr hab. n. med. Janusz Limon

**Gdańsk 2011**

Praca została w całości sfinansowana z grantu: N407 020 32/0536

## SPIS TREŚCI

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	6
1.1. Wielkości fizyczne i przedrostki. ....	6
1.2. Substancje chemiczne i roztwory.....	7
1.3. Symbole aminokwasów.. ....	7
1.4. Geny i białka.....	8
1.5. Pozostałe skrótów.. ....	9
2. STRESZCZENIE .....	12
2.1. ABSTRACT .....	14
3. WSTĘP .....	16
3.1. Zespół Cornellii de Lange. ....	16
3.1.1. Kliniczna charakterystyka zespołu Cornellii de Lange. ....	17
3.1.2. Dziedziczenie zespołu Cornellii de Lange. ....	24
3.2. Kompleks kohezyny.....	25
3.2.1. Białka z rodziny SMC (structural maintenance of chromosomes).27	
3.2.2. Inne białka kompleksu.....	29
3.2.3. Zasadnicze funkcjonowanie kompleksu kohezyny.....	31
3.2.4. Dodatkowe funkcje kompleksu kohezyny.....	34
3.2.5. Efekty zaburzenia kompleksu kohezyny obserwowane u chorych z CdLS.....	36
3.3. Gen <i>NIPBL</i> .....	37
3.3.1. Gen <i>NIPBL</i> i jego produkt białkowy.....	37
3.3.2. Mutacje <i>NIPBL</i> a fenotyp osób chorych.....	38
3.3.3. Regulacja ekspresji genów poprzez białko <i>NIPBL</i> (w interakcji z kompleksem kohezyny).....	39
3.4. Mutacje genów <i>SMC1</i> i <i>SMC3</i> w zespole Cornellii de Lange.....	43
3.5. Duże rearanżacje genowe.....	43
3.5.1. Duże rearanżacje genu <i>NIPBL</i> .....	47
3.6. Techniki molekularne wykorzystywane w poszukiwaniu mutacji.....	48
3.7. Podsumowanie.....	52

4. CELE PRACY .....	54
5. MATERIAŁY I METODY .....	55
5.1. Materiał.....	55
5.2. Metody.....	56
5.2.1. Aparatura. ....	56
5.2.2. Odczynniki. ....	57
5.2.3. Wykaz roztworów wykorzystywanych do analiz .....	59
5.2.4. Izolacja DNA z limfocytów krwi obwodowej .....	60
5.2.5. Izolacja RNA .....	62
5.2.6. Synteza cDNA .....	62
5.2.7. Amplifikacja sekwencji kodującej genu <i>NIPBL</i> .....	62
5.2.8. Elektroforeza agarozowa .....	67
5.2.9. Wysokosprawną denaturującą chromatografię cieczową DHPLC .....	68
5.2.10. Sekwencjonowanie produktów PCR .....	69
5.2.11. Badanie wpływu mutacji w miejscu konsensus na proces składania mRNA .....	70
5.2.12. Elektroforeza poliakrylamidowa .....	72
5.2.13. Badanie dużych rearanżacji .....	72
5.2.14. Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy - aCGH .....	75
5.2.15. Badania kosegregacyjne z wykorzystaniem techniki DHPLC .....	77
5.2.16. Narzędzia <i>in silico</i> .....	77
5.2.17. Analiza statystyczna .....	78
6. WYNIKI .....	79
6.1. Analiza mutacji punktowych genu <i>NIPBL</i> .....	79
6.1.1. Badania za pomocą DHPLC i sekwencjonowania.....	79
6.1.2. Badania na poziomie cDNA .....	83
6.1.3. Zestawienie mutacji punktowych .....	84
6.1.3.1. Ocena bioinformatyczna mutacji zmiany sensu .....	85
6.1.4. Weryfikacja zmian w sekwencjach rozpoznawanych przez białka z rodziny SR .....	87
6.2. Badania kosegregacyjne u rodziców pacjentów.....	89

6.3. Poszukiwania dużych rearanżacji genomowych.....	89
6.3.1. Analiza MLPA .....	89
6.3.2. Porównawcza hybrydyzacja genomowa (aCGH).....	90
6.4. Fenotyp chorego a typ mutacji. ....	92
7. DYSKUSJA .....	94
8. WNIOSKI .....	110
9. PIŚMIENNICTWO .....	111

**1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW****1.1. Wielkości fizyczne i przedrostki.**

<b>g</b>	gram
<b>kDa</b>	kilodalton, jednostka masy
<b>l</b>	litr, dm <sup>3</sup>
<b>M</b>	stężenie molowe, mol/dm <sup>3</sup>
<b>m</b>	metr
<b>min</b>	minuta
<b>sek</b>	sekunda
<b>U</b>	jednostka enzymu
<b>V</b>	Wolt – jednostka napięcia elektrycznego
<b>M</b>	mega, 10 <sup>6</sup>
<b>k</b>	kilo, 10 <sup>3</sup>
<b>d</b>	decy, 10 <sup>-1</sup>
<b>c</b>	centy, 10 <sup>-2</sup>
<b>m</b>	mili, 10 <sup>-3</sup>
<b>μ</b>	mikro, 10 <sup>-6</sup>
<b>n</b>	nano, 10 <sup>-9</sup>
<b>p</b>	piko, 10 <sup>-12</sup>

**1.2. Substancje chemiczne i roztwory.**

<b>A</b>	adenina
<b>ATP</b>	adenozynotrifosforan
<b>C</b>	cytozyna
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	woda podwójnie destylowana
<b>dNTPs</b>	deoksynukleotydy (adeninowy, guaninowy, tyminowy i cytozynowy)
<b>ddNTPs</b>	dideoksynukleotydy (adeninowy, guaninowy, tyminowy i cytozynowy)
<b>EDTA</b>	kwasy etylenodiaminotetraoctowy ( <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
<b>G</b>	guanina
<b>KHCO<sub>3</sub></b>	wodorowęglan potasu
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	chlorek magnezu
<b>NaCl</b>	chlorek sodu
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	chlorek amonu
<b>RBC</b>	bufor do lizy erytrocytów ( <i>red blood cell lysis buffer</i> )
<b>SDS</b>	dodecylosiarczan sodu ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
<b>T</b>	tymina
<b>TAE</b>	bufor do elektroforezy z kwasem octowym ( <i>Tris – acetate – EDTA</i> )
<b>TBE</b>	bufor do elektroforezy z kwasem bornym ( <i>Tris – borate – EDTA</i> )
<b>TRIS</b>	2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol

**1.3. Symbole aminokwasów.**

<b>A (Ala)</b>	alanina	<b>M (Met)</b>	metionina
<b>C (Cys)</b>	cysteina	<b>N (Asn)</b>	asparagina
<b>D (Asp)</b>	kwasy asparaginowy	<b>P (Pro)</b>	prolina
<b>E (Glu)</b>	kwasy glutaminowy	<b>Q (Gln)</b>	glutamina
<b>F (Phe)</b>	fenyloalanina	<b>R (Arg)</b>	arginina
<b>G (Gly)</b>	glicyna	<b>S (Ser)</b>	seryna
<b>H (His)</b>	histydyna	<b>T (Thr)</b>	treonina
<b>I (Ile)</b>	izoleucyna	<b>V (Val)</b>	walina
<b>K (Lys)</b>	lizyna	<b>W (Trp)</b>	tryptofan
<b>L (Leu)</b>	leucyna	<b>Y (Tyr)</b>	tyrozyna

**1.4. Geny i białka.**

<b>BRCA1</b>	gen podatności na raka piersi 1 ( <i>breast cancer 1</i> )
<b>BRCA2</b>	gen podatności na raka piersi 2 ( <i>breast cancer 2</i> )
<b>BSA</b>	albumina surowicza ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CTCF</b>	białko uczestniczące w regulacji transkrypcji ( <i>CCCTC-binding transcriptional insulator protein</i> )
<b>ESCO (1-2)</b>	geny kodujące białka z rodziny EFO ( <i>establishment of cohesion</i> ), uczestniczące w utrzymaniu kohezji, wyróżnia się kilka rodzajów, homolog <i>Eso, Eco1</i>
<b>ESPL1</b>	gen kodujący białko septynę, homolog <i>Esp1, Cut1, Sse</i>
<b>GDNF</b>	gen kodujący glijopochodny czynnik wzrostu nerwów
<b>HDAC (1-4)</b>	deacetylazy histonowe, wyróżnia się kilka rodzajów
<b>HP-1</b>	białko modelujące chromatynę ( <i>heterochromatin protein 1</i> )
<b>LDLR</b>	gen kodujący receptor LDL
<b>MAU2</b>	gen kodujący białko MAU2 (hSCC4) biorące udział w regulacji kohezji, homolog <i>Sccl4, Ssl3</i>
<b>MRE11</b>	białko zaangażowane w naprawę podwójnych pęknięć DNA, wchodzi w skład kompleksu MRN z nibryną i RAD50
<b>NBS1</b>	białko nibryna zaangażowane w naprawę podwójnych pęknięć DNA, wchodzi w skład kompleksu MRN z białkiem MRE11 i RAD50
<b>NF1</b>	gen supresorowy, kodujący neurofibrominę
<b>NIPBL</b>	gen kodujący delanginę (NIPBL - białko nipped-B-like), homolog <i>Sccl2, Mis4, Nipped-B</i>
<b>NUP155</b>	gen kodujący nukleoporynę o masie cząsteczkowej 155kDa
<b>PAPP-A</b>	osoczowe białko ciążowe A ( <b>A-Pregnancy Associated Plasma Protein</b> )
<b>PDS5</b>	gen kodujący białko PDS5 biorące udział w regulacji kohezji ( <i>precocious dissociated of sister 5</i> )
<b>PLK1</b>	gen kodujący kinazę PLK1 uczestniczącą w usuwaniu kohezji, ( <i>polo-like kinase 1</i> ) homolog <i>Sdc5, Plo1, Polo</i>

<b>PTTG</b>	gen kodujący białko sekuryne, homolog <i>Pds1, Cut2, Pim</i>
<b>RAD21</b>	gen kodujący białko z rodziny kleizyn ( <b>radiation sensitive 21</b> ), homolog <i>Scs1, Mcd1</i>
<b>RAD50</b>	białko zaangażowane w naprawę podwójnych pęknięć DNA, wchodzi w skład kompleksu MRN z białkiem MRE11 i nibryną
<b>SA (1-2)</b>	geny kodujące białka z rodziny stroma lin ( <b>stromal antigen</b> ), inaczej STAG, wyróżnia się kilka rodzajów, homolog <i>Irr1, Psc3</i>
<b>Scs (1-4)</b>	geny kodujące różne białka zaangażowane w kohezję ( <b>sister chromatid cohesion</b> )
<b>SLC1A3</b>	gen kodujący białko z rodziny EAAT - transporter glutaminianu
<b>SMC (1-6)</b>	geny kodujące białka chromosomowe odpowiedzialne za organizację i integralność chromosomów ( <b>structural maintenance of chromosomes</b> ), wyróżnia się kilka rodzajów białek
<b>SR</b>	białka regulujące proces składania mRNA ( <b>serine/arginine rich</b> )
<b>WAPL</b>	gen kodujący białko WAPAL (WAPL) biorące udział w regulacji kohezji, ( <b>wings apart-like 1</b> ) homolog <i>Rad61, Wpl1, Wapl</i>

### 1.5. Pozostałe skróty.

<b>aCGH</b>	porównawcza hybrydyzacja genomowa na mikromacierzy ( <b>array Comparative Genomic Hybridisation</b> )
<b>Alu</b>	sekwencje powtórzone, retrotranspozony
<b>CARs</b>	sekwencje bogate w AT ( <b>cohesin-associated regions</b> ) występujące u drożdży
<b>CdLS</b>	zespół Cornellii de Lange
<b>DGGE</b>	elektroforeza na żelach z gradientem czynnika denaturującego ( <b>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</b> )
<b>DHPLC</b>	denaturacyjna wysokosprawnościowa chromatografia cieczowa ( <b>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</b> )
<b>DSB</b>	pęknięcia obu nici DNA ( <b>Double-Strand Break</b> )

<b>ESE</b>	sekwencje wzmacniające proces składania mRNA zlokalizowane w eksonach ( <i>Exonic Splicing Enhancer</i> )
<b>ESS</b>	sekwencje osłabiające proces składania mRNA zlokalizowane w eksonach ( <i>Exonic Splicing Silencer</i> )
<b>FISH</b>	fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> ( <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> )
<b>FoSTeS</b>	opóźnienie widełek replikacyjnych z zamianą nici matrycowej ( <i>Fork Stalling and Template Switching</i> )
<b>GLN</b>	rejon białka NIPBL bogaty w glutaminę
<b>HA</b>	analiza heterodupleksów ( <i>Heteroduplex Analysis</i> )
<b>HEAT</b>	domeny delanginy zbudowane z wielokrotnych powtórzeń aminokwasów (37 – 42) odpowiedzialne za interakcje z różnymi białkami ( <i>Huntington, Elongation factor3, the PR65/A subunit of PP2A and the lipid kinase Tor</i> )
<b>HRM</b>	denaturacja DNA z wysoką rozdzielczością ( <i>High Resolution Melting</i> )
<b>ISE</b>	sekwencje wzmacniające proces składania mRNA zlokalizowane w intronach ( <i>Intronic Splicing Enhancer</i> )
<b>ISS</b>	sekwencje osłabiające proces składania mRNA zlokalizowane w intronach ( <i>Intronic Splicing Silencer</i> )
<b>LCLs</b>	linie komórkowe wyprowadzone z limfoblastów ( <i>Lymphoblastoid Cell Lines</i> )
<b>LCRs</b>	wysoce homologiczne sekwencje repetytywne ( <i>Low Copy Repeats</i> )
<b>LINE</b>	długie rozproszone sekwencje jądrowe ( <i>Long Interspersed Nuclear Element</i> )
<b>m. ż.</b>	miesiąc życia
<b>MLPA</b>	zależna od ligazy reakcja łańcuchowa polimerazy ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> )
<b>NAHR</b>	niealleliczna rekombinacja homologiczna ( <i>Non-Allelic Homologous Recombination</i> )
<b>NHEJ</b>	niehomologiczne łączenie końców ( <i>Non-Homologous End-Joining</i> )
<b>NLS</b>	domena odpowiedzialna za prawidłowy transport przez błonę jądrową ( <i>Nucleus Localisation Signal</i> )
<b>NMD</b>	degradacja nieprawidłowego mRNA ( <i>Nonsense-Mediated Decay</i> )
<b>NT</b>	przezierność łańcucha karkowego – parametr oceniany w badaniu USG płodu,

	odzwierciedla obrzęk tkanki podsórnej
<b>p</b>	ramiona krótkie chromosomu
<b>PCR</b>	łańcuchowa reakcja polimerazy ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PSCS</b>	przedwczesne rozchodzenie się chromatyd siostrzanych ( <i>Precocious Sister Chromatid Separation</i> )
<b>PxVxL</b>	motyw białka NIPBL umożliwiający interakcję z białkiem HP-1
<b>pz</b>	pary zasad
<b>q</b>	ramiona długie chromosomu
<b>r. ż.</b>	rok życia
<b>RPA</b>	współczynnik amplifikacji sond ( <i>Ratio Probe Amplification</i> ) wykorzystywany w technice MLPA
<b>SCID</b>	ciężkie, złożone niedobory odporności ( <i>Severe Combined Immunodeficiency</i> )
<b>SD</b>	wysoce homologiczne sekwencje repetytywne ( <i>Segmental Duplication</i> )
<b>SINE</b>	krótkie rozproszone sekwencje jądrowe ( <i>Short Interspersed Nuclear Element</i> )
<b>SNP</b>	pojedyncza zmiana nukleotydowa ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>SSCP</b>	analiza konformacji pojedynczych nici DNA ( <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> )
<b>ter</b>	końcowa część ramion chromosomu ( <i>terminal</i> )
<b>USG</b>	badanie ultrasonograficzne - nieinwazyjna, metoda diagnostyczna

## **2. STRESZCZENIE**

Zespół Cornelia de Lange (OMIM 122470) jest rzadkim schorzeniem genetycznym uszkadzającym wiele narządów i charakteryzującym się przewlekłym przebiegiem klinicznym. Do najważniejszych objawów klinicznych zalicza się specyficzny wygląd twarzy, prenatalne i postnatalne zahamowanie wzrostu, malformację kończyn - głównie górnych, hirsutyzm oraz opóźnienie rozwoju psychomotorycznego. Zróżnicowana ekspresja cech pozwala wyróżnić podtypy zespołu – postać klasyczną z wyraźniej zaznaczonymi wadami rozwojowymi oraz postać łagodną.

Podłożem molekularnym CdLS są zaburzenia w funkcjonowaniu kompleksu kohezyny, dlatego schorzenie to określane jest jako kohezynopatia. Podstawową funkcją tego kompleksu jest kontrolowanie segregacji chromosomów do komórek potomnych. Ponadto kohezyna uczestniczy w regulacji ekspresji genów oraz w naprawie pęknięć DNA. Dysfunkcja kompleksu, powodująca wystąpienie zespołu CdLS, powodowana jest najczęściej przez mutacje w genie *NIPBL*. Produkt tego genu (białko delangina) reguluje przyłączanie się kohezyny do chromatyd. Gen *NIPBL* jest zlokalizowany w ramionach krótkich chromosomu 5 i składa się z 47 eksonów. Innymi czynnikami zaburzającymi funkcje kohezyny są mutacje w genach *SMC1* i *SMC3*, które kodują składowe rdzenia kompleksu.

Celem badań było określenie częstości oraz rodzaju mutacji punktowych genu *NIPBL* u 70 niespokrewnionych chorych z CdLS. Pacjenci do badań zakwalifikowani zostali na podstawie rozpoznania klinicznego - u 32 osób stwierdzono postać klasyczną zespołu, a u 38 postać łagodną. Kolejnym celem projektu było zidentyfikowanie dużych rearanżacji genomowych (delekcji i/lub duplikacji eksonów) obejmujących gen *NIPBL*.

Poszukiwania mutacji punktowych przeprowadzono w sekwencji kodującej genu korzystając z dwóch technik: DHPLC oraz sekwencjonowania. Natomiast duże rearanżacje obejmujące gen *NIPBL* były analizowane za pomocą techniki MLPA, a następnie potwierdzane poprzez CGH do mikromacierzy.

Wykazano, że mutacje genu *NIPBL* znamienne częściej występują u pacjentów z klasycznym fenotypem CdLS – zidentyfikowano je u 62% chorych w tej podgrupie. Pośród chorych z łagodną postacią CdLS mutacje stwierdzono jedynie u 21%

pacjentów. W sumie wykryto 26 różnych mutacji punktowych, wśród których było 15 mutacji zmiany sensu (n=15/26; 58%), pięć delecji (19%), trzy mutacje typu *splice site* (~11%), dwie mutacje nonsensowne (~8%) oraz jedna duplikacja (~4%). Wykazano, że mutacje powodujące skrócenie białka występują jedynie u chorych z klasycznym fenotypem zespołu. Ogólna częstość mutacji punktowych wynosi 37% i jest zbliżona do częstości wykazywanych w innych populacjach. Większość mutacji punktowych opisano po raz pierwszy.

W celu scharakteryzowania zidentyfikowanych substytucji nukleotydowych przeprowadzono badania kosegregacyjne. Potwierdziły one iż zmiany te powstały *de novo* u pacjentów z CdLS i mogą być przyczyną zaburzeń rozwojowych.

Analiza dużych rearanżacji genu *NIPBL* za pomocą techniki MLPA została przeprowadzona w grupie 44 chorych z wykluczoną wcześniej mutacją punktową tego genu. U dwóch pacjentów z klasycznym fenotypem CdLS stwierdzono utratę całego allelu. Weryfikacja tych zmian z wykorzystaniem aCGH wykazała, że są to mikrodelecje chromosomu 5-go. Pierwsza z delecji obejmowała obszar około 1,7Mpz, w którym obok genu *NIPBL* zlokalizowane są geny: *SLC1A3*, *FLJ1323*, *NUP155*, *WDR70* oraz *GDNF*. Druga delecja, wielkości ok. 0,65Mpz, obejmowała wraz z *NIPBL* trzy geny (*FLJ1323*, *NUP155* i część *WDR70*). Wyniki tych badań potwierdzają niską częstość dużych rearanżacji genomowych z udziałem *NIPBL* u chorych z CdLS.

## **2.1. ABSTRACT**

Cornelia de Lange Syndrome (OMIM 122470) is a rare, genetic, systemic developmental disorder, characterized by a chronic clinical outcome. The major clinical manifestations include a characteristic facial appearance, prenatal and postnatal growth retardation, malformations of limbs - mainly the upper ones, hirsutism, and psychomotor retardation. The diverse expression features can allow to differentiate CdLS subtypes into the mild form and the classical one, with clearly marked malformations.

CdLS is caused by an abnormal function of the cohesin complex so it is often defined as a cohesinopathy. The primary function of this complex is to regulate chromosome segregation during cell division. The cohesin is also implicated in gene expression regulation and DNA repair. The dysfunction of this complex, expressed in human as CdLS, is most often caused by mutations in the *NIPBL* gene. The product of the *NIPBL* gene (delangine protein) regulates the attachment of cohesin to chromatids. Other factors which disturb the function of cohesin are the mutations in *SMC1* and *SMC3* genes, which encodes the core proteins of the complex.

The aim of this study was to determine the prevalence and spectrum of the point mutations within the *NIPBL* gene among 70 unrelated CdLS patients, of whom 32 subjects were diagnosed with a classical form, while 38 were diagnosed with a mild form of the disease. Further, it was to identify large genomic rearrangements (deletion/ duplications of exons) within the *NIPBL* gene.

Screening for point mutations was carried out using a combination of two techniques: DHPLC and DNA sequencing, while searching for large rearrangements was performed using the MLPA technique followed by microarray CGH analyses.

The mutations within the *NIPBL* gene were significantly more common among the patients with the classical CdLS phenotype as compared to the patients with mild CdLS phenotype (62% vs. 21% of patients were the mutation carriers, respectively).

The analyses of the *NIPBL* gene sequence showed 26 point mutations: 15 missense mutations (n=15/26; 58%), five deletions (19%), three splice site (~ 11%), two nonsense mutations (~ 8%) and one duplication (~ 4%). It has been shown that mutations which result in a truncated protein product occur only in the patients with the classical phenotype. The frequency of point mutations in the examined group was

37% and was comparable to the frequency reported in other populations. It should be noted that most of the point mutations within the *NIPBL* gene has been reported for the first time.

In order to further characterize the substitutions, cosegregation analyses have been done. They confirmed that the nucleotide sequence changes within the *NIPBL* gene arose *de novo* in CdLS patients.

The analysis of large rearrangements within the *NIPBL* gene was performed using MLPA in the group of 44 patients, who did not carry the point mutations within the *NIPBL* gene. Two cases of deletion of the entire *NIPBL* gene have been found. The exact size of the deletions were confirmed by microarray CGH. The first deleted region consists of approximately 1.7Mb and encompasses six genes: *SLC1A3*, *NIPBL*, *FLJ1323*, *NUP155*, *WDR70*, and *GDNF*. The second deleted region is about 0.65Mb and includes the *NIPBL*, *FLJ1323*, *NUP155* and part of *WDR70* gene. Those results confirm the low prevalence of large genomic rearrangements within the *NIPBL* gene among the CdLS patients.

### **3. WSTĘP**

#### **3.1. Zespół Cornellii de Lange.**

Wśród wielu chorób uwarunkowanych genetycznie wyróżnia się tak zwane rzadkie zespoły genetyczne. Charakteryzują się one bardzo niską częstością występowania oraz przeważnie przewlekłym i ciężkim klinicznie przebiegiem. Do takich zespołów chorobowych zalicza się zespół Cornellii de Lange (CdLS; OMIM 122470), w którym obserwuje się zaburzenia dotyczące wielu narządów chorego. Fenotyp pacjentów z CdLS jest bardzo charakterystyczny, choć wykazuje różnorodną ekspresję. Częstość występowania CdLS oblicza się od 1:10.000 do 1:50.000, a większość przypadków występuje sporadycznie, ale znane są również przypadki rodzinnego występowania tej choroby [Beck 1976, Barisic i wsp. 2008]. Pierwszy znany medyczny opis przypadku, którego cechy odpowiadałyby ciężkiej postaci CdLS został dokonany przez holenderskiego anatoma i patologa Willema Vrolika w połowie XIX wieku.

Zespół ten głównie rozpoznawany jest na podstawie specyficznego wyglądu twarzy, najczęściej zaraz po urodzeniu, lub w przeciągu pierwszych tygodni życia. Charakteryzuje się prenatalnym i postnatalnym zahamowaniem wzrostu, malformacją kończyn górnych, hirsutyzmem, opóźnieniem rozwoju psychomotorycznego oraz wadami wielu narządów. Jednak stopień nasilenia tych cech u pacjentów jest różny i waha się od stosunkowo umiarkowanych do poważnych, dzięki czemu wyróżnia się dwie postaci kliniczne - łagodną i ciężką (tzw.: klasyczną). Różnorodność tę można zauważyć już w pierwszych opisach zespołu. W 1933 r. holenderska pediatra Cornelia de Lange w dosyć krótkim odstępie czasu zbadała dwie, niespokrewnione ze sobą dziewczynki (w 6 i 17 m. życia), które trafiły do szpitala z powodu choroby płuc. U obu stwierdzono także problemy z przyjmowaniem pokarmu, mikrocefalię, opóźnienie wzrostu i rozwoju. Miały one również bardzo charakterystyczne rysy twarzy, przez które były bardziej podobne do siebie nawzajem, niż do innych członków swoich rodzin. Dzięki tym pacjentkom C. de Lange scharakteryzowała zespół znany dziś pod jej nazwiskiem. Jednak wcześniejszy opis fenotypu odpowiadający CdLS został dokonany przez niemieckiego lekarza Winfrieda Brachmanna w 1916 r. i dotyczył przypadku ciężko chorego noworodka. W swoim raporcie Brachmann skupił się jednak na zaobserwowanych malformacjach kończyn, a cechy budowy twarzy

scharakteryzował mniej dokładnie. Dopiero w latach 80-tych ubiegłego wieku zorientowano się, że opis ten odpowiada ciężkiej postaci CdLS i od tego czasu w literaturze niekiedy stosowana jest nazwa zespół Brachmann – de Lange [Opitz 1985].

### 3.1.1. Kliniczna charakterystyka zespołu Cornellii de Lange.

Zespół Cornellii de Lange występuje rzadko, ale jest dobrze scharakteryzowany klinicznie. Jego występowanie szacowane jest na 1:10.000 do 1:50.000, ale prawdopodobnie częstość jest wyższa, co potwierdzone jest przez coraz powszechniejsze rozpoznawanie zespołu u pacjentów o mniejszej ekspresji cech fenotypowych. Zespół diagnozuje się z porównywalną częstością u obu płci. Wyróżnia się dwie postaci kliniczne zespołu: klasyczną - łatwiej rozpoznawalną, z większymi wadami rozwojowymi i o ciężkim przebiegu oraz łagodną – trudną do rozpoznania ze względu na mniejszą ekspresję objawów chorobowych. Niekiedy wyróżnia się postać umiarkowaną o cechach pośrednich. Wydaje się, że nieprawidłowości dotyczą wszystkich narządów, jednak największe zaburzenia obserwuje się w budowie twarzoczaszki, przewodu pokarmowego i mięśniowo-szkieletowego oraz układu nerwowego. Charakterystyczny fenotyp chorego powoduje, że prawidłowa diagnoza zespołu stawiana jest często już w niemowlęctwie. Do specyficznych objawów zalicza się małą masę urodzeniową, mikrocefalię, nadmierne owłosienie głowy i tułowia (*hirsutism*), łukowato wygięte i zrosnięte brwi (*synophrys*), długie rzęsy, cofniętą małą żuchwę oraz malformacje kończyn (najczęściej górnych). Jednak wraz z wiekiem fenotyp się zmienia, co może utrudniać prawidłowe rozpoznanie, szczególnie w przypadku niewystępowania wad kończyn [Oliso i wsp. 2009, Wierzbę i wsp. 2010].

Proporcjonalne zmniejszenie rozmiarów ciała występujące w ciągu całego życia pacjenta można zauważyć już podczas badań prenatalnych wykonywanych za pomocą ultrasonografii, w których stwierdza się także nieprawidłowości w przezierności karkowej (NT). Wykazuje się także obniżone stężenie białka PAPP-A. Należy jednak pamiętać, że są to cechy obserwowane także przy innych anomaliach płodów [Arbuzova i wsp. 2003]. Jak do tej pory nie są znane żadne biochemiczne wskaźniki pozwalające na wykrycie CdLS w okresie prenatalnym [Kline 2010]. W badaniach USG stwierdza się nieprawidłowości kostne dotyczące głównie przedramion, dłoni oraz

czaszki, a także obserwuje się obniżoną ruchliwość płodu [Chong i wsp. 2009, Kanellopoulos i wsp. 2011]. Diagnozowane są również nieprawidłowości w budowie serca oraz przepuklina przepony [Pajkrt i wsp. 2010]. Co istotne w dużej części przypadków żywo urodzonych noworodków z CdLS, wcześniejsze badania ultrasonograficzne płodów nie wskazywały żadnych nieprawidłowości. Wraz z rozwojem technik diagnostycznych wzrasta precyzja tych badań, trwają także prace nad udoskonaleniem schematów postępowania w przypadku zauważenia mikrocefalii, czy zahamowania wzrostu wewnątrzmacicznego [Barisic i wsp. 2008, Pajkrt i wsp. 2010].

Średnia waga, wzrost oraz obwód głowy w momencie urodzenia najczęściej nie przekraczają dziesiątego centyla (odpowiednio 2,3kg, 45,5cm i 30,9cm) [Kline i wsp. 2007a, Oliver i wsp. 2010]. Istnieje korelacja pomiędzy mniejszą wagą urodzeniową a cięższą postacią zespołu [Barisic i wsp. 2008]. We wzrastaniu i dojrzewaniu niemowląt z CdLS nie zauważa się istotnych zaburzeń, jednak proces rozwoju przebiega zawsze znacznie wolniej niż u dzieci zdrowych i we wczesnym dzieciństwie wszystkie parametry klasyfikowane są poniżej piątego centyla. Aby kontrolować przebieg rozwoju pacjentów stworzono specjalne siatki centylowe [Kline i wsp. 1993]. Ostateczne wartości wzrostu i wagi osiągane przez chorych to odpowiednio 130 - 160cm, oraz 30 - 48kg. Natomiast obwód głowy nie przekracza zazwyczaj 49cm, co pozwala na stwierdzenie proporcjonalnej mikrocefalii [Kline i wsp. 2007a].

Rysy twarzy są najbardziej charakterystycznymi cechami obserwowanymi u pacjentów. Nadmierne ciemne owłosienie głowy z nisko schodzącą linią włosów, łukowate brwi, *synophrys*, długie i gęste rzęsy są wyróżnikami łatwo zauważalnymi w pierwszym okresie życia i ułatwiającymi postawienie prawidłowej diagnozy [Kline i wsp. 2007a, Liu i wsp. 2009a]. Twarzoczaszka u chorych jest spłaszczona i wraz z nisko osadzonymi, charakterystycznymi małżowinami usznymi [Hunter i wsp. 2009] oraz cofniętą niewielką żuchwą jest kolejną cechą pozwalającą na rozpoznanie zespołu. Zrośnięte brwi bardzo często zachodzące na grzbiet nosa stwierdza się u 98% pacjentów, a długie i nadmiernie podkręcone rzęsy, często wyrastające w dwóch rzędach, u 99%. Małżowiny uszne nie tylko są nieprawidłowo osadzone, ale także dysplastyczne ze zwężonymi kanałami słuchowymi. U 85% chorych nos jest krótki z szerokim grzbietem i zadartymi nozdrzami, a rynienka podnosowa (*philtrum*) jest

wydatna i długa. Dodatkowymi cechami, obserwowanymi u 94% noworodków, są cienkie górne wargi, których kąciki często wygięte są ku dołowi. Ponadto, u co najmniej 80% dzieci występują szeroko rozstawione zęby i wysokie podniebienie [Kline i wsp. 2007a]. Noworodki mogą charakteryzować się także niebieskawym przebarwieniem skóry w okolicy nosa i ust, a u 75% z nich stwierdza się obniżoną tonację płaczu [Jackson i wsp. 1993].

W rozpoznaniu zespołu pomóc mogą również zmiany dotyczące kończyn. W co najmniej jednej trzeciej przypadków obserwuje się ciężkie wady rozwojowe rąk. Malformacje te mogą występować z różnym stopniem nasilenia - od oligodaktylii do fokomelii. Znaczne uszkodzenia kończyny górnej występują częściej u pacjentów płci męskiej oraz u noworodków o mniejszej wadze urodzeniowej [Barisic i wsp. 2008]. U 90% pacjentów z zachowanymi kończynami obserwuje się małe dłonie. Zmianom tym towarzyszyć może nieproporcjonalne skrócenie pierwszej kości śródreżca wraz z proksymalnym ustawieniem kciuków. Innymi stwierdzanymi zaburzeniami są brachydaktylia oraz klinodaktylia piątego palca. Nieprawidłowości kończyn dolnych są znacznie rzadsze, nie mniej u części pacjentów stopy również są małe, niekiedy z syndaktylią drugiego i trzeciego palca [Kline i wsp. 2007a]. W małej grupie chorych obserwowano nieproporcjonalne skrócenie obu lub jednej kończyny dolnej [Barisic i wsp. 2008]. Dodatkowymi zmianami jakie występują w układzie szkieletowym są zaburzenia takie jak skolioza, kifoza kręgosłupa bądź osteoporoza [Kline 2010].

Do najczęściej obserwowanych (90% chorych) zaburzeń przewodu pokarmowego zalicza się refluks żołądkowo-przełykowy. W wielu przypadkach wymaga on interwencji chirurgicznej, nie mniej komplikacje wynikające z tej anomalii są częstą przyczyną zgonów wśród chorych. U pacjentów stwierdza się też zwiększone ryzyko powstania przełyku Barretta lub zapalenia woreczka żółciowego. Rozpoznaje się także przypadki przepukliny przepony oraz nieprawidłowości w budowie jelit [Kline i wsp. 2007a]. U 40% chorych obserwuje się zmniejszoną perystaltykę jelit, czemu często towarzyszą zaparcia [Kline 2010]. Jedna czwarta pacjentów ma wady serca, najczęściej jest to defekt przegrody międzykomorowej lub przedsionkowej, choć zmiany mogą być różnorodne. Jednak tylko niewielki odsetek pacjentów wymaga operacji kardiologicznej. Kolejne nieprawidłowości, występujące u 15 - 40% chorych, dotyczą układu moczowo-płciowego i odnoszą się głównie do zaburzeń w budowie

nerek lub moczowodów. Skutkuje to obniżeniem wydolności nerek oraz refluksem moczowodowym [Selicorni i wsp. 2005, Barisic i wsp. 2008]. Rozwój gonad także jest zaburzony, zarówno u mężczyzn jak i u kobiet. Dojrzewanie płciowe rozpoczyna się zwykle później niż u osób zdrowych (ok. 14 - 15 r.ż.), a osoby z lżejszą postacią zespołu często są płodne i mogą mieć potomstwo [Kline i wsp. 2007b]. U wielu chorych występują anomalie oczu, gdzie opadanie powiek wraz z nieprawidłowościami w układzie rzęs i niedrożnymi kanałami łzowymi prowadzi do zapalenia powiek, spojówek czy rogówki, w następstwie czego w skrajnych przypadkach dojść może do odklejenia siatkówki [Kline 2010]. Wśród pacjentów powszechnie występuje krótkowzroczność. Często obserwuje się także zapalenia ucha oraz, nasilające się z wiekiem chorych, zapalenia zatok, które prawdopodobnie są wynikiem nieprawidłowości w ich budowie.

Kontakt z wieloma pacjentami jest bardzo utrudniony, co wynika zarówno z niepełnosprawności intelektualnej jak i powszechnej głuchoty (występującej u 60% chorych), z którą powiązane prawdopodobnie jest upośledzenie mowy [Kline i wsp. 2007a]. Szczególnie osoby z klasyczną postacią zespołu mają mały zasób słów, o ile nie posługują się tylko nieartykułowanymi dźwiękami, co wymusza na opiekunach rozwinięcie pozawerbalnego sposobu porozumiewania się. Jednak spora grupa pacjentów z łagodną postacią schorzenia porozumiewa się normalnie.

W okresie noworodkowym zdarzają się problemy oddechowe z towarzyszącymi infekcjami dróg oddechowych. Innymi komplikacjami są trudności z przyjmowaniem pokarmu - u około połowy pacjentów z ciężką postacią zespołu występuje upośledzenie odruchu ssania [Oliver i wsp. 2010]. U pacjentów zdarzają się także zakłócenia snu o niewyjaśnionym podłożu [Kline 2010, Stavinoha i wsp. 2011] – chorym czasami wystarczają dwie lub trzy godziny snu na dobę, znane są też przypadki gdy chorzy nie śpią przez kilka dni. Występują zaburzenia neurologiczne i behawioralne, do których można zaliczyć nadpobudliwość, obniżenie koncentracji, zaburzenia kompulsywne lub stany lękowe [Basile i wsp. 2007]. Co najmniej połowa pacjentów ma zdiagnozowane nieprawidłowe napięcie mięśniowe przejawiające się przeważnie jego wzrostem, choć stwierdza się także jego obniżenie.

Nierzadko u osób z CdLS wykrywa się padaczkę, ale nieprawidłowości w budowie mózgu nie są powszechne [Kline i wsp. 2007a]. W wielu przypadkach

chorzy przejawiają zachowania autystyczne, dochodzi nawet do samookaleczeń [Oliver i wsp. 2009]. Większość z tych zmian nasila się wraz z wiekiem pacjenta i stanowi istotny problem dla opiekunów. U ponad połowy chorych stwierdza się znaczną niepełnosprawność intelektualną (średni stopień IQ osiągany przez pacjentów to 53), a tylko u około 8%, z łagodną postacią zespołu, iloraz inteligencji jest zbliżony do normy [Deardorff i wsp. 2006, Kline 2010].

Dzięki wieloletnim obserwacjom i zgromadzonym danym opracowano kryteria diagnostyczne ułatwiające prawidłowe zdiagnozowanie schorzenia (Tab. 1) oraz system punktów służący do odpowiedniego sklasyfikowania postaci zespołu (Tab. 2).

Tab. 1. Kryteria diagnostyczne stosowane przy rozpoznaniu zespołu Cornellii de Lange [Kline i wsp.2007a].

cecha	podstawowe kryterium	oraz	dodatkowe kryteria
<b>rysy twarzy</b>	<i>Synophrys</i>	≥3	długie rzęsy krótki nos z zadartymi nozdrzami długie i wydatne <i>philtrum</i> szeroki i zapadnięty grzbiet nosa mały podbródek wąska górna warga z kącikami skierowanymi ku dołowi wysokie podniebienie szeroko rozstawione zęby, bądź ich brak
<b>rozmiary ciała</b>	≥2 waga poniżej 5 centyla wzrost poniżej 5 centyla obwód głowy poniżej 2 centyla (odpowiednich dla wieku)		
<b>rozwój</b>	≥1 opóźnienie umysłowe problemy z nauką		
<b>zachowanie</b>	≥2 braki koncentracji z nadpobudliwością zachowania obsesyjno-kompulsywne niepokój agresja samookaleczenie ekstremalna nieśmiałość bądź wycofanie cechy autyzmu		

<b>ukł. mięśniowo- szkieletowy</b>	<p>brak przedramienia</p> <p>lub</p> <p>oligodaktylia lub małe dłonie i stopy</p> <p>lub</p> <p>żadne z powyższych</p>	<p>≥2</p> <p>≥3</p>	<p>-</p> <p>klinodaktylia 5 palca nieprawidłowo umiejscowiony kciuk ograniczenie ruchomości stawu łokciowego</p> <p>bruzda na dłoni halluks częściowa syndaktylia 2 i 3 palca skolioza lejkowata klatka piersiowa zwichnięte biodro</p>
<b>narządy zmysłów i zmiany skórne</b>	<p>≥3 opadanie powiek zwężenie kanału nosowo-łzowego krótkowzroczność pigmentacja wokół nerwu wzrokowego głuchota lub niedosłuch napady padaczkowe skóra marmurkowata hirsutyzm małe brodawki sutkowe i/ lub pępek.</p>		
<b>inne zmiany narządowe</b>	<p>≥3 przepuklina przeponowa nieprawidłowości żołądkowo jelitowe refluks żołądkowo – przełykowy rozszczip podniebienia wady serca mikropenis wnętrostwo spodziectwo wady nerek lub moczowodów.</p>		

Tab. 2. System punktów określający postać zespołu Cornellii de Lange [Kline i wsp.2007a].

kryterium	1 punkt	3 punkty	5 punktów
masa urodzeniowa	powyżej 2,5kg	2- 2,5kg	poniżej 2kg
samodzielne siedzenie	przed 9 m. ż.	między 9 a 20 m. ż.	później niż w 20 m. ż.
samodzielny chód	przed 18 m. ż.	między 18-42 m. ż.	później niż w 42 m. ż.
wypowiedzenie pierwszego słowa	przed 24 m. ż.	między 24-48 m. ż.	później niż w 48 m. ż.
wady kończyny górnej	brak	częściowe wady (obecne więcej niż 2 palce)	ciężkie wady (obecne mniej niż 2 palce)
liczba innych zaburzeń	0-1	2-3	więcej niż 3
utrata słuchu	brak	łagodna	umiarkowana- ciężka
<p>powyżej 22 punktów – postać ciężka - klasyczna  między 15 i 22 punktami – postać umiarkowana (jeżeli się ją wyróżnia)  poniżej 22 lub 15 – postać łagodna</p>			

Leczenie CdLS jest objawowe i angażuje lekarzy różnych specjalności w zależności od rodzaju i ciężkości objawów. Jest ono też utrudnione poprzez ograniczony kontakt z pacjentami z powodu ich umiarkowanej bądź znacznej niepełnosprawności intelektualnej. Wcześnie rozpoczęta terapia i indywidualne traktowanie chorych z zespołem jest niezmiernie istotne. Bardzo ważne jest wczesne wdrożenie usprawnienia ruchowego pozwalającego ograniczyć deformacje pojawiające się w wyniku nieprawidłowości w napięciu mięśniowym. Pozwala to większości chorych osiągnąć umiejętność samodzielnego poruszania się [Wierzba i wsp. 2010]. Odpowiedni dobór oddziaływań na pacjenta i metod rehabilitacji pozwala na rozwój zdolności intelektualnych pod wpływem terapii. Dzieci z lżejszą postacią zespołu wykazują duże zainteresowanie otoczeniem, chęć poznawania i bliskiego kontaktu z innymi osobami, jednak ma to miejsce tylko w przypadku braku występowania zachowań autystycznych. Chorzy z umiarkowanym opóźnieniem rozwoju psychomotorycznego mają szanse na podjęcie edukacji, jednak późniejsza integracja

ze społeczeństwem jest ograniczona [Oliosio i wsp. 2009]. Osoby z ciężką postacią zespołu są zwykle głęboko niepełnosprawne intelektualnie, ich szanse rozwoju są zatem bardzo utrudnione.

Dzięki coraz większej wiedzy na temat tego schorzenia polepsza się opieka nad chorymi a tym samym jakość i długość ich życia - pacjenci z mniejszymi defektami dożywają 50-go roku życia. Opieka nad nimi pozwala także na coraz lepsze określenie różnic fenotypowych między dziećmi a osobami dorosłymi z CdLS [Wierzba i wsp. 2010, Oliver i wsp. 2010, Rohatgi i wsp. 2010]. U wielu dorosłych chorych obserwuje się szybsze objawy starzenia niż wynikałoby to z ich wieku, czego zewnętrznym objawem jest wczesne zmniejszenie elastyczności skóry, ale podobnie przyspieszone procesy starzenia dotyczą całego organizmu [Kline 2010].

### 3.1.2 Dziedziczenie zespołu Cornellii de Lange.

Większość przypadków zespołu (99%) występuje sporadycznie, a złożoność fenotypu i uszkodzenie wielu organów sugerowała zawsze, że w patogenezę schorzenia zaangażowane jest wiele genów, lub jeden, którego produkt pełniłby rolę regulatorową [Tonkin i wsp. 2004]. Takie założenia spełnia gen *NIPBL*, który został zidentyfikowany po szczegółowych badaniach rejonu zaangażowanego w translokacje chromosomowe. Nieprawidłowości w kariotypie u pacjentów z CdLS wykrywa się rzadko, stwierdzono jednak zaangażowanie regionu 5p13 w rearanżacje chromosomowe w niektórych przypadkach CdLS. Badania tego rejonu wykazały, że zlokalizowany jest tam gen *NIPBL*, którego mutacje są najczęstszą przyczyną występowania schorzenia [Tonkin i wsp. 2004, Krantz i wsp. 2004]. Nie jest on jednak jedynym czynnikiem genetycznym powiązanim z zespołem albowiem udowodniono także, w innych rodzinach, wpływ mutacji genu *SMC1* zlokalizowanego w regionie Xp11.2 [Egemen i wsp. 2005, Musio i wsp. 2006]. W ostatnich latach wykazano też, że kolejnym czynnikiem wywołującym CdLS są mutacje genu *SMC3* (chromosom 10q25.2) [Deardorff i wsp. 2007]. Zaangażowanie tych genów najczęściej obserwuje się w sporadycznych zachorowaniach. Znane są jednak rodziny, w których zespół występuje u kilku członków [Russell i wsp. 2001, Borck i wsp. 2006, Selicorni i wsp. 2007]. Wykazano również, że jeden procent pacjentów ma rodziców z cechami tego zespołu [Deardorff i wsp. 2006]. Wyjątki te mogą wskazywać na udział innych

czynników w etiologii CdLS, aktualnie rozpatrywane jest zaangażowanie mutacji genu *PDS5* w takich rodzinach [Zhang B i wsp. 2009]. Kolejnym wyjaśnieniem rodzinnego występowania schorzenia może być, dowiedziony u kilku osób, germinalny mozaicyzm mutacji genu *NIPBL* [Niu i wsp. 2006, Weichert i wsp. 2011]. Ponadto wykazano przypadek somatycznej mozaiki mutacji *NIPBL* [Castronovo i wsp. 2010]. Nie stwierdzono zależności między wiekiem rodziców a ryzykiem wystąpienia zespołu u ich potomstwa.

### **3.2. Kompleks kohezyny.**

Prawidłowo funkcjonujące produkty powyższych genów regulują działanie bądź są składowymi tzw.: kompleksu kohezyny, który odpowiedzialny jest między innymi za segregację chromosomów. W trakcie podziału komórki eukariotycznej chromatydy siostrzane są utrzymywane w ścisłym połączeniu od czasu replikacji DNA w trakcie fazy S cyklu komórkowego, aż do metafazy w czasie podziałów komórkowych. Na początku anafazy kohezja zanika pozwalając chromosomom potomnym na rozejście się do przeciwnych biegunów wrzeciona. Prawidłowe rozdzielenie chromosomów jest istotne dla utrzymania integralności genomu, natomiast zaburzenia w segregacji mogą być przyczyną różnego rodzaju chorób genetycznych, spontanicznych poronień bądź rozwoju nowotworów [Weaver i Cleveland 2006, Weaver i wsp. 2007, Mannini i wsp. 2010b]. Początkowo uważano, że kohezja chromatyd siostrzanych wynika z lepkości chromatyny, lub interakcji między cząsteczkami DNA, jednak wyniki badań nad mutantami muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) ze specyficznymi defektami kohezji, pozwoliło na zidentyfikowanie czynników biorących aktywny udział w tym procesie [Kerrebrock i wsp. 1992, Miyazaki i Orr-Weaver 1992].

Wyniki badań prowadzonych przez ostatnie kilkanaście lat wykazały, że w kohezję chromatyd zaangażowanych jest szereg białek, z których część tworzy rdzeń kompleksu kohezyny, a inne pełnią funkcje regulatorowe. Białka zaangażowane w kohezję wpływają nie tylko na strukturalną i funkcjonalną organizację chromosomów oraz biorą udział w ich segregacji, ale także uczestniczą w naprawie DNA, regulacji transkrypcji genów i tym samym są zaangażowane w rozwój całego organizmu. Białka te są konserwowane ewolucyjnie i w wielu organizmach pełnią bardzo podobne funkcje. Ponieważ badania nad nimi były przeprowadzane z wykorzystaniem wielu

modeli biologicznych w piśmiennictwie funkcjonuje różnorodne nazewnictwo, które zostało zestawione w Tab. 3.

Tab. 3. Nazewnictwo podjednostek kompleksu kohezyny i białek regulatorowych [Strachan 2005, Onn i wsp. 2008, Feeney i wsp. 2010].

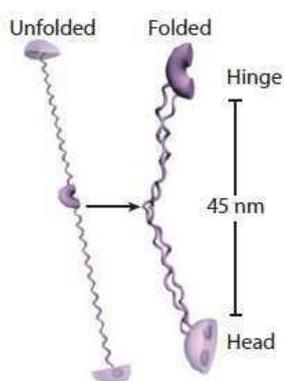
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Homo sapiens</i>
<b>Podjednostki kompleksu kohezyny</b>	Smc1	Psm1	Smc1	Smc1	SMC1
	Smc3	Psm3	Smc3	Smc3	SMC3
	Mcd1 (Scc1)	Rad21	Rad21	Rad21	RAD21 (kleizyna/ SCC1)
	Irr1 (scc3)	Psc3	Sa (stromalina)	Sa1, sa2	SA1, SA2 (stromalina, STAG1, STAG2), STAG3
<b>Białka regulatorowe</b>	Scc2	Mis4	Nipped-B	XSc2	NIPBL
	Scc4	Ssl3	Mau-2 (CG4203)	XSc4	MAU2 (hSCC4)
	Eco1 (ctf7)	Eso1	Eco (San, Deco)	XEco1, XEco2	EFO1, EFO2 (ESCO1, ESCO2)
	Pds5	Pds5	Pds5	Pds5A, pds5B	PDS5A, PDS5B
	Rad61	Wpl1	Wapl	brak danych	WAPAL (WAPL)
	Pds1	Cut2	Pim	Sekuryna	Sekuryna (PTTG)
	Esp1	Cut1	Sse	Separyna	Separyna (ESPL1)
	Sdc5	Plo1	Polo	plx1	PLK1
	Sgo1	Sgo1, Sgo2	Sgo1	x Sgo1	hSGO1

I chociaż nie wszystkie kwestie zostały dogłębnie wyjaśnione wiadomo, że w skład kompleksu wchodzi cztery podjednostki: dwa białka z rodziny SMC (*structural maintenance of chromosomes*) tworząc kolistą rdzeń kohezyny, białko RAD21 (inaczej nazywane kleizyną, lub SCC1) stabilizujące tworzący się pierścień rdzenia oraz SA (inaczej stromalina, bądź STAG), które występują w kilku wariantach

pozwalają na zróżnicowanie kompleksów kohezyny [Sumara i wsp. 2000, Losada i wsp. 2000, Canudas i Smith 2009].

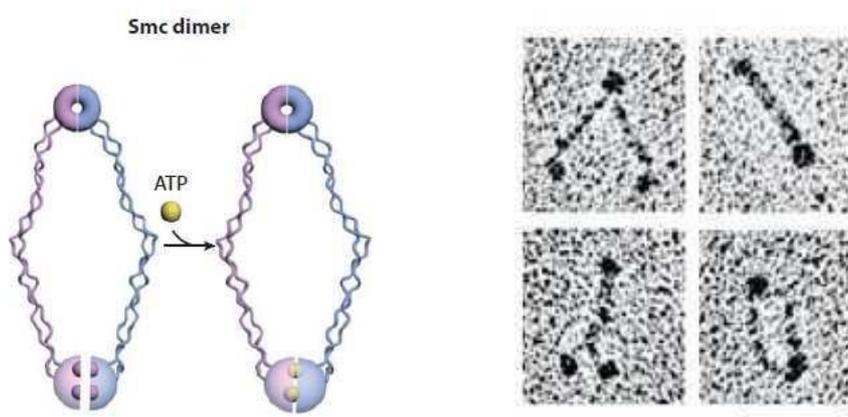
### 3.2.1. Białka z rodziny SMC (*structural maintenance of chromosomes*).

Białka z rodziny SMC, kodowane przez geny *SMC*, które zlokalizowane są w różnych chromosomach, są dużymi peptydami złożonymi z 1.000 – 1.300 aminokwasów. Charakteryzują się one unikatową budową strukturalną i pełnią rolę nie tylko w utrzymaniu organizacji chromosomów, ale wpływają także na kohezję chromatyd siostrzanych, kondensację chromosomów, naprawę i rekombinację DNA oraz ekspresję genów. Białka te pełnią podobne funkcje w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych, gdzie są aktywne zarówno w komórkach somatycznych jak i generatywnych [Jessberger 2002]. W ich specyficznej budowie można wyróżnić dwie globularne domeny na N- i C- końcu połączone długą domeną  $\alpha$ - helis, która na środku przedzielona jest domeną określaną jako zawias (*hinge domain*), prawdopodobnie umożliwiającą swobodną zmianę konformacji peptydu [Jessberger 2002]. Monomer SMC zawija się w domenie zawiasu tworząc przeciwstawnie zwiniętą domenę podwójnej helisy (*coiled-coil domain*), tym samym przybliżając do siebie domeny globularne. Dzięki ich fizycznemu przybliżeniu powstaje domena głowy (*head domain*), która zawiera połowę struktury wiążącej ATP. W domenie tej można wyróżnić trzy konserwowane, charakterystyczne dla ATPaz typu ABC, motywy: motyw Walker A, Walker B oraz motyw C [Saitoh i wsp. 1994, Hopfner i wsp. 2000]. W ostatecznie uformowanym białku domena głowy oddalona jest od domeny zawiasu o około 45 nm [Onn i wsp. 2008] (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie białka z rodziny SMC [Onn i wsp. 2008].

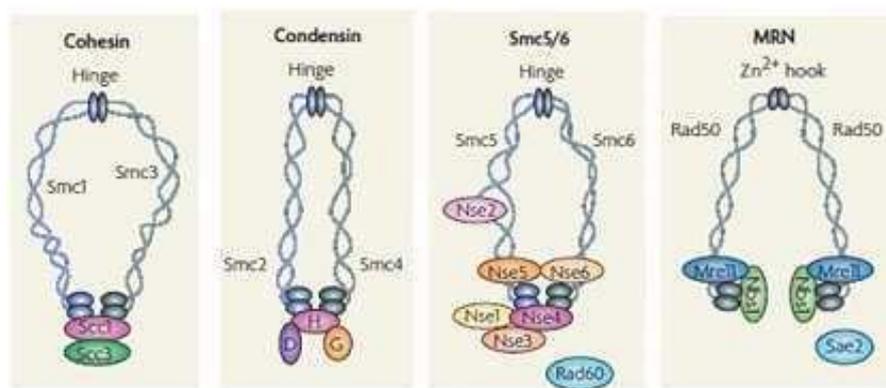
W komórkach eukariotycznych występuje sześć klas białek z rodziny SMC (SMC1 – SMC6). Wszystkie białka SMC są w stanie łączyć się w heterodimery (Ryc. 2) a współdziałając z innymi białkami formują kompleksy pośredniczące w interakcjach chromatynowych. Białka SMC klasyfikuje się na trzy podgrupy w zależności od heterodimerów jakie tworzą – SMC1 i SMC3, SMC2 i SMC4 oraz SMC5 i SMC6. Dimeryzacja zachodzi głównie dzięki hydrofobowym interakcjom między domenami zawiasu dwóch monomerów prowadząc do ukształtowania się struktury o kształcie litery V [Haering i wsp. 2002, 2004]. Poprzez oddziaływania między dwiema domenami głowy następuje zamknięcie tej struktury i tworzy się pierścień oraz powstają dwie ATPazy, których aktywność uzyskiwana jest poprzez połączenie motywów Walker jednej domeny głowy z motywem C z drugiej domeny głowy. Elastyczność heterodimerów i zmienność ich kształtów stwierdzono dzięki badaniom z użyciem mikroskopu elektronowego, gdzie zaobserwowano zarówno otwarte formy w kształcie V jak i zamknięte pierścienie [Hirano 2006].



Ryc. 2. Schematycznie przedstawienie heterodimeru białek SMC oraz zdjęcia z mikroskopu elektronowego (kreska odpowiada 50 nm) [Onn i wsp. 2008, Hirano 2006].

Dimery te stanowią podstawy wielobiałkowych kompleksów pełniących odmienne, specyficzne funkcje [Hirano 2005, 2006]. Najlepiej poznano funkcję kompleksu kohezyny o rdzeniu złożonym z SMC1 i SMC3, zaangażowanego głównie w utrzymanie spójności chromatyd siostrzanych oraz kondensyny biorącej udział w kondensacji chromosomów, w której rdzeń zbudowany jest z SMC2 i SMC4 [Jossberger 2002]. Określono także udział heterodimeru SMC5-SMC6 w kompleksie,

zbudowanym łącznie z ośmiu białek, uczestniczącym w naprawie DNA [Murray i Carr 2008]. Zidentyfikowano i inne kompleksy z rdzeniem złożonym z białek z rodziny SMC, z których część jest charakterystyczna tylko dla mejozy. Wyróżnia się ponadto białka o podobnej budowie i zbliżonych funkcjach określane jako SMC-like, czego przykładem może być białko RAD50 tworzące z białkami MRE11 i NBS1 kompleks uczestniczący w naprawie DNA [Assenmacher i Hopfner 2004]. Od białek z rodziny SMC różni go między innymi brak domeny typu zawias oraz obecność palców cynkowych.

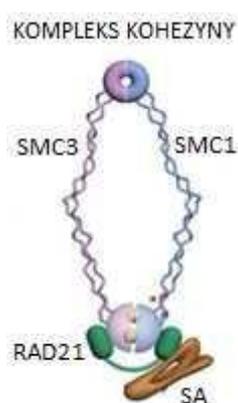


Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie kompleksów z udziałem białek SMC oraz SMC - like [Murray i Carr 2008].

### 3.2.2. Inne białka kompleksu.

Niepowiązany z chromatyną kompleks kohezyny składa się z białek z rodziny SMC tworzących rdzeń oraz stabilizujących go innych białek, z których najlepiej poznano i opisano RAD21 (*radiation sensitive 21*) należące do rodziny kleizyn. U człowieka jest ono kodowane przez gen *RAD21*, zlokalizowany w chromosomie 8 i białko to jest odpowiednikiem Scc1 (inaczej Mcd1 - *mitotic condensin subunit*) występującego u drożdży. N- koniec RAD21 łączy się z domeną głowy SMC3, natomiast C- koniec jest miejscem przyłączenia do domeny głowy SMC1 [Haering i wsp. 2002]. Dzięki temu białko to spaja rdzeń kohezyny i stabilizuje zamknięcie pierścienia. Miejsce interakcji końców N- i C- znajdują się w pobliżu kieszeni przyłączających ATP, jednak tylko zespolenie z SMC1 jest ATP zależne [Gruber i wsp. 2003, Haering i wsp. 2004]. Kleizyna w kompleksie jest miejscem cięcia przez białko ESPL1 (inaczej określane jako

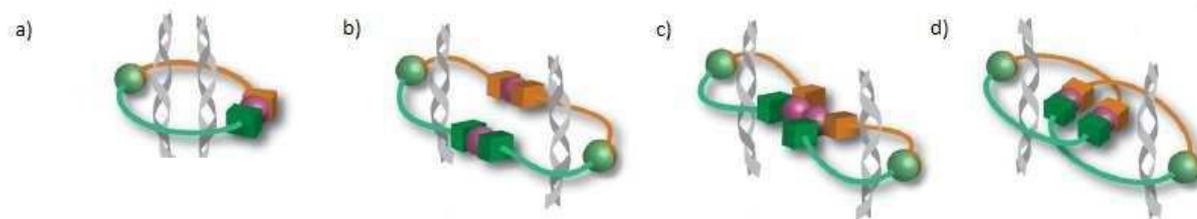
separacyjna, kodowane przez gen *ESPL1* położony w chromosomie 12), co gwarantuje oddysocjowanie kompleksu od chromatyd zezwalając im na prawidłowe rozejście się do komórek potomnych. Białko RAD21 łączy się również z czwartą składową kompleksu - jednym z wariantów proteiny SA (*stromal antigen*) określanej inaczej jako STAG (kodowanej przez geny *STAG1*, *STAG2* i *STAG3*, zlokalizowane w chromosomach 3, X i 7), będącej odpowiednikiem Scc3 u drożdży. Wykazano, że kompleks kohezyny może zawierać tylko jeden z wariantów tego białka, przy czym STAG3 ulega ekspresji tylko w komórkach germinalnych. W budowie tego czwartego elementu oprócz sekwencji HEAT (*Huntington, Elongation factor3, the PR65/A subunit of PP2A and the lipid kinase Tor*) nie wyróżnia się innych domen [Onn i wsp. 2008]. Sekwencje HEAT (zbudowane z powtórzeń 37 - 42 aminokwasów), o nie do końca wyjaśnionych funkcjach, ale odpowiedzialne za interakcje między różnymi białkami, występują także w innych białkach funkcjonalnie połączonych z kompleksem, np.: w towarzyszącym kohezji PDS5 (*precocious dissociated of sister 5*) kodowanym przez gen *PDS5* (zlokalizowany w chromosomie 4). Powtórzenia te znajdują się też w podstawowym regulatorze kohezji, delanginie (inaczej NIPBL) kodowanej przez gen *NIPBL*. Choć nie do końca wyjaśniono rolę wariantów białka SA sugeruje się, że odgrywają one istotną rolę w czasie ustanawiania kohezji w rejonie telomerów (SA1) bądź centromerów (SA2) oraz biorą udział w utrzymaniu integralności genomu. Udowodniono, że utrata funkcji przez SA1 zaburza morfologię i funkcje chromosomów [Canudas i Smith 2009].



Ryc. 4. Kompleks kohezyny. [Onn i wsp. 2008]

### 3.2.3. Zasadnicze funkcjonowanie kompleksu kohezyny.

Podstawową funkcją kompleksu kohezyny jest utrzymanie spójności chromatyd siostrzanych w komórce do momentu jej podziału. Struktura kompleksu sugeruje kilka prawdopodobnych modeli jego działania. Jako jeden z pierwszych został zaproponowany model pierścienia, bądź objęcia (*embrace*) [Gruber i wsp. 2003], gdzie jeden kompleks obejmuje równocześnie dwie chromatyd. Hydroliza ATP z domen głowy białek SMC powoduje otwarcie kolistego rdzenia umożliwiając wniknięcie chromatyd do jego wnętrza. Natomiast ponowne przyłączenie ATP zamyka pierścień a interakcja z pozostałymi podjednostkami kompleksu wzmacnia jego całość. Proces ten odbywałby się po przejściu widełek replikacyjnych [Haering i Nasmyth 2003, Nasmyth i wsp. 2005]. Wydaje się jednak, że model ten nie jest wystarczający, aby wyjaśnić w pełni udział kompleksu podczas regulacji transkrypcji czy naprawy DNA. Inny model, dwupierścieniowy, bądź „kajdanek” (*two– ring, handcuff*) [Milutinovich i Koshland 2003, Huang i wsp. 2005] zakłada, że pojedynczy kompleks jest nieaktywny, a jego struktura ulega przemianie, gdy łączy się z chromatyną. Każda z chromatyd siostrzanych otoczona jest przez jeden heterodimer SMC, natomiast aby zaszła kohezja kolistego rdzenia muszą się połączyć tworząc oligomery – poprzez interakcje między domenami zawiasu, czy przeciwstawnie zwiniętymi domenami podwójnej helisy heterodimerów, bądź poprzez białko RAD21 i SA [Onn i wsp. 2008, Zhang N i wsp. 2008]. Zdają się to potwierdzać wyniki badań wykazujące, że tylko jedno białko SA jest zaangażowane w utrzymanie połączenia między dwiema chromatydami, gdy udział pozostałych komponent jest podwójny [Zhang N i wsp. 2008]. Prawdopodobne jest, że oba modele (Ryc. 5) opisują funkcjonowanie kompleksu łączącego się z chromatyną według różnych zasad w zależności od cyklu komórkowego, budowy chromatyny, czy też pełnionych funkcji.



Ryc. 5. Modele oddziaływania kompleksu kohezyny z chromatydami:  
 a) model pierścienia, b), c) i d) modele dwupierścieniowe z różnymi  
 układami białek stabilizujących kompleks. [Feeney i wsp. 2010]

U niższych eukariota kompleks kohezyny zaczyna łączyć się z DNA pod koniec fazy  $G_1$ , natomiast w komórkach ssaków obserwuje się przyłączenie podczas telofazy poprzedniego cyklu. Wykazano coraz silniejszą interakcję kompleksu z chromatyną w trakcie przejść faz cyklu komórkowego z  $G_1$  poprzez S do metafazy [Gerlich. i wsp. 2006] oraz, że w procesie tym niezbędna jest hydroliza ATP [Weitzer i wsp. 2003, Arumugam i wsp. 2003]. Rozmieszczenie kohezyny nie jest równomierne - w okolicach centromerów obserwuje się większe zagęszczenie kompleksu, niż wzdłuż ramion chromosomów, gdzie lokalizuje się głównie w sekwencjach bogatych w AT, w drożdżach określanych jako CARs (*cohesin-associated regions*). Rozpoczęcie kohezji jest ściśle regulowane poprzez, tworzące dwuskładnikowy kompleks, białka będące odpowiednikiem drożdżowych Scc2 (NIPBL u człowieka) i Scc4 (hSCC4 lub MAU2) [Ciosk i wsp. 2000, Watrin i wsp. 2006, Skibbens 2008]. Pomimo, że nie wszystkie aspekty zostały dogłębnie zbadane wydaje się, że białko Scc2 krótkotrwale oddziałuje na kohezynę powodując hydrolizę ATP, co przyczynia się do otwarcia heterodimeru SMC, bądź oddzielenia od niego podjednostki Scc1 (RAD21) umożliwiając tym wniknięcie helisy DNA do pierścienia [Arumugam i wsp. 2003]. Inna z hipotez zakłada, że białka Scc2-Scc4 pierwotnie lokują się na chromatynie, do nich przyłącza się Smc1, a to stanowi sygnał do dopełnienia całego kompleksu kohezyny [Skibbens 2008]. W większości przypadków kohezja zależna jest od obecności Scc2-Scc4, istnieją jednak przykłady wskazujące, że proces ten może odbyć się bez udziału tych białek. Na przykładzie komórek człowieka udowodniono oddysocjowanie kompleksu NIPBL-hSCC4 od chromosomów w trakcie mitozy [Watrin i wsp. 2006], co powinno zahamowywać ponowne przyłączenie kohezyny aż do telofazy. Obserwuje się jednak w czasie wczesnej anafazy powtórny kohezję w centromerach, co sugeruje

alternatywny, choć nie wyjaśniony jeszcze, mechanizm jej ustanawiania [Ocampo-Hafalla i wsp. 2007]. Być może jest on specyficzny tylko dla tego etapu cyklu komórkowego.

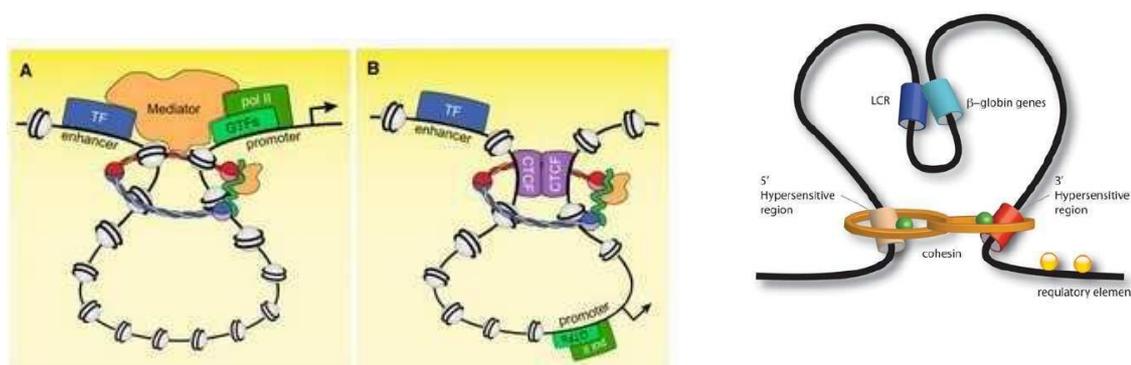
Zapewnienie i utrzymanie kohezji jest zależne między innymi od obecności acetylotransferazy Eco1 (*establishment of cohesion 1*) (EFO1 i 2 u człowieka) - białka wchodzącego również w interakcje z wieloma czynnikami uczestniczącymi w procesie replikacji [Kenna i Skibbens 2003, Feeney i wsp. 2010]. Eco1 prawdopodobnie ułatwia przejście maszynerii replikacyjnej przez pierścienie kompleksu kohezyny, co potwierdzają obserwacje wskazujące na konieczność acetylacji kohezyny przy przesuwaniu się widełek replikacyjnych [Terret i wsp. 2009]. W ostatnich latach wykazano, że w fazie S cyklu komórkowego Eco1 uczestniczy w acetylacji dwóch, silnie konserwowanych, lizyn białka Smc3. Mutacje w *Smc3* zmieniające te aminokwasy skutkują letalnymi defektami kohezji [Zhang J i wsp. 2008]. W komórkach człowieka występują dwie odmiany białka Eco1: EFO2, aktywne w fazie S oraz EFO1 niezbędne w acetylacji kohezyny w czasie fazy G<sub>1</sub> i S. U organizmów wyższych zidentyfikowano jeszcze acetylotransferazę San stabilizującą kohezję głównie w centromerach [Hou i wsp. 2007]. Innymi białkami regulującymi kohezję są Wpl1 (*wings apart-like 1*) i Pds5, określane jako WAPAL i PDS5 u człowieka, prawdopodobnie formujące kompleks mający za zadanie hamowanie przyłączania kohezyny i będący antagonistą Eco1 [Gandhi i wsp. 2006, Kueng i wsp. 2006]. Udowodniono, iż obniżenie stężenia WAPAL zmniejsza efektywność odłączania kohezyny z ramion chromosomów w czasie profazy i jej ponownego przyłączania. Wiadomo, że u kręgowców kompleks białek WAPAL - PDS5 oddziałuje z kohezyjną, poprzez sekwencje HEAT występujące w PDS5 oraz rodzinie białek SA, zmieniając konformację pierścienia i tym samym ułatwiając jej oddysocjowanie w czasie profazy [Shintomi i Hirano 2009]. Gdy komórka jest gotowa do podziału, a chromosomy siostrzane zostają połączone z wrzecionem kariokinetycznym, kohezja pomiędzy nimi jest usuwana przez proteolitycznie aktywowaną separazę Esp1 tnącą podjednostkę Scc1 (RAD21). U kręgowców proces ten przebiega w dwóch etapach. W pierwszym, kohezyna odłącza się z ramion chromosomów a w drugim, pod koniec anafazy, z rejonu centromerów i wydaje się, że tylko ten drugi etap jest zależny od przecięcia RAD21 [Feeney i wsp. 2010]. Udowodniono, że w obu etapach zaangażowane jest białko Plk1 (*polo-like kinase 1*)

fosforylujące zarówno RAD21 jak i SA2 zwiększając tym wydajność separazy [Sumara i wsp. 2002].

#### 3.2.4. Dodatkowe funkcje kompleksu kohezyny.

Przez bardzo długi czas przypuszczano, że kompleks kohezyny, poza swoim podstawowym udziałem w utrzymaniu spójności chromatyd siostrzanych i segregacji chromosomów, uczestniczy dodatkowo w innych funkcjach komórki. Pierwszym z dowodów potwierdzających tę hipotezę było obserwowane ponowne przyłączanie tego kompleksu do DNA pod koniec mitozy. W ostatnich latach badania dostarczyły kolejnych danych wykazujących zaangażowanie kompleksu między innymi w kontrolę ekspresji genów podczas interfazy oraz naprawę pęknięć DNA. Ponadto u chorych z zespołem Cornellii de Lange lub zespołem Roberts'a, które są powodowane przez mutacje w genach kodujących białka uczestniczące w kohezji, nie obserwuje się istotnych zaburzeń cyklu komórkowego, co sugeruje zakłócenie właśnie tych dodatkowych funkcji kohezyny. Wyniki badań nad modelowym organizmem jakim jest jednokomórkowy grzyb z gromady workowców *Schizosaccharomyces pombe* sugerują, iż poprzez akumulację pierścieni w rejonie nieaktywnej heterochromatyny kompleks staje się fizyczną barierą rozdzielając różne geny i ułatwiając terminację transkrypcji [Gullerova i Proudfoot 2008] oraz, że może zapobiegać nieuprawnionej rekombinacji [Nonaka i wsp. 2002]. W komórkach ssaków wykazano przyłączanie się kohezyny w pobliżu sekwencji rozpoznawanych przez regulator transkrypcji - białko CTCF (*CCCTC-binding transcriptional insulator protein*) i współregulowanie transkrypcji [Parelho i wsp. 2008, Wendt i Peters 2009, Chien i wsp. 2011]. W budowie CTCF wyróżnia się 11 wysoce konserwowanych palców cynkowych ułatwiających równoczesne interakcje między różnymi białkami i sekwencjami DNA. Najczęstszą konsekwencją przyłączenia CTCF jest uniemożliwienie oddziaływania, bardzo często znacznie od siebie oddalonych, elementów wzmacniających transkrypcję (*enhancers*) na sekwencje promotorowe genów, czyli hamowanie ich ekspresji. W procesie tym uczestniczy kohezyna tworząc, a następnie stabilizując, trzeciorzędowe struktury DNA. Najczęściej są to pętle powstające pomiędzy sekwencjami rozpoznawanymi przez CTCF. Prawdopodobnie działanie kompleksu kohezyny w trakcie stabilizacji takich pętli jest zbliżone do zakładanego w modelu dwupierścieniowym. Usytuowanie pomiędzy

dwoma genami miejsc równoczesnego wiązania CTCF i kohezyny blokuje interakcje między enhancerami i promotorami, co pozwala na niezależne regulowanie ekspresji tych genów [Bowers i wsp. 2009]. Wykazano także, że kompleks kohezyny przyłącza się w pobliże sekwencji promotorowych i enhancerów z równoczesnym łączeniem kompleksu mediatora oraz zaangażowaniem RNA - polimerazy II, co wskazuje na udział kohezyny w pozytywnej regulacji ekspresji genów [Kagey i wsp. 2010]. Mediator składa się z około 20 białek, które u eukariota ułatwiają polimerazie kontakt z sekwencjami promotorowymi. Dzięki przestrzennemu zbliżeniu różnych fragmentów DNA następuje oddziaływanie między aktywatorami transkrypcji przyłączonymi do enhancerów a RNA-polimerazą II przyłączoną do promotorów - jest to możliwe również przez tworzenie pętli DNA i stabilizowanie ich przez kohezynę. Coraz więcej danych wskazuje, że regulacja ekspresji różnych genów z udziałem kompleksu jest tkankowo specyficzna [Schmidt i wsp. 2010].



Ryc. 6. Stabilizacja pętli DNA poprzez kohezynę [Cuylen i Haering 2010, Feeney i wsp. 2010].

Oprócz aktywnego udziału w kontrolowaniu transkrypcji kompleks kohezyny jest także zaangażowany w naprawę uszkodzeń DNA. Podczas pracy nad komórkami drożdży udowodniono, że do skutecznej naprawy uszkodzeń DNA niezbędna jest kohezja ustalona wzdłuż ramion chromosomów w fazie S. Jednak w przypadku poreplikacyjnego pęknięcia obu nici DNA (DSB – *double-strand break*) obserwuje się wtórne przyłączanie kompleksu kohezyny w miejscu uszkodzenia [Sjogren i Nasmyth 2001, Strom i wsp. 2004]. Wśród niezbędnych czynników prawidłowo rozpoznających uszkodzone miejsca i kierujących w ich pobliże kohezynę znajduje się białko Scc2 (ortolog delanginy) [Strom i wsp. 2004]. Zagęszczenie kompleksu koło miejsca

pęknięcia i ustanowienie ścisłej lokalnej kohezji między chromatydami znacznie ułatwia naprawę uszkodzeń z wykorzystaniem drugiej chromatydy jako matrycy. W proces ten jest zaangażowany między innymi kompleks MRN (MRE11/RAD50/NBS1) [Unal i wsp. 2004]. Z pewnością wiele jeszcze aspektów dotyczących funkcjonowania kompleksu kohezyny oraz jego budowy pozostało do wyjaśnienia.

### 3.2.5. Efekty zaburzenia kompleksu kohezyny obserwowane u chorych z CdLS.

Udowodniono, że czynnikami powodującymi zaburzenia rozwoju organizmu, rozpoznawane u człowieka jako zespół Cornellii de Lange, są mutacje części genów, których produkty zaangażowane są w funkcjonowanie kompleksu kohezyny i jego budowę (m.in.: *NIPBL*, *SMC1* i *SMC3*). Tym samym dowiedziono, że zespół ten powstaje w wyniku zaburzeń funkcjonowania kohezyny i dlatego dosyć często określa się go mianem kohezynopatii. W jaki sposób dysfunkcyjne działanie kompleksu przyczynia się do obserwowanych nieprawidłowości rozwoju organizmu nie zostało w pełni rozwikłane. Co jest istotne u pacjentów CdLS nie obserwuje się znacznego zaburzenia segregacji chromosomów w komórkach, co oznacza, że funkcja kompleksu jaką jest utrzymanie spójności chromatyd siostrzanych nie ulega zaburzeniom. Po wykazaniu, że mutacje genów powiązanych z kohezją chromatyd siostrzanych są czynnikami patogennymi CdLS przypuszczano, że we wstępnej diagnostyce tego zespołu będzie można posługiwać się analizą przedwczesnego rozchodzenia się chromatyd siostrzanych (PSCS - *precocious sister chromatid separation*) [Kaur i wsp. 2005]. Jednak w latach późniejszych zweryfikowano to przypuszczenie udowadniając, że częstość PSCS u chorych nie jest znacząco zwiększona i nie odbiega istotnie od obserwowanego u osób zdrowych, a tym samym zdyskredytowano diagnostyczne zastosowanie tego zjawiska [Castronovo i wsp. 2009]. W trakcie badań na liniach komórkowych wyprowadzonych od pacjentów z CdLS wykazano, że obniża się w nich tolerancja na działanie różnorodnych czynników mutagennych, co pośrednio wskazuje na upośledzenie udziału kohezyny przy naprawie uszkodzeń DNA w fasie G<sub>2</sub> [Vrouwe i wsp. 2007]. Największe zaburzenia obserwuje się w regulacji transkrypcji genów, w której poprzez interakcje z innymi białkami regulatorowymi uczestniczy kohezyna, co prawdopodobnie skutkuje nieprawidłowościami rozwoju całego organizmu [Kawauchi i wsp. 2009].

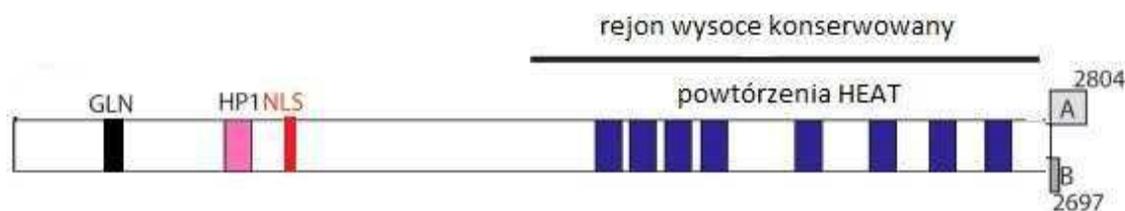
### **3.3. Gen NIPBL.**

W 2004 roku dwóm zespołom badawczym udało się udowodnić zależność między mutacjami genu *NIPBL* a CdLS. Zarówno zespoły Tonkin jak i Krantza, skupiając się na miejscach pęknięć chromosomów uczestniczących w aberracjach zdiagnozowanych u pacjentów, wytypowali do szczegółowych badań region 5p13.2. W miejscu tym zlokalizowano homolog genu *Nipped-B*, wcześniej zidentyfikowany u *D. melanogaster*, który jest odpowiednikiem drożdżowego *Scc2*. Produkty tych genów stanowią białka regulujące przyłączanie kompleksu kohezyny do chromatyd siostrzanych. Gen, który zlokalizowany jest dokładnie między zasadami 36.912.618 – 37.102.265 od końca ramion krótkich (p-ter) chromosomu 5 został nazwany *NIPBL* (*Nipped-B-like*) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Tonkin i wsp. 2004, Krantz i wsp. 2004]. Koduje on białko delanginę (NIPBL), które podobnie jak produkty homologicznych genów, jest głównym mediatorem przyłączania kohezyny do chromatyd i uczestniczy w wielu procesach życiowych komórki.

#### **3.3.1. Gen NIPBL i jego produkt białkowy.**

Gen *NIPBL* zbudowany jest z 47 eksonów (ekson na końcu 5' jest niekodujący) i mogą z niego powstać dwie izoformy białka. Jednak struktura sekwencji genu sugeruje prawdopodobieństwo kilku alternatywnych sposobów składania mRNA (*splicing*) [Strachan 2005]. Powstające odmiany białka zbudowane są odpowiednio z 2804 i 2697 aminokwasów. Większa izoforma jest zgodna w 92% z mysim odpowiednikiem, szczurzym w 88%, a w 37% z produktem genu *Nipped-B* [Krantz i wsp. 2004]. Jak do tej pory nie zidentyfikowano innych białek o budowie zbliżonej do delanginy. Wykazano, że w ortologach białka NIPBL, zarówno u kręgowców jak i niższych organizmów, C- koniec obejmujący około 1.500 aminokwasów jest wysoce konserwowany ewolucyjnie, w przeciwieństwie do N- końca, gdzie obserwuje się zmienność międzygatunkową [Tonkin i wsp. 2004, Strachan 2005]. W NIPBL na C- końcu wyróżnia się głównie wielokrotne powtórzenia domeny HEAT odpowiedzialne za interakcje z innymi białkami [Strachan 2005, Jahnke i wsp. 2008]. Powtórzenia te jak już wspomniano występują i w innych białkach powiązanych z kompleksem kohezyny. Natomiast na N- końcu zlokalizowany jest rejon bogaty w glutaminę, następnie

znajduje się domena NLS (*nucleus localisation signal*) odpowiedzialna za prawidłowy transport przez błonę jądrową oraz motyw PxVxL pozwalający na oddziaływanie z białkiem HP-1 (*heterochromatin protein 1*). Ze względu na spore rozmiary oraz złożoność struktury delanginy budowa tego białka nie została do końca poznana.



Ryc. 7. Prawdopodobna budowa białka NIPBL [za Jahnke i wsp. 2008, McNairn i Gerton 2008].

Wyniki dalszych badań wykazały, że transkrypt *NIPBL* ma wielkość 9,8kbp [Tonkin i wsp. 2004], a jego ekspresja jest zmienna – zależy od tkanki i okresu rozwoju organizmu. Największą ekspresję obserwuje się w okresie embrionalnym, szczególnie w zawiązkach kości rozwijających się kończyn, głównie łokcia oraz dłoni, a także organizującej się czaszki z uwzględnieniem okolic twarzy, w nerkach, wątrobie i grasicy. Ponadto *NIPBL* ulega translacji w znacznym stopniu w strunie grzbietowej, przełyku, tchawicy, oskrzelach i sercu. W bardzo niewielkim stopniu, o ile w ogóle, ulega ekspresji w mózgu, płucach, jelitach i leukocytach [Tonkin i wsp. 2004, <http://www.genecards.org>]. Podobnie u osoby dorosłej, wysoki poziom obserwuje się w komórkach kości, mięśni szkieletowych, serca oraz w nerkach i wątrobie. Wskazuje to, że największa ekspresja genu następuje w tkankach narządów, które są najbardziej dotknięte zmianami u osób z CdLS.

### 3.3.2. Mutacje *NIPBL* a fenotyp osób chorych.

Nigdy nie stwierdzono mutacji homozygotycznej genu *NIPBL*, gdyż doprowadza to prawdopodobnie do tak dużych zmian w trakcie podziałów komórkowych, że jest letalne dla rozwijającego się embrionu. Natomiast jeden prawidłowy allel tego genu nie jest w stanie zapewnić odpowiedniej ilości funkcjonalnego białka NIPBL dla prawidłowego funkcjonowania komórki, czyli mutacje genu skutkują efektem haploinsuficjencji. Wyniki badań na wielu grupach pacjentów wykazują, że heterozygotyczne mutacje genu *NIPBL* diagnozuje się u około 50% chorych, jednak

rozbieżność między grupami jest spora i wynosi od 26% do 70% [Borck i wsp. 2004, Gillis i wsp. 2004, Miyake i wsp. 2005, Yan i wsp. 2006, Bhuiyan i wsp. 2006, Schoumans i wsp. 2007, Selicorni i wsp. 2007, Kline i wsp. 2007a, Pie i wsp. 2010]. Na dzień dzisiejszy zidentyfikowano ponad 240 mutacji w tym genie u 320 chorych, większość z nich powstała *de novo* i tylko nieliczne powtarzają się u niespokrewnionych pacjentów [Oliveira i wsp. 2010]. Istnieje dodatnia korelacja między obecnością mutacji a ciężkością objawów choroby [Gillis i wsp. 2004], jednak nie dopatrzonej jej u wszystkich pacjentów [Bhuiyan i wsp. 2006]. Mutacje w *NIPBL* diagnozuje się u większości pacjentów z klasyczną postacią zespołu, choć występują one również i u pacjentów z postacią łagodną, ale ze znacznie mniejszą częstością. Mutacje typu *truncating*, w wyniku których powstaje skrócony produkt białkowy, objawiają się pod postacią cięższego fenotypu – dotyczy to stopnia opóźnienia rozwoju psychoruchowego, zmian w budowie kończyn i bardziej zaznaczonych nieprawidłowości w budowie twarzy. Natomiast mutacje typu *missense* (zamiany aminokwasu), czy małe delecje *in-frame* są prawdopodobnie przyczyną łagodniejszej postaci zespołu [Gillis i wsp. 2004, Yan i wsp. 2006, Pie i wsp. 2010]. Jeśli jednak mutacja tego typu wystąpi w rejonie konserwowanego C-końca, szczególnie w rejonie powtórzeń HEAT, może wywołać zaburzenia charakterystyczne dla postaci klasycznej [Oliveira i wsp. 2010]. Zidentyfikowane mutacje genu *NIPBL* zlokalizowane są wzdłuż całej sekwencji kodującej i wydaje się, że nie ma tzw.: *hot spot*, ale znane są przypadki występowania takiej samej mutacji u kilku pacjentów z różnych grup etnicznych. Do najczęstszych należy p.R827GfsX2, znaleziona u siedmiu osób, jednak ich fenotypy różnią się między sobą, co sugeruje wpływ dodatkowych czynników modyfikujących w rozwoju zespołu [Pie i wsp. 2010]. Oprócz mutacji w regionie kodującym, zidentyfikowano również mutację w rejonie 5', w obrębie sekwencji nie ulegającej translacji, objawiającą się jako postać łagodna zespołu [Borck i wsp. 2006].

### 3.3.3. Regulacja ekspresji genów poprzez białko NIPBL (w interakcji z kompleksem kohezyny).

Pierwsze doniesienia o wpływie ortologu delanginy na regulację ekspresji genów przyniosły badania nad *D. melanogaster*. U heterozygot ze zmutowanym *Nipped-B* obserwowano znaczne zahamowanie ekspresji homeotycznych genów *cut*

oraz *Ubx* (***Ultrabithorax***) [Rollins i wsp. 1999]. Prawidłowa ekspresja tych genów wymaga oddziaływań między, znacznie oddalonymi od siebie, sekwencjami promotora i wzmacniacza (*enhancer*). Jak wspomniano wcześniej, kompleks kohezyny stabilizuje pętle DNA pomiędzy sekwencjami przyłączającymi czynnik CTCF wpływając przez to na proces transkrypcji. Nipped-B jest głównym białkiem regulującym inkorporację kohezyny do chromatyd (podobnie jak inne homologi *Scs2*). Wykazano, że u *D. melanogaster* z mutacją, poziom mRNA dla *Nipped-B* jest zredukowany o około 25% i że tak niewielka redukcja transkryptu już rzutuje na stopień ekspresji innych genów. Obniżenie poziomu prawidłowego mRNA *Nipped-B*, poprzez zastosowanie interferencji RNA (RNAi), o kolejne 50% było dla komórek letalne [Rollins i wsp. 2004]. Równie niewielkie obniżenie poziomu mRNA *NIPBL* obserwuje się w liniach komórkowych wyprowadzonych od pacjentów ze znaną mutacją, czy też u heterozygot w mysim modelu [Liu i wsp. 2009a, Kawauchi i wsp. 2009]. Wskazuje to jak bardzo istotne jest zachowanie wysokiej dawki prawidłowego białka NIPBL, aby nie nastąpiło zakłócenie funkcji komórki. Zmniejszenie poziomu delanginy zarówno zwiększa jak i zmniejsza transkrypcję różnych genów, co może sugerować, że przynajmniej część z nich jest bezpośrednio kontrolowana przez kohezynę [Bose i Gerton 2010]. Udokumentowano jednoczesne przyłączanie się czynnika regulującego CTCF i produktu genu *NIPBL* do określonych sekwencji genomu oraz, że interakcje te są niezbędne nie tylko w regulowaniu promotorów, ale przyczyniają się też do utrzymania integralności genomu [Carretero i wsp. 2010, Merkschlanner 2010]. Ponadto wykazano istotne rozbieżności w oddziaływaniach tych białek w zależności od typu komórek, co wyraża się w zróżnicowanej aktywacji określonych genów oraz w organizacji chromatyny [Hou i wsp. 2010].

Jak istotny w rozwoju organizmu jest prawidłowy poziom białka nipbl wykazano w trakcie badań nad mysim modelem zespołu CdLS. Myszy z heterozygotyczną mutacją *nipbl* (wyłączającą ekspresję zmutowanego allelu) wykazywały obniżenie poziomu transkryptu o 25- 30% w porównaniu z myszami z prawidłową sekwencją genu [Kawauchi i wsp. 2009]. U osobników tych, w trakcie rozwoju występowały objawy bardzo zbliżone do charakteryzujących pacjentów z CdLS. Co prawda nie obserwowano u zwierząt poważnych deformacji kończyn, ale występowało znaczne skrócenie kości kończyn, a anomalie w rozwoju kośćca dotyczyły także czaszki. Nieprawidłowości serca,

mniejsze rozmiary ciała oraz zaburzenia neurologiczne to kolejne elementy zbieżne z fenotypem CdLS, a jedną z nielicznych różnic była wysoka śmiertelność zwierząt. Przeanalizowano poziom ekspresji 978 genów w grupie zwierząt z mutacją i bez – badania te wykazały różnice w poziomach mRNA między obiema grupami. Wyniki tych badań wskazują, że niewłaściwe ilości transkryptów wielu genów, a tym samym zaburzone funkcje i interakcje ich produktów, są podstawową przyczyną obserwowanych zmian fenotypowych. Podobny wpływ mutacji genu *NIPBL* na zaburzenia w kontroli transkrypcji udowodniono badając linie komórkowe z limfocytów chorych ze znanymi mutacjami tego genu oraz osób zdrowych. Po porównaniu ekspresji 420 genów w liniach komórkowych od pacjentów i z grupy kontrolnej, zauważono różnice dla 339 genów [Liu i wsp. 2009a], przy czym ~60% z nich wykazywało zwiększoną, a ~40% zmniejszoną ekspresję w liniach z mutacjami *NIPBL*. Różnice te nie były bardzo istotne, ale prawdopodobnie na zaburzenia rozwoju organizmu wpływa akumulowanie się zmian molekularnych. Istotnym jest, że wśród genów wrażliwych na mutacje *NIPBL* znajdują się geny, których produkty są powiązane z kompleksem kohezyny, w tym sam gen *NIPBL* oraz *STAG1*, *PDS5* i *MAU2*. Jednym z genów, którego regulacja ulega największym zaburzeniom jest *ROBO1* powiązany z dojrzewaniem neuronów oraz zaburzeniami językowych zdolności poznawczych, co prawdopodobnie wpływa na obserwowane u większości chorych upośledzenie mowy. Zespołowi badaczy udało się wyodrębnić grupę genów, których ekspresja jest na tyle podatna na obniżony poziom *NIPBL*, że mogłyby służyć jako biomarker chorych z CdLS [Liu i wsp. 2009a].

Dowód wpływu mutacji *NIPBL* na organizację genomu przyniosły badania nad metylacją DNA. Zostały one przeprowadzone na liniach komórkowych wyprowadzonych z limfoblastów (LCLs – *lymphoblastoid cell lines*) osób z CdLS i zdrowych [Liu i wsp. 2010]. U ssaków metylacji ulegają zwykle pary nukleotydów CpG, często połączone w tzw. wyspy CpG. W większości sekwencji promotorowych i eksonach wyspy CpG występują w postaci niezmetylowanej, natomiast pozostałe porzucane w sekwencjach niekodujących mają na ogół przyłączoną grupę metylową. Metylacja dinukleotydów w promotorach prowadzi zazwyczaj do wyciszenia transkrypcji, odgrywa też istotną rolę w imprintingu, inaktywacji chromosomu X, w rozwoju embrionalnym czy kancerogenezie. Zespół Liu wykazał różnice w profilu

metylacji DNA w liniach komórkowych LCLs od osób chorych i z grupy kontrolnej, pozwalające na rozróżnienie tych dwóch grup. Wykazano także zależność między stopniem metylacji a fenotypem chorych – profil w liniach od pacjentów z łagodniejszą postacią zespołu klasyfikował się pomiędzy profilem osób z postacią klasyczną a osób zdrowych z grupy kontrolnej [Liu i wsp. 2010]. Także metylacja chromosomu X u osób chorych różni się od prawidłowej [Kline 2010].

Zmniejszenie poziomu metylacji skutkuje ponadto zmianami kondensacji chromatyny. Delangina uczestniczy w regulacji struktury chromatydy wpływając tym na różne funkcje komórki. Poprzez powtórzone domeny HEAT, białko NIPBL oddziałuje między innymi z histonowymi deacetylazami HDAC1 i HDAC3, które zmieniają stopień kondensacji chromatyny poprzez reakcje z histonami. Dostyć często mutacje diagnozowane u pacjentów z CdLS są umiejscowione w sekwencjach domen HEAT zaburzając ich strukturę i wpływając na efektywność interakcji między innymi z deacetylazami [Jahnke i wsp. 2008]. Natomiast motyw PxVxL odgrywa istotną rolę w oddziaływaniach delnanginy z kolejnym czynnikiem regulującym dostęp kofaktorów transkrypcji do nici DNA, jakim jest białko HP-1, które łącząc się z histonem H3 stabilizuje heterochromatynę wyciszając translację [Lechner i wsp. 2005, Hines i wsp. 2009].

Molekularny mechanizm przyczyniający się do zmian w ekspresji genów u osób z kohezynopatią nie został do końca wyjaśniony. Regulacja transkrypcji i translacji genów u kręgowców jest ściśle regulowana przez szereg powiązanych ze sobą czynników. Jednym z nich jest kompleks kohezyny, a jej udział w tym procesie można wyjaśnić na kilka sposobów. Kohezyna wpływa na poziom białek i funkcje komórki poprzez uczestniczenie w remodelingu chromatyny, w ułatwianiu wzajemnego oddziaływania czynników regulatorowych na sekwencje promotorów oddalonych od siebie nawzajem na znaczne odległości, czy w bezpośredniej aktywacji, hamowaniu bądź terminacji translacji. Nie wiadomo jak wiele genów podlega regulacji poprzez kohezynę. Nie wyjaśniono także, czy przyłączanie się kompleksu kohezyny do chromatyd w okolicach regulowanych genów odbywa się na takiej samej zasadzie jak przy utrzymaniu spójności chromatyd siostrzanych, nie mniej udowodniono, że proces ten jest zależny od delnanginy [Bose i Gerton 2010]. Niewątpliwie w kohezynopatii istotna jest również dynamika procesów z udziałem kohezyny.

Utrzymanie kohezji, trwające zwykle od kilku minut nawet do kilku godzin, nie wymaga takiej aktywności poszczególnych składników kompleksu, jak mediowanie przyłączania się różnych czynników w czasie transkrypcji, która zwykle trwa krócej niż kilkanaście sekund [Dorsett i Krantz 2009]. Regulacja transkrypcji prawdopodobnie wymaga całej puli delanginy aby mogła przebiegać bez zakłóceń, natomiast u pacjentów z mutacją genu *NIPBL* jego ekspresja jest obniżona o około 30%. Podobnie mutacje w *SMC1* i *SMC3* upośledzają aktywność kompleksu kohezyny i są kolejnym czynnikiem powodującym fenotyp CdLS.

#### **3.4. Mutacje genów *SMC1* i *SMC3* w zespole Cornellii de Lange.**

Odkryto także mutacje w innych genach powiązanych z kohezyną wśród pacjentów z CdLS. Dotyczy to genów: *SMC1* i *SMC3*. Najczęściej fenotyp takich osób odpowiada postaci łagodnej zespołu [Musio i wsp. 2006, Borck i wsp. 2007, Deardorff i wsp. 2007, Liu i wsp. 2009b]. Do tej pory w genie *SMC1* zidentyfikowano około 30 mutacji typu *missense* lub małych delecji typu *in-frame*, skutkiem których białko prawdopodobnie traci część swoich funkcji [Mannini i wsp. 2010a, Oliveira i wsp. 2010]. Uważa się, że mutacje całkowicie destabilizujące białko są letalne [Liu i Krantz 2008, Pie i wsp. 2010]. Gen ten jest zlokalizowany w chromosomie X i nie ulega inaktywacji w trakcie lionizacji, a mutacje znajdowane są u pacjentów obu płci. Część mutacji powstaje *de novo*, ale znane są przypadki rodzinnego występowania zespołu powodowane przez mutacje właśnie w tym genie [Deardorff i wsp. 2007]. Mutacje w *SMC1* znajdowane są również w komórkach nowotworowych, co wskazuje jak istotne w kancerogenezie jest prawidłowe funkcjonowanie kompleksu kohezyny [Mannini i wsp. 2010b]. Wśród przebadanych do tej pory pacjentów z CdLS zidentyfikowano tylko dwa warianty sekwencyjne genu *SMC3*, który zlokalizowany jest w chromosomie 10 [Deardorff i wsp. 2007, Oliveira i wsp. 2010].

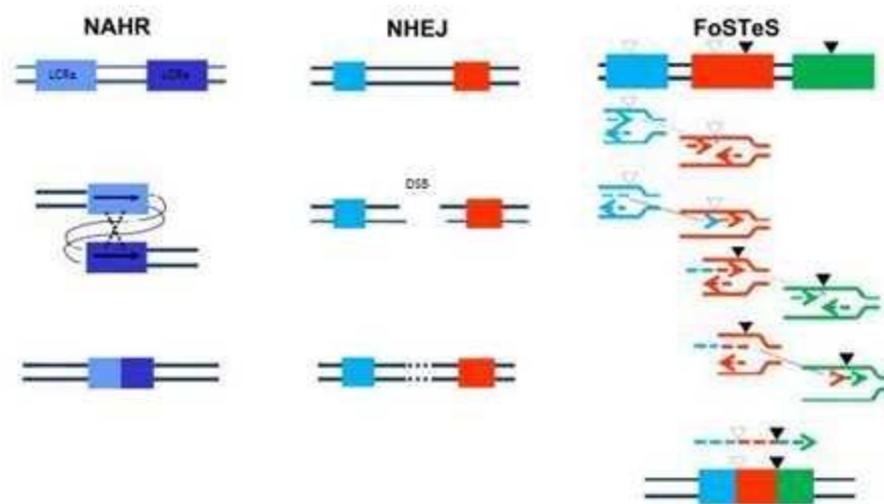
#### **3.5. Duże rearanżacje genowe.**

Większość badań nad genem *NIPBL* opiera się na poszukiwaniu mutacji punktowych. Mutacje tego typu powstają w wyniku błędnego włączenia zasad przez polimerazę w czasie replikacji, pod wpływem czynników mutagennych, czy w wyniku nieskutecznej naprawy źle sparowanych zasad. Należy jednak pamiętać o złożoności

genomu człowieka i występowaniu zjawiska, określanego jako duże rearanżacje, powodującego zmiany w układzie elementów genomu. Rearanżacje są zaangażowane w patologię wielu chorób występujących u człowieka. Wśród schorzeń, u podłoża których identyfikuje się i takie zmiany (obok mutacji punktowych) wymienia się neurofibromatozę typu 1, chorobę Charcot Marie Tooth, dystrofię mięśniową Duchenne'a i rdzeniowy zanik mięśni [Gu i wsp. 2008]. Rearanżacje mogą obejmować fragmenty genomu o różnej wielkości – od kilkuset par zasad (pz), co może odpowiadać wielkości eksonu, do kilku milionów pz, czyli objąć nawet kilka genów. Gdy zmiany są większe niż 3-5 milionów pz stają się widoczne w czasie analizy cytogenetycznej. Do rearanżacji zalicza się delecje lub duplikacje eksonów oraz insercje, translokacje czy inwersje. W wyniku zajścia tych zmian może dojść do zwiększenia lub zmniejszenia liczby kopi genu (co prowadzi do zaburzeń w rozwoju organizmu wynikających z efektu niewłaściwej dawki produktu tego genu), uszkodzenia sekwencji genu, bądź powstania genu fuzyjnego. Jest kilka mechanizmów prowadzących do powstania dużych zmian genomowych, a w ich przebiegu istotne znaczenie ma architektura genomu [Gu i wsp. 2008]. Do trzech najważniejszych mechanizmów należą: niealleliczna rekombinacja homologiczna (NAHR– *non-allelic homologous recombination*), niehomologiczne łączenie końców (NHEJ– *non-homologous end-joining*) oraz opóźnienie widełek replikacyjnych z zamianą nici matrycowej (FoSTeS – *fork stalling and template switching*). Większość dużych rearanżacji powstaje w wyniku nieallelicznej rekombinacji homologicznej zachodzącej między specyficznymi fragmentami DNA określanymi jako LCRs (*low copy repeats*) lub SD (*segmental duplication*). Zbudowane są one z 10 – 300 tysięcy par zasad i są homologiczne względem siebie w co najmniej 95% [Bailey i Eichler 2006]. NAHR może zajść zarówno w czasie mitozy jak i mejozy, prowadząc do rozwoju nowotworów, mozaicyzmu czy zespołów genetycznych. Gdy NAHR wystąpi między LCRs umiejscowionymi w tym samym chromosomie skutkuje delecją bądź duplikacją o ile LCRs mają zgodną orientację, natomiast inwersją, gdy orientacja jest przeciwna. Do późniejszej translokacji chromosomowej dojść może gdy sekwencje LCRs zlokalizowane na różnych chromosomach rekombinują między sobą. Mutacje te jednak nie powstają z jednakową częstością – delecje zdają się przeważać nad duplikacjami, ponieważ intrachromatydowe zmiany skutkują powstaniem jedynie delecji, w przeciwieństwie

do zmian interchromatydowych czy chromosomowych. Zauważono także, że w niektórych zespołach genetycznych zdiagnozowane mutacje są częściej pochodzenia matczynego (np.: w *NF1*) bądź ojcowskiego (np.: w *SMN*) co można wyjaśnić tym, że w czasie gametogenezy NAHR występuje z różną częstością u kobiet i u mężczyzn lub tym, że zmienione allele są poddawane zróżnicowanej selekcji u obu płci [Lopes i wsp. 1997, Gu i wsp. 2008]. Kolejnym mechanizmem prowadzącym do zmian genomowych jest NHEJ, którego podstawowym zadaniem jest udział w naprawie pęknięcia obu nici DNA – DSB. Niehomologiczne łączenie końców uczestniczy przy naprawie pęknięć powstałych w wyniku działania czynników mutagennych, co można zaobserwować już w komórkach prokariotycznych, ale u kręgowców jest również podstawą, zachodzącej w limfocytach B, rekombinacji somatycznej V(D)J zapewniającej różnorodność przeciwciał. Zaburzenia w tym zjawisku są podstawą około 15% ciężkich złożonych niedoborów odporności (*SCID - severe combined immunodeficiency*) [Schwarz i wsp. 2003]. Uważa się ponadto, że NHEJ przyczynia się do powstawania translokacji chromosomowych w komórkach nowotworowych [Lieber i wsp. 2008]. W czasie procesu NHEJ wyróżnia się cztery etapy. Pierwszym jest rozpoznanie uszkodzonych końców DNA powstających w wyniku pęknięcia, w drugim etapie następuje przybliżenie końców do siebie, w kolejnym zmodyfikowanie ich w taki sposób by wykazywały homologię, a w ostatnim etapie dochodzi do połączenia [Weterings i van Gent 2004]. Po zajściu tego zjawiska, w naprawionym miejscu, pozostają ślady w postaci kilku dodanych lub wyciętych nukleotydów, co może być wykorzystane przy znajdowaniu i opisywaniu zmian oraz ustaleniu, czy to ten mechanizm leży u podstaw dużych rearanżacji [Gu i wsp. 2008]. Trzecim mechanizmem, scharakteryzowanym najpóźniej dzięki znacznemu zwiększeniu rozdzielczości stosowanych metod służących do analizy zmian genomowych, jest FoSTeS. Proces ten zachodzi w trakcie replikacji i prowadzi do bardzo skomplikowanych przetasowań w genomie. Jeżeli w trakcie syntezy DNA widełki replikacyjne, z przyłączoną polimerazą DNA, zatrzymają się w pewnym miejscu (co może wynikać ze struktur trzeciorzędowych DNA) nowopowstająca nić może odłączyć się, przemieścić i przyłączyć do innych widełek. Połączenie to zachodzi dzięki, nawet niewielkiej, homologii końca 3'. Następuje połączenie obu widełek, a przemieszczona nić staje się starterem i ulega wydłużeniu w widełkach do których się dołączyła. Jeżeli nić połączy

się z nowymi widełkami położonymi poniżej pierwotnego miejsca, to skutkiem będzie delecja, jeżeli przeskok nastąpi do sekwencji zlokalizowanych powyżej - to wystąpi duplikacja. Przemieszczenie takie może zajść kilkakrotnie, natomiast po przejściu polimerazy wydłużona nić powraca do oryginalnych widełek replikacyjnych, a konsekwencją tych procesów jest złożona mutacja [Gu i wsp. 2008, Zhang F i wsp. 2009]. Wykazano, że zjawisko to jest jedną z przyczyn zmian obserwowanych w genie dystrofiny [Zhang Z i wsp. 2008].



Ryc. 8. Przykładowe konsekwencje mechanizmów prowadzących do rearanżacji genomowych [Gu i wsp. 2008]

Istotne znaczenie w wystąpieniu dużych zmian genomowych, szczególnie z zaangażowaniem NAHR, mają sekwencje powtórzone, które są rozproszone po całym genomie człowieka. Należą do nich LINE (*long interspersed nuclear element*) czyli długie rozproszone sekwencje jądrowe o długości ponad 6 tysięcy par zasad oraz SINE (*short interspersed nuclear element*) krótkie rozproszone sekwencje o długości od 100 do 400 pz, z których najlepiej poznane są sekwencje Alu. I to właśnie te sekwencje, znajdujące się w całym genomie w bardzo licznych kopiach, często są przyczyną nieallelicznej rekombinacji homologicznej, a tym samym leżą u podłoża różnych chorób genetycznych [Batzer i Deininger 2002]. Udział sekwencji Alu stwierdzono w rearanżacjach genów *BRCA1* i *BRCA2* powiązanych z rodzinnym rakiem piersi i/lub jajnika [Sluiter i van Rensburg 2001] oraz genu *LDLR*, którego mutacje odpowiedzialne są za rodzinną hipercholesterolemię [Chaves i wsp. 2001]. Jednak NAHR może zajść i

pomiędzy innymi sekwencjami powtórzonymi, natomiast ani w NHEJ ani w FoSTeS nie obserwuje się bezpośredniego udziału powtórzeń, choć w przypadku FoSTeS wydaje się, że sekwencje LCRs mogą przybliżyć do siebie widełki replikacyjne zaangażowane później w powstanie mutacji [Gu i wsp. 2008]. Z pewnością nie zidentyfikowano jeszcze wszystkich mechanizmów zaangażowanych w powstawanie mutacji, jednak szybko rozwijające się metody analizy genomu przyczynią się do ich lepszego poznania i zrozumienia.

### 3.5.1. Duże rearanżacje genu *NIPBL*.

Mutacje punktowe genu *NIPBL* występują u około 50% chorych osób z zespołem Cornelia de Lange, dodatkowo u około 5% znajdowane są mutacje genów kodujących podjednostki rdzenia kompleksu kohezyny (*SMC1* i *SMC3*). Oznacza to istnienie sporego odsetka pacjentów bez zidentyfikowanego molekularnego czynnika patologicznego. Mając na uwadze te wyniki oraz różnorodność fenotypów obserwowanych u pacjentów kilka grup naukowców zajmujących się CdLS podjęło się sprawdzenia w jakim stopniu ze schorzeniem powiązane są duże rearanżacje genu *NIPBL*. W jednym ośrodku, po przebadaniu 50 pacjentów, z wykluczoną wcześniej mutacją punktową, wykryto dużą delecję. Mutacja ta o wielkości około 5200pz obejmowała eksony 41-42 (wraz z przyległymi sekwencjami intronów) i została zidentyfikowana u dwuletniej dziewczynki z cechami fenotypu odpowiadającymi ciężkiej postaci zespołu [Bhuiyan i wsp. 2007]. Dokładne badania miejsc pęknięć wykluczyły zaangażowanie sekwencji typu Alu w zaistniałą rearanżację. W gdańskim ośrodku, u jednej pacjentki, spośród 11 przebadanych, zidentyfikowano kolejną dużą delecję o wielkości około 63 tysięcy pz zawierającą eksony 35-47 [Ratajska i wsp. 2010]. Podobnie jak w pierwszym przypadku cechy fenotypu pacjentki były charakterystyczne dla klasycznej postaci CdLS. Szczegółowe badania pozwoliły na określenie pęknięć pomiędzy dwiema sekwencjami LINE, wykazały również insercję 15pz co sugeruje udział zjawiska NHEJ w powstaniu tej delecji. Zarówno w jednym jak i w drugim przypadku mutacje prowadzą do powstania skróconego białka niezdolnego do pełnienia prawidłowo swoich funkcji. Zidentyfikowano także duplikację obejmującą eksony 11 - 22 w linii komórkowej wyprowadzonej z limfocytów B pacjenta z cechami CdLS [Vrouwe i wsp. 2007]. W tych przypadkach do poszukiwań rearanżacji wykorzystano

technikę MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – zależna od ligazy łańcuchowa reakcja polimerazy) pozwalającą na równoczesne wykrycie zaburzeń liczby kopii kilkudziesięciu różnych sekwencji DNA. W innej grupie pacjentów, za pomocą aCGH (*array Comparative Genomic Hybridisation* – porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy), zidentyfikowano duplikacje w rejonie genu *NIPBL* oraz *SMC1*. Fenotyp tych pacjentów, pod pewnymi względami, odbiegał od charakterystycznego dla CdLS, ale występowały również cechy wspólne takie jak: opóźnienie rozwoju psychomotorycznego, zaburzenia snu i nieprawidłowości w budowie kończyn [Yan i wsp. 2009]. Wyniki te sugerują, że zmiany liczby kopii genów, których produkty są zaangażowane w kohezję, bądź duże delecja i/lub duplikacje eksonów w tych genach u pacjentów z zespołem są rzadkie, niemniej powinno się dążyć do określenia rzeczywistej częstości tego zjawiska.

### **3.6. Techniki molekularne wykorzystywane w poszukiwaniu mutacji.**

Niewątpliwie najlepszą techniką pozwalającą na dokładne scharakteryzowanie zmiany sekwencji nukleotydowej jest sekwencjonowanie bezpośrednie, jest to jednak technika czasochłonna. By usprawnić badania można zastosować metody pośrednie, które są szybsze i tańsze, i choć oczywiście charakteryzują się mniejszą swoistością, pozwalają na wstępne wykrycie zaburzeń w produktach amplifikacji (uzyskanych w reakcji PCR) badanych sekwencji. Do metod pośrednich zalicza się między innymi: SSCP (*single stranded conformational polymorphism*) czyli badanie zmian konformacji jednoniciowego DNA, analizę heterodupleksów HA (*heteroduplex analysis*) bądź elektroforezę na żelach z gradientem czynnika denaturującego DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*).

Aktualnie jedną z najczulszych metod pośrednich wykorzystywaną do poszukiwania nowych mutacji jest DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*) czyli wysokosprawna denaturująca chromatografia ciekowa. Analizowane amplikony (powielone fragmenty DNA) o maksymalnej długości 700bp przeprowadzane są przez złożę kolumny chromatograficznej w gradiencie czynnika denaturującego, jakim jest acetonitryl. Zachodząca w tych warunkach częściowa denaturacja termiczna pozwala na utworzenie heterodupleksów (pomiędzy nicią prawidłową i z mutacją), które charakteryzują się słabszym związaniem do złoża

kolumny niż homodupleksy, i tym samym są szybciej z niej wymywane. Rozdział jest monitorowany i mierzony za pomocą pomiaru absorbancji przy 260nm i przedstawiany graficznie jako chromatogram. Profil elucji jest charakterystyczny i powtarzalny dla danej zmiany, co pozwala na odróżnienie nowych mutacji od zanalizowanych wcześniej bądź znanych polimorfizmów. Czułość metody sięga 100%, wszystkie wykryte w ten sposób odstępstwa od kontroli muszą zostać zsekwencjonowane, aby dokładnie określić zmianę.

Inną równie czułą techniką pośrednią jest denaturacja DNA z wysoką rozdzielczością - HRM (*high resolution melting*). Można ją wykorzystać do poszukiwań nowych mutacji oraz polimorfizmów takich jak pojedyncze zmiany nukleotydowe (SNP-*single nucleotide polymorphism*). Metoda ta opiera się na detekcji małych różnic temperatury topnienia (czyli temperatury w której dwie nici DNA ulegają rozpleceniu, a która zależy od stosunku par AT do GC) między badanymi sekwencjami. W czasie reakcji PCR jednym ze składników mieszaniny reakcyjnej jest fluorescencyjny znacznik interkalujący do podwójnej nici DNA. Gdy znacznik jest włączony do dsDNA jego detekcja jest bardzo łatwa, gdyż intensywność sygnału jest duża, natomiast gdy nici DNA ulegną rozpleceniu - sygnał prawie zanika. Po zakończeniu reakcji PCR badane fragmenty poddaje się działaniu temperatury, w momencie gdy następuje denaturacja intensywność sygnału zmienia się co przedstawiane jest za pomocą wykresu jako krzywe topnienia odmienne dla różnych sekwencji. Metoda ta jest bardzo szybka oraz tania, jednak czułość jej spada wraz z długością analizowanych fragmentów.

Do poszukiwań dużych rearanżacji genów wykorzystać można kilka technik, są one między sobą zróżnicowane i mogą służyć do wykrywania znanych bądź nowych zmian. Jedną z powszechnie kiedyś używanych jest metoda Southerna (*Southern blotting*). Jest ona oparta na hybrydyzacji i pozwala na detekcję zarówno zmian liczbowych jak i translokacji czy inwersji. Badane DNA najczęściej poddaje się działaniu enzymów restrykcyjnych i następnie przeprowadza rozdział za pomocą elektroforezy. Kolejnym etapem jest transfer fragmentów DNA na membranę i uwidacznianie ich poprzez hybrydyzację z wyznakowanymi odpowiednio sondami.

Coraz powszechniej stosuje się metodę MLPA opracowaną przez MRC Holland (Holandia), która pozwala na jednoczesną analizę zaburzeń liczby kopii wielu badanych eksonów (do 40). Stosuje się tutaj pary sond komplementarnych do

sąsiadujących ze sobą sekwencji analizowanych fragmentów. Sondy, poza sekwencjami hybrydującymi do sekwencji badanych eksonów, zawierają, jednakowe dla wszystkich par, sekwencje starterowe. Ponadto jedna sonda z każdej pary ma dodatkowo przyłączoną wstawkę (o określonej długości), umożliwiającą rozróżnienie sond w czasie elektroforezy kapilarnej. W momencie, gdy analizowany fragment jest niezmienny sondy są w stanie się do niego prawidłowo przyłączyć, a następnie za pomocą ligazy są scalane stając się matrycą w reakcji PCR. Startery wykorzystywane w czasie reakcji PCR są wyznakowane fluorescencyjnie umożliwiając detekcję w czasie elektroforezy. Liczba kopii produktu otrzymanego po PCR jest proporcjonalna do liczby kopii sekwencji matrycowej co odzwierciedla się w intensywności sygnału. Jeżeli natężenie sygnału próbki jest zawyżone do 130-150% (przy porównaniu do sond kontrolnych rozrzuconych po genomie) można mówić o duplikacji danego fragmentu, gdy natomiast sygnał jest obniżony o 30-50% to nastąpiła delecja eksonu. Niewątpliwą zaletą MLPA jest względna prostota wykonania oraz mała ilość DNA potrzebna do badania.

Jedną z technik cytogenetyki molekularnej jaką można wykorzystać do detekcji znanych rearanżacji genomowych oraz scharakteryzowania nowych zmian, jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH– *fluorescence in situ hybridization*). Polega ona na przyłączeniu się sond o znanej sekwencji, do chromosomów bądź jąder interfazalnych. Zastosowanie specyficznych sond pozwala na zlokalizowanie pęknięć chromosomów, określenie translokacji czy wykrycie duplikacji, amplifikacji bądź delecji badanego fragmentu chromosomu. Sondy są wyznakowane fluorochromami, które świecą po wzbudzeniu światłem o określonej długości fali i równoczesne zastosowanie kilku znaczników pozwala na sprecyzowanie zaistniałych przetasowań chromosomowych. Analizę przeprowadza się wykorzystując mikroskop fluorescencyjny.

Inną, ciągle doskonaloną i znajdującą coraz szersze zastosowanie, techniką z pogranicza cytogenetyki i biologii molekularnej jest porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (aCGH). Jedną z odmian tej metody umożliwia ocenę genomu w pojedynczym badaniu z bardzo dużą rozdzielczością sięgającą kilkuset, a w niektórych przypadkach, kilkunastu par zasad. Polega ona na hybrydyzacji do, umieszczonych na nośniku (macierzy), oligonukleotydowych sond (reprezentujących

cały genom lub wybrane chromosomy) badanego DNA wymieszanego, w równym stosunku, z DNA referencyjnym. DNA badane jak i kontrolne są wyznakowane odmiennymi znacznikami fluorescencyjnymi, a analiza polega na laserowym wzbudzeniu fluorescencji i porównaniu jej natężenia dla obu fluorochromów. Komputerowy program analizuje stosunek fluorescencji obu znaczników dla poszczególnych sond, a wynik zostaje przedstawiony w postaci ideogramów chromosomów z zaznaczonymi niezrównoważeniami. Zwiększenie kopii materiału genetycznego diagnozuje się, gdy przeważa fluorescencja znacznika zastosowanego do DNA badanego, natomiast utratę materiału, gdy przeważa sygnał z fluorochromu zastosowanego do wyznakowania DNA referencyjnego. W sytuacji, gdy stosunek obu znaczników jest zbliżony do jedności, wyklucza się aberracje. Podstawową zaletą tej metody jest wysoka rozdzielczość oraz możliwość wykorzystania materiału archiwalnego, wadą natomiast wykrywanie tylko zmian niezrównoważonych.

Coraz większe znaczenie w ocenie zidentyfikowanych zmian sekwencyjnych mają narzędzia *in silico* czyli analiza wykonana za pomocą określonych, bioinformatycznych programów komputerowych, dostępnych często za pomocą Internetu. Pozwalają one między innymi na porównanie sekwencji badanego genu z sekwencjami homologicznych genów zidentyfikowanych u blisko spokrewnionych organizmów, co umożliwi wskazanie fragmentów konserwowanych ewolucyjnie, zidentyfikowanie domen, a nawet lepsze zrozumienie funkcji jego produktu. Poprzez podobne porównanie budowy białek możliwe jest również zweryfikowanie, potencjalnie patogennego, wpływu wykrytej zamiany aminokwasów na funkcjonowanie białka kodowanego przez badany gen. Można tu wymienić SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) czy PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>). Ostatnio często podkreśla się zawziętość procesu wycinania intronów i składania dojrzałego mRNA [Baralle i Barelle 2005; Baralle i wsp. 2006; Chamary i Hurst 2009] oraz jaki wpływ na te procesy mają specyficzne sekwencje nukleotydowe znajdujące się w eksonach i/lub intronach genów. Są to najczęściej heksamery rozpoznawane przez białka z rodziny SR (*serine/arginine rich*), które regulują proces składania RNA, i wyróżnia się w nich zarówno sekwencje wzmacniające ten proces (*exonic/intronic splicing enhancer – ESE/ISE*) jak i osłabiające (*exonic/intronic splicing silencer – ESS/ISS*) [Blencowe 2000, Fairbrother i wsp. 2002, Siala i wsp. 2010]. Wykazano, że substytucje nukleotydowe

w tych sekwencjach mogą skutkować powstaniem alternatywnych miejsc składania mRNA. Sugeruje to, iż nawet potencjalnie niegroźna zmiana typu „*silent*” może mieć bardzo poważne konsekwencje biologiczne. W celu zweryfikowania hipotezy czy zmiana nukleotydu zaburza proces prawidłowego składania mRNA także można wykorzystać narzędzia *in silico* takie jak: ESE Finder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/>) czy HSF (*Human Splicing Finder*, <http://www.umd.be/HSF>)

### **3.7. Podsumowanie**

Zespół Cornellii de Lange przeważnie jest diagnozowany na podstawie cech fenotypu w pierwszym okresie życia pacjenta. Rozwijająca się biologia molekularna dostarcza narzędzi pozwalających na coraz lepsze poznanie i zrozumienie patomechanizmu leżącego u podstaw tego schorzenia. Do tej pory udowodniono występowanie mutacji trzech genów u chorych z CdLS. Najpowszechniej wśród pacjentów diagnozowane są mutacje punktowe w genie *NIPBL* kodującym delanginę, czyli białko regulujące przyłączanie się kompleksu kohezyny do chromatyd siostrzanych. Od momentu odkrycia tego genu w 2004 roku coraz większe znaczenie zaczęto przypisywać poszukiwaniom jego wariantów sekwencyjnych w diagnostyce schorzenia. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że mutacje w tym genie są zlokalizowane wzdłuż całej sekwencji kodującej i nie wykazano występowania tzw.: *hot spot*. Zestawienie wszystkich znanych mutacji (do kwietnia 2010 roku) wskazuje jednak, że nie wszystkie eksony są zaangażowane w zmiany z taką samą częstością [Oliveira i wsp. 2010]. Najwięcej mutacji zlokalizowanych jest w eksonie 10, ale wpływa na to jego wielkość. Ponadto wykazano, że około 80% mutacji zlokalizowanych jest w 21 eksonach, co może sugerować, że molekularną diagnostykę u pacjentów powinno się rozpoczynać od przeanalizowania tych właśnie fragmentów genu. Od momentu zidentyfikowania genu *NIPBL* upłynęło stosunkowo niewiele czasu a zespół Cornellii de Lange występuje z niewielką częstością, więc analiza zmian sekwencyjnych *NIPBL* w planowanej rozprawie doktorskiej może pozwolić na zweryfikowanie tych obserwacji. Wyniki badań różnych autorów wskazują także na istnienie zależności pomiędzy wystąpieniem mutacji w genie *NIPBL* a objawami klinicznymi u pacjentów. Dlatego też jednym z celów niniejszej pracy było dostarczenie kolejnych danych do określenia korelacji między typem mutacji a fenotypem. W niniejszej pracy badanie

mutacji punktowych w wyselekcjonowanych eksonach genu *NIPBL* zaplanowano z wykorzystaniem bardzo czułej oraz szybkiej techniki pośredniej jaką jest DHPLC. Natomiast te eksony, których budowa nukleotydowa uniemożliwia zastosowanie tej metody przesiewowej, poddawane będą od razu sekwencjonowaniu. Nie we wszystkich grupach pacjentów na świecie, u których wykluczono mutację punktową, przeprowadza się dodatkowo analizę dużych rearanżacji genomowych. Dlatego też kolejnym celem niniejszej pracy było określenie częstości tego zjawiska wśród chorych CdLS. Do badań tych zaplanowano wykorzystanie techniki MLPA, charakteryzującej się prostotą wykonania analizy oraz czytelnością otrzymanych wyników. Jednoczesne poszukiwanie zmian sekwencyjnych oraz delecji i/lub duplikacji eksonów genu *NIPBL* pozwoli na otrzymanie wiarygodnych wyników w grupie polskich chorych z CdLS.

#### **4. CELE PRACY**

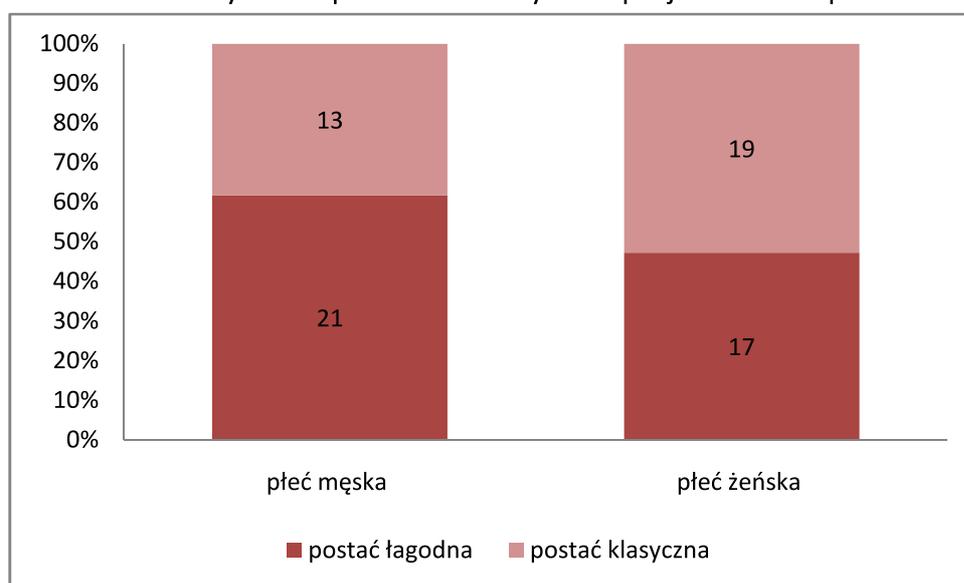
1. Określenie częstości oraz rodzaju mutacji punktowych w sekwencji kodującej genu *NIPBL* u pacjentów z klinicznie rozpoznanym zespołem Cornellii de Lange.
2. Przeprowadzenie analizy dużych rearanżacji w genie *NIPBL* w grupie pacjentów z wykluczoną wcześniej mutacją punktową tego genu.
3. Przeprowadzenie analizy kosegregacyjnej u rodziców pacjentów ze zidentyfikowaną substytucją nukleotydową w genie *NIPBL*.
4. Określenie związku fenotypu z obecnością i rodzajem mutacji w genie *NIPBL*.

## **5. MATERIAŁY I METODY**

### **5.1. Materiał.**

Badania przeprowadzono na grupie 70 pacjentów z terenu całej Polski, z klinicznie rozpoznanym zespołem Cornellii de Lange. Wstępne rozpoznanie było weryfikowane poprzez bezpośrednie konsultacje pacjentów przez specjalistę z genetyki klinicznej dr n. med. Jolantę Wierzbę z Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Badania przeprowadzono tylko u tych pacjentów, których opiekunowie wyrazili na to pisemną zgodę po zapoznaniu się z planem projektu. Pacjenci zakwalifikowani do badań byli w wieku od kilku miesięcy do 40 lat, wśród nich było 36 osób płci żeńskiej i 34 męskiej. Na podstawie systemu punktacji opracowanego do kwalifikowania postaci zespołu (Tab. 2) u 32 osób zidentyfikowano ciężką (klasyczną) postać zespołu, a u 38 postaci łagodną. Na wykresie W. 1 przedstawiono rozkład postaci zespołu dla płci pacjentów.

W. 1. Procentowy udział postaci klinicznych 70 pacjentów z zespołem CdLS.



Od każdego z pacjentów pobrano od 3 do 5ml krwi na antykoagulant i następnie wyizolowano DNA. Równocześnie w przypadku 42 pacjentów, pobrano krew na antykoagulant od jednego lub obojga rodziców, a po wyizolowaniu DNA został zabezpieczony w  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**5.2. Metody.****5.2.1. Aparatura.**

Tab. 4. Zestawienie aparatury wykorzystywanej do analiz.

Aparatura	Producent
Piec do hybrydyzacji	Agilent Technology
Sekwencjator automatyczny ABI PRISM 310	Applied Biosystem
Termocykler, GeneAmp PCR System 2700	
Termocykler, GeneAmp PCR System 2720	
Aparaty do elektroforezy	Bio-Rad
MiniProtean – zestaw do elektroforezy pionowej	
System do archiwizacji żeli Gel Doc 2000	
Zasilacz PowerPac 3000	
Wirówka 5810R	Eppendorf
Wirówka z chłodzeniem 5804	
Wirówka 5415R	
Mini Spin 5452	
Termocykler Mastercycler	
Termomixer	
Skaner do mikromacierzy Genepix 4000B	Genepix
Worteks	Ika
Łaźnia wodna z pokrywą MB-13	Julabo
Cieplarka	Laborgeräte Berlin
Termocykler PTC-200 DNA Engine	MJ-Research
Spektrofotometr NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies
Cieplarka Heraeus Function Line B6	Thermo Elektron Corporation
Zestaw DHPLC - System WAVE 3500	Transgenimic Ltd

Transiluminator	UVP Dual- Intensity Transiluminator
-----------------	--

### 5.2.2. Odczynniki.

Tab. 5. Zestawienie odczynników wykorzystywanych do analiz.

Odczynnik	Producent
Zestaw do izolacji DNA - Genomic Midi AX	A&A Biotechnology
Zestaw do izolacji RNA - total RNA Mini kit	
Zestaw do oczyszczania produktów PCR -Clean-up	
Zestaw do oczyszczania po reakcji z Big Dye - Exterminator	
Genomic Labelling Kit PLUS	Agilent Technology
Human Genomic CGH 105A Oligo Microarray Kit	
Oligo aCGH/ CHIP-on-CHIP Hybridization Kit	
Oligo aCGH/ CHIP-on-CHIP Wash Buffer 1+2	
10x EDTA bufor	Applied Biosystems
5x Sequencing Buffer	
BigDye Terminator Kit wersja 3.1	
Formamid	
Kapilara 47cm x 50µm	
Marker wielkości GeneScan-500 TAMRA	
Polimer POP-4	
ROX Size Standard Gene Scan-500	
Zestaw do syntezy cDNA BioScript™	Bioline Inc.
Akrylamid/bis 37,5:1	Bio-Rad
Marker wielkości M100-500	DNA Gdańsk II
Tris EDTA Buffer Solution pH=8.0	Fluka Analytical
Startery	IBB PAN, Warszawa

Proteinaza K	ICN
10 x bufor do polimerazy	MBI, Fermentas
dNTP (100 µM)	
Marker wielkości Gene Ruler DNA Ladder Low Range	
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	
Taq Polimeraza DNA (5U/µl)	
Chloroform	MERCK
Izopropanol	
SALSA MLPA KIT P141/P142 NIPBL	MRC-Holland
Acetonitryl HPLC	POCH Gliwice
Alkohol etylowy 96%	
Agaroza Basica	Prona
Zestaw do izolacji DNA - QIAamp DNA Mini kit	QIAGEN
Błękit bromofenolowy	SIGMA – Aldrich
Bromek etydyny	
Chlorek amonu	
Chlorek sodu	
Cyjanol ksyleny	
EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy)	
Formamid	
Kwas borowy	
Octan sodu	
Proteinaza K	
Puromycyna	
Sacharoza	
SDS	

TRIS BASE	
Wodorowęglan potasu	
Wymiennik jonowy TEAA Solution, 2M	Transgenomic

### 5.2.3. Wykaz roztworów wykorzystywanych do analiz.

#### Bufor A do DHPLC

100ml wymiennika jonowego TEAA  
uzupełnić ddH<sub>2</sub>O do 2000ml

#### Bufor B do DHPLC

100ml wymiennika jonowego TEAA  
500ml acetonitrylu  
uzupełnić ddH<sub>2</sub>O do 2000ml

#### Bufor C do DHPLC

80ml acetonitrylu  
uzupełnić ddH<sub>2</sub>O do 1000ml

#### Bufor D do DHPLC

750ml acetonitrylu  
uzupełnić ddH<sub>2</sub>O do 1000ml

#### Bufor do Proteinyzy K

100mM NaCl  
10mM TRIS HCl, pH 8.0  
25mM EDTA, pH 8.0  
0,5% SDS

#### Bufor obciążający, stężony 6x

40% sacharoza  
0.25% bromofenol  
0.25% cyjanol ksylenu

#### Bufor RBC, stężony 5x

41.46g NH<sub>4</sub>Cl  
4.6g KHCO<sub>3</sub>  
10ml 0,5M EDTA, pH 8,0  
uzupełnić ddH<sub>2</sub>O do 1000ml

#### Bufor TAE, stężony 50x

242g TRIS  
1ml lodowatego kwasu octowego

100ml 0,5 M EDTA, pH 8,0  
uzupełnić ddH<sub>2</sub>O do 1000ml

**Bufor TBE, stężony 5x**

54g TRIS  
27,5g Kwas borowy  
20ml 0,5 M EDTA, pH 8,0  
uzupełnić ddH<sub>2</sub>O do 1000ml

**Roztwór roboczy akrylamidu (7%) (100 ml)**

1.9ml 50x TAE  
23.5ml 30% akrylamid/bis (37.5:1)

**5.2.4. Izolacja DNA z limfocytów krwi obwodowej.**

W celu przeprowadzenia analizy mutacji punktowych, jak i dużych rearanżacji, genu *NIPBL*, izolowano DNA z limfocytów krwi obwodowej. Izolację tę przeprowadzano za pomocą dwóch metod:

- I) tradycyjną metodą trawienia proteinazą K z ekstrakcją fenol/chloroform i precypitacją etanolem,
- II) z wykorzystaniem zestawu do izolacji DNA: Genomic Midi AX firmy A&A Biotechnology.

Ad. I) Pobraną na antykoagulant krew obwodową przenoszono do 50ml probówek typu „falcon” i postępując zgodnie z protokołem zamieszczonym w Tab. 6 ekstrahowano DNA. Wpierw usuwano erytrocyty działając na nie buforem RBC, następnie limfocyty lizowano roztworem SDS przy równoczesnym trawieniu białek proteinazą K i inaktywacją DNaz za pomocą EDTA. W kolejnym etapie, z wykorzystaniem fenolu oraz chloroformu, oddzielano frakcję DNA od frakcji białek. DNA z roztworu wytrącano izopropanolem, a następnie po wysuszeniu, rozpuszczano w 300µl ddH<sub>2</sub>O.

Tab. 6. Protokół izolacji DNA ze świeżej krwi obwodowej tradycyjną metodą.

1.	5-10 ml krwi pobranej na EDTA przenieść do probówki o poj. 50ml
2.	wirować przez 10 min (3200xg, +4°C), odciągnąć supernatant
3.	osad elementów morfotycznych zalać 10ml buforu 1xRBC, wymieszać
4.	inkubować 10 min w temp. +4°C
5.	wirować przez 10 min (3200xg, +4°C), odciągnąć supernatant
6.	ponownie dodać bufor 1xRBC (5ml), wymieszać, odwirować w w/w warunkach, odciągnąć supernatant
7.	czynność z punktu 6. powtarzać aż do uzyskania białego osadu krwinek

8.	osad zawiesić w 5ml NaCl/EDTA, dodać 500µl 10% SDS i 12µl proteiny K (20mg/ml)
9.	inkubować co najmniej 12h w temp. +37°C
10.	dodać 5ml fenolu (o pH 7.9) i wytrząsać przez 20 min
11.	wirować przez 15min (6000xg, +4°C), górną warstwę przenieść do nowej probówki
12.	dodać 5ml chloroformu, wytrząsać przez 30 min
13.	wirować przez 15min (6000xg, +4°C), górną warstwę przenieść do nowej probówki
14.	czynność z punktu 13. powtórzyć dwukrotnie
15.	dodać 5ml izopropanolu, wymieszać, inkubować 30 min w temp. -20°C
16.	wirować przez 30 min (6000xg, +4°C), zlać supernatant
17.	osad przepłukać dodając 1ml 70% etanolu
18.	wirować przez 15 min (6000xg, +4°C), zlać supernatant
19.	osad wysuszyć
20.	rozpuścić osad DNA w 300µl ddH <sub>2</sub> O

Ad. II) Izolacja, polegająca na użyciu membran jonowo-wymiennych umieszczonych na kolumnach i wiążących DNA, który następnie jest z nich wyłukiwany roztworem soli o wysokiej sile jonowej, po wcześniejszym usunięciu zanieczyszczeń, została przeprowadzona wg zmodyfikowanego protokołu producenta zamieszczonego w Tab. 7.

Tab. 7. Protokół izolacji DNA ze świeżej krwi obwodowej z wykorzystaniem zestawu do izolacji Genomic Midi AX.

1.	2ml krwi pobranej na EDTA przenieść do probówki o poj. 15ml i dodać 2ml Buforu Lizującego L 1.4 oraz 50µl Proteazy
2.	całość wymieszać i inkubować 20min w temp. 50°C
3.	probówki intensywnie wortexować przez 20sek.
4.	całość mieszaniny przenieść na kolumnę umieszczoną w probówce o poj. 15 ml
5.	wirować w rotorze uchylonym 2min (1810xg, +18°C)
6.	przenieść kolumnę do nowej probówki o poj. 15ml, dodać 2,5 ml Buforu Płuczającego K2
7.	wirować w rotorze uchylonym 2min (1810xg, +18°C)
8.	ponownie dodać 2,5ml Buforu Płuczającego K2 i wirować w w/w warunkach
9.	przenieść kolumnę do nowej probówki o poj. 15ml, dodać 0,55 ml Buforu Elucyjnego K3
10.	inkubować 2min w temp. pok.
11.	wirować w rotorze uchylonym 1min (1810xg, +18°C)
12.	ponownie dodać 0,55ml Buforu Elucyjnego K3 i wirować w w/w warunkach
13.	eluat przenieść do probówki typu „ependorf” o poj. 2 ml, dodać 0.8 ml izopropanolu,
14.	wymieszać przez kilkukrotne odwrócenie probówki
15.	wirować przez 15min (6000xg, +4°C), zlać supernatant
16.	osad przepłukać dodając 0.5ml 70% etanolu
17.	wirować przez 10min (6000xg, +4°C), zlać supernatant
18.	wysuszyć osad
19.	rozpuścić osad DNA w 50µl ddH <sub>2</sub> O

W wybranych przypadkach, wykonano ponowną izolację kwasu nukleinowego z wykorzystaniem zestawu do izolacji DNA QIAamp Mini kit firmy QIAGEN. Izolację przeprowadzono wg protokołu załączonego przez producenta.

#### 5.2.5. Izolacja RNA.

Do świeżo pobranej krwi dodawano puromycynę w stężeniu 200µg/ml (SIGMA – Aldrich), a po inkubacji przez 1h w temp. pok. krew zamrożono w -20°C. Puromycyna ma za zadanie zahamować degradację nieprawidłowego mRNA (NMD - *Nonsense-Mediated Decay*). Izolację RNA przeprowadzono korzystając z zestawu total RNA Mini kit (A&A Biotechnology) postępując zgodnie z protokołem załączonym przez producenta.

Za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND-1000 v 3.1.2 przeprowadzono pomiar ilościowy i jakościowy kwasów nukleinowych, a następnie doprowadzano DNA do roboczego stężenia dla reakcji PCR (30 – 50ng/µl).

#### 5.2.6. Synteza cDNA.

Do syntezy cDNA użyto 10µl całkowitego RNA o stężeniu około 50ng/µl korzystając z zestawu Bioscript™ (Bioline Inc.). W czasie syntezy postępowano wg protokołu producenta.

#### 5.2.7. Amplifikacja sekwencji kodującej genu *NIPBL*.

Sekwencje kodujących eksonów wraz z flankującymi fragmentami intronów genu *NIPBL* zostały zamplifikowane za pomocą reakcji PCR z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych z użyciem programu Primer3input na podstawie sekwencji genu *NIPBL* ([ENST00000282516](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ENST00000282516), dostępna w bazie internetowej Ensembl <http://www.ensembl.org>). Eksony 9 i 10, ze względu na duże rozmiary, zostały podzielone na kilka, zachodzących na siebie, fragmentów ułatwiających przeprowadzenie analizy. Z kolei z powodu niewielkich długości eksonów oraz krótkie sekwencje intronowe pomiędzy eksonami następujące fragmenty amplifikowano łącznie: 13-14, 28-29 oraz 35-36. łącznie opracowano startery dla 49 ampliconów – ich sekwencje zostały przedstawione w Tab. 8.

Tab. 8. Zestawienie starterów dla amplikonów, warunków amplifikacji, metod analizy amplikonu oraz przybliżonej długości produktów amplifikacji.

Amplikon	Pary starterów (F- forward, R- reverse)	MgCl <sub>2</sub> μl/próbka	Temperatura przyłączania starterów (w °C)	Metoda analizy amplikonu	Temperatury rozdziatu na DHPLC (w °C)	Przybliżona długość produktu (pz)
<b>2</b>	F- TGTGTTGCAGTGTGGAAAT R- AGGCTGCTGATACCTCCAAC	2	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	390
<b>3</b>	F- AGAGACTTCTATAGTCACTC R- TATTCTCCCTCGGATATGG	2	63-56/56	DHPLC	54/58	360
<b>4</b>	F- ATTGTTGGCCATACCCAGTG R- CTTGTTAAAGAAGACACCTGG	2	63-56/56	DHPLC	53/56.2/59.5	300
<b>5</b>	F- TAGAAGAAAAATAACGTTCTGTA R- AATCCACCATTACCTAAATGT	2	63-56/56	DHPLC	53.2/55.2/57	230
<b>6</b>	F- CTAAGAGATCAGAGGACTTT R- TGGAAATTAAGCACTTAGAC	3	63-56/56	DHPLC	54.5/57.5/60	300
<b>7</b>	F- AGTCAGTACATGAGTATCTG R- CCCAGTATAATGATATACGG	2	63-56/56	DHPLC	51.4/56.5/57.4	400
<b>8</b>	F- TTATGTCCTTATTGGTTCTC R- CTGAGTTCTTTATTCAACTTC	2	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	250
<b>9A</b>	F- CACAACGTACTTCTATCGA R- TGTCCTGGTACTGCACA	2	63-56/56	DHPLC	52.3/55.2/56.8	360
<b>9B</b>	F- AACTTACATTAAGACTTTCTC R- ATGATGAAGTGGTAATAATGAG	2	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	460
<b>10A</b>	F- AAAGAATAAACAAACGTCATAGG R- CTCAGGATGTTTTCTGGTG	2	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	380
<b>10B</b>	F- GATATTGTTGGAAGCTTAAATC R- ATGGTCTCTCGTTTTGTTTG	2	63-56/56	DHPLC	56.7	250
<b>10C</b>	F- CAGAATGAGAGCAGAACAACTG R- CTTCCATCACCCCTTCTGTTTTG	2,5	68-61/61	Sekwencjonowanie	-	240

MATERIAŁY I METODY

Amplikon	Pary starterów (F- forward, R- reverse)	MgCl <sub>2</sub> μl/próbka	Temperatura przyłączania starterów (w °C)	Metoda analizy amplikonu	Temperatury rozdziału na DHPLC (w °C)	Przybliżona długość produktu (pz)
<b>10D</b>	F- AGTGATGGGCATCCTGAAAC R- CTTCGAACCTAGACTGATC	2	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	375
<b>10E</b>	F- TGAATCAGAGCGACATCGAG R- CCCCCAACAAAATAACTTGGAA	2,5	63-56/56	DHPLC	55.5/57.2	360
<b>10F</b>	F- TTCCAAGTTATTTGTTGGGG R- TTATATTTTCATGTAGTGCCTTC	3	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	415
<b>11</b>	F- TTATGCTAACTTAGTTAAAAATTTTC R- AATTAAGGTGACTGTGCCTTTTG	3	63-56/56	DHPLC	52/55/58.2	360
<b>12</b>	F- TTGTCATGGGGATTTGCTTC R- CTTAAACGATAATCACTGCAC	2,5	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	260
<b>13-14</b>	F- GTTGTGAGTCCTGCATTTTCAG R- AGTTAAGACACTAGAGATGTG	2	68-61/61	DHPLC	53.8/54.8	350
<b>15</b>	F- GGTTTACTTGAGGTTTATATATAG R- TCAGAAAGTCAACAATGAGTTTTTC	3	68-61/61	DHPLC	50.8/53.3/56.5	380
<b>16</b>	F- CCTCCATATGCTCAAAAGGGAA R- TAAGGGTAAAAATTAACAGTATGG	2,5	63-56/56	DHPLC	53.3/54.9	220
<b>17</b>	F- TCCACAGTGAAAAATCAAATC R- TTTTGGTGCCATTTTAAAGTCC	2	68-61/61	Sekwencjonowanie	-	405
<b>18</b>	F- TTATCTCCAGGTTCTGTAGC R- CTAGGTTTACTAGACTTAATCA	3	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	340
<b>19</b>	F- GATAGAATGTTACTGAAATCAAC R- TGTTTTTATTTGTTGGGTAACATAA	3	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	190
<b>20</b>	F- CATTTTCATTTAAATGGCAGGT R- GTGGTTCTTCATTAACCTTGAC	2,5	63-56/56	DHPLC	51.8/53.8/54.9	250
<b>21</b>	F- TGGCAAAACACAGTATCGTAA R- TATAAGAAATGACAGAGAAATATAGG	3	63-56/56	DHPLC	52.9/54.2/55.5	310

MATERIAŁY I METODY

Amplikon	Pary starterów (F- forward, R- reverse)	MgCl <sub>2</sub> μl/próbka	Temperatura przyłączania starterów (w °C)	Metoda analizy amplikonu	Temperatury rozdziatu na DHPLC (w °C)	Przybliżona długość produktu (pz)
<b>22</b>	F- CATGACAAATAGCAACAGGGC R- TGGCAGGAAATGGATTTCATC	3	63-56/56	DHPLC	53.2/56	240
<b>23</b>	F- ATGTTGGTAGACAGATGACTG R- CATTATGTTGTCTTCTAGTAATC	2,5	63-56/56	DHPLC	56.7/57.5	250
<b>24</b>	F- GGAATTTATATGATAAATTG R- GACATGCAAAAGAAAATAACTAT	2	51	Sekwencjonowanie	-	290
<b>25</b>	F- TACAATTAGGTGATTTATTAAG R- CTACCTCCCAATTTCTT	2	51	DHPLC	53.2/54.2/55.5	340
<b>26</b>	F- CATCAAGCTCAAGTCTGTCTAA R- ATAAATGTAACACTGTTTCTCCTT	2,5	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	300
<b>27</b>	F- ATATCTATTTCCCTAAGTTAC R- ATCAATATCACTGTATAAGG	2	52	Sekwencjonowanie	-	230
<b>28-29</b>	F- ACAAAAAATGTCAATGTT R- TTTTCTAACTTAACACTTT	2	51	Sekwencjonowanie	-	470
<b>30</b>	F- TCTAAATTCATACACTAGGC R- AAATTTAAAAACAGTCAACACT	2	55	DHPLC	53.7/55	360
<b>31</b>	F- GCCTAATGAGAAATTTGGAATTGT R- GGCCTCAATTAGGTCTGGAT	2,5	63-56/56	DHPLC	54.3/55.9/57.3	310
<b>32</b>	F- GGCTAAAGCATAACAAAAGTATATT R- AATAAAATTTCCCTACCAAAAAGAA	2,5	63-56/56	DHPLC	53.1/56.4/58.9	230
<b>33</b>	F- ATATAGTTGTTGSSGTCCGAAGAGGATT R- AATCATTAGACAAGCAGGCCAGAG	2	68-61/61	Sekwencjonowanie	-	300
<b>34</b>	F- CTTGTCATATTTTAGTGTCTT R- GCATGTGAACCTCTAAAATTTA	2	55	DHPLC	52.1/54.5/56.5	330
<b>35-36</b>	F- ATATAGTTTCTTTTCAGGTTTTGGAT R- GCAGAATAATTTTAAAAACCCCTGGTA	2	68-61/61	Sekwencjonowanie	-	475

MATERIAŁY I METODY

Amplikon	Pary starterów (F- forward, R- reverse)	MgCl <sub>2</sub> μl/próbka	Temperatura przyłączania starterów T <sub>A</sub> (w °C)	Metoda analizy amplikonu	Temperatury rozdziálu na DHPLC (w °C)	Przybliżona długość produktu (pz)
<b>37</b>	F- TAGTAGTAATTACTTTGAACTTAG R- CAGTGCCATATAGCTCTATG	2,5	63-56/56	DHPLC	52.4/54.8/57.4	280
<b>38</b>	F- TAAGTTACTGTTTCATGAACACT R- TGACAAGAATGCAACCCAGT	2	58	DHPLC	54	305
<b>39</b>	F- AATTTTTGAAATAAGGAGCCGTTT R- GAAATTTCTTCATCTAACAAATAAGG	2,5	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	390
<b>40</b>	F- GTAAAGTTAGTATAGGTGCTC R- AGTGCTGCTGCCATAAAACA	2	63-56/56	DHPLC	56.4/57.4/58.5	270
<b>41</b>	F- AGTTTTGACATATGTTCTAAATAGAG R- TAGAAGATAGGTACTAAGTAAGAC	2	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	300
<b>42</b>	F- TGAAGCTAGCCTCAGAATGTAA R- ACTTAATGAAGTTACTATCATATAC	2	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	400
<b>43</b>	F- TGGTTGGGTTTCTAGATTATCC R- GCACTTTGACAGATGGATTAAG	2	63-56/56	DHPLC	55.4/56.8/57.5	250
<b>44</b>	F- TCAAGCTGTTGAATGGAGCATA R- TTCTCTCACTGCTTATGTAACC	2,5	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	380
<b>45</b>	F- CATTAAATATGGTGCTTCCTACC R- CCCCCACATTTACTTTGTCAAAA	2	63-56/56	DHPLC	54.4/57.5/57.1	330
<b>46</b>	F- TCTGTTTCACCCACACCCAAA R- TACGCTGCGAAATACGTTGA	2,5	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	330
<b>47</b>	F- GCGTCAAGGGGATTA AAAAGCA R- ATGTTTGCCCAACATTTCTCT	2,5	63-56/56	Sekwencjonowanie	-	570

Tab. 9. Składniki mieszaniny reakcyjnej stosowanej do reakcji PCR z różną zawartością jonów magnezu.

Składniki mieszaniny	Objętość w $\mu\text{l}$ /próbka		
	18,9	18,4	17,7
ddH <sub>2</sub> O	18,9	18,4	17,7
10xbufor	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	2,5	3
dNTP mix (10mM)	0,5	0,5	1
Startery (10 $\mu\text{M}$ )	0,5/0,5	0,5/0,5	0,5/0,5
Polimeraza (5U/ $\mu\text{l}$ )	0,12	0,12	0,12
DNA (30-50 $\mu\text{l}$ )	1	1	1

Reakcję amplifikacji przeprowadzano w objętości 25 $\mu\text{l}$  zgodnie z profilem termicznym przedstawionym w Tab. 10. Dla każdego amplikonu empirycznie ustalono optymalne temperatury przyłączania starterów ( $T_A$ , zestawione w Tab. 8). W podobny sposób, w zależności od stężenia jonów magnezu, ustalono skład mieszaniny reakcyjnej (zestawione w Tab. 8 oraz Tab. 9). Każdorazowo w reakcji PCR, w celu kontroli prawidłowego jej przeprowadzenia, stosowano kontrolę negatywną, którą stanowiła próbka z jałową wodą. Po zakończeniu amplifikacji obecność produktu oraz specyficzność reakcji sprawdzano przy pomocy elektroforezy agarozowej.

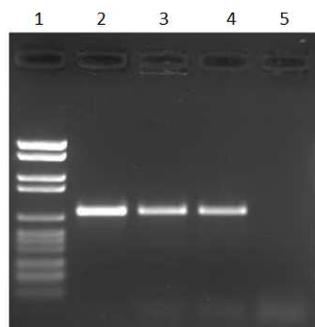
Tab. 10. Profil termiczny reakcji PCR.

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94°C	5'	1
Denaturacja	94°C	30''	35
Przyłączanie starterów	$T_A$	30''	
Wydłużanie	72°C	45''	
Wydłużanie końcowe	72°C	5'	1

#### 5.2.8. Elektroforeza agarozowa.

Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji PCR przeprowadzano na 2% żelu agarozowym (z dodatkiem bromku etydyny) zanurzonym w buforze 1xTBE. Do studzienek żelu наносono po 5 $\mu\text{l}$  produkt PCR wymieszanych wcześniej z 3 $\mu\text{l}$

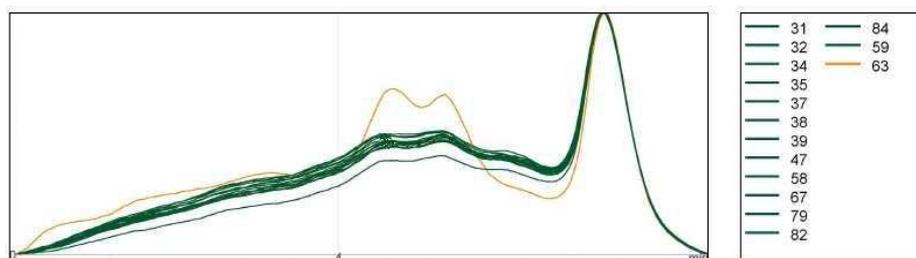
buforu obciążającego i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny, w obecności markera wielkości, przy stałym napięciu 140V przez około 30min. Po wizualizacji prążków w świetle UV uzyskany obraz archiwizowano z użyciem systemu Gel Doc 2000 (Bio-Rad).



Ryc. 9. Przykładowy żel agarozowy wybarwiony bromkiem etydyny po rozdziale produktu amplifikacji fragmentu 9B genu *NIPBL*.  
1-marker wielkości; 2, 3, 4 - zamplifikowane fragmenty; 5 - kontrola negatywna.

#### 5.2.9. Wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa DHPLC.

DHPLC jest czułą techniką pośrednią służącą wykrywaniu zmian w sekwencjach nukleotydów wykorzystującą wysoką rozdzielczość złóż kolumn chromatograficznych. Oparta jest na detekcji, powstających w warunkach częściowej denaturacji termicznej, heterodupleksów (pomiędzy nicią prawidłową i z mutacją), które z kolumny są szybciej wmywane niż homodupleksy. Z wykorzystaniem oprogramowania Transgenomic Navigator™ Software wyselekcjonowano eksony genu *NIPBL*, których budowa umożliwiła pokrycie w całości domenami topnienia, a tym samym przeprowadzenie miarodajnej analizy oraz opracowano optymalne warunki jej przeprowadzenia. Temperatury zastosowane do przebadania poszczególnych amplikonów zostały zestawione w Tab. 8. Rozdział hetero- i homo-dupleksów jest monitorowany i przedstawiany graficznie jako chromatograf, wszystkie próbki o odmiennym profilu pików były ponownie amplifikowane i następnie analizowane za pomocą sekwencjonowania.



Ryc. 10. Przykładowy zmieniony obraz chromatogramu dla pacjenta CdLS-63 (amplikon 45 genu *NIPBL*, temp. rozdziału 54.4°C).

#### 5.2.10. Sekwencjonowanie produktów PCR.

Wszystkie zakwalifikowane wcześniej amplikony oraz te próbki, których obraz w czasie analizy DHPLC przedstawiał odmienny wzór chromatografu zostały poddane reakcji sekwencjonowania. Uzyskane w trakcie reakcji PCR produkty oczyszczano za pomocą zestawu Clean-up (A&A Biotechnology). Protokół postępowania był zgodny z zaleceniami producenta.

Dla każdej próbki, przeprowadzono dwie reakcje sekwencjonowania – pierwszą z użyciem startera sensownego (*forward*), drugą ze starterem antysensownym (*reverse*). Skład mieszaniny reakcji z dideoksynukleotydami (ddNTPs), oraz zestawem do sekwencjonowania BigDye Terminator Kit (Applied Biosystem) przedstawiono w Tab. 11, a warunki reakcji w Tab. 12.

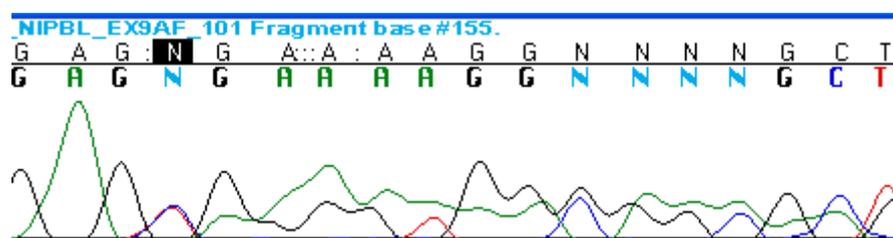
Tab. 11. Składniki mieszaniny reakcyjnej stosowanej do amplifikacji produktu do sekwencjonowania.

Składnik mieszaniny	Objętość (μl/próbka)
<b>BDT v 3.1</b>	1
<b>Bufor</b>	3
<b>Starter F lub R (1μM)</b>	2
<b>Produkt PCR</b>	4
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	5

Tab. 12. Warunki amplifikacji produktu do sekwencjonowania.

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95°C	2'	1
Denaturacja	95°C	10''	25
Przyłączanie starterów	50°C	5''	
Wydłużanie	60°C	4'	

W celu pozbycia się znakowanych ddNTPs, które nie zostały wykorzystane w trakcie reakcji, uzyskany produkt oczyszczano przy użyciu zestawu Exterminator (A&A Biotechnology) postępując zgodnie z protokołem producenta. Tak przygotowaną próbkę denaturowano (95°C/3') a następnie schładzano do 4°C, aby uniemożliwić renaturację DNA. Odczyt sekwencji przeprowadzano w analizatorze automatycznym ABI PRISM 310 (Applied Biosystems), przy użyciu oprogramowania Data Collection Software, a zebrane dane analizowano za pomocą programu Sequencing Analysis Software. Otrzymaną sekwencję porównywano z sekwencją referencyjną, dostępną w bazie Ensembl, za pomocą demo programu Sequencher.



Ryc. 11. Przykładowy elektorforogram ze zmienioną sekwencją amplikonu 9A (pacjent CdLS-101).

#### 5.2.11. Badanie wpływu mutacji w miejscu konsensus na proces składania mRNA.

Aby potwierdzić wpływ delekcji guaniny w miejscu donorowym intronu 16 na nieprawidłowe składanie mRNA, po zsyntetyzowaniu cDNA, przeprowadzono amplifikację badanego fragmentu korzystając ze specjalnie zaprojektowanych starterów: *forward* F: CCTCAGGAAGTCTTAGGAA (zlokalizowanego w eksonie 15) oraz *reverse* R: ATTTAGCCCGTTTTGCTTTTGACC (zakotwiczonego w eksonie 18), dla których  $T_A$  wynosiło 60°C. Reakcję przeprowadzano w objętości 33μl, jej warunki

zestawiono w Tab. 13, a profil termiczny w Tab. 14. Obecność prawidłowego fragmentu o długości ~440pz oraz drugiego z prawdopodobną delecją eksonu 16 (o długości ~355pz) wykazano stosując elektroforezę poliakrylamidową.

Tab. 13. Składniki mieszaniny reakcyjnej stosowanej do amplifikacji fragmentu cDNA.

Składniki mieszaniny	Objętość (μl/próbka)
ddH <sub>2</sub> O	17,9
10xbufor	3
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3,5
dNTP mix (10mM)	2
Startery (10μM)	2/2
Polimeraza (5U/μl)	0,6
cDNA	2

Tab. 14. Warunki amplifikacji badanego fragmentu.

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94°C	5'	1
Denaturacja	94°C	30''	40
Przyłączanie starterów	T <sub>A</sub>	45''	
Wydłużanie	72°C	1'30''	
Wydłużanie końcowe	72°C	5'	1

W podobnych warunkach (Tab. 13 i Tab. 14) zbadano wpływ delecji adeniny w miejscu akceptorowym 29 intronu (prowadzącą do ominięcia eksonu 30). Po uzyskaniu cDNA przeprowadzono amplifikację z zastosowaniem starterów: sensownego F: CGAACAAAAGCCATGAAGTG (zakotwiczonego w eksonie 28) i antysensownego R: TCCTCTTCGGACTTCAACAAG (zlokalizowanego w eksonie 32), które przyłączano w temperaturze 68°C. Po zakończeniu amplifikacji obecność dwóch fragmentów: prawidłowego o długości ~520pz oraz drugiego (z prawdopodobną delecją eksonu 30) o długości ~380pz, sprawdzano rozdzielając produkt PCR na żelu poliakrylamidowym.

#### 5.2.12. Elektroforeza poliakrylamidowa.

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono na 7% żelu poliakrylamidowym. Produkt amplifikacji oraz marker wielkości, zawieszony w buforze obciążającym, nanoszono do studzienek na żelu i przeprowadzono elektroforezę przy stałym napięciu 200V przez ok. 30min. Następnie żel inkubowano w roztworze bromku etydyny, a po wizualizacji prążków w świetle UV obraz zarchiwizowano z użyciem systemu Gel Doc 2000.

#### 5.2.13. Badanie dużych rearanżacji.

Wśród 44 pacjentów, u których nie wykryto mutacji punktowej genu *NIPBL* przeprowadzono analizę dużych rearanżacji genomowych (delecji lub duplikacji całych eksonów) za pomocą techniki MLPA. Badania wykonano specjalnie dobranym zestawem kitów dla genu *NIPBL*: SALSA MLPA KIT 141 i 142 (firmy MRC-Holland). Pierwszy kit zawiera wyznakowane fluorochromem sondy dla nieparzystych eksonów genu *NIPBL*, a drugi dla eksonów parzystych oraz dodatkowo dla eksonu pierwszego. Ponadto oba zestawy zawierają sondy łączące się w różnych miejscach w genomie tworząc wewnętrzne kontrole jakości DNA. Podział sond na dwa zestawy pozwala przeanalizować całość genu oraz wykluczyć wyniki fałszywie dodatnie uzyskane podczas analizy MLPA. Zestaw P141 zawiera 35 sond, łączących się z analizowanymi eksonami genu *NIPBL* bądź specyficznymi w genomie (kontrola wewnętrzna), o długości produktu amplifikacji od 135 do 418pz. Ponadto zawiera pięć fragmentów kontrolnych, których produkty o długości mniejszej niż 120pz stanowią kontrolę poprawności przeprowadzenia wszystkich etapów analizy (cztery kontrole Q- *Quantity control fragments*, jedna kontrola D- *Denaturation control fragments*). Drugi zestaw P142, obok kontroli reakcji Q i D, zawiera 36 sond specyficznych dla badanych eksonów oraz kontroli wewnętrznych, których produkty amplifikacji mają długość od 137 do 418 par zasad.

Każdy eksperyment oprócz DNA pacjentów zawierał trzy próbki referencyjne od osób zdrowych, jedną próbkę kontrolną DNA ze zidentyfikowaną w gdańskim

ośrodka delecją obejmującą eksony 35-47 genu *NIPBL* (dzięki uprzejmości dr n. med. M. Ratajskiej) oraz kontrolę negatywną reakcji (zawierającą jałową wodę) (Tab. 15).

Tab. 15. Protokół przeprowadzenia reakcji MLPA.

<b>DZIEŃ 1</b>				
1.	5μl DNA (o stężeniu 20-50ng/ μl) denaturować przez 5min w 98°C			
2.	obniżyć temp. do 25°C			
3.	dodać 3μl <i>SALSA mix</i> (na próbkę) [1,5μl <i>SALSA probemix</i> + 1,5μl <i>MLPA Buffer</i> ]			
4.	wymieszać przez pipetowanie			
5.	inkubować przez 1 min w 95°C			
6.	inkubować przez co najmniej 16h w 60°C			
<b>DZIEŃ 2</b>				
1.	obniżyć temp. do 54°C			
2.	dodać 32μl <i>Ligase-65 mix</i> (na próbkę) [25μl H <sub>2</sub> O + 3μl <i>Ligase-65 buffer A</i> + 3μl <i>Ligase-65 buffer B</i> + 1μl <i>Ligase-65</i> ]			
3.	wymieszać przez pipetowanie			
4.	inkubować przez 15min w 54°C			
5.	denaturować przez 5min w 98°C			
6.	obniżyć temp. do 4°C			
7.	przygotować i opisać nowe próbki			
8.	dodać 30μl <i>PCR mix</i> (na próbkę) do nowo przygotowanych próbek [26μl H <sub>2</sub> O + 4μl <i>SALSA PCR Buffer</i> ]			
9.	dodać 10μl produktu ligacji MLPA			
10.	krótco zwirować			
11.	inkubować w 60°C przez czas następnego etapu			
12.	dodać 10μl <i>Polymerase mix</i> (na próbkę) [5,5μl H <sub>2</sub> O + 2μl <i>SALSA PCR primers</i> + 2μl <i>SALSA Enzyme dilution Buffer</i> + 0,5μl <i>SALSA polymerase</i> ]			
13.	rozpocząć reakcję PCR			
	Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
	Denaturacja	95°C	30''	35
	Przyłączanie starterów	60°C	30''	
	Wydłużanie	72°C	1'	
	Wydłużanie końcowe	72°C	20'	1

Po zakończeniu eksperymentu uzyskane produkty reakcji PCR-MLPA rozdzielano za pomocą elektroforezy kapilarnej, a dzięki wbudowanym znacznikom fluorescencyjnym, identyfikowano poszczególne sondy w trakcie rozdziatu. W celu

ograniczenia negatywnego wpływu buforów po reakcji PCR na rozdział w kapilarze oraz aby uzyskać prawidłowe natężenia sygnału dla poszczególnych fragmentów, przygotowywano mieszaninę wg wartości przedstawionych w Tab. 16.

Tab. 16. Składniki mieszaniny rozdziału produktów PCR-MLPA.

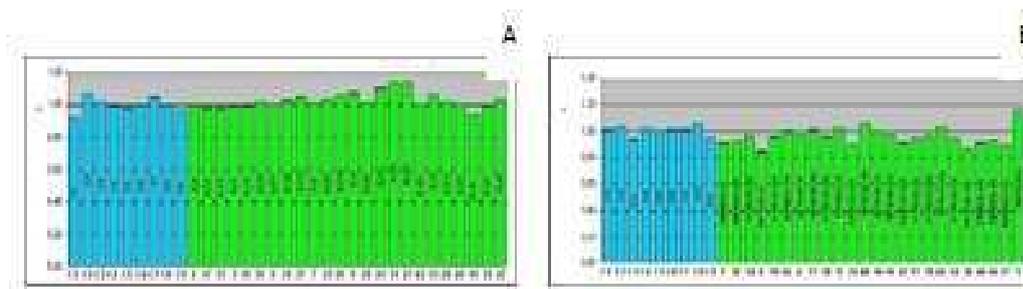
Składnik mieszaniny	Objętość ( $\mu$ l/próbka)
formamid	13,5
Produkt PCR-MLPA	0,75
ddH <sub>2</sub> O	0,75
Marker wielkości Standard ROX_500	0,5

Elektroforezę kapilarną, po ustaleniu optymalnych warunków rozdziału (Tab. 17), przeprowadzono w analizatorze automatycznym ABI Prism 310 (Applied Biosystem) z odpowiednim oprogramowaniem, który odczytywał wielkości i powierzchnie pików reprezentujących poszczególne sondy.

Tab. 17. Warunki elektroforezy kapilarnej.

Czas nastrzyku	Napięcie nastrzyku	Napięcie rozdziału	Temperatura rozdziału	Czas rozdziału
25''	1.6kV	10kV	60°C	50'

Analizę diagramów uzyskanych po elektroforezie przeprowadzono za pomocą arkusza kalkulacyjnego zaprojektowanego na podstawie programu Microsoft Excel (<http://www.mrc-holland.com>), do którego przenoszono wartości opisujące wysokość każdego pików. Początkowo dane w arkuszu są normalizowane przez porównanie wartości pików sond reprezentujących badane eksony do wartości pików sond kontroli wewnętrznych. Proces ten jest przeprowadzany zarówno dla próbek badanych, trzech próbek referencyjnych, oraz kontroli delecyjnej. Następnie uzyskane znormalizowane wartości dla prób badanych są porównywane z wartościami referencyjnymi dzięki czemu otrzymuje się histogramy dla badanych eksonów o określonym współczynniku RPA (*ratio probe amplification*). Zgodnie z zaleceniami MRC-Holland współczynnik RPA w przedziale 70-130% przyjęto jako brak zmian liczbowych (norma).



Ryc. 11. Przykładowe histogramy przedstawiające prawidłowy wynik analizy MLPA o RPA w przedziale 70-130% (pacjent CdLS-59).  
 A- kit P141 (eksony nieparzyste), B- kit P142 (eksony parzyste)  
 Kolorem zielonym przedstawiono wartości dla sond zlokalizowanych w eksonach genu *NIPBL*, kolorem niebieskim dla sond kontrolnych rozrzuconych po genomie.

#### 5.2.14. Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy - aCGH.

W celu potwierdzenia wyniku uzyskanego dzięki technice MLPA sugerującego delecję całego allelu (współczynnik RPA poniżej 70%) oraz dokładnego ustalenia miejsc pęknięć, przeprowadzano porównawczą hybrydyzację genomową. Po ponownym wyizolowaniu DNA, za pomocą zestawu do izolacji firmy QIAGEN, przeprowadzono porównawczą hybrydyzację genomową na macierzy Human Genomic CGH 105A Oligo Microarray (Agilent Technology) zawierającej około 100 tysięcy oligonukleotydowych sond reprezentujących sekwencje z całego genomu. CGH do mikromacierzy przeprowadzono postępując zgodnie z protokołem zamieszczonym w Tab. 18.

Tab. 18. Protokół wykonania porównawczej hybrydyzacji genomowej.

DZIEŃ 1	
1.	rozwinąć DNA przez 1h w 55°C, następnie zmierzyć stężenie
2.	przygotować 22µl wodnego roztworu o zawartości 1,5µg DNA (oddzielnie dla DNA badanego i referencyjnego)
3.	dodać 3,8 µl <i>digestion solution mix</i> (na próbkę) [2,6µl buforu do enzymów restrykcyjnych + 0,2µl BSA + 0,5µl <i>AluI</i> + 0,5µl <i>RsaI</i> ]
4.	wymieszać przez pipetowanie
5.	inkubować przez 2h w 37°C, w międzyczasie przygotować 1,5% żel agarozowy
6.	inkubować przez 20min w 65°C
7.	umieścić na lodzie na co najmniej 5min, odjąć 2µl mieszaniny aby przeprowadzić elektroforezę

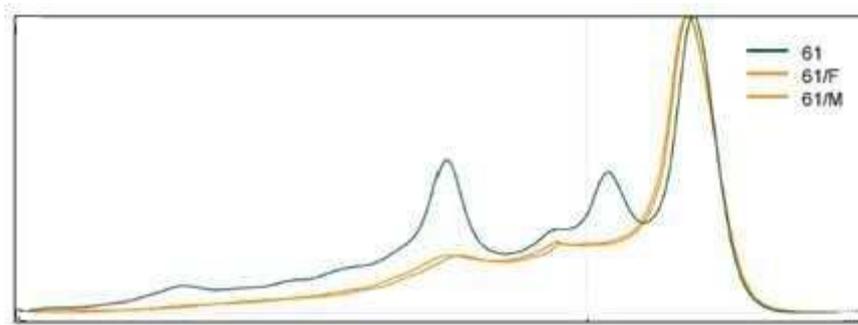
8.	dodać 5µl <i>random primer</i> (na próbkę)
9.	inkubować przez 3min w 95°C, umieścić na lodzie na co najmniej 5min
10.	przygotować 21µl <i>labelling mix</i> (na próbkę), oddzielnie dla DNA badanego i referencyjnego [10µl <i>5xbuffer</i> + 2µl H <sub>2</sub> O + 5µl 10xdNTPs + 3µl Cy5 (lub Cy3) + 1µl <i>Exo-Klenow</i> ]
11.	wymieszać <i>labelling mix</i> z DNA przez pipetowanie
12.	inkubować przez 2h w 37°C, w międzyczasie sprawdzić na żelu stopień pocięcia DNA enzymami restrykcyjnymi
13.	inkubować przez 10min w 65°C, umieścić na lodzie na co najmniej 5min
14.	dodać 430µl roztworu TE, nanieść na kolumnę do oczyszczania celem usunięcia niezwiązanych znaczników
15.	wirować przez 10min (8000xg, +18°C)
16.	dodać 480µl roztworu TE
17.	wirować przez 10min (8000xg, +18°C)
18.	odwrócić kolumnę, przełożyć do nowych probówek
19.	wirować przez 1 min (8000xg, +18°C)
20.	zmierzyć inkorporację znaczników do DNA za pomocą spektrofotometru Nano-Drop
21.	przygotować 180µl <i>hybridisation mix</i> (na próbkę badaną) [25µl <i>Human Cot-1</i> + 25µl <i>agilent blocking reagent</i> + 130µl <i>agilent 2xhybridisation buffer</i> ]
22.	połączyć DNA badane i referencyjne
23.	dodać 180µl <i>hybridisation mix</i> , wymieszać przez pipetowanie
24.	inkubować przez 3min w 95°C
25.	inkubować przez 30min w 37°C
26.	wymieszać delikatnie, zwirować
27.	mieszankę nałożyć na szkiełko nakrywkowe, przykryć szkiełkiem z sondami, złożyć komorę
28.	inkubować przez 40h w 65°C
<b>DZIEŃ 3</b>	
1.	rozłożyć komorę
2.	szkiełko z sondami zdjąć z nakrywkowego w buforze W1 w temp. pok.
3.	płukać w buforze W1 przez 5min w temp. pok.
4.	płukać w buforze W2 przez 1min w 37°C
5.	płukać w acetonitrylu przez 1min w temp. pok.
6.	szkiełko wysuszyć unikając intensywnego światła

Po zakończeniu hybrydyzacji wypłukiwano nie przyłączony do sond DNA, a po wysuszeniu szkiełka przeprowadzano analizę. W skanerze do mikromacierzy Genepix wzbudzano laserem fluorescencją znaczników: Cy3 przy 532nm długości fali dla DNA badanego, oraz Cy5 przy 635nm długości fali dla DNA referencyjnego. Następnie, po wykluczeniu czynników mogących zakłócić analizę, porównano i

znormalizowano natężenie fluorescencji (Cy3/Cy5) dla poszczególnych sond za pomocą oprogramowania Agilent Feature Extraction (Agilent Technologies). Wyniki, pozwalające na określenie miejsca pęknięć na chromosomie, otrzymano po przeanalizowaniu danych za pomocą programu Agilent DNA Analytics (Agilent Technologies).

#### 5.2.15. Badania kosegregacyjne z wykorzystaniem techniki DHPLC.

Dla 15 pacjentów, u których zidentyfikowano substytucję nukleotydową, dysponowano zabezpieczonym DNA od rodziców. W grupie tej, dla 14 rodzin, przeprowadzono badania kosegregacyjne za pomocą wysokosprawnej denaturującej chromatografii ciekowej. Po przeprowadzeniu reakcji amplifikacji określonego eksonu zarówno u rodziców jak i u pacjenta (wg warunków ustalonych wcześniej dla danego amplikonu) sprawdzano obecności produktu za pomocą elektroforezy agarozowej. Następnie do przeanalizowania produktów wykorzystano DHPL, określając wcześniej optymalną temperaturę rozdziału do uwidocznienia różnicy między sekwencją zmienioną a prawidłową. Po rozdziale porównywano chromatogram dla sekwencji pacjenta do profilu elucji produktów amplifikacji fragmentów z DNA rodziców.



Ryc. 12. Porównanie obrazów chromatogramu pacjenta CdLS-61 i chromatografów rodziców (amplikon 20 genu *NIPBL*, temp. rozdziału 53.8°C).

#### 5.2.16. Narzędzia *in silico*.

W celu zweryfikowania czy wykryte substytucje nukleotydowe zlokalizowane w eksonach genu *NIPBL* zmieniają, rozpoznawane przez białka z rodziny SR uczestniczące w procesie składania mRNA, sekwencje regulujące ten proces, przeprowadzono analizę za pomocą komputerowych narzędzi *in silico*. Zmiany

w sekwencjach mogą prowadzić do utraty miejsca uprzednio rozpoznawanego przez białka lub pojawienia się nowego. Wykorzystano dwie platformy dostępne w Internecie: ESE Finder ([//rulai.cshl.edu/tools/ESE2/](http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/)) oraz HSF ([//www.umd.be/HSF/](http://www.umd.be/HSF/)).

Podobnie, przy zastosowaniu programów do przewidywania efektu biologicznego, sklasyfikowano teoretyczny wpływ wszystkich wykrytych mutacji typu *missence* na kodowane przez gen *NIPBL* białko. Ocenę bioinformatyczną przeprowadzono korzystając z bazy UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>) oraz UniProtKB (<http://www.expasy.ch/sprot>). Wykorzystano także program PolyPhen2 ([//genetics.bwh.harvard.edu/pph/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/)) i SIFT ([//sift.jcvi.org/](http://sift.jcvi.org/)).

#### 5.2.17. Analiza statystyczna.

Do porównania rozkładów uzyskanych wyników wykorzystany został test Chi – kwadrat oraz dokładny test Fischera. We wszystkich przeprowadzonych analizach za istotnie statystycznie przyjęto wartości  $p \leq 0,05$ . Obliczenia statystyczne przeprowadzono za pomocą oprogramowania SYSTEM SAS (Statistical Analysis System).

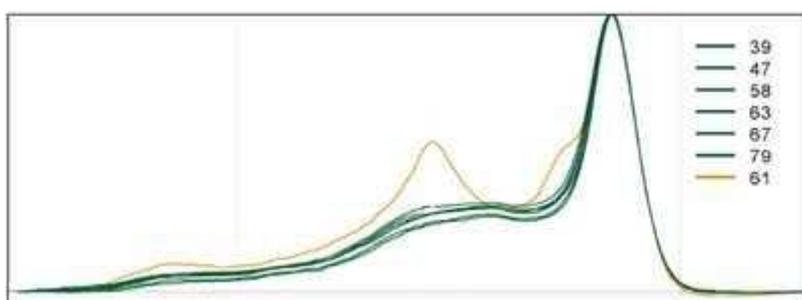
## **6. WYNIKI**

### **6.1. Analiza mutacji punktowych genu *NIPBL*.**

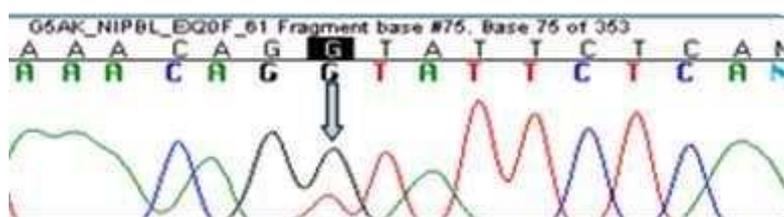
#### **6.1.1. Badania za pomocą DHPLC i sekwencjonowania.**

Do poszukiwania mutacji punktowych genu kodującego delanginę zakwalifikowano 70 pacjentów z zespołem Cornellii de Lange. Analiza molekularna genu *NIPBL* wykazała łączne występowanie 54 wariantów sekwencyjnych, z których 26 było mutacjami, a 28 zakwalifikowano jako zmiany pojedynczej zasady o nieznanym konsekwencjach biologicznych.

Po wytypowaniu za pomocą oprogramowania Transgenomic Navigator™ 26 amplikonów, przeprowadzono analizę pośrednią wykorzystując system DHPLC. W przypadku 12 różnych amplikonów (4, 6, 10B, 10E, 13-14, 16, 20, 30, 34, 40, 43, 45) porównanie chromatogramów wykazało odmienny profil elucji produktów PCR od 34 pacjentów. Fragmenty te ponownie zamplifikowano i poddano reakcji sekwencjonowania, które u 28 pacjentów potwierdziło zmiany nukleotydowe, a w przypadku sześciu chorych wykluczyło odstępstwa od sekwencji prawidłowej.

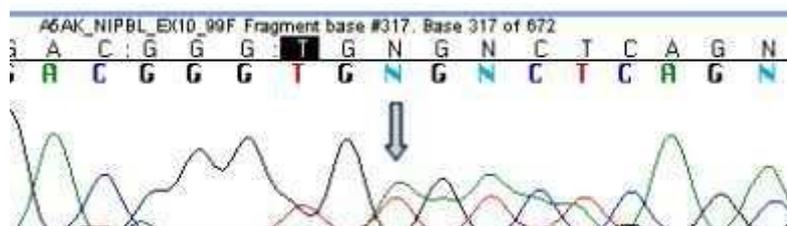


Ryc. 13. Porównanie profilu elucji dla siedmiu pacjentów sugerujące zmienioną sekwencję u pacjenta CdLS-61 (amplikon 20, temp. rozdziału 51.8°C).



Ryc. 14. Elektorforogram potwierdzający zmianę sekwencji u pacjenta CdLS-61 (amplikon 20, strzałką zaznaczono substytucję).

Bezpośrednie sekwencjonowanie pozostałych 23 amplikonów pozwoliło na zidentyfikowanie zmian nukleotydowych u 26 pacjentów w 11 różnych fragmentach (Tab. 19).



Ryc. 15. Zmieniony elektorforogram sekwencji pacjenta CdLS-99 (amplikon 10D, strzałką zaznaczono początek delecji).

Wśród chorych z CdLS zidentyfikowano 28 zmian pojedynczej zasady, które można określić jako polimorfizm lub warianty sekwencyjne o nieznanym efekcie biologicznym. Wśród tych zmian, w przypadku 13 pacjentów (18%), transwersje czy tranzycje nukleotydowe zlokalizowane były w sekwencjach intronów. Natomiast w 15 przypadkach (21%) substytucje występowały w eksonach - u ośmiu chorych (11%) był to znany polimorfizm eksonu 10 (c.2021A>G), a u kolejnych siedmiu (10%) były to podstawienia zasad, które nie pociągają za sobą zmian reszt aminokwasowych (określane jako mutacje typu *silent*).

U 26 chorych (37%) zidentyfikowano różnego rodzaju mutacje, wśród których można wyróżnić następujące typy:

- A) mutacje zmiany sensu (n=15, 58% wszystkich mutacji)
- B) delecje i duplikacje kilku nukleotydów prowadzące do przedwczesnego powstanie kodonu STOP, najczęściej poprzez przesunięcia ramki odczytu (*frame shift*) (n=8, 31%)
- C) mutacje zaburzające składanie mRNA, określane jako *splice site* (n=3, 11%).

Tab. 19. Zestawienie 54 wariantów sekwencyjnych zidentyfikowanych u pacjentów z CdLS.

Lp.	Nr pacjenta	Zmiana na poziomie genomu	ekson /intron	Zmiana na poziomie białka
1.	CdLS-57	c.64+18A>G	2	-
2.	CdLS-39	c.64+77T>G	2	-

3.	<b>CdLS-53</b>	<b>c.209A&gt;T</b>	<b>3</b>	<b>p.N70I</b>
4.	<b>CdLS-56</b>	<b>c.269delG</b>	<b>4</b>	<b>p.G90VfsX31</b>
5.	CdLS-98*	c.300G>A	4	p.100=
6.	<b>CdLS-52*</b>	<b>c.535G&gt;T</b>	<b>6</b>	<b>p.A179S</b>
7.	<b>CdLS-101</b>	<b>c.1012_1016delCAGAG</b>	<b>9</b>	<b>p.Q338X</b>
8.	<b>CdLS-57*</b>	<b>c.1051C&gt;A</b>	<b>9</b>	<b>p.P351S</b>
9.	<b>CdLS-40*</b>	<b>c.1071A&gt;C</b>	<b>9</b>	<b>p.K357N</b>
10.	CdLS-50	c.2021A>G	10	p.N674S, znany polimorfizm
11.	CdLS-69	c.2021A>G	10	p.N674S, znany polimorfizm
12.	CdLS-72	c.2021A>G	10	p.N674S, znany polimorfizm
13.	CdLS-73	c.2021A>G	10	p.N674S, znany polimorfizm
14.	CdLS-76	c.2021A>G	10	p.N674S, znany polimorfizm
15.	CdLS-88	c.2021A>G	10	p.N674S, znany polimorfizm
16.	CdLS-90	c.2021A>G	10	p.N674S, znany polimorfizm
17.	CdLS-95	c.2021A>G	10	p.N674S, znany polimorfizm
18.	<b>CdLS-124</b>	<b>c.2296delA</b>	<b>10</b>	<b>p.R766GfsX27</b>
19.	<b>CdLS-99</b>	<b>c.2485_2486dupTG</b>	<b>10</b>	<b>p.E829VfsX19</b>
20.	<b>CdLS-75*</b>	<b>c.2603G&gt;A</b>	<b>10</b>	<b>p.R868Q</b>
21.	CdLS-58	c.2955A>G	10	p.985=
22.	<b>CdLS-93</b>	<b>c.3060_3063delAGAG</b>	<b>10</b>	<b>p.E1021TfsX22</b>
23.	CdLS-89	c.3121+24A>G	10	-
24.	CdLS-100	c.3575-10T>G	13	-
25.	CdLS-67	c.3575-17A>G	13	-
26.	CdLS-85	c.3575-17A>G	13	-
27.	CdLS-90	c.3575-17A>G	13	-
28.	CdLS-112	c.3575-17A>G	13	-
29.	<b>CdLS-120*</b>	<b>c.3619G&gt;A</b>	<b>14</b>	<b>p.E1207K</b>
30.	CdLS-80	c.3845T>C	16	p.1281=
31.	<b>CdLS-42</b>	<b>c.3855+1delG</b>	<b>16</b>	<b>Uszkodzone miejsce donorowe dla procesu składania</b>
32.	CdLS-79	c.3924G>A	17	p.1308=
33.	<b>CdLS-70*</b>	<b>c.4015T&gt;C</b>	<b>17</b>	<b>p.Y1339H</b>
34.	CdLS-35	c.4239+19C>A	18	-
35.	<b>CdLS-36</b>	<b>c.4306A&gt;C</b>	<b>19</b>	<b>p.K1436Q</b>
36.	<b>CdLS-61*</b>	<b>c.4321G&gt;T</b>	<b>20</b>	<b>p.V1441L</b>
37.	CdLS-66	c.4421+16A>C	20	-
38.	<b>CdLS-62</b>	<b>c.4450delC</b>	<b>21</b>	<b>p.P1484SfsX137</b>

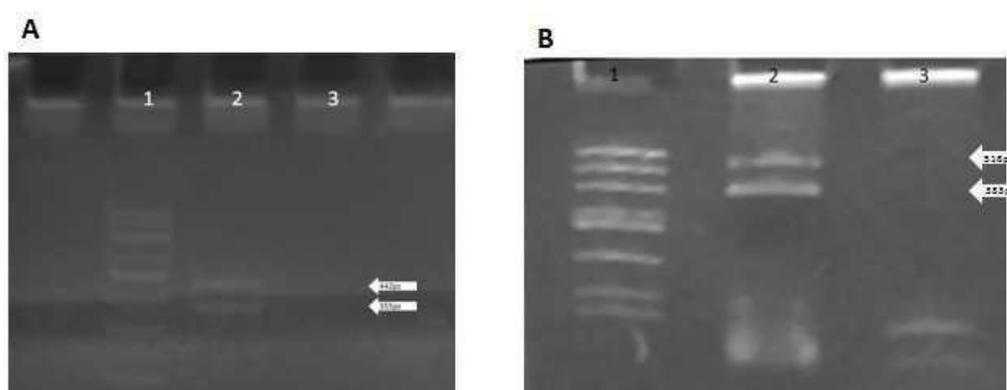
39.	CdLS-81	c.4873G>T	24	p.V1625F
40.	CdLS-95*	c.4909A>C	24	p.I1637L
41.	CdLS-47*	c.5052A>C	26	p.1684=
42.	CdLS-85*	c.5164A>C	26	p. N1722H
43.	CdLS-129	c.5207_5222del16	26	p.S1736X
44.	CdLS-67	c.5575-2delA	29	Uszkodzone miejsce akceptorowe dla procesu składania
45.	CdLS-94	c.5710-13C>G	30	-
46.	CdLS-113	c.5863 -1G>C	32	Uszkodzone miejsce akceptorowe dla procesu składania
47.	CdLS-113*	c.5867T>G	33	p.1956=
48.	CdLS-86	c.6409_6412delAAAC	37	p.K2137QfsX33
49.	CdLS-37	c.6763+49T>G	39	-
50.	CdLS-77*	c.6892C>T	40	p.R2298C
51.	CdLS-89*	c.6935G>T	40	p.G2312V
52.	CdLS-76	c.7297G>A	43	p.D2433N
53.	CdLS-76	c.7410+43G>A	43	-
54.	CdLS-63*	c.7830G>A	45	p.2610=
kolorem szarym zaznaczono zmiany w sekwencjach intronowych, kolorem czarnym zmiany w sekwencjach eksonów, <b>zapisy mutacji pogrubiono</b> *oznaczono zmiany, dla których przeprowadzono badania kosegregacyjne				

Wykryte zmiany nukleotydowe zlokalizowane były wzdłuż całej sekwencji genu *NIPBL*. Najczęściej obserwowano ich występowanie w obrębie największego eksonu 10, jednak nie stwierdzono występowania tzw.: *hot spot*. W zbadanej grupie pacjentów żadna mutacja nie powtórzyła się, natomiast wielokrotnie zidentyfikowano polimorfizm c.2021A>G w eksonie 10 oraz tranzycję c.3575-17A>G w intronie 13. U siedmiu pacjentów zidentyfikowano równocześnie więcej niż jeden wariant sekwencyjny. W przypadku pacjenta CdLS-90 był to równocześnie znany polimorfizm eksonu 10 (c.2021A>G) i zmiana w intronie 13, a u chorego CdLS-95 wraz z c.2021A>G wykazano mutację typu zmiany sensu (c.4909A>C). Z kolei u pacjenta CdLS-76 zidentyfikowano trzy substytucje, w tym jedną mutację niesynonimiczną (c.7297G>A). U trzech kolejnych pacjentów CdLS-57, CdLS-85 i CdLS-89, obok mutacji *missense* (odpowiednio c.1051C>A, c.5164A>C i c.6935G>T), stwierdzono zamiany nukleotydów w różnych intronach. U chorego CdLS-67, obok delecji adeniny w miejscu zaburzającym proces składania mRNA (c.5575-2delA), występuje c.3575-17A>G w intronie 13.

Natomiast u pacjenta CdLS-113 równocześnie z substytucją zaburzającą powstawanie prawidłowego mRNA (c.5863-1G>C) zidentyfikowano mutację typu *silent*. U pozostałych chorych stwierdzono pojedyncze warianty sekwencyjne (Tab. 19).

#### 6.1.2. Badania na poziomie cDNA.

Spośród zidentyfikowanych mutacji trzy (c.3855+1delG, c.5575-2delA, c.5863-1G>C) zlokalizowane są w miejscu donorowym bądź akceptorowym procesu składania mRNA. W przypadku pacjentów CdLS-42 oraz CdLS-67 istniała możliwość przeprowadzenia badań na poziomie cDNA. Po reakcji amplifikacji, z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów, przeprowadzono rozdział elektroforetyczny na żelu poliakrylamidowym potwierdzający powielenie dla każdego z pacjentów dwóch fragmentów. W przypadku pacjenta CdLS-42 uzyskano fragment o długości 442 par zasad oraz drugi o długości 355pz (z delecją eksonu 16). Elektroforeza poliakrylamidowa DNA pacjenta CdLS-67 uwidoczniała fragment o długości 518pz oraz drugi delecyjny o długości 383pz (Ryc. 16). Po oczyszczeniu z żelu produkty poddano reakcji sekwencjonowania, które potwierdziło delecję pojedynczych eksonów (Ryc. 17). Zmiany te nie powodują przesunięcia ramki odczytu.

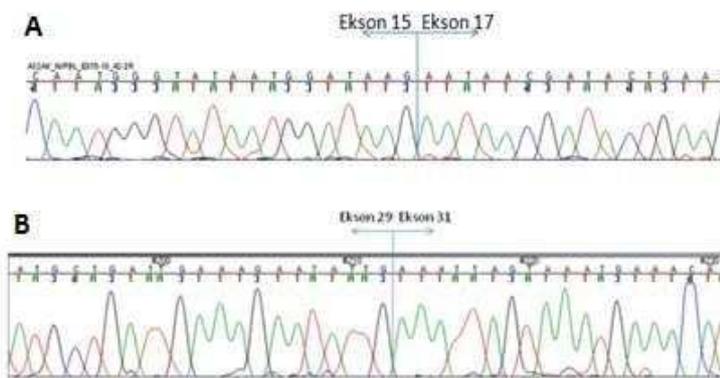


Ryc. 16. Rozdział elektroforetyczny na żelu poliakrylamidowym

1-marker wielkości; 2- produkty amplifikacji cDNA; 3 – kontrola negatywna reakcji; strzałkami oznaczono prawidłowy i zmieniony produkt po reakcji PCR;

A – pacjent CdLS-42

B – pacjent CdLS-67



Ryc. 17. Elektroforogram cDNA potwierdzający delecję pojedynczego eksonu u pacjentów

A - pacjent CdLS-42

B - Pacjent CdLS-67.

### 6.1.3. Zestawienie mutacji punktowych.

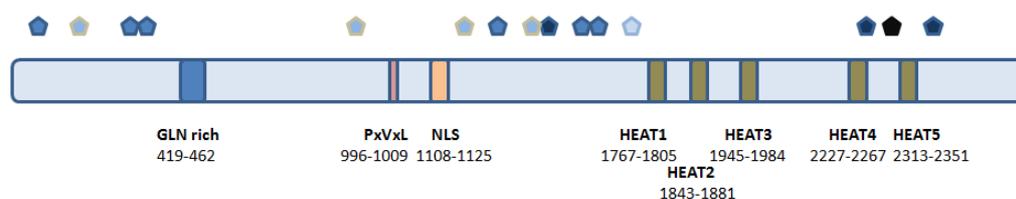
Wśród zidentyfikowanych wariantów sekwencyjnych zidentyfikowano trzy powtarzające się mutacje (c.3060\_3063delAGAG, c.4321G>T, c.6892C>T - odnotowane od jednego do czterech razy w bazie LOVD). Trzy inne (c.535G>T, c.6935G>T oraz c.7297G>A) zmieniają reszty aminokwasowe w powtarzających się kodonach, a c.5575-2delA to kolejna odnotowana zmiana miejsca akceptorowego eksonu 29. Pozostałe mutacje zidentyfikowano po raz pierwszy i znajdują się w miejscach, w których nie opisano dotąd występowania zmian sekwencji genu *NIPBL*.

W badanej grupie pacjentów zidentyfikowano osiem mutacji prowadzących do powstania przedwczesnego kodonu STOP i skrócenia produktu białkowego. Cztery spośród stwierdzonych zmian (c.269delG, c.1012\_1016delCAGAG, c.2296delA i c.2485\_2486dupTG) występują w początkowej części sekwencji genu. Kolejna mutacja (c.3060\_3063delAGAG) zlokalizowana jest za sekwencją kodującą motyw PxVxL odpowiedzialny za interakcję z białkiem HP-1. Trzy kolejne (c.4450delC, c.5207\_522del16, c.6409\_6412delAAAC) znajdują się w pobliżu sekwencji kodujących domeny HEAT.

Stwierdzono obecność także trzech mutacji zaburzających prawidłowe składanie dojrzałego transkryptu. Mutacja c.3855+1delG prowadzi do omięcia eksonu 16, który zlokalizowany jest prawdopodobnie w nieustrukturyzowanym regionie białka (*disorder region*). Zmiana miejsca akceptorowego dla procesu składania

mRNA przed eksonem 30 (c.5575-2delA) skutkuje delecją tego eksonu, a tym samym uszkodzeniem drugiego powtórzenia domeny HEAT. Natomiast w wyniku substytucji w miejscu akceptorowym intronu 32 (c.5863-1G>C) następuje ominięcie 33 eksonu i zaburzeniom ulega prawdopodobnie trzecie powtórzenie domeny HEAT.

Wśród badanych pacjentów zidentyfikowano 15 mutacji typu zmiany sensu. Zmieniane w ich wyniku aminokwasy zlokalizowane są wzdłuż całej sekwencji białka – Ryc. 18.



Ryc. 18. Schemat delanginy z zaznaczonymi głównymi domenami oraz przybliżonym umiejscowieniem aminokwasów zmienianych w wyniku mutacji *missense*.

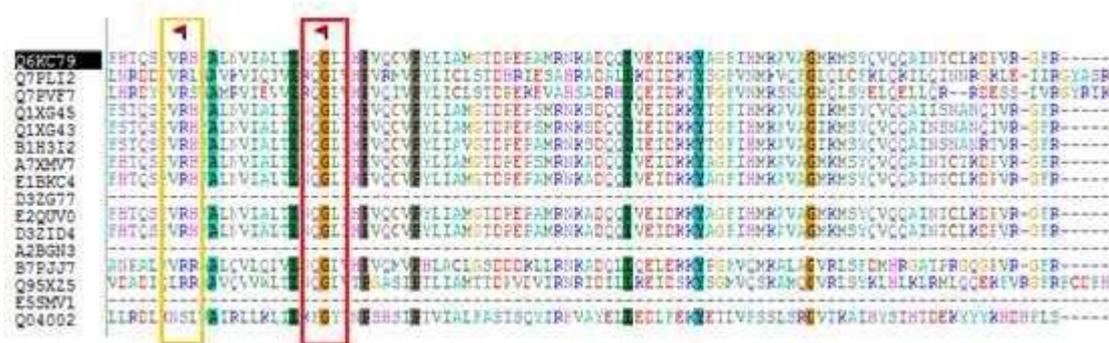
Zmieniane aminokwasy zaznaczono pięciokątem, im ciemniejszy kolor tym bardziej konserwowany jest aminokwas.

#### 6.1.3.1. Ocena bioinformatyczna mutacji zmiany sensu.

W celu zweryfikowania wpływu zmienionego aminokwasu na funkcjonowanie białka NIPBL przeprowadzono analizę korzystając z UCSC Genome Bioinformatics oraz UniProtKB. Wpierw porównano sekwencje (*alignment*) odpowiedników delanginy kręgowców. Pozwoliło to wykazać, że wśród zidentyfikowanych mutacji pięć (c.535G>T, c.2603G>A, c.3619G>A, c.4306A>C oraz c.5164A>C) wywołuje wstawienie nieprawidłowego aminokwasu w miejscach charakteryzujących się niższą swoistością, z pośród których transwersja c.5164A>C zmienia resztę asparaginy na resztę histydyny w miejscu najbardziej zmiennym (pozycja 1722). Natomiast pozostałe zidentyfikowane mutacje zmieniają reszty aminokwasowe w pozycjach konserwowanych.

Aby dokładniej określić znaczenie zmienionych aminokwasów poszerzono porównanie o sekwencje ortologów z bardziej oddalonych ewolucyjnie gatunków. Wykazano, że zmiany p.V1441L, p.R2298C i p.D2433N (spowodowane odpowiednio przez: c.4321G>T, c.6892C>T, c.7297G>A) występują w miejscach o wysokim podobieństwie sekwencyjnym, podobnie jak p.G2312V (c.6935G>T), która zlokalizowana jest w najbardziej konserwowanej pozycji. Wszystkie te zamiany

aminokwasowe występują w rejonie powtórzeń domeny HEAT. Pozostałe reszty aminokwasowe (zmieniane w wyniku mutacji zidentyfikowanych w tej pracy), występują w pozycjach nie charakteryzujących się wysokim podobieństwem sekwencyjnym między 15 porównanymi gatunkami.



Ryc. 19. Wynik porównania sekwencyjnego (*alignment*) fragmentu C- końca delanginy (próg zgodności 80%).

Kolorem czerwonym zaznaczono mutację c.6935G>T (p.G2312V), która prowadzi do zamiany konserwowanej reszty aminokwasowej.

Kolorem żółtym zaznaczono mutację c.6892C>T (p.R2298C) zmieniającą aminokwas w miejscu o wysokim podobieństwie sekwencyjnym.

(Q6KC79 – *Homo sapiens*, Q7PLI2 – *Drosophila melanogaster*, Q7PVF7 – *Anopheles gambiae*, Q1XG45 i Q1XG43 – *Xenopus laevis*, B1H3I2 – *Xenopus tropicalis*, A7XMV7 – *Gallus gallus*, E1BKC4 – *Bos taurus*, D3ZG77 – *Rattus norvegicus*, E2QUV0 – *Canis familiaris*, D3ZID4 – *Mus musculus*, A2BGN3 – *Danio rerio*, B7PJJ7 – *Ixodes scapularis*, Q95XZ5 – *Caenorhabditis elegans*, E5SMV1 – *Trichinella spiralis*, Q04002 – *Saccharomyces cerevisiae*)

Wszystkie zamiany aminokwasów zostały sklasyfikowane także przy zastosowaniu kolejnych programów do przewidywania efektu biologicznego (SIFT i PolyPhen2), a uzyskane wartości pozwalają wskazać zmiany zaburzających funkcje delanginy w znacznym stopniu. Większość podstawień aminokwasów negatywnie wpływających na funkcje białka zlokalizowana jest w jego C- końcu (Tab. 20).

Tab. 20. Zestawienie wyników z bazy SIFT i PolyPhen2 dla mutacji typu zmiany sensu zidentyfikowanych wśród pacjentów z CdLS.

Lp.	Nr pacjenta	Zmiana na poziomie białka	Teoretyczny wpływ mutacji na funkcjonowanie białka	
			Baza SIFT	Baza PolyPhen2
1.	CdLS-53	p.N70I	0,19	0,996
2.	CdLS-52	p.A179S	0,30	0,516
3.	CdLS-57	p.P351S	0,01	0,112
4.	CdLS-40	p.K357N	0,12	0,985
5.	CdLS-75	p.R868Q	0,03	0,319
6.	CdLS-120	p.E1207K	0,02	0,819
7.	CdLS-70	p.Y1339H	0,28	0,948
8.	CdLS-36	p.K1436Q	0,16	0,992
9.	CdLS-61	p.V1441L	0,10	0,012
10.	CdLS-81	p.V1625F	0,11	0,996
11.	CdLS-95	p.I1637L	0,62	0,231
12.	CdLS-85	p. N1722H	0,12	0,010
13.	CdLS-77	p.R2298C	0,01	1,000
14.	CdLS-89	p.G2312V	0,00	0,999
15.	CdLS-76	p.D2433N	0,02	0,999

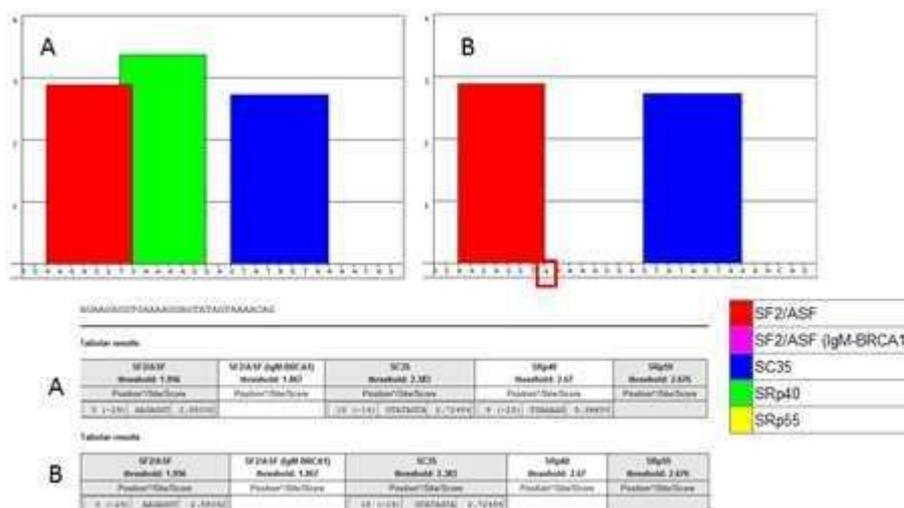
Baza SIFT – wartość współczynnika mniejsza od 0,05 sugeruje negatywny wpływ mutacji  
 Baza PolyPhen2 – im wyższa wartość współczynnika tym większe prawdopodobieństwo zaburzenia funkcjonowania produktu białkowego

#### 6.1.4. Weryfikacja zmian w sekwencjach rozpoznawanych przez białka z rodziny SR.

Substytucje nukleotydowe zlokalizowane w eksonach (wywołujące mutacje synonimiczne jak i niesynonimiczne) przeanalizowano wykorzystując platformy ESE Finder oraz HSF.

Program ESE Finder wykazał, że wśród zidentyfikowanych 22 tranzycji i transwersji potencjalnie 16 zaburza zlokalizowane w eksonach miejsca wzmacniające *splicing* (Tab. 21, Ryc. 20), wśród tych zmian pięć to mutacje typu *silent*. Natomiast dane uzyskane dzięki HSF wskazują, że 11 substytucji (w tym cztery zmiany synonimiczne) może także zmieniać sekwencje osłabiające wycinanie intronów z transkryptu (Tab. 21).

Przeanalizowanie substytucji zidentyfikowanych w sekwencjach intronów wykazało że i one mogą zaburzać proces składania transkryptu.



Ryc. 20. Wynik analizy wpływu mutacji przy zastosowaniu ESE Finder - pacjent CdLS-63:

- A) sekwencja niezmieniona - miejsca rozpoznawane przez białka z rodziny SR  
 B) sekwencja po zajściu substytucji c.7830G>A – zanik jednego z miejsc rozpoznawanych przez białka z rodziny SR

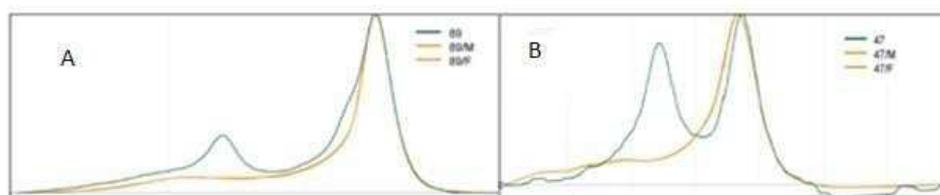
Tab. 21. Teoretyczne zaburzenia miejsc rozpoznawanych przez białka z rodziny SR.

Lp.	Nr pacjenta	Miejsce i rodzaj substytucji	Wpływ na miejsca rozpoznawane przez białka z rodziny SR	
			wzmacniające <i>splicing</i>	osłabiające <i>splicing</i>
1.	CdLS-53	c.209A>T	utrata miejsca	-
2.	CdLS-98	c.300G>A	-	nowe miejsce
3.	CdLS-52	c.535G>T	utrata miejsca	nowe miejsce
4.	CdLS-57	c.1051C>A	utrata miejsca	utrata miejsca
5.	CdLS-40	c.1071A>C	-	-
6.	CdLS-75	c.2603G>A	-	utrata miejsca
7.	CdLS-58	c.2955A>G	nowe miejsce	-
8.	CdLS-120	c.3619G>A	utrata miejsca	utrata miejsca
9.	CdLS-80	c.3845T>C	-	-
10.	CdLS-79	c.3924G>A	utrata miejsca	utrata miejsca
11.	CdLS-70	c.4015T>C	nowe miejsce	-
12.	CdLS-36	c.4306A>C	-	-
13.	CdLS-61	c.4321G>T	nowe miejsce	-
14.	CdLS-81	c.4873G>T	utrata miejsca	-
15.	CdLS-95	c.4909A>C	utrata miejsca	-

16.	CdLS-47	c.5052A>C	nowe miejsce	-
17.	CdLS-85	c.5164A>C	nowe miejsce	nowe miejsce
18.	CdLS-113	c.5867T>G	nowe miejsce	utrata miejsca
19.	CdLS-77	c.6892C>T	utrata miejsca	nowe miejsce
20.	CdLS-89	c.6935G>T	-	utrata miejsca
21.	CdLS-76	c.7297G>A	utrata miejsca	-
22.	CdLS-63	c.7830G>A	utrata miejsca	nowe miejsce

## **6.2. Badania kosegregacyjne u rodziców pacjentów.**

W przypadku 15 pacjentów, u których zidentyfikowano substytucję nukleotydową, prowadzącą bądź do mutacji typu *missense* lub *silent*, przeprowadzono badania kosegregacyjne korzystając z zabezpieczonego od rodziców DNA (Tab. 19). W przypadku 14 pacjentów po powieleniu określonego amplikonu (zarówno dla rodziców jak i pacjenta) otrzymane produkty rozdzielano na kolumnie DHPLC w odpowiednio dobranej temperaturze. W przypadku jednej rodziny wykonano sekwencjonowanie bezpośrednie (budowa fragmentu uniemożliwia wykorzystanie DHPLC). Porównywanie sekwencji oraz profilów elucji fragmentów uzyskanych od chorych i od ich rodziców pozwoliło na wykluczenie, we wszystkich przypadkach, rodzinnego występowania substytucji.



Ryc. 21. Porównanie obrazów chromatogramów dla pacjentów oraz ich rodziców wykluczające nosicielstwo mutacji.

A – pacjent CdLS-89 (c.6935G>T)

B – pacjent CdLS-47 (c.5052A>C)

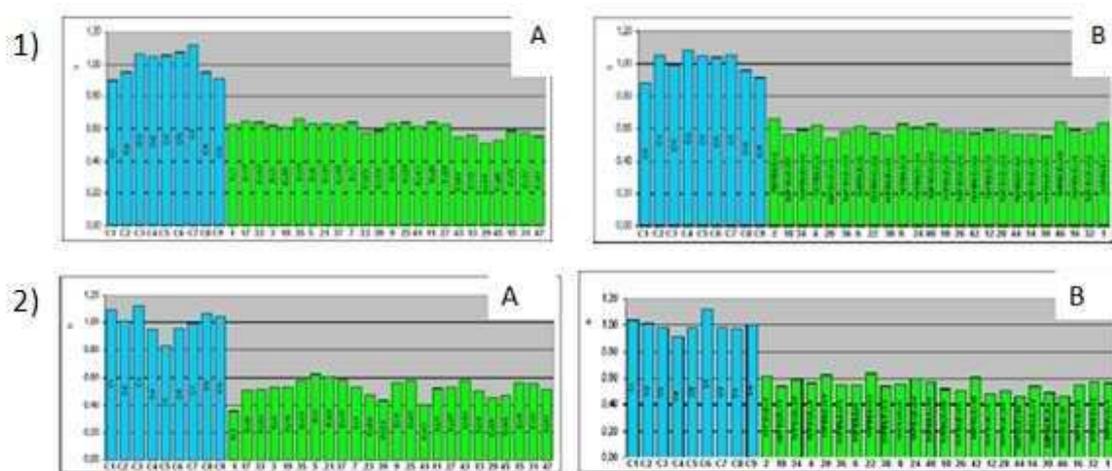
## **6.3. Poszukiwania dużych rearanżacji genomowych.**

### **6.3.1. Analiza MLPA.**

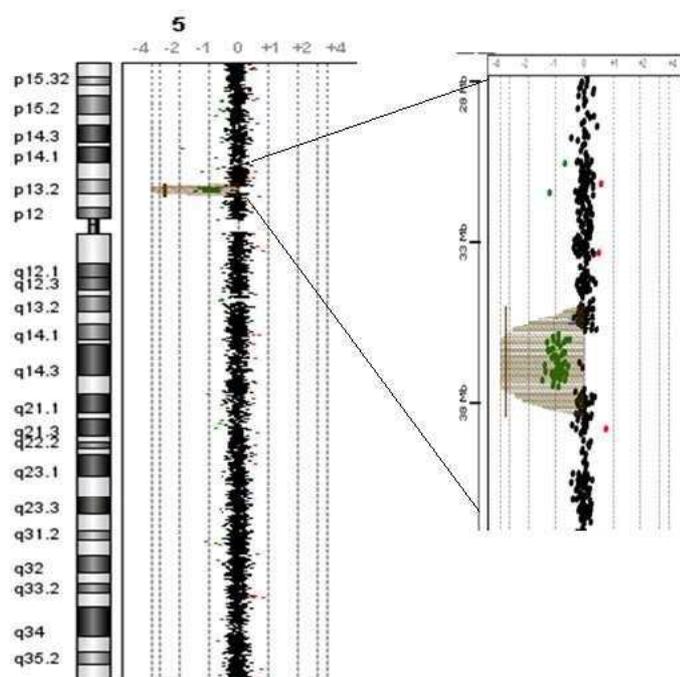
Wśród 44 pacjentów bez zidentyfikowanej mutacji punktowej, przeprowadzono za pomocą techniki MLPA analizę dużych rearanżacji genomowych (delecji i/lub duplikacji eksonów) genu *NIPBL*. Na wstępie dla każdego pacjenta przeprowadzono reakcje z wykorzystaniem sond z kitu 141 (eksony nieparzyste), następnie z sondami z kitu 142 (eksony parzyste wraz z eksonem 1).

W przypadku dwóch pacjentów z klasyczną postacią zespołu (CdLS-94 i CdLS-114) zarówno dla pierwszego zestawu sond (141) jak i drugiego zestawu (142) zaobserwowano obniżenie wartości współczynnika RPA wszystkich eksonów poniżej 70% (Ryc. 22). Wyniki dla tych rearanżacji zostały potwierdzone przez przeprowadzenie drugiej, niezależnej reakcji MLPA. Otrzymane wartości wskazują na delecję całego allelu genu *NIPBL* u obu pacjentów.

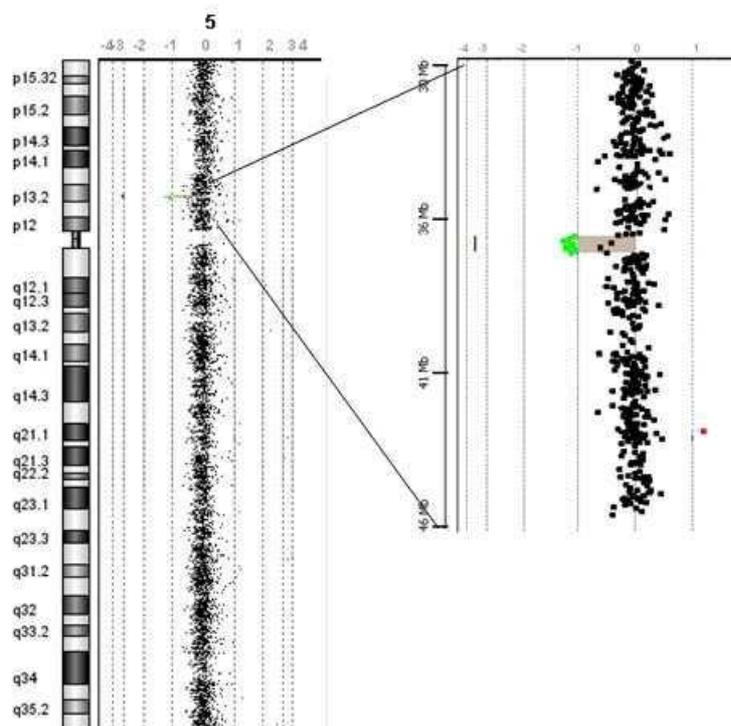
Dla pozostałych 42 chorych (95%) współczynnik RPA wszystkich eksonów mieścił się w granicach 80- 120% oznaczających brak zmian liczbowych.



Cy3) wymieszanego z DNA referencyjnym (wyznakowany Cy5) do sond, odczytano natężenia fluorescencji znaczników i przeanalizowano ich stosunki. Pozwoliło to stwierdzić u pacjenta CdLS-94 delecję ramion krótkich chromosomu 5 o wielkość ok. 1,7Mpz, która jest zawarta między zasadami 36.487.985 – 38.154.159 (Ryc. 23). W rejonie tym zlokalizowane jest sześć, znanych bądź potencjalnych genów, wśród których jest także gen *NIPBL*. Natomiast u pacjenta CdLS-114 zidentyfikowano delecję zlokalizowaną pomiędzy zasadami 36.771.925 – 37.427.989 co oznacza utratę materiału genetycznego o wielkości około 0,65Mpz (Ryc. 24). Zlokalizowane są tu poza genem *NIPBL* trzy inne geny. Wyniki aCGH potwierdzają wyniki analizy MLPA.



Ryc. 23. Diagram chromosomu 5 oraz powiększony obszar delecji (kolor zielony) wykazany technika aCGH u pacjenta CdLS-94. pojedyncze sondy o zmienionych wartościach współczynników zlokalizowane są w obrębie regionów CNV (*Copy Number Variation*)



Ryc. 24. Diagram chromosomu 5 oraz powiększony obszar delecji (kolor zielony) wykazany techniką aCGH u pacjenta CdLS-114. pojedyncza sonda o zmienionych wartościach współczynników zlokalizowana jest w obrębie CNV

#### **6.4. Fenotyp chorego a typ mutacji.**

W badanej grupie pacjentów z CdLS wyróżnia się dwie podgrupy kliniczne:

- 1) chorych z klasyczną, ciężką postacią zespołu CdLS
- 2) chorych z łagodną postacią.

Mutacje w genie *NIPBL* (zarówno punktowe jak i delecje allelu) zidentyfikowano łącznie u 20 chorych z podgrupy pierwszej (20/32 - 62%) i tylko u ośmiu pacjentów z podgrupy drugiej (8/38 - 21%). Analiza powyższych danych przy pomocy testu  $\chi^2$  wykazała zależność statystyczną między typem zespołu a obecnością mutacji genu *NIPBL*. Mutacje występowały znacznie częściej u pacjentów z postacią klasyczną CdLS ( $p=0.0004$ ).

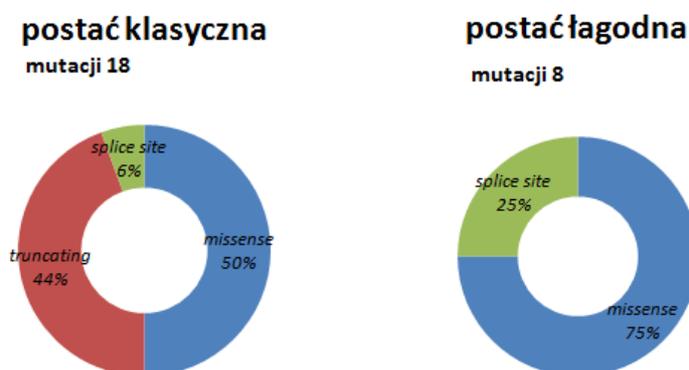
U pacjentów z ciężką postacią zespołu Cornellii de Lange zdiagnozowano dwie duże rearanżacje genomowe, powodujące utratę całego allelu genu *NIPBL* wraz

z kilkoma innymi genami przylegającymi. Zmiany te można określić jako mikrodelecje chromosomowe.

W podgrupie tej wykryto także większość mutacji punktowych (18/26 - 69%) U ośmiu chorych były to mutacje skracające powstający produktu (*truncating*) – co skutkuje utratą większości lub najważniejszych funkcji delanginy. Ponadto u dziewięciu pacjentów wykazano mutacje zmieniające aminokwas w powstającym peptydzie. Cztery z tych zmian zlokalizowane są w miejscu o wysokim podobieństwie sekwencyjnym w rejonie powtórzeń domeny HEAT. U jednego chorego z klasyczną postacią zespołu wykryto także mutację zaburzającą powstanie prawidłowego mRNA, której konsekwencją jest delecja eksonu 30 i uszkodzenie jednej z domen HEAT.

W podgrupie chorych z łagodną postacią zespołu zidentyfikowano znacznie mniej mutacji (8/26 – 31%). U sześciu pacjentów wykazano substytucje powodujące zmianę reszty aminokwasowej. Mutacje te zlokalizowane są w sekwencjach kodujących N- koniec i środkową część białka. W tej grupie chorych stwierdzono także dwie mutacje zakłócające powstanie poprawnego transkryptu (W. 2).

W. 2. Procentowy udział typów mutacji punktowych u chorych zależnie od postaci zespołu.



## 7. DYSKUSJA

Zespół Cornellii de Lange jest genetycznie uwarunkowanym, rzadkim i złożonym schorzeniem charakteryzującym się określonymi, wyraźnymi cechami fenotypu. Zaburzenia obserwowane w budowie twarzoczaszki są szczególnie specyficzne dla tego schorzenia i ułatwiają zdiagnozowanie pacjenta, także w przypadku mniej zaznaczonych zmian w łagodnej postaci tego zespołu. Od 2004 roku, kiedy wykryto, iż jednym z genetycznych czynników determinujących zmiany obserwowane u pacjentów są mutacje w genie *NIPBL*, biologia molekularna odgrywa coraz większe znaczenie w diagnostyce tego schorzenia. Produkt genu *NIPBL* jest głównym czynnikiem regulującym przyłączanie kompleksu kohezyny do chromatyd siostrzanych chromosomów. Podstawową rolą kohezyny w komórce jest kontrolowanie segregacji chromosomów potomnych w czasie podziałów komórkowych. Ponadto kompleks kohezyny jest pośrednio zaangażowany w regulację ekspresji genów oraz uczestniczy w naprawie pęknięć DNA. Wykrycie wśród osób z CdLS mutacji genu *NIPBL* zasugerowało, że to właśnie zaburzenia prawidłowego funkcjonowania kompleksu kohezyny są odpowiedzialne za występujące u tych chorych zaburzenia rozwojowe. Zgodnie z tymi założeniami uwaga naukowców zajmujących się genetycznym podłożem schorzenia skupiła się następnie na innych genach, których produkty są zaangażowane w tworzenie lub regulowanie tego kompleksu. Do dnia dzisiejszego udowodniono zależność między zespołem CdLS a występowaniem mutacji w dwóch kolejnych genach (*SMC1*, *SMC3*). Jednak w przeważającej części, wśród pacjentów ze zidentyfikowanymi zmianami genetycznymi, stwierdza się mutacje w genie *NIPBL*.

### Częstość i typ mutacji punktowych w genie *NIPBL* u chorych z zespołem Cornellii de Lange.

Wyniki badań przeprowadzonych w różnych ośrodkach pozwoliły wykazać, że mutacje punktowe tego genu dotyczą kilkudziesięciu procent pacjentów. Częstość mutacji jaką wykazano w czasie analiz obejmujących grupy chorych nie jest jednakowa – waha się od 26% do 70%. Podobnie zróżnicowane jest spektrum zdefiniowanych mutacji. Na obserwowane różnice wpływać może wielkość grupy, dokładność diagnostyki klinicznej oraz selekcja pacjentów do badań. Najmniejszą częstość mutacji stwierdzono w badaniu wykonanym przez zespół Miyake'go obejmującym grupę

15 chorych z Japonii. Wśród tych pacjentów wykazano cztery substytucje w sekwencji genu *NIPBL* skutkujące trzema mutacjami typu *nonsense* i jedną *missense*. Autorzy nie określili u ilu osób zdiagnozowano klasyczną postać zespołu, nie mniej zaznaczyli, że spośród czterech pacjentów z malformacjami kończyny górnej u trzech zidentyfikowano mutacje [Miyake i wsp. 2005]. Największą częstość zmian sekwencji genu *NIPBL* wykazano w przebadanej przez zespół Schoumansa, równie mało licznej, grupie szwedzkich pacjentów (11 osób). Ośmioro chorych miało cechy pozwalające na sklasyfikowanie do ciężkiej postaci CdLS i u sześciorga z nich wykazano mutacje genu *NIPBL*. Spośród siedmiu mutacji, łącznie zdiagnozowanych w tej grupie, najliczniejsze były zmiany powodujące przedwczesne powstanie kodonu STOP (*truncating*). Stwierdzono także dwie mutacje powodujące zamianę aminokwasu w powstającym peptydzie, przy czym jedna z nich występowała u pacjenta z łagodną postacią [Schoumans i wsp. 2007]. W najliczniejszym badaniu, przeprowadzonym przez Gillis i współpracowników, obejmującym grupę 120 osób, mutacje wykazano u 56 chorych (47%). Większość zidentyfikowanych zmian powodowała przesunięcie ramki odczytu, albo natychmiastowe powstanie kodonu STOP w wyniku substytucji, mutacje zmiany sensu stanowiły około 20%, a najmniej licznie reprezentowane były mutacje zaburzające prawidłowe składanie transkryptu. Uzyskane wyniki pozwoliły badaczom wykazać korelację między obecnością mutacji a ciężkością obserwowanych cech, trzeba jednak zaznaczyć, że nie u wszystkich osób z klasycznym fenotypem wykryto mutacje *NIPBL* [Gillis i wsp. 2004]. W kolejnej, pod względem liczebności, grupie przebadanej przez włoski zespół Selicorniego, zmutowany gen *NIPBL* stwierdzono u 44% pacjentów (26/62). Mutacje typu *frame shift* oraz *splice site* były równie często wykazane w tej analizie, a najrzadziej stwierdzono mutacje typu *missense*. W grupie tej udało się wykazać zależność statystyczną między stopniem objawów chorobowych a występowaniem mutacji, przy czym u osób z mutacjami powodującymi skrócenie produktu białkowego częściej występowało zahamowanie wzrostu, deformacje kończyn oraz zaburzenia mowy w porównaniu do osób z mutacjami innego typu, natomiast fenotyp pacjentów bez mutacji był stosunkowo najłagodniejszy [Selicorni i wsp. 2007]. W najnowszej opublikowanej analizie obejmującej 30 osób nieprawidłowe sekwencje genu (najczęstszymi były substytucje) wykazano u 37% chorych [Pie i wsp. 2010]. Zespół Pie'go poszukiwał także mutacji w genach *SMC*,

a uzyskane wyniki wskazały różnice między fenotypem osób z mutacją genu *NIPBL*, mutacją genu *SMC1* oraz osób bez mutacji w tych genach. Wśród pacjentów z mutacją w genie *NIPBL* znacznie częściej stwierdzano prenatalne i postnatalne zahamowanie wzrostu, nieprawidłowości w budowie rąk czy utratę słuchu. Natomiast u pacjentów z mutacją w genie *SMC1* większość cech odpowiadała łagodnej postaci zespołu z wyjątkiem nieprawidłowości w budowie podniebienia. W fenotypie osób bez mutacji występowało najmniej anomalii [Pie i wsp. 2010]. Zsumowanie wszystkich opublikowanych do tej pory wyników analiz przeprowadzonych na grupach chorych pozwala wyciągnąć średnią częstość mutacji genu *NIPBL* u chorych z zespołem Cornellii de Lange. Wartość tą, która wynosi w przybliżeniu 45%, można przyjąć za rzeczywiste zaangażowanie tego genu w patogenezę schorzenia. Natomiast zestawienie wszystkich opublikowanych mutacji, zdiagnozowanych także w pojedynczych przypadkach chorych na całym świecie, pozwala stwierdzić, że najczęściej wykazywane są delecje prowadzące do przedwczesnego powstania kodonu STOP (28%) a następnie mutacje zmiany sensu (21%). Z podobną (kilkunastoprocentową) częstością diagnozowane są mutacje typu *nonsense* oraz zaburzające *splicing*, natomiast najrzadziej duplikacje i insercje [Oliveira i wsp. 2010].

Wyniki analizy sekwencji kodującej genu *NIPBL* uzyskane w naszej pracy wykazały, że mutacje punktowe tego genu leżą u podstaw zespołu u 37% chorych, co jest nieznacznie niższą wartością od wyliczonej średniej. Ogólnie wśród przebadanych chorych stwierdzono 26 mutacji genu *NIPBL*. Przeważały mutacje zmiany sensu (n=15, 58%), zidentyfikowano także siedem delecji (27%) - w tym dwie powodujące natychmiastowe powstanie kodonu STOP (pozostałe skutkują wcześniejszym zatrzymaniem translacji w wyniku przesunięcia ramki odczytu). Wykazano również trzy mutacje (~11%) zaburzające powstanie prawidłowego transkryptu i przyczyniające się do ominięcia pojedynczych eksonów. Ponadto zidentyfikowano jedną duplikację (~4%) dwóch nukleotydów. Podobnie jak w analizach innych grup, mutacje w przeważającej większości występowały u pacjentów z klasyczną postacią zespołu (n=18, 69% wszystkich mutacji). Zaobserwowano, że u pacjentów z bardziej zaznaczonymi nieprawidłowymi cechami fenotypu zidentyfikowano wszystkie mutacje, których konsekwencją jest skrócenie delanginy. Natomiast u pacjentów z łagodną postacią stwierdzono mutacje powodujące wstawienie

nieprawidłowego aminokwasu oraz typu *splice site*. Nieco niższa częstość mutacji *NIPBL* u chorych, niż wynika z opublikowanych zbiorowych opracowań, może być spowodowana klasyfikacją chorych na badania molekularne. Podobnie, dobór chorych mógł wpłynąć na stwierdzoną w tym badaniu, a odbiegająca od ogólnoświatowych tendencji, przewagę substytucji nad mutacjami typu *frame shift*. W przeanalizowanej grupie 54% stanowili pacjenci z łagodną postacią, a jak wykazano wcześniej istnieje korelacja między ciężkością fenotypu a rodzajem mutacji. I właśnie mutacje typu *missense* są znacznie częściej diagnozowane u osób z tą postacią zespołu, niż u osób z postacią klasyczną. Badania w niniejszej pracy są drugim opracowaniem obejmującym polskich pacjentów. Pierwsze, przeprowadzone w 2006 przez zespół prof. Lupskiego, we współpracy z Katedrą i Zakładem Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Kliniką Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii UCK w Gdańsku, obejmowało 28 osób - w grupie tej 75% chorych miało cechy fenotypowe pozwalające na zakwalifikowanie do klasycznej postaci zespołu. I to wśród tych pacjentów zidentyfikowano wszystkie, stwierdzone w tamtym okresie, mutacje – a 85% z nich skracało powstający peptyd [Yan i wsp. 2006]. Po uwzględnieniu tych danych można stwierdzić, że u 40% polskich chorych przyczyną zespołu CdLS są mutacje genu *NIPBL*. Sumując liczbę mutacji i rozpatrując ich rodzaj zauważa się, że zmiany powodujące skrócenie białka przeważają nad mutacjami typu zmiany sensu, a zaburzenie *splicingu* są nieliczne. To wszystko pokazuje, że populacja polskich chorych z CdLS nie odbiega znacząco od innych populacji.

#### Charakterystyka mutacji w sekwencji genu *NIPBL*.

Do tej pory nie udało się wykazać w sekwencji genu *NIPBL* tzw.: *hot spot*, ale może być to spowodowane rzadkością występowania CdLS i relatywnie stosunkowo niewielką liczbą przebadanych pacjentów. Wyniki każdej dodatkowej analizy, szczególnie obejmującej, jak nasz projekt kilkadziesiąt chorych, przybliżają do precyzyjniejszego wskazania miejsc wyjątkowo podatnych na zmiany. Do dnia dzisiejszego opublikowano 245 różnych wariantów sekwencyjnych tego genu, zidentyfikowanych u 321 chorych [<http://www.grenada.lumc.nl/LOVD2/CDLS/home.php>]. Z danych tych wynika, że większość mutacji można określić jako indywidualne. Znane są także mutacje powtarzające się (od dwóch do siedmiu razy)

u niespokrewnionych pacjentów, i stanowią one łącznie tylko około 10% wszystkich zmian [Oliveira i wsp. 2010].

W aktualnym projekcie znaczna część mutacji występuje również w miejscach do tej pory nie opisanych, nie mniej trzy wykazano już we wcześniejszych opracowaniach. Delecja czterech zasad (c.3060\_3063), stwierdzona w tym badaniu u chłopca z ciężką postacią zespołu, została uprzednio opisana u dwóch pacjentów (również z klasyczną postacią CdLS) [Gillis i wsp. 2004, Bhuiyan i wsp. 2006]. Transwersję guaniny na tyminę w pozycji c.4321 zidentyfikowano wcześniej w jednym przypadku. Zmiana ta, podobnie jak w aktualnym badaniu, została wykazana u pacjenta z łagodną postacią CdLS [Pie i wsp. 2010]. Natomiast tranzycja cytozyny na tyminę (c.6892) występująca u chłopca z klasycznym obrazem zespołu została stwierdzona wcześniej u czworga pacjentów. U dwójki pacjentów z tą mutacją określono umiarkowaną postać zespołu, a tylko u jednego cechy fenotypu pozwalały na zaklasyfikowanie do postaci ciężkiej [Gillis i wsp. 2004, Selicorni i wsp. 2007, Kline i wsp. 2007a]. Podobnie, jak ma to miejsce w przypadku najczęściej diagnozowanej do tej pory na świecie mutacji (delecja c.2479\_2480delAG (p.R827GfsX2)), diagnozowanej u osób z odmiennymi fenotypami, różnice w cechach klinicznych wskazują, że taka sama zmiana nukleotydowa nie zawsze pociąga jednakowe zmiany w fenotypie chorych. Jest to prawdopodobnie spowodowane wpływem dodatkowych, nie określonych jeszcze, czynników modyfikujących [Gillis i wsp. 2004, Pie i wsp. 2010].

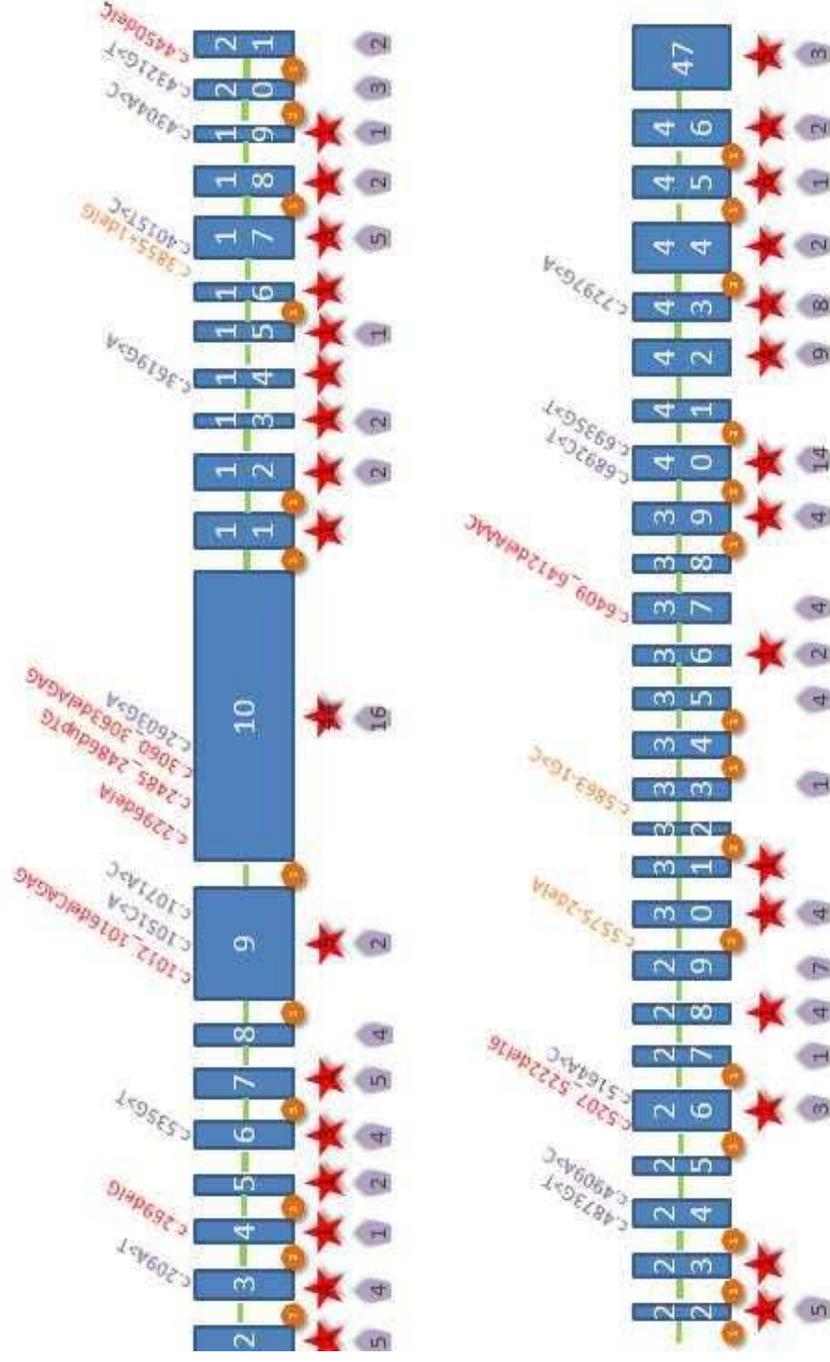
W aktualnej analizie, poza powyższymi mutacjami, stwierdzono trzy substytucje nukleotydowe, których konsekwencją były zmiany aminokwasów w powtarzających się kodonach. Pierwszym z takich miejsc jest kodon 179, w którym w aktualnym badaniu zamiast alaniny wstawiana jest seryna, gdy we wcześniej opisanym przypadku podstawiana była treonina. W obu przypadkach kodon ten był zaangażowany u pacjentów z łagodną postacią zespołu [Oliveira i wsp. 2010]. Kolejnym jest kodon 2312 zlokalizowany w konserwowanym C-końcu białka. W wyniku mutacji zidentyfikowanej w tym projekcie wstawiana jest walina (zamiast glicyny), natomiast w analizie przeprowadzonej przez zespół Gillis wykazano podstawianie argininy. Następnym powtarzającym się jest kodon 2433. Jego zmianę zidentyfikowano wcześniej u dwojga chińskiego rodzeństwa z umiarkowanymi cechami fenotypu. Pacjenci ci odziedziczyli mutację od zdrowego ojca, u którego stwierdzono mozaicyzm

germinalny sekwencji genu *NIPBL* [Niu i wsp. 2006]. W prawidłowej sekwencji białka w miejscu tym zlokalizowany jest kwas asparaginowy, natomiast w jego miejsce u chińskiego rodzeństwa wstawiana jest glicyna, a u polskiego pacjenta (z klasyczną postacią CdLS) następuje podstawienie asparaginy. Co wydaje się istotne - nie jest to jedyna substytucja zidentyfikowana u tego chorego – dodatkowo występuje u niego polimorfizm w eksonie 10 (p.N674S). Obecność tego wariantu sekwencyjnego może wpływać na obserwowane różnice fenotypu między nosicielami tej samej mutacji. Postulowano już wcześniej, że to ten polimorfizm może być właśnie jednym z czynników modyfikujących fenotyp chorych [Gillis i wsp. 2004]. Prawdopodobnie nawet nieznaczne obniżenie aktywności delanginy w wyniku mutacji typu zmiany sensu sumuje się z minimalnymi skutkami równoczesnej obecności powyższego polimorfizmu w zaburzeniach udziału kohezyny w regulacji ekspresji genów, co objawia się większymi zmianami obserwowanymi u chorych. Problem wpływu różnorodnych polimorfizmów na zmianę ekspresji cech syndromu może stanowić temat wielu dalszych badań.

Oprócz powtarzających się mutacji czy zmian kodonów w przeprowadzonej przez nas analizie wykazano kolejne zaburzenie miejsca akceptorowego w intronie 29, prowadzące do delecji eksonu 30 w powstającym transkrypcie. Zmianę tego miejsca zidentyfikowano uprzednio w pierwszych, przeprowadzonych przez zespół Tonkin [Tonkin i wsp. 2004], opracowaniach genu *NIPBL*. Zarówno w tamtym przypadku jak i w naszym badaniu mutacja występowała u pacjenta z klasycznym fenotypem CdLS.

Zestawienie wszystkich opublikowanych do tej pory mutacji genu *NIPBL* wskazuje, że są rejony (czy nawet eksony), w których mutacje diagnozuje się częściej niż w innych fragmentach tego genu [Oliveira i wsp. 2010]. Najwięcej zmian stwierdzanych w genie *NIPBL* zlokalizowanych jest w eksonie 10, co z pewnością związane jest z jego rozmiarami (ponad 1600 par zasad). Jednak zastosowanie odpowiedniego algorytmu do przeliczenia częstości mutacji w stosunku do wielkości sekwencji kodujących pozwoliło autorom wskazać miejsca w genie szczególnie narażone na wystąpienie zmian nukleotydowych. Z powyższych powodów oraz aby zminimalizować koszty analizy tego sporych rozmiarów genu, wysunięto propozycję by na wstępie ograniczyć poszukiwanie mutacji do wybranych eksonów z flankującymi

je fragmentami intronów. Badania te miałyby dotyczyć 21 następujących eksonów: 2, 3, 7, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 26, 28–31, 35, 36, 39, 40, 42, 43, oraz 45. Oliveira wraz ze współpracownikami [Oliveira i wsp. 2010] twierdzą, iż analiza tylko połowy genu (czyli powyższych fragmentów) jest w stanie wykryć około 80% mutacji w *NIPBL*. W naszej pracy jednak wykazano udział sekwencji, w których wcześniej mutacje stwierdzano rzadko i nie zostałyby włączone w powyższy schemat analizy. Dotyczyło to ampliconów obejmujących następujące eksony: 6, 9, 14, 16, 20, 21, 33, 37. Ponadto wykryto zmiany w rejonie nigdy wcześniej nie zaangażowanym (ekson 24 - dwie mutacje). Łącznie w sekwencjach nie wskazywanych przez Oliveira jako wysoce zmienne wykryto 46% wszystkich zidentyfikowanych w niniejszym projekcie mutacji.



Ryc. 25. Zestawienie mutacji zidentyfikowanych w tym projekcie oraz wcześniej wykazanych zmian u pacjentów z CdLS wzdłuż sekwencji genu NIPBL.

Kodujące eksony oznaczono ponumerowanymi prostokątami (zachowując proporcje między nimi), mutacje zdiagnozowane w tym projekcie opisano, opublikowane wcześniej oznaczono za pomocą figur: gwiazdka i kolorem czerwonym zaznaczono mutacje typu *truncating*, pięciokątem i kolorem fioletowym zaznaczono mutacje typu *missense*, siedmiokątem i kolorem pomarańczowym oznaczono mutacje zaburzające *splicing*, liczba oznacza ile razy w danym eksonie bądź intronie zidentyfikowano mutację.

Zależność pomiędzy zidentyfikowaną mutacją a kliniczną postacią zespołu.

W znacznym odsetku chorych ze zidentyfikowaną mutacją w genie *NIPBL* można dowieść istnienie korelacji pomiędzy typem tej mutacji i jej wpływem na powstający peptyd (skrócenie białka, zmiana aminokwasu, zaburzenia składania transkryptu) a fenotypem obserwowanym u pacjentów [Gillis i wsp. 2004, Yan i wsp. 2006, Selicorni i wsp. 2007, Kline i wsp. 2007a, Pie i wsp. 2010, Oliver i wsp. 2010, Oliveira i wsp. 2010]. Podobną zależność można wykazać i w niniejszym badaniu.

Wszystkie mutacje typu *truncating* zostały zidentyfikowane u pacjentów z klasycznym fenotypem zespołu. Trzy delecje występujące na początku genu (c.269delG, c.1012\_1016delCAGAG i c.2296delA) oraz duplikacja dwóch zasad (c.2485\_2486dupTG) zlokalizowane są przed sekwencjami kodującymi wszystkie, określone do dnia dzisiejszego, domeny delanginy. Zmiany te skutkują prawdopodobnie całkowitą utratą funkcji białka, szczególnie że umiejscowione są przed sekwencją domeny NLS odpowiedzialnej za transport delanginy przez błonę jądrową [Strachan 2005]. Lokalizacja mutacji c.3060\_3063delAGAG tuż za sekwencją motywu PxVxL może sugerować, że zachowana zostaje jako jedyna możliwość interakcji z białkiem HP-1, które pośredniczy w regulacji kondensacji chromatyny [Lechner i wsp. 2005, Hines i wsp. 2009]. Dwie inne delecje (c.4450delC i c.5207\_5222del16) powodują zatrzymanie translacji przed domenami HEAT - najistotniejszymi elementami delanginy odpowiedzialnymi min. za oddziaływanie z pozostałymi komponentami kompleksu kohezyny [Strachan 2005, Yan i wsp. 2006]. Ostatnia zdiagnozowana mutacja (c.6409\_6412delAAAC) zlokalizowana jest pomiędzy sekwencjami trzeciego i czwartego powtórzenia domeny HEAT, czego konsekwencją prawdopodobnie jest zmniejszenie liczby powtórzeń tej domeny.

Natomiast mutacje zmiany sensu, które są zlokalizowane wzdłuż całego genu, zostały zidentyfikowane zarówno u pacjentów z łagodniejszymi jak i poważniejszymi zmianami fenotypu. Podobnie w obu grupach chorych stwierdzono występowanie znanego polimorfizmu w eksonie 10 (c.2021A>G) oraz substytucje nukleotydowe prowadzące do powstania mutacji synonimicznych. By wykazać czy zamiana aminokwasu może upośledzać funkcjonowanie delanginy przeprowadzono ocenę bioinformatyczną. Narzędzia *in silico* pozwoliły również przeanalizować czy wykryte substytucje potencjalnie dezorganizują składanie dojrzałego mRNA przy udziale białek

z rodziny SR (*serine/arginine rich*). Co istotne, patogenne znaczenie zidentyfikowanych mutacji typu *missense* oraz *silent* (z wykluczeniem polimorfizmu w eksonie 10) udało się wykazać dla 15 rodzin (15/22 - 68%), gdzie zamiany nukleotydu w genie *NIPBL* wystąpiły *de novo* u pacjentów.

Porównanie sekwencji ortologów delanginy, zarówno wśród kręgowców jak i ewolucyjnie oddalonych od siebie zwierząt, oraz wartości uzyskanych za pomocą platform SIFT i PolyPhen2 nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków względem wszystkich mutacji. Dane te wskazują jednak, że największy negatywny wpływ na funkcjonowanie białka *NIPBL* mają mutacje zmieniające aminokwasy w rejonie kodującym powtórzenia sekwencji domeny HEAT. Do tych zmian należą p.R2298C p.G2312V i p.D2433N, które zostały zidentyfikowane u pacjentów z klasyczną postacią CdLS. Podobnie u osób z ciężkimi zmianami fenotypu stwierdzono dwie inne mutacje, które według danych biometrycznych w znaczny sposób negatywnie wpływają na delanginę. Pierwsza z nich powoduje wstawienie asparaginy zamiast izoleucyny na początku sekwencji białka w kodonie 70. Natomiast druga skutkuje zamianą lizyny na kwas glutaminowy w pozycji 1207, czyli w niewielkiej odległości od sekwencji odpowiadającej za lokalizację białka w jądrze [Yan i wsp. 2006]. Z kolei przewidywania teoretyczne sugerują, że podstawienie seryny zamiast alaniny w kodonie 179, zidentyfikowane u pacjenta z łagodnym fenotypem CdLS, nie zmniejsza w istotny sposób funkcjonalności delanginy. Podobnie też łagodne zmiany białka *NIPBL*, jakimi są wg narzędzi *in silico* zmiany p.V1441L i p.I1637L, zostały zidentyfikowane u chorych z łagodną postacią CdLS. Jednak nie u wszystkich pacjentów można wyszukać zależność między obserwowanymi cechami fenotypu a potencjalnie negatywnym wpływem mutacji na zachowanie funkcji białka. Podstawienie feniloalaniny zamiast waliny w kodonie 1625, które wg danych bioinformatycznych w znacznym stopniu upośledza funkcje delanginy, zostało zidentyfikowane u pacjenta z łagodnymi zmianami fenotypu. Z drugiej strony zamiana asparaginy na histydynę w pozycji 1722 zidentyfikowana u chorej z klasyczną postacią prawdopodobnie ma niewielki wpływ na oddziaływanie białka. Istotny wydaje się fakt, że u tej pacjentki zidentyfikowano także substytucję w intronie 13, która wg platformy HSF zaburza sekwencje rozpoznawane przez białka z rodziny SR, co może wpływać na *splicing*. Ogólnie wśród zidentyfikowanych w tym badaniu mutacji typu *missense* około 75%

zlokalizowane jest w sekwencjach rozpoznawanych przez białka z rodziny SR, a więc ewentualnie prowadzi do powstania alternatywnych miejsc składania mRNA. Doprowadzić to może nie tylko do zmian struktury i funkcji białka w wyniku zamiany aminokwasu, ale i do poważniejszych zaburzeń jak ominięcie któregoś z eksonów w trakcie obróbki transkryptu. Przewidywania platformy ESE Finder dotyczące transwersji w pozycji c.4321 wskazują, że w jej wyniku powstaje nowe miejsce wzmacniające składanie transkryptu. Jak wykazał zespół Pie'go dla mutacji w tym miejscu (c.4321G>T) równocześnie z podstawieniem leucyny za walinę w kodonie 1441, skutkuje ona powstaniem alternatywnego transkryptu omijającego ekson 20, czego konsekwencją jest pojawienie się przedwczesnego kodonu STOP (p.F1442KfsX3) [Pie i wsp. 2010]. Identyczną mutację zidentyfikowano w naszym badaniu i pomimo, że nie przeprowadzono badań mających na celu wykazanie zaburzeń *splicingu* można założyć, że substytucja tak samo oddziałuje na powstający peptyd. Także dla czterech z siedmiu mutacji typu *silent* programy HSF bądź ESE Finder przewidują zaburzenia wycinania intronów. Nawet jeżeli tylko w niewielkiej części powstających łańcuchów mRNA nie zachodzi poprawny proces składania, prowadzi to do obniżenia poziomu prawidłowego białka NIPBL. Ponadto mutacja synonimiczna może spowalniać translację, uniemożliwiając przyjęcie prawidłowej konformacji przez powstający peptyd, ponownie przyczyniając się do zmniejszenia puli dojrzałego białka [Cartegni i wsp. 2002, Chamary i Hurst 2009]. Jak wykazały wyniki badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych czy liniach komórkowych wyprowadzonych od osób z mutacją w genie *NIPBL*, to właśnie niższy poziom delanginy zaburza regulację ekspresji różnorodnych genów poprzez kompleks kohezyny, co objawia się szeregiem zaburzeń rozwoju organizmu [Kawauchi i wsp. 2009, Liu i wsp. 2009a, Dorsett i Krantz 2009].

Dwie z trzech mutacji zlokalizowanych bezpośrednio w sekwencjach konsensus dla procesu składania mRNA zostało wykazane u pacjentów z łagodną postacią zespołu. Delecja guaniny w miejscu donorowym 16 intronu (c.3855+1delG) prowadzi do ominięcia eksonu 16 w dojrzałym transkrypcje. Ekson ten, prawdopodobnie, zlokalizowany jest w nieustrukturyzowanym regionie białka, przez co potencjalnie nie zaburza jego głównych funkcji. Natomiast transwersja przed eksonem 33 (c.5863-1G>C) skutkuje delecją tego eksonu (przewidywania bioinformatyczne), a że w tym

rejonie znajduje się sekwencja trzeciego powtórzenia domeny HEAT, to ulega ono zaburzeniom i prawdopodobnie umniejsza możliwość oddziaływania delanginy z innymi białkami. Z kolei trzecią mutację typu *splice site* wykazano u chłopca z cechami odpowiadającymi ciężkiej postaci zespołu (łącznie z zaburzeniami rozwojowymi rąk) [Wierzbą i wsp. 2011]. Delecja adeniny w sekwencji miejsca akceptorowego intronu 29 (c.5575-2delA) skutkuje ominięciem eksonu 30, a tym samym uszkodzeniem drugiego powtórzenia domeny HEAT. Zmianę tego miejsca akceptorowego zidentyfikowano wcześniej w analizie przeprowadzonej przez zespół Tonkin (c.5575-2A>G) [Tonkin i wsp. 2004], choć nie przeprowadzono wtedy badań na poziomie RNA, które potwierdziłyby zaburzenia *splicingu*. Podobnie jak w tym badaniu mutacja występowała u pacjenta z klasyczną postacią CdLS, u którego nie obserwowano jednak malformacji kończyny górnej [Tonkin i wsp. 2004]. Badania nad udziałem delanginy w modyfikacjach kondensacji chromatyny dostarczyły informacji, że fragment kodowany przez sekwencje zlokalizowane między 1838 a 2000 aminokwasem odpowiada za interakcje białka NIPBL z deacetylazami histonów (HDAC1 i HDAC3) [Jahnke i wsp. 2008, Musio i Krantz 2010]. Większość mutacji stwierdzanych w tym rejonie diagnozowano u pacjentów z łagodną postacią CdLS, dlatego przypuszczano, że zakłócenie oddziaływania z deacetylazami nie dezorganizuje znacząco organizmu chorego, a w szczególności nie zakłóca rozwoju rąk [Pie i wsp. 2010]. Zarówno ominięcie eksonu 30 jak i 33 prowadzi do zaburzeń wyżej opisanych sekwencji, ale tylko u jednego z pacjentów występują nieprawidłowości w budowie kończyny górnej. Niewątpliwie ekson 30 jest większy od 33 (o kilkadziesiąt par zasad) i zlokalizowany jest na początku rozpatrywanych sekwencji, co może przyczyniać się do obserwowanych zaburzeń rozwojowych i różnic między fenotypami obu pacjentów. U pacjenta z malformacją kończyn stwierdzono również substytucję w intronie 13 i być może obecność tej zmiany wpływa na obraz kliniczny.

Trzeba jednak podkreślić, że wszystkie powyższe informacje mają charakter orientacyjny, a ostateczną odpowiedź o wpływie wariantów sekwencyjnych, a w szczególności substytucji, na funkcjonowanie białka mogłyby udzielić jedynie wyniki badań funkcjonalnych.

### Rearanżacje genomowe obejmujące gen *NIPBL*.

Dzięki zwiększającej się wiedzy na temat budowy genomu coraz częściej udaje się udowodnić, że w patologię wielu schorzeń zaangażowane są, obok mutacji punktowych, duże rearanżacje genomowe. Przetarasowania takie mogą być różnej wielkości i dotyczyć pojedynczych eksonów, części genów, bądź większych fragmentów genomu obejmujących kilka genów. Ich występowanie wykazano między innymi w *NF1*, *BRCA1*, *BRCA2* czy *LDLR* [Sluiter i van Rensburg 2001, Chaves i wsp. 2001, Gu i wsp. 2008]. Również w genie *NIPBL*, czyli najważniejszym genie zaangażowanym w patologię zespołu Cornellii de Lange, stwierdzono duże rearanżacje, jednak wszystkie dane wskazują, że nie jest to zjawisko zbyt częste. Opisano dwie delecje kilku eksonów tego genu u pacjentek z cechami klasycznego fenotypu CdLS. Pierwszą, obejmującą eksony 41 - 42 o wielkości około 5 tys par zasad scharakteryzował w 2007 roku zespół Bhuiyana [Bhuiyan i wsp. 2007]. Została ona zidentyfikowana u jednej pacjentki na 50 przebadanych. Druga o wielkości prawie 63 tysięcy par zasad, wykryta wśród 11 polskich chorych w gdańskim ośrodku, rozpoczynała się w 35 eksonie i sięgała poza koniec 3' genu *NIPBL* [Ratajska i wsp. 2010]. Ponadto stwierdzono duplikację kilku eksonów (11 -22) w linii komórkowej z limfocytów B pacjenta z zespołem CdLS [Vrouwe i wsp. 2007]. Są to jedyne opublikowane informacje o rearanżacjach obejmujących gen *NIPBL*.

W niniejszym projekcie poszukując dużych rearanżacji genu *NIBL* przebadano 44 chorych z wykluczoną wcześniej mutacją punktową. U dwóch dziewczynek z klasycznym fenotypem analiza MLPA wykazała utratę całego allelu, co zostało potwierdzone za pomocą aCGH. Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy wykazała, że u obu pacjentek delecje mają różną wielkość i poza genem *NIPBL* obejmują kilka innych. U jednej z chorych delecja obejmowała w przybliżeniu 1,7Mpz i dodatkowo rozprzestrzeniała się na pięć znanych bądź prawdopodobnych genów: *SLC1A3*, *FLJ1323*, *NUP155*, *WDR70* oraz *GDNF* (arr5p13.2 (36.487.985 - 38.154.159)x1). U drugiej pacjentki delecja była mniejsza (około 0,65Mpz) i rozciągała się także na *FLJ1323*, *NUP155* i część niescharakteryzowanego genu *WDR70* (arr5p13.2 (36.771.925 - 37.427.989)x1). Spośród genów, które są traczone w wyniku obu delecji do dnia dzisiejszego nie opisano także funkcji produktu

dla *FLJ1323* (określanego także jako *C5orf42*). Natomiast dobrze poznano produkty pozostałych trzech genów, oraz wykazano ich powiązania z różnymi schorzeniami. Produktem genu *SLC1A3* (tracony tylko u jednej pacjentki) jest białko z rodziny EAAT - transporter glutaminianu zaangażowany w regulację pobudzenia nerwowego. Znanych jest łącznie pięć podtypów EAAT a ich największa ekspresja następuje w neuronach zlokalizowanych w różnorodnych częściach mózgu [Kanai i Hediger 2004, Jen i wsp. 2005]. Wykazano zależność między nieprawidłowo funkcjonującymi białkami z tej rodziny a niezdolnością ruchową, porażeniem połowicznym oraz schorzeniami psychicznymi jak schizofrenia. Kolejny gen objęty delecją chromosomową u obu chorych (*NUP155*) także powiązany jest z transportem molekuł. Produktem genu jest nukleoporyna o masie cząsteczkowej 155kDa. Wchodzi w skład błony jądrowej i uczestniczy w przepływie mRNA i białek między jądrem i cytoplazmą budując wraz z innymi białkami kanałowymi pory transbłonowe [Mitchell i wsp. 2010]. Poprzez oddziaływanie z HDAC4 białko to uczestniczy pośrednio w regulacji ekspresji genów [Kehat i wsp. 2011]. Mutacje genu *NUP155* powiązane z anomaliami kardiomiocytów, a u jednej z pacjentek stwierdza się nieprawidłowości w budowie przegrody międzyprzedsionkowej. Jednak różnego rodzaju nieprawidłowości w budowie serca występują u około 25% chorych [Kline i wsp. 2007a]. Natomiast produktem genu *GDNF* jest glijepochodny czynnik wzrostu nerwów powiązany z różnicowaniem i przetrwaniem neuronów dopaminergicznych. Produkt ten także jest ligandem dla produktu protoonkogenu *RET*. Mutacje *GDNF* są powiązane z chorobą Hirschsprunga [Mundt i Bates 2010], której jednym z objawów są przewlekłe zaparcia. Ścieżki sygnałowe w których uczestniczą produkty *GDNF* i *RET* są także bardzo istotne w prawidłowym rozwoju i dojrzewaniu nerek oraz moczowodów [Jain 2009]. Gen ten w wyniku delecji tracony jest u jednej z pacjentek i u niej zaburzenia w perystaltyce jelit są bardziej zaznaczone niż u drugiej chorej, podobnie można wykazać większe nieprawidłowości w budowie nerek. Jednak zmiany te są również dosyć często obserwowane u osób z klasycznym fenotypem CdLS [Selicorni i wsp. 2005, Barisic i wsp. 2008, Kline 2010].

Jak wspomniano wyżej fenotyp obu pacjentek odpowiada postaci klasycznej, z niewielkimi różnicami w obrazie klinicznym, na które prawdopodobnie wpływają utraty innych, opisanych powyżej genów. Pomimo tych różnic cechą wspólną jest,

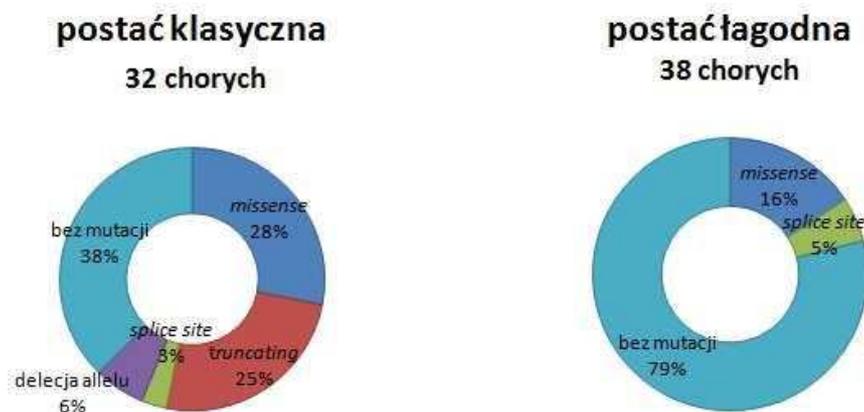
że u żadnej z dziewczynek nie występują znaczne zaburzenia rozwoju kończyny górnej, które często obserwuje się u pacjentów z mutacją typu *nonsense* genu *NIPBL*. U pacjentek z rearanżacją chromosomową stwierdzone nieprawidłowości dotyczą głównie kości dłoni, które ulegają skróceniu. Obserwacja ta jest zgodna z wcześniej opublikowanymi przypadkami dużych rearanżacji *NIPBL* [Bhuiyan i wsp. 2007, Ratajska i wsp. 2010].

Nie wyjaśniono wszystkich procesów prowadzących do powstawania przetasowań genomowych, wiadomo jednak, że w NAHR (nieallelicznej rekombinacji homologicznej – najlepiej poznanego z mechanizmów powodujących rearanżacje) szczególną rolę odgrywają sekwencje powtórzone LINE i SINE [Batzer i Deininger 2002, Gu i wsp. 2008]. Obecność tych powtórzeń wykazano we wcześniej opisanych rearanżacjach genu *NIPBL* nie wyjaśniając jednak do końca ich zaangażowania w mutacje. Źródła charakteryzujące strukturę genomu sygnalizują liczne występowanie zarówno długich jak i krótkich sekwencji rozproszonych w rejonie obu delecji zdiagnozowanych w tym projekcie [<http://genome.ucsc.edu/>]. Sugeruje to, że i w tych przypadkach sekwencje repetytywne mogą stać u podłoża aberracji.

W czasie trwania projektu, wśród pacjentów z wyraźniej zaznaczonymi cechami zespołu, zidentyfikowano znacznie więcej mutacji w genie *NIPBL*, niż w grupie chorych z postacią łagodną (62% chorych do 21%). U pacjentów z klasyczną postacią zidentyfikowano wszystkie rodzaje mutacji punktowych oraz dwie mikrodelecje chromosomowe. Natomiast u osób z łagodniejszymi zaburzeniami rozwoju organizmu stwierdzono tylko substytucje powodujące wstawienie nieprawidłowej reszty aminokwasu, bądź mutacje zaburzające powstawanie transkryptu. Większość mutacji typu *truncating* została zidentyfikowana u pacjentów płci męskiej, gdy mutacje typu zmiany sensu znajdowano u pacjentów obu płci w podobnym stosunku. Trzeba zaznaczyć, że w podgrupie z klasycznym fenotypem, w której zidentyfikowano właśnie mutacje skracające powstające białko, chłopcy i młodzi mężczyźni stanowili mniejszość. Z pewnością u każdego pacjenta ze zidentyfikowanym klinicznie zespołem CdLS wskazane jest przeprowadzenie diagnostyki podłoża molekularnego tego schorzenia. Wydaje się jednak, że poszukiwania dużych rearanżacji obejmujących gen *NIPBL*

powinno być ograniczone tylko do pacjentów z klasycznym fenotypem schorzenia, gdyż jest to zjawisko niezmiernie rzadkie i wykazane tylko u osób z tą postacią zespołu.

### W. 3. Mutacje genu *NIPBL* a postaci zespołu.



Gen *NIPBL* jest jednym z kilkudziesięciu genów, których produkty są zaangażowane w funkcjonowanie kompleksu kohezyny. Być może w najbliższym czasie zostaną wykazane zmiany w kolejnym białku budującym lub regulującym działanie tego kompleksu u pacjentów z cechami zespołu Cornelia de Lange. Jednym z takich najczęściej rozpatrywanych genów kandydatów jest *PDS5A*, którego produkt wpływa na kohezję [Zhang B i wsp. 2009, Oliver i wsp. 2010]. Należy także rozpatrzyć wpływ drugiego składnika układu *NIPBL-hSCC4* regulującego funkcjonowanie kohezyny [Watrin i wsp. 2006]. Wyniki analiz cytogenetycznych, czy porównawczej hybrydyzacji genomowej przeprowadzane u pacjentów z CdLS z wykluczonymi wcześniej mutacjami znanych genów zaangażowanych w tę kohezynopatię, dostarczają informacji o lokalizacji kolejnych genów kandydatów [DeScipio i wsp. 2005, Egemen i wsp. 2005, Holder i wsp. 1994, Gervasini i wsp. 2008, Baynam i wsp. 2008]. Znane są również przypadki chorych o fenotypie tylko w niektórych elementach wspólnym z fenotypem charakterystycznym dla zespołu, które określa się jako Cornelia de Lange- like. U pacjentów takich diagnozowane są niekiedy mutacje w genach niepowiązanych z kompleksem kohezyny [Smits i wsp. 2011]. Dokładne poznanie wszystkich mechanizmów odpowiedzialnych za zaburzenia organizmu występujące w zespole Cornelia de Lange jest z pewnością wyzwaniem, które wymaga jeszcze wielkiego nakładu pracy.

## **8. WNIOSKI**

1. Mutacje genu *NIPBL* istotnie częściej występują u pacjentów z klasycznym fenotypem zespołu Cornellii de Lange w porównaniu do pacjentów z łagodną postacią tej choroby.
2. Ponieważ mutacje punktowe genu *NIPBL* występują zarówno u chorych z ciężkimi jak i łagodnymi zaburzeniami rozwojowymi analizę tego typu mutacji należy przeprowadzać u wszystkich chorych z CdLS.
3. Ponieważ duże rearanżacje genomowe obejmujące gen *NIPBL* występują wyłącznie u chorych CdLS z klasycznym fenotypem, dlatego poszukiwania tych zmian powinny być ograniczone do tych pacjentów.
4. Wykazano, że mutacje skracające produkt genu *NIPBL* występują wyłącznie u chorych CdLS z ciężkimi wadami rozwojowymi, co potwierdza istotną rolę delanginy w rozwoju organizmu.
5. Wyniki badań kosegregacyjnych, wykluczyły nosicielstwo substytucji nukleotydowych w sekwencji genu *NIPBL* u zdrowych rodziców dzieci z CdLS.
6. Obecność mutacji genu *NIPBL* wykazano u 40% chorych z zespołem Cornellii de Lange, co wskazuje na istnienie innych czynników w etiopatologii tego zespołu.

**9. PIŚMIENICTWO**

1. Arbutova S, Nikolenko M, Krantz D, Hallahan T, Macri J.: Low first-trimester pregnancy-associated plasma protein-A and Cornelia de Lange syndrome. *Prenat Diagn* 2003; 23: 864
2. Arumugam P, Gruber S, Tanaka K, Haering C H, Mechtler K, Nasmyth K.: ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. *Curr Biol* 2003; 13: 1941-1953
3. Assenmacher N, Hopfner K P.: MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 2004; 113: 157-166
4. Bailey J A, Eichler E E.: Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 552-564
5. Baralle D, Baralle M.: Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet* 2005; 42: 737-748
6. Baralle M, Skoko N, Knezevich A, De Conti L, Motti D, Bhuvanagiri M, Baralle D, Buratti E, Baralle F E.: NF1 mRNA biogenesis: effect of the genomic milieu in splicing regulation of the NF1 exon 37 region. *FEBS Lett* 2006; 580: 4449-4456
7. Barisic I, Tokic V, Loane M, Bianchi F, Calzolari E, Garne E, Wellesley D, Dolk H.: Descriptive epidemiology of Cornelia de Lange syndrome in Europe. *Am J Med Genet A* 2008; 146A: 51-59
8. Basile E, Villa L, Selicorni A, Molteni M.: The behavioural phenotype of Cornelia de Lange Syndrome: a study of 56 individuals. *J Intellect Disabil Res* 2007; 51: 671-681
9. Batzer M A, Deininger P L.: Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 370-379
10. Baynam G, Goldblatt J, Walpole I.: Deletion of 8p23.1 with features of Cornelia de Lange syndrome and congenital diaphragmatic hernia and a review of deletions of 8p23.1 to 8pter? A further locus for Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet A* 2008; 146A: 1565-1570
11. Beck B.: Epidemiology of Cornelia de Lange's syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1976; 65: 631-638
12. Bhuiyan Z A, Klein M, Hammond P, van Haeringen A, Mannens M M, van Berckelaer-Onnes I, Hennekam R C.: Genotype-phenotype correlations of 39 patients with

- Cornelia De Lange syndrome: the Dutch experience.  
J Med Genet 2006; 43: 568-575
13. Bhuiyan Z A, Stewart H, Redeker E J, Mannens M M, Hennekam R C.: Large genomic rearrangements in NIPBL are infrequent in Cornelia de Lange syndrome.  
Eur J Hum Genet 2007; 15: 505-508
  14. Blencowe B J.: Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases.  
Trends Biochem Sci 2000; 25: 106-110
  15. Borck G, Redon R, Sanlaville D, Rio M, Prieur M, Lyonnet S, Vekemans M, Carter N P, Munnich A, Colleaux L, Cormier-Daire V.: NIPBL mutations and genetic heterogeneity in Cornelia de Lange syndrome.  
J Med Genet 2004; 41: e128
  16. Borck G, Zarhrate M, Cluzeau C, Bal E, Bonnefont JP, Munnich A, Cormier-Daire V, Colleaux L.: Father-to-daughter transmission of Cornelia de Lange syndrome caused by a mutation in the 5' untranslated region of the NIPBL Gene.  
Hum Mutat 2006; 27: 731-735
  17. Borck G, Zarhrate M, Bonnefont J P, Munnich A, Cormier-Daire V, Colleaux L.: Incidence and clinical features of X-linked Cornelia de Lange syndrome due to SMC1L1 mutations.  
Hum Mutat 2007; 28: 205-206
  18. Bose T, Gerton J L.: Cohesinopathies, gene expression, and chromatin organization.  
J Cell Biol 2010; 189: 201-210
  19. Bowers S R, Mirabella F, Calero-Nieto F J, Valeaux S, Hadjur S, Baxter E W, Merkenschlager M, Cockerill P N.: A conserved insulator that recruits CTCF and cohesin exists between the closely related but divergently regulated interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genes.  
Mol Cell Biol 2009; 29: 1682-1693
  20. Canudas S, Smith S.: Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells.  
J Cell Biol 2009; 187: 165-173
  21. Carretero M, Remeseiro S, Losada A.: Cohesin ties up the genome.  
Curr Opin Cell Biol 2010; 22: 781-787
  22. Cartegni L, Chew SL, Krainer A R.: Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing.  
Nat Rev Genet 2002; 3: 285-298

23. Castronovo P, Gervasini C, Cereda A, Masciadri M, Milani D, Russo S, Selicorni A, Larizza L.: Premature chromatid separation is not a useful diagnostic marker for Cornelia de Lange syndrome.  
Chromosome Res 2009; 17: 763-771
24. Castronovo P, Delahaye-Duriez A, Gervasini C, Azzollini J, Minier F, Russo S, Masciadri M, Selicorni A, Verloes A, Larizza L.: Somatic mosaicism in Cornelia de Lange syndrome: a further contributor to the wide clinical expressivity?  
Clin Genet 2010; 78: 560-564
25. Chamary J V, Hurst L D.: The price of silent mutations.  
Sci Am 2009; 300: 46-53
26. Chaves F J, Real J T, García-García A B, Puig O, Ordovas J M, Ascaso J F, Carmena R, Armengod M E.: Large rearrangements of the LDL receptor gene and lipid profile in a FH Spanish population.  
Eur J Clin Invest 2001; 31: 309-317
27. Chien R, Zeng W, Kawauchi S, Bender M A, Santos R, Gregson H C, Schmiesing J A, Newkirk D, Kong X, Ball A R Jr, Calof A L, Lander A D, Groudine M T, Yokomori K.: Cohesin mediates chromatin interactions that regulate mammalian  $\beta$ -globin expression.  
J Biol Chem 2011; 286: 17870-17888
28. Chong K, Keating S, Hurst S, Summers A, Berger H, Seaward G, Martin N, Friedberg T, Chitayat D.: Cornelia de Lange syndrome (CdLS): prenatal and autopsy findings.  
Prenat Diagn 2009; 29: 489-494
29. Ciosk R, Shirayama M, Shevchenko A, Tanaka T, Toth A, Shevchenko A, Nasmyth K.: Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins.  
Mol Cell 2000; 5: 243-254
30. Cuylen S, Haering C H.: A new cohesive team to mediate DNA looping.  
Cell Stem Cell 2010; 7: 424-426
31. Deardorff M A, Clark D M, Krantz I D.: Cornelia de Lange Syndrome.  
w: GeneReviews, Seattle (WA): University of Washington, 2006,  
(on-line <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1104/>)
32. Deardorff M A, Kaur M, Yaeger D, Rampuria A, Korolev S, Pie J, Gil-Rodríguez C, Arnedo M, Loeys B, Kline A D, Wilson M, Lillquist K, Siu V, Ramos F J, Musio A, Jackson L S, Dorsett D, Krantz I D.: Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation.

Am J Hum Genet 2007; 80: 485-494

33. DeScipio C, Kaur M, Yaeger D, Innis J W, Spinner N B, Jackson L G, Krantz I D.: Chromosome rearrangements in cornelia de Lange syndrome (CdLS): report of a der(3)t(3;12)(p25.3;p13.3) in two half sibs with features of CdLS and review of reported CdLS cases with chromosome rearrangements  
Am J Med Genet A 2005; 137A: 276-282
34. Dorsett D, Krantz I D.: On the molecular etiology of Cornelia de Lange syndrome.  
Ann N Y Acad Sci 2009; 1151: 22-37
35. Egemen A, Ulger Z, Ozkinay F, Gulen F, Cogulu O.: A de novo t (X;8)(p11.2;q24.3) demonstrating Cornelia de Lange syndrome phenotype.  
Genet Couns 2005; 16: 27-30
36. ENSEMBLE; <http://www.ensembl.org/index.html> (stan na 10 lipca 2011)
37. Fairbrother W G, Yeh R F, Sharp P A, Burge CB.: Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes.  
Science 2002; 297: 1007-1013
38. Feeney K M, Wasson C W, Parish J L.: Cohesin: a regulator of genome integrity and gene expression.  
Biochem J 2010; 428: 147-161
39. Gandhi R, Gillespie P J, Hirano T.: Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase.  
Curr Biol 2006; 16:2406-2417
40. GeneCards; Weizmann Institute of Science; <http://www.genecards.org> (stan na 10 lipca 2011)
41. Gerlich D, Koch B, Dupeux F, Peters JM, Ellenberg J.: Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication.  
Curr Biol 2006; 16: 1571-1578
42. Gervasini C, Pfundt R, Castronovo P, Russo S, Roversi G, Masciadri M, Milani D, Zampino G, Selicorni A, Schoenmakers E F, Larizza L.: Search for genomic imbalances in a cohort of 24 Cornelia de Lange patients negative for mutations in the NIPBL and SMC1L1 genes.  
Clin Genet 2008; 74: 531-538
43. Gillis L A, McCallum J, Kaur M, DeScipio C, Yaeger D, Mariani A, Kline A D, Li H H, Devoto M, Jackson L G, Krantz I D.: NIPBL mutational analysis in 120 individuals with Cornelia de Lange syndrome and evaluation of genotype-phenotype correlations.

Am J Hum Genet 2004; 75: 610-623

44. Gruber S, Haering C H, Nasmyth K.: Chromosomal cohesin forms a ring.  
Cell 2003; 112: 765-777
45. Gu W, Zhang F, Lupski J R.: Mechanisms for human genomic rearrangements.  
Pathogenetics 2008; 1:4 (doi:10.1186/1755-8417-1-4)
46. Gullerova M, Proudfoot N J.: Cohesin complex promotes transcriptional termination between convergent genes in *S. pombe*.  
Cell 2008; 132: 983-995
47. Haering CH, Löwe J, Hochwagen A, Nasmyth K.: Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex.  
Mol Cell 2002; 9: 773-788
48. Haering C H, Nasmyth K.: Building and breaking bridges between sister chromatids.  
Bioessays 2003; 25: 1178-1191
49. Haering C H, Schoffnegger D, Nishino T, Helmhart W, Nasmyth K, Löwe J.: Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction.  
Mol Cell 2004; 15: 951-964
50. Hines K A, Cryderman D E, Flannery K M, Yang H, Vitalini M W, Hazelrigg T, Mizzen C A, Wallrath L L.: Domains of heterochromatin protein 1 required for *Drosophila melanogaster* heterochromatin spreading.  
Genetics 2009; 182: 967-977
51. Hirano T.: SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans.  
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2005; 360: 507-514
52. Hirano T.: At the heart of the chromosome: SMC proteins in action.  
Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7: 311-322
53. Holder S E, Grimsley L M, Palmer R W, Butler L J, Baraitser M.: Partial trisomy 3q causing mild Cornelia de Lange phenotype.  
J Med Genet 1994;31:150-152
54. Hopfner K P, Karcher A, Shin D S, Craig L, Arthur L M, Carney J P, Tainer J A.: Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily.  
Cell 2000; 101: 789-800
55. Hou C, Dale R, Dean A.: Cell type specificity of chromatin organization mediated by CTCF and cohesin.

- Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 3651-3656
56. Hou F, Chu C W, Kong X, Yokomori K, Zou H.: The acetyltransferase activity of San stabilizes the mitotic cohesin at the centromeres in a shugoshin-independent manner.  
J Cell Biol 2007; 177: 587-597
  57. Huang C E, Milutinovich M, Koshland D.: Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for Smc complexes.  
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2005; 360: 537-542
  58. Hunter A G, Collins J S, Deardorff M A, Krantz I D.: Detailed assessment of the ear in Cornelia de Lange syndrome: comparison with a control sample using the new dysmorphology guidelines.  
Am J Med Genet A 2009; 149A: 2181-2192
  59. Jackson L, Kline A D, Barr M A, Koch S.: de Lange syndrome: a clinical review of 310 individuals.  
Am J Med Genet 1993; 47: 940-946
  60. Jahnke P, Xu W, Wülling M, Albrecht M, Gabriel H, Gillessen-Kaesbach G, Kaiser F J.: The Cohesin loading factor NIPBL recruits histone deacetylases to mediate local chromatin modifications.  
Nucleic Acids Res 2008; 36: 6450-6548
  61. Jain S.: The many faces of RET dysfunction in kidney.  
Organogenesis 2009; 5: 177-190
  62. Jen J C, Wan J, Palos T P, Howard B D, Baloh R W.: Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures.  
Neurology 2005; 65: 529-534
  63. Jessberger R.: The many functions of SMC proteins in chromosome dynamics.  
Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3: 767-778
  64. Kagey M H, Newman J J, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando D A, van Berkum N L, Ebmeier C C, Goossens J, Rahl P B, Levine S S, Taatjes D J, Dekker J, Young R A.: Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture.  
Nature 2010; 467: 430-435
  65. Kanai Y, Hediger M A.: The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects.  
Pflugers Arch 2004; 447: 469-479
  66. Kanellopoulos V, Iavazzo C, Tzanatou C, Papadakis E, Tassis K.: A case of third trimester diagnosis of Cornelia de Lange syndrome.

Arch Gynecol Obstet 2011; 283: 59-63

67. Kaur M, DeScipio C, McCallum J, Yaeger D, Devoto M, Jackson LG, Spinner N B, Krantz I D.: Precocious sister chromatid separation (PSCS) in Cornelia de Lange syndrome. Am J Med Genet A 2005; 138: 27-31
68. Kawauchi S, Calof AL, Santos R, Lopez-Burks M E, Young C M, Hoang M P, Chua A, Lao T, Lechner M S, Daniel J A, Nussenzweig A, Kitzes L, Yokomori K, Hallgrimsson B, Lander A D.: Multiple organ system defects and transcriptional dysregulation in the Nipbl(+/-) mouse, a model of Cornelia de Lange Syndrome. PLoS Genet 2009; 5: e1000650
69. Kehat I, Accornero F, Aronow B J, Molkenin J D.: Modulation of chromatin position and gene expression by HDAC4 interaction with nucleoporins. J Cell Biol 2011; 193: 21-29
70. Kenna M A, Skibbens R V.: Mechanical link between cohesion establishment and DNA replication: Ctf7p/Eco1p, a cohesion establishment factor, associates with three different replication factor C complexes. Mol Cell Biol 2003; 23: 2999-3007
71. Kerrebrock A W, Miyazaki W Y, Birnby D, Orr-Weaver T L.: The Drosophila mei-S332 gene promotes sister-chromatid cohesion in meiosis following kinetochore differentiation. Genetics 1992; 130: 827-841
72. Kline A D, Barr M, Jackson L G.: Growth manifestations in the Brachmann-de Lange syndrome. Am J Med Genet 1993; 47: 1042-1049
73. Kline A D, Krantz I D, Sommer A, Kliwer M, Jackson L G, FitzPatrick D R, Levin A V, Selicorni A.: Cornelia de Lange syndrome: clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance. Am J Med Genet A 2007a; 143A: 1287-1296
74. Kline A D, Grados M, Sponseller P, Levy H P, Blagowidow N, Schoedel C, Rampolla J, Clemens D K, Krantz I, Kimball A, Pichard C, Tuchman D.: Natural history of aging in Cornelia de Lange syndrome. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2007b; 145C: 248-260
75. Kline A D.: Cornelia de Lange Syndrome 4<sup>th</sup> biennial scientific and educational symposia abstracts. Am J Med Genet A 2010; 152A: 2683-2694
76. Krantz I D, McCallum J, DeScipio C, Kaur M, Gillis LA, Yaeger D, Jukofsky L, Wasserman

- N, Bottani A, Morris C A, Nowaczyk M J, Toriello H, Bamshad M J, Carey J C, Rappaport E, Kawauchi S, Lander A D, Calof A L, Li H H, Devoto M, Jackson L G.: Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nat Genet* 2004; 36: 631-635
77. Kueng S, Hegemann B, Peters B H, Lipp J J, Schleiffer A, Mechtler K, Peters J M.: Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* 2006; 127: 955-967
78. Lechner M S, Schultz D C, Negorev D, Maul G G, Rauscher F J.: The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 929-937
79. Lieber M R, Lu H, Gu J, Schwarz K.: Flexibility in the order of action and in the enzymology of the nuclease, polymerases, and ligase of vertebrate non-homologous DNA end joining: relevance to cancer, aging, and the immune system. *Cell Res* 2008; 18: 125-133
80. Liu J, Krantz I D.: Cohesin and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9:303-320
81. Liu J, Zhang Z, Bando M, Itoh T, Deardorff M A, Clark D, Kaur M, Tandy S, Kondoh T, Rappaport E, Spinner N B, Vega H, Jackson LG, Shirahige K, Krantz I D.: Transcriptional dysregulation in NIPBL and cohesin mutant human cells. *PLoS Biol* 2009a; 7: e1000119
82. Liu J, Feldman R, Zhang Z, Deardorff M A, Haverfield E V, Kaur M, Li J R, Clark D, Kline A D, Waggoner D J, Das S, Jackson L G, Krantz I D.: SMC1A expression and mechanism of pathogenicity in probands with X-Linked Cornelia de Lange syndrome. *Hum Mutat* 2009b; 30: 1535-1542
83. Liu J, Zhang Z, Bando M, Itoh T, Deardorff M A, Li J R, Clark D, Kaur M, Tatsuro K, Kline A D, Chang C, Vega H, Jackson L G, Spinner N B, Shirahige K, Krantz I D.: Genome-wide DNA methylation analysis in cohesin mutant human cell lines. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 5657-5671
84. Lopes J, Vandenberghe A, Tardieu S, Ionasescu V, Lévy N, Wood N, Tachi N, Bouche P, Latour P, Brice A, LeGuern E.: Sex-dependent rearrangements resulting in CMT1A and HNPP. *Nat Genet* 1997; 17: 136-137
85. Losada A, Yokochi T, Kobayashi R, Hirano T.: Identification and characterization of SA/Scp3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes.

J Cell Biol 2000; 150: 405-416

86. LOVD - Leiden Open Variation Database; Leiden University Medical Center;  
<http://www.grenada.lumc.nl/LOVD2/CDLS/home.php> (stan na 10 lipca 2011)
87. Mannini L, Liu J, Krantz I D, Musio A.: Spectrum and consequences of SMC1A mutations: the unexpected involvement of a core component of cohesin in human disease.  
 Hum Mutat 2010a; 31: 5-10
88. Mannini L, Menga S, Musio A.: The expanding universe of cohesin functions: a new genome stability caretaker involved in human disease and cancer.  
 Hum Mutat 2010b; 31: 623-630
89. McNairn A J, Gerton J L.: Cohesinopathies: One ring, many obligations.  
 Mutat Res 2008; 647: 103-111
90. Merkschlager M.: Cohesin: a global player in chromosome biology with local ties to gene regulation.  
 Curr Opin Genet Dev 2010; 20: 555-561
91. Milutinovich M, Koshland D E.: Molecular biology. SMC complexes--wrapped up in controversy.  
 Science 2003; 300: 1101-1102
92. Mitchell J M, Mansfeld J, Capitanio J, Kutay U, Wozniak R W.: Pom121 links two essential subcomplexes of the nuclear pore complex core to the membrane.  
 J Cell Biol 2010; 191: 505-521
93. Miyake N, Visser R, Kinoshita A, Yoshiura K, Niikawa N, Kondoh T, Matsumoto N, Harada N, Okamoto N, Sonoda T, Naritomi K, Kaname T, Chinen Y, Tonoki H, Kurosawa K.: Four novel NIPBL mutations in Japanese patients with Cornelia de Lange syndrome.  
 Am J Med Genet A 2005; 135: 103-105
94. Miyazaki W Y, Orr-Weaver T L.: Sister-chromatid misbehavior in *Drosophila* ord mutants.  
 Genetics 1992; 132: 1047-1061
95. Mundt E, Bates M D.: Genetics of Hirschsprung disease and anorectal malformations.  
 Semin Pediatr Surg 2010; 19: 107-117
96. Murray J M, Carr A M.: SMC5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication?  
 Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9: 177-182

97. Musio A, Selicorni A, Focarelli M L, Gervasini C, Milani D, Russo S, Vezzoni P, Larizza L.: X-linked Cornelia de Lange syndrome owing to SMC1L1 mutations. *Nat Genet* 2006; 38: 528-530
98. Musio A, Krantz ID.: Cohesin biology and the cohesinopathies: Abstracts from the Second Biennial Conference, Pontignano, Italy, 2009. *Am J Med Genet A* 2010; 152A: 1630-1640
99. National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (stan na 10 lipca 2011)
100. Nasmyth K, Haering C H.: The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 595-648
101. Niu D M, Huang J Y, Li H Y, Liu K M, Wang S T, Chen Y J, Udaka T, Izumi K, Kosaki K.: Paternal gonadal mosaicism of NIPBL mutation in a father of siblings with Cornelia de Lange syndrome. *Prenat Diagn* 2006; 26: 1054-1057
102. Nonaka N, Kitajima T, Yokobayashi S, Xiao G, Yamamoto M, Grewal S I, Watanabe Y.: Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 89-93
103. Ocampo-Hafalla M T, Katou Y, Shirahige K, Uhlmann F.: Displacement and re-accumulation of centromeric cohesin during transient pre-anaphase centromere splitting. *Chromosoma* 2007; 116: 531-544
104. Oliosio G, Passarini A, Atzeri F, Milani D, Cereda A, Cerutti M, Maitz S, Menni F, Selicorni A.: Clinical problems and everyday abilities of a group of Italian adolescent and young adults with Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet A* 2009; 149A: 2532-2537
105. Oliveira J, Dias C, Redeker E, Costa E, Silva J, Reis Lima M, den Dunnen J T, Santos R.: Development of NIPBL locus-specific database using LOVD: from novel mutations to further genotype-phenotype correlations in Cornelia de Lange Syndrome. *Hum Mutat* 2010; 31: 1216-1222
106. Oliver C, Sloneem J, Hall S, Arron K.: Self-injurious behaviour in Cornelia de Lange syndrome: 1. Prevalence and phenomenology. *J Intellect Disabil Res* 2009; 53: 575-589
107. Oliver C, Bedeschi M F, Blagowidow N, Carrico CS, Cereda A, Fitzpatrick D R, Gervasini C, Griffith G M, Kline A D, Marchisio P, Moss J, Ramos F J, Selicorni A, Tunncliffe P, Wierzbica J, Hennekam R C.: Cornelia de Lange syndrome: extending the physical

and psychological phenotype.

Am J Med Genet A 2010; 152A: 1127-1135

108. Onn I, Heidinger-Pauli J M, Guacci V, Unal E, Koshland D E.: Sister chromatid cohesion: a simple concept with a complex reality.  
Annu Rev Cell Dev Biol 2008; 24: 105-129
109. Opitz J M.: The Brachmann-de Lange syndrome.  
Am J Med Genet 1985; 22: 89-102
110. Pajkrt E, Griffin D R, Chitty L S.: Brachmann-de Lange syndrome: definition of prenatal sonographic features to facilitate definitive prenatal diagnosis.  
Prenat Diagn 2010; 30: 865-872
111. Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson H C, Jarmuz A, Canzonetta C, Webster Z, Nesterova T, Cobb B S, Yokomori K, Dillon N, Aragon L, Fisher A G, Merkschlager M.: Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms.  
Cell 2008; 132: 422-433
112. Pie J, Gil-Rodríguez M C, Ciero M, López-Viñas E, Ribate M P, Arnedo M, Deardorff M A, Puisac B, Legarreta J, de Karam J C, Rubio E, Bueno I, Baldellou A, Calvo M T, Casals N, Olivares JL, Losada A, Hegardt FG, Krantz ID, Gómez-Puertas P, Ramos F J.: Mutations and variants in the cohesion factor genes NIPBL, SMC1A, and SMC3 in a cohort of 30 unrelated patients with Cornelia de Lange syndrome.  
Am J Med Genet A 2010; 152A: 924-929
113. Ratajska M, Wierzba J, Pehlivan D, Xia Z, Brundage E K, Cheung S W, Stankiewicz P, Lupski J R, Limon J.: Cornelia de Lange syndrome case due to genomic rearrangements including NIPBL.  
Eur J Med Genet 2010; 53: 378-382
114. Rohatgi S, Clark D, Kline A D, Jackson L G, Pie J, Siu V, Ramos F J, Krantz I D, Deardorff M A.: Facial diagnosis of mild and variant CdLS: Insights from a dysmorphologist survey.  
Am J Med Genet A 2010; 152A: 1641-1653
115. Rollins R A, Morcillo P, Dorsett D.: Nipped-B, a Drosophila homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes.  
Genetics 1999; 152: 577-593
116. Rollins R A, Korom M, Aulner N, Martens A, Dorsett D.: Drosophila nipped-B protein supports sister chromatid cohesion and opposes the stromalin/Scs3 cohesion factor to facilitate long-range activation of the cut gene.

Mol Cell Biol 2004; 24: 3100-3111

117. Russell K L, Ming J E, Patel K, Jukofsky L, Magnusson M, Krantz I D.: Dominant paternal transmission of Cornelia de Lange syndrome: a new case and review of 25 previously reported familial recurrences.  
Am J Med Genet 2001; 104: 267-276
118. Saitoh N, Goldberg I G, Wood E R, Earnshaw W C.: Scll: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure.  
J Cell Biol 1994; 127: 303-318
119. Schmidt D, Schwalie P C, Ross-Innes C S, Hurtado A, Brown G D, Carroll J S, Flicek P, Odom DT.: A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription.  
Genome Res 2010; 20: 578-588
120. Schoumans J, Wincent J, Barbaro M, Djureinovic T, Maguire P, Forsberg L, Staaf J, Thuresson A C, Borg A, Nordgren A, Malm G, Anderlid B M.: Comprehensive mutational analysis of a cohort of Swedish Cornelia de Lange syndrome patients.  
Eur J Hum Genet 2007;15: 143-149
121. Schwarz K, Ma Y, Pannicke U, Lieber M R.: Human severe combined immune deficiency and DNA repair.  
Bioessays 2003; 25: 1061-1070
122. Selicorni A, Sforzini C, Milani D, Cagnoli G, Fossali E, Bianchetti M G.: Anomalies of the kidney and urinary tract are common in de Lange syndrome.  
Am J Med Genet A 2005; 132: 395-397
123. Selicorni A, Russo S, Gervasini C, Castronovo P, Milani D, Cavalleri F, Bentivegna A, Masciadri M, Domi A, Divizia M T, Sforzini C, Tarantino E, Memo L, Scarano G, Larizza L.: Clinical score of 62 Italian patients with Cornelia de Lange syndrome and correlations with the presence and type of NIPBL mutation.  
Clin Genet 2007; 72: 98-108
124. Shintomi K, Hirano T.: Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1.  
Genes Dev 2009; 23: 2224-2236
125. Siala O, Rebai A, Baklouti F, Fakhfakh F.: Subtle discrepancies of SF2/ASF ESE sequence motif among human tissues: A computational approach.  
Comput Biol Chem 2010; 34: 203-209
126. Sjögren C, Nasmyth K.: Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*.

Curr Biol 2001; 11: 991-995

127. Skibbens R V.: Mechanisms of sister chromatid pairing.  
Int Rev Cell Mol Biol 2008; 269: 283-339
128. Sluiter M D, van Rensburg E J.: Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation.  
Breast Cancer Res Treat 2011; 125: 325-349
129. Smits P, Saada A, Wortmann S B, Heister A J, Brink M, Pfundt R, Miller C, Haas D, Hantschmann R, Rodenburg R J, Smeitink J A, van den Heuvel L P.: Mutation in mitochondrial ribosomal protein MRPS22 leads to Cornelia de Lange-like phenotype, brain abnormalities and hypertrophic cardiomyopathy.  
Eur J Hum Genet 2011; 19: 394-399
130. Stavinoha R C, Kline A D, Levy H P, Kimball A, Mettel T L, Ishman S L.: Characterization of sleep disturbance in Cornelia de Lange Syndrome.  
Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2011; 75: 215-218
131. Strachan T.: Cornelia de Lange Syndrome and the link between chromosomal function, DNA repair and developmental gene regulation.  
Curr Opin Genet Dev 2005; 15: 258-264
132. Ström L, Lindroos H B, Shirahige K, Sjögren C.: Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair.  
Mol Cell 2004; 16: 1003-1015
133. Sumara I, Vorlaufer E, Gieffers C, Peters B H, Peters J M.: Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase.  
J Cell Biol 2000; 151: 749-762
134. Sumara I, Vorlaufer E, Stukenberg P T, Kelm O, Redemann N, Nigg E A, Peters J M.: The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase.  
Mol Cell 2002; 9: 515-525
135. Terret M E, Sherwood R, Rahman S, Qin J, Jallepalli P V.: Cohesin acetylation speeds the replication fork.  
Nature 2009; 462: 231-234
136. Tonkin E T, Wang T J, Lisgo S, Bamshad M J, Strachan T.: NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome.  
Nat Genet 2004; 36: 636-641

137. Unal E, Arbel-Eden A, Sattler U, Shroff R, Lichten M, Haber J E, Koshland D.: DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain.  
Mol Cell 2004; 16: 991-1002
138. Vrouwe M G, Elghalbzouri-Maghrani E, Meijers M, Schouten P, Godthelp B C, Bhuiyan Z A, Redeker E J, Mannens M M, Mullenders L H, Pastink A, Darroudi F.: Increased DNA damage sensitivity of Cornelia de Lange syndrome cells: evidence for impaired recombinational repair.  
Hum Mol Genet 2007; 16: 1478-1487
139. Watrin E, Schleiffer A, Tanaka K, Eisenhaber F, Nasmyth K, Peters J M.: Human Scc4 is required for cohesin binding to chromatin, sister-chromatid cohesion, and mitotic progression.  
Curr Biol 2006; 16: 863-874
140. Weaver B A, Cleveland D W.: Does aneuploidy cause cancer?  
Curr Opin Cell Biol 2006; 18: 658-667
141. Weaver B A, Silk A D, Montagna C, Verdier-Pinard P, Cleveland D W.: Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor.  
Cancer Cell 2007; 11: 25-36
142. Weichert J, Schröer A, Beyer D A, Gillessen-Kaesbach G, Stefanova I.: Cornelia de Lange syndrome: antenatal diagnosis in two consecutive pregnancies due to rare gonadal mosaicism of NIPBL gene mutation.  
J Matern Fetal Neonatal Med 2011; 24: 978-982
143. Weitzer S, Lehane C, Uhlmann F.: A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA.  
Curr Biol 2003; 13: 1930-1940
144. Wendt K S, Peters J M.: How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression.  
Chromosome Res 2009; 17: 201-214
145. Weterings E, van Gent D C.: The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synopsis.  
DNA Repair (Amst) 2004; 3: 1425-1435
146. Wierzba J., Wierzba T., Mazyrkiewicz – Bełdzińska M., Szyca R., Kozłowski J., Banach P. Potaż P., Limon J.: Dorosły z rzadkim schorzeniem genetycznym – diagnostyka i terapia zespołu Cornellii de Lange.  
Forum medycyny rodzinnej 2010; 4: 167 - 174

147. Wierzba J, Kuzniacka A, Ratajska M, Lipska B S, Kardas I, Iliszko M, Limon J.: Cornelia de Lange syndrome associated with a de-novo novel NIPBL splice-site mutation and a coincidental inherited translocation t(3;5)(p13;q11).  
Clin Dysmorphol 2011; [Epub ahead of print]
148. Yan J, Saifi G M, Wierzba T H, Withers M, Bien-Willner G A, Limon J, Stankiewicz P, Lupski J R, Wierzba J.: Mutational and genotype-phenotype correlation analyses in 28 Polish patients with Cornelia de Lange syndrome.  
Am J Med Genet A 2006; 140: 1531-1541
149. Yan J, Zhang F, Brundage E, Scheuerle A, Lanpher B, Erickson R P, Powis Z, Robinson H B, Trapane P L, Stachiw-Hietpas D, Keppler-Noreuil K M, Lalani S R, Sahoo T, Chinault A C, Patel A, Cheung S W, Lupski J R.: Genomic duplication resulting in increased copy number of genes encoding the sister chromatid cohesion complex conveys clinical consequences distinct from Cornelia de Lange.  
J Med Genet 2009; 46: 626-634
150. Zhang B, Chang J, Fu M, Huang J, Kashyap R, Salavaggione E, Jain S, Kulkarni S, Deardorff M A, Uzielli M L, Dorsett D, Beebe D C, Jay P Y, Heuckeroth R O, Krantz I, Milbrandt J.: Dosage effects of cohesin regulatory factor PDS5 on mammalian development: implications for cohesinopathies.  
PLoS One 2009; 4: e5232
151. Zhang F, Khajavi M, Connolly A M, Towne C F, Batish S D, Lupski J R.: The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans.  
Nat Genet 2009; 41: 849-853
152. Zhang J, Shi X, Li Y, Kim B J, Jia J, Huang Z, Yang T, Fu X, Jung S Y, Wang Y, Zhang P, Kim S T, Pan X, Qin J.: Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast.  
Mol Cell 2008; 31: 143-151
153. Zhang N, Kuznetsov S G, Sharan S K, Li K, Rao P H, Pati D.: A handcuff model for the cohesin complex.  
J Cell Biol 2008; 183: 1019-1031
154. Zhang Z, Takeshima Y, Awano H, Nishiyama A, Okizuka Y, Yagi M, Matsuo M.: Tandem duplications of two separate fragments of the dystrophin gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy.  
J Hum Genet 2008; 53: 215-219