



Inga Kempa

**KANDIDĀTGĒNU IDENTIFIKĀCIJA
NESINDROMĀLO LŪPAS AR/BEZ
AUKSLĒJU ŠĶELTŅU UN IZOLĒTAS
AUKSLĒJU ŠĶELTNES ATTĪSTĪBĀ**

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte - Medicīniskā ģenētika

Rīga, 2013

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, Rīga, Latvija un Molekulārās ģenētikas zinātniskā laboratorijā, Rīgas Stradiņa universitāte, Rīga, Latvija, sadarbībā ar Pitsburgas Universitāti, Pitsburga, ASV un Tartu Universitāti, Tartu, Igaunija.

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. med. **Baiba Lāce**, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, Rīga, Latvija

Dr. biol. **Jānis Kloviņš**, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, Rīga, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. biol., prof. **Edvīns Miklaševičs**, Rīgas Stradiņa universitāte, Rīga, Latvija

Dr. biol. **Dace Pjanova**, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, Rīga, Latvija

PhD, MD, prof. **Kairit Joost**, Tartu universitātes slimnīca, Tartu, Igaunija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2013. gada 29. aprīlī plkst. 15:00 Rīgas Stradiņa universitātes Teorētiskās medicīnas Promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:

www.rsu.lv

Promocijas darbs veikts ar Eiropas sociālā fonda projekta “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu



Promocijas padomes sekretārs:

Dr. habil. med., prof. **Līga Aberberga-Augškalne**

SATURS

1. IEVADS	4
1.1. Promocijas darba mērķi	7
1.2. Promocijas darba uzdevumi	7
1.3. Darba hipotēze	7
1.4. Darba zinātniskā novitāte	8
2. MATERIĀLI UN METODEDES	8
2.1. Analizētās personas	8
2.2. DNS izdalīšana	10
2.3. Genotipēšana ar APEX-2 metodi	10
2.4. Genotipēšana ar TaqMan tehnoloģiju	12
2.5. Genotipēšana ar MALDI-TOF tehnoloģiju	13
2.6. Datu statistiskā analīze	14
3. REZULTĀTI	15
3.1. Genotipēšana ar APEX-2 metodi	15
3.2. Genotipēšana ar MALDI-TOF tehnoloģiju	19
3.2.1. <i>BCL3</i> gēns	19
3.3. Genotipēšana ar TaqMan tehnoloģiju	22
3.3.1. 19q13 lokuss	22
3.3.2. <i>BMP4</i> gēns	23
3.3.3. <i>IRF6</i> gēns.....	25
4. DISKUSIJA	28
SECINĀJUMI	42
PUBLIKĀCIJAS	43
PATEICĪBAS	48
LITERATŪRAS SARAKSTS	49

1. IEVADS

Lūpas šķeltne ar/bez aukslēju šķeltnes un izolēta aukslēju šķeltne (LŠ/LŠ+AŠ/AŠ) ir iedzimts defekts, kas skar virslūpu, alveolāro loku, zobu šķilšanos un aukslēju saplūšanu dažādās pakāpēs. Lūpas un aukslēju veidošanās ir vairāku procesu rezultāts, kas ietver šūnu proliferāciju, šūnu diferenciāciju, šūnu adhēziju un apoptozi. Problēmas jebkurā no šiem procesiem var veicināt šķeltņu veidošanos. LŠ/LŠ+AŠ/AŠ ir viens no visbiežāk sastopamajiem defektiem jaundzimušo vidū (Mooney and Siegel, 2002). Aukslēju šķeltne (AŠ) un lūpas šķeltne ar lūpas un aukslēju šķeltni (LŠ/LŠ+AŠ) etioloģiski tiek uzskatītas kā atšķirīgas, kas varētu tikt izskaidrots ar to, ka lūpas un aukslēju attīstība notiek dažādos embrioloģiskās attīstības periodos (Murray, 2002). Aprēķinātā LŠ/LŠ+AŠ prevalence visā pasaulē variē no 1/300 līdz 1/2500 dzimušajiem, bet AŠ prevalence ir aptuveni 1/500 dzimušajiem, kas variē atkarībā no ģeogrāfiskā reģiona un dažādas etniskās piederības (Stanier and Moore, 2004).

Nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ etioloģiju nosaka daudzu ģenētisko faktoru mijiedarbība ar ārējās vides faktoriem. Divdesmit procentiem no LŠ/LŠ+AŠ/AŠ pacientiem dažādās populācijās ir pozitīva LŠ/LŠ+AŠ/AŠ ģimenes vēsture un dvīņu pētījumi atklāja, ka LŠ/LŠ+AŠ/AŠ konkordances līmenis starp monozigotiskiem (MZ) dvīņiem ir 60%, bet starp dizigotiskiem (DZ) dvīņiem - 10% (Murray, 2002). Šobrīd daudzi gēni tiek uzskatīti kā iespējamie nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ kandidātģēni, pamatojoties uz saistības un asociācijas pētījumiem dažādās populācijās. Ārējās vides faktoru ietekme un to mijiedarbība ar dažādiem gēniem, kas iesaistīti embriogēnēzē, arī ir nozīmīgi faktori LŠ/LŠ+AŠ/AŠ attīstībā (Stanier and Moore, 2004).

Aptuveni 30% gadījumu LŠ/LŠ+AŠ/AŠ izraisa dažādi zināmi monogēnie sindromi vai hromosomālas aberācijas, savukārt nesindromālās LŠ/LŠ+AŠ/AŠ (~70%) ir kompleksa patoloģija, kurā iesaistīti daudzi

ģenētiskie faktori (Schutte and Murray, 1999). Nesen veikti pētījumi ir izvirzījuši hipotēzi, ka 2-14 gēni varētu būt izraisošie faktori LŠ/LŠ+AŠ/AŠ attīstībā (Schielkelman and Slatkin, 2002).

Ļoti daudzi pētījumi ir veltīti tam, lai identificētu gēnus, kas varētu būt iesaistīti LŠ/LŠ+AŠ/AŠ etioloģijā. Lai atklātu kandidātģenus un lokusus, kas iesaistīti nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ veidošanās procesā, visā pasaulē ir veikti dažādi plaša genoma saistības (*genome-wide linkage screens*) un plaša genoma asociācijas analīzes (*genome-wide association studies*), kā arī gēnu kartēšana (*fine mapping*). Neseni pētījumi atklāja un apstiprināja tādus reģionus kā 1p21-p31, 1q32, 2p13, 3q27-28, 4q21-q26, 8q24, 9q21, 10q25.3, 12p11, 14q21-24, 16q24 un 17q22 (Marazita et al., 2004, Riley et al., 2007a, Marazita et al., 2009, Birnbaum et al., 2009, Mangold et al., 2009, 2010). Tomēr, neskatoties uz to, ka ir pētīti un atklāti neskaitāmi iespējamie LŠ/LŠ+AŠ/AŠ kandidātģēni, vienīgi *IRF6* gēna ietekme ir pierādīta, analizējot daudzas populācijas un tiek uzskatīts, ka *IRF6* gēns ir atbildīgs par 12%-18% no visiem nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ gadījumiem (Zucchero et al., 2004). Šie rezultāti ir replicēti dažādās populācijās, apstiprinot *IRF6* gēna nozīmi LŠ/LŠ+AŠ/AŠ etioloģijā atšķirīgās etniskās grupās (Marazita et al., 2009). Vairāk kā 20 nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ kandidātģēnu sekvenēšana, lai identificētu mutācijas, atklāja, ka tikai 2%-6% no visiem analizētajiem indivīdiem, ir mutācijas *FOXE1*, *GLI2*, *JAG2*, *LHX8*, *MSX1*, *MSX2*, *SATB2*, *SKI*, *SPRY2*, *TBX10* gēnos (Vieira et al., 2005; Jezewski et al., 2003). Neseni pētījuma rezultāti atklāja, ka FGF signālceļi var ietekmēt ~ 3%-5% no visiem nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ gadījumiem (Riley et al., 2007b). Literatūrā ir pieejami dati, ka ir analizēti arī citi gēni, piem., *TGFA*, *BCL3*, *PVR* un *PVRL2* gēni, bet iegūtie rezultāti ir pretrunīgi ģenētiski dažādās populācijās (Carreno et al., 2002, Pezzetti et al., 2007, Martinelli et al., 1998, Fujita et al., 2004).

Ir veikti dažādi eksperimenti ar *knockout* dzīvnieku modeļiem, lai atklātu jaunus LŠ/LŠ+AŠ/AŠ kandidātģēnus. Pētījumi ar cāļiem un pelēm

identificēja dažus ļoti svarīgus signālceļus, piemēram, Fgf signālceļus un to nozīmi sejas morfoģenēzē un virslūpas attīstībā (Trumpp et al., 1999). Pētījumos ar pelēm atklāja divus Wnt gēnus (*WNT3* un *WNT9B*), kas ir iesaistīti sejas morfoģenēzē un LŠ/LŠ+AŠ attīstībā (Juriloff et al., 2001, 2004, 2005, Brugmann et al., 2007).

Ir veikti arī pētījumi, kā rezultātā tiek uzskatīts, ka indivīdiem ar LŠ/LŠ+AŠ/AŠ, ir paaugstināts sirds-asinsvadu slimību un audzēju saslimstības un mirstības risks, salīdzinot ar veseliem indivīdiem. Tiek uzskatīts arī, ka indivīdiem ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ/AŠ, ir paaugstināts epilepsijas, pneimonijas, aspirācijas u.c. mirstības risks no, kā arī ir paaugstināts pašnāvību risks (Christensen et al., 2004).

Neskatoties uz to, ka mūsdienās ir iespēja ķirurģiski labot šo defektu, lūpas šķeltne ar/bez aukslēju šķeltnes un izolēta aukslēju šķeltne ir kļuvusi par vienu no svarīgām sabiedrības veselības problēmām visā pasaulē, tādēļ ir ļoti svarīgi pētīt un noskaidrot mehānismus, kas iesaistīti LŠ/LŠ+AŠ/AŠ etioloģijā.

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti atklāja ļoti augstu saistību starp *FGFR1*, *WNT3*, *SKI*, *BMP4* un *IRF6* gēniem un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ, kā arī norāda uz iespējamo saistību starp 19q13 lokusu un nesindromālajām LŠ/LŠ+AŠ. Šie rezultāti turpina apstiprināt minēto gēnu nozīmi nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņu un izolētas aukslēju šķeltnes attīstībā eiropiešiem.

Šis ir pirmais tik liela mēroga pētījums, kas ir veltīts nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ kandidātģēnu analīzei Latvijā. Pētījumā iegūtie rezultāti ir vērā ņemams ieguldījums šīs sarežģītās patoloģijas izpratnē un iespējamo gēnu ietekmes izvērtēšanā slimības izraisīšanā.

1.1. Promocijas darba mērķi

Veikt kandidātģēnu pētījumu, lai noskaidrotu, kuri ģēni ir iesaistīti nesindromālo lūpas šķeltņes ar/bez aukslēju šķeltņū un izolētas aukslēju šķeltņes attīstībā.

1.2. Promocijas darba uzdevumi

Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši darba uzdevumi:

1. Atlasīt iespējamos kandidātģēnus, kas varētu būt iesaistīti nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņū un izolētas aukslēju šķeltņes etioloģijā, un veikt atlasīto ģenētisko marķieru genotipēšanu.
2. Veikt gadījuma-kontroles analīzi, lai noteiktu, vai ģenētiskajām variācijām analizētajos ģēnos ir saistība ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ.
3. Veikt haplotipu analīzi, lai atklātu haplotipus, kam ir riska vai aizsargājošs efekts nesindromālo LŠ/LŠ+A un AŠ attīstībā, salīdzinot ar kontroles populāciju.
4. Veikt ģimeņu asociācijas analīzi, analizējot ģenētiskos marķierus *BCL3*, *PVR*, *PVRL2*, *CLPTMI*, *BMP4* un *IRF6* ģēnos, lai novērtētu nobīdi no informatīvās alēles pārmantošanas līdzsvara triādēs ar transmisijas disekvilibrācijas testu (TDT).
5. Veikt *BCL3* ģēna piecu SNP (rs7257231, rs10401176, rs8103315, rs1979377 un rs2927456) salīdzinošo analīzi Brazīlijas nesindromālo lūpas šķeltņes ar/bez aukslēju šķeltņū un izolētas aukslēju šķeltņes pacientiem un kontroles populācijai.

1.3. Darba hipotēze

4. Atšķirīgi ģēni un ģenētiskie marķieri ir iesaistīti nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņū un izolētas aukslēju šķeltņes attīstībā Latvijas populācijā, salīdzinot ar citām Eiropas izcelsmes populācijām.

1.4. Darba zinātniskā novitāte

Šis ir pirmais tik liela mēroga pētījums, kas ir veltīts nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ kandidātģēnu analīzei Latvijā.

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti pirmo reizi parādīja *SKI*, *WNT3*, *BMP4*, *IRF6* un *FGFR1* ģēnu nozīmi nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ attīstībā Latvijas populācijā. Iegūtie rezultāti var tikt izmantoti turpmākiem pētījumiem, lai noskaidrotu dažādu ģēnu savstarpējo mijiedarbību un ģēnu mijiedarbību ar dažādiem ārējās vides faktoriem, tādējādi palīdzot izprast šīs sarežģītās patoloģijas veidošanās mehānismus.

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Analizētās personas

Pētījumā tika iekļauti pacienti ar nesindromālu lūpas šķeltni (LŠ), pacienti ar nesindromālu lūpas šķeltni un aukslēju šķeltni (LŠ+A), pacienti ar nesindromālu aukslēju šķeltni (AŠ), bez vecuma ierobežojuma, bez dzimuma ierobežojuma un Eiropas izcelsmes. Pacientu pētāmajā grupā netika iekļauti pacienti ar sindromālu LŠ/LŠ+AŠ/AŠ vai kādu citu diagnosticētu iedzimtu patoloģiju, kā arī pacienti no bērnu namiem. Kontroles grupā tika iekļauti savstarpēji neradnieciski, randomi atlasīti indivīdi, bez pozitīvas lūpas šķeltnes ar/bez aukslēju šķeltnes vai izolētas aukslēju šķeltnes ģimenes anamnēzes, bez vecuma ierobežojuma, bez dzimuma ierobežojuma un Eiropas izcelsmes. Indivīdi ar dažādām diagnosticētām iedzimtām patoloģijām un adoptēti indivīdi tika izslēgti no kontroles grupas.

Pētījums tika veikts ar Latvijas Centrālās medicīnas ētikas komitejas atļauju. Pirms materiālu ievākšanas vai jebkādas manipulācijas ar ievāktu materiālu, visas pētījumā iesaistītās personas parakstīja piekrišanas formu par

dalību pētījumā. Gadījumā, ja kāda persona bija jaunāka par 18 gadiem, piekrišanas formu parakstīja personas vecāki.

Pacienti un viņu vecāki tika iesaistīti pētījumā Rīgas Stradiņa universitātes Stomatoloģijas institūta Rīgas Lūpu, aukslēju un sejas šķeltnu centrā.

Kontroles grupu sastādīja 190 indivīdi, kas tika iesaistīti pētījumā Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā Valsts Iedzīvotāju genoma datu bāzes ietvaros, un 293 indivīdi, kas tika iekļauti pētījumā no Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas datu bāzes.

Gadījuma-kontroles saistības analīzes veikšanai tika analizēti 661 indivīds no Latvijas populācijas, no kuriem 178 indivīdi bija pacienti ar nesindromālu lūpas šķeltni ar/bez aukslēju šķeltni un izolētu aukslēju šķeltni (LŠ/LŠ+AŠ/AŠ), un 483 indivīdi bija kontroles grupa. No visiem 178 nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ pacientiem, 135 pacienti bija ar nesindromālu LŠ/LŠ+AŠ (36 pacienti ar LŠ, 99 pacienti ar LŠ+AŠ) un 43 pacientiem bija nesindromāla aukslēju šķeltne (AŠ).

Transmisijas disekvilibrācijas tests (TDT) tika veikts 122 triādēm (122 pacientiem un to abiem vecākiem, kopā 366 personām) Latvijas populācijā. No 122 triādēm, 89 triādes bija 89 nesindromālo LŠ/LŠ+A pacienti un to abi vecāki (kopā 267 personas), bet 33 triādes bija 33 pacienti ar nesindromālu aukslēju šķeltni un to abi vecāki (kopā 99 personas).

Papildus tika analizēti 606 DNS paraugi no Brazīlijas populācijas, no kuriem 338 paraugi bija nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ pacientu DNS paraugi un 268 kontroles grupas DNS paraugi. Pacientu grupā tika iekļauti pacienti ar nesindromālu lūpas šķeltni (LŠ), pacienti ar nesindromālu lūpas šķeltni un aukslēju šķeltni (LŠ+AŠ), pacienti ar nesindromālu aukslēju šķeltni (AŠ), bez vecuma ierobežojuma, bez dzimuma ierobežojuma un Eiropas izcelsmes, izslēdzot pacientus ar sindromālu LŠ/LŠ+AŠ/AŠ un kādu citu diagnosticētu

iedzimtu patoloģiju. Kontroles grupā tika iekļauti savstarpēji neradnieciski un veseli indivīdi, bez pozitīvas lūpas/ar bez aukslēju šķeltnes vai izolētas aukslēju šķeltnes ģimenes anamnēzes, bez vecuma ierobežojuma, bez dzimuma ierobežojuma un Eiropas izcelsmes, izslēdzot indivīdus ar dažādām diagnosticētām iedzimtām patoloģijām. No visiem 338 nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ pacientiem, 294 pacienti bija ar nesindromālu LŠ/LŠ+AŠ un 44 pacienti - ar nesindromālu aukslēju šķeltņi (AŠ). Paraugi no Brazīlijas populācijas tika iegūti *Dental Clinics of the Hospital of Rehabilitation and Craniofacial Anomalies and Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil*. Pētījums tika veikts ar vietējās ētikas komitejas atļauju. Visi pētījumā iesaistītie dalībnieki parakstīja piekrišanas formu dalībai pētījumā.

2.2. DNS izdalīšana

Genomiskā DNS no nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ pacientiem, to vecākiem un kontroles grupas tika iegūta no venozajām asinīm vai siekalām, izmantojot standarta fenola-hloroforma metodi, veicot tajā nelielas izmaiņas.

2.3. Genotipēšana ar APEX-2 metodi

Lai pētījumā tiktu iekļauti SNP ar minorās alēlēs frekvenci (MAF) > 0,05 un $r^2 = 0,8$, tika atlasīts 651 tagSNP interesējošajos rajonos, pamatojoties uz *HapMap Phase II* datiem, izmantojot *HapMap CEU* kā references populāciju. Kopā tika atlasīti vairāki SNP katrā interesējošā gēnā, ieskaitot 10 kb no interesējošā gēna *upstream* vai *downstream* daļas.

Genotipēšanai atlasīto SNP saraksts un to lokalizācija gēnā redzama

2.3.1. tabulā.

2.3.1. tabula

Pētījumā iekļautie kandidātgēni un to lokusi

Gēns/Lokuss	Hromosomālā lokalizācija	Genotipēto SNP [^] skaits
<i>MTHFR</i>	1p36.3	11
<i>LHX8</i>	1p31.1	9
<i>COL11A1</i>	1p21	48

2.3.1. tabulas turpinājums		
Gēns/Lokuss	Hromosomālā lokalizācija	Genotipēto SNP skaits
<i>SKI</i>	1q22-q24	20
<i>IRF6</i>	1q32.3-q41	11
<i>TGFA</i>	2p13	41
<i>FN1</i>	2q34	30
<i>MSX1</i>	4p16.3-p16.1	15
<i>FGF2</i>	4q26-q27	20
<i>FGF1</i>	5q31	35
<i>MSX2</i>	5q34-q35	6
<i>EDN1</i>	6p24.1	15
<i>COL11A2</i>	6p21.3	22
<i>FGFR1</i>	8p11.2-p11.1	12
<i>FOXE1</i>	9q22	4
<i>TBX10</i>	11q13.2	10
<i>MMP3</i>	11q22.3	8
<i>MMP13</i>	11q22.3	20
<i>PVRL1</i>	11q23.3	19
<i>COL2A1</i>	12q13.11	33
<i>SPRY2</i>	13q31.1	3
<i>BMP4</i>	14q22-q23	4
<i>TGFB3</i>	14q24	8
<i>JAG2</i>	14q32	11
<i>MMP25</i>	16p13.3	7
<i>MMP2</i>	16q13-q21	21
<i>CDH1</i>	16q22.1	14
<i>RARA</i>	17q21	5
<i>WNT3</i>	17q21	17
<i>WNT9B</i>	17q21	12
<i>TIMP2</i>	17q25	26
' <i>OFC11</i> '	18q21**	27
<i>BCL3</i>	19q13.1-q13.2	4
<i>PVRL2</i>	19q13.2	13
<i>CLPTM1</i>	19q13.2-q13.3***	8
<i>BMP2</i>	20p12	25
<i>MMP9</i>	20q11.2-q13.1	6
<i>TIMP3</i>	22q12.3****	38
<i>TBX22</i>	Xq21.1	7
<i>TIMP1</i>	Xp11.3-p11.23	6

^ SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*);

* iekļaujot *NUDT6* gēnu;

** iekļaujot *SMAD2* un *SMAD4* gēnus;

*** iekļaujot *APOC2* gēnu;

**** iekļaujot *SYN3* gēnu

Visu 651 ģenētisko marķieru genotipēšana 44 gēnos tika veikta, pamatojoties uz publicēto standarta protokolu (Krjutskov et al., 2008).

2.4. Genotipēšana ar TaqMan tehnoloģiju

Trīs marķieri *BMP4* gēnā, seši marķieri 19q13 lokusā un septiņi marķieri *IRF6* gēnā tika atlasīti, pamatojoties uz nesen publicētiem pētījumiem par apstiprinātiem saistības un asociācijas analīzes rezultātiem ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ. Detalizēta informācija par atlasītajiem SNP ir redzama 2.4.1. tabulā.

2.4.1. tabula
Atlasītie SNP genotipēšanai ar TaqMan zondēm

SNP [^]	Hromosomālā lokalizācija	Gēns	SNP lokalizācija gēnā	Alēle*	MAF**
rs1957860	14: 53499105	<i>BMP4</i>	~6 kb <i>downstream</i> no gēna	C/T	0.383
rs17563	14: 53487272	<i>BMP4</i>	5. eksons	A/G	0.373
rs2071047	14: 53488161	<i>BMP4</i>	4. introns	G/A	0.406
rs35385129	19: 49854029	<i>PVR</i>	6. eksons	C/A	0.164
rs10421283	19: 49881333	<i>PVR/ BCL3</i>	~20 kb <i>downstream</i> no <i>PVR</i> gene un ~62 kb <i>upstream</i> no <i>BCL3</i> gēna	G/A	0.476
rs2927438	19: 49933947	<i>BCL3</i>	~10 kb <i>upstream</i> no gēna	G/A	0.190
rs419010	19: 50060160	<i>PVRL2</i>	1. introns	T/C	0.484
rs2075620	19: 50171877	<i>CLPTM1</i>	6. introns	A/G	0.362
rs875255	19: 50185475	<i>CLPTM1</i>	11. introns	G/C	0.428
rs4844880	1: 207937539	<i>IRF6</i>	~88 kb <i>upstream</i> no gēna	T/A	0.355
rs2013162	1: 208035307	<i>IRF6</i>	4. eksons	C/A	0.403
rs861019	1: 208042009	<i>IRF6</i>	1. introns	A/G	0.399
rs2073487	1: 208043269	<i>IRF6</i>	1. introns	T/C	0.402
rs642961	1: 208055893	<i>IRF6</i>	~10 kb <i>downstream</i> no gēna	G/A	0.175
rs658860	1: 208057172	<i>IRF6</i>	~11 kb <i>downstream</i> no gēna	C/T	0.181
rs2235371	1: 208030703	<i>IRF6</i>	6. eksons	C/T	0.138

[^] SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*);

* Majorā alēle ir norādīta pirmā; ** Mīnorās alēles frekvence no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Genotipēšana tika veikta ar TaqMan zondēm (*Applied Biosystems*, USA), izmantojot reālā laika PCR iekārtas *7500 Real-Time PCR System* un *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, ASV). Visas reakcijas tika veiktas pēc ražotāja ieteiktā standarta protokola.

2.5. Genotipēšana ar MALDI-TOF tehnoloģiju

Astoņi SNP (2.5.1. attēls) tika atlasīti, lai vienmērīgi nosegtu visu *BCL3* gēnu ~ ar 1 kb distanci, ņemot vērā pieejamo informāciju par alēļu frekvencēm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).



2.5.1. attēls. *BCL3* gēna uzbūve un pētījumā atlasīto SNP aptuvenā lokalizācija. Vertikālās līnijas nozīmē aptuveno SNP lokalizāciju *BCL3* gēnā. Melnie taisnstūri apzīmē eksonus. Līnijas, kas savieno taisnstūrus, apzīmē intronus.

Genotipēšana tika veikta ar MALDI-TOF tehnoloģijas palīdzību, izmantojot reaģentu komplektu *Bruker Daltonics genostrep 96 kit 10x96* (*Bruker Daltonics*, Vācija), veicot nelielas izmaiņas to sastāvā.

Detalizēta informācija par pētījumā iekļautajiem SNP redzama 2.5.1. tabulā.

2.5.1. tabula
Atlasītie SNP *BCL3* gēnā

SNP [^]	Hromosomālā lokalizācija	SNP lokalizācija gēnā	Alēle*	MAF**
rs7257231	19: 49944279	1. introns	T/A	0.276
rs10401176	19: 49945331	1. introns	G/A	0.160
rs8103315	19: 49946008	1. introns	G/T	0.054
rs2927457	19: 49948787	2. introns	T/G	0.051
rs11671085	19: 49949647	2. introns	C/T	Nav zināma
rs1979377	19: 49950842	2. introns	G/T	0.187
rs2927456	19: 49952054	3. introns	C/T	0.130
rs2306148	19: 49953271	6. introns	C/T	Nav zināma

[^] SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*);

* Majorā alēle ir norādīta pirmā; ** Minorās alēles frekvence no <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2.6. Datu statistiskā analīze

Visiem analizētajiem marķieriem tika pārbaudīts, vai ir novirze no Hārdija-Veinberga līdzsvara, izmantojot standarta χ^2 testu ar 1 brīvības pakāpi ($df=1$). Alēļu frekvences atšķirības starp pacientiem un kontrolēm tika novērtētas katram analizētajam marķierim, izmantojot standarta χ^2 testu ar 1 brīvības pakāpi ($df=1$). Tika aprēķināta izredžu attiecība (OR) un 95% ticamības intervāls (CI), izmantojot standarta χ^2 testu, izmantojot t.s. multiplikatīvo (*multiplicative*) modeli. Rezultātu statistiskās ticamības izvērtēšanai tika noteikts būtiskuma līmenis $\alpha=0,05$. Haplotipu analīze tika veikta, izmantojot χ^2 testu ar slīdošā loga metodes un LD bloka analīzes palīdzību. Iegūto datu statistiskai apstādei tika izmantota PLINK v.1.07 programmatūra (Purcell et al., 2007). Lai koriģētu multiplās testēšanas kļūdu, tika izmantota Bonferroni korekcijas metode ($0,05/\text{analizēto marķieru skaits}$, piemērojot konkrētai analizēšanas metodei).

Veicot datu statistisko analīzi, nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņu un izolētas aukslēju šķeltnes pacienti tika iedalīti 2 grupās - vienā grupā tika iekļauti nesindromālu aukslēju šķeltņu (AŠ) pacienti, otrā grupā - pacienti ar nesindromālu lūpas šķeltņi (LŠ) un pacienti ar nesindromālu lūpas šķeltņi ar aukslēju šķeltņi (LŠ+AŠ), jo tiek uzskatīts, ka LŠ un LŠ/AŠ iedzimst kopā.

3. REZULTĀTI

Šajā nodaļā rezultāti ir atspoguļoti, pamatojoties uz izmantotajām genotipēšanas metodēm. Kopumā tika izmantotas trīs dažādas genotipēšanas tehnoloģijas.

3.1. Genotipēšana, izmantojot APEX-2 metodi

Seši simti piecdesmit viens marķieris 44 gēnos tika analizēts 106 pacientiem ar lūpas šķeltņi un lūpas šķeltņi kopā ar aukslēju šķeltņi (LŠ/LŠ+AŠ), 29 pacientiem ar aukslēju šķeltņi (AŠ) un 182 veseliem un neradnieciskiem indivīdiem, kas tika izmantoti kā kontroles kopa.

3.1.1. tabulā ir atspoguļoti visi marķieri, kas saglabāja statistiski ticamu saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ pēc multiplās testēšanas korekcijas.

Tika atklāta ļoti augsta saistība starp SNP rs16824948, kas ir lokalizēts *SKI* gēnā, un nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ fenotipu, kur alēle T bija saistīta ar paaugstinātu LŠ/LŠ+AŠ risku (p-vērt. = $0,0013 \times 10^{-14}$; OR = 6,376; 95% CI = 4,039-10,07). Atklātā saistība saglabājās arī pēc Bonferroni korekcijas piemērošanas.

SNP rs11655598, kas atrodas *WNT3* gēnā, uzrādīja ļoti augstu saistību (p-vērt. = $0,0053 \times 10^{-11}$; OR = 5,925; 95% CI = 3,593-9,772) ar nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ, to saglabājot arī pēc multiplās testēšanas korekcijas. Alēle G bija saistīta ar paaugstinātu nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ risku.

Tika atklāts, ka arī *FGFR1* gēna SNP rs7829058 alēle C, ir saistīta ar paaugstinātu risku attīstīties nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ (p-vērt. = $0,0024 \times 10^{-5}$; OR = 7,991; 95% CI = 3,435-18,59).

Visaugstākā saistība starp analizētajiem marķieriem un nesindromālu AŠ tika atklāta SNP rs11655598, lokalizēts *WNT3* gēnā, kur alēle G bija asociēta ar paaugstinātu nesindromālo AŠ risku (p-vērt. = $0,0039 \times 10^{-11}$; OR = 9,495; 95% CI = 4,879-18,34).

SNP rs16824948 *SKI* gēnā uzrādīja ļoti augstu saistību (p-vērt. = $0,0011 \times 10^{-7}$; OR = 6,777; 95% CI = 3,577-12,84) ar nesindromālo AŠ, to saglabājot arī pēc multiplās testēšanas korekcijas. Alēle T bija saistīta ar paaugstinātu nesindromālo AŠ risku.

Tika atklāts, ka rs7829058, kas atrodas *FGFR1* gēnā ir saistīts ar paaugstinātu nesindromālo AŠ risku (p-vērt = $0,0002 \times 10^{-6}$; OR = 13,16; 95% CI = 4,93-35,1), kur alēle C uzrādīja saistību ar paaugstinātu risku attīstīties šim šķeltnes fenotipam.

3.1.1. tabula
Nozīmīgākie gadījuma-kontroles asociācijas analīzes rezultāti un to saistība ar LŠ/LŠ+AŠ un AŠ

Gēns	SNP [^]	Alē-les [#]	MAF ^{**}		p-vērt.	OR ^{^^}	95% CI ^{###}
			Gadīj.	Kontr.			
LŠ/LŠ+AŠ							
<i>SKI</i>	rs16824948	C/T	0,382	0,088	$0,0013 \times 10^{-14}$	6,376	4,039-10,07
<i>FGFR1</i>	rs7829058	G/C	0,137	0,019	$0,0024 \times 10^{-5}$	7,991	3,435-18,59
<i>WNT3</i>	rs11655598	C/G	0,307	0,069	$0,0053 \times 10^{-11}$	5,925	3,593-9,772
AŠ							
<i>SKI</i>	rs16824948	C/T	0,397	0,088	$0,0011 \times 10^{-7}$	6,777	3,577-12,84
<i>FGFR1</i>	rs7829058	G/C	0,207	0,019	$0,0002 \times 10^{-6}$	13,16	4,93-35,1
<i>WNT3</i>	rs11655598	C/G	0,414	0,069	$0,0039 \times 10^{-11}$	9,459	4,879-18,34

[^] SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*); [#] Majorā alēle ir norādīta pirmā; ^{**} MAF - minorās alēles frekvence; ^{^^} OR - izredžu attiecība (*odds ratio*); ^{###} 95% CI - 95% ticamības intervāls (*confidence interval*)

Haplotipu asociācijas analīze tika veikta, izmantojot divus dažādus principus. *SKI*, *WNT3* un *FGFR1* gēnu haplotipu analīze tika veikta, piemērojot divu līdz piecu SNP slīdošā loga principu. Šie gēni tika izvēlēti haplotipu analīzei, jo tika atklāts, veicot gadījuma-kontroles saistības analīzi, ka SNP, kas atrodas šajos gēnos, ir saistīti ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ. Otrās haplotipu analīzes princips bija veikt visu gēnu haplotipu analīzi, veicot LD bloku analīzi.

3.1.2. tabulā un 3.1.3. tabulā atspoguļoti labākie *SKI* gēna haplotipu saistības analīzes rezultāti (p vērt. $\leq 0,0001$), izmantojot slīdošā loga principu.

Visaugstākā saistība ar LŠ/LŠ+AŠ tika atklāta deviņiem haplotipiem *SKI* gēnā, no kuriem visi haplotipi bija saistīti ar paaugstinātu LŠ/LŠ+AŠ risku.

3.1.2. tabula

Labākie *SKI* gēna haplotipu analīzes rezultāti un to saistība ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ

**SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	Frekvence		p-vērt.
					Gadīj.	Kontr.	
rs262683	rs2460000	rs263533	rs16824948	rs903910	*	*	*
T	G	T	T	C	0,112	0,001	0,0172x10 ⁻⁸
rs2460000	rs263533	rs16824948	rs903910	rs4648625	*	*	*
G	T	T	C	T	0,109	0,003	0,0106x10 ⁻⁷
rs263533	rs16824948	rs903910	rs4648625	rs6673129	*	*	*
C	T	C	T	*	0,13	0,003	0,0132x10 ⁻⁸
C	T	C	*	*	0,137	0,003	0,0034x10 ⁻⁸
C	T	*	*	*	0,291	0,079	0,0176x10 ⁻⁸
rs16824948	rs903910	rs4648625	rs6673129	rs12045693	*	*	*
T	C	T	C	A	0,116	0,003	0,0282x10 ⁻⁸
T	C	T	C	*	0,134	0,007	0,0092x10 ⁻⁷
T	C	T	*	*	0,228	0,013	0,0062x10 ⁻¹⁴
T	C	*	*	*	0,233	0,014	0,0392x10 ⁻¹⁵

*Tukša šūna; **SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*)

Analīzes rezultātā tika atklāta ļoti augsta saistība starp septiņiem *SKI* gēna haplotipiem un nesindromālu aukslēju šķeltni. Visi haplotipi uzrādīja saistību ar paaugstinātu AŠ risku.

3.1.3. tabula

Labākie *SKI* gēna haplotipu analīzes rezultāti un to saistība ar nesindromālu AŠ

**SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	Frekvence		p-vērt.
					Gadīj.	Kontr.	
rs2460000	rs263533	rs16824948	rs260507	rs903910	*	*	*
G	T	T	C	C	0,261	0,004	0,0029x10 ⁻¹⁶
G	T	T	C	*	0,203	0,007	0,0136x10 ⁻¹¹
rs263533	rs16824948	rs260507	rs903910	rs4648625	*	*	*
T	T	C	C	T	0,218	0,008	0,0034x10 ⁻¹¹
T	T	C	C	*	0,219	0,008	0,0061x10 ⁻¹¹
rs16824948	rs260507	rs903910	rs4648625	rs6673129	*	*	*
T	C	C	T	C	0,219	0,006	0,0045x10 ⁻¹²
T	C	C	T	*	0,218	0,006	0,0075x10 ⁻¹²
T	C	C	*	*	0,22	0,007	0,0126x10 ⁻¹²

*Tukša šūna; **SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*)

3.1.4. tabulā ir parādīti labākie *FGFR1* gēna haplotipu analīzes rezultāti (p vērt. ≤0,0001).

Mēs atklājām visaugstāko saistību starp diviem *FGFR1* haplotipiem un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ. Abi haplotipi bija saistīti ar paaugstinātu nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ risku. Veicot haplotipu saistības analīzi, tika atklāts, ka trīs haplotipi *FGFR1* gēnā arī ir saistīti ar paaugstinātu nesindromālo AŠ risku.

3.1.4. tabula

Labākie *FGFR1* gēna haplotipu analīzes rezultāti un to saistība ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ

**SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	Frekvence		p-vērt.
					Gadīj.	Kontr.	
LŠ/LŠ+AŠ							
rs6996321	rs7829058	rs13279569	*	*	*	*	*
G	C	G	*	*	0,138	0,019	0,0185x10 ⁻⁵
rs7829058	rs13279569	rs328300	*	*	*	*	*
C	G	*	*	*	0,147	0,019	0,0045x10 ⁻⁵
AŠ							
rs6996321	rs7829058	rs13279569	rs328300	*	*	*	*
G	C	*	T	*	0,106	0,003	0,0026x10 ⁻⁴
G	C	*	*	*	0,165	0,018	0,0021x10 ⁻⁴
*	rs7829058	rs13279569	rs328300	*	*	*	*
C	G	*	*	*	0,185	0,019	0,0331x10 ⁻⁷

*Tukša šūna; **SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*)

3.1.5. tabulā ir parādīti *WNT3* gēna haplotipu analīzes labākie rezultāti.

Veicot haplotipu analīzi *WNT3* gēnā, visaugstākā saistība tika atklāta starp četriem šī gēna haplotipiem un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un pieciem šī gēna haplotipiem ar nesindromālu aukslēju šķeltņi. Visi haplotipi bija saistīti ar paaugstinātu risku attīstīties nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ.

3.1.5. tabula

Labākie *WNT3* gēna haplotipu analīzes rezultāti un to saistība ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ

**SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	Frekvence		p-vērt.
					Gadīj.	Kontr.	
LŠ/LŠ+AŠ							
rs199496	rs11658976	rs11655598	rs12452064	rs199494	*	*	*
G	A	G	G	A	0,277	0,063	0,0248x10 ⁻¹⁰
rs11658976	rs11655598	rs12452064	rs199494	rs7218567	*	*	*
A	G	G	A	C	0,274	0,064	0,0084x10 ⁻⁹

3.1.5. tabulas turpinājums							
SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	Frekvence		p-vērt.
					Gadīj.	Kontr.	
rs11655598	rs12452064	rs199494	rs7218567	rs111769	*	*	*
G	G	A	C	T	0,29	0,07	0,0034x10 ⁻⁹
G	G	*	*	*	0,289	0,068	0,0098x10 ⁻⁹
AŠ							
rs11658976	rs11655598	rs12452064	rs199494	rs7218567	*	*	*
A	G	*	*	*	0,383	0,064	0,0078x10 ⁻⁹
rs11655598	rs12452064	rs199494	rs7218567	rs111769	*	*	*
G	G	A	C	T	0,411	0,07	0,0006x10 ⁻⁹
G	G	A	C	*	0,404	0,069	0,0366x10 ⁻¹⁰
G	G	A	*	*	0,402	0,068	0,0041x10 ⁻⁹
G	G	*	*	*	0,416	0,069	0,0049x10 ⁻¹⁰

*Tukša šūna; **SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*)

Veicot visu analizēto gēnu haplotipu saistības analīzi, izmantojot LD bloku analīzi, kopā tika izveidoti 114 dažādi haplobloki saistībā ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un 111 haplotbloki saistībā ar nesindromālām AŠ. Analīzes rezultātā tika atklāts, ka tikai viens haplotips *FGFI* gēnā uzrādīja saistību (p vērt $\leq 0,0001$) ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, bet netika atklāta nozīmīga saistība ar nesindromālām AŠ.

3.1.6. tabulā ir redzams haplotips rs34002-rs250092-rs34010-rs250103-rs34013 (TGGAT), kas uzrādīja nozīmīgu saistību ar paaugstinātu nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ risku.

3.1.6. tabula

***FGFI* gēna LD bloku haplotipu analīzes rezultāti saistībā ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ**

**SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	Frekvence		p-vērt.
					Gadīj.	Kontr.	
rs34002	rs250092	rs34010	rs250103	rs34013	*	*	*
T	G	G	A	T	0,105	0,001	0,0082x10 ⁻⁷
T	G	T	A	T	0,222	0,359	0,0007

*Tukša šūna; **SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*)

3.2. Genotipēšana ar MALDI-TOF tehnoloģiju

3.2.1. *BCL3* gēns

Pētījuma ietvaros tika atlasīti astoņi marķieri, lai veiktu to genotipēšanu, izmantojot MALDI-TOF tehnoloģiju, no kuriem trīs SNP

(rs2927457, rs11671085 un rs2306148) tika atklāti kā neinformatīvi, līdz ar to tie netika iekļauti turpmākajā analīzē.

Lai veiktu gadījuma-kontroles asociācijas analīzi Latvijas populācijā, 129 nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ pacientiem, 39 nesindromālo AŠ pacientiem un 335 savstarpēji neradnieciskiem un veseliem indivīdiem tika analizēti pieci *BCL3* gēna SNP. Šie marķieri tika genotipēti arī citā Eiropas izcelsmes populācijā - analīzē tika izmantoti 606 indivīdi no Brazīlijas populācijas (294 nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ pacienti, 44 nesindromālo AŠ pacienti un 268 savstarpēji neradnieciski un veseli indivīdi bez pozitīvas LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ ģimenes anamnēzes, Eiropas izcelsmes). Pētījuma ietvaros tika veikts arī transmisijas disekvilibrācijas tests (TDT), analizējot 109 triādes (pacients kopā ar abiem vecākiem) Latvijas populācijā, no kuriem 85 pacienti un viņu vecāki tika iekļauti nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ grupā un 24 triādes - nesindromālo AŠ grupā.

3.2.1. tabulā ir attēloti gadījuma-kontroles saistības analīzes rezultāti Latvijas populācijā ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ, bet 3.2.2. tabulā ir redzami gadījuma-kontroles asociācijas rezultāti ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ Brazīlijas populācijā.

Pētījuma ietvaros netika atklāta nozīmīga saistība starp analizētajiem *BCL3* gēna marķieriem un nesindromālajām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ ne Latvijas, ne Brazīlijas populācijā. Tika atklāta tikai ļoti vāja saistība starp SNP rs10401176 un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ Latvijas populācijā (p -vērt. = 0,042; OR = 0,609; 95% CI = 0,377-0,986), kur alēle A bija saistīta ar samazinātu LŠ/LŠ+AŠ risku, bet šī saistība izzuda pēc Bonferroni korekcijas piemērošanas.

3.2.1. tabula

***BCL3* gēna gadījuma-kontroles analīzes rezultāti saistībā ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ Latvijas populācijā**

Gēns	SNP ^o	Alēles [#]	MAF ^{**}		p-vērt.	OR ^{^^}	95% CI ^{##}
			Gadīj.	Kontr.			
LŠ/LŠ+AŠ							
<i>BCL3</i>	rs7257231	A/T	0,165	0,181	0,5976	0,897	0,6-1,341
<i>BCL3</i>	rs10401176	G/A	0,1	0,154	0,042	0,609	0,377-0,986

3.2.1. tabulas turpinājums							
Gēns	SNP	Alēles	MAF		p-vērt.	OR	95% CI
			Gadīj.	Kontr.			
<i>BCL3</i>	rs8103315	G/T	0,1	0,075	0,23	1,375	0,816-2,317
<i>BCL3</i>	rs1979377	T/G	0,096	0,108	0,6148	0,878	0,53-1,456
<i>BCL3</i>	rs2927456	C/T	0,057	0,073	0,391	0,758	0,403-1,43
AŠ							
<i>BCL3</i>	rs7257231	A/T	0,129	0,181	0,3079	0,672	0,311-1,45
<i>BCL3</i>	rs10401176	G/A	0,097	0,154	0,2254	0,588	0,247-1,401
<i>BCL3</i>	rs8103315	G/T	0,032	0,075	0,2134	0,413	0,098-1,74
<i>BCL3</i>	rs1979377	T/G	0,048	0,108	0,1426	0,422	0,129-1,383
<i>BCL3</i>	rs2927456	C/T	0,016	0,073	0,0886	0,208	0,028-1,531

SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*); # Majorā alēle ir norādīta pirmā; ** MAF - minorās alēles frekvence, ^^ OR - izredžu attiecība (*odds ratio*), ## 95% CI - 95% ticamības intervāls (*confidence interval*)

3.2.2. tabula
***BCL3* gēna gadījuma-kontroles analīzes rezultāti saistībā ar nesindromālām LŠ/LŠ+A un AŠ Brazīlijas populācijā**

Gēns	SNP [^]	Alēles [#]	MAF ^{**}		p-vērt.	OR ^{^^}	95% CI ^{##}
			Gadīj.	Kontr.			
LŠ/LŠ+AŠ							
<i>BCL3</i>	rs7257231	A/T	0,277	0,302	0,4013	0,884	0,663-1,179
<i>BCL3</i>	rs10401176	G/A	0,125	0,117	0,72	1,076	0,72-1,608
<i>BCL3</i>	rs8103315	G/T	0,109	0,094	0,4713	1,174	0,759-1,817
<i>BCL3</i>	rs2927456	C/T	0,111	0,078	0,0929	1,478	0,935-2,337
AŠ							
<i>BCL3</i>	rs7257231	A/T	0,274	0,302	0,6075	0,871	0,514-1,475
<i>BCL3</i>	rs10401176	G/A	0,191	0,117	0,0707	1,773	0,947-3,319
<i>BCL3</i>	rs8103315	G/T	0,155	0,094	0,1016	1,76	0,888-3,486
<i>BCL3</i>	rs2927456	C/T	0,095	0,078	0,603	1,242	0,548-2,815

SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*); # Majorā alēle ir norādīta pirmā; ** MAF - minorās alēles frekvence, ^^ OR - izredžu attiecība (*odds ratio*), ## 95% CI - 95% ticamības intervāls (*confidence interval*)

Haplotipu saistības analīze tika veikta, lai atklātu jebkādu iespējamo saistību starp haplotipiem *BCL3* gēnā un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ Latvijas vai Brazīlijas populācijā.

Tika atklāts, ka Latvijas populācijā četri *BCL3* gēna haplotipi uzrādīja ļoti augstu saistību ar paaugstinātu nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ risku (sk. 3.2.3. tabulu).

3.2.3. tabula

**Labākie *BCL3* gēna haplotipu analīzes rezultāti saistībā ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ
Latvijas populācijā**

**SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	Frekvence		p-vērt.
					Gadīj.	Kontr.	
rs7257231	rs10401176	rs8103315	rs1979377	rs2927456	*	*	*
A	G	T	T	T	0,101	0,034	0,0007
rs7257231	rs10401176	rs8103315	rs1979377	*	*	*	*
A	G	T	T	*	0,099	0,039	0,0005
rs7257231	rs10401176	rs8103315	*	*	*	*	*
A	G	T	*	*	0,098	0,038	0,0006
rs10401176	rs8103315	rs1979377	*	*	*	*	*
G	T	T	*	*	0,096	0,039	0,0009

*Tukša šūna; **SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*)

Analizējot *BCL3* gēna haplotipus Latvijas populācijā, tika atklāta haplotipa rs7257231-rs10401176 (TA) vāja saistība ar nesindromālām AŠ (p-vērt. = 0,0345), norādot uz tā iespējamo saistību ar samazinātu nesindromālo AŠ risku (rezultāti nav attēloti).

Haplotipu analīze Brazīlijas populācijā atklāja, ka haplotipi rs10401176-rs8103315 (GG) (p-vērt. = 0,0078), rs7257231-rs10401176-rs8103315 (TAG) (p-vērt. = 0,0321) un rs10401176-rs8103315-rs2927456 (GCG) (p-vērt. = 0,0357) ir asociēti ar nesindromālām AŠ, bet ne ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ (rezultāti nav attēloti).

Veicot pārmantoto un nepārmantoto alēļu attiecības kalkulāciju starp nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ un AŠ pacientiem un to vecākiem transmisijas disekvilibrācijas testa ietvaros, netika atklāta saistība starp analizētajiem marķieriem un kādu no šķeltnes fenotipiem (rezultāti nav attēloti) Latvijas populācijā.

3.3. Genotipēšana ar TaqMan tehnoloģiju

3.3.1. 19q13 lokuss

Šajā pētījumā tika analizēti septiņi 19q13 lokusa, kas sastāv no *PVR*, *BCL3*, *PVRL2* un *CMPTM1* gēniem, marķieri. Tika veikta visu septiņu SNP

gadījuma-kontroles saistības analīze 86 nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ pacientiem, 27 pacientiem ar nesindromālām AŠ un 148 savstarpēji neradnieciskiem un veselīgiem indivīdiem no Latvijas populācijas. Transmisijas disekvilibrācijas tests (TDT) tika veikts 66 triādēm (pacientam un abiem vecākiem), no kuriem 52 pacienti un to vecāki tika iedalīti LŠ/LŠ+AŠ grupā un 14 triādes - nesindromālo AŠ grupā.

Pētījuma ietvaros netika atklāta nozīmīga saistība starp analizētajiem 19q13 lokusa marķieriem un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ (rezultāti nav attēloti).

Veicot haplotipu saistības analīzi, netika atklāta nozīmīga saistība starp haplotipiem 19q13 lokusā un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ Latvijas populācijā. Haplotipi rs419010-rs2075620 (CG) (p-vērt. = 0,0156), rs419010-rs2075620-rs875255 (CGC) (p-vērt. = 0,0161), rs2927438-rs419010-rs2075620-rs875255 (GCGC) (p-vērt. = 0,0279) un rs2927438-rs419010-rs2075620 (CGC) (p-vērt. = 0,0305) uzrādīja vāju saistību ar izolētu aukslēju šķeltni, kur visi iepriekšminētie četri haplotipi bija saistīti ar paaugstinātu AŠ risku.

Tika veikts transmisijas disekvilibrācijas tests, lai noskaidrotu pārmantoto un nepārmantoto alēļu attiecību starp nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ un AŠ pacientiem un to vecākiem Latvijas populācijā. Nenoizpētīta asociācija tika atklāta tikai starp *BCL3* gēna SNP rs10421283 (p-vērt. = 0,0477) un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, bet ne nesindromālām AŠ, tomēr novērotā saistība izzuda pēc Bonferroni korekcijas piemērošanas.

3.3.2. *BMP4* gēns

Lai veiktu gadījuma-kontroles asociācijas analīzi Latvijas populācijā, 127 nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ pacientiem, 37 nesindromālo AŠ pacientiem un 190 savstarpēji neradnieciskiem un veselīgiem indivīdiem tika analizēti trīs *BMP4* gēna marķieri. Pētījuma ietvaros tika veikts arī transmisijas

disekvilibrācijas tests (TDT), analizējot 65 triādes, no kurām 38 triādes tika iekļautas nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ grupā un 27 triādes - nesindromālo AŠ grupā.

Visaugstākā saistība starp analizētajiem marķieriem un nesindromālu LŠ/LŠ+AŠ tika atklāta SNP rs2071047, kur alēle A bija asociēta ar samazinātu nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ risku (p-vērt. = 0,0087; OR = 0,63; 95% CI = 0,446-0,891). Atklātā saistība saglabājās arī pēc Bonferroni korekcijas piemērošanas. SNP rs17563 uzrādīja nenozīmīgu asociāciju (p-vērt. = 0,0178; OR = 0,666; 95% CI = 0,476-0,933) ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, kas izzuda pēc multiplās testēšanas koriģēšanas. Netika atklāta saistība starp analizētajiem *BMP4* gēna marķieriem un nesindromālām aukslēju šķeltnēm.

Haplotipu saistības analīze tika piemērota, lai atklātu jebkādu papildus iespējamo saistību starp *BMP4* gēnu un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ Latvijas populācijā.

Tika atklāts, ka haplotips rs17563-rs2071047 (AA) (p-vērt. = 0,0087) ir saistīts ar samazinātu nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ risku. Papildus divi haplotipi rs2071047-rs1957860 (AC) (p-vērt. = 0,0165) un rs17563-rs2071047-rs1957860 (AAC) (p-vērt. = 0,0184) atklāja saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, bet šajā gadījumā novērotā saistība tika atklāta kā aizsargājošs efekts saistībā ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ.

Haplotipu analīze neatklāja nekādu nozīmīgu saistību starp *BMP4* gēnu un nesindromālām AŠ (rezultāti nav attēloti).

Veicot pārmantoto un nepārmantoto alēļu attiecības kalkulāciju starp nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ un AŠ pacientiem un to vecākiem transmisijas disekvilibrācijas testa ietvaros Latvijas populācijā, tika atklāta nenozīmīga saistība starp SNP rs1957860 (p vērt. = 0,0455; OR = 3,0; 95% CI = 0,968-9,302) un AŠ. Neviens analizētais marķieris neatklāja saistību ar LŠ/LŠ+AŠ (rezultāti nav attēloti).

3.3.3. *IRF6* gēns

Pētījumā tika veikta gadījuma-kontroles saistības analīze, analizējot *IRF6* gēna septiņus marķierus 85 nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ pacientiem, 27 pacientiem ar nesindromālām AŠ un 148 savstarpēji neradnieciskiem un veselīgiem indivīdiem no Latvijas populācijas. Transmisijas disekvilibrācijas tests (TDT) tika veikts 63 triādēm, no kurām 49 triādes tika iedalītas LŠ/LŠ+AŠ grupā un 14 triādes - nesindromālo AŠ grupā.

Visaugstākā saistība starp analizētajiem marķieriem un nesindromālu LŠ/LŠ+AŠ tika atklāta SNP rs658860, kur alēle T bija asociēta ar samazinātu nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ risku (p-vērt. = $0,0244 \times 10^{-3}$; OR = 0,412; 95% CI = 0,272-0,625). Atklātā saistība saglabāja nozīmīgumu arī pēc Bonferroni korekcijas piemērošanas. SNP rs642961 uzrādīja nozīmīgu saistību (p-vērt. = 0,0019; OR = 2,141; 95% CI = 1,315-3,488) ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, kas neizzuda arī pēc multiplās testēšanas koriģēšanas piemērošanas. Alēle G bija saistīta ar samazinātu LŠ/LŠ+AŠ risku. Līdzīgi rezultāti tika iegūti, salīdzinot SNP rs658860 ar nesindromālām AŠ (p-vērt. = $0,0378 \times 10^{-5}$; OR = 0,412; 95% CI = 0,036-0,289), kur alēle T bija saistīta ar samazinātu AŠ risku, saglabājot nozīmīgo saistību arī pēc Bonferroni korekcijas.

Tika veikta arī haplotipu saistības analīze, lai atklātu jebkādu papildus iespējamo saistību starp *IRF6* gēnu un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ Latvijas populācijā.

Pētījumā tika atklāta augsta saistība starp deviņiem *IRF6* gēna haplotipiem un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, no kuriem septiņi haplotipi atklāja saistību ar paaugstinātu LŠ/LŠ+AŠ risku, bet divi haplotipi - ar samazinātu LŠ/LŠ+AŠ risku.

3.3.3.1. tabulā ir attēloti labākie *IRF6* gēna haplotipu asociācijas analīzes rezultāti (p-vērt. $\leq 0,001$) ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ.

Pētījuma ietvaros tika atklāta ļoti augsta divu *IRF6* gēna haplotipu saistība ar nesindromālu AŠ, kur haplotips rs642961-rs658860 (GT) (p-vērt. =

0,0378x10⁻⁵) bija asociēts ar paaugstinātu nesindromālo AŠ risku, bet haplotips rs642961-rs658860 (GC) (p-vērt. = 0,0195x10⁻⁴) uzrādīja saistību ar samazinātu risku attīstīties nesindromālām aukslēju šķeltnēm.

3.3.3.2. tabulā ir redzami labākie *IRF6* gēna haplotipu asociācijas analīzes rezultāti (p-vērt. ≤0,001) ar nesindromālām AŠ.

3.3.3.1. tabula

Labākie *IRF6* gēna haplotipu saistības analīzes rezultāti saistībā ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ Latvijas populācijā

SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	Frekvence		p-vērt.
					Gadīj.	Kontr.	
rs2013162	rs861019	rs2073487	rs642961	rs658860	*	*	*
C	G	T	G	C	0,006	0,184	0,0155x10 ⁻⁶
A	A	C	G	C	0	0,13	0,0114x10 ⁻⁴
C	A	*	*	*	0,265	0,14	0,0009
rs861019	rs2073487	rs642961	rs658860	*	*	*	*
G	T	G	C	*	0,006	0,185	0,0131x10 ⁻⁶
A	C	G	C	*	0	0,13	0,0113x10 ⁻⁴
rs2073487	rs642961	rs658860	*	*	*	*	*
T	G	C	*	*	0,006	0,187	0,0078x10 ⁻⁶
C	G	C	*	*	0	0,131	0,0085x10 ⁻⁴
rs642961	rs658860	*	*	*	*	*	*
G	C	*	*	*	0,006	0,318	0,0093x10 ⁻¹³
G	T	*	*	*	0,747	0,549	0,0244x10 ⁻³

*Tukša šūna; **SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*)

3.3.3.2. tabula

Labākie *IRF6* gēna haplotipu saistības analīzes rezultāti saistībā ar nesindromālām AŠ Latvijas populācijā

SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	Frekvence		p-vērt.
					Gadīj.	Kontr.	
rs2013162	rs861019	rs2073487	rs642961	rs658860	*	*	*
C	G	T	G	C	0	0,20	0,0004
C	A	T	G	T	0,058	0,004	0,001
A	A	C	G	T	0,481	0,26	0,0013
rs861019	rs2073487	rs642961	rs658860	*	*	*	*
G	T	G	C	*	0	0,199	0,0004
A	C	G	T	*	0,481	0,259	0,0013
rs2073487	rs642961	rs658860	*	*	*	*	*
T	G	C	*	*	0	0,196	0,0005
C	G	T	*	*	0,481	0,255	0,001
rs642961	rs658860	*	*	*	*	*	*
G	T	*	*	*	0,923	0,549	0,0378x10 ⁻⁵
G	C	*	*	*	0	0,318	0,0195x10 ⁻⁴

*Tukša šūna; **SNP - viena nukleotīda polimorfisms (*single nucleotide polymorphism*)

Tika veikts arī transmisijas disekvilibrācijas tests, kā rezultātā tika atklāta asociācija starp nesindromālu AŠ un SNP rs642961 (p-vērt. = 0,0039; OR = 0,091; 95% CI = 0,012-0,704), tomēr, piemērojot multiplās testēšanas korekciju, novērotā saistība izzuda. Tika atklāta vāja saistība starp rs658860 (p-vērt. = 0,0067; OR = 0,1; 95% CI = 0,013-0,781) un nesindromālu AŠ, kas izzuda pēc multiplās testēšanas korekcijas piemērošanas. Abi marķieri uzrādīja saistību ar samazinātu AŠ risku. Tika atklāts, ka abi iepriekšminētie marķieri ir saistīti arī ar paaugstinātu nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ risku (rs642961 (p-vērt. = 0,0035; OR = 3,143; 95% CI = 1,343-7,357), rs658860 (p-vērt. = 0,0054; OR = 3,0; 95% CI = 1,275-7,057)) arī pēc Bonferroni korekcijas piemērošanas.

4. DISKUSIJA

Daudzi gēni ir iesaistīti un regulē kraniofaciālā reģiona veidošanos. Dažādi augšanas faktori (piemēram, FGFs, TGFs, PDGFs, EGFs, BMPs un to attiecīgie receptori), signālmolekulas (piemēram, WNT, SHH un to attiecīgie receptori), šūnu adhēzijas molekulas (piemēram, PVRL1) un transkripcijas faktori (piemēram, MSX, DLX, LHX, PRRX un BARX un to attiecīgie receptori) var būt iesaistīti nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņu un izolētu aukslēju šķeltnes attīstībā.

Cilvēka fibroblastu augšanas faktori (*human fibroblast growth factors*) (FGFs) un to šūnu virsmas receptori (FGFRs) pieder pie signālmolekulu ģimenes, kam ir ļoti liela nozīme dažādos embriogēnēzes un audu homeostāzes procesos (Itoh un Ornitz, 2004; Chen un Deng, 2005; Dailey et al., 2005; Eswarakumar et al., 2005; Krivicka-Uzkurele et al., 2008). Riley u.c. (2007a) sava pētījuma ietvaros veica plaša genoma saistības analīzi (*genome-wide linkage scan*), analizējot 220 nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņu pacientus un to radniekus no Filipīnām, kā rezultātā atklāja jaunu rajonu (8p11-23), kas iespējams ir iesaistīts nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņu attīstībā. Tiek uzskatīts, ka gēni, kas atrodas šajā reģionā, ieskaitot *FGFR1* gēnu, kas atrodas 8p12, ir iespējamie nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ kandidātģēni. Daudzās populācijās ir analizētas ģenētiskās variācijas *FGFR1* gēnā saistībā ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ, bet atklātie rezultāti ir pretrunīgi starp dažādām populācijām un rasēm (Riley, 2007a, 2007b; Menezes et al., 2008; Mostowska, 2010; Butali, 2011; Wang, 2011). Mūsu pētījumā, veicot gadījuma-kontroles asociācijas analīzi, analizējot ģenētiskos marķierus *FGFR1* gēnā, tika atklāts, ka viens marķieris šajā gēnā (rs7829058) uzrāda statistiski nozīmīgu saistību gan ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ (p-vērt. = $0,0024 \times 10^{-5}$; OR = 7,991; 95% CI = 3,435-18,59), gan ar nesindromālu aukslēju šķeltni (p-value = $0,0002 \times 10^{-6}$; OR = 13,16; 95% CI = 4,93-35,1), turklāt novērotā saistība neizzuda arī pēc Bonferroni korekcijas piemērošanas.

Mēs veicām arī *FGFR1* gēna haplotipu analīzi un atklājām nozīmīgu saistību starp haplotipiem šajā gēnā un nesindromālu aukslēju šķeltņi (AŠ). Citā pētījumā, lai palielinātu pētāmo paraugkopu, mēs apvienojām Latvijas populācijas paraugkopu ar paraugkopu no Igaunijas un Lietuvas. Rezultāti atklāja, ka SNP rs7829058 ir saistīts ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, bet novērotā saistība izzuda pēc koriģēšanas ar Bonferroni metodi (p-vērt. = 0,0137; OR = 1,457; 95% CI = 1,079-1,968) (Nikopensius et al., 2011). Veicot *FGFR1* gēna SNP analīzi, tika atklāts, ka SNP rs34010 (p-vērt. = 0,0002; OR = 0,485; 95% CI = 0,331-0,71) ir saistīts ar aizsargājošu efektu pret nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, bet atklātā asociācija izzuda, piemērojot Bonferroni korekciju. Salīdzinot izolētas aukslēju šķeltņes pacientus ar kontroles paraugiem, mēs atklājām, ka SNP rs34016, kas lokalizēts *FGFR1* gēnā, ir saistīts ar paaugstinātu AŠ risku (p-vērt. = 0,006, OR = 2,934; 95% CI = 1,322-6,512), kaut arī šī novērotā asociācija nesaglabājās pēc multiplās testēšanas koriģēšanas. *FGFR1* gēna haplotipu analīze atklāja saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, bet ne ar nesindromālām AŠ. Riley u.c. (2007a) veica pētījumu, kurā, veicot gan saistības (*linkage*), gan asociācijas (*association*) analīzi, tika atklāta saistība ar marķieriem *FGFR1* gēnā (recesīvo daudzpunktu HLOD = 1.07). Tas pats autors, tikai citā pētījumā (2007b) veica 12 gēnu (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGF2*, *FGF3*, *FGF4*, *FGF7*, *FGF8*, *FGF9*, *FGF10*, *FGF18*, and *NUDT6*) kodējošo reģionu sekvenēšanu un veica asociācijas analīzi Aiovas un Filipīnu populācijām, kā arī izmantoja proteīnu struktūras analīzi, lai noteiktu aminoskābju variantu iespējamo funkciju. Minētajā pētījumā tika identificētas dažas mutācijas, kas iespējams varētu izraisīt LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ, ieskaitot *nonsense* mutāciju R609X *FGFR1* gēnā un *missense* variantus *FGFR1*, *FGFR2* un *FGFR3* gēnos. *FGFR1* variāciju strukturālā analīze atklāja, ka identificētas mutācijas varētu pasliktināt proteīnu funkciju caur dažādiem mehānismiem. Šī pētījuma ietvaros tika veikta arī SNP genotipēšana, atklājot saistību starp nesindromālām LŠ+AŠ un SNP rs13317, kas lokalizēts *FGFR1*

gēnā (p-vērt. = 0,03). Līdzīgs pētījums tika veikts, veicot gadījuma-kontroles analīzi Brazīlijas populācijā (Menezes et al., 2008), kā rezultātā tika daļēji apstiprināti Riley et al. (2007b) pētījuma rezultāti. Šajā pētījumā tika atklāts, ka daži gēni, to skaitā arī *FGFR1* gēns, uzrāda vāju saistību ar nesindromālām LŠ+AŠ ar vai bez kādām zobu anomālijām. Menezes et al. (2008) pētījumā tika noteiktas katra analizētā marķiera alēļu frekvenču atšķirības starp pacientiem un kontrolēm, izdalot dažādus šķeltņu subfenotipus un aprēķinot OR un 95% CI. Tika atklāta vāja saistība starp SNP rs13317 un vienpusēju labās puses LŠ+AŠ kopā ar zobu aģenēzi. Mostowska et al. (2010) veiktajā pētījumā Polijas populācijā tika analizēti gēni, kas kodē transkripcijas faktorus, tādi kā *FGF10* un *FGFR1*. Tika analizēti *FGFR1* gēna divi SNP (rs6987534 un rs328300), lai noteiktu to saistību ar kādu no šķeltnes fenotipiem, bet neviens no abiem marķieriem neatklāja saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ. Abi šie marķieri tika analizēti arī mūsu pētījumā, bet arī mēs neatklājām nozīmīgu saistību starp kādu no šiem marķieriem un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ Latvijas populācijā. Vienīgais pierādījums tam, ka šie marķieri varētu būt iesaistīti nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ etioloģijā mūsu analizētajā populācijā, bija haplotipu saistības analīzes rezultāti, kur *FGFR1* gēna haplotipi, ieskaitot abus iepriekš minētos SNP, uzrādīja saistību ar paaugstinātu nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ un AŠ risku. Ļoti līdzīgi rezultāti, kādi tika iegūti mūsu pētījumā, tika atklāti Wang et al. (2011) pētījumā, analizējot SNP desmit fibroblastu augšanas faktoru un to receptoru kodējošos gēnus (ieskaitot *FGF2* un *FGFR1* gēnus) triādēm no Āzijas un Merilendas, analizējot bērņus ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un to vecākus. Pētījumā tika atklāta *FGFR1* gēna saistība ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, veicot gan saistības (*linkage*), gan transmisijas disekvilibrācijas testu (*transmission disequilibrium test*), tādējādi apstiprinot citu pētnieku atklāto asociāciju. Savukārt, veicot *FGFR1* gēna trīs SNP haplotipu (rs6987534, rs6474354 un rs10958700) saistības analīzi, tika atklāta saistība starp pacientiem ar nesindromālām

LŠ/LŠ+AŠ un to vecākiem Āzijas populācijā, kas ir ļoti līdzīgi mūsu *FGFR1* gēna haplotipu saistības analīzes rezultātiem Latvijas populācijā. Negatīva saistība tika atklāta Butali et al. (2011) pētījumā, kur autors veica asociācijas analīzi un tiešo *FGFR1* un *FGFR2* gēnu sekvenēšanu Nigērijas populācijā. Iegūtie rezultāti varētu tikt izskaidrojami ar to, ka pastāv atšķirības starp gēniem, kas ir iesaistīti šķeltnu attīstībā, kā arī starp šķeltnu sastopamības biežumu starp rasēm, turklāt pēc literatūrā pieejamiem datiem var secināt, ka Āfrikā LŠ/LŠ+AŠ/AŠ sastopamības biežums ir relatīvi zemāks kā citās populācijās.

SKI gēns ir protoonkogēns, kas ir iesaistīts centrālās nervu sistēmas un skeleta muskuļu attīstībā, kā arī tas ir iesaistīts dažādu kraniofaciālo struktūru attīstībā (Berk et al., 1997). Kopumā nav daudz pētījumu par *SKI* gēnu un tā iespējamo nozīmi LŠ/LŠ+AŠ/AŠ attīstībā. Vieira et al. (2005) pētījumā tika anaizēti 20 dažādi kandidātgēni Filipīnu populācijā, veicot šo gēnu tiešo sekvenēšanu indivīdiem ar LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ, kā rezultātā tika atklāts, ka dažas punkteveida mutācijas *FOXE1*, *GLI2*, *JAG2*, *LHX8*, *MSX1*, *MSX2*, *SATB2*, *SPRY2*, *TBX10* un *SKI* gēnos var izraisīt nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ attīstību, papildus iegūtie nelīdzsvarotās saistības analīzes rezultāti apstiprināja, ka ģenētiskajām variācijām *MSX2*, *SKI* vai *JAG2* gēnos vai to reģionā ap šiem gēniem ir nozīme nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ etioloģijā. Citā pētījumā, lai identificētu ģenētiskās variācijas *SKI* gēnā un noskaidrotu iespējamo saistību starp *SKI* gēna polimorfismiem un LŠ/LŠ+AŠ risku, Lu ar kolēģiem (2005) atkārtoti sekvenēja (resekvenēja) šo gēnu. Pētījumā tika identificēts jauns polimorfisms (257C>G), kas lokalizēts 1. eksonā, atklājot tā saistību ar samazinātu LŠ/LŠ+AŠ risku (OR = 0,6; 95% CI = 0,3-1,0) Kalifornijas populācijā. Šis SNP atrodas ļoti tuvu promotera rajonam, līdz ar to iespējams, ka polimorfisms atrodas nelīdzsvarotajā saistībā ar polimorfismiem *upstream* regulatorajos rajonos. Mūsu pētījumā tika analizēti divdesmit marķieri *SKI* gēnā, lokalizēti 1q22-q24, lai noskaidrotu to iespējamo saistību ar

nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ. Tika atklāta SNP rs16824948 nozīmīga saistība ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ (p-vērt. = $0,0013 \times 10^{-14}$; OR = 6,37; 95% CI = 4,039-1,07) un nesindromālu AŠ (p-vērt. = $0,0011 \times 10^{-7}$; OR = 6,777; 95% CI = 3,577-12,84), kur alēle T bija saistīta ar paaugstinātu nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ un AŠ risku, turklāt saglabājot nozīmīgo saistību arī pēc multiplās testēšanas korekcijas. Mēs veicām arī haplotipu saistības analīzi, kas atklāja līdzīgus rezultātus. Tomēr citā pētījumā, palielinot paraugkopas apjomu un apvienojot igauņu un lietuviešu paraugkopas ar Latvijas paraugkopu, netika atklāta nozīmīga saistība (p-vērt. $\leq 0,05$) starp analizētajiem marķieriem *SKI* gēnā un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, bet SNP rs12562937 uzrādīja vāju saistību ar nesindromālu AŠ (p-vērt. = 0,0143; OR = 0,534; 95% CI = 0,321-0,889), kas izzuda, piemērojot Bonferroni korekciju (Nikopensius et al., 2010; Nikopensius et al., 2011). Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti apstiprina citu autoru pētījumos novēroto *SKI* gēna iespējamo nozīmi nesindromālo šķeltnu etioloģijā, bet ir nepieciešami papildus pētījumi, lai atkārotu šos rezultātus arī citās populācijās.

Ir atklāts, ka Wnt signālceļiem ir izšķiroša nozīme galvaskausa un sejas attīstībā, turklāt trīs neseni pētījumi atklāja, ka ģenētiskās variācijas *WNT3* un *WNT9B* gēnos varētu būt saistītas ar LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ dažādās populācijās (Chiquet, 2008; Menezes, 2010; Mostowska, 2012). Mūsu pētījumā tika analizēti divdesmit deviņi viena nukleotīda polimorfismi *WNT3* un *WNT9B* gēnos, lokalizēti 17q21, lai atklātu iespējamo saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ Latvijas populācijā, veicot gadījuma-kontroles saistības analīzi. *WNT3* gēna viens marķieris (rs1165598) uzrādīja nozīmīgu saistību gan ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ (p-vērt = $0,0053 \times 10^{-11}$; OR = 5,925; 95% CI = 3,593-9,772), gan ar nesindromālu AŠ (p-vērt = $0,0039 \times 10^{-11}$; OR = 9,495; 95% CI = 4,879-18,34), novērotā saistība saglabājās arī pēc Bonferroni korekcijas. Arī veiktā haplotipu saistības analīze atklāja līdzīgus rezultātus. Chiquet et al. (2008) savā pētījumā analizēja trīsdesmit astoņus SNP septiņos *WNT* ģimenes gēnos (*WNT3*, *WNT3A*, *WNT5A*, *WNT7A*, *WNT8A*,

WNT9B un *WNT11*) Hispāņu un Eiropas amerikāņu populācijās, atklājot, ka SNP trīs gēnos (*WNT3A*, *WNT5A* un *WNT11*) ir nozīmīgi saistīti ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ arī pēc multiplās testēšanas korekcijas, turklāt tika atklāts, ka arī daudzi haplotipi *WNT* ģimenes gēnos ir saistīti ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ. Menezes et al. (2010) savā pētījumā veica trīspadsmit SNP genotipēšanu sešos *WNT* gēnos (*WNT3*, *WNT3A*, *WNT5A*, *WNT8A*, *WNT9B* and *WNT11*), pamatojoties uz Chiquet et al. (2008) iepriekšējiem publicētajiem pētījumiem par *WNT* gēnu ģimenes iespējamo nozīmi nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņu attīstībā cilvēkiem un Juriloff et al. (2005), Juriloff et al. (2006), Lan et al. (2006) veiktajiem pētījumiem ar dzīvnieku modeļiem, lai pārbaudītu saistību starp ģenētiskajiem marķieriem šajos gēnos un dažādiem LŠ/LŠ+AŠ un AŠ subfenotipiem Brazīlijas populācijā. Viņu pētījumā tika novērota saistība starp ģenētiskajām variācijām *WNT3* gēnā un paaugstinātu LŠ/LŠ+AŠ/AŠ un LŠ+AŠ risku. SNP rs142167, kas lokalizēts *WNT3* gēna 5'UTR, atklāja saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ/AŠ (p-vērt. = 0,0003; OR = 1,61; 95% = 1,29-2,02), LŠ+AŠ (p-vērt = 0,001; OR = 1,6; 95% CI = 1,26-2,02) un vienpusēju LŠ+AŠ (p-vērt. = 0,002; OR = 1,65; 95% = 1,27-2,13). Arī *WNT3* gēna SNP rs9890413 atklāja saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ/AŠ (p-vērt. = 0,03; OR = 1,46; 95% CI = 1,12-1,74), ar LŠ+AŠ (p-vērt = 0,02; OR = 1,46; 95% CI = 1,16-1,84) un vienpusēju LŠ+AŠ (p-vērt. = 0,04; OR = 1,46; 95% CI = 1,13-1,89), bet SNP rs142167 *WNT3* gēnā uzrādīja saistību ar “nepilnīgi bilaterālu” šķeltnes subfenotipu (p-vērt. = 0,03; OR = 1,57; 95% CI = 1,17-2,11). Arī haplotipu saistības analīze apstiprināja iepriekšējā analīzē atklāto saistību. Mēs analizējām divus SNP (rs111769 un rs2165846), kas arī bija iekļauti iepriekš aprakstītajos citu autoru pētījumos (Chiquet et al., 2008; Menezes et al., 2010), un mēs atklājām, ka SNP rs111769 ir saistīts ar nesindromālu aukslēju šķeltņi, lai gan novērotā saistība izzuda pēc Bonferroni korekcijas piemērošanas (p-vērt. = 0,0195; OR = 1,931; 95% CI = 1,105-3,374). Mostowska et al. (2012) savā pētījumā analizēja četrpadsmit SNP sešos

WNT gēnos (*WNT3*, *WNT3A*, *WNT5A*, *WNT8A*, *WNT9B* un *WNT11*), kā rezultātā tika atklāts, ka viens *WNT3* gēna SNP (rs3809857) atklāja ievērojamu asociāciju ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, kur alēle T bija saistīta ar samazinātu šī šķeltnu veida risku Polijas populācijā (p-vērt. = 0,015; OR = 0,492; 95% CI = 0,276-0,879). Arī haplotipu saistības analīze atklāja nozīmīgu saistību starp *WNT3* gēna polimorfismiem un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ. Trīs SNP (rs12452064, rs2165846 un rs4968282), kas tika analizēti Polijas populācijā, tika iekļauti arī mūsu pētījumā. SNP rs4968282 atklāja vāju saistību (p-vērt. = 0,0444; OR = 0,654; 95% CI = 0,431-0,991) ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ mūsu pētītajā populācijā, bet novērotā saistība izzuda pēc multiplās testēšanas korekcijas piemērošanas. Jāpiemin, ka SNP rs4968282 neatklāja saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ Polijas populācijā. Neviens no trīs analizētajiem marķieriem neuzrādīja saistību ar nesindromālu aukslēju šķeltni ne Latvijas, ne Polijas populācijā (p-vērt. $\geq 0,05$). Citā pētījumā, apvienojot Latvijas paraugkopu ar Lietuvas un Igaunijas paraugkopu, SNP rs11653738, kas lokalizēts *WNT3* gēnā, atklāja saistību ar nesindromālu AŠ (p-vērt. = 0,0064; OR = 1,518; 95% CI = 1,123-2,053), bet novērotā asociācija izzuda pēc multiplās testēšanas korekcijas piemērošanas (Nikopensius et al., 2010). *WNT9B* gēna divi SNPs (rs4968282 un rs1105127) atklāja saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ (attiecīgi p-vērt. = 0,0013; OR = 0,688; 95% CI = 0,548-0,865 un p-vērt. = 0,0377; OR = 1,239; 95% CI = 1,012-1,518), bet atklātā saistība izuda pēc Bonferroni korekcijas piemērošanas (Nikopensius et al., 2011). Mūsu pētījuma rezultāti apstiprina, ka *WNT3* gēns ir viens no nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ izraisošajiem gēniem eiropiešiem.

Gan saistības analīze (*linkage analysis*), gan asociācijas analīze dažādās populācijās atklāja nozīmīgu saistību starp LŠ/LŠ+AŠ/AŠ un 19q13 lokusu, sauktu arī par OFC3 (orofaciālo 3) lokusu, kas sastāv no tādiem gēniem kā *PVR*, *PVRL2*, *BCL3* un *CLPTMI*, bet iegūtie rezultāti ir pretrunīgi (Stanier and Moore, 2004; Wyszynski et al., 1997; Martinelli et al., 1998; Beaty et al.,

2001; Fujita et al., 2004; Morkuniene et al., 2007; Park et al., 2009). Mūsu pētījumā tika analizēti SNP *BCL3*, *CLPTM1*, *PVR* un *PVRL2* gēnos, analizējot gan ģimenes, gan atsevišķus indivīdus, salīdzinot tos ar kontroles paraugkopu no Latvijas populācijas, lai atklātu iespējamo sistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ. Papildus pētījumā tika analizēti arī *BCL3* gēna polimorfismi nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ un AŠ pacientiem un kontroles kopai no Brazīlijas populācijas. Pētījuma rezultātā netika atklāta nozīmīga saistība ne ar LŠ/LŠ+AŠ, ne ar AŠ un analizētajiem marķieriem 19q13 lokusā ne Latvijas, ne Brazīlijas populācijā. Vienīgā iespējamā saistība tika atklāta starp *BCL3* gēna SNP rs8103315 (p-vērt. = 0,0396; OR = 0,245; 95% CI = 0,058-1,04) un nesindromālu aukslēju šķeltni un starp *BCL3* gēna SNP rs4803750 (p-vērt. = 0,0449; OR = 0,496; 95% CI = 0,247-0,996) un nesindromālā, LŠ/LŠ+AŠ, bet atklātā saistība izzuda pēc Bonferroni korekcijas piemērošanas. Haplotipu saistības analīze *BCL3* gēnā atklāja nozīmīgu saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ Latvijas populācijā un vāju saistību ar nesindromālu AŠ Brazīlijas populācijā. Neskatoties uz to, ka tika atklāta pozitīva saistība starp *BCL3* gēna haplotipiem un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ, netika atklāta saistība starp analizētajiem marķieriem un nesindromālā LŠ/LŠ+A vai AŠ, veicot gadījuma-kontroles saistības analīzi, kas varētu nozīmēt to, ka iespējams haplotipiem šajā gēnā ir kāda funkcionāla nozīme, kas ir jānoskaidro. Skaidrojot iegūtos rezultātus Brazīlijas populācijā, jāpiemin, ka rezultāti nav pārsteidzoši, jo citu autoru pētījumos iegūtie rezultāti ir līdzīgi. Kādā pētījumā, analizējot brazīļu ģimenes, netika atklāta nekāda pārmantoto alēļu novirze no normas, līdz ar to netika atklāta saistība starp *BCL3* gēnu un nesindromālām lūpas ar/bez aukslēju šķeltnēm (Gaspar et al., 2002). Jāpiemin, ka ģimeņu pētījumi un to asociācijas analīze, piemēram, transmisijas disekvilibrācijas tests (TDT) ir precīzāka metode kā vienkārši gadījuma-kontroles saistības analīze, līdz ar to, ja šīs analīzes ietvaros tiek atklāta kāda pozitīva saistība starp marķieriem un slimību, tad novērotajai saistībai ir lielāka nozīme. Sava pētījuma ietvaros mēs veicām

arī TDT analīzi, lai noteiktu 19q13 lokusa iespējamo saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ. Rezultātā tikai SNP rs10421283 šajā gēnā atklāja vāju saistību (p-vērt. = 0,0477) ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, bet ne ar AŠ. Mūsu pētījuma rezultāti ir līdzīgi citu autoru pētījumu rezultātiem, kur tika novērots *BCL3* gēna alēļu pārmantojamības ekscess no vecākiem (Maestri et al., 1997; Park et al., 2009). Warrington et al. (2006) pētīja 19q13 lokusu un atklāja saistību starp nesindromālām lūpas ar/bez aukslēju šķeltnēm un *PVR* gēnu divās dažādās populācijās - Aiovas un Dienvidamerikas populācijās, šī saistība saglabājās arī pēc multiplās testēšanas korigēšanas piemērošanas. Savā pētījumā mēs neatklājām nozīmīgu saistību starp marķieriem *PVR* un *PVRL2* gēnos un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ Latvijas populācijā, līdzīgi kā citu autoru pētījumos Dānijas un Itālijas populācijā (Warrington et al., 2006; Pezzetti et al., 2007). Citā pētījumā, apvienojot Latvijas paraugkopu ar Lietuvas un Igaunijas paraugkopu, divi marķieri *PVRL2* gēnā (rs519113 un rs2075642) uzrādīja saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, bet atklātā saistība izzuda pēc Bonferroni korekcijas (attiecīgi p-vērt. = 0,0039; OR = 0,702; 95% CI = 0,552-0,894 un p-vērt. = 0,0206; OR = 1,347; 95% CI = 1,046-1,733) (Nikopensius et al., 2011). *PVRL2* gēna SNP rs6859 un *CLPTMI* gēna divi SNP rs5127 un rs16979595 atklāja saistību ar nesindromālu AŠ, bet saistība izzuda pēc multiplās testēšanas korekcijas piemērošanas (attiecīgi p-vērt. = 0,0472; OR = 1,35; 95% CI = 1,003-1,816, p-value = 0,0146; OR = 1,494; 95% CI = 1,081-2,064, p-vērt. = 0,0288; OR = 1,457; 95% CI = 1,038-2,046) (Nikopensius et al., 2010). No mūsu pētījuma rezultātiem un citu autoru pētījumiem mēs varam spriest, ka, ja 19q13 lokusam tiešām ir nozīme nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ attīstībā, tad tikai kā zemas penetrances vai kā modificējošam lokusam.

Ir atrodami vairāki pētījumi saistībā ar *BMP4* gēna pozitīvu saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ. Marazita et al. (2004) veiktās 13 genomu skanu meta analīzes rezultātā tika identificēti seši rajoni piecās hromosomās ar HLODs ≥ 3.2 , viens no šiem atklātajiem rajoniem 14q21-25, kas norādīja uz

iespējamo saistību ar nesindromālām lūpas ar/bez aukslēju šķeltņēm. Pamatojoties uz šo pētījumu, Lin et al. (2008) veica gadījuma-kontroles analīzi, genotipējot *BMP4* gēna polimorfismus un atklāja saistību starp 538T/C polimorfismu (rs17563) un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ Ķīnas populācijā. Pētījuma rezultāti atklāja, ka 538C alēles nesēji bija saistīti ar paaugstinātu nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ risku, salīdzinot ar indivīdiem, kas nebija šīs alēles nesēji (p-vērt. = 0,005; OR = 1,52; 95% CI = 1,13-2,03). 2009. gadā tika veikts pētījums, kur tika veikta *BMP4* gēna mutāciju analīze, kas atklāja, ka indivīdiem ar dažādiem lūpas un *orbicularis oris* muskuļa (OOM) defektiem ir kādas šī gēna mutācijas, bet neviena mutācija netika atklāta vairāk kā 500 kontroles paraugiem. Šī pētījuma rezultāti apstiprina *BMP4* gēna iespējamo nozīmi nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņu patoģenēzē (Suzuki et al., 2009). Suazo et al. (2010) pētījuma ietvaros analizēja saistību starp *BMP4* gēna trīs SNP (rs762642, rs2855532 un rs1957860) un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, analizējot 150 savstarpēji neradnieciskas triādes Čīles populācijā. Iegūtie rezultāti neatklāja nozīmīgu nobīdi no pārmantoto un nepārmantoto alēļu attiecības, veicot katra SNP analīzi atsevišķi, bet, veicot haplotipu saistības analīzi, tika atklāts, ka haplotipi rs1957860-rs762642 (T-T (p-vērt. = 0.018) un C-T (p-vērt. = 0.015)) ir saistīti ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ. Pētījuma autors uzskata, ka, neskatoties uz atklāto pozitīvo saistību starp haplotipiem un nesindromālām šķeltņēm, saistītajiem haplotipiem visticamāk nav nekāda funkcionāla efekta uz *BMP4* ekspresiju vai proteīnu aktivitāti, bet iespējams haplotipi atrodas nelīdzsvarotajā saistībā ar šī gēna polimorfismiem, tādējādi iesaistoties nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ attīstībā. Šie pētījuma rezultāti apstiprina *BMP4* gēna nozīmi nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņu etioloģijā Čīles populācijā. Mūsu pētījumā, veicot gadījuma-kontroles saistības analīzi, tika atklāta saistība starp ģenētiskajām variācijām *BMP4* gēnā un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, bet ne ar nesindromālu AŠ. Nozīmīgākā saistība ar LŠ/LŠ+AŠ tika atklāta starp nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un SNP rs2071047,

kas atrodas 4. intronā, kur alēle A bija saistīta ar samazinātu LŠ/LŠ+AŠ risku (p-vērt. = 0,0087; OR = 0,63; 95% CI = 0,446-0,891). Atklātā saistīna neizzuda arī pēc Bonferroni korekcijas. SNP rs17563, lokalizēts 5. eksonā, uzrādīja vāju (p-vērt. = 0,0178; OR = 0,666; 95% CI = 0,476-0,933) ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, kur alēle A bija saistīta ar samazinātu LŠ/LŠ+AŠ risku. Arī haplotipu saistības analīze atklāja līdzīgus rezultātus. Netika atklāta saistība starp haplotipiem *BMP4* gēnā un nesindromālu aukslēju šķeltni, bet divi haplotipi šajā gēnā atklāja savu saistību kā aizsargājošu efektu pret nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ. Transmisijas disekvilibrācijas tests atklāja pretējus rezultātus, kādi tika iegūti gadījuma-kontroles saistības analīzes rezultātā. TDT testa ietvaros netika atklāta saistība starp marķieriem *BMP4* gēnā un LŠ/LŠ+AŠ, bet SNP rs1957860, kas ir lokalizēts ~ 6kb *downstream* no gēna, atklāja vāju saistību ar nesindromālu aukslēju šķeltni (p-vērt. = 0,0455; OR = 3,0; 95% CI = 0,968-9,302). Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti apstiprina iepriekšējos pētījumus, ka *BMP4* gēnam ir nozīme nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ un AŠ etioloģijā, visticamāk ar atšķirīgu ietekmi starp dažādām populācijām un rasēm. Mūsu pētījuma rezultāti norāda, ka *BMP4* gēns varētu būt iesaistīts nesindromālo AŠ attīstībā, bet tam varētu būt aizsargājošs efekts saistībā ar nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ attīstību.

Ir ļoti daudzi pētījumi saistībā ar *IRF6* gēnu kā vienu no galvenajiem gēniem, kas varētu būt iesaistīti nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ/AŠ attīstībā. Mūsu pētījuma ietvaros tika atklāta nozīmīga saistība starp *IRF6* gēna viena nukleotīda polimorfismiem un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ. Nozīmīgākā saistība ar LŠ/LŠ+AŠ un AŠ tika atklāta starp SNP rs658860 un rs642961, abi lokalizēti ~10-11 kb *downstream* no *IRF6* gēna. Atklātā saistība tika apstiprināta gan ar gadījuma-kontroles saistības analīzi, gan ar haplotipu saistības analīzi, gan ar transmisijas disekvilibrācijas testu. Nesenā pētījumā tika atklāta saistība starp *IRF6* gēnu SNP rs2235371, lokalizēts 6. eksonā, Ķīnas populācijā, kur TDT and HHRR (*haplotype-based haplotype relative*

risk) analīze atklāja saistību ar nesindromāli lūpas šķeltņi (LŠ) (Li et al., 2012). Iepriekš minētais SNP tika analizēts arī mūsu pētījumā, bet iegūtie rezultāti neatklāja saistību ar LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ. Iegūtie rezultāti varētu tikt skaidroti ar to, ka sava pētījuma ietvaros mēs neiedalījām indivīdus ar izolētu lūpas šķeltņi atsevišķā grupā, veicot gadījuma-kontroles saistības analīzi. Iespējams, SNP rs2235371 būtu atklājis asociāciju ar LŠ Latvijas populācijā, bet pētījumā iekļauto indivīdu ar lūpas šķeltņi skaits bija ļoti neliels, lai to varētu pārbaudīt. Ir pieņemts iedalīt indivīdus ar lūpas šķeltņi un indivīdus ar lūpas šķeltņi un aukslēju šķeltņi vienā grupā, jo tiek uzskatīts, ka abiem fenotipiem ir viena ģenētiskā etioloģija, turpretī aukslēju šķeltnei - cita ģenētiskā etioloģija (Harville, 2005), tomēr neseni pētījumu rezultāti liecina, ka lūpas šķeltne un lūpas un aukslēju šķeltnes tomēr varētu būt kā atsevišķas vienības, kam ir atšķirīga etioloģija un patoģenēze (Jugessur et al., 2011). Līdzīgs pētījums tika veikts Hondūras populācijā (Larrabee et al., 2011), kur tika analizēti divi SNP - rs642961 un rs2235371. Šī pētījuma ietvaros tika atklāta saistība starp SNP rs2235371 un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ gan veicot gadījuma-kontroles saistības analīzi (p-vērt. = 0,01), gan ģimeņu saistības analīzi (p-vērt. = 0,01), bet netika atklāta saistība ar SNP rs642961, kas tiek uzskatīts kā potenciāli bioloģiski nozīmīgs faktors *IRF6* ekspresijā un funkcijas nodrošināšanā (Pan et al., 2010). Šī pētījuma rezultāti ir pretrunīgi ar mūsu pētījuma rezultātiem, kā arī ar Shi et al. (2011) veikto pētījumu, kur abi iepriekš minētie SNP tika analizēti Ķīnas populācijā. Iegūtie rezultāti var atšķirties, jo dažādos pētījumos tika analizētas dažādas populācijas. Ir pētījumi, kas uzskata, ka atšķirīgas populācijas var ietekmēt dažādi *IRF6* gēna polimorfismi. Citā pētījumā apvienojot Latvijas paraugkopu ar Lietuvas un Igaunijas paraugkopu un veicot gadījuma-kontroles saistības analīzi, SNP rs17389541 atklāja saistību ar nesindromālu aukslēju šķeltņi (p-vērt. = 0,0006; OR = 1,726; 95% CI = 1,263-2,358), atklātā saistība tika apstiprināta arī ar haplotipu saistības analīzi. Šis ir

jauns atklājums saistībā ar *IRF6* gēna ietekmi nesindromālo AŠ attīstībā, bet ir nepieciešami papildus pētījumi citās populācijās, lai to apstiprinātu.

Tas, ka pētījuma ietvaros neizdevās atklāt saistību starp tiem gēniem un tajos esošajiem SNP, kas tiek uzskatīti kā iespējamie kandidātģēni jau daudzus gadus, kā, piemēram, *MSX1* gēns, un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ, var būt saistīta ar alēļu vai lokusu heterogenitāti šķeltnu veidošanās etioloģijā. Jāpiemin arī, ka analizējamo indivīdu skaits ir neliels, kā arī atlasīto SNP skaits katrā gēnā var būt pārāk mazs, lai būtu pārklāts viss gēns. Visbeidzot, savā pētījumā mēs analizējām atsevišķus gēnus, bet ne to savstarpējo saistību vai saistību starp gēniem un apkārtējās vides faktoriem, kas arī varētu būt ļoti nozīmīgs faktors LŠ/LŠ+AŠ/AŠ attīstībā. Mūsu nākotnes plāni ir veikt pētījumus, lai noskaidrotu dažādu gēnu mijiedarbību ar dažādiem ārējās vides faktoriem, kā arī to ietekmi nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltnu un izolētas aukslēju šķeltnes etioloģijā.

Mūsu pētījuma rezultāti norāda, ka *FGFR1*, *WNT3*, *SKI*, *BMP4* un *IRF6* gēni ir iesaistīti nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ un AŠ attīstībā, kā arī atklāj iespējamo saistību starp 19q13 lokusu un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ. Neskatoties uz atklātajiem rezultātiem, ir nepieciešams identificēt potenciāli funkcionālos variantus gēnos, kas uzrādīja nozīmīgu saistību ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ vai AŠ, veicot šo rezultātu atkārtojamību citās populācijās, bet ne tikai dažādās Eiropas populācijās.

Oponenti var diskutēt, ka gandrīz visi pētījumā analizētie SNP atrodas intronos vai starpgēnu rajonos un nemaina transkripcijas faktoru piesaistes vietas vai tiem nav potenciāli kaitīgs efekts. Tomēr mums ir jāņem vērā, ka šie SNP, iespējams neitrāli, var atrasties nelīdzsvarotajā saistībā ar kādu no etioloģiskajiem variantiem, kas varētu izskaidrot mūsu pētījumā iegūtos rezultātus. Papildus jāmin arī tas, ka, daudzi literatūrā pieejami GWAS pētījumi norāda, ka SNP, kas ir saistīti ar kādu no slimībām, tiek uzskatīti kā funkcionāli.

Izdarot secinājumu par mūsu pētījumu, varam teikt, ka nesindromālās LŠ/LŠ+AŠ/AŠ ir ļoti kompleksa patoloģija, kā arī ir vēl ļoti daudz nenoskaidrotu gēnu, kas iesaistīti pētītās patoloģijas izraisīšanā, bet tomēr tikai daži gēniem ir liela nozīme nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņu un izolētas aukslēju šķeltnes attīstībā.

SECINĀJUMI

1. Pamatojoties uz iepriekš noteiktajiem parametriem, tika atlasīti 675 ģenētiskie marķieri četrdesmit piecos kandidātgēnos, kas varētu būt iesaistīti nesindromālo lūpas ar/bez aukslēju šķeltņu un izolētas aukslēju šķeltnes etioloģijā.
2. Gadījuma-kontroles saistības analīzes rezultāti atklāja, ka ģenētiskās variācijas *SKI*, *FGFR1*, *WNT3* un *IRF6* gēnos ir saistītas gan ar nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ, gan ar nesindromālām aukslēju šķeltnēm (AŠ) Latvijas populācijā. Iegūtie rezultāti atklāja, ka ģenētiskajām variācijām *BMP4* gēnā iespējams ir aizsargājošs efekts saistībā ar nesindromālo LŠ/LŠ+AŠ attīstību.
3. Tika atklāta nozīmīga saistība starp haplotipiem *SKI*, *FGFR1*, *WNT3* un *IRF6* gēnos un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ, kā arī starp haplotipiem *BMP4* gēnā un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ.
4. Ģimeņu asociācijas analīzes rezultāti atklāja nozīmīgu saistību starp *IRF6* gēnu un nesindromālām LŠ/LŠ+AŠ un AŠ.
5. *BCL3* gēna salīdzinošā analīze atklāja saistību starp *BCL3* gēna haplotipiem un nesindromālu AŠ Brazīlijas populācijā.

PUBLIKĀCIJAS

Publikācijas

1. Lāce B, Prane I, Piekuse L, Akota I, Barkāne B, Krūmiņa A. Lūpas un/vai aukslēju šķeltņu molekulāri ģenētiskie pētījumi Latvijā. RSU zinātnisko rakstu krājums. 2010; 384-388.
2. Nikopensius T, Jagomāgi T, Krjutškov K, Tammekivi V, Saag M, Prane I, Piekuse L, Akota I, Barkane B, Krumina A, Ambrozaitytė L, Matulevičienė A, Kučinskienė ZA, Lace B, Kučinskas V, Metspalu A. Genetic variants in COL2A1, COL11A2, and IRF6 contribute risk to nonsyndromic cleft palate. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2010; 88(9): 748-756.
3. Nikopensius T, Kempa I, Ambrozaitytė L, Jagomāgi T, Saag M, Matulevičienė A, Utkus A, Krjutškov K, Tammekivi V, Piekuse L, Akota I, Barkane B, Krumina A, Klovins K, Lace B, Kučinskas V, Metspalu A. Variation in FGF1, FOXE1, and TIMP2 genes is associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2011; 91(4): 218-225.
4. Lace B, Kempa I, Piekuse L, Grinfelde I, Klovins J, Pliss L, Krumina A, Vieira AR. Association Studies of Candidate Genes and Cleft Lip and Palate Taking into Consideration Geographic Origins. Eur J Oral Sci. 2011; 119(6): 413-417.
5. Lace B, Kempa I, Klovins J, Stavusis J, Krumina A, Akota I, Barkane B, Vieira AR, Nagle E, Grinfelde I, Maulina I. BCL3 gene role in facial morphology. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2012; 94(11): 918-924.
6. Letra A, Fakhouri W, Fonseca RF, Menezes R, Kempa I, Prasad JL, McHenry TG, Lidral AC, Moreno L, Murray JC, Daack-Hirsch S,

Marazita ML, Castilla EE, Lace B, Orioli IM, Granjeiro JM, Schutte BC, Vieira AR. Interaction between IRF6 and TGFA genes contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45441. doi: 10.1371/journal.pone.0045441.

Tēzes

1. Prane I, Lace B, Piekuse L, Barkane B, Akota I, Krumina A. BCL3 gene association analysis with nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate in Latvia. *European Journal of Human Genetics*. 2007; 15(1): 240.
2. Prane I, Lace B, Piekuse L, Klovinis J, Barkane B, Akota I, Krumina A. Intron region importance of BCL3 gene in the nonsyndromic cleft and/or cleft palate. *European Journal of Human Genetics*. 2008; 16(2): 300.
3. Prane I, Lace B, Vieira AR, Akota I, Barkane B, Krumina A. Significant association between IRF6 gene and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Latvian population. *European Journal of Human Genetics*. 2009; 17(2): 237-238.
4. Prane I, Lace B, Vieira AR, Letra A, Menezes R, Barkane B, Akota I, Krumina A. *IRF6 gene as a genetic factor in the development of cleft lip with or without cleft palate*. *Stomatologija*. 2009; 6: 20.
5. Prane I, Piekuse L, Akota I, Barkane B, Krumina A, Lace B. Polymorphisms in WNT family genes are associated with nonsyndromic cleft lip and palate. *European Journal of Human Genetics*. 2010; 18(1): 248.
6. Prane I, Piekuse L, Akota I, Barkāne B, Krūmiņa A, Lāce B. New concepts in genetics of nonsyndromic orofacial clefts. The 7th Congress of the Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery, May 20-22, Riga, Latvia, 2010.

7. Lāce B, Micule I, Grīnfelde I, Prane I, Piekuse L, Krūmiņa A, Barkāne B, Akota I. Identified risk factors of cleft lip and/or palate development. The 7th Congress of the Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery, May 20 – 22, Riga, Latvia, 2010.
8. Lāce B, Pliss L, Pelnēna I, Prane I. Our common roots: mitochondrial haplotype analysis in patients with nonsyndromic cleft lip and/or palate. The 7th Congress of the Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery, May 20 – 22, Riga, Latvia, 2010.
9. Kempa I, Piekuse L, Akota I, Barkane B, Krumina A, Lace B. New concepts in genetics of nonsyndromic orofacial clefts. 4. starptautiskā jauno zinātnieku skola molekulārajā ģenētikā “Genomika un šūnas bioloģija”, Moscow, Russia, 2010; 230.
10. Kempa I, Piekuse L, Klovinis J, Barkane B, Akota I, Krumina A, Lace B. Polymorphisms in FGF1 gene are associated with nonsyndromic cleft lip and palate. *European Journal of Human Genetics*. 2011; 19(2): 307.
11. Kempa I, Martinkevica O, Klovinis J, Akota I, Barkane B, Krumina A, Lace B. BCL3 gene polymorphisms and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research*. 2011; 25(3): 536.
12. Krasone K, Lāce B, Kempa I, Piekuse L, Akota I, Barkāne B, Care R. Hipodontijas ģenētiskie pētījumi indivīdiem ar lūpu un/vai aukslēju šķeltņi Latvijā. RSU Zinātniskā konference, Tēzes 2012; 320.
13. Kempa I, Akota I, Barkane B, Krumina A, Klovinis J, Lace B. Association of IRF6 gene polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *European Journal of Human Genetics*. 2012; 20(1): 234.
14. Kempa I, Piekuse L, Klovinis J, Barkane B, Akota I, Krumina A, Lace B. Polymorphisms in FGF1 gene are associated with nonsyndromic

cleft lip and palate. The V-th International school on molecular genetics for young scientists “Variability of the genome”, Abstract book, 2012; 8.

15. Kempa I, Akota I, Barkane B, Krumina A, Klovinis J, Lace B. Association of IRF6 gene polymorphisms with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. The 3rd Open Gene Young investigator workshop in Baltic region, Abstract book, 2012; 31-32.
16. Kempa I, Piekuse L, Akota I, Barkane B, Krumina A, Stavusis J, Klovinis J, Lace B. Genetic variants in SKI, FGFR1, WNT3, IRF6 and BMP4 genes are associated with risk for non-syndromic CL/CLP and/or CP in Latvian population. *European Journal of Human Genetics*. 2013 (accepted).

Aprobācija

1. Pre-defence of the thesis was held in joint meeting of Department of Biology and Microbiology, Rīga Stradiņš University, Institute of Stomatology, Rīga Stradiņš University and Latvian Association of Human Genetics at April 23, 2012, Stomatology Institute, Rīga Stradiņš University, Riga, Latvia.
2. Kempa I, Martinkevica O, Klovinis J, Akota I, Barkane B, Krumina A, Lace B. BCL3 gene polymorphisms and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. 9th European Craniofacial Congress, 14.09.2011.-17.09.2011., Salzburg, Austria.
3. Kempa I, Akota I, Barkāne B, Krūmiņa A, Lāce B. “Ģenētisko faktoru loma nesindromālo lūpas un/vai aukslēju šķeltnu attīstībā Latvijas populācijā”. LZP Sadarbības projekta seminārs, 03.03.2011., Rīga, Latvija.
4. Prane I, Piekuse L, Akota I, Barkāne B, Krūmiņa A, Lāce B. „New concepts in genetics of nonsyndromic orofacial clefts”. The 7th

Congress of the Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery, 20.05.2010.-22.05.2010., Rīga, Latvija.

PATEICĪBAS

Izsaku lielu pateicību visiem, kas piedalījās šī darba tapšanā un darīja visu, lai tas tiktu realizēts.

Vēlos izteikt dziļu pateicību abiem darba vadītājiem - dr. med. Baibai Lācei un dr. biol. Jānim Kloviņam par iespēju izstrādāt darbu viņu vadībā un augt kā zinātniekam kopā ar viņiem. Ļoti liels paldies Baibai par darba vadīšanu un par laiku, ko viņa nesavtīgi veltīja, lai iepazītos ar manām tēzēm un veiktu to koriģēšanu. Liels paldies arī Jānim, kurš nekad neskopojās ar padomiem datu statistiskajā apstrādē.

Esmu ļoti pateicīga saviem koēģiem no Rīgas Stradiņa universitātes un Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra, īpaši manai kolēģei un ļoti labai draudzenei Lindai Piekusei, kas vienmēr mani atbalstīja darba tapšanas grūtajos brīžos.

Vēlos no visas sirds pateikties arī kolēģiem no Rīgas Stradiņa universitātes Stomatoloģijas institūta Rīgas Lūpu, aukslēju un sejas šķeltņu centra par palīdzību paraugu vākšanā.

Paldies arī visiem nesavtīgajiem pacientiem un viņu ģimenes locekļiem par piedalīšanos šajā pētījumā, jo bez viņu līdzdalības nekas no realizētā nebūtu iespējams.

Visdziļāko pateicību vēlos izteikt savai ģimenei, īpaši manai mammai, kas vienmēr pieņēma un atbalstīja manus lēmumus saistībā ar izvēlēto profesiju. Visbeidzot, vēlos no visas sirds pateikties savam vīram par to, ka viņš ļauj man piepildīt savus sapņus un pieļauj manu trako dzīves veidu - zinātni.

LITERATŪRAS SARAĶSTS

1. Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB et al. A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Ann Epidemiol.* 2001; 11(6): 434-442.
2. Berk M, Desai SY, Heyman HC, Colmenares C. Mice lacking the SKI proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial patterning, and skeletal muscle development. *Genes Dev.* 1997; 11(16): 2029-2039.
3. Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, Baluardo C, Ferrian M, Almeida de Assis N, Alblas MA, Barth S, Freudenberg J, Lauster C, Schmidt G, Scheer M, Braumann B, Bergé SJ, Reich RH, Schiefke F, Hemprich A, Pötzsch S, Steegers-Theunissen RP, Pötzsch B, Moebus S, Horsthemke B, Kramer FJ, Wienker TF, Mossey PA, Propping P, Cichon S, Hoffmann P, Knapp M, Nöthen MM, Mangold E. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2009; 41(4): 473-477.
4. Brugmann SA, Goodnough LH, Gregorieff A, Leucht P, ten Berge D, Fuerer C, Clevers H, Nusse R, Helms JA. Wnt signaling mediates regional specification in the vertebrate face. *Development.* 2007; 134(18): 3283-3295.
5. Butali A, Mossey PA, Adeyemo WL, Jezewski PA, Onwuamah CK, Ogunlewe MO, Ugboko VI, Adejuyigbe O, Adigun AI, Abdur-Rahman LO, Onah II, Audu RA, Idigbe EO, Mansilla MA, Dragan EA, Petrin AL, Bullard SA, Uduezue AO, Osaguona AO, Olasoji HO, Ligali TO, Kejeh BM, Iseh KR, Olaitan PB, Adebola AR, Efunkoya E, Adesina OA, Oluwatosin OM, Murray JC. Genetic studies in the nigerian population implicate an MSX1 mutation in complex oral facial clefting disorders. *Cleft Palate Craniofac J.* 2011; 48(6): 646-

653.

6. Carreño H, Suazo J, Paredes M, Solá J, Valenzuela J, Blanco R. Association between cleft lip/palate phenotype and non syndrome microsatellite markers located in 6p, 17q and 19q. *Rev Med Chil.* 2002; 130(1): 35-44.
7. Chen L, Deng CX. Roles of FGF signaling in skeletal development and human genetic diseases. *Front Biosci.* 2005; 10: 1961-1976.
8. Chiquet BT, Blanton SH, Burt A et al. Variation in WNT genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mol Genet.* 2008; 17(14): 2212-2218.
9. Christensen K, Juel K, Herskind AM, Murray JC. Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. *BMJ.* 2004; 328(7453): 1405.
10. Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16(2): 233-247.
11. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16(2): 139-149.
12. Fujita H, Nagata M, Ono K, Okubo H, Takagi R. Linkage analysis between BCL3 and nearby genes on 19q13.2 and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in multigenerational Japanese families. *Oral Dis.* 2004; 10(6): 353-359.
13. Gaspar DA, Matioli SR, Pavanello RC et al. Evidence that BCL3 plays a role in the etiology of nonsyndromic oral clefts in Brazilian families. *Genet Epidemiol.* 2002; 23(4): 364-374.
14. Harville EW, Wilcox AJ, Lie RT, Vindenes H, Abyholm F. Cleft lip and palate versus cleft lip only: are they distinct defects? *Am J Epidemiol.* 2005; 162(5): 448-453.

15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
16. Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet.* 2004; 20(11): 563-569.
17. Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B, Romitti PA, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Machida J, Natsume N, Murray JC. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2003; 40(6): 399-407.
18. Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, Christensen K, Boyles AL, Daack-Hirsch S, Nguyen TT, Christiansen L, Lidral AC, Murray JC. Fetal genetic risk of isolated cleft lip only versus isolated cleft lip and palate: a subphenotype analysis using two population-based studies of orofacial clefts in Scandinavia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011; 91(2): 85-92.
19. Juriloff DM, Harris MJ, Brown CJ. Unravelling the complex genetics of cleft lip in the mouse model. *Mamm Genome.* 2001; 12(6): 426-35.
20. Juriloff DM, Harris MJ, Dewell SL, Brown CJ, Mager DL, Gagnier L, Mah DG. Investigations of the genomic region that contains the *clfl* mutation, a causal gene in multifactorial cleft lip and palate in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005; 73(2): 103-113.
21. Juriloff DM, Harris MJ, Dewell SL. A digenic cause of cleft lip in A-strain mice and definition of candidate genes for the two loci. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004; 70(8): 509-518.
22. Krivicka-Uzkurele B, Pilmane M, Akota I. Barx1. growth factors and apoptosis in facial tissue of children with clefts. *Stomatologija.* 2008; 10(2): 62-66.
23. Krjutskov K, Andreson R, Mägi R, Nikopensius T, Khrunin A, Mihailov E, Tammekivi V, Sork H, Remm M, Metspalu A.

- Development of a single tube 640-plex genotyping method for detection of nucleic acid variations on microarrays. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(12): e75.
24. Larrabee YC, Birkeland AC, Kent DT, Flores C, Su GH, Lee JH, Haddad J Jr. Association of common variants, not rare mutations, in IRF6 with nonsyndromic clefts in a Honduran population. *Laryngoscope.* 2011; 121(8): 1756-1759.
 25. Li M, Zhu W, Wang Y, Guo J, Li S, Li Y. [Association between polymorphism of IRF6 rs2235371 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2012; 29(2): 149-154.
 26. Lin JY, Chen YJ, Huang YL, Tang GP, Zhang L, Deng B, Li M, Ma H, Luan RS. Association of bone morphogenetic protein 4 gene polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chinese children. *DNA Cell Biol.* 2008; 27(11): 601-605.
 27. Lu W, Volcik K, Zhu H, Wen S, Shaw GM, Lammer EJ, Finnell RH. Genetic variation in the proto-oncogene SKI and risk for orofacial clefting. *Mol Genet Metab.* 2005; 86(3): 412-416.
 28. Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J et al. Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. *American Journal of Medical Genetics.* 1997; 73(3): 337-344.
 29. Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S, Reutter H, de Assis NA, Chawa TA, Mattheisen M, Steffens M, Barth S, Kluck N, Paul A, Becker J, Lauster C, Schmidt G, Braumann B, Scheer M, Reich RH, Hemprich A, Pötzsch S, Blaumeiser B, Moebus S, Krawczak M, Schreiber S, Meitinger T, Wichmann HE, Steegers-Theunissen RP, Kramer FJ, Cichon S, Propping P, Wienker TF, Knapp M, Rubini M, Mossey PA, Hoffmann P, Nöthen MM.

- Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet.* 2010; 42(1): 24-26.
30. Mangold E, Reutter H, Birnbaum S, Walier M, Mattheisen M, Henschke H, Lauster C, Schmidt G, Schiefke F, Reich RH, Scheer M, Hemprich A, Martini M, Braumann B, Krimmel M, Opitz C, Lenz JH, Kramer FJ, Wienker TF, Nöthen MM, Diaz Lacava A. Genome-wide linkage scan of nonsyndromic orofacial clefting in 91 families of central European origin. *Am J Med Genet A.* 2009; 149A(12): 2680-2694.
 31. Marazita ML, Lidral AC, Murray JC et al. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered.* 2009; 68(3): 151-170.
 32. Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, Arcos-Burgos M, Cooper ME, Goldstein T, Maher BS, Daack-Hirsch S, Schultz R, Mansilla MA, Field LL, Liu YE, Prescott N, Malcolm S, Winter R, Ray A, Moreno L, Valencia C, Neiswanger K, Wyszynski DF, Bailey-Wilson JE, Albacha-Hejazi H, Beaty TH, McIntosh I, Hetmanski JB, Tunçbilek G, Edwards M, Harkin L, Scott R, Roddick LG. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet.* 2004; 75(2): 161-173.
 33. Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F et al. Suggestive linkage between markers on chromosome 19q13.2 and nonsyndromic orofacial cleft malformation. *Genomics.* 1998; 51(2): 177-181.
 34. Menezes R, Letra A, Ruff J, Granjeiro JM, Vieira AR. Studies of genes in the FGF signaling pathway and oral clefts with or without dental anomalies. *Am J Med Genet A.* 2008; 15; 146A(12): 1614-1617.
 35. Menezes R, Letra A, Kim AH, Kuchler EC, Day A, Tannure PN,

- Gomes da Motta L, Paiva KB, Granjeiro JM, Vieira AR. Studies with Wnt genes and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010; 88(11): 995-1000.
36. Mooney MP, Siegel MI, editors: Understanding craniofacial anomalies: The etiopathogenesis of craniosynostoses and facial clefting. New York, *Wiley-Liss, Inc*; 2002.
 37. Morkuniene A, Steponaviute D, Utkus A, Kucinskas V. Few associations of candidate genes with nonsyndromic orofacial clefts in the population of Lithuania. *J Appl Genet*. 2007; 48(1): 89-91.
 38. Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Biedziak B, Paradowska P, Jagodzinski PP. Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010; 88(7): 538-545.
 39. Mostowska A, Hozyasz KK, Biedziak B, Wojcicki P, Lianeri M, Jagodzinski PP. Genotype and haplotype analysis of WNT genes in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci*. 2012; 120(1): 1-8.
 40. Murray JC: Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*. 2002; 61(4): 248-256.
 41. Pan Y, Ma J, Zhang W, Du Y, Niu Y, Wang M, Zhang Z, Wang L. IRF6 polymorphisms are associated with nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A(10): 2505-211.
 42. Park BY, Sull JW, Park JY, Jee SH, Beaty TH. Differential parental transmission of markers in BCL3 among Korean cleft case-parent trios. *J Prev Med Public Health*. 2009; 42(1): 1-4.
 43. Pezzetti F, Palmieri A, Martinelli M, Scapoli L, Arlotti M, Baciliero U,

- Padula E, Carinci P, Caramelli E, Carinci F. Linkage disequilibrium analysis of two genes mapping on OFC3: PVR and PVRL2. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15(9): 992-994.
44. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007; 81(3): 559-575.
45. Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, Russo ET, Vieira AR, Dodé C, Mohammadi M, Marazita ML, Murray JC. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007b 13; 104(11): 4512-4517.
46. Riley BM, Schultz RE, Cooper ME, Goldstein-McHenry T, Daack-Hirsch S, Lee KT, Dragan E, Vieira AR, Lidral AC, Marazita ML, Murray JC. A genome-wide linkage scan for cleft lip and cleft palate identifies a novel locus on 8p11-23. *Am J Med Genet A.* 2007a 15; 143A(8): 846-852.
47. Schliekelman P, Slatkin M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(6): 1369 - 85.
48. Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet.* 1999; 8(10): 1853-1859.
49. Shi J, Song T, Jiao X, Qin C, Zhou J. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the IRF6 and TFAP2A in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCLP) in a northern Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 15;410(4): 732-736.
50. Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Gen.* 2004; 13: 73-81.

51. Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Association between bone morphogenetic protein 4 gene polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chilean population. *DNA Cell Biol.* 2010; 29(2): 59-64.
52. Suzuki S, Marazita ML, Cooper ME, Miwa N, Hing A, Jugessur A, Natsume N, Shimozato K, Ohbayashi N, Suzuki Y, Niimi T, Minami K, Yamamoto M, Altannamar TJ, Erkhembaatar T, Furukawa H, Daack-Hirsch S, L'heureux J, Brandon CA, Weinberg SM, Neiswanger K, Deleyiannis FW, de Salamanca JE, Vieira AR, Lidral AC, Martin JF, Murray JC. Mutations in BMP4 are associated with subepithelial, microform, and overt cleft lip. *Am J Hum Genet.* 2009; 84(3): 406-411.
53. Trumpp A, Depew MJ, Rubenstein JL, Bishop JM, Martin GR. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes Dev.* 1999; 13(23): 3136-3148.
54. Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, O'Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, Fitzpatrick DR, Jiang R, Marazita ML, Murray JC. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.* 2005; 1(6): e64.
55. Wang H, Zhang T, Wu T, Hetmanski JB, Ruczinski I, Schwender H, Murray T, Fallin MD, Redett RJ, Raymond GV, Jin SC, Wu-Chou YH, Chen PK, Yeow V, Chong SS, Cheah FS, Jee SH, Jabs EW, Liang KY, Scott A, Beaty TH. The FGF&FGFR Gene Family and Risk of Cleft Lip with/without Cleft Palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2011; [Epub ahead of print].

56. Warrington A, Vieira AR, Christensen K et al. Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2006; 43(6): e26.
57. Wyszynski DF, Maestri N, McIntosh I, Smith EA, Lewanda AF, Garcia-Delgado C, Vinageras-Guarneros E, Wulfsberg E, Beaty TH. Evidence for an association between markers on chromosome 19q and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in two groups of multiplex families. *Hum Genet.* 1997; 99(1): 22-26.
58. Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J, Natsume N, Yoshiura K, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Moreno L, Arcos-Burgos M, Lidral AC, Field LL, Liu YE, Ray A, Goldstein TH, Schultz RE, Shi M, Johnson MK, Kondo S, Schutte BC, Marazita ML, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med.* 2004; 19; 351(8): 769 - 80.

