

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALENTINA MATEK  
MAGISTRSKA NALOGA  
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM  
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018



UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALENTINA MATEK

**ANALIZA SPREMEMB NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENA  
IRF6 V DRUŽINAH Z OROFACIALNIMI SHIZAMI**

**SEQUENCE ANALYSIS OF IRF6 GENE IN FAMILIES WITH  
OROFACIAL CLEFTING**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM  
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018



Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Alenke Šmid, mag. farm. Sekvenciranje so opravili v podjetju McLab iz San Francisca.

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Nataši Karas Kuželički, mag. farm., in somentorici asist. dr. Alenki Šmid, mag. farm., za pomoč pri izdelavi magistrske naloge.*

*Še posebej se zahvaljujem svoji družini, Mitji in prijateljem za podporo, pomoč in vzpodbudne besede. Brez vas mi ne bi uspelo.*

*»The art and science of asking questions is the source of all knowledge.«*

*Thomas Berger*

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag. farm., in somentorice asist. dr. Alenke Šmid, mag. farm. Magistrska naloga je del ARRS projekta J3-8207 pod vodstvom prof. dr. Ksenije Geršak.



# VSEBINA

1.	UVOD.....	1
1.1	POJAVNOST IN POSLEDICE OFC .....	1
1.2	NASTANEK IN DELITEV OFC .....	1
1.3	KLASIFIKACIJA OFC .....	3
1.4	DEJAVNIKI TVEGANJA .....	4
1.4.1	Demografski dejavniki tveganja.....	5
1.4.2	Okoljski dejavniki tveganja.....	5
1.4.3	Genetski dejavniki tveganja.....	7
1.4.4	Interakcija med okoljem in geni .....	8
1.5	<i>IRF6</i> .....	9
1.5.1	Struktura in funkcija <i>IRF6</i> .....	9
1.5.2	Povezava <i>IRF6</i> s kliničnimi stanji.....	11
1.5.3	Najpogostejši preučevani polimorfizmi <i>IRF6</i> .....	12
2.	NAMEN .....	14
3.	MATERIALI in METODE .....	15
3.1	VZORCI PREISKOVANCEV .....	15
3.2	IZOLACIJA DNA IZ BRISA BUKALNE SLUZNICE .....	15
3.2.1	Material: .....	15
3.2.2	Oprema: .....	16
3.3	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO.....	16
3.3.1	Material.....	17
3.3.2	Oprema .....	18
3.3.3	Postopek .....	18
3.4	ELEKTROFOREZA.....	24
3.4.1	Material.....	24

3.4.2	Oprema .....	25
3.4.3	Postopek .....	25
3.5	SEKVENCIRANJE .....	26
3.6	GENOTIPIZACIJA Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU .....	27
3.6.1	Material: .....	28
3.6.2	Oprema: .....	29
3.6.3	Postopek .....	29
4.	REZULTATI .....	32
4.1	REZULTATI SEKVENCIRANJA .....	32
4.2	REZULTATI GENOTIPIZACIJE DRUŽIN .....	32
4.2.1	DRUŽINA OFC_004 .....	33
4.2.2	DRUŽINA OFC_025 .....	33
4.2.3	DRUŽINA OFC_032 .....	34
4.2.4	DRUŽINA OFC_047 .....	34
4.2.5	DRUŽINA OFC_059 .....	35
4.2.6	DRUŽINA OFC_062 .....	35
4.2.7	DRUŽINA OFC_064 .....	36
4.2.8	DRUŽINA OFC_066 .....	36
4.2.9	DRUŽINA OFC_071 .....	37
4.2.10	DRUŽINA OFC_078 .....	37
4.2.11	DRUŽINA OFC_093 .....	38
4.2.12	DRUŽINA OFC_095 .....	38
4.2.13	DRUŽINA OFC_113 .....	39
4.2.14	DRUŽINA OFC_115 .....	39
4.2.15	DRUŽINA OFC_126 .....	40
4.2.16	DRUŽINA OFC_140 .....	40



4.2.17	DRUŽINA OFC_141 .....	41
4.2.18	DRUŽINA OFC_144 .....	41
4.2.19	DRUŽINA OFC_147 .....	42
4.2.20	DRUŽINA OFC_156 .....	42
4.2.21	DRUŽINA OFC_167 .....	43
4.2.22	DRUŽINA OFC_178 .....	44
4.2.23	DRUŽINA OFC_179 .....	44
5.	RAZPRAVA.....	46
6.	SKLEPI.....	57
7.	VIRI IN LITERATURA: .....	59
8.	PRILOGE .....	70

## **KAZALO SLIK**

Slika 1: Prikaz embrionalnega razvoja obraza in ustne votline (povzeto po 15) .....	2
Slika 2: Položaj gena IRF6 na kromosomu 1, označen z rumeno puščico (povzeto po: <a href="https://ghr.nlm.nih.gov/gene/IRF6#location">https://ghr.nlm.nih.gov/gene/IRF6#location</a> , dostopno: avgust, 2018).....	9

# KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Seznam okrajšav.....	III
Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi PCR za en vzorec s končnim volumnom 10 µL.	19
Preglednica III: Program izvedbe verižne reakcije s polimerazo .....	19
Preglednica IV: Prikaz temperatur prileganja oligonukleotidnih začetnikov za optimizacijo PCR na gradientnem cikličnem pomnoževalniku C1000™ Thermal Cycler.....	20
Preglednica V: Optimizacija koncentracije MgCl <sub>2</sub> – prikaz izbranih koncentracijskih nivojev MgCl <sub>2</sub> s spremembami volumna MgCl <sub>2</sub> in ultra čiste vode v PCR reakcijski zmesi.....	20
Preglednica VI: Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov – prikaz izbranih koncentracijskih nivojev za začetnike s spremembami volumna za začetnike in ultra čisto vodo v PCR reakcijski zmesi.....	21
Preglednica VII: Prikaz rezultatov optimizacije PCR za posamezne pare oligonukleotidnih začetnikov .....	21
Preglednica VIII: Sestava reakcijskih zmesi za posamezen par oligonukleozidnih začetnikov po optimizaciji in prilagoditvi končnega volumna .....	22
Preglednica IX: Program izvedbe PCR z uporabo HOT FIREPol® DNA Polymerase.....	24
Preglednica X: Sestava reakcijske mešanice za en vzorec qPCR s TaqMan® sondami.....	29
Preglednica XI: Program izvedbe qPCR za genotipizacijo s TaqMan sondami .....	29
Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi za qPCR in HRM analizo za en vzorec .....	30
Preglednica XIII: Program za izvedbo qPCR in HRM analize .....	31
Preglednica XIV: Odkrite mutacije v kodirajočih regijah gena IRF6 in njihovi neposredni bližini v slovenski polpulaciji.....	32
Preglednica XV: Rezultati genotipizacije za družino OFC_004, C1-primarni bolnik z OFC, C2-sorojenec, F-oče, M-mati.....	33
Preglednica XVI: Rezultati genotipizacije za družino OFC_025, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati .....	33
Preglednica XVII: Rezultati genotipizacije za družino OFC_032, C1-primarni bolnik z OFC, C2, C3-sorojenec, F-oče, M-mati .....	34
Preglednica XVIII: Rezultati genotipizacije za družino OFC_047, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati .....	34
Preglednica XIX: Rezultati genotipizacije za družino OFC_059, C1-primarni bolnik z OFC, F-oče, M-mati .....	35

Preglednica XX: Rezultati genotipizacije za družino OFC_062, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati.....	35
Preglednica XXI: Rezultati genotipizacije za družino OFC_064, C1-primarni bolnik z OFC, F-oče, M-mati.....	36
Preglednica XXII: Rezultati genotipizacije za družino OFC_066, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati.....	36
Preglednica XXIII: Rezultati genotipizacije za družino OFC_071, C1-primarni bolnik z OFC, C2-sorojenec, F-oče, M-mati.....	37
Preglednica XXIV: Rezultati genotipizacije za družino OFC_078, C1-primarni bolnik z OFC, F-oče, M-mati.....	37
Preglednica XXV: Rezultati genotipizacije za družino OFC_093, C1-primarni bolnik z OFC, F-oče, M-mati, GM-babica.....	38
Preglednica XXVI: Rezultati genotipizacije za družino OFC_095, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati.....	38
Preglednica XXVII: Rezultati genotipizacije za družino OFC_113, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati.....	39
Preglednica XXVIII: Rezultati genotipizacije za družino OFC_115, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati.....	39
Preglednica XXIX: Rezultati genotipizacije za družino OFC_126, C1-primarni bolnik z OFC, C2-sorojenec, F-oče, M-mati.....	40
Preglednica XXX: Rezultati genotipizacije za družino OFC_140, C1-primarni bolnik z OFC, C2-sorojenec, F-oče, M-mati.....	40
Preglednica XXXI: Rezultati genotipizacije za družino OFC_141, C1-primarni bolnik z OFC, C2-sorojenec, M-mati.....	41
Preglednica XXXII: Rezultati genotipizacije za družino OFC_144, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati.....	41
Preglednica XXXIII: Rezultati genotipizacije za družino OFC_147, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati.....	42
Preglednica XXXIV: Rezultati genotipizacije za družino OFC_156, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati.....	42
Preglednica XXXV: Rezultati genotipizacije za družino OFC_167, C1-primarni bolnik z OFC, C2,C3-sorojenec, F-oče, M-mati, GM-babica, UN-stric.....	43

Preglednica XXXVI: Rezultati genotipizacije za družino OFC_178, C1-primarni bolnik z OFC, C2,C3-sorojenec, F-oče, M-mati .....	44
Preglednica XXXVII: Rezultati genotipizacije za družino OFC_179, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati .....	44
Preglednica XXXVIII: Seznam neuspešnih genotipizacij in manjkajočih vzorcev za posamezne polimorfizme.....	47
Preglednica XXXIX: Vezavno neravnovesje v italijanski populaciji za polimorfizme rs7552506, rs2013162 in rs2235375 (vir: baza podatkov Ensembl).....	54



# POVZETEK

Orofacialne shize (OFC) so pogoste prirojene nepravilnosti v razvoju obraznih tkiv. Njihova etiologija je zelo kompleksna, saj gre večinoma za multifaktorske bolezni, na katere vpliva veliko število genov. Poleg genetskih faktorjev k povečanemu tveganju za nastanek shiz prispevajo tudi okoljski in demografski dejavniki tveganja. Obstajajo tudi bolj redke monogenske oblike OFC (npr. Van der Woudeov sindrom). Najmočnejša povezava med orofacialnimi shizami je bila dokazana za gen *IRF6*. Ker raziskav o vrsti in pogostosti sprememb nukleotidnega zaporedja *IRF6* v slovenski populaciji še ni bilo, smo se odločili raziskati mutacijski profil kodirajočih odsekov gena *IRF6* ter njihovih mej z introni pri bolnikih z orofacialnimi shizami in njihovih zdravih ali bolnih družinskih članih. V raziskavo smo vključili 24 družin oziroma 24 bolnikov s pozitivno družinsko anamnezo in njihove družinske člane (skupaj 72 preiskovancev). S pomočjo verižne reakcije s polimerazo smo pomnožili kodirajoče eksone gena *IRF6* vključno z njihovimi intronskimi mejami na vzorcih DNA otrok z orofacialnimi shizami ter produkte reakcije poslali na sekvenciranje. Določili smo šest mutacij, ki so prisotne v slovenski populaciji: rs7552506, rs2013162, rs2235375, rs763754100, rs2235373 in CM022409. Od teh sta bili dve mutaciji intronski (rs2235375 in rs2235373), ena mutacija spojitvenega mesta (rs7552506), ena nesmiselna (CM022409) in dve sinonimni (rs2013162, rs763754100). Pri preostalih družinskih članih smo genotipe posameznih mutacij določili s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času in TaqMan sondami ter analizo talilnih krivulj. Posledice ugotovljenih mutacij smo nadalje *in silico* analizirali s pomočjo baze podatkov Ensembl. Ugotovili smo, da se genotip v primeru vseh polimorfizmov z izjemo CM022409 izraža fenotipsko variabilno. Obstajajo indikacije za vezavno neravnovesje med polimorfizmi rs7552506, rs2013162 in rs2235375. Mutacija CM022409 se deduje avtosomno dominantno in je značilna za monogeno obliko OFC, Van der Woudeov sindrom. Ostale odkrite mutacije imajo verjetno manjši prispevek k nastanku shiz in so delo poligenškega dedovanja nesindromskih OFC. Sinonimna mutacija rs763754100 je v preučevani skupini slovenskih bolnikov s pozitivno družinsko anamnezo OFC skoraj 3000-krat pogostejša kot pri populaciji zdravih posameznikov iz baze 1000 Genomes, zato lahko sklepamo, da je mutacija povezana z omenjenimi nepravilnostmi, kar pa bi bilo potrebno potrditi s funkcijskimi študijami.

**KLJUČNE BESEDE:** orofacialne shize, polimorfizmi, študija družin, Van der Woudeov sindrom





# ABSTRACT

Orofacial clefts (OFC) are common congenital anomalies in development of facial structures. These multifactorial diseases have complex etiology because they are impacted by number of genes. Besides genetic risk factors environmental and demographic risk factors are increasing the occurrence of orofacial clefts. There are also not so frequent monogenic types of OFC such as Van der Woude syndrome. The strongest linkage to orofacial clefts has been proven for gene *IRF6*. Sequence analysis of *IRF6* gene has never been performed on Slovenian population. That is why we decided to perform a research of mutation profiles within coding segments of gene *IRF6* and their intron boundaries on the group of patients with OFC and their healthy or affected family members. The research was performed on 24 families or 24 patients with positive OFC anamnesis and their family members (total number of subjects is 72). With the help of polymerase chain reaction we multiplied coding exons of *IRF6* gene and their intron boundaries on DNA samples collected from children with orofacial clefts. Polymerase chain reaction products were sent to be sequenced. We have discovered six variants in the Slovenian population. These variants are: rs7552506, rs2013162, rs2235375, rs763754100, rs2235373 and CM022409. The two of them (rs2235375 and rs2235373) are intronic variants, one (rs7552506) is splice site mutation, one (CM022409) is nonsense mutation and two are synonymous mutations (rs2013162 and rs763754100). Missing genotype results were collected by genotyping assays of real time polymerase chain reaction with TaqMan probes and High Resolution melt curve analysis. Furthermore, we analyzed mutations *in silico* with the help of Ensembl data base. Our conclusion is that genotype varies in phenotypes, except in the case of variant CM022409. There are also indications of linkage disequilibrium between polymorphisms rs7552506, rs2013162 and rs2235375. Variant CM022409 has autosomal dominant inheritance which is typical for monogenic type of OFC Van der Woude syndrome. The rest of the discovered mutations are more likely to have minor contribution and they belong to nonsyndromic clefts which are polygenic diseases. Synonymous variant rs763754100 is in our study on Slovenian population of patients with positive family history of OFC almost 3000-times more common than in global population of healthy individuals from the base 1000 Genomes. That is why we conclude that this variant has impact on mentioned anomalies but should be further investigated in functional studies.

**KEY WORDS:** orofacial clefts, polymorphisms, family study, Van der Woude syndrome



# SEZNAM OKRAJŠAV

Preglednica I: Seznam okrajšav

<b>bp</b>	bazni par
<b>CLP</b>	razcep ustnice in/ali neba ( <i>ang. Cleft lip with or without cleft palate</i> )
<b>CP</b>	razcep neba ( <i>ang. Cleft palate</i> )
<b>ddNTP</b>	dideoksinukleozidtrifosfat
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>dNTP</b>	deoksiribonukleozidtrifosfat
<b>dsDNA</b>	dvoverižna DNA
<b>Ex</b>	ekson
<b>F</b>	smerni začetnik
<b>ICD</b>	mednarodna klasifikacija bolezni ( <i>ang. International Classification of Diseases</i> )
<b>IFN</b>	interferon
<b>IRF</b>	interferon regulirajoči faktor
<b>IRF6</b>	interferon regulirajoči faktor 6
<b>ITM</b>	indeks telesne mase
<b>LD</b>	vezavno neravnovesje
<b>MAF</b>	frekvenca manj pogostega alela ( <i>ang- Minor Allele Frequency</i> )
<b>mRNA</b>	informacijska ribonukleinska kislina
<b>NMD</b>	nesmiselno voden razpad ( <i>ang. Nonsense Mediated Decay</i> )
<b>OFC</b>	orofacialne shize
<b>p63</b>	tumor protein p63
<b>PCOS</b>	policistični sindrom jajčnikov
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo
<b>PPS</b>	sindrom poplitealnega ptergija
<b>PRS</b>	Pierre Robinova sekvenca
<b>R</b>	protismerni začetnik
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina
<b>RNaza</b>	ribonukleaza
<b>ssDNA</b>	enoverižna DNA

<b>t. n.</b>	teden nosečnosti
<b>Ta</b>	temperatura prileganja ( <i>ang. annealing temperature</i> )
<b>TAE</b>	tris-acetat-etilendiamintetraocetna kislina
<b>Tm</b>	temperatura tališča ( <i>angl. melting temperature</i> )
<b>V274I</b>	zamenjava aminokislina valin na mestu 274 za izolevcin
<b>VWS</b>	Van der Woudeov sindrom
<b>WHO</b>	Svetovna zdravstvena organizacija

# 1. UVOD

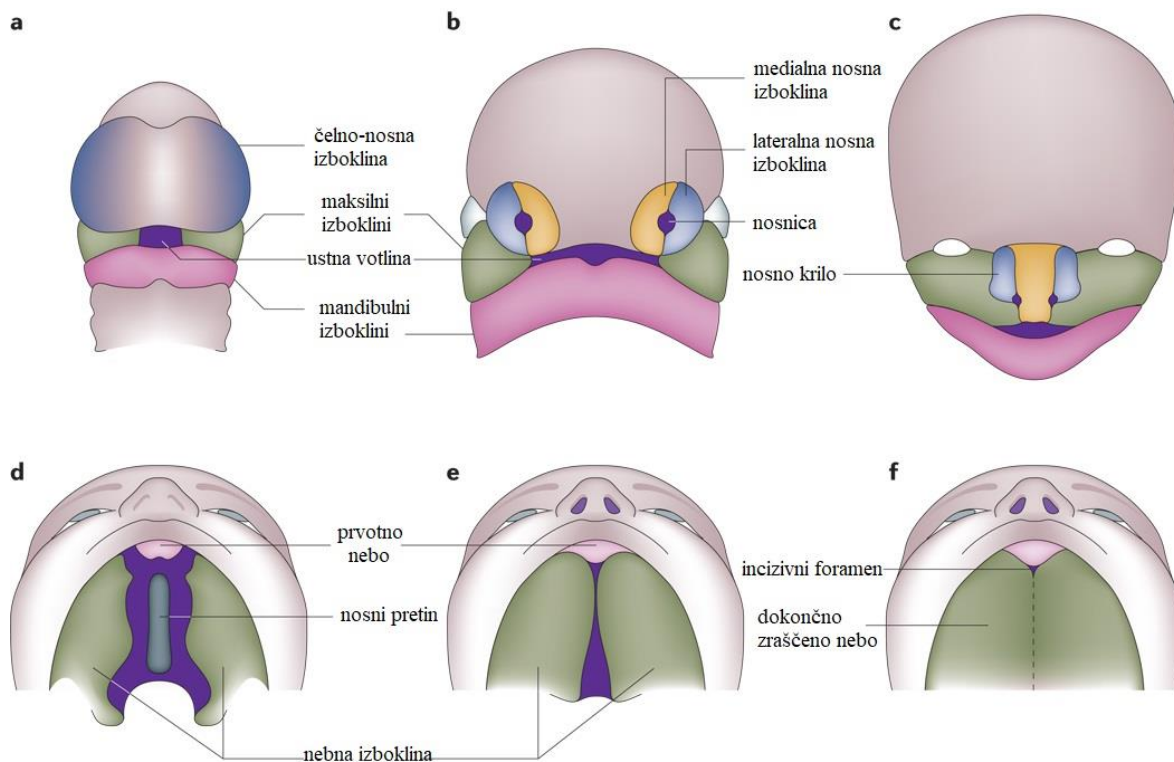
## 1.1 POJAVNOST IN POSLEDICE OFC

Orofacialne shize (*ang. orofacial clefts*, OFC) so dedne anomalije obraza in ustne votline. Pojavljajo se pri 1,7 otroka na 1000 zdravih rojstev (1). Med letoma 1993 in 2012 se je v Sloveniji rodil en otrok s shizo na 597 živorojenih otrok. Pojavnost anomalije je pri 1,67 otroka na 1000 rojstev. Incidenca se med leti razlikuje, najnižja je bila leta 2000 in najvišja leta 1994 (2).

OFC so ene najpogostejših prirojenih razvojnih nepravilnosti, ki negativno vplivajo na življenje posameznika in v veliki meri tudi na življenje njegovih bližnjih. Nastanejo kot posledica kompleksnih interakcij med različnimi okoljskimi in genetskimi dejavniki. Zdravljenje vključuje različne strokovnjake, ki posameznikom omogočijo kvalitetnejše življenje. Sem vključujemo kirurge, govorne terapevte, zobozdravnike, ortodonte, psihologe in druge. Stroški, povezani z zdravljenjem, so visoki (3). Dejstvo je, da orofacialne shize predstavljajo velik javnozdravstveni problem, zato danes izvajajo številne študije, s katerimi skušajo ugotoviti vzrok za nastanek teh anomalij. Z odkritjem vzrokov bi lahko izboljšali preventivo OFC v najbolj ogroženih segmentih populacije.

## 1.2 NASTANEK IN DELITEV OFC

Da bi razumeli nastanek OFC, moramo poznati embriološki razvoj obraza in ustne votline. V četrtem tednu nosečnosti (t. n.) je oblikovana prvotna ustna votlina, ki jo obdajajo dve mandibulni izboklini (spodaj), dve maksilni izboklini (ob strani) ter čelno-nosna izboklina (zgoraj). Izbokline se tekom razvoja med seboj zraščajo in tvorijo dele obraza ter ustne votline (4). Izbokline nastanejo iz celic nevrálnega grebena, katerih potovanje, razvoj in apoptozo nadzira vrsta hišnih genov. Ti so na molekularnem nivoju odgovorni za razvoj obraznih tkiv. V primeru, da so geni premalo izraženi ali da nastajajo okvarjeni proteini, ni ustreznih signalov za dokončno diferenciacijo in razvoj obraznih tkiv. Nadaljnji razvoj obraza in ustne votline poteka od petega do desetega t. n. (5, 6, 7). V šestem t. n. se z združitvijo čelno-nosne izbokline in maksilnih izboklin razvijejo nos, nosnici, zgornja ustnica ter prvotno nebo. Formiranje dokončnega neba poteka v osmem t. n., ko se nebni izboklini zraščata s prvotnim nebom in nosnim pretinom (6, 7).



Slika 1: Prikaz embrionalnega razvoja obraza in ustne votline (povzeto po 15)

Če se izbokline nepravilno zraščajo, pride do nastanka razvojnih napak, ki jih označimo kot orofacialne shize. Pri razvoju prvotnega neba lahko pride do nepravilnega zraščanja maksilne in srednje nosne izbokline. Tako nastaneta **heiloshiza** (razcepljena zgornja ustnica) in **gnatoshiza** (razpoka zgornje čeljusti med zgornjo dvojko in trojko). Med razvojem dokončnega neba lahko pride do neustreznega zraščanja nosnega pretina in nebni izboklin. V tem primeru nastane **palatoshiza** (razcepljeno trdo in mehko nebo). V najhujšem primeru je razcepljeno trdo in mehko nebo, zgornja čeljust in ustnica – **heilognatopalatoshiza**. Razcepi so lahko enostranski (*ang. unilateral*) ali dvostranski (*ang. bilateral*) (4). Pojem orofacialna shiza predstavlja kakršen koli razcep v strukturah obraza in ustne votline. Najpogostejši so razcepi ustnic in neba, zato jih najpogosteje raziskujejo. OFC lahko anatomsko razdelimo na tiste z razcepom neba (*ang. Cleft palate ali CP*), ki imajo razcepljeno trdo in mehko nebo, na tiste z razcepljenim primarnim nebom in ustnico ali samo z razcepljeno ustnico (*ang. Cleft lip with or without cleft palate ali CLP*). OFC glede na prisotnost drugih kongenitalnih anomalij delimo na sindromske ali nesindromske oblike. **Sindromske (30 %)** se pojavljajo skupaj z drugimi strukturnimi in/ali funkcionalnimi prirojenimi nepravilnostmi. **Nesindromske (70 %)** so tiste oblike, pri katerih posamezniki nimajo drugih fizičnih ali razvojnih anomalij (8).

Študije nesindromskih orofacialnih shiz v Evropi in Združenih državah Amerike so pokazale, da je najpogostejša oblika orofacialnih shiz unilateralno razcepljena ustnica z razcepljenim nebom in zajema 30–35 % OFC. Izolirano razcepljena ustnica in izolirano razcepljeno nebo zajemata med 20 % in 25 % shiz. Najredkejša oblika, ki predstavlja 10 % shiz, je bilateralno razcepljena ustnica z razcepljenim nebom. Znotraj populacije s CLP je približno 80 % unilateralnih in 20 % bilateralnih razcepov (9). V Sloveniji so podatki o pojavnosti različnih oblik shiz za bolnike, rojene med letoma 1993 in 2012, naslednji: najpogostejša oblika OFC je palatoshiza ali CP, ki se pojavlja pri 46 % bolnikov, sledita heilognatopalatoshiza (pri 30,5 %) in heilo-ter-heilognatoshiza (22 % bolnikov), 1,5 % otrok pa ima OFC netipične oblike. Od shiz, ki vključujejo razcepljene ustnice, je razmerje med levostranskimi, desnostranskimi in obojestranskimi oblikami 1,56 : 1 : 0,78 (2).

### **1.3 KLASIFIKACIJA OFC**

Poznamo različne klasifikacijske sisteme, ki so nastajali tekom časa. Sistemi za klasifikacijo orofacialne shize temeljijo na morfologiji razcepljenih ustnic in neba (10). Svetovna zdravstvena organizacija (*ang. World Health Organisation, WHO*) je razvila mednarodno klasifikacijo bolezni (*MKB, ang. International Classification of Diseases ali ICD*). Gre za kodiran mednarodni sistem klasifikacije bolezni, ki omogoča boljšo sledljivost diagnoz v zdravstvenih kartotekah po celem svetu. Danes je na voljo že enajsta izdaja (*ICD – 11*), ki je dostopna preko spletne strani <https://icd.who.int/browse11/1-m/en>. V Sloveniji je trenutno v uporabi posodobljena avstralska modifikacija desete revizije mednarodne klasifikacije bolezni in sorodstvenih zdravstvenih problemov za statistične namene (*MKB-10-AM, verzija 6*). Ta uvršča stanje orofacialne shize v poglavje 17 pod prirojene malformacije, deformacije in kromosomske nepravilnosti (kodirano: Q00-Q99) (11). Nadaljnja razdelitev je prikazana spodaj.

#### **RAZCEP USTNICE IN RAZCEPLJENO NEBO (Q35–Q37)**

**Izključeno:** Robinov sindrom (Q87.06)

#### **Q35: RAZCEPLJENO NEBO**

**Vključeno:** fisura neba palatoshiza; **izključeno:** razcep neba in ustnice (Q37.-)

- **Q35.1:** razcepljeno trdo nebo,
- **Q35.3:** razcepljeno mehko nebo,

- **Q35.5:** razcepljeno trdo in mehko nebo,
- **Q35.7:** razcepljen jeziček (bifidna uvula),
- **Q35.9:** razcepljeno nebo, neopredeljeno.

### **Q36: RAZCEP USTNICE**

**Vključeno:** heiloshiza, prirojena fisura ustnice, zajčja ustnica; **izključeno:** razcep ustnice in neba (Q37.-)

- **Q36.0:** obojestranski razcep ustnice,
- **Q36.1:** razcep ustnice, medialni,
- **Q36.9:** enostranski razcep ustnice.

### **Q37: RAZCEPLJENO NEBO Z RAZCEPOM USTNICE**

- **Q37.0:** razcepljeno trdo nebo z obojestranskim razcepom ustnice,
- **Q37.1:** razcepljeno trdo nebo z enostranskim razcepom ustnice,
- **Q37.2:** razcepljeno mehko nebo z obojestranskim razcepom ustnice,
- **Q37.3:** razcepljeno mehko nebo z enostranskim razcepom ustnice,
- **Q37.4:** razcepljeno trdo in mehko nebo z obojestranskim razcepom ustnice,
- **Q37.5:** razcepljeno trdo in mehko nebo z enostranskim razcepom ustnice,
- **Q37.8:** neopredeljeno razcepljeno nebo z obojestranskim razcepom ustnice,
- **Q37.9:** neopredeljeno razcepljeno nebo z enostranskim razcepom ustnice (11, 12).

Zaenkrat nobeden od klasifikacijskih sistemov za orofacialne shize ni idealen. Vsak sistem ima svoje prednosti in slabosti. Problem je predvsem nenatančna razdelitev subfenotipov OFC. V primeru natančnejše razdelitve subfenotipov pa so klasifikacijski sistemi težji za uporabo (13).

## **1.4 DEJAVNIKI TVEGANJA**

Etiologija OFC je multifaktorska, kar pomeni, da so v nastanek shiz vpleteni različni genetski, pa tudi demografski in okoljski dejavniki. Z identifikacijo vpletenih faktorjev lahko vplivamo na znižanje pojavnosti te anomalije (1). V primeru sindromskih OFC so dejavniki



tveganja dobro poznani, nesindromske oblike OFC pa imajo še danes neznano etiologijo, ki je domnevno splet delovanja več genetskih, demografskih ter okoljskih dejavnikov tveganja (14).

#### **1.4.1 Demografski dejavniki tveganja**

Najpomembnejši demografski dejavniki tveganja so **spol, rasa in starost staršev ob porodu**. Pojavnost OFC se med spoloma razlikuje. Pri dečkih je pogostost CLP večja kot pri deklicah (2 : 1), medtem ko je razmerje pojavnosti za CP 3 : 2 za deklice (14). Obstajajo razlike med posameznimi etničnimi skupinami (9). Podatki za slovensko populacijo so podobni svetovnim. Pri dečkih je pojavnost CLP pogostejša kot pri deklicah. Natančneje, razmerje za heiloshizo in heilognatoshizo je 1,3 dečka na eno deklico, za heilognatopalatoshizo pa 1,8 dečka na eno deklico (CLP). Palatoshize ali CP so bolj pogoste pri deklicah. Spremembe v pojavnosti med leti kažejo na to, da so se v zadnjih dvajsetih letih začele pri deklicah pogosteje pojavljati oblike shiz, ki načeloma prevladujejo pri dečkih (2).

S študijami, izvedenimi po celem svetu, so dokazali, da se pojavnost shiz bistveno razlikuje med rasami. Najvišje tveganje je v populaciji Azijcev in ameriških domorodcev (1/500). Pri kavkazijski rasi je pojavnost anomalije srednja (1/1000), v afriški populaciji pa najnižja (1/2500) (15). Študija, izvedena najbližje naši državi, je bila na Hrvaškem med letoma 1988 in 1998. Dokazali so pojavnost orofacialnih shiz pri 1,717 otroku na 1000 rojstev (16). Pojavnost shiz se med državami znotraj posameznih ras lahko razlikuje (17).

Študije, ki proučujejo vpliv materine starosti na pojav OFC pri otrocih, nimajo enakih rezultatov. Po eni strani je tveganje za matere, stare med 25 in 29 let, manjše kot za starejše od 29 let. Z višanjem starosti matere se tveganje za nastanek OFC povečuje (14, 18). Po drugi strani pa Baird in sodel. niso dokazali značilne povezave med starostjo matere in povečanim tveganjem za nastanek shiz (19). Z novejšimi študijami so dokazali povezavo med starostjo očetov in mater s pojavnostjo OFC. S starostjo se tveganje v obeh primerih povečuje. Višja starost očeta in matere je povezana z večjim tveganjem za nastanek CLP, samo višja starost očeta pa z višjim tveganjem za nastanek CP (20, 21, 22).

#### **1.4.2 Okoljski dejavniki tveganja**

Okoljski dejavniki tveganja so velikokrat povezani tudi z geografsko lego. Ljudje v različnih delih sveta so glede na svojo kulturo in navade različno izpostavljeni okoljskim dejavnikom tveganja, kot so kajenje, alkohol, prehrana in življenjski slog (1). Glavni okoljski dejavniki

tveganja so **kajenje, alkohol, zmanjšan vnos folne kisline, debelost, stres, znižan nivo cinka v krvi ter povišana telesna temperatura v nosečnosti** (23).

**Uživanje alkohola** med nosečnostjo zviša tveganje za nastanek OFC. Pri kroničnem popivanju in uživanju pijač z višjo vsebnostjo alkohola (žgane pijače) je tveganje večje kot pri občasnem uživanju alkohola v manjših količinah (24, 25, 26). Kombinacija alkohola z drugimi faktorji tveganja (kajenje, zdravila, socialno-geografski faktorji, genetsko ozadje) še poveča možnost za nastanek OFC (1). **Kajenje** je največji faktor tveganja za nastanek shiz (23). Leite in sodel. zaključujejo, da kajenje v prvem trimesečju nosečnosti ni statistično značilno povezano z nastankom OFC, medtem ko ostale študije kažejo statistično značilno povezavo. Pri otrocih kadilk je večje tveganje za nastanek CLP kot za CP (24). Obstajajo študije, ki kažejo značilno povezavo med pasivnim kajenjem in povečanim tveganjem za OFC (27).

**Jemanje folne kisline** pred in med nosečnostjo naj bi zmanjšalo tveganje za pojav shiz, vendar rezultati študij niso enotni. Nekatere študije kažejo morebitno povezavo z znižanjem tveganja za nastanek anomalij. Preventivni vpliv je odvisen tudi od tipa shiz in odmerka folne kisline (28, 29, 30). Študije so pokazale, da je **znižana koncentracija cinka** v materini krvi povezana z višjim tveganjem za nastanek OFC (31). **Vnos vitaminov** v nosečnosti je inverzno povezan s tveganjem za CLP. Večji je vnos vitaminov med nosečnostjo, manjši je rizik za pojav shiz v primeru določenega genotipa (32).

Zvišano tveganje za nastanek OFC je pri jemanju **zdravil**, kot so antiepileptiki, bronhodilatatorji, retinojska kislina in nekateri kortikosteroidi (14, 15). Bronhodilatatorje uporabljamo za zdravljenje astme in kronične obstruktivne pljučne bolezni. Obstaja statistično značilna povezava med uporabo bronhodilatatorjev v nosečnosti ter zvišanim tveganjem za CL. Še vedno ni čisto jasno, ali je ta povezava posledica uporabe zdravil, resnosti bolezni ali obojega (33). Kortikosteroidi se zaradi svojega protivnetnega delovanja uporabljajo za zdravljenje številnih bolezni, kot so npr. astma, alergijske reakcije, psoriaza, revmatoidni artritis, kronična vnetna črevesna bolezen in druge. Povezava med njihovo uporabo in povečano pojavnostjo shiz še vedno ni potrjena. Raziskave ne dajejo enakih rezultatov, večinoma povezava statistično ni značilna (34, 35). Uporaba antibiotikov med nosečnostjo je vprašljiva. Rezultati študij niso enotni (9). Splošna uporaba antibiotikov v zgodnji nosečnosti ni velik faktor tveganja za pojav OFC. Problematične so določene vrste antibiotikov v kritičnem obdobju zgodnje nosečnosti, ki lahko povečajo rizik za nastanek

CLP in CP (doksiciklini, tetraciklini, sulfametizol, trimetoprim) (36). Dokazana je povezava med OFC in uporabo amoksisicilina v zgodnji nosečnosti (37). Uporaba antiepileptikov, kot so valprojska kislina, karbamazepin in lamotrigin, med nosečnostjo povečuje tveganje za OFC (38, 39). Pri predpisovanju zdravil med nosečnostjo ter pri doječih materah morajo biti zdravniki zelo pazljivi, kljub temu pa se uporabi nekaterih zdravil ne morejo izogniti. Upoštevati je potrebno tudi materino zdravstveno stanje.

**Sladkorna bolezen in debelost** (ITM > 30) posamezno ali v kombinaciji povečujeta tveganje za nastanek OFC (14, 15, 40). **Povišana telesna temperatura** matere v začetnih mesecih nosečnosti je povezana s povečanjem tveganja za nastanek shiz (41). Nosečnice so lahko izpostavljene dejavnikom tveganja v delovnem okolju, to so sevanje (radiacija), izpostavljenost visokim temperaturam, kemičnim snovem (npr. organska topila), pesticidom, elektromagnetnemu valovanju ter drugim (1). Še vedno obstaja potreba po dodatnih študijah, ki bodo z veliko verjetnostjo dokazale vpliv okoljskih dejavnikov na tveganje za nastanek shiz.

### 1.4.3 Genetski dejavniki tveganja

Genov, ki so vpleteni v nastanek OFC, je veliko. Kljub številnim raziskavam vseh še vedno niso identificirali in raziskali. Identifikacija genov, odgovornih za nastanek OFC, je ključna za razlago patogenih mehanizmov v razvoju nepravilnosti in omogoča nadzor ter preprečitev njihovega nastanka v prihodnosti. Študije ocenjujejo, da se število vpletenih genov giblje med 3 in 14. Zadnje čase ugotavljajo, da so za razlago etiologije OFC pomembne interakcije med vpletenimi geni (42).

Večina OFC (70 %) je **nesindromskih**. Njihova etiologija je zelo kompleksna oziroma multifaktorska. To pomeni, da nastanejo zaradi spleta številnih genetskih in okoljskih dejavnikov. Nesindromske oblike nimajo jasno prepoznavnega vzorca dedovanja, zato etiologija večine shiz ni dobro poznana, in vse primere tovrstnih shiz uvrščamo med nesindromske OFC. Zaradi zapletene etiologije je njihovo genetsko ozadje slabše znano kot pri sindromskih oblikah (43). Odkrili so številne gene in kromosomske regije, katerih spremembe so povezane s povečanim tveganjem za nastanek nesindromskih OFC. Sem spadajo določene regije na kromosomih 1, 2, 4, 6, 14, 17 in 19, ki nosijo zapis za različne gene. Od genov v omenjenih regijah so najbolj znani rastni faktorji (*TGFA* ali *transformirajoči rastni faktor alfa*, *TGFB3* ali *transformirajoči rastni faktor beta 3*), transkripcijski faktorji (*MSX1* ali *MSH* hišni gen 1, *TBX22* ali *T-box* transkripcijski faktor,

*IRF6* ali interferon regulirajoči faktor 6), geni, vpleteni v metabolizem ksenobiotikov (*CYP1A1* ali citokrom P450 1A1, *GST* ali glutation S-transferaza, *NAT2* ali N-acetil transferaza 1), geni, vpleteni v metabolizem nutrientov (*MTHFR* ali metilentetrahidrofolat reduktaza, *RARA* ali receptor za retinojsko kislino alfa) in geni, vpleteni v imunski odziv (*PVRL1*) (44). Najmočnejša in najpomembnejša povezava med nesindromskimi OFC je dokazana za gen *IRF6*. Ta je bil predhodno identificiran kot vzročni gen za Van der Woudeov sindrom (ang. *Van der Woude syndrome* ali *VWS*). Študije so opredelile, da je prispevek genetskih variacij v *IRF6* k razvoju nesindromskih OFC 12 % (45, 46, 47, 48). Prvi polimorfizem v genu *IRF6*, ki so ga povezali z OFC, je rs2235371. Polimorfizem povzroči zamenjavo aminokislina valin z izolevcinom na mestu 274 (V274I). V evropski in afriški populaciji je frekvenca nemutiranega alela skoraj 100 %, zato je polimorfizem rs2235371 malo verjetno etiološki vzrok za OFC (42).

Približno 30 % shiz je **sindromskih** in se pojavljajo skupaj z enim ali več sindromi. Takšnih sindromov je več kot 400. Sindromske oblike navadno predstavljajo mendelske vzorce dedovanja, ki omogočajo identifikacijo vzročnih genov (45, 49). Najbolj znani sindromi, pri katerih se pojavljajo OFC, so Van der Woudeov sindrom, sindrom poplitealnega ptergija (ang. *Popliteal pterygium syndrome* ali *PPS*), Pierre Robinova sekvenca, Treacher-Collinsonov sindrom, Patauov sindrom (trisomija 13) in Edwardsov sindrom (trisomija 18). Gre za avtosomno recesivne sindrome in kromosomske nepravilnosti. Najpogostejša oblika sindromskih OFC je Van der Woudeov sindrom (VWS) (8).

#### **1.4.4 Interakcija med okoljem in geni**

Študije dvojčkov v primerih OFC so pokazale, da je konkordanca ali ujemanje med enojajčnimi dvojčki med 40 % in 60 %, medtem ko je pri dvojajčnih dvojčkih ujemanje le 5 %. Zaradi odsotnosti 100 % ujemanja okolja in genov med enojajčnimi dvojčki so zaključili, da etiologija OFC izhaja iz kombinacije okoljskih in genetskih dejavnikov. Obstaja povezava med kajenjem in naslednjimi geni: *TGFA*, *MSX1*, *TGFB3*, *RARA*, *CYP P450* (ali citokrom P450), *GST* in *EPHX1* (ali epoksid hidrolaza 1). Prekomerno uživanje alkohola je povezano z geni *TGFA*, *MSX1* in *TGFB3* (49). Dokazali so interakcijo med kajenjem matere in genoma *GST* in *NOS3* (ali dušikov oksid sintaza), ki sodelujeta v določenih razstrupljevalnih metaboličnih poteh. Določene genetske variante v *IRF6* in kajenje matere vplivajo na nastanek CLP. Ista študija potrjuje interakcijo med vnosom multivitaminov

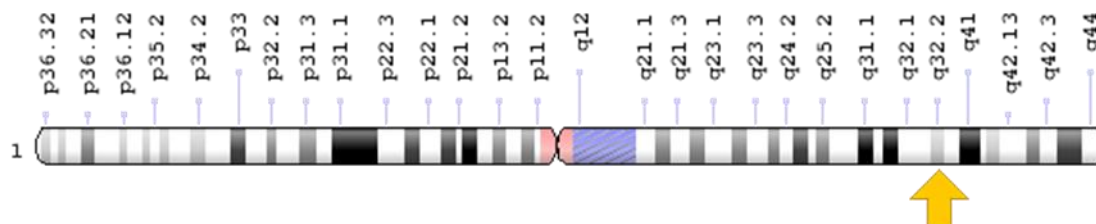
tekom nosečnosti in genetskimi variantami v genu *IRF6*. Zaključki omenjenih študij dokazujejo, da je interakcija med geni in okoljskimi vplivi pomembna za nastanek OFC (15).

## 1.5 *IRF6*

Interferon regulirajoči faktor 6 (*ang. Interferon Regulatory Factor 6 ali IRF6*) je gen z zapisom za protein, ki ima odločilno vlogo v zgodnjem embrionalnem razvoju. Protein je transkripcijski faktor, kar pomeni, da se veže na specifične regije DNA in uravnava izražanje določenih genov (50). Spada v družino interferon regulirajočih transkripcijskih faktorjev – (*ang. Interferon Regulatory Factor Family ali IRF družina*). Družina je sestavljena iz devetih transkripcijskih faktorjev (*IRF 1–9*), večinoma vpletenih v imunski odziv. Za razliko od ostalih *IRF*, *IRF6* ni vpleten v prirojeno imunost, ampak v normalen razvoj in diferenciacijo epidermisa (51). Protein je aktiven predvsem v celicah, odgovornih za razvoj tkiv glave in obraza. Vpleten je tudi v razvoj drugih delov telesa, kot sta koža in genitalije (50).

### 1.5.1 Struktura in funkcija *IRF6*

Gen *IRF6* se nahaja na kromosomu 1. Njegova citogenetska lokacija je 1q32.2, kar pomeni, da leži na daljši ročici kromosoma 1, na poziciji 32.2. Molekularna lokacija na kromosomu 1 je od 209,785,623 do 209,806,175 baznega para (50). *IRF6* je sestavljen iz devetih eksonov s start kodonom v eksonu 3 in stop kodonom v eksonu 9. Gen se izraža v možganih, očeh, srcu, jetrih, pljučih, placenti, koži, na jeziku ter v testisih (52).



Slika 2: Položaj gena *IRF6* na kromosomu 1, označen z rumeno puščico (povzeto po: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/IRF6#location>, dostopno: avgust, 2018)

Protein *IRF6* je sestavljen iz 467 aminokislin (53). V kristalni strukturi ima N-terminalno domeno za vezavo na DNA, ki jo sestavlja pet relativno dobro ohranjenih ponovitev, bogatih s triptofanom. Domena tvori strukturo heliks-zavoj-heliks, ki prepozna DNA sekvence, znane kot interferon stimulirajoči odzivni element (*ang. IFN – stimulated response element ali ISRE*). C-terminalne regije *IRF* proteinov so bolj variabilne in so odgovorne za interakcijo z drugimi *IRF* družinskimi člani, drugimi transkripcijskimi faktorji ali kofaktorji (51, 52).

C-terminalna domena je stikalo med aktivacijo in represijo, ki je regulirano s fosforilacijo. Stikalo je močno občutljivo na mutacije. IRF6 se kot transkripcijski faktor nahaja večinoma v citoplazmi in le redko v jedru. Za ustrezno delovanje proteina je ključna domena za vezavo na DNA. V primeru mutacij je zmanjšana afiniteta za vezavo na DNA, kar se kaže kot zmanjšano delovanje transkripcijskega faktorja (53).

*IRF6* je v embrionalnem razvoju zelo pomemben. Sodeluje pri razvoju glave in obraza, poleg tega še pri razvoju nekaterih drugih tkiv. Izražanje *IRF6* je prisotno tudi pri odraslih, in sicer v nosečnosti ter pri celjenju ran. Pri študijah na miših so ugotovili, da se pri tistih z zmanjšanim izražanjem *IRF6* pojavljajo okvare pri razvoju kože, okončin ter oblikovanju glave in obraza. Pri miših brez izražanja *IRF6* so opazili debelejši epidermis, keratinociti pa se niso dokončno diferencirali. Zaključujejo, da je IRF6 ključni transkripcijski regulator epidermalne diferenciacije (52, 54). Epidermis pri miših z zmanjšano ekspresijo funkcionalnega IRF6 je hiperproliferativen in nima normalne dokončne diferenciacije. IRF6 je nedvoumno ključen faktor za regulacijo preklopa med proliferacijo in diferenciacijo keratinocitov (55). Regulacija ravnotežja med proliferacijo in diferenciacijo je zapleten proces, v katerega so vpleteni številni geni (*Sfn* ali *stratifin*, *Ikka* ali *inhibitor nuklearnega faktorja kappa B*, *Rip4* ali *receptorsko intereagirajoča serin-treonin protein kinaza 4*). IRF6 je represor proliferacije in promotor diferenciacije, ki je nujen, a ne zadosten za dokončno diferenciacijo keratinocitov (56). Mutacije v genih *p63* (*tumor protein 63*) in *IRF6* so eden glavnih vzrokov za nastanek CLP. Negativna povratna zanka med IRF6 in p63 je ključnega pomena za razvoj neba. p63 je odgovoren za vzdrževanje proliferacije, medtem ko je IRF6 promotor diferenciacije epidermisa. Tumor supresor p63 se veže na IRF6 ojačevalec (*ang. enhancer*) in na ta način stimulira ekspresijo genov. Medtem IRF6 negativno regulira nivo p63, zato omejuje rast keratinocitov. V primeru mutacij je rezultat prekomerna proliferacija in pomanjkljiva diferenciacija keratinocitov (57, 58, 59). IRF6 vpliva tudi na migracijo keratinocitov. To ima pomembno vlogo pri embrionalnem razvoju neba in pri celjenju ran. Bolniki z VWS, ki imajo mutiran *IRF6* gen, imajo težave s celjenjem ran (60). *IRF6* se izraža tudi med nosečnostjo v proliferajočih mlečnih epitelijskih celicah. V sodelovanju s serinskimi proteinaznimi inhibitorji in tumor supresorskimi geni *maspin* (inhibitor serinske proteaze ali *ang. mammary serine protease inhibitor*) regulira celično proliferacijo. Preko svoje interakcije z *maspin* lahko IRF6 deluje kot tumor supresor. Izguba *maspin-IRF6* interakcije lahko promovira neoplastično transformacijo. Ekspresija *IRF6* inverzno korelira z invazijo raka dojk (52, 61, 62).

### 1.5.2 Povezava *IRF6* s kliničnimi stanji

Mutacije v genu *IRF6* povzročajo dva alelska avtosomno dominantna sindroma, Van der Woudeov sindrom in sindrom poplitealnega ptergija. Zadnje študije kažejo še na povezavo z nastankom **nesindromskih oblik OFC** ter povezavo med *IRF6* in geni, vpletenimi v formacijo zob.

**Van der Woudeov sindrom** (VWS) je najpogostejša sindromska oblika OFC, ki zajema 2 % vseh shiz. Sindrom se pojavlja pri enem od 35.000 do 100.000 ljudi. Po klinični manifestaciji se VWS najbolj približa nesindromskim oblikam OFC. Klinični znaki so kongenitalni razcepi spodnjih ustnic, CLP, CP, razcepljen jeziček (*ang. Bifid uvula*) in hipodontije. CLP se pojavlja pri 50 % posameznikov z VWS (45, 47, 63, 64, 65, 66). VWS se deduje avtosomno dominantno z visoko penetranco (96,7 %) in variabilno ekspresijo (65). Vzrok za nastanek VWS so mutacije na kromosomski lokaciji **1q32-q41** (VWS1), kjer se nahaja gen *IRF6* (1q32.2). Druga, manj pogosta lokacija, je lokus 1p34 (VWS2), ki je povezan z genom *GRHL3* (*ang. Grainyhead-like transcription factor 3*) (1). Zelo pomembno odkritje je, da je *IRF6* vzročno povezan z VWS, poleg tega pa tudi z nesindromskimi OFC (47).

**Sindrom poplitealnega ptergija** (PPS) je avtosomno dominantna motnja, ki se pojavlja pri enem od 300.000 ljudi. Večina bolnikov ima izraženo CP ali CLP. Poleg anomalij, ki se pojavljajo pri VWS, se pri tem izražajo še membrana v kolenski kotanji, oralne sinehije, adhezije med vekami, zraščanje prstov na nogah in rokah ter genitalne anomalije. Tudi PPS je povezan s kromosomsko lokacijo **1q32-1q41**, kjer se nahaja gen *IRF6*. Mutacije v genu *IRF6* so vzrok za nastanek obeh sindromov. Posledica mutacij je haploinsuficienca *IRF6*, ki moti normalen razvoj obraznih tkiv (66). Sem prištevamo tako drugačnosmiselne (*ang. missense*) kot tudi nesmiselne (*ang. nonsense*) mutacije. Mutacije na domeni za vezavo na DNA ter na domeni za vezavo na proteine povzročijo izgubo funkcije proteina in posledično neustrezen razvoj obraznih tkiv (64, 66).

**Neformacija zob** je pogosta anomalija, ki se pojavlja skupaj s fenotipom OFC. Študije povezujejo gen *IRF6* s pojavom neustrezne formacije zob (67, 68). Kasneje so raziskali interakcijo med genom *IRF6* in glavnim genom, odgovornim za neformacijo zob, *TGFA*. Študije na miših so dokazale, da je izražanje *TGFA* odvisno od izražanja *IRF6*, kar povzroča sočasno pojavljanje obeh anomalij (42).

**Pierre Robinova sekvenca** (*ang. Pierre Robin sequence ali PRS*) je prirojena nepravilnost, pri kateri imajo novorojenčki manjšo spodnjo čeljust (*ang. micrognathia*), nazaj pomaknjen jezik (*ang. glossoptosis*) in CP. PRS se pojavlja samostojno ali v približno 37 % v kombinaciji z drugimi sindromi. Nastanek anomalije povezujejo z genom *SOX9*. PRS nastane zaradi zaporedja dogodkov. Zaradi prehitre rasti spodnje čeljusti v embrionalnem razvoju se jezik pomakne bolj nazaj. Ko se spodnja čeljust neustrezno razvija, nazaj pomaknjen jezik prepreči zraščanje neba, kar rezultira v nastanku CP (13).

Zuccero in sodel. so bili prvi, ki so potrdili povezavo gena *IRF6* s pojavnostjo **nesindromskih OFC**. Ocenjujejo, da mutacijam v *IRF6* lahko pripišemo 12 % tveganje za nastanek OFC. Tveganje za pojav OFC med brati in sestrami iz družin z zgodovino OFC je 9 %. Zato predlagajo, da bi genotip *IRF6* uporabili za genetsko svetovanje (69). Značilno povezavo med *IRF6* in nesindromskimi CLP so dokazali v številnih populacijah po svetu (Italija, Belgija, ZDA, Tajska, Tajvan, Singapur, Koreja, Norveška), kar lahko pojasni 12–18 % vseh nesindromskih CLP (70, 71, 73, 74). Izjema je študija Pegelowa in sodel. na Švedskem, kjer povezave niso potrdili. Možna razloga za to sta raznolikost med populacijami in premajhen vzorec preiskovancev, vključenih v raziskavo (75).

### 1.5.3 Najpogostejši preučevani polimorfizmi *IRF6*

V preteklosti so v študijah bolezni preučevali predvsem drugačnosmiselne mutacije (*ang. non-synonymous mutation*), ki povzročijo spremembo v aminokislinskem zaporedju. Zadnje čase znanstveniki ugotavljajo, da so lahko povzročitelji bolezni tudi nepomenske (*ang. synonymous*) mutacije, včasih znane kot tihe. Pomembne so tudi mutacije v intronskih, nekodirajočih delih genskega zapisa. Prišli so do zaključka, da takšni polimorfizmi vplivajo na stabilnost mRNA in na zvijanje proteina ter posledično na njegovo funkcijo (76).

Glede na literaturo so najpogostejši preučevani polimorfizmi v genu *IRF6* v povezavi z OFC naslednji: rs2235371, rs2013162, rs2235375 in rs642961. Zuccero in sodel. so bili eni prvih, ki so identificirali *IRF6* kot kandidatni gen, vpleten v nastanek nesindromskih CLP. V študiji so se osredotočili na polimorfizem **rs2235371** (V274I) in dedovanje predniškega alela pri pacientih z nesindromskimi CLP v azijski populaciji. Ugotovili so, da polimorfizem rs2235371 sam po sebi verjetno ni vzročen. Bolj verjetno je, da se deduje vezano z drugimi mutacijami v *IRF6* ali njegovi bližini. Temu rečemo vezavno neravnovesje (*ang. linkage disequilibrium*). Za vezavno neravnovesje je odgovornih več mutacij, ki se med populacijami razlikujejo. Za to, da je biološki učinek viden, v tem primeru OFC, je potrebna



specifična kombinacija mutacij na kromosomu. Analize napovedujejo, da k nastanku shiz prispeva 3–6 glavnih genetskih lokusov (69). To teorijo potrjujejo nedavno izvedene študije na različnih populacijah (npr. Blanton, Scapoli, tudi drugi) (70, 71). Mutirani alel I je zelo redek ali celo odsoten pri Afričanih in Evropejcih. Zato bolj pogostega alela V divjega tipa ne moremo povezovati neposredno z bolezenskim stanjem. Obstaja pa možnost, da pri določeni kombinaciji z drugimi mutacijami predstavlja faktor tveganja za nastanek nesindromskih orofacialnih shiz (71, 72). Posamezne mutacije in kombinacije mutacij, odgovorne za razvoj anomalije, se razlikujejo od populacije do populacije (70, 72).

V študiji, izvedeni na italijanski populaciji pacientov z nesindromskimi oblikami CLP, so opazovali štiri izbrane polimorfizme rs1319435, rs2013162, rs2235375 in rs2235543. Značilno vezavno neravnovesje so dokazali za polimorfizma rs2013162 in rs2235375. Pogostejši alel se v obeh primerih prenaša na pacienta z nesindromskimi CLP. Redkeje pojava alel je negativno povezan s pojavnostjo bolezni (71). Glede na to, da je študija Scapolija in sodel. nam najbližje izvedena, lahko predvidevamo, da obstaja velika verjetnost za pojav omenjenih dveh polimorfizmov tudi v slovenski populaciji.

## 2. NAMEN

Orofacialne shize so zelo pogoste razvojne nepravilnosti, ki predstavljajo veliko težavo pri obolelih posameznikih. Poleg estetskega videza imajo otroci z OFC težavo tudi pri požiranju, razvoju govora in vključevanju v družbo. S tega stališča je potrebnih veliko strokovnjakov, ki tem otrokom pomagajo na poti do boljšega in bolj kvalitetnega življenja. Za nastanek anomalij je poleg okoljskih in demografskih dejavnikov tveganja odgovornih več genov, ki nosijo zapis za proteine, ki so vpleteni v embrionalni razvoj obraznih tkiv. Do danes je bilo izvedenih veliko raziskav, ki so odkrile povezavo številnih genov z nastankom OFC. Ena najmočnejših povezav je dokazana med genom *IRF6* in OFC.

**Namen našega magistrskega dela je:**

1. s sekvenciranjem ugotoviti prisotnost mutacij v kodirajočih regijah gena *IRF6* in njihovi neposredni bližini pri 24 bolnikih s pozitivno družinsko anamnezo orofacialnih shiz;
2. s sodobnimi genotipizacijskimi metodami določiti genotip preostalim družinskim članom, za katere imamo na voljo vzorce DNA, izolirane iz brisa bukalne sluznice;
3. raziskati, ali se genotipi ujemajo s fenotipom pri obolelih in zdravih članih družine z družinsko anamnezo OFC;
4. ugotoviti patogeni potencial posameznih ugotovljenih mutacij za pojav orofacialnih shiz *in silico*, pri čemer si bomo pomagali z različnimi bioinformatičnimi orodji v sklopu baze Ensembl.

Na ta način bomo preverili prisotnost mutacij v genu *IRF6* v populaciji bolnikov s pozitivno družinsko anamnezo OFC in v njihovih družinah ter s tem naredili manjšo študijo za slovensko populacijo. Mutacije, odkrite v preiskovani skupini 24 družin s pozitivno anamnezo OFC, bodo dobra osnova za nadaljnje funkcijske in populacijske študije.

## **3. MATERIALI in METODE**

### **3.1 VZORCI PREISKOVANCEV**

Za genetsko analizo smo kot biološki vzorec uporabili DNA, izolirano iz brisov bukalne sluznice. V študijo smo vključili 24 otrok z OFC (C1), od tega 16 moških in osem žensk, ter njihove sorodnike: mama (M), oče (F), sorojenci (C2, C3), ostali sorodniki (UN-stric, GM-babica). V študijo smo vključili 72 vzorcev. Družinska drevesa preiskovanih družin se nahajajo v Prilogi 1. Tam je tudi označeno, za katere družinske člane smo imeli na voljo vzorce DNA. Natančnejši opis družin se nahaja v poglavju Rezultati. Del vzorcev, ki so bili že vključeni v druge študije, je bil na voljo v obliki izoliranega DNA z izmerjeno koncentracijo. Za vzorce, ki jih je bilo premalo, ali smo jih dodatno vključili v študijo, smo izolacijo DNA naredili sami.

Vzorce smo pridobili s Kliničnega oddelka za maksilofacialno in oralno kirurgijo, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Magistrska naloga je del ARRS projekta J3-8207, katerega nosilka je prof. dr. Ksenija Geršak, UKC Ljubljana. Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko (odločba komisije za etiko: 57/02/13). Vsi udeleženci raziskave so sodelovanje potrdili s pisno privolitvijo oz. privolitvijo njihovih skrbnikov.

### **3.2 IZOLACIJA DNA IZ BRISA BUKALNE SLUZNICE**

DNA smo izolirali s pomočjo reagenčnega kompleta MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre, an Illumina® company). Gre za metodo izolacije DNA s hitrim izsoljevanjem, da odstranimo kontaminirajoče makromolekule. Postopek izolacije DNA smo naredili po protokolu, ki ga je napisal proizvajalec (77). Preskočili smo korak z uporabo encima RNAze. Naloga RNAze je razgradnja RNA, ki lahko moti merjenje koncentracije DNA na aparaturi NanoDrop®. To pomeni, da bi v prisotnosti RNA izmerili lažno višje koncentracije DNA. Ker je RNA zelo nestabilna molekula, smo se odločili, da ta korak preskočimo. Za merjenje koncentracije nukleinskih kislin smo uporabili spektrofotometer NanoDrop®. Koncentracijo DNA smo izmerili pri 260 nm, poleg tega smo preverili še čistost vzorca s kvocientom absorbance pri 260 nm in 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) ter pri 260 nm in 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ) (78).

#### **3.2.1 Material:**

- Reagenčni komplet »MasterPure™ DNA Purification Kit« (Epicentre, an Illumina® company), ki vsebuje:
  - Red Cell Lysis Solution,

- Tissue and Cell Lysis Solution,
- Proteinase K,
- MPC Protein Precipitation Reagent,
- TE Buffer;
- 1X PBS pufer (namesto Red Cell Lysis Solution),
- 96–100 % izopropanol,
- 70 % etanol,
- sterilne mikrocentrifugirke (1,5 mL, Eppendorf),
- sterilni pipetni nastavki (modri, rumeni, beli).

### 3.2.2 Oprema:

- Pipete (10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL, Eppendorf™),
- centrifuga (Centrifuge 5430 R, Eppendorf™),
- vibracijski mešalnik (Bio Vortex V1, Biosan),
- vodna kopel (WB-4MS, Biosan),
- minicentrifuga (MiniSpin™, Eppendorf™),
- spektrofotometer NanoDrop® (NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific).

## 3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Verižna reakcija s polimerazo (ang. *Polimerase chain reaction* ali PCR) je tehnika, ki se v molekularni biologiji uporablja za pomnoževanje posameznih odsekov DNA *in vitro*. Na ta način dobimo iz posamezne molekule ali nekaj molekul DNA na tisoče do milijone kopij določenega segmenta DNA, ki ga nato uporabimo za nadaljnje raziskave (79, 80). Za PCR reakcijsko zmes potrebujemo vzorec DNA, smerne in protismerne oligonukleotidne začetnike (ang. *Forward and reverse primer ali F in R*),  $Mg^{2+}$  ione, deoksinukleozidtrifosfate (dNTP), termostabilno DNA polimerazo ter ustrezen pufer. Reakcija je sestavljena iz več ciklov, od katerih je odvisno tudi končno število produktov. Navadno naredimo od 20 do 40 ciklov. Pred izvedbo prvega cikla dodamo še korak začetne denaturacije in aktivacije DNA polimeraz, po zadnjem ciklu pa korak zaključnega podaljševanja (79, 80). Vsak cikel je sestavljen iz treh stopenj, in sicer:

- **denaturacije:** s segrevanjem na 94–95 °C povzročimo ločitev verig v dvoverižni DNA (*ang. Double stranded DNA ali dsDNA*). Dobimo dve enoverižni DNA (*ang. Single stranded DNA ali ssDNA*);
- **prileganja oligonukleotidnih začetnikov:** z ohlajanjem na 40–60 °C omogočimo prileganje oligonukleotidnih začetnikov na ssDNA;
- **izgradnje komplementarne verige:** s ponovnim dvigom temperature na 72 °C pridemo v temperaturno območje, ki je optimalno za delovanje termostabilne DNA polimeraze. Polimeraza se pripne na oligonukleotidni začetnik in omogoči izgradnjo komplementarne verige iz 5' konca proti 3' koncu (79, 80).

Za vsak par oligonukleotidnih začetnikov je potrebno PCR optimizirati. Optimiziramo sestavine reakcijske zmesi: MgCl<sub>2</sub>, reakcijski puffer, DNA polimeraza, oligonukleotidni začetniki, matrica, dNTP, temperature in časi posameznih stopenj cikla in število ciklov PCR (79).

### 3.3.1 Material

- Ultra čista voda (prečiščena in avtoklavirana),
- deoksinukleozidtrifosfati (dNTP, 2 mM),
- oligonukleotidni začetniki smerni (F) in protismerni (R) za pomnoževanje kodirajočih eksonov 3, 4, 5, 6, 7, 8 in 9, SIGMA-ALDRICH
  - Ex\_3\_F: 5`-TCTAGTAGATGGGAAAGGTGGC-3`
  - Ex\_3\_R: 5`-AGCATTCTCTCTGTTTCACCAG-3`
  - Ex\_4\_F: 5`-TCTGTAAATCGGGGTGGGA-3`
  - Ex\_4\_R: 5`-AGGCTTTCTTGCTTTATCCATCT-3`
  - Ex\_4.2\_F: 5`-GGACTCACTGTGGTTTCTTGTTTC-3`
  - Ex\_4.2\_R: 5`-CTGGGTCCTTCCCAGAGAAA-3`
  - Ex\_5\_F: 5`-TGTAAGAACCTGAGGAGCC-3`
  - Ex\_5\_R: 5`-TCACCTCTGACTCCCAGTTG-3`
  - Ex\_6\_F: 5`-CTGATGGGCTGGAAGATCAC-3`
  - Ex\_6\_R: 5`-GCTAGCCAGGAAACAGAAACA-3`
  - Ex\_7\_F: 5`-CTGGTTGAAAGGTGGCTTGA-3`
  - Ex\_7\_R: 5`-TTTGCCATGCCAGGAAAGC-3`
  - Ex\_8\_F: 5`-TCAATGATGTCCAAGAGAACCC-3`
  - Ex\_8\_R: 5`-GGGCTGATGGATGCTTGATG-3`

- Ex\_9\_F: 5`-ACAGTGAGCCTTGGCAGAA-3`
- Ex\_9\_R: 5`-AGCAAAGTCTGAAGGGTGATTT-3`,
- pufer (10x PCR Gold Buffer, brez MgCl<sub>2</sub>, 5 mL, Sigma-Aldrich),
- MgCl<sub>2</sub> (MgCl<sub>2</sub> Solution; 25 Mm; 1,5 mL, Sigma-Aldrich),
- DNA polimeraza (AmpliTaq Gold, 250 Units, 5 U/μL, Sigma-Aldrich),
- HOT FIREPol® DNA Polymerase, Solis BioDyne,
- HOT FOREPol® 10x Buffer B1, Solis BioDyne,
- 25 Mm MgCl<sub>2</sub>, Solis BioDyne,
- 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load, Solis BioDyne,
- epruvete v stripih (0,2 mL), Eppendorf,
- sterilne epruvete (0,5 mL in 1,5 mL), Eppendorf,
- sterilni nastavki za pipete,
- 70 % etanol,
- hipoklorit (3 %).

### 3.3.2 Oprema

- Delovna komora z UV lučjo (DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR, Biosan),
- minicentrifuga z vrtinčastim mešalom (Combi-Spin, Biosan),
- pipete (0,5 μL, 10 μL, 20 μL, 200 μL, 1000 μL), Eppendorf™,
- centrifuga Mikro-242, tehcnica Železniki,
- PCR ciklični pomnoževalnik C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad.

### 3.3.3 Postopek

Oligonukleotidne začetnike smo komercialno dobili v liofilizirani obliki. Glede na podatke s tehničnega lista smo jim dodali ustrezen volumen ultra čiste vode, da smo dobili 100 μM raztopino. Pozneje smo pripravili še 20 μM delovno raztopino.

#### 3.3.3.1 Optimizacija verižne reakcije s polimerazo

Za potrebe študije smo optimizirali temperaturo prileganja oligonukleotidnih začetnikov, njihovo koncentracijo in koncentracijo MgCl<sub>2</sub>. Za začetek smo uporabili vnaprej načrtovano sestavo PCR reakcijske zmesi ter vnaprej pripravljen program izvedbe PCR (*Preglednica II, Preglednica III*). Pozneje smo sestavo reakcijske zmesi glede na rezultate optimizacije spremenili.

Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi PCR za en vzorec s končnim volumnom 10  $\mu\text{L}$

Sestavina	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Ultra čista voda	4,45
MgCl <sub>2</sub> Solution (1–10 mM)	1 (optimizacija)
PCR Gold Buffer (10 x)	1
Deoksinukleozidtrifosfati (2 mM)	0,5
AmpliTaq Gold (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,05
Oligonukleotidni začetnik – F (0,2–1 $\mu\text{M}$ )	0,5 (optimizacija)
Oligonukleotidni začetnik – R (0,2–1 $\mu\text{M}$ )	0,5 (optimizacija)
Vzorec DNA (146,8 ng/ $\mu\text{L}$ )/voda (slepi vzorec)	2
Skupni volumen reakcijske zmesi za en vzorec	10

Preglednica III: Program izvedbe verižne reakcije s polimerazo

Stopnja	Temperatura	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	95 °C	3 minute	1x
Denaturacija	95 °C	30 sekund	34x
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	53–68 °C Optimizacija	30 sekund	34x
Podaljševanje	72 °C	1 minuta	34x
Končno podaljševanje	72 °C	5 minut	1x

Na temperaturo prileganja oligonukleotidnih začetnikov (*ang. Annealing temperature ali  $T_a$* ) vplivata njihova dolžina in vsebnost GC. Če je  $T_a$  prenizka, pride do pomnoževanja nespecifičnih DNA fragmentov, zaradi česar se pojavljajo dodatne lise pri elektroforezi. Če je  $T_a$  previsoka, sta izkoristek in čistost produktov zaradi slabšega prileganja oligonukleotidnih začetnikov zmanjšana.  $T_a$  oligonukleotidnih začetnikov je odvisna od temperature njihovega tališča (*ang. Melting temperature ali  $T_m$* ). Večinoma je  $T_a$  začetnikov glede na  $T_m$  manj stabilnega začetnika nižja za približno 5 °C (79, 81). Za vseh sedem parov oligonukleotidnih začetnikov smo preverili nastanek produktov pri osmih različnih temperaturah (Preglednica IV). PCR smo izvedli na cikličnem pomnoževalniku C1000™

Thermal Cycler (Bio-Rad), ki ima možnost gradientne nastavitve temperatur. Temperaturni interval, ki smo ga izbrali, je bil med 53 °C in 68 °C. Naredili smo 34 ciklov PCR.

*Preglednica IV: Prikaz temperatur prileganja oligonukleotidnih začetnikov za optimizacijo PCR na gradientnem cikličnem pomnoževalniku C1000™ Thermal Cycler*

<b>Položaj na cikličnem pomnoževalniku</b>	<b>Temperatura [° C]</b>
<b>A</b>	68,0
<b>B</b>	66,9
<b>C</b>	65,1
<b>D</b>	62,4
<b>E</b>	58,9
<b>F</b>	56,4
<b>G</b>	54,4
<b>H</b>	53,0

Prosti magnezijevi ioni so kofaktor encima termostabilne DNA polimeraze. Omogočijo stabilizacijo interakcije med matrično DNA ter polimerazo, tako da se vežejo na dNTP ter jih naredijo prepoznavne za polimerazo. Na koncentracijo magnezijevih ionov poleg dNTP vplivajo še koncentracija matrice, koncentracija začetnikov ter prisotnost kelirajočih snovi. To pomeni, da mora biti v PCR reakcijski zmesi dovolj  $MgCl_2$ , da je PCR reakcija uspešna. V primeru prenizke koncentracije magnezijevih ionov je izkoristek PCR manjši. Če je koncentracija ionov previsoka, je zmanjšana točnost encima in večja stopnja nastanka nespecifičnih produktov (79, 82). V PCR reakcijski zmesi smo določili pet različnih koncentracijskih nivojev  $MgCl_2$ , ki smo jih preizkusili na vseh parih oligonukleotidnih začetnikov. Koncentracijo  $MgCl_2$  smo spreminjali s prilagajanjem volumna ultra čiste vode (*Preglednica V*). Za posamezne pare oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili temperature, ki smo jih določili pri prvem delu optimizacije. Izvedli smo 34 ciklov PCR.

*Preglednica V: Optimizacija koncentracije  $MgCl_2$  – prikaz izbranih koncentracijskih nivojev  $MgCl_2$  s spremembami volumna  $MgCl_2$  in ultra čiste vode v PCR reakcijski zmesi*

<b>Koncentracija <math>MgCl_2</math> [mM]</b>	<b>Volumen <math>MgCl_2</math> [<math>\mu</math>L]</b>	<b>Volumen ultra čiste vode [<math>\mu</math>L]</b>
<b>1,0</b>	0,4	5,05
<b>2,0</b>	0,8	4,65



<b>3,5</b>	1,4	4,05
<b>5,0</b>	2,0	3,45
<b>10,0</b>	4,0	1,45

Izbrali smo tri koncentracijske nivoje oligonukleotidnih začetnikov v PCR reakcijski zmesi, ki smo jih preizkusili na vseh parih začetnikov. Koncentracijo začetnikov smo spreminjali s prilagajanjem volumna ultra čiste vode (*Preglednica VI*). Za posamezne pare oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili temperature in koncentracije MgCl<sub>2</sub>, ki smo jih določili pri predhodnih optimizacijah. Izvedli smo 34 ciklov PCR.

*Preglednica VI: Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov – prikaz izbranih koncentracijskih nivojev za začetnike s spremembami volumna za začetnike in ultra čisto vodo v PCR reakcijski zmesi*

<b>Koncentracija oligonukleotidnih začetnikov [μM]</b>	<b>Volumen oligonukleotidnih začetnikov [μL]</b>	<b>Volumen ultra čiste vode [μL]</b>
<b>1,0</b>	0,5	4,45
<b>0,4</b>	0,2	4,75
<b>0,2</b>	0,1	4,85

Končno sestavo reakcijske zmesi in T<sub>a</sub> smo glede na rezultate optimizacije izbrali za vsak par oligonukleotidnih začetnikov (*Preglednica VII*).

*Preglednica VII: Prikaz rezultatov optimizacije PCR za posamezne pare oligonukleotidnih začetnikov*

<b>Par oligonukleotidnih začetnikov</b>	<b>T<sub>a</sub> [°C]</b>	<b>Koncentracija MgCl<sub>2</sub> [mM]</b>	<b>Koncentracija začetnikov [μM]</b>
<b>Ex_3 (F, R)</b>	62,4	2,0	0,4
<b>Ex_4 (F, R)</b>	62,4	2,0	0,4
<b>Ex_5 (F, R)</b>	62,4	2,0	1,0
<b>Ex_6 (F, R)</b>	58,9	2,0	0,2
<b>Ex_7 (F, R)</b>	62,4	2,0	0,4
<b>Ex_8 (F, R)</b>	65,1	2,0	0,2
<b>Ex_9 (F, R)</b>	65,1	2,0	1,0

Količina matrične DNA tudi vpliva na uspešnost PCR reakcije. V primeru, da je koncentracija matrične DNAprenizka, ne pride do nastanka zadostne količine produkta. Če

je koncentracija previsoka, pa lahko pride do inhibicije pomnoževanja ali večje količine nastalih nespecifičnih produktov (79). Koncentracija testne DNA je bila 146,8 ng/μL, koncentracije vzorcev, ki smo jih uporabili za raziskavo, pa veliko nižje. Količina vzorcev, ki smo jih imeli na voljo, je bila omejena. Zato smo skušali optimizirano PCR za vse pare začetnikov narediti z nizko koncentracijo testne DNA. Testno DNA smo redčili 10-krat in zmanjšali volumen v reakcijski mešanici iz 2 μL na 0,5 μL. Končna koncentracija testne DNA v PCR reakcijski zmesi je bila približno 0,7 ng/μL. Ker so bili PCR produkti po izvedeni elektroforezi lepo vidni (ustrezna koncentracija nastalih PCR produktov), smo se odločili, da bomo vzorce DNA v PCR reakcijski zmesi razredčili na koncentracijo 0,7 ng/μL.

### PCR FAZA 1

Za sekvenciranje smo potrebovali vsaj 15 μL PCR reakcijske zmesi, zato smo povečali volumen PCR reakcijske zmesi iz 10 μL na 20 μL. Končna sestava PCR reakcijske zmesi z upoštevanjem rezultatov optimizacije PCR ter spremembe končnega volumna reakcijske mešanice je prikazana v *Preglednici VIII*.

*Preglednica VIII: Sestava reakcijskih zmesi za posamezen par oligonukleotidnih začetnikov po optimizaciji in prilagoditvi končnega volumna*

Sestavina	Volumen [μL]						
	Ex3	Ex4	Ex5	Ex6	Ex7	Ex8	Ex9
Ultra čista voda	4,5	4,5	3,3	4,9	4,5	4,9	3,3
MgCl <sub>2</sub> Solution (25 Mm)	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
PCR Gold Buffer (10x)	2	2	2	2	2	2	2
dNTP (2 mM)	1	1	1	1	1	1	1
AmpliTaq Gold (5 U/μL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Oligonukleotidni začetnik – F	0,4	0,4	1	0,2	0,4	0,2	1
Oligonukleotidni začetnik – R	0,4	0,4	1	0,2	0,4	0,2	1
Vzorec DNA/voda (slepi vzorec)	10	10	10	10	10	10	10
Volumen reakcijske zmesi	20	20	20	20	20	20	20
T <sub>a</sub> [°C]	62	62	62	58	62	65	65

V prvi fazi smo naredili PCR samo na vzorcih 24 bolnikov z OFC (C1). Ustreznost koncentracije nastalih produktov smo preverili z elektroforezo. Pri delu smo naleteli na težave, saj pri elektroforezi nismo dobili vidnih lis za PCR produkte, ali pa so bile prisotne

dodatne lise krajših fragmentov. Ugotovili smo, da se je to zgodilo pri tistih vzorcih, ki so imeli zelo nizke koncentracije DNA, ter pri tistih, ki jih je bilo volumsko premalo. Po več neuspešnih ponovitvah PCR smo se odločili, da bomo povečali koncentracijo matrične DNA v PCR reakcijski zmesi iz 0,7 ng/μL na 1,4 ng/μL. Ker nam je določenih vzorcev zmanjkalo, smo PCR naredili iz predhodno neuspelega PCR. Sestava reakcijske zmesi za take reakcije je bila enaka kot v *Preglednici VIII*. Namesto ultra čiste vode smo razliko do 20 μL dopolnili z neuspelo PCR reakcijsko zmesjo.

## **PCR FAZA 2**

V drugi fazi smo naredili PCR na vzorcih bolnikov (C1) iz prve faze, v kateri smo dobili dovolj kvalitetne sekvence, ter pri njihovih sorodnikih z in brez OFC. Ustreznost koncentracije nastalih produktov smo preverili z elektroforezo. Koncentracija matrične DNA v PCR reakcijski zmesi je znašala 1,2 ng/μL. Para oligonukleotidnih začetnikov Ex\_4\_F in Ex\_4\_R nismo ustrezno načrtovali, zato smo to storili še enkrat. Z novim parom začetnikov (Ex\_4.2\_F, Ex\_4.2\_R) smo PCR ponovili na vseh vzorcih bolnikov, ki smo jih še imeli na voljo. Pri delu smo naleteli na iste težave, saj pri elektroforezi nismo dobili vidnih lis za PCR produkte. Izvedli smo več ponovitev PCR, zato nam je nekaterih vzorcev zmanjkalo. V tej fazi smo namesto DNA polimeraze AmpliTaq Gold uporabljali DNA polimerazo HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne). Ker je bil v tem primeru potreben modificiran PCR z vročim začetkom (*ang. hot start PCR*), smo temu primerno spremenili program izvedbe PCR (*Preglednica IX*). PCR reakcijske zmesi smo pripravljali enako kot prej (*Preglednica VIII*). DNA polimeraza je aktivna tudi pri nižjih temperaturah. Zato lahko pri temperaturah, nižjih od 72 °C, pride do nastanka dimerov oligonukleotidnih začetnikov ter njihovega nespecifičnega prileganja in podaljševanja. S PCR z vročim začetkom preprečimo aktivnost DNA polimeraze, dokler temperatura ne preseže  $T_m$ . Tako nastane manj nespecifičnih in več specifičnih produktov. Princip delovanja temelji na uporabi DNA polimeraze, ki se aktivira šele pri začetni denaturaciji. Ena možnost je, da uporabimo encime, ki pri nižjih temperaturah niso aktivni. Alternativa je vezava protiteles ali aptamerov na polimerazo, ki se pri povišanju temperature odcepijo iz encima in tako omogočijo njegovo aktivnost pri višjih temperaturah. Zato je korak začetne denaturacije pri PCR z vročim začetkom podaljšan na 10 do 15 minut (79, 83).

Stopnja	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija	95 °C	15 minut
Denaturacija	95 °C	30 sekund
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	53–68 °C optimizacija	30 sekund
Podaljševanje	72 °C	1 minuta
Končno podaljševanje	72 °C	5 minut

### 3.4 ELEKTROFOREZA

Izraz elektroforeza označuje tehniko, ki izkorišča potovanje nabitih delcev v električnem polju. Večina pomembnih bioloških molekul, kot so aminokisljine, peptidi, proteini in nukleinske kisline (DNA, RNA), imajo skupine, ki ionizirajo, zaradi česar obstajajo v raztopinah z različno vrednostjo pH kot kationi ali anioni. Ločevanje poteka na podlagi njihovega naboja in velikosti. Molekule potujejo po elektroforetskem nosilcu v različnih smereh in/ali z drugačnimi hitrostmi (79). Elektroforezo izvajamo v pokriti kadički za elektroforezo. Ta je sestavljena iz dveh posod za pufer, dveh elektrod (anode in katode, vsaka na eni strani posode), na sredini pa je mesto, kamor postavimo elektroforetski nosilec. V primeru negativno nabitih molekul (npr. DNA) je del elektroforetskega nosilca, ki ima vdolbine za nanašanje vzorcev na tisti strani kadičke, kjer je negativno nabita katoda. Poleg tega potrebujemo še vir enosmerne napetosti. Elektroforetske ločbe, ki potekajo do 30 minut, izvajamo pri konstantni napetosti, tiste, ki trajajo več kot 30 minut, pa pri konstantnem toku. Pod vplivom električnega toka nabiti delci potujejo proti katodi ali anodi (79, 84). Fosfatni del DNA molekule je negativno nabit, zato v električnem polju potuje proti pozitivno nabiti anodi. Vse molekule DNA imajo isto enoto naboja/maso, zato jih z gelsko elektroforezo ločimo glede na velikost (85).

#### 3.4.1 Material

- Tris-acetat-EDTA (TAE) pufer (1-krat,
- agarozna v prahu, Sigma-Aldrich,
- Midori Green, Advance DNA Stain, 1 mL, NIPPON Genetics Europe GmbH,
- sterilni pipetni nastavki,

- parafilm,
- barvilo Xylene Cyanol,
- lestvica Quick-Load® 100 bp DNA Ladder, New England BioLabs.

### 3.4.2 Oprema

- Merilni valji,
- erlenmajerica,
- čaša,
- urno steklo,
- kadička za tehtanje,
- tehtnica VIBRA SJ, Lotrič Metrology,
- mikrovalovna pečica HP50 Shaker Oven, APOLLO,
- digestorij,
- model za gel – mali, glavnički (30), držalo,
- pipete,
- elektroforetska kadička,
- vir enosmerne napetosti.

### 3.4.3 Postopek

Za ločevanje RNA ali DNA fragmentov variabilnih dolžin – od 100 bp do 25 kbp – uporabljamo kot elektroforetski nosilec agarozni gel (86). Agaroz je linearni polisaharid, sestavljen iz ponavljajočih se enot agarobioze. Ko agarozo resuspendiramo v ustreznem pufru, segrejemo in ohladimo, pride do nekovalentnega premreženja z vodikovimi vezmi. To tvori strukturo gela (84, 87). Velikost por v gelu kontroliramo z začetno koncentracijo agaroze. Koliko odstotni gel pripravimo, je odvisno od velikosti DNA, ki ga ločujemo (84, 85). Naši PCR produkti so velikosti od 373 bp do 597 bp. Za fragmente velikosti od 50 bp do 2000 bp pripravimo 2 % agarozni gel (85, 88). Za vizualizacijo v gel dodamo barvilo. Najbolj znano fluorescenčno barvilo je etidijev bromid, ki ga danes zaradi mutagenosti nadomešča Midori Green. S pomočjo lestvice, ki je sestavljena iz DNA fragmentov znanih velikosti, smo preverili velikost dobljenih PCR produktov.

Zatehtali smo 1,5 g agaroze in jo prenesli v erlenmajerico. Z merilnim valjem smo odmerili 75 mL 1x TAE pufra, ga dodali agarozu ter premešali. Vse skupaj smo stehali, pokrili z urnim steklom in postavili v mikrovalovno pečico. Zmes smo segrevali, dokler nismo dobili

bistre raztopine. Erlenmajerico smo še enkrat stekali ter izhlapelo vodo nadomestili z destilirano. Počakali smo, da se raztopina malo ohladi. Dodali smo 3  $\mu\text{L}$  barvila Midori green ter zmes dobro premešali. Tekočino smo vlili v model za gel z glavnički in počakali, da se gel strdi. Gel smo položili v elektroforetsko kadičko z 1x TAE pufrom. Kot lestvico smo uporabili Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs). V prvi žepek na gelu smo nanесли 2  $\mu\text{L}$  lestvice. V preostale luknjice smo nanесли 2  $\mu\text{L}$  nanašalnega barvila, zmešanega z 2  $\mu\text{L}$  PCR reakcijske zmesi. Elektroforeza je potekala 25 minut pri 90 V. Ko na gel dodamo nukleinske kisline, se barvilo Midori Green interkalira med njihove bazne pare. To pomeni, da se barvilo skoncentrira v predelih, kjer se ustavi DNA (84, 88). Za vizualizacijo elektroforetske ločbe smo uporabili UV-fluorescenčno slikanje s pomočjo Uvitec Cambridge Alliance 9.7 slikovnega sistema. V primeru, da smo dobili liso ustrezne intenzitete, smo preostanek PCR reakcijske zmesi poslali na sekvenciranje.

### 3.5 SEKVENCIRANJE

S tehnikami sekvenciranja določamo nukleotidna zaporedja nukleinskih kislin. Začetki metode segajo v leto 1977, ko so razvili Sangerjevo tehniko sekvenciranja. Sangerjeva tehnika temelji na vključevanju radioaktivno označenih dideoksinukleotidov (*ang. Dideoxynucleotides ali ddNTP*) v reakcijsko mešanico za pomnoževanje DNA. ddNTP se od deoksinukleotidov (dNTP) razlikujejo v tem, da nimajo hidroksilne skupine na 3' mestu. To onemogoča, da se povežejo s 5' fosfatno skupino naslednjega dNTP. Na mestu, kjer se v novo nastajajočo verigo inkorporira ddNTP, se sinteza nove verige zaključi. Na koncu dobimo vrsto različno dolgih DNA fragmentov, ki jih ločimo z elektroforezo. Na podlagi dolžine DNA fragmentov in različnega radioaktivnega označevalca za vsako dušikovo bazo ddNTP (adenin, timin, gvanin, citozin) določimo nukleotidno zaporedje izbranega odseka DNA. Z leti so Sangerjevo sekvenciranje nadgrajevali in omogočili nastanek prvih aparatov za sekvenciranje prve generacije. Temu je sledil nadaljnji razvoj tehnik sekvenciranja druge in tretje generacije, ki so danes v široki uporabi (89).

Po izvedenem PCR in elektroforezi smo vzorce poslali na sekvenciranje. Zanimalo nas je zaporedje izbranih odsekov gena *IRF6* v populaciji izbranih bolnikov z OFC in njihovih družinskih članov. Uspešne PCR reakcijske zmesi smo po načrtu pipetirali na mikrotitrsko ploščico. Pripravili smo tudi po 100  $\mu\text{L}$  F in R oligonukleotidnih začetnikov s koncentracijo 3,2  $\mu\text{M}$ . Ploščice in oligonukleotidne začetnike smo poslali na sekvenciranje v podjetje

McLab iz San Francisca. Rezultate sekvenciranja smo pregledali s programsko opremo Finch TV 1.4.0 (Geospiza Inc.).

### 3.6 GENOTIPIZACIJA Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Genotipizacija je identifikacija znanih polimorfizmov. V primeru genotipizacije uporabimo analizo v končni točki, ki je drugačna od klasičnega PCR v realnem času. Za genotipizacijo potrebujemo dve fluorescenčno označeni sondi, ki se razlikujeta v enem nukleotidu na mestu polimorfizma. Ena se veže na mutirano in druga na nemutirano zaporedje. Vsaka ima vezano specifično fluorescenčno barvilo, na podlagi česar ločimo različne genotipe (79). TaqMan sonde imajo na 5' strani kovalentno vezano fluorescenčno barvilo (npr. VIC, FAM), na 3' strani pa dušilec. Nedotaknjena sonda zaradi bližine dušilca, ki absorbira emitirano fluorescenco barvila, ne oddaja fluorescence barvila. V primeru, da je pri PCR podaljšanju prisotna tarčna sekvenca, na katero se nukleotidno zaporedje sonde prilega, 5' nukleazna aktivnost Taq polimeraze odcepi fluorescenčno barvilo. Ker se razdalja med fluorescenčnim barvilom in dušilec poveča, dušilec več ne absorbira emitirane fluorescence. Intenziteta fluorescence se tekom PCR veča in je proporcionalna s količino novonastalih DNA produktov. Glede na jakost signala sonde za normalno in mutirano zaporedje določimo genotip posameznega preiskovanca. V primeru, da sta prisotna oba signala, ima posameznik mutirani in nemutirani alel. Temu rečemo heterozigotno stanje (90).

Analiza talilne krivulje pri visoki ločljivosti (*ang. High resolution melting analysis* ali *HRM*) je metoda, ki temelji na principu PCR in se uporablja za določanje polimorfizmov. Za HRM genotipizacijo smo uporabili sestavine za PCR v realnem času in specifične Light SNiP (rs763754100) sonde. Sonde se prilegajo na mutirano ali nemutirano zaporedje. Na 3' ali na 5' koncu so označene z dušilec in fluorescenčno označenim barvilom. Ko so sonde proste v reakcijski zmesi, dušilec absorbira emitirano fluorescenco barvila. Ko se hibridizirajo na tarčni odsek DNA, dušilec več ne prestreza fluorescence barvila, zato ta naraste. Tehnika temelji na razlikah v temperaturni stabilnosti med popolnim in nepopolnim prileganjem sonde na enoverižno DNA. V prvem koraku izvedemo PCR v realnem času tako, da pomnožimo zelen odsek DNA zaporedja. V drugem koraku zvišamo temperaturo na 95°C, da dsDNA denaturira v ssDNA. Temu sledi prileganje sonde na ssDNA, nastanek dupleksov in porast fluorescence. Dupleksi, ki nastajajo pri nepopolnem ujemanju, so temperaturno manj stabilni, zato je njihova  $T_m$  nižja kot  $T_m$  dupleksov s popolnim prileganjem. Pri

heterozigotih nastaneta oba tipa dupleksov. V zadnjem koraku postopno zvišujemo temperaturo v temperaturnem območju med 40 °C in 75 °C, da denaturiramo predhodno nastale duplekse. Posledično fluorescenca upade, kar spremljamo s talilno krivuljo. Talilno krivuljo predstavlja graf negativnega odvoda fluorescence v odvisnosti od temperature. Iz grafa lahko odčitamo  $T_m$  (ang. *melting temperature*). To je temperatura, pri kateri denaturira 50 % dupleksov ssDNA in sonde. Na grafu negativnega odvoda fluorescence v odvisnosti od temperature je vrh homozigotov s popolnim ujemanjem pri višji  $T_m$  kot vrh homozigotov z nepopolnim ujemanjem. Heterozigoti imajo dva nižja vrha (90, 91).

Ker smo s pomočjo PCR in sekvenciranja v primarni skupini 24 bolnikov z OFC odkrili šest polimorfizmov, smo se odločili, da jih potrdimo še s pomočjo genotipizacije z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Zaradi pomanjkanja pozitivnih kontrol smo lahko s PCR v realnem času preverili pet od šestih s sekvenciranjem odkritih polimorfizmov. Za polimorfizme z oznakami rs2013162, rs2235373, rs2235375 in rs7552506 smo uporabili TaqMan® sonde. Za polimorfizem z oznako rs763754100 smo uporabili Light SNIp sonde in analizo talilnih krivulj.

### 3.6.1 Material:

- TaqMan® SNP Genotyping Assay C\_\_25966036\_10 (187µL; 40X),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay C\_\_2500165\_10 (187µL; 40X),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay C\_\_15952201\_10 (187µL; 40X),
- TaqMan® SNP Genotyping Assay C\_\_1592202\_10 (187µL; 40X),
- 5x HOT FIREPol® Probe Universal qPCR Mix (1 mL), Solis Biodyne,
- ultra čista voda (visoko prečiščena avtoklavirana voda),
- LightSNIP Assay rs763754100 IRF6, TIB-MOLBIOL,
- LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe FastStart Reaction Mix HybProbe 1b, Roche,
- LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe LC FastStart DNA Master HybProbe, 10X, 1a, Roche,
- LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe MgCl<sub>2</sub> stock solution 2 (25 mM), Roche,
- LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe H<sub>2</sub>O, PCR grade, 3, Roche,
- LightCycler® Sealing Foil, Roche.



### 3.6.2 Oprema:

- LightCycler® 480 System, Roche,
- LightCycler® Multiwell plate 384, Roche,
- delovna komora z UV lučko, DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR, Biosan,
- minicentrifuga z vrtinčastim mešalom Combi-Spin, Biosan,
- centrifuga Mikro-242, tehtnica Železniki,
- pipete (0,5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L),
  - nastavki za pipete.

### 3.6.3 Postopek

#### 3.6.3.1 Genotipizacija s TaqMan® sondami

Za genotipizacijo s TaqMan sondami smo poleg ustreznih sond uporabili še MasterMix, ultra čisto vodo in DNA s koncentracijo 4 ng/ $\mu$ L. Najprej smo pripravili reakcijsko mešanico, ki smo jo napipetirali na mikrotitersko ploščico LightCycler® Multiwell plate 384 (Roche).

Preglednica X: Sestava reakcijske mešanice za en vzorec qPCR s TaqMan® sondami

Sestavine	Volumen [ $\mu$ L]
5x HOT FIREPol® Probe Universal qPCR Mix	1,2
TaqMan sonde	0,15
Ultra čista voda	3,15
Skupni volumen [ $\mu$ L]	6

Nato smo dodali še 1,5  $\mu$ L testne DNA s koncentracijo 4 ng/ $\mu$ L. Ploščico smo prekrili s folijo, jo centrifugirali dve minuti pri 2000 obratih na minuto ter jo vstavili v LightCycler® 480 System (Roche). Program izvedbe qPCR je naveden v Preglednici XI.

Preglednica XI: Program izvedbe qPCR za genotipizacijo s TaqMan sondami

Stopnja		Temperatura	Čas
Inkubacija		50 °C	2 min
Aktivacija polimeraze		95 °C	10 min
PCR (50 ciklov)	Denaturacija	95 °C	15 s
	Prileganje/ podaljševanje	60 °C	1 min

Po opravljeni analizi smo dobili rezultate v obliki točkastega grafa alelna diskriminacije. Na koncu verižne reakcije s polimerazo je aparat izmeril končno fluorescenco in glede na vezano sondo opredelil genotip posameznega vzorca, ki ga predstavlja točka na grafu. Graf alelna diskriminacije predstavlja fluorescenco barvila FAM™ na osi x in fluorescenco barvila VIC™ na osi y. Dobili smo tri skupine oziroma tri genotipe: nemutirani homozigot, heterozigot in mutirani homozigot.

### 3.6.3.2 Genotipizacija z analizo talilne krivulje pri visoki ločljivosti

Liofiliziranim LightSNiP začetnikom in sondam smo dodali 100 µL ultra čiste vode. V UV delovni komori smo pripravili mešanico LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (10x). Vsebinsko epruvete z oznako B1, ki vsebuje DNA polimerazo, smo prenesli v epruvetko A1. Epruvetka A1 vsebuje 10mM MgCl<sub>2</sub>, reakcijski pufer in deoksinukleozidtrifosfate. Temu smo dodali še oligonukleotidna začetnika, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, ultra čisto vodo in sondo Light SNiP (rs763754100). Reakcijsko zmes smo rahlo premešali in centrifugirali. Reakcijsko zmes smo pripravili za izbrano število vzorcev z upoštevanjem 10 % napake pri pipetiranju. Na ploščico za genotipizacijo smo v vsako mikroepuvetko napipetirali 7,5 µL reakcijske mešanice in nato dodali še 2,5 µL testne DNA. Ploščico smo prekrili s folijo ter jo centrifugirali 2 minuti pri 2000 obratih na minuto. Nato smo jo vstavili v aparaturo LightCycler® 480 System (Roche).

Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi za qPCR in HRM analizo za en vzorec

Sestavine	Volumen [µL]
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	1
LightSNiP rs763754100 IRF6	0,3
Ultra čista voda	5,4
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,8
Vzorčna DNA (4 ng/µL)	2,5
Skupni volumen [µL]	10

Izbrali smo vnaprej določen program za izvedbo qPCR in HRM analize. Po končani analizi smo dobili rezultate v obliki talilne krivulje na grafu negativnega odvoda fluorescence v odvisnosti od temperature.

Preglednica XIII: Program za izvedbo qPCR in HRM analize

<b>Stopnja</b>		<b>Temperatura</b>	<b>Čas</b>
Preinkubacija		95 °C	10 min
PCR (45 ciklov)	Denaturacija	95 °C	10 s
	Prileganje začetnikov	60 °C	10 s
	Podaljševanje	72 °C	10 s
HRM analiza	Denaturacija	95 °C	30 s
	Prileganje sonde	40 °C	2 min
	Taljenje	40 °C–75 °C	+ 0,19 °C/s
Hlajenje		40 °C	30 s

## 4. REZULTATI

### 4.1 REZULTATI SEKVENCIRANJA

Rezultate sekvenciranja smo obdelali s pomočjo programske opreme FinchTV. Po pregledu sekvenc s programom smo jih primerjali še z referenčnimi sekvencami v bazi podatkov NCBI Blast (92). V naboru vzorcev 24 bolnikov s pozitivno družinsko anamnezo OFC smo odkrili prisotnost šestih mutacij, ki so predstavljene v *Preglednici XIV*. Podatke o posameznih polimorfizmih smo pridobili iz baze podatkov Ensembl (93) in ClinVar (94). Polimorfizme smo analizirali s pomočjo spletnega orodja Variant Effect Predictor, Ensembl (95). Z nadaljnjo genotipizacijo smo preverili prisotnost istih mutacij pri ostalih sorodnikih obolelih preiskovancev.

*Preglednica XIV: Odkrite mutacije v kodirajočih regijah gena IRF6 in njihovi neposredni bližini v slovenski populaciji*

Mutacija	Sprememba AK zaporedja	rs/HGMD oznaka	lokacija
c.459 G>T	Ser 153 Ser	rs2013162	Ekson 5
c.522 G>A	Ala 174 Ala	rs763754100	Ekson 6
c.667 +27 C>G	/	rs2235375	Intron 7
c.1060 +37 C>T	/	rs2235373	Intron 8
c.1234 C>T	Arg 412 X	CM022409	Ekson 9
c.175 -5 C>G	/	rs7552506	Intron 3

### 4.2 REZULTATI GENOTIPIZACIJE DRUŽIN

Rezultati so predstavljeni v sklopu posameznih družin. S pomočjo spletne programske opreme Progeny Free Online Pedigree Tool (96) smo naredili prikaz družinskih dreves družin, vključenih v študijo. Označili smo različna bolezenska stanja posameznikov in družinske člane, pri katerih smo imeli na voljo vzorec DNA. Vsa družinska drevesa se nahajajo v Prilogi 1. V študijo smo vključili 24 družin. Zaradi pomanjkanja vzorcev in odsotnosti polimorfizmov smo izključili družino z oznako OFC\_017. Za polimorfizem pod oznako CM022409 (c. 1234 C>T) nismo naredili potrditvene genotipizacije, saj nismo imeli na voljo ustreznih vzorcev (oz. pozitivne kontrole) za optimizacijo genotipizacijskih sond. Za dotični polimorfizem imamo na voljo samo rezultate, ki smo jih pridobili s sekvenciranjem.

## 4.2.1 DRUŽINA OFC\_004

Preglednica XV: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_004, C1-primarni bolnik z OFC, C2-sorojenec, F-oče, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
VZOREC	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_004_C1</b>	GG	TT	GG	GG	CC	CC
<b>OFC_004_C2</b>	Ni vzorca	Ni vzorca	CC	Ni vzorca	Ni vzorca	Ni vzorca
<b>OFC_004_F</b>	CG	GT	CG	GG	CC	/
<b>OFC_004_M</b>	CG	GT	CG	GG	CC	/

Primarni preiskovanec OFC\_004\_C1 ima enostransko heilognatopalatoshizo. Preiskovančev oče OFC\_004\_F ima diagnosticirano desnostransko delno shizo. Mamina nečakinja ima defekt septuma. *In utero* je bil preiskovanec izpostavljen pesticidom. Preiskovančeva mati je bivša kadilka. Z genetsko analizo smo ugotovili, da je preiskovanec OFC\_004\_C1 mutirani homozigot za naslednje tri polimorfizme: rs7552506, rs2013162 in rs2235375. Oba starša, OFC\_004\_F in OFC\_004\_M, sta za iste polimorfizme heterozigota. Tekom analiz je zmanjkalo vzorca OFC\_004\_C2 (zdravi sorojenec), zato zanj nismo pridobili vseh rezultatov.

## 4.2.2 DRUŽINA OFC\_025

Preglednica XVI: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_025, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
VZOREC	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_025_C1</b>	GG	TT	GG	GG	CC	CT
<b>OFC_025_M</b>	CG	GT	CG	GG	CC	CC

Primarni preiskovanec OFC\_025\_C1 ima diagnosticirano levostransko heilognatopalatoshizo s sumom na Van der Woudeov sindrom. Preiskovančev oče, za katerega DNA vzorca nismo imeli na voljo, ima diagnosticirano obojestransko heilognatopalatoshizo. Okoljski dejavniki tveganja niso znani oziroma jih ni. Z genetsko analizo smo ugotovili, da je preiskovanec OFC\_025\_C1 mutirani homozigot za naslednje tri polimorfizme: rs7552506, rs2013162 in rs2235375. Za polimorfizem z oznako CM022409 je preiskovanec OFC\_025\_C1 heterozigot. Mama OFC\_025\_M je v primeru polimorfizmov rs7552506, rs2013162 in rs2235375 heterozigot, za CM022409 pa nemutirani homozigot.

### 4.2.3 DRUŽINA OFC\_032

Preglednica XVII: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_032, C1-primarni bolnik z OFC, C2, C3-sorojenec, F-oče, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
VZOREC	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_032_C1</b>	CC	GG	CC	GA	CC	/
<b>OFC_032_C2</b>	CC	Neuspešna genotipizacija	CC	GG	CC	/
<b>OFC_032_C3</b>	GG	GT	CG	Neuspešna genotipizacija	CC	/
<b>OFC_032_F</b>	CG	GT	CG	Neuspešna genotipizacija	Neuspešna genotipizacija	/
<b>OFC_032_M</b>	CC	GG	CC	GG	CC	/

Primarni preiskovanec OFC\_032\_C1 ima levostransko heiloshizo. Njegova sestra OFC\_032\_C2 ima palatoshizo. Okoljskih dejavnikov tveganja ni oziroma niso znani. Z genetsko analizo smo ugotovili, da je preiskovanec OFC\_032\_C1 heterozigot za polimorfizem rs763754100. Njegov zdravi brat OFC\_025\_C3 je mutirani homozigot za polimorfizem rs7552506 in heterozigot za polimorfizma rs2013162 ter rs2235375. Oče OFC\_032\_F je heterozigot za polimorfizme rs7552506, rs2013162 in rs2235375. Vseh rezultatov zaradi večkrat neuspešne genotipizacije nismo pridobili.

### 4.2.4 DRUŽINA OFC\_047

Preglednica XVIII: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_047, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
VZOREC	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_047_C1</b>	CC	GG	CC	GG	CC	CC
<b>OFC_047_M</b>	CG	GT	CG	GG	CT	/

Primarna preiskovanka OFC\_047\_C1 ima obojestransko heilognatopalatoshizo. Njena mama OFC\_047\_M ima diagnosticirano heiloshizo. Edini zabeleženi dejavnik tveganja je savna v prvem trimesečju nosečnosti, ostalih dejavnikov tveganja ni oziroma niso znani. Z genetsko analizo smo ugotovili, da je preiskovanka OFC\_047\_C1 nemutirani homozigot za

vse polimorfizme. Mama OFC\_047\_M je heterozigot za polimorfizme rs7552506, rs2013162, rs2235375 in rs2235373.

#### 4.2.5 DRUŽINA OFC\_059

*Preglednica XIX: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_059, C1-primarni bolnik z OFC, F-oče, M-mati*

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_059_C1</b>	CG	GT	CG	GG	CC	CC
<b>OFC_059_F</b>	CG	GT	CG	GG	CC	/
<b>OFC_059_M</b>	CG	GT	CG	GG	CC	/

Primarna preiskovanka OFC\_059\_C1 ima diagnosticirano palatoshizo s Pierre Robin sekvenco. Mama OFC\_059\_M ima heiloshizo brez Pierre Robin sekvence. Je kadilka. V prvem trimesečju nosečnosti ni jemala folne kisline. Z genetsko analizo smo ugotovili, da so vsi družinski člani OFC\_059\_C1, OFC\_059\_M in OFC\_059\_F heterozigoti za polimorfizme rs7552506, rs2013162 in rs2235375.

#### 4.2.6 DRUŽINA OFC\_062

*Preglednica XX: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_062, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati*

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_062_C1</b>	CG	Ni vzorca	CG	GA	CT	CC
<b>OFC_062_M</b>	CC	GG	CC	GG	CC	/

Primarna preiskovanka OFC\_062\_C1 ima palatoshizo s Pierre Robin sekvenco. Preiskovankin brat, čigar vzorca nismo imeli na voljo, ima diagnosticiran odprt botallov vod. Gre za pogosto prirojeno srčno napako. Okoljskih dejavnikov tveganja ni oziroma niso znani. Z genetsko analizo smo ugotovili, da je preiskovanka OFC\_062\_C1 heterozigot za polimorfizme rs7552506, rs2235375, rs763754100 in rs2235373. Vzorca OFC\_062\_C1 je zmanjkalo, zato nismo določili genotipa za polimorfizem rs2013162.

## 4.2.7 DRUŽINA OFC\_064

Preglednica XXI: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_064, C1-primarni bolnik z OFC, F-oče, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_064_C1</b>	CC	GG	CC	GG	CC	CC
<b>OFC_064_F</b>	CC	GG	CC	GG	CC	/
<b>OFC_064_M</b>	CC	GG	CC	GG	CC	/

Preiskovanec OFC\_064\_C1 in njegov oče OFC\_064\_F imata diagnosticirano palatoshizo. Okoljskih dejavnikov tveganja ni oziroma niso znani. Z genetsko analizo smo ugotovili, da v družini OFC\_064 za preiskovane polimorfizme ni prisotnih mutacij.

## 4.2.8 DRUŽINA OFC\_066

Preglednica XXII: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_066, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_066_C1</b>	CG	GT	CG	Ni vzorca	CC	/
<b>OFC_066_M</b>	CG	GT	CG	GG	CC	CC

Preiskovanka OFC\_066\_C1 ima diagnosticirano palatoshizo z Pierre Robin sekvenco. Mama OFC\_066\_M ima palatoshizo brez Pierre Robin sekvence. Mamina sestra ima diagnosticirano submukozno palatoshizo. Mama je kadička, ostalih dejavnikov tveganja ni oziroma niso znani. Z genetsko analizo smo ugotovili, da sta tako preiskovanka OFC\_066\_C1 kot njena mati OFC\_066\_M heterozigota za polimorfizme rs7552506, rs2235375 in rs2013162. Zmanjkalo nam je vzorca OFC\_066\_C1, zato pri polimorfizmu rs763754100 nismo določili genotipa.



## 4.2.9 DRUŽINA OFC\_071

Preglednica XXIII: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_071, C1-primarni bolnik z OFC, C2-sorojenec, F-oče, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
VZOREC	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_071_C1</b>	CC	GG	CC	GG	CC	CC
<b>OFC_071_C2</b>	Neuspešna genotipizacija	Neuspešna genotipizacija	CC	Neuspešna genotipizacija	Neuspešna genotipizacija	/
<b>OFC_071_F</b>	CC	GG	CC	Neuspešna genotipizacija	CC	/
<b>OFC_071_M</b>	CG	GT	CG	GG	CT	/

Preiskovanec OFC\_071\_C1 ima nepopolno desnostransko heilognatopalatoshizo. Mama OFC\_071\_M ima obojestransko heilognatopalatoshizo. Okoljskih dejavnikov tveganja ni oziroma niso znani. Z genetsko analizo smo ugotovili, da pri preiskovancu OFC\_071\_C1 niso prisotni mutirani aleli za preučevane polimorfizme. Mama OFC\_071\_M je heterozigot za polimorfizme rs7552506, rs2013162, rs2235375 in rs2235373. Zaradi večkrat neuspešne genotipizacije nismo pridobili vseh rezultatov.

## 4.2.10 DRUŽINA OFC\_078

Preglednica XXIV: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_078, C1-primarni bolnik z OFC, F-oče, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
VZOREC	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_078_C1</b>	CC	GG	CC	GG	CC	CC
<b>OFC_078_F</b>	CG	GT	CG	GG	CT	/
<b>OFC_078_M</b>	CC	GG	CC	GG	CC	/

Preiskovanec OFC\_078\_C1 ima diagnosticirano levostransko heiloshizo in ASD secundum (ang. Atrial Septal Defect). Preiskovančev oče OFC\_078\_F ima diagnosticirano insuficienco zaklopke. Mama OFC\_078\_M ima evtirotično golšo, ki spada med bolezni ščitnice. Ostalih dejavnikov tveganja ni oziroma niso znani. Z genetsko analizo smo ugotovili, da je oče OFC\_078\_F heterozigot za polimorfizme rs7552506, rs2013162, rs2235375 in rs2235373.

#### 4.2.11 DRUŽINA OFC\_093

Preglednica XXV: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_093, C1-primarni bolnik z OFC, F-oče, M-mati, GM-babica

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_093_C1</b>	CG	GT	CG	GG	CT	CC
<b>OFC_093_M</b>	CG	GT	CG	GG	CC	/
<b>OFC_093_F</b>	GG	Neuspešna genotipizacija	CG	Neuspešna genotipizacija	Neuspešna genotipizacija	/
<b>OFC_093_GM</b>	GC	GT	CG	Neuspešna genotipizacija	CC	/

V družini OFC\_093 se pojavljajo shize v treh generacijah. Primarna preiskovanka OFC\_093\_C1 ima diagnosticirano desnostransko heilognatopalatoshizo in levostransko palatoshizo s sumom na Van der Woudeov sindrom. Mama OFC\_093\_M ima palatoshizo in fistulo spodnje ustnice s sumom na Van der Woudeov sindrom. Tudi babica po mamini strani OFC\_093\_GM ima palatoshizo. Mamin brat, čigar vzorca nismo imeli na voljo, ima diagnosticirano heilognatopalatoshizo. Ostalih dejavnikov tveganja ni oziroma niso znani. Z genetsko analizo smo ugotovili, da je preiskovanka OFC\_093\_C1 heterozigot za polimorfizme rs7552506, rs2235375, rs2013162 in rs2235373. Mama OFC\_093\_M in babica OFC\_093\_GM sta heterozigota za polimorfizme rs7552506, rs2013162 in rs2235375. Oče OFC\_093\_F je mutirani homozigot za polimorfizem rs7552506 in heterozigot za polimorfizem rs2235375. Zaradi neuspešnih poskusov genotipizacije nismo dobili vseh želenih rezultatov. Neuspešne genotipizacije smo ponovili vsaj trikrat.

#### 4.2.12 DRUŽINA OFC\_095

Preglednica XXVI: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_095, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_095_C1</b>	CG	GT	CG	GG	CT	CC
<b>OFC_095_M</b>	GG	TT	GG	GG	TT	/

V družini OFC\_095 se OFC pojavljajo v treh generacijah. Primarni preiskovanec OFC\_095\_C1 ima desnostransko heilognatopalatoshizo. Heilognatopalatoshiza je diagnosticirana tudi pri očetu in babici po očetovi strani, za katera nismo imeli na voljo

vzorcev. Preiskovančeva mati je kadilka. Med nosečnostjo ni jemala folne kisline. Z genetsko analizo smo ugotovili, da je primarni preiskovanec OFC\_095\_C1 heterozigot za polimorfizme rs7552506, rs2013162, rs2235375 in rs2235373. Mama OFC\_095\_M je za iste polimorfizme mutirani homozigot.

#### 4.2.13 DRUŽINA OFC\_113

*Preglednica XXVII: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_113, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati*

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_113_C1</b>	CC	GG	CC	GG	CC	CC
<b>OFC_113_M</b>	CC	GG	CC	GG	CC	/

Primarni preiskovanec v družini OFC\_113\_C1 in njegova mama OFC\_113\_M imata diagnosticirano palatoshizo. Mama je imela povišano telesno temperaturo v prvem trimesečju nosečnosti. Z genetsko analizo smo ugotovili, da pri nobenem preiskovancu ni mutiranih alelov za preiskovane polimorfizme.

#### 4.2.14 DRUŽINA OFC\_115

*Preglednica XXVIII: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_115, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati*

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_115_C1</b>	CC	GG	CC	GG	CC	CC
<b>OFC_115_M</b>	CG	GT	CG	GG	CT	/

Po očetovi strani so v družini OFC\_115 prisotne shize v daljnem sorodstvu. Primarni preiskovanec OFC\_115\_C1 ima zdravo sorojenko in dva mrtvorojena sorojenca. OFC\_115\_C1 ima diagnosticirano obojestransko heilognatopalatoshizo. Mama je bivša kadilka. Z genetsko analizo smo ugotovili, da pri preiskovancu OFC\_115\_C1 niso prisotni mutirani aleli za preiskovane polimorfizme. Mama OFC\_115\_M je heterozigot za polimorfizme rs7552506, rs2013162, rs2235375 in rs2235373.

#### 4.2.15 DRUŽINA OFC\_126

Preglednica XXIX: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_126, C1-primarni bolnik z OFC, C2-sorojenec, F-oče, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_126_C1</b>	CG	GT	CG	GG	CC	CC
<b>OFC_126_C2</b>	Neuspešna genotipizacija	Neuspešna genotipizacija	CG	Neuspešna genotipizacija	Neuspešna genotipizacija	/
<b>OFC_126_F</b>	GG	Neuspešna genotipizacija	CG	Neuspešna genotipizacija	Neuspešna genotipizacija	/
<b>OFC_126_M</b>	CG	GT	CG	GG	CC	/

Primarna preiskovanka v družini OFC\_126\_C1 ima obojestransko heilognatopalatoshizo. Mama OFC\_126\_M ima šum na srcu, astmo in želodčni refluks. V prvem trimesečju nosečnosti je jemala zdravili Pulmicort® in Ventolin®. Z genetsko analizo smo ugotovili, da sta preiskovanka OFC\_126\_C1 in mama OFC\_126\_M heterozigota za polimorfizme rs7552506, rs2013162 in rs2235375. Oče OFC\_126\_F in zdrav sorojenec OFC\_126\_C2 sta heterozigota za polimorfizem rs2235375. Oče OFC\_126\_F je mutirani homozigot za polimorfizem rs7552506. Zaradi neuspešnih genotipizacij preostalih rezultatov nismo pridobili.

#### 4.2.16 DRUŽINA OFC\_140

Preglednica XXX: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_140, C1-primarni bolnik z OFC, C2-sorojenec, F-oče, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_140_C1</b>	CG	GT	CG	GG	CT	CC
<b>OFC_140_C2</b>	CC	GG	CC	Neuspešna genotipizacija	CC	/
<b>OFC_140_F</b>	CC	GG	GG	Neuspešna genotipizacija	CC	/
<b>OFC_140_M</b>	CG	GT	CG	GG	CC	/

V družini OFC\_140 ima primarni preiskovanec OFC\_140\_C1 diagnosticirano levostransko heiloshizo. Njegov oče OFC\_140\_F ima diagnosticirano nakazano desnostransko heiloshizo. Ostalih dejavnikov tveganja ni oziroma niso znani. Preiskovanec OFC\_140\_C1

in njegova mama OFC\_140\_M sta heterozigota za polimorfizme rs7552506, rs2013162 in rs2235375. OFC\_140\_C1 je poleg tega še heterozigot za rs2235373. Oče OFC\_140\_F je mutirani homozigot za polimorfizem rs2235375. Zaradi neuspešnih genotipizacij nismo pridobili vseh rezultatov.

#### 4.2.17 DRUŽINA OFC\_141

Preglednica XXXI: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_141, C1-primarni bolnik z OFC, C2-sorojenec, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_141_C1</b>	CG	GT	CG	GG	CT	CC
<b>OFC_141_C2</b>	Ni vzorca	Ni vzorca	CC	Ni vzorca	Ni vzorca	Ni vzorca
<b>OFC_141_M</b>	CC	GG	CC	GG	CC	/

V družini OFC\_141 ima primarni preiskovanec OFC\_141\_C1 diagnosticirano levostransko heiloshizo. Oče in njegov stric imata diagnosticirano heiloshizo. Mama je imela v prvem trimesečju nosečnosti povišano telesno temperaturo zaradi angine. Jemala je zdravilo Oспен®. Z genetsko analizo smo ugotovili, da je preiskovanec OFC\_141\_C1 heterozigot za polimorfizme rs7552506, rs2013162, rs2235375 in rs2235373. Vzorca zdravega brata OFC\_141\_C2 nam je zmanjkalo, zato večine genotipov nismo določili.

#### 4.2.18 DRUŽINA OFC\_144

Preglednica XXXII: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_144, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_144_C1</b>	CC	GG	CC	GG	CC	CC
<b>OFC_144_M</b>	CC	GG	CC	GG	CC	/

Preiskovanec OFC\_144\_C1 ima diagnosticirano palatoshizo s Pierre Robin sekvenco. Oče preiskovanca ima poleg palatoshize brez Pierre Robin sekvence še razcepljen jeziček (*ang. Uvula bifida*). Mama je kadilka. Imela je nosečniško sladkorno bolezen. Od petega meseca nosečnosti naprej je jemala inzulin. Z genetsko analizo smo ugotovili, da v družini ni mutiranih alelov za preiskovane polimorfizme.

#### 4.2.19 DRUŽINA OFC\_147

Preglednica XXXIII: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_147, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_147_C1</b>	CG	GT	CG	Ni vzorca	CC	CC
<b>OFC_147_M</b>	CG	GT	CG	GG	CC	/

Primarni preiskovanec OFC\_147\_C1 ima diagnosticirano palatoshizo. Preiskovančev brat ima razcepljen jeziček (*ang. Uvula bifida*). Mama je kadilka. V prvem trimesečju nosečnosti je mama jemala Amoksiklav<sup>®</sup>. Z genetsko analizo smo ugotovili, da sta tako primarni preiskovanec OFC\_147\_C1 kot njegova mati OFC\_147\_M heterozigota za polimorfizme rs7552506, rs2013162 in rs2235375. Vzorca preiskovanca OFC\_147\_C1 je tekom analiz zmanjkalo, zato nismo določili genotipa za polimorfizem rs763754100.

#### 4.2.20 DRUŽINA OFC\_156

Preglednica XXXIV: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_156, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_156_C1</b>	CG	GT	CG	GG	CC	CC
<b>OFC_156_M</b>	CG	GT	CG	GG	CC	/

Primarni preiskovanec OFC\_156\_C1 ima diagnosticirano submukozno palatoshizo in razcepljen jeziček (*ang. Uvula bifida*). Ima dva zdrava sorojenca, pri enem sorojencu pa so se zaradi ugotovljene hude malformacije ledvic odločili za umetno prekinitev nosečnosti v 18. tednu. Ostalih dejavnikov tveganja ni oziroma niso znani. Po genetski analizi smo ugotovili, da sta preiskovanec OFC\_156\_C1 in njegova mama OFC\_156\_M heterozigota za polimorfizme rs7552506, rs2013162 in rs2235375.

## 4.2.21 DRUŽINA OFC\_167

Preglednica XXXV: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_167, C1-primarni bolnik z OFC, C2,C3-sorojenec, F-oče, M-mati, GM-babica, UN-strict

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_167_C1</b>	CG	GG	CC	GG	CC	CC
<b>OFC_167_C2</b>	GG	TT	GG	GG	CT	/
<b>OFC_167_C3</b>	GG	Neuspešna genotipizacija	CC	Neuspešna genotipizacija	Neuspešna genotipizacija	/
<b>OFC_167_F</b>	GG	TT	GG	Neuspešna genotipizacija	Neuspešna genotipizacija	/
<b>OFC_167_GM</b>	CG	GT	CG	Neuspešna genotipizacija	CC	/
<b>OFC_167_UN</b>	GG	Neuspešna genotipizacija	GG	Neuspešna genotipizacija	Neuspešna genotipizacija	/
<b>OFC_167_M</b>	CG	GT	CG	GG	CC	/

V družini OFC\_167 se shize pojavljajo v treh generacijah. Diagnosticirane so pri petih družinskih članih. Primarna preiskovanka OFC\_167\_C1 ima obojestransko heilognatopalatoshizo, brat OFC\_167\_C2 desnostransko heilognatopalatoshizo, brat OFC\_167\_C3 levostransko nakazano heiloshizo, mama OFC\_167\_M levostransko nakazano heiloshizo in babica po mamini strani OFC\_167\_GM levostransko heiloshizo. Mama je imela v prvem trimesečju nosečnosti povišano telesno temperaturo zaradi gripe. Med nosečnostjo ni jemala folne kisline. Z genetsko analizo smo ugotovili prisotnost mutacij pri vseh preiskovanih družinskih članih. Za polimorfizem rs7552506 so mutirani homozigoti kar štirje družinski člani, in sicer oba brata preiskovanke (OFC\_167\_C2 in C3), oče OFC\_167\_F in stric po mamini strani OFC\_167\_UN. Preiskovanka OFC\_167\_C1, mama OFC\_167\_M in babica po mamini strani OFC\_167\_GM so heterozigoti. Za polimorfizem rs2235375 so mutirani homozigoti brat OFC\_167\_C2, oče OFC\_167\_F in stric po mamini strani OFC\_167\_UN. Heterozigota sta babica OFC\_167\_GM in mama preiskovanke OFC\_167\_M. Za ostale polimorfizme zaradi večkrat neuspešne genotipizacije nimamo vseh podatkov. Za polimorfizem rs2013162 je mutirani homozigot brat preiskovanke OFC\_167\_C2, mama OFC\_167\_M in babica OFC\_167\_GM pa sta heterozigota. Za

polimorfizem rs2235373 je brat OFC\_167\_C2 heterozigot. Manjkajoče genotipizacije smo vsaj trikrat ponovili neuspešno.

#### 4.2.22 DRUŽINA OFC\_178

Preglednica XXXVI: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_178, C1-primarni bolnik z OFC, C2,C3-sorojenec, F-oče, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_178_C1</b>	CG	GT	CG	GG	CT	/
<b>OFC_178_C2</b>	CG	GT	CG	GG	CT	/
<b>OFC_178_C3</b>	CG	GT	CG	GG	CT	/
<b>OFC_178_F</b>	CC	Neuspešna genotipizacija	CC	GG	CC	/
<b>OFC_178_M</b>	CC	TT	GG	GG	TT	/

V družini OFC\_178 je diagnosticirana palatoshiza pri primarni preiskovanki OFC\_178\_C1 in njeni mami OFC\_178\_M. Mama je kadilka. Ima policistični sindrom jajčnikov (*ang. Polycystic Ovary Syndrome ali PCOS*). Med nosečnostjo ni jemala folne kisline zaradi slabosti. Z genetsko analizo smo ugotovili, da so primarna preiskovanka OFC\_178\_C1 in oba zdrava sorojenca (OFC\_178\_C2, OFC\_178\_C3) heterozigoti za polimorfizme rs7552506, rs2013162, rs2235375 in rs2235373. Mama (OFC\_178\_M) je mutirani homozigot za polimorfizme rs2013162, rs2235375 in rs2235373.

#### 4.2.23 DRUŽINA OFC\_179

Preglednica XXXVII: Rezultati genotipizacije za družino OFC\_179, C1-primarni bolnik z OFC, M-mati

	Intron 3	Ekson 5	Intron 7	Ekson 6	Intron 8	Ekson 9
<b>VZOREC</b>	rs7552506 c.175-5C>G	rs2013162 Ser153Ser	rs2235375 c.677+27 C>G	rs763754100 Ala174Ala	rs2235373 c.1060+37 C>T	CM022409 Arg412X
<b>OFC_179_C1</b>	CC	GG	CC	GG	CC	CC
<b>OFC_179_M</b>	CC	GG	CC	GG	CC	/

Primarni preiskovanec OFC\_179\_C1 ima levostransko heilognatopalatoshizo. V drugem mesecu nosečnosti je bil *in utero* izpostavljen rentgenskim žarkom. Preiskovančev brat ima obojestransko heiloshizo in popolno palatoshizo. Mama OFC\_179\_M je imela v prvem trimesečju nosečnosti povišano telesno temperaturo. Jemala je zdravilo Amoksiklav®. Med



nosečnostjo ni jemala folne kisline. Z genetsko analizo smo ugotovili, da v družini OFC\_179 ni mutiranih alelov za preiskovane polimorfizme.

## 5. RAZPRAVA

OFC so pogoste prirojene anomalije, katerih nastanek je splet več genetskih, okoljskih in demografskih dejavnikov. Bolniki so podvrženi številnim operacijskim posegom in zdravstvenim obravnavam. Zaradi resnosti zdravstvenega stanja predstavljajo velike ovire za posameznike in njihove družine, zaradi visoke cene zdravljenja pa veliko breme za javno zdravstvo. V naši raziskavi smo se osredotočili predvsem na genetiko shiz. Želeli smo poiskati morebitne polimorfizme v določenih odsekih gena *IRF6*, ki bi potencialno lahko vplivali na nastanek OFC. V prvem delu raziskave smo pri 24 bolnikih z OFC s sekvenciranjem določili šest polimorfizmov v kodirajočih regijah gena *IRF6* in njihovi neposredni bližini: rs7552506, rs2013162, rs2235375, rs763754100, rs2235373 in CM022409. Študijo smo nadaljevali z genotipizacijo za omenjene polimorfizme na vzorcih preostalih družinskih članov. Končni rezultat je družinska študija, ki predstavlja osnovo za nadaljnje raziskave na tem področju.

Pri eksperimentalnem delu smo naleteli na kar nekaj težav. Izolirana DNA je imela v določenih primerih zelo nizke koncentracije, zato je nismo mogli uporabiti za PCR in genotipizacijo. Do tega je verjetno prišlo, ker so si nekateri preiskovanci sami jemali brise bukalne sluznice in jih nato po pošti poslali v laboratorij. Zaradi nedoslednega upoštevanja navodil in neizkušenosti brisi niso bili kakovostno odvzeti. Obstaja možnost, da so pri izolaciji DNA v vzorcih ostali inhibitorji, ki so motili PCR in genotipizacijo. Pri analizi smo želeli zaradi omejitev pri količini vzorcev uporabiti čim nižje koncentracije DNA za PCR reakcijsko zmes. Zaradi nekakovostnih PCR produktov tudi sekvenciranje ni bilo vedno uspešno. Pri določenih sekvencah je bil šum previsok, da bi lahko razbrali nukleotidno zaporedje. Težave smo imeli tudi pri genotipizaciji. Na vzorcih, naštetih v spodnji preglednici, smo genotipizacijo vsaj trikrat izvedli neuspešno. Razloga za to sta prisotnost inhibitorjev v vzorcu ali slaba kvaliteta DNA. Največ težav smo imeli s polimorfizmom rs2013162, pri čemer programska oprema za aparaturo LightCycler ni ustrezno ločevala skupine nemutiranih homozigotov, heterozigotov in mutiranih homozigotov. Skupine smo morali zato opredeliti ročno.

Preglednica XXXVIII: Seznam neuspešnih genotipizacij in manjkajočih vzorcev za posamezne polimorfizme

	<b>rs7552506</b>	<b>rs2013162</b>	<b>rs2235375</b>
<b>Neuspešna genotipizacija</b>	OFC_071_C2 OFC_126_C2	OFC_032_C2 OFC_071_C2 OFC_093_F OFC_126_C2 OFC_126_F OFC_167_C3 OFC_167_F OFC_178_F	/
<b>Zmanjkalo vzorca</b>	OFC_004_C2 OFC_141_C2	OFC_004_C2 OFC_062_C1 OFC_141_C2	/
	<b>rs763754100</b>	<b>rs2235373</b>	<b>CM022409</b>
<b>Neuspela genotipizacija</b>	OFC_032_C3 OFC_032_F OFC_066_C1 OFC_071_C2 OFC_071_F OFC_093_F OFC_093_GM OFC_126_C2 OFC_126_F OFC_140_C2 OFC_140_F OFC_147_C1 OFC_167_C3 OFC_167_F OFC_167_GM OFC_167_UN	OFC_071_C2 OFC_093_F OFC_126_C2 OFC_126_F OFC_167_C3 OFC_167_F OFC_167_UN	
<b>Zmanjkalo vzorca</b>	OFC_004_C2 OFC_141_C2	OFC_004_C2 OFC_141_C2	OFC_004_C2 OFC_141_C2

Polimorfizma rs2013162 in rs763754100 sta sinonimni mutaciji (*ang. synonymous mutation*). Sinonimne mutacije so bile včasih znane kot tihe mutacije. Izraz se opušta, saj novejša raziskava potrjujejo, da lahko takšne mutacije kljub ohranitvi aminokislinskega zaporedja vplivajo na konformacijo in funkcijo proteinov, posledično pa lahko vplivajo tudi na pojav bolezni. Sinonimne mutacije lahko vplivajo na izrezovanje mRNA, stabilnost mRNA in posledično na ekspresijo proteinov ter encimsko aktivnost. Lahko vplivajo tudi na zvižanje proteinov in posledično na njihovo zmanjšano funkcijo, kar vodi v nastanek številnih obolenj (76). Za razliko od sinonimnih polimorfizmov v eksonih spadajo rs7552506, rs2235375 in rs2235373 med intronske mutacije (*ang. Intron variant*). Introni so nekodirajoči deli nukleotidnega zaporedja, ki imajo veliko vlogo pri izražanju genov. Njihova naloga je regulacija alternativnega izrezovanja intronov, pospešujejo ekspresijo genov, kontrolirajo transport mRNA ali sestavljanje komatina, mutacije v 5' in 3' UTR regijah pa lahko vplivajo na nesmiselno voden razpad (*ang. Nonsense Mediated Decay ali NMD*). Vloga NMD je zmanjševanje napak v ekspresiji genov z odstranjevanjem mRNA, ki vsebujejo prezgodnji stop kodon (97). Polimorfizem CM022409 je nesmiselna mutacija v eksonu 9, ki povzroči prezgodnji nastanek stop kodona in posledično krajši proteinski produkt (93).

#### **rs7552506 C>G (c.175-5 C>G)**

Sprememba nukleotidnega zaporedja c.175-5 C>G je intronski polimorfizem oziroma polimorfizem spojivnega mesta (*ang. Splice region variant*). Nahaja se v intronu 3 gena *IRF6*. Lokacija polimorfizma je 1:209796557. Nemutirani alel je C, mutirani pa G. MAF (*ang. Minor Allele Frequency*) vrednost nam pove frekvenco manj pogostega alela v populaciji. Za alel G ta znaša 0,27. Najvišji MAF za alel G je dokazan pri Britancih in znaša 0,41. Globalno je pogostost alela C približno pri 73 % populacije ter alela G pri približno 27 %. V evropski populaciji je pogostost nekoliko drugačna. Alel C se pojavlja pri 65 % populacije. Alel G je prisoten pri 35 % evropske populacije. Podatkov za slovensko populacijo nimamo, so pa nam najbližje dostopni podatki za italijansko. Pri Italijanih je prisotnost alela C in alela G primerljiva s podatki za Evropo (G 66 % in C 34 %). V primeru, da privzamemo podatke za Italijo, je pogostost mutiranega alela višja od svetovnega povprečja in primerljiva z evropskim povprečjem (93, 95). V bazi podatkov ClinVar so podatki o povezavi med alelom G in VWS. Klinični pomen povezave je klasificiran kot

benigen (94). Spremembe nukleotidnega zaporedja izven eksonov prav tako vplivajo na funkcijo proteina (76).

Polimorfizem smo analizirali *in silico* z bioinformatičnim orodjem za analizo mutacij spojivnega mesta MaxEntScan (98), ki je dostopno kot del aplikacije Variant Effect Predictor (95) na spletni strani Ensembl. MaxEntScan vsakemu spojivnemu mestu (*ang. Splice site*) pripiše določeno število točk, in sicer primerja spojivno mesto divjega tipa (referenčno) in mutirano spojivno mesto (alternativno). Večje kot je pripisano število točk, večja je verjetnost, da bo spojivno mesto uporabljeno pri izrezovanju intronov. V primeru polimorfizma c.175-5 C>G je MaxEntScan referenčnemu spojivnemu mestu pripisal 9,65 točk, alternativnemu pa 6,86. Iz tega sledi, da nastane več transkriptov divjega tipa kot alternativnih transkriptov. Ker pa je število točk za alternativni transkript relativno visoko, lahko pričakujemo, da se bo vsaj del transkriptov oblikoval po alternativnem načinu, kar lahko rezultira v abnormalnih proteinskih molekulah, to pa bi lahko imelo patološke posledice. V študiji švedskih družin z nesindromskimi CLP so ugotovili povezavo med alelom G polimorfizma rs7552506 in alelom A polimorfizma rs861019 z OFC (75). V študijah pri Ircih in Poljakih korelacije med rs7552506 in shizami zaradi prisotnosti genetskih sprememb pri zdravih posameznikih niso potrdili (99, 100).

V študiji družin smo določili genotip za polimorfizem rs7552506 pri 67 posameznikih. Od tega je 24 nemutiranih homozigotov, 33 heterozigotov in 10 mutiranih homozigotov. Genotipizacija ni uspela na vzorcih OFC\_071\_C2 in OFC\_126\_C2. Vzorcev OFC\_004\_C2 in OFC\_141\_C2 nam je zmanjkalo. Polimorfizem rs7552506 se v preiskovanih družinah fenotipsko različno izraža. Od nemutiranih homozigotov je deset (42 %) zdravih posameznikov, sedem bolnikov z diagnosticirano palatoshizo, štiri s heilognatopalatoshizo in tri s heiloshizo (skupaj 58 %). V skupini heterozigotov je deset zdravih (31 %), deset s palazoshizo, pet s heiloshizo, pet s heilognatopalatoshizo, dve s srčnimi boleznimi in ena z delno shizo (skupaj 69 %). Med mutiranimi homozigoti je šest (60 %) zdravih posameznikov, tri s heilognatopalatoshizami in en s heiloshizo (skupaj 40 %). Sklepamo, da polimorfizem rs7552506 sam po sebi najverjetneje ne povzroča OFC in najverjetneje ni povezan s tipom shize. Možno pa je, da omenjeni polimorfizem poveča tveganje za OFC v kombinaciji z drugimi polimorfizmi in/ali okoljskimi dejavniki tveganja.

### rs2013162 G>T (Ser153Ser)

Sprememba nukleotidnega zaporedja c.459 G>T se izraža kot sinonimni polimorfizem. V aminokislinskem zaporedju proteina, ki ga kodira gen *IRF6*, ni zamenjave aminokislinske serin na mestu 153 (Ser 153 Ser). Polimorfizem se nahaja v eksonu 5 gena *IRF6*. Lokacija je 1:209795339. Referenčni kodon divjega tipa je TCG, alternativni pa TCT. Oba kodirata aminokislino serin. Nemutirani alel je alel G, mutirani pa T. Globalno je pogostost alela G približno v 60 % populacije ter alela T v približno 40 % (MAF). Najvišji MAF za alel T je v populaciji prebivalcev Los Angelesa z mehiškimi koreninami in znaša 0,49. V evropski populaciji je pogostost alelov nekoliko drugačna, še vedno pa so podatki primerljivi z globalnimi. Alel G se pojavlja pri 64 %, alel T pri 36 % populacije. Podatkov za Slovenijo nimamo. Pri Italijanih je alel G pogostejši kot v evropski populaciji. Pojavlja se pri 66 %, alel T pa pri 34 % populacije (93, 95). Po podatkih iz arhiva ClinVar je alel T fenotipsko značilno povezan s tremi kliničnimi stanji: CLP, PPS in VWS. Polimorfizem je v vseh treh primerih klasificiran kot benignen (94). Nove raziskave kažejo na to, da na funkcijo proteina vplivajo tudi sinonimne mutacije, pri katerih ni spremembe v aminokislinskem zaporedju (76). Polimorfizem smo analizirali *in silico* z bioinformatičnim orodjem za analizo sinonimnih mutacij LoFtool (101), ki je dostopno kot del aplikacije Variant Effect Predictor (95) na spletni strani Ensembl. LoFtool vrednost za rs2013162 znaša 0,0332 (klasificirano kot verjetno škodljivo oz. *ang. probably damaging*), kar pomeni, da polimorfizem verjetno vpliva na potek translacije ter posledično na količino in/ali strukturo končnega proteinskega produkta (93).

V družinski študiji smo uspešno določili 60 genotipov. Genotipizacije niso bile uspešne na vzorcih OFC\_032\_C2, OFC\_071\_C2, OFC\_093\_F, OFC\_126\_C2, OFC\_126\_F, OFC\_167\_C3, OFC\_167\_UN, OFC178\_F. Polimorfizem rs2013162 se fenotipsko variabilno izraža. Od 60 genotipizacij smo določili 23 nemutiranih homozigotov, 32 heterozigotov in pet mutiranih homozigotov. Med nemutiranimi heterozigoti je 11 (48 %) zdravih posameznikov, šest bolnikov s palatoshizo, štiri s heilognatopalatoshizo, en z delno shizo desno in en s prirojenimi srčnimi boleznimi (skupaj 52 %). Od 32 heterozigotov je dvanajst (37,5 %) zdravih posameznikov, sedem pozameznikov s heiloshizo, sedem pozameznikov s palatoshizo, pet pozameznikov s heilognatopalatoshizo in en posameznik s srčno boleznijo (skupaj 62,5 %). Med mutiranimi homozigoti je en (20 %) zdrav preiskovanec, trije preiskovanci s palatoshizami in en s heiloshizo (skupaj 80 %).

Salahshourifar in sodel. navajajo, da se polimorfizem rs2013162 pojavlja v primerih unilateralnih CL, CP ter pri unilateralnih CLP. Zaključujejo, da se genotip fenotipsko variabilno izraža (102). Zanimivo je, da v naši preiskovani skupini bolnikov z OFC in njihovih sorodnikov incidenca obolelih posameznikov narašča s številom mutiranih alelov (52 % obolelih homozigotov divjega tipa, 62,5 % obolelih heterozigotov in 80 % obolelih mutiranih homozigotov). Ker pa se polimorfizem pojavlja tudi pri zdravih posameznikih, sklepamo, da rs2013162 sicer potencialno poveča tveganje za OFC, vendar ni samostojni genetski dejavnik tveganja, ampak deluje v sklopu multifaktorskega dedovanja, ki vključuje druge polimorfizme in gene ter vplive okolja.

#### **rs2235375 C>G (c.667+27 C>G)**

Sprememba nukleotidnega zaporedja c.667+27 C>G je intronski polimorfizem. Polimorfizem se nahaja v intronu 7 na kromosomu 1. Lokacija je 1:209792242. Alel divjega tipa je C, mutiran pa G. MAF vrednost za alel C znaša 0,41. Najvišji MAF za alel C je pri Bengalih v Bangladešu in znaša 0,49. Globalno je pogostost alela C pri približno 41 % populacije ter alela G pri približno 59 % populacije. V evropski populaciji je pogostost alelov nekoliko drugačna. Alel C se pojavlja manj pogosto, pri 36 %, alel G pa pri 64 % populacije. Podatkov za slovensko populacijo nimamo. Pri Italijanih je prisotnost alelov C in G primerljiva s podatki za Evropo. Alel C je prisoten pri 34 %, alel G pa pri 66 % populacije (93, 94). V bazi podatkov Ensembl in ClinVar ni podatkov o povezavi med polimorfizmom in kliničnimi stanji (93, 95).

Pri analizi družin smo ugotovili, da se genotip izraža fenotipsko variabilno. Od 71 uspešnih genotipizacij smo določili 27 nemutiranih homozigotov, 36 heterozigotov in osem mutiranih heterozigotov. Med nemutiranimi homozigoti je bilo štirinajst (52 %) zdravih družinskih članov, sedem članov s palatoshizami, štirje sheilognatopalatoshizami, en z delno shizo in en s prirojeno srčno boleznijo (skupaj 48 %). Med heterozigoti je bilo 13 (36 %) zdravih preiskovancev. Palatoshiza se pojavlja pri osmih, heiloshiza pri osmih in heilognatopalatoshiza pri šestih heterozigotih. En heterozigot pa ima srčno bolezen (skupaj 64 %). Med mutiranimi homozigoti sta dva (25 %) zdrava preiskovanca, trije s palatoshizami, dva s heilognatopalatoshizo in eden s heiloshizo (skupaj 75 %). Zdravi posamezniki imajo vse genotipe, zato lahko sklepamo, da se genotip izraža fenotipsko variabilno oziroma da povezave med polimorfizmom in orofacialnimi shizami ni, lahko pa je polimorfizem del multifaktorskega dedovanja OFC. Na to kaže tudi dejstvo, da so štiri

študije (71, 103, 104, 105) rs2235375 povezale z nastankom OFC, medtem ko ena študija te povezave ni potrdila (100).

#### **rs763754100 G>A (Ala174Ala)**

Sprememba nukleotidnega zaporedja c.522 G>A je sinonimni polimorfizem. Na mestu 174 ni zamenjave aminokislina alanin, kar pomeni, da se ohrani aminokislinsko zaporedje v proteinu, ki ga kodira gen *IRF6*. Referenčni kodon je GCG, alternativni pa GCA. Oba kodirata aminokislino alanin. Polimorfizem se nahaja v kromosomu 1 na mestu 1:209792414, in sicer v eksonu 6. Alel divjega tipa je G, poleg tega pa imamo še eno varianto, to je A. Vrednost MAF za alel A znaša manj kot 0,01; bolj natančno  $1,6 \times 10^{-5}$  (glede na bazo EVA EXAC (106), ki vključuje tudi 1000 Genomes). Za populacijsko genetiko je na voljo zelo malo podatkov. Podatki za svet in Evropo so enaki in kažejo na skoraj 100 % prisotnost alela G. To pomeni, da se polimorfizem pojavlja izjemno redko (93, 94). Zaradi pomanjkanja podatkov ni dokazane povezave polimorfizma s kakšnim kliničnim stanjem (95). LoFtool vrednost znaša 0,0332, kar pomeni, da ima polimorfizem patološki potencial (*ang. probably damaging*) (93).

Pri analizi družin smo uspešno genotipizirali 53 vzorcev. Od tega je 51 preiskovancev nemutiranih homozigotov. Le dva preiskovanca sta heterozigota, in sicer OFC\_032\_C1 in OFC\_062\_C1. Oba imata OFC, in sicer heiloshizo (OFC\_032\_C1) in palatoshizo s Pierre Robinovo sekvenco (OFC\_062\_C1). V družini OFC\_032 je polimorfizem odsoten pri zdravi bolnikovi materi (OFC\_032\_M) in pri njegovi sestri s palatoshizo (OFC\_032\_C2). V drugi družini je polimorfizem odsoten pri zdravi bolnikovi materi (OFC\_062\_M). Za preostale družinske člane žal nismo uspeli pridobiti vzorcev DNA. Zanimivo je, da se polimorfizem, ki je v splošni populaciji izjemno redek (0,0016 %), v naši preiskovani skupini družin z OFC pojavlja s frekvenco 4,5 %, torej 2813-krat pogosteje. Še bolj zanimivo je, da je prisoten pri dveh OFC bolnikih, ki nista v sorodu, ter da se pri zdravih družinskih članih ne pojavlja. Vse to kaže na zelo velik patološki potencial omenjenega polimorfizma. Za potrditev tega bi bilo potrebno izvesti nadaljnje funkcijske in populacijske študije.

#### **rs2235373 C>T (c.1060+37 C>T)**

Sprememba zaporedja c.1060+37 C>T je intronski polimorfizem. Polimorfizem se nahaja v intronu 8 gena *IRF6*, ki se nahaja na kromosomu 1. Lokacija je 1:209790458. Alel divjega tipa je T, alternativni pa C. MAF vrednost za alel T znaša 0,29. Najvišji MAF za alel T je v



populaciji vzhodne Azije in znaša 0,50. Na svetu je pogostost alela T pri približno 29 % populacije ter alela C približno 71 %. V evropski populaciji je pogostost alelov nekoliko drugačna. Alel T se pojavlja manj pogosto, pri 15 % populacije. Alel C je prisoten pri 85 % Evropejcih, kar je veliko nad svetovnim povprečjem. Podatkov za slovensko populacijo nimamo. Pri Italijanih je prisotnost alela T in alela C primerljiva s podatki za Evropo. Pogostost alela T je 14,5 %, alela C 85,5 % (93, 95). V bazi podatkov ClinVar ni podatkov o povezavi med polimorfizmom in kliničnimi stanji (94).

Pri genetski analizi družin smo naredili 63 uspešnih genotipizacij. Določili smo 48 nemutiranih homozigotov, 13 heterozigotov in dva mutirana homozigota. Med nemutiranimi homozigoti je 21 (44 %) zdravih družinskih članov, devet takšnih s palatoshizami, devet s heilognatopalatoshizami, šest s heiloshizami in en z delno shizo, dva preiskovanca pa imata srčno bolezen (skupaj 56 %). Med heterozigoti je pet (38,5 %) zdravih preiskovancev, pet s palatoshizami, dva s heiloshizami in en s heilognatopalatoshizo (61,5 %). Med mutiranimi homozigoti je preiskovanka OFC\_095\_M zdrava (50 %), preiskovanka OFC\_178\_M pa ima palatoshizo (50 %). Genotip se izraža fenotipsko variabilno, zato lahko sklepamo, da polimorfizem verjetno ni samostojni genetski dejavnik tveganja za OFC, ampak deluje v sklopu multifaktorskega dedovanja. Polimorfizem rs2235373 je bil v treh študijah povezan z nesindromskimi OFC (67, 107, 108).

### **CM022409 C>T (Arg412X)**

Za polimorfizem z oznako CM022409 v bazi Ensembl ni podatkov. Genotipe smo v tem primeru določevali samo s sekvenciranjem pri 23 preiskovancih. Od teh je samo en heterozigot (4,4 %), ostali so nemutirani homozigoti. Glede na kombinirane podatke baz 1000 Genomes in ESP5400, od skupno 12.984 preiskovancev v splošni populaciji niti pri enem niso našli polimorfizma CM022409, kar pomeni, da je ocenjena frekvenca mutiranega T alela  $<7,7 \times 10^{-5}$ . Pri tem polimorfizmu zaradi spremembe kodona, ki kodira arginin na mestu 412 v stop kodon, pride do predčasne prekinitve translacije, kar rezultira v krajšem proteinu IRF6. Spremenjeni protein je bolj podvržen razgradnji s proteasomom, kar vodi v zmanjšano število IRF6 molekul. Poleg tega naj bi sprememba strukture proteina IRF6 preprečila njegovo aktivacijo s fosforilacijo (109). Polimorfizem Arg412X so povezali z Van der Woudeovim sindromom (66). V naši študiji je imel edini posameznik s tem polimorfizmom OFC\_025\_C1 sum na Van der Woudeov sindrom, kar smo z genotipsko analizo tudi potrdili. Ker pri zdravi materi OFC\_025\_M polimorfizem ni prisoten, sklepamo,

da ga je bolnik podedoval od očeta s heilognatopalatoshizo, za katerega pa na žalost nismo uspeli pridobiti vzorca DNA.

## VPLIV VEČ POLIMORFIZMOV

Ugotavljali smo povezavo posameznega polimorfizma s pojavom shiz. Zanimalo nas je tudi, če je vpliv kombinacije več polimorfizmov pomemben za razvoj OFC. Vezavno neravnovesje (*ang. Linkage disequilibrium* ali *LD*) opisuje pojav, ko se aleli na dveh ali več različnih lokusih nenaključno dedujejo skupaj. Kombinacija dveh ali več SNP se imenuje haplotip. Če sta dva SNP-ja blizu, je verjetnost za genetsko rekombinacijo zelo majhna, kar pomeni, da se dedujeta skupaj. Vezavno neravnovesje opredelimo z Lewotinovim koeficientom  $D'$ , ki je v primeru popolnega LD enak 1 in indeksom  $r^2$ . Različne populacije imajo različne alelne frekvence SNP. LD se med populacijami razlikuje (110). V bazi podatkov Ensembl smo za italijansko populacijo našli podatke o LD med polimorfizmi rs7552506, rs2013162 in rs2235375 (93).

*Preglednica XXXIX: Vezavno neravnovesje v italijanski populaciji za polimorfizme rs7552506, rs2013162 in rs2235375 (vir: baza podatkov Ensembl)*

	rs7552506		rs2013162		rs2235375	
	$D'$	$r^2$	$D'$	$r^2$	$D'$	$r^2$
rs7552506	/	/	1,000	0,979	1,000	0,979
rs2013162	1,000	0,979	/	/	1,000	1,000
rs2235375	1,000	0,979	1,000	1,000	/	/

Razdalja med rs7552506 in rs2013162 je 1218 bp, med rs7552506 in rs2235375 4315 bp ter med rs2013162 in 2253575 3097 bp. Zaradi majhne razdalje med posameznimi SNP je manjša verjetnost za genetsko rekombinacijo. To povečuje verjetnost za pojav LD. Kot lahko vidimo iz preglednice, so polimorfizmi med seboj v močnem vezavnem neravnovesju, saj se vrednosti  $D'$  in  $r^2$  bližajo 1. Rezultatov ne moremo uporabiti za slovensko populacijo, ker alelne frekvence SNP verjetno niso iste kot pri Italijanih. Potrebno bi bilo narediti genotipizacijo na reprezentativnem vzorcu slovenske populacije in na rezultatih narediti študije LD.

V študiji družin smo določili kombinacijo genotipov **CC-GG-CC** na treh lokusih **rs7552506-rs2013162-rs2235375** pri 21 družinskih članih. Med njimi je deset (48 %) zdravih preiskovancev, sedem preiskovancev s palatoshizami, dva s

heilognatopalatoshizami, en z delno shizo desno in en s srčno boleznijo (skupaj 52 %). Pri 31 preiskovancih smo določili kombinacijo genotipov **CG-GT-CG**. Med njimi je 11 (35 %) zdravih preiskovancev, sedem s palatoshizami, pet s heilognatopalatoshizami, sedem s heiloshizami in en s prirojeno srčno napako (skupaj 65 %). Kombinacijo genotipov **GG-TT-GG** smo določili pri štirih preiskovancih. Od tega je en zdrav (25 %), dva imata palatoshizo in en heiloshizo (skupaj 75 %). Pri preostalih preiskovancih nam je zmanjkalo vzorcev ali pa so bile genotipizacije večkrat neuspešne. Za preiskovanca OFC\_167\_F in OFC\_167\_UN smo določili kombinacijo genotipov GG-XX-GG, pri OFC\_032\_C2 in OFC\_178\_F pa CC-XX-CC. Za vzorec OFC\_140\_F smo določili kombinacijo genotipov CC-GG-GG, za OFC\_167\_C1 CG-GG-CC, za OFC\_62\_C1 CG-XX-CG. Kombinacijo genotipov GG-XX-CG smo določili pri preiskovancih OFC\_093\_F in OFC\_126\_F, GG-GT-CG pri OFC\_032\_C3 ter GG-XX-CC pri OFC\_167\_C3. Preiskovanci OFC\_004\_C2, OFC\_141\_C2, OFC\_071\_C2 imajo kombinacijo genotipov XX-XX-CC, OFC\_126\_C2 pa XX-XXCG. Da bi določili, ali je vezavno neravnovesje med rs7552506, rs2013162 in rs2235375 v slovenski populaciji povezano z nastankom OFC, bi bilo potrebno narediti študijo na večjem številu vzorcev. Na ta način bi lahko preverili tudi, ali je genotip povezan s tipom shize. Kljub majhnemu številu vzorcev v naši preiskovani skupini pa lahko opazimo trend povezave med kombinacijo genotipov GG-TT-GG in povečano incidenco OFC, kombinacija genotipov CC-GG-CC pa naj bi imela zaščitni učinek. Povezavo haplotipov rs2013162 in rs2235375 s povečanim tveganjem za OFC je ugotovil Scapoli s sodel. (48), medtem ko novejša študija povezave haplotipov rs7552506, rs2013162 in rs2235375 s shizami ni potrdila (100).

## **OKOLJSKI DEJAVNIKI TVEGANJA**

V osmih preiskovanih družinah (33 %) so mame kadile med nosečnostjo ali pa so bivše kadilke. Kajenje med nosečnostjo kljub nasprotnemu rezultatu študij predstavlja enega največjih dejavnikov tveganja za nastanek OFC (23, 24, 27). V petih (21 %) preiskovanih družinah mame med nosečnostjo niso jemale folatov. Jemanje folatov med nosečnostjo je v številnih raziskavah opredeljeno kot zaščitni faktor pri pojavnosti shiz (28, 29, 30). Povišano telesno temperaturo je imelo pet (21 %) mam preiskovancev. Ena (4 %) od teh je v prvem trimesečju nosečnosti uporabljala savno. Obstaja povezava med povišanim tveganjem za nastanek shiz in povečano telesno temperaturo mater med nosečnostjo. Tveganje je še višje pri posameznicah, ki niso zniževale telesne temperature z antipiretiki (41). Faktor tveganja

predstavlja tudi jemanje določenih zdravil. Preiskovanka OFC\_126\_M je jemala Pulmicort® in Ventolin®, preiskovanka OFC\_141\_M Oспен®, preiskovanki OFC\_147\_M in OFC\_179\_C1 pa Amoksiklav®. Rezultati raziskav, ki proučujejo povezavo med uporabo kortikosteroidov in nastankom shiz, niso enotni. Povezava večinoma ni dokazana (34, 35). Obstajajo dokazi za povezavo med uporabo bronhodilatatorjev in amoksicilna ter povišanim tveganjem za nastanek OFC (33, 37). Na embriološki razvoj ploda lahko vpliva nosečniška sladkorna bolezen, ki je bila prisotna v družini OFC\_144 (14, 16, 40). Preiskovanec OFC\_179\_C1 je bil *in utero* izpostavljen rentgenskim žarkom, OFC\_004\_C1 pa pesticidom. Tudi to sta dva okoljska dejavnika tveganja, ki povečujeta možnost nastanka OFC (1). Zanimivo bi bilo preveriti vpliv kombinacije okoljskih in genetskih dejavnikov tveganja na večji skupini preiskovancev z orofacialnimi shizami in testni skupini zdravih posameznikov.

Da bi našo študijo nadgradili, bi bilo potrebno pridobiti še vzorce ostalih družinskih članov s shizami in dodatne vzorce preiskovancev, predvsem tiste, ki nam jih je zmanjkalo. Na ta način bi naredili popolno družinsko analizo. Prav tako bi bilo potrebno optimizirati sonde za HRM analizo mutacije pod oznako CM022409. Nadaljnje raziskovanje vpliva polimorfizmov na nastanek orofacialnih shiz bi naredili na večji skupini otrok in njihovih družinskih članov ter na kontrolni skupini zdravih otrok in njihovih družinskih članov. V študiji bi lahko preverjali vpliv različnih okoljskih dejavnikov na pojav shiz, kot so kadilski status matere, zaužitje folne kisline med nosečnostjo, povišana telesna temperatura med nosečnostjo, starost matere pri porodu, telesna teža matere in jemanje zdravil med nosečnostjo. Lahko bi naredili še študijo LD, kjer bi ugotavljali vpliv vezanega dedovanja polimorfizmov na razvoj OFC.

## 6. SKLEPI

V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti morebitno prisotnost sprememb nukleotidnega zaporedja v kodirajočih odsekih gena *IRF6* in njihovi neposredni okolici pri bolnikih z orofacialnimi shizami v slovenski populaciji. V primarni skupini 24 OFC bolnikov s pozitivno družinsko anamnezo smo s pomočjo sekvenciranja odkrili šest polimorfizmov. Genotip za posamezne polimorfizme smo določili še pri ostalih družinskih članih, za katere smo imeli na voljo vzorce DNA. Naredili smo družinsko študijo.

### Naše ugotovitve so naslednje:

- V slovenski populaciji bolnikov z OFC se v kodirajočih regijah gena *IRF6* in njihovi neposredni okolici pojavlja šest različnih polimorfizmov z oznakami rs7552506, rs2013162, rs2235375, rs763754100, rs2235373 in CM022409. Polimorfizma rs763754100 in CM022409 sta zelo redka. CM022409 je povezan z Van der Woudeovim sindromom.
- Nesmiselni polimorfizem CM022409 (Arg412X), ki ga povezujejo z Van der Woudeovim sindromom, je v splošni populaciji izredno redek, v naši kohorti pa je bil prisotna pri enem bolniku s sumom na Van der Woudeov sindrom.
- Sinonimni polimorfizem rs763754100 (Ala174Ala), ki še ni bil povezan z nobenim fenotipom, je v naši preiskovani kohorti OFC bolnikov skoraj 3000-krat pogostejši kot v splošni populaciji. Poleg tega je bil prisoten le pri dveh nesorodnih OFC bolnikih, ne pa pri njunih zdravih družinskih članih. Vse to kaže na velik patološki potencial tega polimorfizma.
- Sinonimni polimorfizem rs2013162 (Ser 153Ser), ki je bila v predhodnih študijah povezan z nesindromskimi OFC, se je v naši kohorti pojavljal tako pri zdravih kot obolelih družinskih članih, vendar se je pri teh pojavljal pogosteje. To kaže na patološki potencial polimorfizma v sklopu multifaktorskega dedovanja.
- Polimorfizem spojivnega mesta rs7552506 (c.175-5 C>G), ki je bil predhodno povezan z nesindromskimi OFC, v naši kohorti ni izkazoval povezave z OFC in je bil enakomerno porazdeljen med zdrave in obolele družinske člane. Možno je, da polimorfizem prispeva k multifaktorskim modelom dedovanja OFC.
- Intronska polimorfizma rs2235373 (c.1060+37 C>T) in rs2235375 (c.667+27 C>G), ki sta bila predhodno povezana z nesindromskimi OFC, v naši kohorti kažeta trend

povezanosti z OFC, čeprav sta prisotna tako pri zdravih kot obolelih posameznikih. Polimorfizma imata verjetno manjši prispevek k multifaktorskemu dedovanju OFC.

- Polimorfizem spojitvenega mesta rs7552506, sinonimni polimorfizem rs2013162 in intronski polimorfizem rs2235375 se v naši kohorti (in drugih populacijah) dedujejo vezano. V naši kohorti je kombinacija genotipov GG-TT-GG pogostejša pri bolnikih z OFC, čeprav se pojavlja tudi pri zdravih posameznikih.
- Vsi ugotovljeni polimorfizmi z izjemo CM022409 in rs763754100 kažejo na multifaktorski način dedovanja, pri čemer se njihov vpliv sešteva z vplivom drugih polimorfizmov in okoljskih dejavnikov tveganja.
- CM022409 ima monogensko dedovanje z avtosomno dominantnim vzorcem.
- rs763754100 nakazuje na možnost monogenskega dedovanja ali multifaktorskega dedovanja z razmeroma velikim deležem vpliva na pojav OFC.

## 7. VIRI IN LITERATURA:

- (1) Kawalec A., Nelke K., Pawlas K., Gerber H.: Risk factors involved in orofacial cleft predisposition – review. *Open Medicine*. 2015; 10(1): 163–175.
- (2) Koželj V.: Računalniški informacijski sistem za spremljanje orofacialnih shiz v Sloveniji kot vir za epidemiološko analizo obdobj 1973–1993 in 1993–2012. *Zobozdravstveni vestnik*. 2015; 70: 135–142.
- (3) Wehby G., Cassell C.: The Impact of Orofacial Clefts on Quality of Life and Health Care. *Oral Diseases*. 2010; 16(1): 3–10.
- (4) Gašperšič D., Košir N., Jevnikar N.: Razvoj obraza, ustne votline in zobnega organa. Medicinska fakulteta v Ljubljani, Ljubljana, 2002: 7–14.
- (5) Posnick JC.: *Orthognathic Surgery: Principles and Practice*. 1st edition. Saunders. United States, 2013: 77–91.
- (6) Fonseca RJ., Marciani R., Turvey T.: *Oral and Maxillofacial Surgery, Volume III*. 2nd edition. Saunders, United States, 2008: 713–716.
- (7) Miloro M., Ghali GE., Larsen P., Waite P.: *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*, 3rd edition. People's Medical Publishing House, Shelton Connecticut, USA, 2011: 945–949.
- (8) Venkatesh R.: Syndromes and anomalies associated with cleft. *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2009; 42: 51–55.
- (9) Mossey PA., Modell B.: Epidemiology of Oral Clefts 2012: An International Perspective. *Frontiers of Oral Biology*. 2012; 16: 1–18.
- (10) Singh D., Bastian TS., Kudva S., Singh MK., Sharma P.: Classification Systems for Orofacial Clefts: *Oral & Maxillofacial Pathology Journal*. 2015; 6(1): 556–560.
- (11) Mednarodna klasifikacija bolezni in sorodnih zdravstvenih problemov za statistične namene, Avstralska modifikacija, Verzija 6, [http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/podatki/klasifikacije\\_sifranti/mkb/mkb-10-am-v6\\_v03\\_splet.pdf](http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/podatki/klasifikacije_sifranti/mkb/mkb-10-am-v6_v03_splet.pdf). Dostopno: avgust 2018.

- (12) Allori AC., Cragan JD., Della Porta GC., Mulliken JB., Meara JG., Bruun R., Shusterman S., Cassell CH., Raynor E., Santiago P., Marcus JR.: Clinician's Primer to ICD-10-CM Coding for Cleft Lip/Palate Care. *The Cleft Palate Craniofacial Journal*. 2017; 54(1): e7–e13.
- (13) McBride WA., McIntyre GT., Carroll K., Mossey PA.: Subphenotyping and Classification of Orofacial Clefts: Need for Orofacial Cleft Subphenotyping Calls for Revised Classification. *Cleft Palate Craniofacial Journal*, 2016; 53(5): 539–49.
- (14) Watkins SE., Meyer RE., Strauss RP., Aylsworth AS.: Classification, Epidemiology, and Genetics of Orofacial Clefts. *Clinics in Plastic Surgery*. 2014; 41(2): 149–63.
- (15) Dixon MJ., Marazita ML., Beaty TH., Murray JC.: Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences. *Nature Reviews Genetics*. 2011; 12(3): 167–178.
- (16) Magdalenić-Meštrović M., Bagatin M.: An Epidemiological Study of Orofacial Clefts in Croatia 1988–1998. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* (2005), 33, 85–90.
- (17) Derijcke A., Eerens A., Carels C.: The incidence of oral clefts: a review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1996; 34(6): 488–94.
- (18) Shaw GM., Croen LA., Curry CJ.: Isolated oral cleft malformations: associations with maternal and infant characteristics in a California population. *Teratology* 1991; 43(3): 225–28.
- (19) Baird PA., Sadovnick AD., Yee IML.: Maternal Age and Oral Cleft Malformations: Data From a Population-Based Series of 576,815 Consecutive Livebirths. *Teratology* 1994; 49: 448–51.
- (20) Berg E., Lie RT., Sivertsen A., Haaland ØA.: Parental age and the risk of isolated cleft lip: a registry-based study. *Annals of Epidemiology*. 2015; 25(12): 942–47.
- (21) Correia de Queiroz Herkrath AP., Herkrath FJ., Bessa Rebelo MA, Vettore MV.: Parental age as a risk factor for non-syndromic oral clefts: A meta-analysis. *Journal of dentistry*. 2012; 40(1): 3–14.
- (22) Bille C., Skytthe A., Vach W., Knudsen LB., Nybo Andersen AM., Murray JC., Christensen K.: Parent's Age and the Risk of Oral Clefts. *Epidemiology* 2005; 16(3): 311–16.



- (23) Molina-Solana R., Yanez-Vico RM., Iglesias-Linares A., Mendoza-Mendoza A., Solano-Reina E.: Current Concepts on the Effect of Environmental Factors on Cleft Lip and Palate. *Int Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013; 42(2): 177–84.
- (24) Leite IC., Koifman S.: Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Oral Research*. 2009; 23(1): 31–37.
- (25) Romitti PA., Sun L., Honein MA., Reefhuis J., Correa A., Rasmussen SA.: Maternal periconceptional alcohol consumption and risk of orofacial clefts. *American Journal of Epidemiology*. 2007; 166(7): 775–785.
- (26) Shaw GM., Lammer EJ.: Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts. *The Journal of Pediatrics*. 1999; 134(3): 298–303.
- (27) Sabbagh HJ., Hassan MHA., Innes NPT., Elkodary HM., Little J., Mossey PA.: Passive Smoking in the Etiology of Non-Syndromic Orofacial Clefts: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2015; 10(3).
- (28) Wehby G., Murray JC.: Folic Acid and Orofacial Clefts: A Review of the Evidence. *Oral diseases*. *Oral Diseases*. 2010; 16(1): 11–19.
- (29) Li S., Chao A., Li Z., Moore CA., Liu Y., Zhu J., Erickson JD., Hao L., Berry RJ.: Folic Acid Use and Nonsyndromic Orofacial Clefts in China: A Prospective Cohort Study. *Epidemiology*. 2012; 23(3): 423–32.
- (30) Figueiredo RF., Figueiredo N., Feguri A., Bieski I., Mello R., Espinosa M., Damazo AS.: The role of the folic acid to the prevention of orofacial cleft: an epidemiological study. *Oral Diseases*. 2014; 21(2): 240–47.
- (31) Hozyasz KK., Kaczmarczyk M., Dudzik J., Bulska E., Dudkiewicz Z., Szymanski M.: Relation between the concentration of zinc in maternal whole blood and the risk of an infant being born with an orofacial cleft. *The British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2009; 47(6): 466–469.
- (32) Wu T., Liang KY., Hetmanski JB.: Evidence of gene-environment interaction for the IRF6 gene and maternal multivitamin supplementation in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate. *Human genetics*. 2010; 128(4): 401–10.

- (33) Munsie JW., Lin S., Browne ML., Campbell KA., Caton AR., Bell EM., Rasmussen SA., Romitti PA., Druschel CM.: Maternal bronchodilator use and the risk of orofacial clefts. *Human Reproduction*. 2011; 26(11): 3147–54.
- (34) Skuladottir H., Wilcox AJ., Ma C., Lammer EJ., Rasmussen SA., Shaw GM., Carmichael SL.: Corticosteroid use and risk of orofacial clefts. *Birth Defects Research Part A, Clinical and Molecular Teratology*. 2014; 100(6): 499–506.
- (35) Hviid A., Mølgaard-Nielsen D.: Corticosteroid use during pregnancy and risk of orofacial clefts. *Canadian Medical Association Journal*. 2011; 183(7): 796–804.
- (36) Mølgaard-Nielsen D., Hviid A.: Maternal use of antibiotics and the risk of orofacial clefts: a nationwide cohort study. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. 2012; 21(3): 246–53.
- (37) Lin KJ., Mitchell AA., Yau W-P., Louik C., Hernández-Díaz S.: Maternal Exposure to Amoxicillin and the Risk of Oral Clefts. *Epidemiology*. 2012; 23(5): 699–705.
- (38) Dolk H., Jentink J., Loane M., Morris J. de Jong-van den Berg LT.: Does lamotrigine use in pregnancy increase orofacial cleft risk relative to other malformations? *Neurology*. 2008; 71(10): 714–22.
- (39) Werler MM., Ahrens KA., Bosco JLF., Mitchell AA., Anderka MT., Gilboa SM., Holmes LB.: Use of Antiepileptic Medications in Pregnancy in Relation to Risks of Birth Defects. *Annals of Epidemiology*. 2011; 21(11): 842–50.
- (40) Kutbi H., Wehby GL., Moreno Uribe LM., Romitti PA., Carmichael S., Shaw GM., Olshan AF., DeRoo L., Rasmussen SA., Murray JC., Wilcox A., Lie RT., Munger RG.: Maternal underweight and obesity and risk of orofacial clefts in a large international consortium of population-based studies. *International Journal of Epidemiology*. 2017 Feb; 46(1): 190–99.
- (41) Shahrukh Hashmi S., Gallaway MS., Waller DK., Langlois PH., Hecht JT.: Maternal fever during early pregnancy and the risk of oral clefts. *Birth Defects Research (Part A), Clinical and Molecular Teratology*. 2010; 88(3): 186–94.
- (42) 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., Lacey 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.

(43) Marazita ML.: The Evolution of Human Genetic Studies of Cleft Lip and Cleft Palate. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2012; 13: 263–83.

(44) Murthy J., Bhaskar LVKS.: Current concepts in genetics of nonsyndromic clefts. *Indian Journal of Plastic Surgery : Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India*. 2009; 42(1): 68–81.

(45) Stuppia L., Capogreco M., Marzo G., La Rovere D., Antonucci I., Gatta V., Palka G., Mortellaro C., Tete S.: Genetics of Syndromic and Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2011; 22: 1722–26.

(46) Yuana Q., Blantonb SH., Hechta JT.: Genetic Causes of Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate. *Advances in Otorhinolaryngology*. 2011; 70: 107–13.

(47) Ghassibe' M., Revencu N., Bayet B., Gillerot Y., Vanwijck R., Verellen-Dumoulin C., Vikkula M.: Six families with Van der Woude and/or popliteal pterygium syndrome: all with a mutation in the IRF6 gene. *Journal of Medical Genetics*. 2004; 41(2): e15.

(48) Carinci F., Scapoli L., Palmieri A., Zollino I., Pezzetti F.: Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2007; 71(10): 1509–19.

(49) Murray JC.: Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clinical Genetics*. 2002 April; 61(4): 248–56.

(50) Genetics Home Reference, IRF6 gene, <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/IRF6#sourcesforpage>. Dostopno: julij, 2018.

(51) Yanai H., Negishi H., Taniguchi T.: The IRF family of transcription factors: Inception, impact and implications in oncogenesis. *Oncoimmunology*. 2012; 1(8): 1376–86.

(52) NCBI Gene, IRF6, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3664>. Dostopno: julij, 2018.

(53) Kousa YA., Schutte BC.: Toward an Orofacial Gene Regulatory Network. *Developmental dynamics*. 2015; 245(3): 220–32.

- (54) Ingraham CR., Kinoshita A., Kondo S., Yang B., Sajan S., Trout KJ., Malik MI., Dunnwald M., Goudy SL., Lovett M., Murray JC., Schutte BC.: Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). *Nature genetics*. 2006; 38(11): 1335–40.
- (55) Richardson RJ., Dixon J., Malhotra S., Hardman MJ., Knowles L., Boot-Handford RP., Shore P., Whitmarsh A., Dixon MJ.: Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nature Genetics*. 2006; 38(11): 1329–34.
- (56) Biggs LC., Rhea L., Schutte BC., Dunnwald M.: Interferon Regulatory Factor 6 is necessary but not sufficient for keratinocyte differentiation. *The Journal of investigative dermatology*. 2012; 132(1): 50–58.
- (57) Thomason HA., Zhou H., Kouwenhoven EN., Dotto GP., Restivo G., Nguyen BC., Little H., Dixon MJ., van Bokhoven H., Dixon J.: Cooperation between the transcription factors p63 and IRF6 is essential to prevent cleft palate in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120(5): 1561–69.
- (58) Moretti F., Marinari B., Lo Iacono N., Botti E., Giunta A., Spallone G., Garaffo G., Vernersson-Lindahl E., Merlo G., Mills AA., Ballarò C., Alemà S., Chimenti S., Guerrini L., Costanzo A.: A regulatory feedback loop involving p63 and IRF6 links the pathogenesis of 2 genetically different human ectodermal dysplasias. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120(5): 1570–77.
- (59) Gritli-Linde A.: p63 and IRF6: brothers in arms against cleft palate. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120(5): 1386–89.
- (60) Biggs LC., Naridze RL., DeMali KA., Lusche DF., Kuhl S., Soll DR., Schutte BC., Dunnwald M.: Interferon regulatory factor 6 regulates keratinocyte migration. *Journal of Cell Science*. 2014; 127(13): 2840–48.
- (61) Bailey CM., Abbott DE., Margaryan NV., Khalkhali-Ellis Z., Hendrix MJC.: Interferon Regulatory Factor 6 Promotes Cell Cycle Arrest and Is Regulated by the Proteasome in a Cell Cycle-Dependent Manner. *Molecular and Cellular Biology*. 2008; 28(7): 2235–43.
- (62) Bailey CM., Hendrix MJC.: IRF6 in Development and Disease: A Mediator of Quiescence and Differentiation. *Cell cycle*. 2008; 7(13): 1925–30.

- (63) Leslie EJ., Standley J., Compton J., Bale S., Schutte BC., Murray JC.: Comparative analysis of IRF6 variants in families with Van der Woude syndrome and popliteal pterygium syndrome using public whole-exome databases. *Genetics in Medicine*. 2013; 15(5): 338–44.
- (64) Little HJ., Rorick NK., Su L-I., Baldock C., Malhotra S., Jowitt T., Gakhar L., Subramanian R., Schutte BC., Dixon MJ., Shore P.: Missense mutations that cause Van der Woude syndrome and popliteal pterygium syndrome affect the DNA-binding and transcriptional activation functions of IRF6. *Human Molecular Genetics*. 2009; 18(3): 535–45.
- (65) Ferreira de Lima RLL., Hoper SA., Ghassibe M. et al.: Prevalence and non-random distribution of Exonic mutations in Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6) in 307 families with Van der Woude syndrome and 37 families with popliteal pterygium syndrome. *Genetics in medicine*. 2009; 11(4): 241–47.
- (66) Kondo S., Schutte BC., Richardson RJ. et al.: Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nature genetics*. 2002; 32(2): 285–89.
- (67) Park JW., McIntosh I., Hetmanski JB., Jabs EW., Vander Kolk CA., Wu-Chou YH., Chen PK., Chong SS., Yeow V., Jee SH., Park BY., Fallin MD., Ingersoll R., Scott AF., Beaty TH.: Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. *Genetics in Medicine*. 2007; 9(4): 219–27.
- (68) Vieira AR., McHenry TG., Daack-Hirsch S., Murray JC., Marazita ML.: Candidate gene loci studies in cleft lip palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts. *Genetics in Medicine*. 2008; 10(9): 668–74.
- (69) Zuccherro TM., Cooper ME., Maher BS., Daack-Hirsch S., Nepomuceno S., Ribeiro L., Caprau D., Christensen C., Suzuki Y., Machida J., Natsume N., Yoshiura KI., Vieira AR., Ieda M., Orioli IM., Castilla EE., Moreno L., Arcos-Burgos M., Lidral AC., Field L., Liu Y., Ray A., Goldstein TH., Schultz RE., Shi M., Johnson MK., Kondo S., Schutte BC., Marazita ML., Jeffrey C., Murray JC.: Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6) Gene Variants and the Risk of Isolated Cleft Lip or Palate. *New England Journal of Medicine*. 2004; 351: 769–80.

- (70) Blanton SH., Cortez A., Stal S., Mulliken JB., Finnell RH., Hecht JT.: Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *American Journal of Medical Genetics*. 2005; 137(3): 259–62.
- (71) Scapoli L., Palmieri A., Martinelli M., Pezzetti F., Carinci P., Tognon M., Carinci F.: Strong Evidence of Linkage Disequilibrium between Polymorphisms at the IRF6 Locus and Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate, in an Italian Population. *American Journal of Human Genetics*. 2005; 76(1): 180–83.
- (72) Park JW., McIntosh I., Hetmanski JB., Jabs EW., Vander Kolk CA., Wu-Chou YH., Beaty TH.: Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. *Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. 2007; 9(4): 219–27.
- (73) Jugessur A., Rahimov F., Lie RT., Wilcox AJ., Gjessing HK., Nilsen RM., Murray JC.: Genetic Variants in IRF6 and the Risk of Facial Clefts: Single-Marker and Haplotype-Based Analyses in a Population-Based Case-Control Study of Facial Clefts in Norway. *Genetic Epidemiology*. 2008; 32(5): 413–24.
- (74) Ghassibé M., Bayet B., Revencu N., Verellen-Dumoulin C., Gillerot Y., Vanwijck R., Vikkula M.: Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population. *European Journal of Human Genetics*. 2005; 13: 1239–42.
- (75) Pegelow M., Peyrard-Janvid M., Zucchelli M., Fransson I., Larson O., Kere J., Larsson C., Karsten A.: Familial non-syndromic cleft lip and palate – analysis of the IRF6 gene and clinical phenotypes. *European Journal Orthodontics*. 2008; 30(2): 169–75.
- (76) Sauna ZE., Kimchi-Sarfaty C.: Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2011; 12(10): 683–91.
- (77) MasterPure™ DNA Purification Kit Manual, <http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/masterpure-dna-purification-kit.pdf?sfvrsn=6>. Dostopno: julij, 2018.
- (78) NanoDrop One User guide, <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-UG-en.pdf>. Dostopno: julij, 2018.

- (79) Černe D., Ostanek B., Lukač-Bajalo J., Marc J.: Biomedicinska analitika I: Učbenik za študente laboratorijske biomedicine. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 78–86, 108–47.
- (80) Joshi M., Deshpande JD.: Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*. 2010; 1(5): 81–97.
- (81) Rychlik W., Spencer WJ., Rhoads RE.: Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*. 1990; 18(21): 6409–12.
- (82) Viljoen GJ., Nel LH., Crowther JR.: *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Springer, Dordrecht, 2005: 43–45.
- (83) King N.: *RT-PCR Protocols: Second Edition*. Springer, 2010; 301–16.
- (84) Wilson K., Walker J.: *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 7th edition. Cambridge University Press, United Kingdom, 2010: 399–426.
- (85) Bishop ML., Fody EP., Schoeff L.: *Clinical Chemistry*. 6th edition, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2010: 145–47.
- (86) Lee PY., Costumbrado J., Hsu CY., Kim YH.: Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 2012; (62): 3923.
- (87) Stellwagen NC.: Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*. 2009; 30(1): 188–95.
- (88) Yilmaz M., Ozic C., Gok I.: Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. *Gel electrophoresis – Principles and Basics*. 2012. InTech; <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-andbasics/principles-of-nucleic-acid-separation-by-agarose-gel-electrophoresis>. Dostopno: september, 2018.
- (89) Heather JM., Chain B.: The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016; 107(1): 1–8.
- (90) Taylor CF.: Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochemical Society Transactions*. 2009; 37(2): 433–7.
- (91) Roche Applied Science Technical note, [https://biochimie.umontreal.ca/wp-content/uploads/sites/37/2015/11/assay\\_formats.pdf](https://biochimie.umontreal.ca/wp-content/uploads/sites/37/2015/11/assay_formats.pdf). Dostopno: julij, 2018.

(92) BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Zadnjič dostopno: 25. 8. 2018.

(93) Ensembl Genome Browser 93, <https://www.ensembl.org/index.html>. Zadnjič dostopno: 25. 8. 2018.

(94) ClinVar-NCBI-NIH, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Zadnjič dostopno: 25. 8. 2018.

(95) Variant Effect Predictor (Ensembl), <https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>. Zadnjič dostopno: 25. 8. 2018.

(96) Progeny Free Online Pedigree Tool, <https://www.progenygenetics.com/online-pedigree/>. Zadnjič dostopno: 25. 8. 2018.

(97) Jo BS., Choi SS.: Introns: The Functional Benefits of Introns in Genomes. *Genomics Informatics*. 2015; 13(4): 112–8.

(98) Yeo G., Burge CB.: Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 2004; 11(2–3): 377–94.

(99) Carter TC., Molloy AM., Pangilinan F., Troendle JF., Kirke PN., Conley MR., Orr DJ., Earley M., McKiernan E., Lynn EC., Doyle A., Scott JM., Brody LC., Mills JL.: Testing reported associations of genetic risk factors for oral clefts in a large Irish study population. *Birth Defects Research. Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2010; 88(2): 84–93.

(100) Charzewska A., Obersztyn E., Hoffman-Zacharska D., Lenart J., Poznański J., Bal J.: Novel Mutations in the IRF6 Gene on the Background of Known Polymorphisms in Polish Patients With Orofacial Clefting. *Cleft Palate Craniofacial Journal*. 2015; 52(5): 161–67.

(101) Fadista J., Oskolkov N., Hansson O., Groop L.: LoFtool: a gene intolerance score based on loss-of-function variants in 60706 individuals. *Bioinformatics* 2017; 33(4): 471–74.

(102) Salahshourifar I., Wan Sulaiman WA., Halim AS., Zilfalil BA.: Mutation screening of IRF6 among families with non-syndromic oral clefts and identification of two novel variants: Review of the literature. *European Journal of Medical Genetics*. 2012; 55(6–7): 389–93.



- (103) Huang Y., Wu J., Ma J., Beaty TH., Sull JW., Zhu L., Lu D., Wang Y., Meng T., Shi B.: Association between IRF6 SNPs and oral clefts in West China. *J Dent Res.* 2009; 88(8): 715–8.
- (104) Ibarra-Arce A., García-Álvarez M., Cortés-González D., Ortiz de Zarate-Alarcón G., Flores-Peña L., Sánchez-Camacho S., Arenas-Díaz S., Romero-Valdovinos M., Olivo-Díaz A.: IRF6 polymorphisms in Mexican patients with non-syndromic cleft lip. *Meta Gene.* 2015; 4: 8–16.
- (105) Gurramkonda VB., Syed AH., Murthy J., Lakkakula BVKS.: IRF6 rs2235375 singlenucleotide polymorphism is associated with isolated non-syndromic cleft palate but not with cleft lip with or without palate in South Indian population. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2018; 84(4): 473–77.
- (106) Exome Aggregation Consortium – ExAC Browser, <http://exac.broadinstitute.org/about>. Zadnjič dostopno: avgust, 2018.
- (107) Mijiti A., Ling W., Guli, Moming A.: Association of single-nucleotide polymorphisms in the IRF6 gene with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Xinjiang Uyghur population. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 53(3): 268–74.
- (108) Jia ZL., Li Y., Li L., Wu J., Zhu LY., Yang C., Chen CH., Shi B.: Association among IRF6 polymorphism, environmental factors, and nonsyndromic orofacial clefts in western china. *DNA Cell Biol.* 2009; 28(5): 249–57.
- (109) Kwa MQ., Huynh J., Reynolds EC., Hamilton JA., Scholz GM.: Disease-associated mutations in IRF6 and RIPK4 dysregulate their signalling functions. *Cell Signal.* 2015; 27(7): 1509–16.
- (110) Encyclopedia of Cancer, Linkage Disequilibrium, [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-16483-5\\_3368](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-16483-5_3368). Dostopno: julij, 2018.

## 8. PRILOGE

### Priloga 1: Družinska drevesa družin, vključenih v študijo

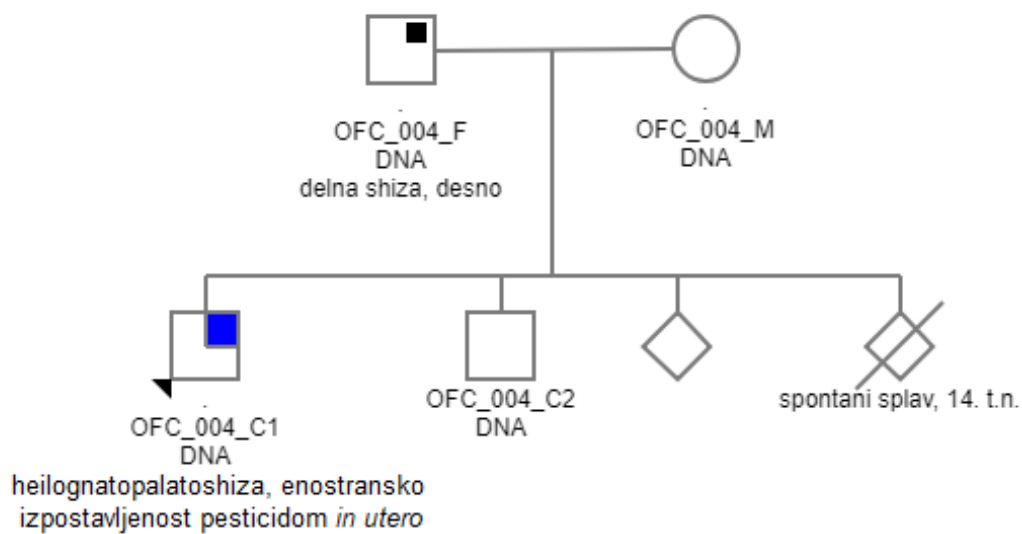
OFC\_004  
5/26/18



delna shiza, desno



heilognatopalatoshiza



Ostale opombe: mamina nečakinja ima defekt septuma (CHD)

Okoljski dejavniki tveganja: mama je bivša kadilka

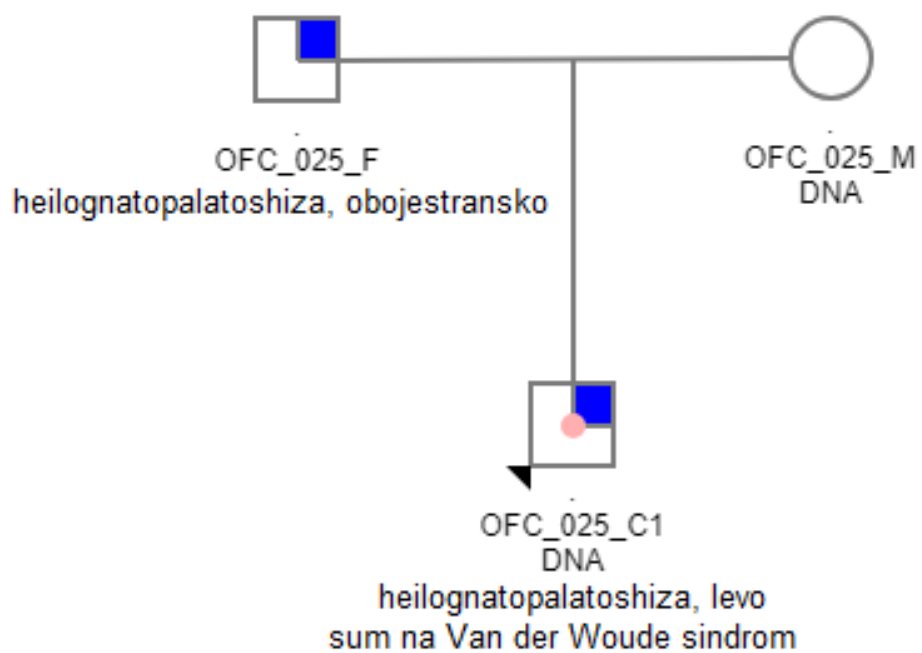
OFC\_025  
5/26/18



heilognatopalatoshiza



sum na Van der Woude sindrom



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: bp

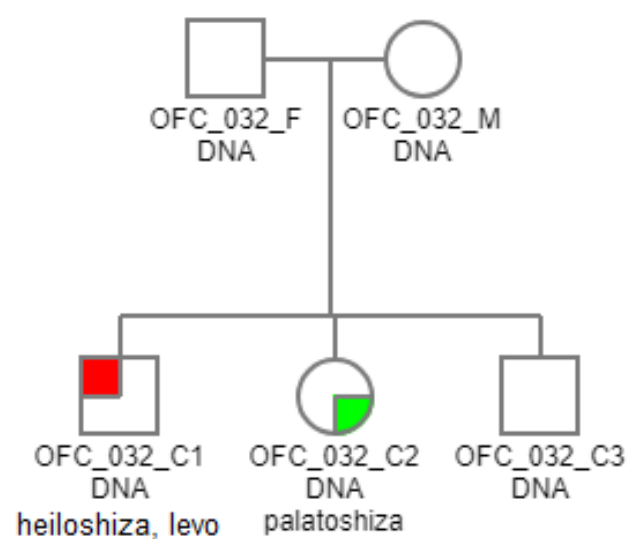
OFC\_032  
6/9/18



heiloshiza



palatoshiza



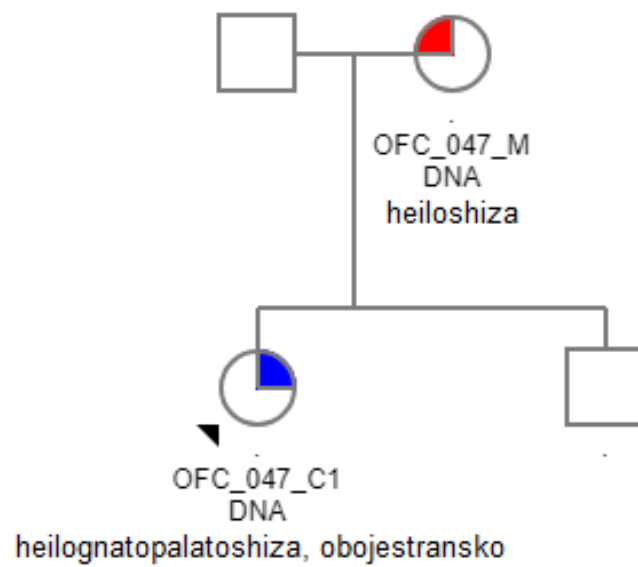
OFC\_047  
5/26/18



heiloshiza



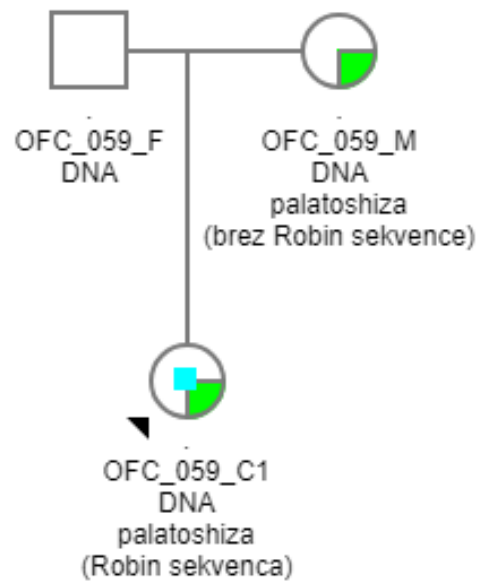
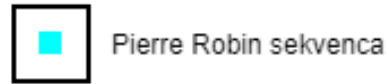
heilognatopalatoshiza



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: savna v 1. trimestru

OFC\_059  
5/26/18



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: mama kadilka, mama ni jemala folne kisline v 1. trimestru nosečnosti

OFC\_062  
5/26/18



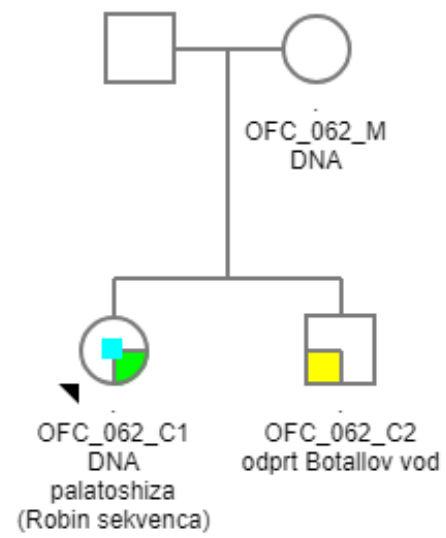
palatoshiza



srčne bolezni



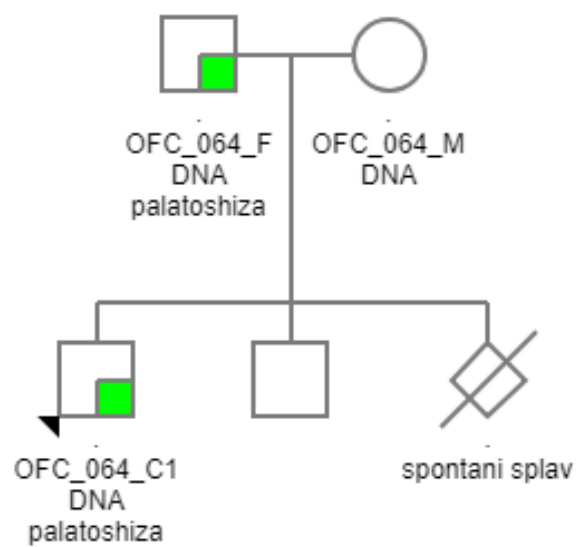
Pierre Robin sekvenca



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: bp

OFC\_064  
5/26/18

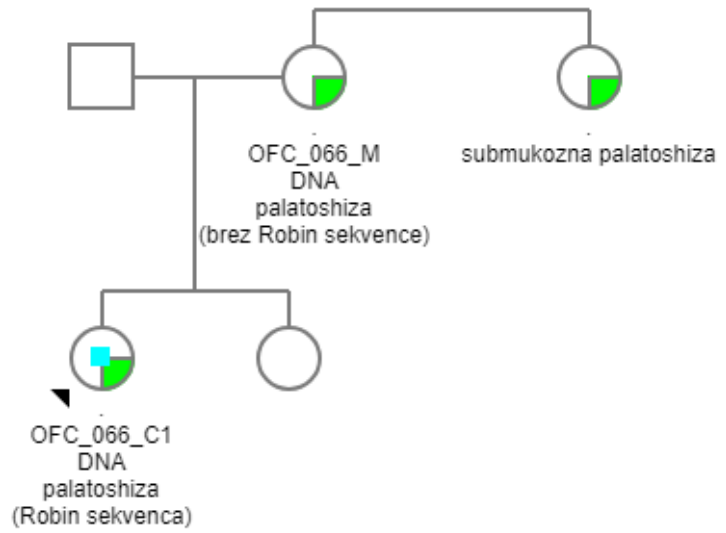
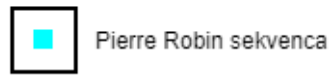


Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: bp




OFC\_066  
5/26/18

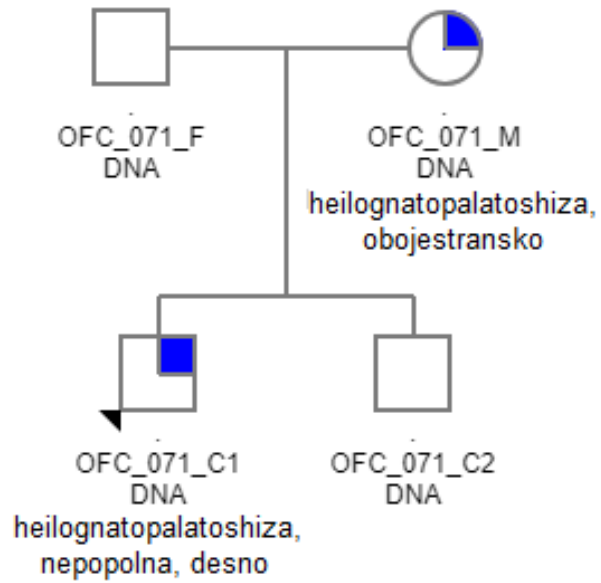


Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: mama kadilka

OFC\_071  
5/26/18

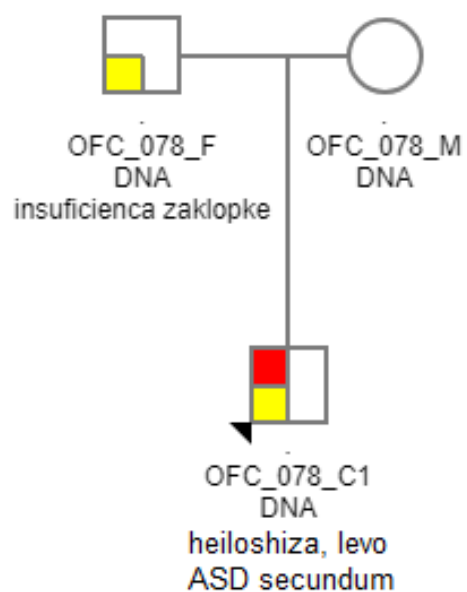
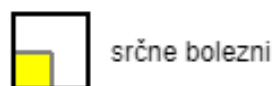
 heilognatopalatoshiza



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: bp

OFC\_078  
5/26/18



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: mama ima bolezen ščitnice  
(evtirotična golša)

OFC\_093  
5/26/18



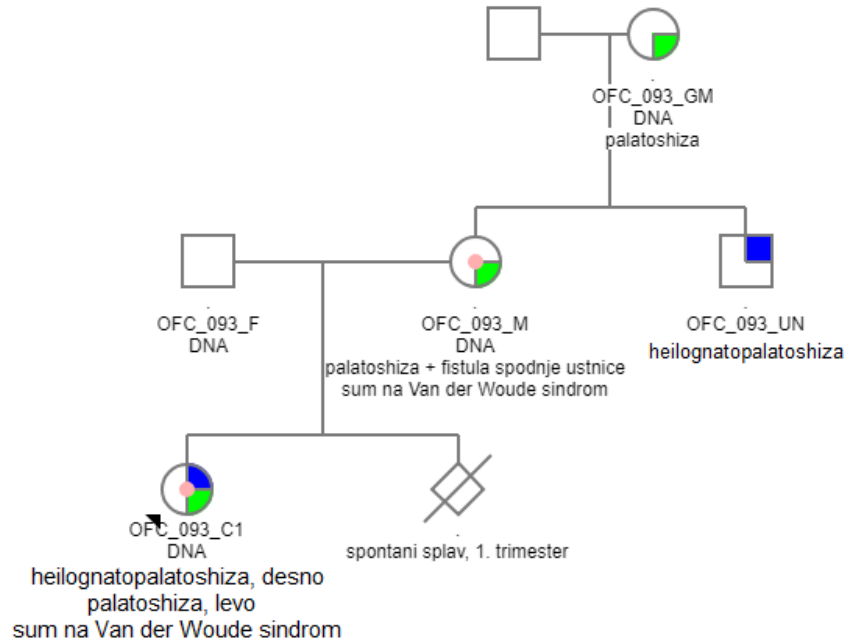
heilognatopalatoshiza



palatoshiza




sum na Van der Woude sindrom

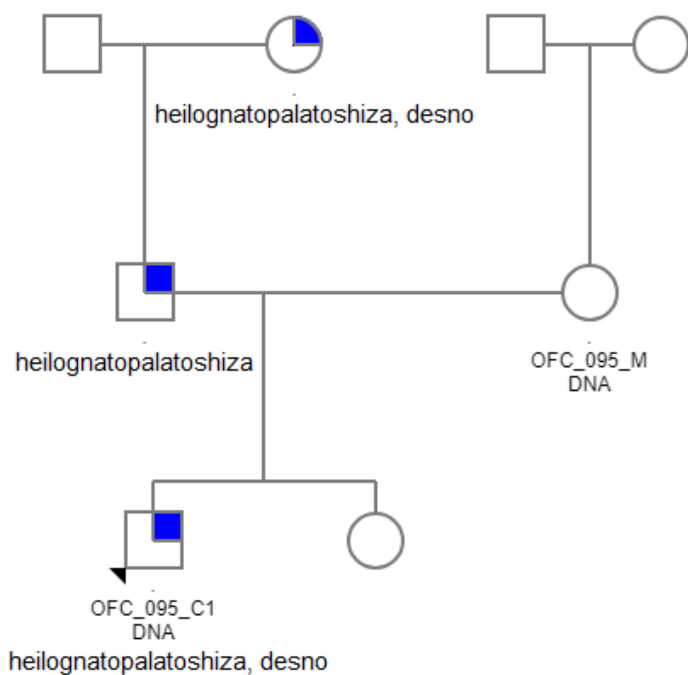


Ostale opombe: proband ima nepojasnjeno levkocitozo ( $25 \times 10^9/L$ ) in povišan krvni tlak (140/80)

Okoljski dejavniki tveganja: bp

OFC 095  
5/26/18

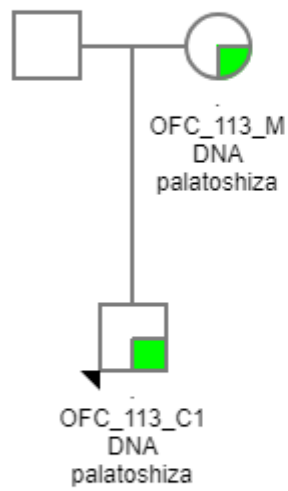
 heilognatopalatoshiza



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: mama je kadilka, mama ni jemala folne kisline med nosečnostjo


OFC\_113  
5/26/18

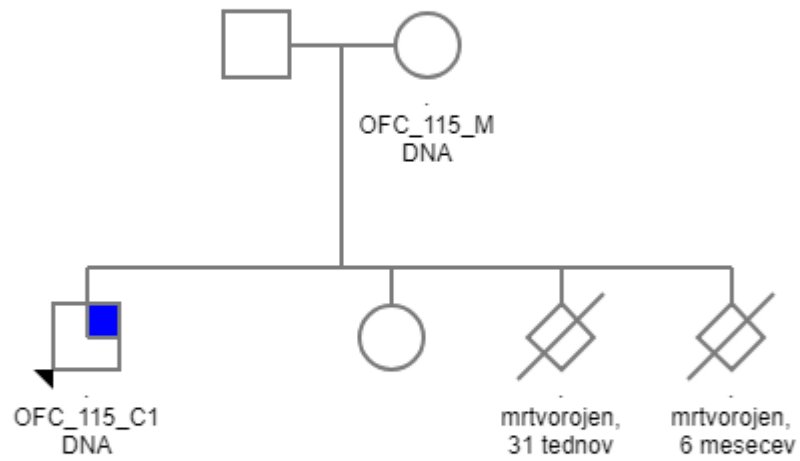


Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: povišana TT v 1. trimestru nosečnosti

OFC\_115  
5/26/18

 heilognatopalatoshiza

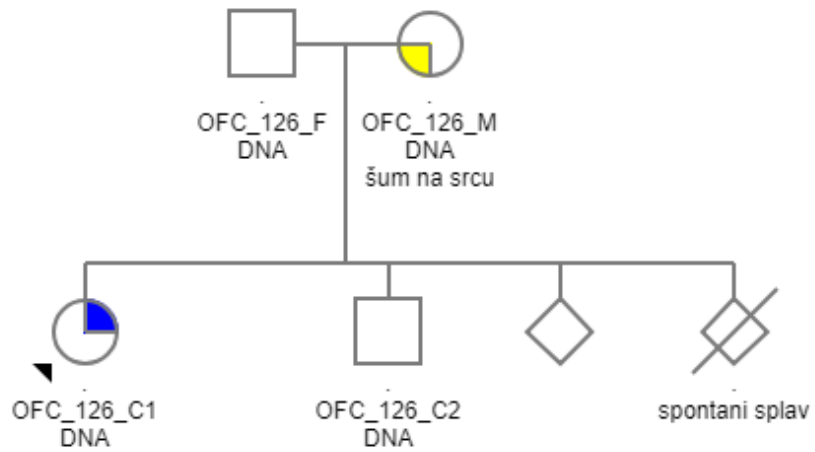
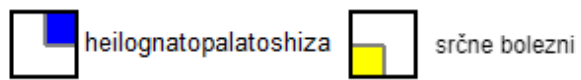


heilognatopalatoshiza, obojestransko

Ostale opombe: po očetovi strani shiza v daljnem sorodstvu

Okoljski dejavniki tveganja: mama bivša kadilka

OFC\_126  
5/26/18

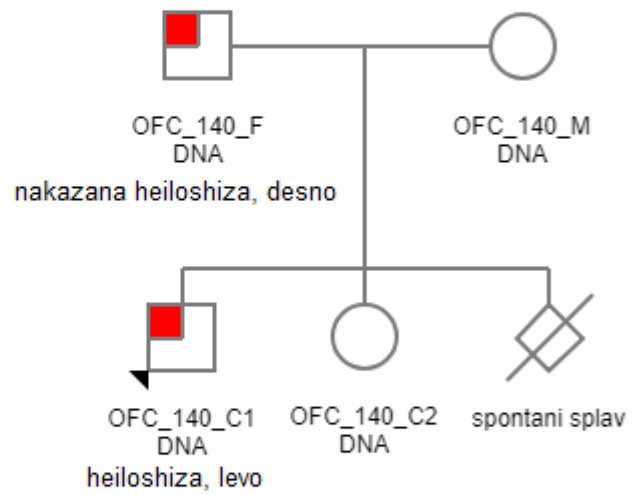


Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: mama ima astmo in želodčni refluks - v 1.trimestru jemala Pulmicort in Ventolin



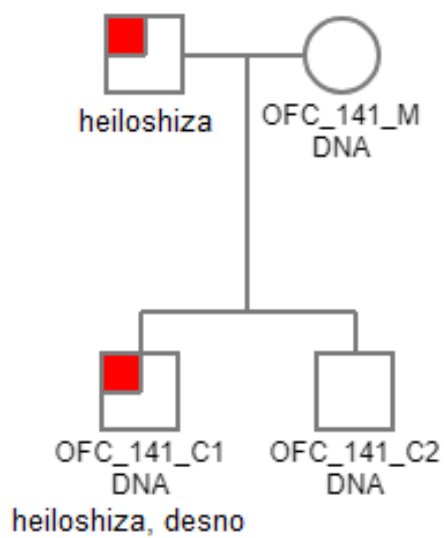
OFC\_140  
5/26/18



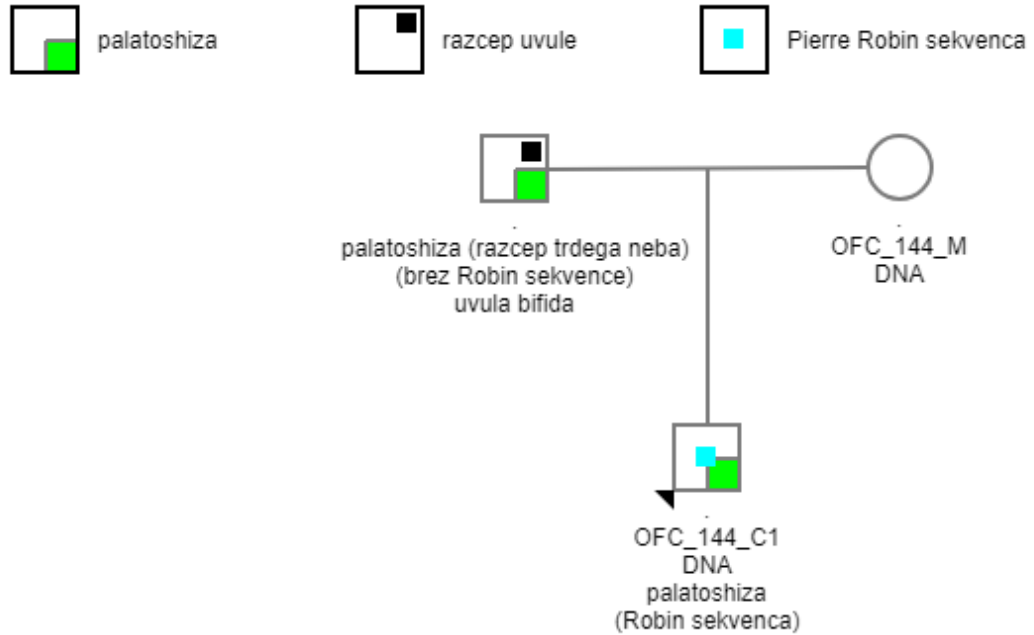
Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: bp

OFC\_141  
6/10/18



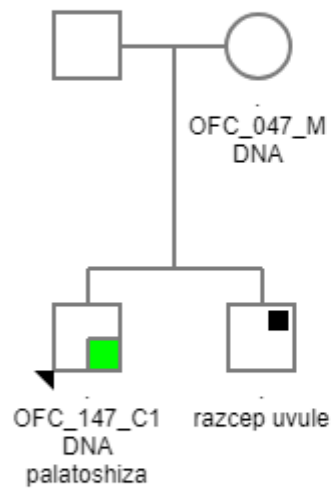
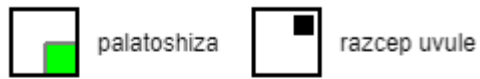
OFC\_144  
5/26/18



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: mama je kadilka, imela je nosečniško sladkorno bolezen (jemala inzulin od 5. meseca nosečnosti)

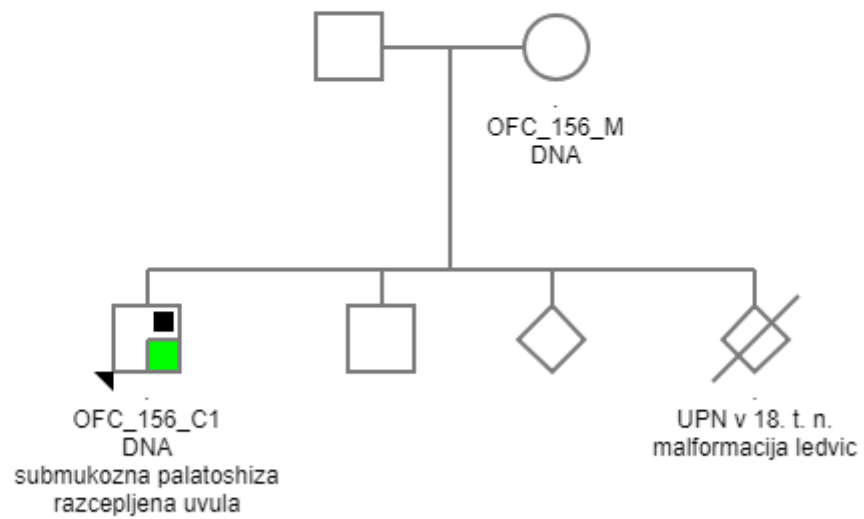
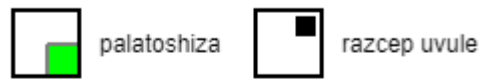
OFC\_147  
5/26/18



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: mama je kadilka, v 1.trimestru nosečnosti je jemala amoksiklav

OFC\_156  
5/26/18



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: bp

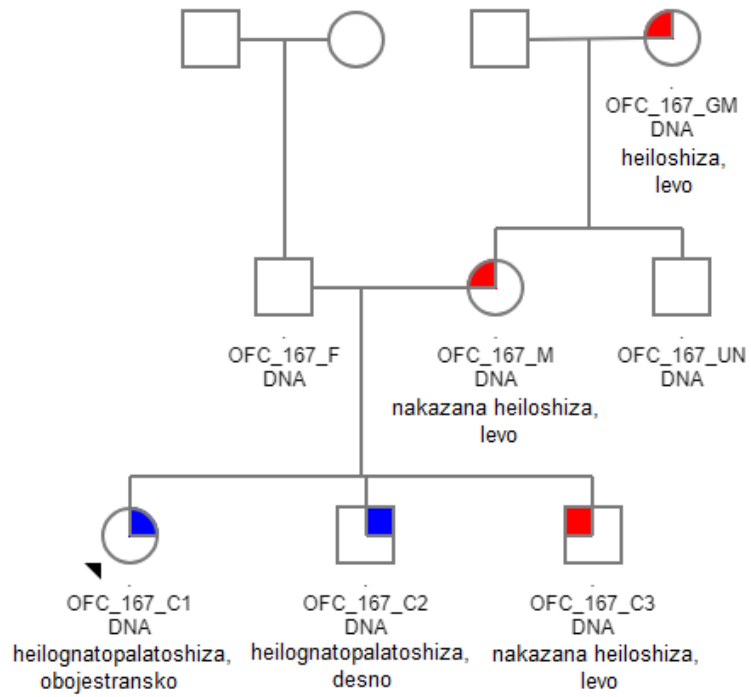
OFC\_167  
5/26/18



heiloshiza



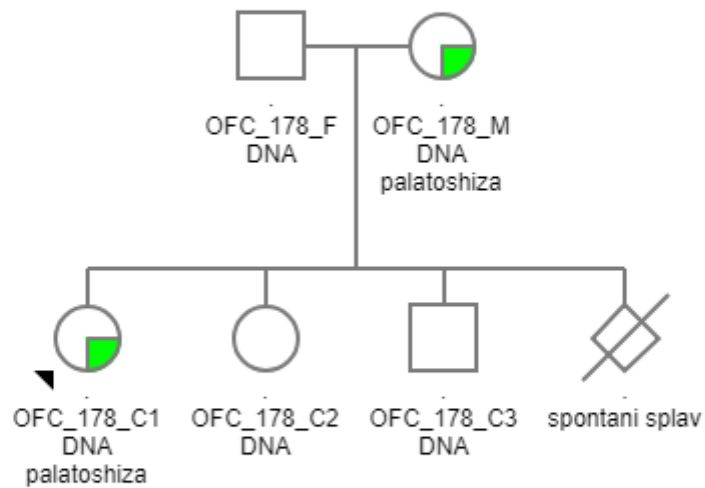
heilognatopalatoshiza



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: mama je imela v 1.trimestru povišano TT (gripa), mama ni jemala folne kisline med nosečnostjo

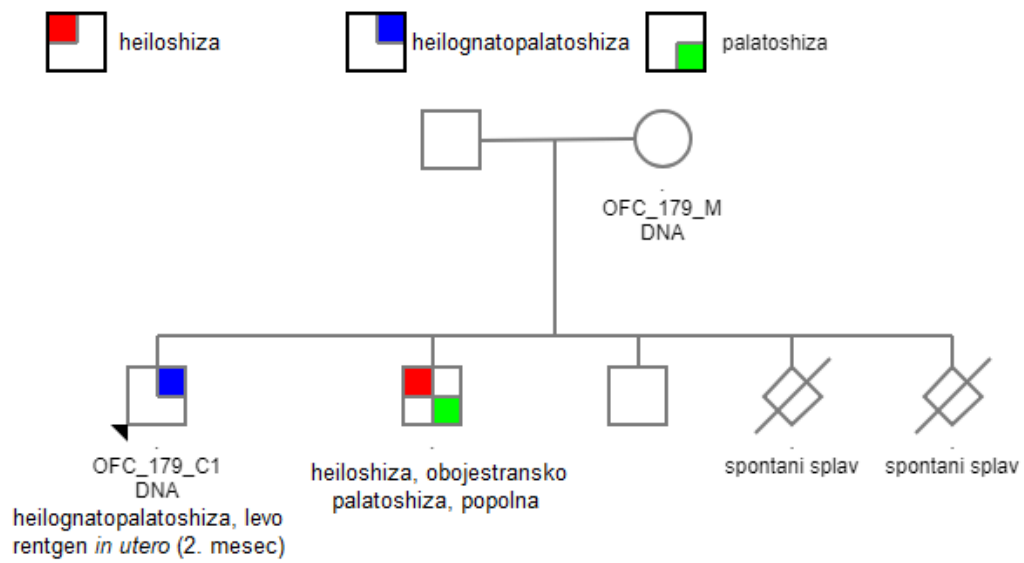
OFC\_178  
5/26/18



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: mama je kadilka, ima PCOS, med nosečnostjo ni jemala folne kisline (zaradi slabosti)

OFC\_179  
5/26/18



Ostale opombe: bp

Okoljski dejavniki tveganja: mama je v 1. trimestru nosečnosti imela povišano TT in je jemala amoksiklav, ni jemala folne kisline med nosečnostjo