Mgr biotech. Justyna Dąbrowska

Identyfikacja patogennych wariantów nukleotydowych u chorych z izolowanym rozszczepem wargi połączonym lub nie z rozszczepem podniebienia

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. Adrianna Mostowska

Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu
Medycznego w Poznaniu

Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

Badania, których wyniki posłużyły do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej są częścią projektu pt.: *„Identyfikacja patogennych wariantów nukleotydowych u chorych z wrodzonymi wadami twarzy”*, realizowanego w ramach „*Wielkopolskiego programu kompleksowej terapii osób z wrodzonymi wadami twarzy”*. Program ten był współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego o nr **RPWP.07.02.02-30-0037/16**.

Słowa kluczowe: izolowany rozszczep wargi i/lub podniebienia; wariant pojedynczego nukleotydu; panel wielogenowy, sekwencjonowanie następnej generacji

Key words: non-syndromic cleft lip with or without cleft palate; single nucleotide variant; multi-gene panel; next generation sequencing

Pragnę złożyć szczególne podziękowania

Prof. dr hab. Adriannie Mostowskiej

za nieocenioną pomoc i opiekę naukową, a także bezcenne uwagi,

poświęcony czas, cierpliwość

oraz wyrozumiałość w trakcie realizacji niniejszej pracy.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów 6
1. Wstęp 7
1.1 Rozwój embrionalny wargi i podniebienia 8
1.2 Klasyfikacja rozszczepów wargi i podniebienia 10
1.3 Epidemiologia rozszczepów 13
1.3.1 Zespołowe formy rozszczepów 13
1.3.2 Izolowane formy rozszczepów 16
1.4 Etiologia izolowanych rozszczepów wargi i podniebienia 17
1.4.1 Czynniki środowiskowe 18
1.4.2 Czynniki genetyczne 19
2. Cele i założenia pracy 28
3. Materiały i metody 30
3.1 Materiał 30
3.1.1 Aparatura 30
3.1.2 Odczynniki i roztwory 31
3.1.3. Sprzęt jednorazowy 31
3.2 Grupa badana 32
3.3 Metody 33
3.3.1 Izolacja genomowego DNA 34
3.3.2 Ocena jakościowa i ilościowa wyizolowanego materiału 37
3.3.3 Sekwencjonowanie metodą NGS wraz z analizą bioinformatyczną 37
3.3.4 Selekcja potencjalnie patogennych wariantów genetycznych 38
3.3.5 Charakterystyka programów wykorzystywanych do analiz *in silico* 39
3.3.6 Potwierdzenie obecności potencjalnie patogennych wariantów u probanta oraz identyfikacja nosicielstwa wyselekcjonowanych zmian u członków rodziny 42
3.3.7 Analiza nadreprezentacji (ORA – ang. *Over-Representation Analysis*) 47
4. Wyniki 48
4.1 Opis nowych wariantów genetycznych zidentyfikowanych w grupie pacjentów z nsCL/P 61
4.2 Opis nowych wariantów w grupie pacjentów z nsCP 82
5. Dyskusja 93
5.1 Wprowadzenie 93
5.1.1 Sekwencjonowanie panelu genowego oparte o technikę NGS 94

5.2 Analizy sekwencjonowania NGS w grupie pacjentów z nsCL/P 95
5.3 Analizy sekwencjonowania NGS w grupie pacjentów z nsCP 119
5.3.1 Czynniki genetyczne w rozszczepie podniebienia..... 119
5.3.2 Wyniki sekwencjonowania NGS 120
5.4 Podsumowanie 130
6. Wnioski 132
7. Streszczenie 133
8. Summary 135
9. Piśmiennictwo 137
10. Spis rycin 151
11. Spis tabel 154
12. Suplement 156
12.1 Panel dla wad rozwojowych części twarzowej czaszki – lista genów (n=424) 156
12.2 Sekwencje starterów zastosowane do amplifikacji produktów PCR użytych w analizie sekwencjonowania metodą Sangera. 170
12.3 Sekwencje starterów zastosowane do amplifikacji produktów PCR użytych w analizie Real-Time PCR-HRM. 175
13. Załączniki 180

Wykaz stosowanych skrótów

CL - rozszczep wargi (ang. *Cleft Lip*)

CL/P - rozszczepy wargi z/lub bez rozszczepu podniebienia (ang. *Cleft Lip with or without Cleft Palate*)

ClinVar - baza danych NCBI (ang. *National Center For Biotechnology information*)

CLP - rozszczep wargi i podniebienia (ang. *Cleft Lip and Palate*)

CP - rozszczep podniebienia (ang. *Cleft Palate*)

EMT - przejście nabłonkowo-mezenchymalne (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*)

FGF - czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast Growth Factor*)

GnomAD - baza danych (ang. *Genome Aggregation Database*)

GWAS - analiza asocjacyjna całego genomu (ang. *Genome-Wide Association Study*)

HGMD - baza danych (ang. *Human Gene Mutation Database*)

HRM - wysokorozdzielcza analiza topnienia (ang. *High Resolution Melting*)

NGS - sekwencjonowanie następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*)

nsCL - izolowany rozszczep wargi (ang. *non syndromic Cleft Lip*)

nsCL/P - izolowany rozszczep wargi z/lub bez rozszczepu podniebienia (ang. *non syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate*)

nsCP - izolowany rozszczep podniebienia (ang. *non syndromic Cleft Palate*)

OMIM - baza danych (ang. *Online Mendelian Inhertance in Man*)

TGF-β - transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *Transforming growth factor beta*)

VarSome - baza danych (ang. *The Human Genomic Variant Search Engine*)

WES - sekwencjonowanie całego eksomu (ang. *Whole Exome Sequnecing*)

Wnt/β-katenina - kanoniczny szlak sygnałowy Wnt zależny od *β*-kateniny (ang. *canonical WNT*/β-catenin *signaling pathway wingless*

1. Wstęp

Rozszczepy wargi i podniebienia (OMIM #119530) to jedne z najczęstszych wad rozwojowych twarzoczaszki. Na świecie anomalie te występują z częstością 1 na 700 żywo urodzonych noworodków [1], a w Polsce ten problem dotyka średnio 1 na 1000 żywo urodzonych dzieci [2]. Według danych literaturowych najczęściej występujące przypadki tych wad rozwojowych to formy izolowane, w których rozszczep twarzowej części czaszki to jedyna występująca anomalia strukturalna [3].

Liczne komplikacje będące następstwem rozszczepu są szczególnie dotkliwe w krajach rozwijających się, gdzie dostęp do kompleksowego leczenia tego typu wad jest ograniczony [4]. Jednak pomimo zapewnienia pacjentom już na wczesnym etapie życia wielospecjalistycznej opieki, wciąż nie udało się opracować metod leczenia, które pozwalałyby całkowicie zniwelować malformacji powstałych na skutek rozszczepu.

Ponadto wśród osób dotkniętych tą anomalią rozwojową zaobserwowano znacząco wyższą śmiertelność. Zjawisko to wiąże się ze zwiększoną liczbą samobójstw spowodowanych nie tylko wykluczeniem społecznym (z racji licznych deformacji twarzy oraz wadą wymowy), ale również jak dowiedziono, występującymi nieprawidłowościami strukturalnymi w mózgu, które mogą predysponować pacjentów z rozszczepami do tego typu aktów [5–7]. Osoby z wadą rozszczepową mają także zwiększone ryzyko zachorowania na choroby sercowo-naczyniowe, epilepsję oraz różnego typu nowotwory m.in. piersi, mózgu oraz jelita grubego [5], [8–11].

Etiopatogeneza izolowanych wad rozszczepowych twarzoczaszki jest bardzo złożona i wciąż nie jest w pełni poznana. W powstawanie tej wady zaangażowane są zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe [12], [13]. Czynniki środowiskowe zostały już w dużej mierze poznane, ale identyfikacja genetycznego podłoża tych anomalii rozwojowych wciąż pozostaje nieuchwytna. Przyczyną tego jest heterogenność genetyczna oraz wieloczynnikowa etiologia, w której czynniki genetyczne i środowiskowe wzajemnie na siebie oddziałują [13].

Lepsze zrozumienie i zgłębienie wiedzy na temat patomechanizmu powstawania tej najczęściej występującej anomalii rozwojowej jest ważne ze względu na poszerzenie i uzupełnienie wiedzy o białkach i szlakach sygnalizacyjnych, które biorą udział w rozwoju twarzoczaszki, a także na rozwój poradnictwa genetycznego izolowanych wad rozszczepowych.

1.1 Rozwój embrionalny wargi i podniebienia

Rozszczepy wargi i podniebienia powstają w skutek zaburzenia procesów łączenia wyrostków twarzowych i podniebiennych we wczesnym okresie życia płodowego. Właściwy rozwój twarzy i podniebienia jest procesem niezwykle złożonym. Wymaga on ścisłej i czasowej koordynacji zachodzących ze sobą procesów takich jak: wzrost, migracja, różnicowanie oraz apoptoza komórek [14].

Proces tworzenia struktur twarzowej części czaszki rozpoczyna się na początku 4 tygodniu życia zarodkowego, gdy komórki grzebienia nerwowego migrują pod pokrywę ektodermalną tworząc pięć zgrubień zwanych wyrostkami (wyniosłościami) twarzowymi (ang. *facial primordia*). Są to: wyrostek czołowo-nosowy, dwa wyrostki żuchwowe oraz dwa wyrostki szczękowe (Ryc. 1a) [15], [16]. Struktury te składają się przede wszystkim z mezenchymy wywodzącej się z grzebienia nerwowego, a także z nabłonka pochodzącego z ektodermy. Po uformowaniu się opisywanych wyniosłości twarzowych powstają plakody nosowe, które tworzą wyrostki (wzniesienia) nosowe boczne i środkowe (Ryc. 1b). Podczas 6 i 7 tygodnia życia zarodkowego mezenchyma wyrostków nosowych łączy się z wyrostkami szczękowymi tworząc wargę górną i podniebienie pierwotne. Nos jest tworzony z połączenia wyrostków nosowych środkowych i bocznych, a także wyrostka szczękowego (Ryc.1c). Zaburzenia wzrostu oraz migracji komórek mezodermy lub niecałkowita fuzja wspomnianych wyrostków na tym etapie embriogenezy skutkuje powstaniem rozszczepu struktur podniebienia pierwotnego czyli górnej wargi i/lub wyrostka zębodołowego [17].

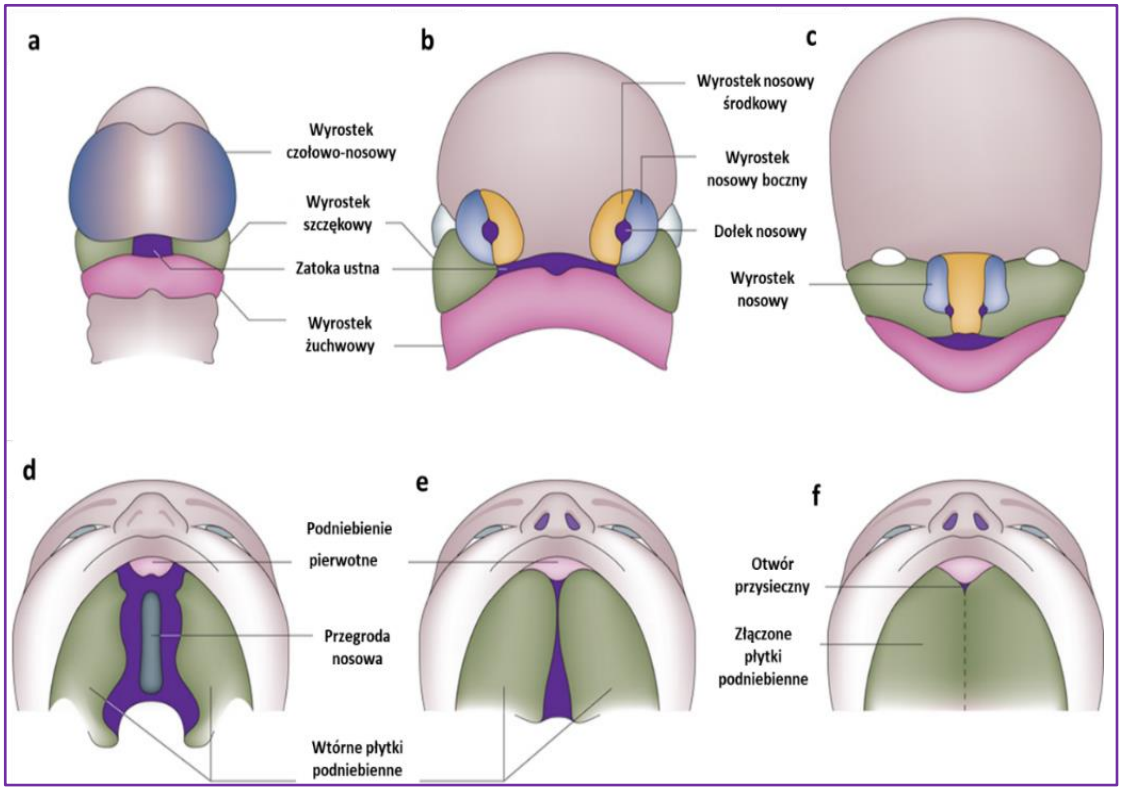
Procesy prowadzące do powstania podniebienia wtórnego (struktura podniebienia miękkiego i twardego) rozpoczynają się dopiero w 6 tygodniu rozwoju embriologicznego. Z wyrostków szczękowych formują dwie charakterystyczne narośle nazywane płytkami (płytami) podniebiennymi (PS - ang. *palatal shelves*). Początkowo płytki podniebienne rozwijają się pionowo, wzdłuż rozdzielającego je języka (Ryc.1d). W dalszym etapie rozwoju ok. 7 tygodnia rozwoju embrionalnego płytki ustawiają się stopniowo w pozycji poziomej. Zmiana pozycji płytek podniebiennych jest możliwa głównie dzięki wyprostowaniu głowy zarodka, który umożliwia opadnięcie języka. Postępujący wzrost prowadzi do połączenia się płytek podniebiennych wzdłuż przyśrodkowej krawędzi nabłonka (MEE - ang. *medial edge epithelia*). Tworzy się wtedy szew przyśrodkowy nabłonka (MES - ang. *medial epithelial seam*), który ulega dezintegracji podczas procesu stopniowego zlewania się płytek podniebiennych

(Ryc. 1e). Pomyślne połączenie obu płytek podniebiennych w procesie powstawania podniebienia wtórnego powoduje całkowite oddzielenie jamy nosowej i ustnej (Ryc. 1f) [18].

Rozszczepy podniebienia mogą być spowodowane niedorozwojem płytek podniebiennych, zaburzeniem procesu ich podnoszenia się, a także niezdolnością języka do opadnięcia spomiędzy płyt [18].

Zanim dojdzie do połączenia się obu płytek podniebiennych i uformowania podniebienia wtórnego, nabłonek wyrostków podniebiennych przechodzi szereg złożonych procesów i zmian rozwojowych [17–19]. Jedna z teorii wskazuje, że proces ten zachodzi dzięki apoptozie i przejściu nabłonkowo-mezenchymalnym EMT (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*). Dzięki EMT dochodzi do przekształcenia nieruchomych i spolaryzowanych komórek nabłonkowych na krawędziach wyrostków podniebiennych w komórki o fenotypie mezenchymalnym [14], [20].

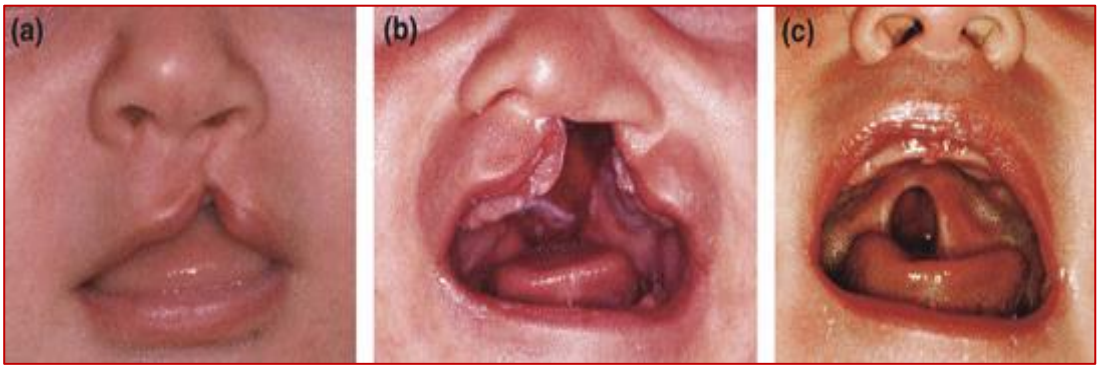
Rozwój twarzoczaszki podlega ściśle regulowanym procesom zachodzącym w określonym przedziale czasowym. Zakłócenie ich przez czynniki genetyczne i/lub środowiskowe może zwiększać ryzyko rozszczepu. Różnice czasowe w rozwoju podniebienia pierwotnego i wtórnego dostarczają dowodów na odmienną etiologię rozszczepów wargi i podniebienia oraz rozszczepów samego podniebienia. Aspekt ten jest szczególnie istotny w badaniach nad molekularnym podłożem wad rozszczepowych [21]. Dobrym przykładem jest tu formowanie się wargi górnej w 6 tygodniu rozwoju, podczas którego komórki wyrostka nosowego podlegają najintensywniejszym podziałom będąc wtedy najbardziej podatnymi na działanie różnych czynników, m.in. teratogenów, które mogą zakłócają proces zespolenia wargi i być może także podniebienia [22]. Natomiast czynniki, które mogą powodować zaburzenia w rozwoju samego podniebienia nie mają już wpływu na prawidłowy rozwój wargi i wyrostka zębodołowego, gdyż proces formowania się podniebienia pierwotnego zachodzi wcześniej.



Ryc. 1 Rozwój embrionalny wargi i podniebienia. Rozwój wargi: **1a)** ok. 4 tygodnia życia zarodkowego formuje się 5 wyrostków twarzowych: wyrostek czołowo-nosowy, para wyrostków żuchwowych oraz dwa wyrostki szczękowe, **1b**) w 5 tygodniu tworzy się para wyrostków nosowych bocznych oraz środkowych, **1c)** ok. 6-7 tygodnia z wyrostków szczękowych formuje się warga górna, która wraz z wyrostkiem zębodołowym tworzy podniebienie pierwotne, a z pary wyrostków nosowych środkowych i bocznych oraz wyrostka szczękowego powstaje nos, Rozwój podniebienia: **1d**) ok. 6 tygodnia z wyrostków szczękowych formuje się para płyt podniebiennych, które rozwijają się pionowo wzdłuż języka **1e)** w 7 tygodniu rozwoju płytki ustawiają się stopniowo w pozycji poziomej, a postępujący wzrost prowadzi do połączenia się płytek podniebiennych wzdłuż przyśrodkowej krawędzi nabłonka, **1f)** połączenie obu płytek podniebiennych powoduje całkowite oddzielenie jamy nosowej. Opracowane na podstawie [12], [15].

1.2 Klasyfikacja rozszczepów wargi i podniebienia

W zależności od miejsca, w którym nie wystąpiła fuzja lub też doszło do niecałkowitego połączenia się właściwych wyrostków podczas rozwoju twarzoczaszki, wyróżniamy rozszczep wargi (CL – ang. *Cleft Lip*), rozszczep wargi oraz podniebienia (CLP- ang. *Cleft Lip with Cleft Palate*) lub rozszczep samego podniebienia (CP – ang. *Cleft Palate*).



Ryc. 2 Podział rozszczepów. a) rozszczep wargi (CL), **b)** rozszczep wargi i podniebienia (CLP), **c)** rozszczep podniebienia (CP). Źródło [23].

W badaniach naukowych zajmujących się identyfikacją genetycznego podłoża wad rozszczepowych, anomalie te dzieli się na dwie odrębne grupy:

I. **CL/P** - rozszczepy wargi połączone lub też nie z rozszczepem podniebienia (ang. *Cleft Lip with or without Palate*) w tym:

- ✓ CLP
- ✓ CL

II. **CPO** -rozszczepy samego podniebienia (ang. *Cleft Palate Only*)

Klasyfikację tę jako pierwszy zaproponował Fogh-Andersem [24]. Bierze się w niej pod uwagę różny czas powstawania oraz odmienną etiologię tych dwóch postaci rozszczepów, a w szczególności geny kandydackie [25]. Dane epidemiologiczne [26] i biologiczne [27], [28] sugerują, że również CL i CLP mogą mieć odrębną etiologię genetyczną. Należy jednak wziąć pod uwagę, że zaburzenia funkcjonowania tych samych szlaków sygnałowych mogą przyczyniać się do powstawania różnych form rozszczepów. Zdarza się, że CL/P jak i CP występują w obrębie jednej rodziny [1].

Rozszczepy twarzoczaszki są bardzo zróżnicowane pod względem anatomicznym i czynnościowym. Dane literaturowe wskazują na ich różnorodne nazewnictwo i podziały. Klasyfikacje te opierają się głównie na różnicach w rozwoju embriologicznym i/lub uwzględniają podział anatomiczny. Za linie podziału przyjmują najczęściej otwór przysieczny. Stanowi on punkt orientacyjny, rozgraniczający podniebienie pierwotne i wtórne (Ryc. 1f).

Jedną z najbardziej znanych klasyfikacji rozszczepów jest podział wg Kernahana i Starka. W podziale tym uwzględnione zostały różnice w rozwoju embriologicznym, w którym górną wargę i wyrostek zębodołowy opisuje się jako podniebienie pierwotne, a podniebienie twarde i miękkie jako podniebienie wtórne. W klasyfikacji tej uwzględnia

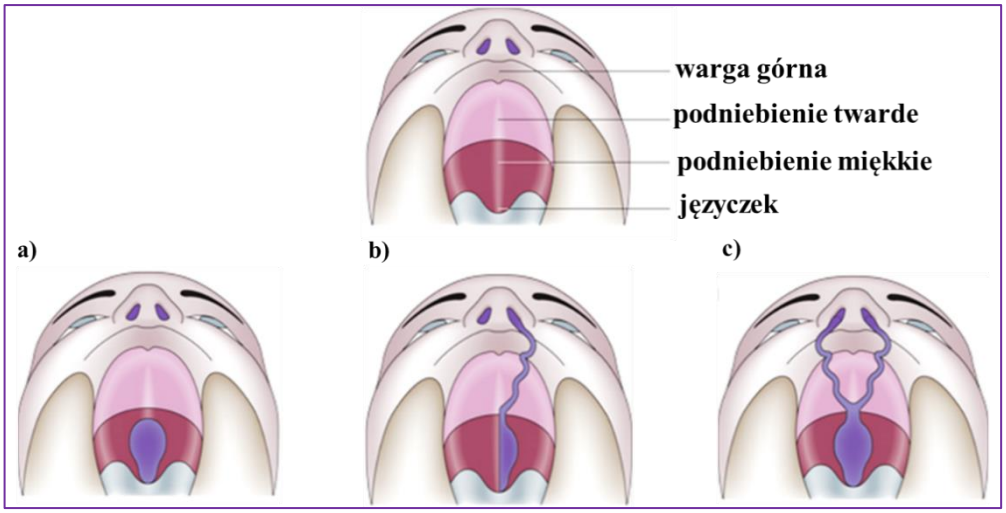
się również rozległość i zasięg rozszczepu, a także stronę wystąpienia wady. Za linie podziału przyjmuje się otwór przysieczny [16].

Klasyfikacja wg Kernahana i Starka wyróżnia 3 typy:

I. Rozszczepy podniebienia pierwotnego:
- ✓ lewostronny całkowity
- ✓ lewostronny częściowy
- ✓ prawostronny całkowity
- ✓ prawostronny częściowy
- ✓ środkowy całkowity
- ✓ środkowy częściowy
- ✓ obustronny całkowity

II. Rozszczepy podniebienia wtórnego:
- ✓ całkowity
- ✓ częściowy
- ✓ podśluzówkowy

III. Rozszczepy podniebienia pierwotnego i wtórnego:
- ✓ lewostronny całkowity
- ✓ lewostronny częściowy
- ✓ prawostronny całkowity
- ✓ prawostronny częściowy
- ✓ obustronny całkowity
- ✓ obustronny częściowy



Ryc. 3 Rozszczepy podniebienia wg mianownictwa Kernahana i Starka. **a)** rozszczep częściowy podniebienia wtórnego, **b)** rozszczep lewostronny całkowity podniebienia pierwotnego i wtórnego **c)** rozszczep obustronny całkowity podniebienia pierwotnego i wtórnego . Źródło [12].

W nazewnictwie stosuje się również podział wg Bardacha i Perczyńskiej-Partyki. Uwzględnia on podział anatomiczny, w którym bierze się pod uwagę część twarzy lub szczęki objętych rozszczepem [29].

Podział wg Bardacha i Perczyńskiej-Partyki wyróżnia 5 typów rozszczepów:

I. Rozszczepy wargi górnej (jednostronny, środkowy, obustronny):
- ✓ podśluzówkowy
- ✓ częściowy
- ✓ całkowity

II. Rozszczep wargi górnej i wyrostka zębodołowego (jednostronny, środkowy, obustronny):
- ✓ podśluzówkowy
- ✓ częściowy
- ✓ całkowity

III. Rozszczepy podniebienia:
- ✓ podśluzówkowy
- ✓ częściowy miękkiego
- ✓ całkowity miękkiego
- ✓ częściowy twardego i całkowity miękkiego
- ✓ całkowity twardego i miękkiego – do otworu przysiecznego

IV. Rozszczepy wargi, wyrostka zębodołowego i podniebienia:
- ✓ jednostronny
- ✓ obustronny

V. Rozszczepy kombinowane

1.3 Epidemiologia rozszczepów

1.3.1 Zespołowe formy rozszczepów

Dotychczas zidentyfikowano setki zespołów wad rozwojowych, w których rozszczep jest główną lub jedną z towarzyszących anomalii rozwojowych (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM). Ich przyczyną są zarówno patogenne warianty pojedynczych lub wielu genów, submikroskopowe rearanżacje genomowe, aberracje chromosomowe lub też działanie teratogenów [30]. Szacuje się, że czynniki genetyczne pełnią kluczową rolę w powstawaniu około 75% zespołów wad rozwojowych o znanej etiologii. Wśród nich jest ponad 500 zespołów chorobowych o Mendlowskim sposobie dziedziczenia, które są spowodowane patogennymi wariantami nukleotydowymi pojedynczego genu [12]. W Tab.1 przedstawiono wybrane przykłady takich zespołów chorobowych.

Tab. 1 Zespoły wad wrodzonych spowodowane patogennymi wariantami nukleotydowymi w pojedynczych genach, w których rozszczep jest jedną z anomalii towarzyszących. Opracownie na podstawie bazy OMIM oraz [12].

OMIM	Zespół wad wrodzonych	Typ rozszczepu	Gen	Typ Dziedziczenia
#101200	Zespół Aperta	CP	*FGFR2*	AD
#106600	Agenezja zębów stałych z/lub bez rozszczepu	CL/P	*MSX1*	AD
#241850	Zespół Bamfortha-Lazarusa	CP	*FOXE1*	AR
#263650	Zespół Bartsocas-Papas	CL/P	*RIPK4*	AR
#214800	Zespół CHARGE	CP	*CHD7*	AD
#122470	Zespół Cornelii de Lange	CP	*NIPBL*	AD
#123500	Zespół Crouzona	CP	*FGFR2*	AD
#188400	Zespół DiGeorge'a	CP	*TBX1*	AD
#225060	Zespół Dysplazja ektodermalna z CLP	CL/P	*PVRL1*	AR
#114290	Zespół Dysplazja kampomeliczna	CP	*SOX9*	AD
#604292	Zespół EEC	CL/P	*TP63*	AD
#265000	Zespół Escobara	CP	*CHRNG*	AD
#109400	Zespół Gorlina	CL/P	*PTCH1*	AD
#610828	Zespół Holoprozencefalia typu 7	CL/P	*PTCH1*	AD
#142945	Zespół Holoprozencefalia typu 3	CL/P	*SHH*	AD
#147920	Zespół Kabuki typ 1	CP	*KMT2D*	AD
#300867	Zespół Kabuki typ 2	CP	*KDM6A*	XLD
#609192	Zespół Loeysa-Dietza typ 1	CP	*TGFBR1*	AD
#610168	Zespół Loeysa-Dietza typ 1, 2	CP	*TGFBR2*	AD
#263750	Zespół Millera	CL, CP	*DHODH*	AR
#300166	Zespół oczno - twarzowo - sercowo - zębowy	CP	*BCOR*	XLD
#300000	Zespół Opitza GBBB	CL/P	*MID1*	XLR
#119500	Zespół płetwistości podkolanowej	CL/P	*IRF6*	AD
#137215	Rodzinna postać raka żołądka z CL/P	CL/P	*CDH1*	AD
#303400	Rozszczep podniebienia bez/z ankyloglosją, sprzężona z chromosomem X	CP	*TBX22*	XL
#300263	Rozszczep wargi i/lub podniebienia oraz niepełnosprawność intelektualna, sprzężona z chromosomem X typu Siderius	CL/P	*PHF8*	XLR
#101400	Zespół Saethre-Chotzena	CP	*TWIST1*	AD
#270400	Zespół Smitha-Lemliego-Opitza	CP	*DHCR 7*	AR

#604841	Zespół Sticklera typ 1	CP	*COL2A1*	AD
#108300	Zespół Sticklera typ 2	CP	*COL11A1*	AD
#273395	Zespół tetra-amelia	CL/P	*WNT3*	AR
#154500	Zespół Treachera Collinsa	CP	*TCOF1*	AD
#311200	Zespół ustno - twarzowo - palcowy typ I	CL/P	*OFD1*	XLR
#119300	Zespół van der Woude'a	CL/P	*IRF6*	AD

CL/P – rozszczep wargi i/lub podniebienia, CP – rozszczep podniebienia, AD - autosomalny dominujący, AR – autosomalny recesywny, XLD – sprzężony z X dominujący, XLR – sprzężony z X recesywny, OMIM – (ang. *Online Mendelian Inheritance in Man*, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM)

Zespół Van der Woude

Zespół Van der Woude (VWS,OMIM# 119300) jest najczęstszą syndromiczną postacią rozszczepów twarzoczaszki. Częstość występowania zespołu VWS wnosi 1/34 000 żywych urodzeń, co stanowi około 2% wszystkich przypadków CL/P. Przyczyną molekularną zespołu są patogenne warianty genu *IFR6* (OMIM *607199) dziedziczone autosomalnie dominująco. Dotychczas zidentyfikowano liczne patogenne warianty tego genu, z których większość jest zlokalizowana w sekwencji kodującej konserwatywną domenę wiążącą DNA oraz domenę odpowiedzialną za interakcje z innymi białkami. [31]. Podstawową cechą odróżniającą WVS od izolowanych form rozszczepów twarzoczaszki jest obecność przetok ślinowych wargi dolnej, które występują u około 83% pacjentów z tym zespołem. [32]. Zespół cechuje się dużą penetracją wynosząca 89-99% i zmienną ekspresją, przez co można zaobserwować różnorodny wachlarz symptomów u chorych. W przypadku występowania rozszczepu u pacjentów z VWS, najczęściej obserwuje się CL/P (65%) oraz CP (30%). Niezwykle rzadko zdarza się również rozszczep samej wargi (CL). U 60% pacjentów z VWS występuje także hipodoncją, która jest jednym z typów agenezji zębów stałych [33].

Zespół płetwistości podkolanowej

Patogenne warianty genu *IRF6* są również jedną z głównych przyczyn zespołu płetwistości podkolanowej (PPS ang. *Popliteal Pterygium Syndrome*, OMIM # 119500). Jest to rzadkie schorzenie o autosomalnie dominującym modelu dziedziczenia, które występuje w populacji ogólnej z częstością 1/300 000 żywych urodzeń.

U pacjentów z PPS oprócz wszystkich objawów zespołu Van der Woude (przetoki ślinowe wargi dolnej oraz różne typy rozszczepów twarzy) może wystąpić jedna z następujących wad wrodzonych: płetwistość skóry rozciągająca się od guzów

kulszowych do pięt z przykurczami mogącymi ograniczać ruchomość, rozszczep moszny, wnętrostwo, syndaktylia palców stóp, nieprawidłowości skóry okolicy paznokci (charakterystyczny fałd zachodzący na paznokieć), nitkowate zrosty szczęki górnej i dolnej (syngantia), a także powieki górnej i dolnej (ankyloblepharon) oraz stopy szpotawe. Manifestacje objawów bywają bardzo różnorodne nawet w obrębie jednej rodziny [34], [35].

Agenezja zębów stałych

Wrodzony brak zawiązków zębów stałych (OMIM #106600) to najczęstsze zaburzenia towarzyszące rozszczepom wargi i podniebienia. Szacuje się, że hipodoncja czyli brak od 1 do 5 zawiązków zębów (wyłączając trzecie zęby trzonowe) występuje u 24 - 78% pacjentów z CP. Znacznie rzadziej można obserwować oligodoncję, czyli brak 6 lub więcej zawiązków zębów (wyłączając trzecie zęby trzonowe) [36], [37]. Agenezja zębów stałych pojawia się przede wszystkim w miejscu rozszczepu. Jednak u pacjentów bardzo często stwierdza się również występowanie wrodzonego braku zawiązków zębów stałych poza obszarem rozszczepu. Ta obserwacja może wskazywać, że te same mechanizmy molekularne mogą odgrywać rolę zarówno podczas rozwoju zawiązków zębów jak również rozwoju wargi i podniebienia.

Według jednej z hipotez izolowana agenezja zębów stałych jest jednym z fenotypów wady rozszczepowej, czego potwierdzeniem może być współwystępowanie tych nieprawidłowości rozwojowych oraz wspólne geny kandydackie [38].

1.3.2 Izolowane formy rozszczepów

Badania wskazują, że 70% wszystkich CL/P oraz 50% wszystkich CP to przypadki klasyfikowane jako formy niesyndromiczne bez innych anomalii towarzyszących - nsCL/P (ang. *non syndromic Cleft Lip with of without Cleft Palate*) oraz nsCP (ang. *non syndromic Cleft Palate*) [23], [39].

W populacji afrykańskiej częstość występowania izolowanej wady rozszczepowej wynosi 1 na 2500 żywych urodzeń, co stanowi najniższy wskaźnik na świecie. Izolowane wady rozszczepowe znacznie częściej występują w populacjach azjatyckich i kaukaskich, w których anomalię tę obserwuje się u 1 na 1000 żywo urodzonych dzieci.

Najwyższy wskaźnik urodzeń dzieci z wadą rozszczepową cechuje populację Indian Ameryki Północnej, rozszczep występuje tam u 1 na 700 żywo urodzonych noworodków [34].

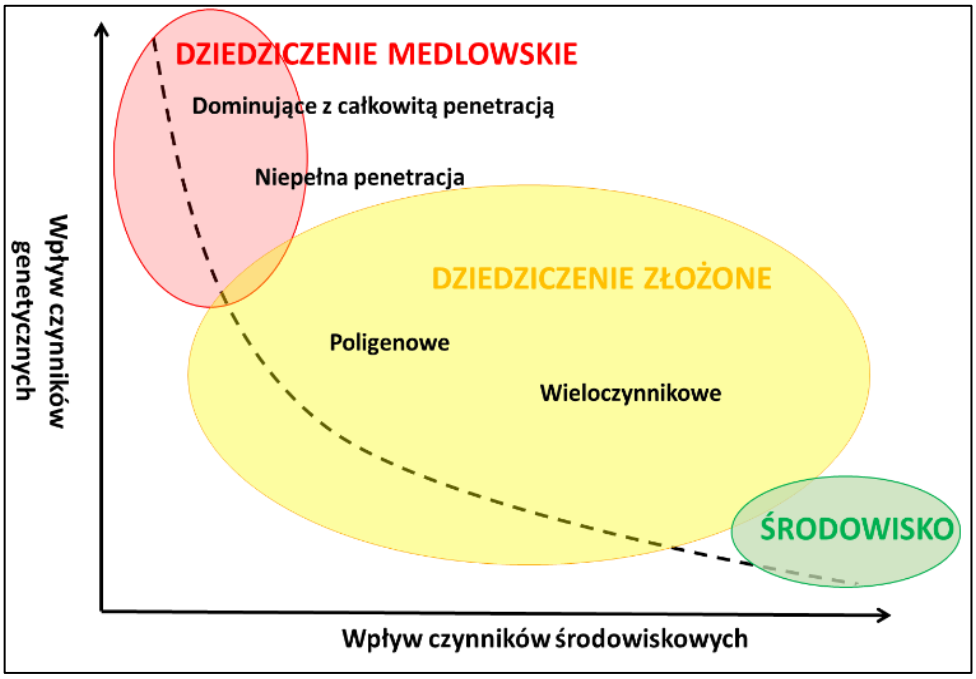
Przedstawione różnice populacyjne pokazują jak istotną rolę w etiologii rozszczepów odgrywają zarówno czynniki genetyczne jak również środowiskowe.

Dostępne dane epidemiologiczne wskazują, że częstość wady rozszczepowej zależy także od płci. Wykazano, że nsCP występuje częściej u kobiet niż u mężczyzn. Według niektórych danych może być to związane z późniejszym łączeniem się wyrostków podniebiennych podczas rozwoju embrionów żeńskich. U mężczyzn z populacji kaukaskiej nsCL/P występuje dwukrotnie częściej i w cięższej formie niż u kobiet. W populacji japońskiej wskaźnik ten jest wyższy nawet kilkukrotnie. Natomiast kiedy CL/P występuje w formie zespołowej różnica w częstości pomiędzy mężczyznami a kobietami nie jest już tak znacząca [22].

Około 75% przypadków rozszczepów wargi występuje po jednej stronie twarzy. Wśród rozszczepów jednostronnych dwa razy częściej występuje rozszczep zlokalizowany po lewej stronie [40].

1.4 Etiologia izolowanych rozszczepów wargi i podniebienia

Etiologia izolowanych rozszczepów jest niezwykle złożona. Biorą w niej udział zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe, a także ich wzajemne oddziaływania. Dane literaturowe wskazują również na epistatyczne interakcje genów i złożony charakter dziedziczenia izolowanych postaci tej wady rozwojowej. Pomimo licznych badań wiedza na temat czynników genetycznych leżących u podstaw etiopatogenezy tej częstej anomalii rozwojowej nie jest jeszcze w pełni poznana [13]. Ryc. 4 przedstawia wieloczynnikową genetyczną etiologię izolowanych rozszczepów twarzoczaszki.



Ryc. 4 Etiologia rozszczepów wargi i podniebienia. Izolowane formy rozszczepów twarzoczaszki są uwarunkowane głównie wielogenowo, a w ich etiopatogenezie uczestniczą również czynniki środowiskowe (teratogeny). Zmodyfikowane na podstawie [12],[41].

1.4.1 Czynniki środowiskowe

Badania nad czynnikami środowiskowymi pozwoliły dostarczyć istotnych dowodów na zwiększone ryzyko rozszczepu twarzoczaszki przy ekspozycji na niektóre z nich.

Liczne dane literaturowe wskazują, że palenie tytoniu przez matkę, zarówno czynne jaki i bierne, jest jednym z istotnych teratogenów zwiększających ryzyko posiadania dziecka z wadą rozszczepową [42] [43].

Spożywanie przez matkę alkoholu również jest wymieniane wśród czynników ryzyka, choć badania nad wpływem etanolu na rozwój wargi i podniebienia są sprzeczne i nie do końca udowodnione. Ostatnio jednak wykazano, że spożycie alkoholu w dużych dawkach tzw. „upijanie się do upadłego" (ang. *binge drinking*), szczególnie w pierwszym trymestrze ciąży, może zwiększać ryzyko wystąpienia rozszczepu wargi u dziecka nawet o 50% [44]. Ważną rolę odgrywa także dieta matki, w tym suplementacja preparatami witaminowo - mineralnymi i folianami w okresie okołokoncepcyjnym oraz w czasie trwania ciąży, stres psychologiczny, a także zaburzona gospodarka hormonalna ciężarnej kobiety [45]. Nie bez znaczenia pozostaje również wpływ chorób metabolicznych,

zażywanie steroidów i leków przeciwpadaczkowych (tj. fenytoina, benzodiazepiny) przez matkę oraz oddziaływanie promieniowania jonizującego [46].

Do tej pory nie udowodniono jednoznacznie wpływu warunków socjoekonomicznych na występowanie rozszczepów, ale istnieje jednak znacząca zależność między częstością wad rozwojowych twarzoczaszki, a statusem społeczno-ekonomicznym. Możliwym wyjaśnieniem tego zjawiska jest wpływ czynników środowiskowych takich jak: stosowanie suplementów witaminowych, prawidłowo zbilansowana dieta, dostęp do opieki medycznej czy też czynniki ryzyka związane ze stylem życia, takie jak palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, zwiększony stres. [47 – 49].

1.4.2 Czynniki genetyczne

Do jednych z pierwszych badań potwierdzających rolę czynników genetycznych w etiopatogenezie rozszczepów wargi i podniebienia należą analizy współczynnika zgodności tej wady u bliźniąt monozygotycznych. W przypadku bliźniąt z nsCL/P współczynnik zgodności wynosił 60% i był istotnie większy niż u bliźniąt dizygotycznych, u których oscylował na poziomie 3-5% [50]. Wartości te wskazują na silny wpływ czynnika genetycznego, ale zwracają również uwagę na złożoność etiologii rozszczepów i sugerują, że biorą w niej udział nie tylko czynniki genetyczne, ale również środowiskowe oraz ich złożone wzajemne oddziaływania.

Ponadto badania przeprowadzone przez Sivertsena i wsp. wykazały, że krewni pierwszego stopnia osoby dotkniętej rozszczepem są 32-razy bardziej podatni na rozszczep wargi niż ogół populacji [51]. O istotnej roli genetyki w rozwoju rozszczepów przemawiają również ich cechy dziedziczenia, które są charakterystyczne dla modelu dziedziczenia wieloczynnikowego, czyli m.in.: wzrost ryzyka powtórzenia się rozszczepu gdy choruje więcej niż jeden członek rodziny, zwiększone ryzyko dziedziczenia przy cięższej manifestacji rozszczepu oraz spadek ryzyka dziedziczenia rozszczepu u dalszych krewnych [26].

Na przestrzeni ostatnich dekad liczne analizy sprzężeń, badania asocjacyjne oraz sekwencjonowanie genów kandydackich przeprowadzone w różnych populacjach wykazały istnienie wielu chromosomowych loci oraz genów, których warianty nukleotydowe mogą być przyczyną lub też mogą zwiększać ryzyko wystąpienia nsCL/P oraz nsCP. Znaczący wpływ na identyfikację czynników genetycznych związanych z etiopatogenezą izolowanych rozszczepów twarzowej części czaszki miały badania

asocjacyjne w skali całego genomu, wykorzystujące technologię mikromacierzową GWAS (ang. *Genome-Wide Association Study)*.

W chwili obecnej najważniejszym genem oraz regionem chromosomalnym dla izolowanych wad rozszczepowych jest gen *IRF6* oraz locus 8q24.21.

Gen IRF6

IRF6 (ang. *Interferon regulatory factor 6*) po raz pierwszy został wzięty po uwagę jako ważny gen kandydacki dla rozszczepów twarzy, gdy dowiedziono, że patogenne warianty nukleotydowe zlokalizowane w jego sekwencji kodującej (głównie w eksonach 3, 4, 7, 8) są przyczyną zespołu Van der Woude oraz płetwistości podkolanowej, w których rozszczep występuje jako główna wada rozwojowa [34]. Około 15% pacjentów z VWS nie ma charakterystycznych dla tego zespołu przetok ślinowych, przez co w diagnostyce klinicznej są oni nie do odróżnienia od osób z izolowanym rozszczepem. Dlatego zaproponowano hipotezę, wg której warianty nukleotydowe obniżające lub zahamowujące ekspresję genu *IRF6* i jego produktu białkowego mogą być jedną z molekularnych przyczyn zespołu VWS.

Gen *IRF6* jest zlokalizowany na chromosomie 1 (1q32-q41). Należy on do dużej rodziny genów kodujących 9 różnych czynników transkrypcyjnych. Białka te zawierają wysoce konserwatywną domenę wiążącą DNA typu helisa-zwrot-helisa (ang. *helix-turn-helix*) oraz domenę odpowiedzialną za interakcje z innymi białkami [52]. Gen *IRF6* jest stosunkowo słabo poznanym członkiem tej rodziny, a funkcja jaką pełni produkt jego ekspresji pozostaje w dużej mierze niejasna [34]. W przypadku pozostałych czynników transkrypcyjnych z rodziny IRF (1-5,7) dowiedziono, że odgrywają one kluczową rolę w odporności wrodzonej regulując ekspresję interferonu α i β w odpowiedzi na infekcję wirusową. Analizy funkcjonalne mające na celu wyjaśnienie roli *IFR6* w patogenezie wad rozszczepowych wykazały, że u myszy pozbawionych funkcjonalnej formy tego genu obserwuje się liczne zaburzenia w rozwoju części twarzowej czaszki, w tym rozszczep podniebienia i nieprawidłowy rozwój zębów, a także nieprawidłowości w rozwoju skóry i kończyn [53]. Dowiedziono ponadto, że *IRF6* ulega silnej ekspresji podczas embriogenezy, szczególnie w podniebieniu wtórnym, a także w keratynocytach u dorosłych myszy. Wykazano, że obniżona ekspresja genu *Irf6* u myszy prowadzi do zaburzeń w proliferacji i różnicowaniu się keratynocytów, a także obniżonej odpowiedzi immunologicznej [54]. Badania wykazały także, że *IRF6* może działać jako supresor w rozwoju guza w płaskonabłonkowym raku piersi [55].

W późniejszych badaniach zidentyfikowano liczne warianty nukleotydowe genu *IRF6*, które wykazywały istotny związek ze zwiększonym ryzykiem nsCL/P. Jednym z nich był wariant rs642961 zlokalizowany w sekwencji promotorowej genu *IRF6*. Analiza funkcjonalna wykazała, że tranzycja ta zaburza wysoce konserwatywne miejsce wiązania dla czynnika transkrypcyjnego AP-2α i tym samym zmniejsza aktywność sekwencji wzmacniającej (ang. *enhancer sequence*) proces transkrypcji genu *IRF6*. Wykazano, że wariant rs642961 występując zarówno w postaci heterozygotycznej jak i homozygotycznej ponad dwukrotnie zwiększa ryzyko wystąpienia izolowanych rozszczepów twarzoczaszki [27], [56].

Związek *IRF6* z ryzykiem nsCL/P został potwierdzony we wszystkich badanych populacjach [57 – 60], w tym populacji polskiej [61]. Pozytywne wyniki uzyskano prowadząc zarówno klasyczne badania asocjacyjne obejmujące tylko wybrane warianty genu *IRF6* jak i analizy GWAS. Również meta-analiza obejmująca wyniki 13-tu badań sprzężeń przeprowadzonych w różnych populacjach potwierdziła status genu *IRF6* jako głównego genu związanego z etiologią wady rozszczepowej [56], [57], [62].

Region 8q24.21

W badaniach nad chromosomalnym regionem 8q24.21 wykazano nie tylko istotny związek między wariantami nukleotydowymi zlokalizowanymi w tym locus a ryzykiem, nsCL/P [63 – 66], ale również z ryzykiem raka prostaty [67], raka jelita grubego [68], [69], raka pęcherza [70] oraz raka piersi [71]. W przypadku rozszczepów, szczególnie silną asocjację wariantów locus 8q24.21 z nsCL/P wykazano w populacjach kaukaskich, w tym populacji polskiej.We wszystkich opublikowanych analizach GWAS dla wady rozszczepowej, wyniki wariantów zlokalizowanych w locus 8q24.21 osiągnęły poziom istotności genomowej ($p<5x10E^{-8}$) potwierdzając tym samym, że region ten jest najważniejszym chromosomowym locus dla izolowanych rozszczepów wargi i podniebienia.

Z powodu braku w tym locus genów kodujących białka, opisywany chromosomowy region 8q24.21 jest określany mianem „pustyni genowej”. Analizy funkcjonalne wykazały jednakże, że w rejonie tym są zlokalizowane ważne sekwencje regulatorowe, które wpływają na ekspresję wielu genów zlokalizowanych w odległości nawet milionów par zasad od nich, a także geny kodujące regulatorowe cząsteczki RNA, w tym długie niekodujące RNA (lncRNA – ang. *long noncoding RNAs*) [72]. W przypadku wady rozszczepowej, w miejscu w którym zlokalizowano warianty

nukleotydowe zwiększające ryzyko rozwoju tej anomalii strukturalnej, zidentyfikowano sekwencje wzmacniające tzw. „enhancery”, które regulują ekspresję genu *MYC* (OMIM *190080) podczas rozwoju twarzoczaszki. Wykazano, że warianty nukleotydowe zlokalizowane w tym regionie, zaburzają funkcję tego ważnego wzmacniacza transkrypcji, prowadząc do zmniejszenia ekspresji genu *MYC* podczas rozwoju twarzoczaszki, czego efektem jest zaburzony proces rozwoju i proliferacji m.in. komórek grzebienia nerwowego [73]. Komórki te są niezbędne do prawidłowego rozwoju parzystych wyrostków twarzowych i podniebiennych oraz ich fuzji. Zaburzenia tego procesu prowadzą do powstania wad rozszczepowych twarzoczaszki [74], [75]. W locus 8q24.21 zidentyfikowano kilka regionów, które mogą pełnić rolę enhancerów regulujących transkrypcję genów o kluczowym znaczeniu dla prawidłowego rozwoju twarzoczaszki [76].

Pozostałymi ważnymi genami, których związek z rozszczepami potwierdzono w licznych analizach genetycznych oraz badaniach na modelach zwierzęcych są: *ARHGAP29* (OMIM *610496), *VAX1* (OMIM *604294), *PAX7* (OMIM *167410) i *MAFB* (OMIM *608968). Wymienić należy także geny: *FGFR2* (OMIM *1769430), *NOG* (OMIM *602991), *THADA* (OMIM *611800), *EPHA3* (OMIM *179611), *SPRY2* (OMIM *602466) oraz *TPM1* (OMIM *191010) (Tab. 2).

Dotychczasowe meta-analizy wykazały również istotny związek pomiędzy ryzykiem nsCL/P a wariantami nukleotydowymi zlokalizowanymi w sekwencji regulatorowej genu *TP63* (OMIM *603273) oraz wariantami genu *FOX1* (OMIM *605104). [77]. Pozostałe geny określane jako modyfikatory fenotypowe, które biorą udział w etiopatogenezie CL/P to: *PAX9* (OMIM *167416), *TGFA* (OMIM *190170) [30] oraz *MSX1* (OMIM *142983) (Tab. 2) [78].

Tab. 2 Wybrane geny kandydackie dla nsCL/P oraz nsCP. Na podstawie [13], [27], [29], [64], [65], [76], [7].

Gen	Lokalizacja	Fenotyp	Przeprowadzone analizy genetyczne				Pozostałe badania	
			Analiza sprzężeń	Analiza asocjacyjna	Analiza sekwencyjna	GWAS	Badania ekspresji	Modele* zwierzęce
ARHGAP29	1p22	nsCL/P			x	x	x	x
PAX7	1p36	nsCL/P		x	x	x	x	x
IRF6	1q32	nsCL/P	x	x	x	x	x	x
TGFA	2p13	nsCL/P	x	x				
THADA	2p21	nsCL/P				x		
EPHA3	3p11	nsCL/P		x		x	x	
TP63	3q27-28	nsCL/P	x		x		x	x
MSX1	4p16	nsCP, hipodoncja		x	x		x	x
-	8q24					x		
FOXE1	9q22.33	nsCL/P, nsCP	x	x	x	x	x	x
VAX1	10q25	nsCL/P				x	x	x
SPRY2	13q31	nsCL/P			x	x	x	x
PAX9	14q13.3	nsCP, hipodoncja		x	x		x	x
TPM1	15q22	nsCL/P			x	x		
NOG	17q22	nsCL/P				x	x	x

nsCL/P – izolowany rozszczep wargi z/lub bez rozszczepu podniebienia, nsCP – izolowany rozszczep podniebienia, GWAS – badania asocjacyjne w skali całego genomu,*myszy typu *knock-out* oraz *knock-down*

1.4.2.1 Badania GWAS w populacji polskiej

Dzięki przeprowadzonej w populacji polskiej analizie GWAS dla pacjentów nsCL/P, zidentyfikowano nowe chromosomowe loci dla izolowanej wady rozszepowej. Najważniejsze z nich to 3q29 oraz 6p22.3. Potwierdzono także związek nsCL/P z wcześniej opisywanymi regionach dla rozszczepów tj. 1p22.1, 8q24.21, 15q13.3, a także 14q22.2 [79], [80].

Gen DLG1

Najważniejszym genem kandydackim dla nsCL/P w locus 3q29, które zidentyfikowano w powyższej analizie jest *DLG1* (ang. *Disc Large Homolg 1*,OMIM *601014). Gen ten koduje jedną z ważnych kinaz guanylanowych, która bierze udział w procesach proliferacyjnych i adhezyjnych, a także reguluje polarność komórek [81], [82]. U myszy, *knock-out* genu *Dlg1*$^{-/-}$ powoduje opóźnienie w rozwoju zarodkowym, rozszczep podniebienia wtórnego, przerost żuchwy, zaburzenia związane z nieprawidłowym zamknięciem cewy nerwowej oraz zaburzenia układu sercowo-naczyniowego. Obserwuje się u nich również niewydolność oddechową, która prowadzi do śmierci zaraz po urodzeniu [83 – 85]. Wykazano, że zmniejszona ekspresja genu *DLG1* jest przyczyną zaburzonego funkcjonowania szlaku sygnałowego Wnt/PCP

(ang. *WNT/β-catenin - Planar Cell Polarity),* pełniącego jedną z kluczowych ról w rozwoju twarzoczaszki [85], [86]. Intersującym jest fakt, że *knock-down* genu *Wnt5a,* którego produkt białkowy odgrywa ważną funkcję w regulacji tego szlaku, powoduje rozszczep podniebienia wtórnego. Skutkiem zaburzeń aktywności szlaku Wnt/PCP jest zahamowanie kierunkowej migracji komórek, która jest niezbędna w procesie formowania się podniebienia w okresie rozwoju zarodkowego [87], [88]. W badaniach asocjacyjnych najistotniejszy wynik uzyskano dla wariantu nukleotydowego rs338217 ($p = 2{,}56E^{-10}$) zlokalizowanego 1.5 kb przed (ang. *upstream*) genem *DLG1* w obrębie sekwencji kodującej antysensowny RNA (*DLG1-AS1*) dla tego genu. Wynik ten może sugerować, że prawdziwe funkcjonalne warianty związane z ryzkiem nsCL/P mogą wpływać bardziej na poziom ekspresji genu *DLG1* niż na zaburzenie struktury kodowanego białka [79]. Ponadto dane literaturowe wskazują, że fenotyp pacjentów z mikrodelecjami chromosomu 3q29 obejmującymi gen *DLG1* charakteryzuje się m.in. występowaniem mikrocefalii, dysmorfii oraz rozszczepów twarzy (OMIM # 609425) [89].

Gen CDKAL1

Kolejnym intersującym chromosomowym locus dla nsCL/P w populacji polskiej, który zidentyfikowano w analizie GWAS był 6p22.3 [80]. Częste warianty nukleotydowe zlokalizowane w obrębie tego regionu wykazywały związek z wadą rozszczepową na poziomie zbliżonym do istotności genomowej. Wariantem dla którego uzyskano wynik o najwyższym poziomie istotności statystycznej ($p = 6{,}31E^{-6}$, rs9356746) jest tranzycja zlokalizowana w intronie 5 genu *CDKAL1* (ang. *CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein 1 Like 1,* OMIM* 611259, rs9356746) [80]. Gen *CDKAL1* koduje metylotiotransferazę, która reguluje modyfikację cząsteczki tRNA. Proces ten zwiększenia wierności procesu translacji transkryptu kodującego cząsteczkę proinsuliny. U myszy brak funkcjonalnej formy genu *Cdkal1* prowadzi do zwiększenia wrażliwości komórek mięśni i tkanki tłuszczowej na insulinę oraz zaburza sekrecję insuliny przez komórki β wysp trzustkowych. Badania GWAS przeprowadzone w licznych populacjach wykazały, że gen *CDKAL1* jest genem kandydackim dla cukrzycy typu 2. Co ciekawe częste warianty genu *CDKAL1,* których asocjacja z cukrzycą była najsilniejsza, są zlokalizowane również w intronie 5 tego genu.[90]. Na związek tego regionu z wadami rozszczepowymi, wskazuje fakt, że znajdują się tam sekwencje wzmacniające, które regulują transkrypcję genu *SOX4* (OMIM* 184430)[91]. Gen *SOX4* koduje czynnik

transkrypcyjny regulujący ekspresję transformującego czynnika wzrostu TGF-β (ang. *Transforming growth factor beta*), który odpowiada za wzrost, różnicowanie oraz migrację komórek. Bierze on również udział w procesie osteogenezy, rozwoju układu sercowo-naczyniowego, dojrzewaniu tymocytów i systemu nerwowego. Badania na mysich zarodkach wykazały, że rodzina białek Sox w tym białko Sox4, mają fundamentalne znaczenie dla migracji i różnicowania się komórek grzebienia nerwowego [92]–[94]. Ponadto gen *Sox4* ulega silnej ekspresji w podniebieniu myszy podczas rozwoju embrionalnego. Sugeruje się także jego rolę w procesie łączenia się wyrostków podniebiennych wzdłuż przyśrodkowej krawędzi ich nabłonka [95]. Powyższe wyniki mogą wskazywać, że to *SOX4,* a nie gen *CDKA1* jest potencjalnym genem kandydackim dla izolowanych rozszczepów twarzowej części czaszki w obrębie locus 6p22.3 [80].

1.4.2.2 Izolowane rozszczepy a nowotwory

Związek wad rozszczepowych z chorobami nowotworowymi był na przestrzeni lat przedmiotem licznych badań. Wynika z nich jasno, że wśród osób dotkniętych tą anomalią rozwojową obserwuje się istotnie zwiększone ryzyko zachorowania na różne typy nowotworów [5], [8]. Korelację tę tłumaczy się głównie wspólnymi szlakami sygnalizacyjnymi, które są zaangażowane zarówno w procesy związane z rozwojem twarzoczaszki jaki i te promujące karcenogenezę. Do najważniejszych wspólnych szlaków sygnałowych należą SHH (ang. *Sonic Hedgehog*) [96], FGF (ang. *Fibroblast Growth Factor*) [97], Wnt/β katenina [98] oraz TGF-β (ang. *Transforming growth factor beta*)[99], [100]. Uczestniczą one w regulacji migracji, proliferacji, transdyferencjacji, a także apoptozie komórek. Wszelkie zaburzenia tych procesów mogą być związane zarówno z powstawaniem wad strukturalnych w obrębie twarzy, jak również sprzyjać procesom nowotworzenia [101]. Doskonałym przykładem wspomnianej asocjacji jest rodzina TGF-β. Cząsteczki należące do tej grupy białek kontrolują krytyczne dla rozwoju embrionalnego twarzy przejście EMT [102]. Procesy te są również uważane za pierwszy etap powstawania komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego. Komórki nabłonkowe nabierają inwazyjności i zdolności do migracji dopiero po przekształceniu się w komórki o charakterze mezenchymalnym [103]. Z przeprowadzonych przez Mani i wsp. badań, wynika że zaburzenia szlaku TGF-β mogą prowadzić do nadmiernej stymulacji wspomnianego przejścia EMT, a co się z tym wiąże do zwiększonej inwazyjności guza nowotworowego [104]. Dodatkowo zakłócenie

ścieżki TGF-β powoduje nadmierną syntezę czynników mitogennych, takich jak płytkopochodny czynnik wzrostu typu B (PDGFB - ang. *Platalet Devided Growth Factor Subunit B*), który przyczynia się do nadmiernej proliferacji komórek nowotworowych [105].

Znaczących dowodów na związek izolowanych rozszczepów twarzoczaszki z nowotworami dostarczyło badanie populacyjne przeprowadzone w Dani, które obejmowało wszystkie osoby dotknięte tą anomalia rozwojową urodzone między 1943 a 1987 rokiem. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazywały na istotnie częstsze występowanie raka płuca u mężczyzn z nsCLP, raka mózgu u kobiet z nsCP, a także raka piersi u kobiet dotkniętych nsCL/P [9], [106]. Już we wcześniejszym badaniu Zhu i wsp. zaobserwowali, że zarówno u dzieci z wadą rozszczepową jak i u ich rodziców zwiększa się ryzyko wystąpienia białaczek [8]. Z kolei Menezes i wsp. wykazali, że w rodzinach, w których jedna osoba jest obciążona nsCL/P obserwuje się istotniej częściej różne typy nowotworów (okrężnicy, mózgu, białaczki, piersi) niż w rodzinach nieobciążonych tą anomalią rozwojową [10].

Ważną przesłanką sugerującą, że rozwój nowotworów i wad rozszczepowych jest związany z zaburzeniem tych samych szlaków sygnałowych jest przykład rodzinnej postaci rozlanego raka żołądka z towarzyszącym rozszczepem CL/P (HDGC; CL/P – ang. - *Hereditary Diffuse Gastric Cancer, with or without cleft lip and/or palate*, OMIM #137215) o autosomalnym dominującym sposobie dziedziczenia. Jako pierwszy związek ten przeanalizował zespół Frebourga i wsp. Zidentyfikowali oni patogenne warianty zlokalizowane w genie *CDH1* w dwóch rodzinach obciążonych zarówno CL/P jak i dziedzicznym rozlanym rakiem żołądka, [107]. Nosiciele patogennych zmian w *CDH1* mają prawie o 80% zwiększone ryzyko raka żołądka [108]. U kobiet dodatkowo wzrasta o 60% ryzyko raka piersi typu zrazikowego [109]. Gen *CDH1* koduje białko E-kadherynę, która utrzymuje adhezję i morfologię komórek nabłonkowych zarówno podczas rozwoju embrionalnego jak i postnatalnie. E-kadheryna tworząc kompleks z kateniną reguluje przemiany EMT oraz procesy odwrotne do nich - MET (ang. *mesenchymal - epithelial transition*). Oba te przejścia są niezbędne w czasie morfogenezy, w tym także podczas rozwoju twarzoczaszki. Zaburzenia tych procesów odgrywają również istotną rolę w inwazyjności i progresji nowotworów [110]. Gen *CDH1* ulega silnej ekspresji we wszystkich wyrostkach twarzowych w 4 i 5 tygodniu życia zarodkowego, czyli w czasie krytycznych etapów rozwoju wargi i podniebienia. Dlatego też *CDH1* został uznany za dobry gen kandydacki dla rozszczepów [107].

Badania Letra i wsp. potwierdziły istotny związek pomiędzy częstymi wariantami nukleotydowymi zlokalizowanymi w genie *CDH1* a nsCL/P w populacji brazylijskiej [111]. Asocjację wariantów genu *CDH1* z ryzykiem wady rozszczepowej potwierdzono także w pop. chińskiej. Wykazano że wariant rs162600 zlokalizowany w sekwencji promotorowej genu *CDH1* około 6-krotnie zwiększa ryzyko tej nieprawidłowości strukturalnej [112].

Analizy GWAS przeprowadzone w licznych populacjach pozwoliły zidentyfikować wiele wspólnych chromosomowych loci i genów, których warianty nukleotydowe mają istotny związek zarówno z nowotworami jaki i z izolowanymi wadami rozszczepowymi. Udało się ustalić m.in. wspólne geny kandydackie oraz warianty nukleotydowe dla raka piersi oraz nsCL/P. W przeprowadzonych odrębnych analizach GWAS silny sygnał zidentyfikowano dla wariantów zlokalizowanych w intronie 2 genu *FGFR2* w grupie pacjentów z rakiem piersi [71], [113], [114], a także w grupie pacjentów z izolowanymi rozszczepami [63]. Podobne wyniki uzyskano w przypadku genu *THADA* pierwotnie związanego gruczolakiem tarczycy. W dwóch odrębnych analizach GWAS wyniki dla wariantów zlokalizowanych w tym genie wskazywały na silną asocjację zarówno z rakiem piersi [115] jaki i z nsCL/P [65]. Natomiast w najważniejszym do tej pory locus dla wad rozszczepowych - 8q24.21 zidentyfikowano warianty, których występowanie ma istotny związek z ryzykiem rozwoju raka jajnika, piersi, prostaty i okrężnicy. W przeprowadzanych analizach, tak samo jak w przypadku rozszczepów, szczególnie silny sygnał wykryto w obrębie sekwencji wzmacniających, które regulują transkrypcję onkogenu *MYC* [116]–[123].

Pomimo licznych badań wiedza na temat roli czynników genetycznych w etiologii nsCL/P wciąż nie jest kompletna. Ponadto większość zidentyfikowanych wariantów nukleotydowych, które wykazują związek z ryzykiem wady rozszczepowej są to często niefunkcjonalne warianty polimorficzne, których związek z rozszczepami jest wynikiem sprzężenia z prawdziwym funkcjonalnym wariantem nukleotydowym.

Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS, ang. *Next Generation Sequencing*), wykorzystywane do badań paneli genów lub analiz całego eksomu (WES, ang. *Whole Exome Sequnecing*) jest obecnie najbardziej obiecującym narzędziem służącym do wyjaśnienia roli czynnika genetycznego w etiopatogenezie tych wad twarzoczaszki [124].

2. Cele i założenia pracy

Rozszczepy wargi i podniebienia należą do najczęstszych wrodzonych wad twarzoczaszki. W Polsce problem ten dotyka średnio 1 na 1000 żywo urodzonych dzieci. Leczenie tej anomalii rozwojowej jest długotrwałe i przebiega wieloetapowo. Liczne deformacje twarzy - dostrzegalne nawet po najlepszym leczeniu chirurgicznym, a także wada wymowy, czy nierzadko występujący niedosłuch, mają znaczący wpływ na funkcjonowanie w społeczeństwie oraz na problemy związane z nawiązywaniem relacji międzyludzkich. Z dotychczasowych badań wynika również, że pacjenci dotknięci wadą rozszczepową są bardziej narażeni na choroby układu sercowo-naczyniowego oraz mają zwiększone ryzyko zachorowania na niektóre typy nowotworów.

Udowodniono, że istotną rolę w etiopatogenezie nsCL/P oraz nsCP pełnią czynniki genetyczne, jednak wiedza na ich temat wciąż nie jest dostatecznie poznana. U większości pacjentów dotkniętych izolowaną wadą rozszczepową twarzy nie udaje się zidentyfikować molekularnego podłoża tej anomalii. Trudności w ustaleniu genetycznych przyczyn powstawania nsCL/P czy nsCP wynikają ze wzajemnego przenikania się i oddziaływania na siebie czynników środowiskowych oraz genetycznych na zasadzie tzw. interakcji gen - środowisko. Identyfikację czynników genetycznych utrudnia również niepełna penetracja patogennych wariantów, epistaza genów, a także często obserwowany wielogenowy charakter dziedziczenia. Dodatkowym problemem są obserwowane znaczące różnice pod względem genów kandydackich oraz wariantów nukleotydowych w zależności od populacji. Dlatego też założeniem tej rozprawy doktorskiej było poszerzenie wiedzy na temat molekularnego podłoża nsCL/P oraz nsCP w populacji polskiej.

Główne cele jakie sformułowano w ramach niniejszej pracy to:

1. Identyfikacja nowych genów kandydackich oraz wariantów nukleotydowych związanych z etiologią nsCL/P i nsCP.
2. Ocena patogenności zidentyfikowanych wariantów nukleotydowych przy użyciu narzędzi bioinformatycznych oraz weryfikacja ich nosicielstwa u dostępnych członków rodziny probantów.

3. Ocena przydatności sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w identyfikacji wariantów nukleotydowych biorących udział w etiopatogenezie nsCL/P oraz nsCP.
4. Opracowanie panelu genowego dla wad rozwojowych twarzy, który pomógłby udoskonalić diagnostykę genetyczną pacjentów dotkniętych nsCL/P lub nsCP.

3. Materiały i metody

3.1 Materiał

Materiałem badawczym było genomowe DNA wyizolowane z leukocytów krwi obwodowej. Krew pobierano w objętości 2.5 - 3.0 ml do probówek zawierających antykoagulant (EDTA). Materiałem do izolacji były również komórki nabłonkowe, pobierane z wymazu policzkowego za pomocą sterylnych bawełnianych pałeczek wymazowych.

Materiał izolacyjny przechowywano w temperaturze 4°C przez maksymalnie 24h. W przypadku gdy dalsze procedury zaplanowano w późniejszym terminie, materiał przechowywany był w -20°C.

3.1.1 Aparatura

W poniższej tabeli przedstawiono listę wykorzystywanego sprzętu znajdującego się w zasobach Katedry i Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej.

Tab. 3 Wykaz stosowanej aparatury.

Aparatura	Producent
Waga laboratoryjna BTA210	AXIS
System do wizualizacji żeli MiniBIS Pro	Bio-Imaging Systems
Termocykler C1000™	Biorad
Worteks Vortex V-1 plus	Biosan
Komora do elektroforezy poziomej MultiSUB	Cleaver Scientific
Wirówka 5415D	Eppendrof
Wirówka z chłodzeniem 5804R	Eppendrof
Termoblok laboratoryjny, Thermomixer comfort	Eppendrof
Pipety 0.1-2µl-100-100µl Disocovery Pro	HTL LAB SOLUTIONS
Worteks S0200-230V-EU	Labnet Intenational, Inc.
Zasilacz do elektroforezy 250 EX	Life Technologies
Cieplarka UNB 400	Memert
LightCycler ®96	Roche
Wirówka SORVAL ST 16R	Thermo Scientific
Spektrofotometr - NanoDrop One	Thermo Scientific
Transiluminator UV	VILBERT LOURMAT

3.1.2 Odczynniki i roztwory

W poniższej tabeli przedstawiono listę odczynników i sporządzonych roztworów użytych podczas realizacji badań.

Tab.4 Spis stosowanych odczynników i roztworów.

Oddczynik	Producent
Zestaw do izolacji DNA z wymazów - blackPREP Swab DNA Kit	Analytikjena
10x stęż. koncentrat buforu TBE	Corning
Zestaw do izolacji DNA z krwi - Extractme DNA Blood Kit	DNA Gdańsk
Zestaw do Gel-out - Smart Pure DNA purification kits	Eurogentec
dNTP Master mix, stęż. 20mM	Eurogentec
Bufor obciążający 6 x Loading Buffer TriDye	Eurx
Oligonukleotydy w formie zliofilizowanej, do sporządzenia stęż. 100 µM	Genomed
Polimeraza DNA Q5®High-Fidelity (2U/µl)	New England Bio Labs
Proteinaza K A4392,0010 20mg/ml	PanReac AppliChem
Bromek Etydyny,roztw. 1 % czystość biochem. A1152,0025	PanReac AppliChem
EDTA - roztw. pH 8.0 (0.5 M)	PanReac AppliChem
Woda do biologii molekularnej, A7398,0500	PanReac AppliChem
SDS - roztw. 20 %, A0675,0250	PanReac AppliChem
Alkohol Etylowy 96%	POCh Gliwice
Chlorek sodu CZDA	POCh Gliwice
Chlorek amonu CZDA	POCh Gliwice
Wodorowęglan potasu CZDA	POCh Gliwice
Agaroza, 11404.07	Serva
5XHOT FIREPol ®EvaGreen ® HRM MIX no ROX	Solis Biodyne
Marker wielkości DNA, GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scietific
Roztwór	**Skład**
Bufor do lizy, ph 7.4	Chlorek amonu-16.56 g Wodorowęglan potasu - 2 g EDTA 0.5M - 400 µl woda MQ do 2000 ml
Bufor SE,ph 8	Chlorek sodu - 2.19 g EDTA 0.5M - 9 ml woda MQ do 500 ml
5M roztwór chloreku sodu	Chlorek sodu -129 g woda MQ do 500 ml

3.1.3. Sprzęt jednorazowy

W Tab.5 znajduje się wykaz sprzętu jednorazowego użytego podczas przeprowadzania analiz.

Tab.5 Spis stosowanego sprzętu jednorazowego.

Sprzęt jednorazowy	Producent
Probówki typu Eppendorf, MCT-150-C	Axygen
Płytki 96 do PCR®MICROPLATE, PCR-96-FLT-C	Axygen
Probówki typu Eppendorf, poj. 1.5 ml, MCT-150-C	Axygen
probówki w stripach do PCR, poj. 0.2 ml, PCR-0208-C	Axygen
Probówki wirownicze, poj. 15 ml, 430791	CORNING
Płytki 96 dołkowe, do Real-time PCR, 3455F5W	SSI
końcówki do pipiet 10µl, Vertex, 4118N00	SSIbio
końcówki do pipety 200µl, Vertex, 4230N00	SSIbio
Końcówki do pipety 1100µl, Vertex, 4230N00	SSIbio
probówki do PCR, poj. 0.2ml, 3210-00, UltraFlux PCR	SSIbio
Folie samoprzylepne do PCR , 4ti-0500	4titude

3.2 Grupa badana

Do grupy badanej zakwalifikowano 150 pacjentów z nsCL/P oraz nsCP. na podstawie badań klinicznych przeprowadzonych w Pracowni Wad Rozwojowych Twarzy Katedry Chirurgii Stomatologicznej i Periodontologii UMP. Rekrutacja pacjentów odbywała w ramach realizacji „*Wielkopolskiego programu kompleksowej terapii osób z wrodzonymi wadami twarzy*". Z analiz wyłączono chorych z zespołowymi postaciami wady rozszczepowej, unikając w ten sposób heterogenności grupy (podczas kwalifikacji pacjentów do analiz, nie brano pod uwagę wrodzonych braków zawiązków zębowych).

kryteria włączenia do grupy badanej:

- izolowany rozszczep wargi i/lub podniebienia tzn. pacjenci z nsCLP, nsCL lub nsCP
- brak innych nieprawidłowości rozwojowych, w tym niedorozwoju psychoruchowego czy niepełnosprawności intelektualnej

Charakterystykę grupy badanej pod kątem płci i typu rozszczepu przedstawiono w Tab.6.

Tab. 6 Grupa badana.

	Typ rozszczepu		
Płeć	**nsCL**	**nsCLP**	**nsCP**
kobiety	15 (10%)	30 (20%)	28 (18.3%)
mężczyźni	15 (10%)	45 (30%)	17 (11.7%)
Razem	**30 (20%)**	**75 (50%)**	**45 (30%)**

nsCL– izolowany rozszczep wargi **nsCLP** – izolowany rozszczep wargi i podniebienia **nsCP** – izolowany rozszczep podniebienia

Od każdej zakwalifikowanej do programu osoby (lub opiekuna w przypadku dzieci) zebrano wywiad dotyczący rodzinnego wstępowania wady rozszczepowej (Tab.12,14), a także przebiegu ciąży tj. przebytych infekcji, przyjmowanych leków czy ekspozycji na teratogeny. Grupę kontrolną stanowiło 300 zdrowych osób , bez żadnych wad rozwojowych. Rekrutacja tej grupy została przeprowadzona, również w Pracowni Wad Rozwojowych Twarzy Katedry Chirurgii Stomatologicznej i Periodontologii UMP.

3.3 Metody

Na potrzeby rozprawy doktorskiej oraz realizacji „*Wielkopolskiego programu kompleksowej terapii osób z wrodzonymi wadami twarzy*" został zaprojektowany panel wad rozwojowych twarzy, obejmujący pełną eksomową sekwencję 424 genów i 61 wariantów nukleotydowych o całkowitej wielkości 1614841 pz = 1,6 Mpz. Do analizy sekwencji kodującej genów włączonych do panelu wykorzystano metodę wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji (NGS - ang. *Next Generation Sequencing*). Geny oraz warianty nukleotydowe zostały wybrane na podstawie najnowszych danych literaturowych oraz naukowych baz danych.

Geny oraz warianty nukleotydowe wyselekcjonowano w oparciu o:

- ich udokumentowany związek z występowaniem izolowanych wad rozszczepowych twarzoczaszki (wszystkie znane geny kandydackie) – szczególną uwagę zwrócono na geny, które wykazują związek z wadą rozszczepową w populacji polskiej (PubMed/OMIM); brano także pod uwagę geny związane z zespołowymi formami rozszczepów

- badania prowadzone na mysich modelach wad twarzoczaszki (ang. *knockout mice*); brano pod uwagę szczególnie te geny, których knock-out powodował u myszy rozszczepy wargi i/lub podniebienia (wg bazy danych MGI ang. *Mouse Genome Informatics*)

- dane dotyczące funkcji genów, których produkty ekspresji uczestniczą w szlakach sygnalizacyjnych, odgrywających kluczową rolę podczas rozwoju embrionalnego twarzoczaszki, oraz geny kodujące białka zaangażowane w naprawę DNA (UniProtKB)

W selekcji uwzględniono również fakt, że wrodzony brak zawiązków zębów stałych, to najczęstsze zaburzenie towarzyszące rozszczepom, a dane literaturowe wskazują na wspólne szlaki sygnalizacyjne i mechanizmy molekularne, które uczestniczą

w rozwoju zawiązków zębów, wargi oraz podniebienia. Dlatego też, do panelu wybrano geny, dla których wykazano związek z występowaniem izolowanych nieprawidłowości zębowych oraz geny związane z zespołami wad rozwojowych, w których wrodzone braki zawiązków zębowych są jedną z występujących anomalii rozwojowych. Zwrócono także uwagę na badania funkcjonalne przeprowadzone na modelu mysim, u których *knock-out* genowy powoduje zaburzenia w rozwój lub brak zębów, a także geny, których produkty białkowe zaangażowane są w rozwój zawiązków zębowych podczas embriogenezy.

Do przygotowania panelu genów wykorzystano bioinformatyczne narzędzie NimbleDesign® opracowane przez firmę Roche. Umożliwiło ono zaprojektowanie sond (SeqCap® EZ Prime Choice), które pozwoliły na tzw. celowane sekwencjonowanie NGS, dzięki czemu analiza mogła ograniczyć się do wybranych miejsc w genomie. Lista wybranych do panelowych genów znajduje się w suplemencie.

3.3.1 Izolacja genomowego DNA

Pierwszym etapem badań była izolacja wysokocząsteczkowego kwasu nukleinowego o wysokim stężeniu i czystości. Do reakcji sekwencjonowań (zarówno sekwencjonowania NGS jak i klasycznego sekwencjonowania metodą Sangera) użyto genomowego DNA wyizolowanego z krwi za pomocą metody wysalania białek komórkowych w obecności nasyconego roztworu chlorku sodu.

Izolację przeprowadzono według następującego protokołu:

1. Do probówek wirowniczych o całkowitej objętości 15 ml, dodawano 7,5 ml schłodzonego w temperaturze 4°C buforu do lizy (ph 7,4).
2. Następnie do probówek z buforem dodawano 2,5 ml krwi obwodowej (pobranej na EDTA, jako antykoagulant); mieszaninę inkubowano w lodzie przez 60 minut. Podczas inkubacji kilkukrotnie mieszano zawartość probówki poprzez odwracanie.
3. W celu uzyskania osadu leukocytów mieszaninę wirowano w temperaturze 4°C, przez 15 min. przy prędkości 5000 rpm.
4. Ostrożnie usuwano supernatant, pozostawiając osad na dnie probówki.

5. Przemywano osad, stosując 2,5 ml schłodzonego buforu do lizy; po dodaniu buforu intensywnie mieszano w celu rozbicia osadu i uzyskania zawiesiny komórek.

6. Mieszaninę wirowano przy prędkości 3000 rpm przez 15 min. Punkty 4, 5, 6 powtarzano ok. czterokrotnie.
7. Po uzyskaniu białego osadu, dodawano 1,25 ml schłodzonego buforu SE i silnie wytrząsano w celu otrzymania zawiesiny.
8. Dodawano 62,5 µl 20% SDS oraz 3,175 µl proteinazy K o stężeniu 20 mg/ml; całość delikatnie mieszano poprzez odwracanie probówki i inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 55°C.
9. Po całonocnej inkubacji, do mieszaniny dodawano 375 µl roztworu 5M NaCl i worteksowano przez 15 s celem wytrącenia białek.
10. Wirowano w temperaturze 20°C przez 15 minut przy prędkości 3600 rpm.
11. Uzyskany supernatant przenoszono do nowych, sterylnych probówek wirownicznych o objętości 15 ml; punkty 9, 10 powtarzano dwa razy.
12. W celu wytrącenia DNA, supernatant przenoszono do czystej probówki i dodawano 96% etanol (schłodzony w temperaturze -20°C) w stosunku objętościowym 1:2,5 (supernatant/etanol).
13. Wytrącające się DNA przenoszono do 1,5 ml probówek typu Eppendorf, a następnie wirowano przy prędkości 12000 rpm w temperaturze 4°C.
14. Usuwano supernatant.
15. W celu oczyszczenia otrzymanego osadu DNA dodawano 500 µl schłodzonego 70% etanolu, następnie wirowano przy prędkości 12000 rpm w temperaturze 4°C przez 15 minut.
16. Usuwano supernatant, a uzyskany osad DNA suszono w temperaturze 37°C przez 30 minut.
17. Osad DNA zawieszano w 500 µl sterylnej dejonizowanej wody wolnej od DNaz i przechowywano przez 24h w 4°C.
18. W celu rozpuszczenia osad DNA delikatnie mieszano pipetą poprzez aspirację.
19. Preparat przechowywano w temperaturze 4°C przez okres ok. 2-3 miesięcy do czasu dalszych procedur. Długoterminowo próbkę przechowywano w temperaturze -20°C.

Do pozostałych analiz genotypowania użyto genomowego DNA wyizolowanego z komórek błony śluzowej policzka metodą kolumienkową.

Izolację DNA z wymazów błony śluzowej przeprowadzono z wykorzystaniem blackPREP Swab DNA Kit firmy Analytikjena, zgodnie z instrukcją producenta:

1. Materiał pobierano za pomocą pałeczki wymazowej, którą następnie umieszczano w 1,5 ml sterylnej probówce typu Eppendorf; wystającą część pałeczki odcinano w celu swobodnego zamknięcia probówki.
2. Dodawano 400 µl bufory lizującego TLS oraz 25 µl Proteinazy K , intensywnie worteksowano przez 5 s, a następnie inkubowano w temperaturze 50°C przez 15-20 minut.
3. Podczas inkubacji próbki worteksowano 3-4 razy.
4. Lizat wraz z pałeczką wymazową przenoszono do probówek prefiltrujących umieszonych w probówce odbierającej, aby odzyskać jak największą ilość materiału oraz wstępnie oczyścić materiał ze zdegradowanych podczas inkubacji białek komórkowych.
5. Wirowano przez 1 minutę przy 10 000 x g
6. Do uzyskanego przesączu dodawano 400 µl buforu wiążącego TBS (zwiększającego powinowactwo ujemnie naładowanego DNA do polikationowego złoża) i delikatnie mieszano poprzez aspirację pipetą do uzyskania homogennej mieszaniny.
7. Całość przenoszono na złoże minikolumny umieszonej w probówce odbierającej.
8. Wirowano przez 2 minuty przy 10 000 x g, a następnie wylewano filtrat.
9. Minikolumnę umieszczano w nowej probówce odbierającej i dodawano 500 µl buforu płuczącego HS, wirowano przez 1 minutę przy 10 000 x g.
10. Uzyskany przesącz wylewano i ponownie umieszczano minikolumnę w nowej probówce odbierającej.
11. Do minikolumny dodano 750 µl buforu płuczącego MS (w celu oczyszczenia złoża m.in. z resztek soli chaotropowych)
12. Wirowano przez 1 minutę przy 10 000 x g, ponownie wylano uzyskany filtrat i umieszczono minikolumnę w nowej probówce odbierającej.
13. Kolumnę wirowano przez 2 minuty przy maksymalnej prędkości w celu dokładnego osuszenia złoża (pozbywano się w ten sposób m.in. resztek alkoholu etylowego, który jest inhibitorem reakcji PCR).
14. Minikolumnę przeniesiono do nowej 1.5 ml sterylnej probówki typu Eppendorf.

15. Na złoże minikolumny naniesiono ostrożnie bufor elucyjny (ang. *elution buffer*), w celu uwodnienia i uwolnienia DNA ze złoża.
16. Próbkę z minikolumną inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 minuty, a następnie wirowano przez 1 minutę przy 6 000 x g .
17. Po wirowaniu minikolumnę usunięto a wyizolowane DNA przechowywano 1.5 ml probówce typu Eppendorf w temperaturze 4°C lub -20°C do czasu dalszych procedur.

3.3.2 Ocena jakościowa i ilościowa wyizolowanego materiału

Analizę jakościową i ilościową wyizolowanego preparatu DNA wykonano za pomocą metody spektrofotometrycznej polegającej na pomiarze absorbancji w świetle ultrafioletowym przy trzech długościach fali: λ=230nm, 260nm, 280nm. Pomiaru dokonywano z wykorzystaniem urządzenia NanoDropOne firmy Thermo Scientific. Stężenie preparatu opierano na pomiarze absorbancji przy długości fali λ=260 nm wobec próby ślepej, którą stanowiła woda lub bufor TE użyty do zawieszenia DNA. Czystość wyizolowanego DNA została określona na podstawie wartości współczynnika absorbancji, mierzonej przy długości fali λ=260 nm i 280 nm oraz 260 nm i 230nm. Wartość współczynnika absorbancji A_{260}/A_{280} pozwoliła określić stopień zanieczyszczenia preparatu białkami oraz solami - prawidłowa, powinna mieścić się w przedziale 1.8 - 2.0. Współczynnik absorbancji A_{260}/A_{230} pozwolił ocenić ewentualne zanieczyszczenie próbki odczynnikami użytymi podczas izolacji (etanolem, EDTA, solami) - prawidłowy zakres powinien przyjmować wartości 2.0 – 2.2. Do dalszych analiz włączono preparaty spełniające wyżej wymienione kryteria.

W celu dodatkowej oceny jakościowej przeprowadzono elektroforezę wyizolowanego DNA w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (stęż. końcowe 0,2 µg/ml). Analiza ta umożliwiła ocenić integralność genomowego DNA.

3.3.3 Sekwencjonowanie metodą NGS wraz z analizą bioinformatyczną

Próbki od pacjentów zawierające 2-3 µg genomowego DNA wysłano do analizy sekwencjonowania metodą NGS. Przygotowanie bibliotek DNA, oznaczenie wybranych

regionów sekwencjonowania i bioinformatyczna obróbka danych, została zrealizowana przez firmę Warsaw Genomics S.A. z siedzibą w Warszawie.

Biblioteki DNA zostały przygotowane przy użyciu kitu Kapa HyperPlus firmy Roche. Do analizy sekwencji kodujących wybranych genów użyto zestawu sond hybrydyzujących SeqCap EZ Choice Probes firmy Roche. Sekwencję wzbogaconych obszarów DNA odczytano na sekwenatorze HiSeq4000 firmy Illumina. Długość odczytu wynosiła 2x150 nukleotydów, co pozwoliło uzyskać wysoką specyficzność reakcji. Średnie pokrycie badanych regionów wynosiło minimum 30X. Po analizie jakości otrzymanych wyników, odczyty zostały złożone w kontigi (ang. *contigous sequences*) i porównane do sekwencji ludzkiego genomu referencyjnego GRCh37/hg19 (ang. *Genome Reference Consortium*). Warianty genetyczne identyfikowano przy pomocy oprogramowania *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA; http://bio-bwa.sourceforge.net), umożliwiającego wykrycie wszystkich możliwych substytucji oraz większości (95%) małych insercji i/lub delecji. Pokrycie eksonów badanych genów oraz jakość sekwencjonowań analizowano przy użyciu programu IGV version 2.6.3 (ang. *The Integrative Genomics Viewer).*

Analiza bioinformatyczna dla wszystkich zidentyfikowanych wariantów obejmowała annotacje z wykorzystaniem baz danych HGMD (ang. *Human Gene Mutation Database,* http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php), ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) oraz VarSome (https://varsome.com/), a także annotacje częstości z wykorzystaniem bazy 1000 Genomes Project (https://www.internationalgenome.org/) oraz gnomAD v.2.1.1 (ang. *Genome Aggregation Database,* https://gnomad.broadinstitute.org/). W celu predykcji patogenności zidentyfikowanych wariantów, przeprowadzono analizy *in silico* z wykorzystaniem programów ClinVar, SHIFT, LRT, Mutation Assessor, FATHMM, PROVEAN oraz Meta SVM.

3.3.4 Selekcja potencjalnie patogennych wariantów genetycznych

Analiza wielogenowego panelu opartego na technice NGS pozwoliła na identyfikację średnio 2815 (+/-65) wariantów nukleotydowych u każdego pacjenta.

Pierwszym etapem selekcji wykrytych zmian była ocena częstości ich występowania w największej bazie ludzkich genomów referencyjnych – GnomAD. Baza ta jest źródłem danych o 15 700 ludzkich genomów i 125 740 sekwencji

eksomowych (dane pochodzącą od ok. 130 000 osób z różnych populacji). Podczas analizy brano po uwagę tylko rzadkie warianty (częstość allelu rzadszego MAF<0,01).

Patogenność wariantów analizowano również w oparciu o internetowe bazy danych takie jak: ClinVar – narzędzie bazy NCBI , HGMD, VarSome, Ensemble (https://m.ensembl.org/index.html) oraz COSMIC (ang. *Catalogue of Somatic Mutationsin Cancer*). Powyższe bazy zawierają informacje o zidentyfikowanych patogennych wariantach, które mają wpływ na fenotyp i dla których wykazano związek z etiologią ludzkich chorób genetycznych. Opierają się one na najnowszych dostępnych danych naukowych i literaturowych. W selekcji oceniano także pokrycie eksonów oraz jakość sekwencjonowania. Do wizualizacji wyników wykorzystano interaktywne narzędzie IGV.

Do oceny patogenności wyselekcjonowanych wariantów wykorzystano narzędzia bioinformatyczne *in silico*, które miały na celu określić możliwy wpływ badanej zmiany na aktywność i funkcje białka. Do tego celu wykorzystano programy DEOGEN2, Eigen, Eigen PC, FATHMM – MKL, FATHMM – XF, Meta LR, Mutation Taster, MVP PrimateAI, REVEL, SHIT4G.

3.3.5 Charakterystyka programów wykorzystywanych do analiz *in silico*

Do badań wykorzystano programy opierające się na ocenie stopnia konserwatywności ewolucyjnej zmienionego aminokwasu oraz analizujące wpływ substytucji aminokwasu na strukturę, właściwości fizykochemiczne i funkcję białka, takie jak:

- **Mutation Assessor -** program ten opiera się na danych z analiz 60 000 patogennych wariantów z bazy OMIM, a także danych zawartych w bazie COSMIC. Skala oceny mieści się w zakresie -5,135 do +6,49.
- **Mutation Taster -** program stosowany także do oceny zmian intronowych, małych insercji i/lub delecji. Opiera się on nie tylko na ocenie stopnia konserwatywności, ale bierze również pod uwagę lokalizację miejsc splicingowych, sekwencji regulatorowych, mRNA oraz funkcję kodowanego białka. Program bazuje na informacjach zawartych w bazie HGMD Professional, w której przechowywane są informacje o 390 000 patogennych wariantach związanych z ludzkimi chorobami. Do oceny używa tzw. naiwnego klasyfikatora Bayes.

- **FATHMM, FATHMM - MKL , FATHMM - XF** (ang. *Functional Analysis Through Hidden Markov Models*) - do analizy patogennego wpływu zmian typu *missense* programy wykorzystują Ukryte Modele Markowa. Analizują one zmiany pod kątem konserwatywności domen białkowych, chorób dziedzicznych, oceniają również stopień ich onkogenności. Współczynniki używane do oceny mieszczą się w przedziale -16,13 do +10,64. Rozszerzenia programu takie jak FATHMM-MKL, FATHMM-XF oceniają wpływ wariantów zlokalizowanych w sekwencjach niekodujących bazując m.in na ENCODE (ang. *Encyclopedia of DNA Elements*). Oceny dokonują w skali od 0 do 1.
- **LRT** (ang. *Likelihood Ratio Test*) - program porównuje wysoce konserwatywne sekwencje aminokwasowowe bazując na genomach 32 gatunków kręgowców, używając skali 0-1.
- **PROVEAN** (ang. *Protein Variation Effect Analyzer)* - program ocenia wpływ zmian niesynonimicznych i insercyjno/delecyjnych na strukturę i aktywność białka w skali od – 14 do 14.
- **SIFT** oraz **SHIT4G** (ang. *Sorts Intolerant from Tolerant)* - do oceny stopnia konserwatywności aminokwasu i porównywania sekwencji homologicznych programy te używają narzędzia PSI-BLAST (ang. *Position-Specific, Iterated Basic Local Alignment Search Tool*). Oceniają one wpływ zmiany niesynonimicznej w skali 0-1, przy czym wyniki poniżej wartości 0,05 są określane jako uszkadzające „*Damaging*".

Zastosowano również programy integrujące wyniki z wielu niezależnych programów do analizy in silico, takie jak:

- **REVEL -** program z dużą czułością rozróżnia warianty patogenne od ultra rzadkich, neutralnych wariantów zmiany sensu. Bazuje on na kombinacji wyników z 13 samodzielnych narzędzi predykcyjnych takich jak: MutPred, FATHMM v2.3, VEST 3.0, Polyphen-2, SIFT, PROVEAN, MutationAssessor, MutationTaster, LRT, GERP ++, SiPhy, phyloP i phastCons. Oceny dokonuje również na podstawie danych z bazy ClinVar, analizuje rzadkie patogenne warianty oraz potencjalnie patogenne warianty z bazy HGMD, a także rzadkie neutralne warianty z serwera ESV (ang. *Exome Variant Server*), zawierającego dane z projektu sekwencjonowania tysięcy ludzkich eksomów.

- **Meta SVM** - do integracji wyników program ten wykorzystuje maszynę wektorów wsparcia SVM (ang. *Support Vector Machine*). W ocenie patogenności, bazuje na programach takich jak: SIFT, PolyPhen-2, GERP ++, MutationTaster, Mutation Assessor, FATHMM, LRT, SiPhy i PhyloP; analizę opiera również na podstawie wyników dla 36 192 wariantów z bazy UniProt.
- **Meta LR** - program ten wykorzystuje regresję logistyczną do integracji wyników z 9 niezależnych narzędzi oceniających patogenność, takich jak: SIFT, PolyPhen-2, GERP ++, Mutation Taster, Mutation Assessor, FATHMM, LRT, SiPhy i PhyloP. Analiza opiera się dodatkowo na podstawie wyników 36 192 wariantów z bazy UniProt. Charakter zmiany ocenia w skali od 0 do 1.

Do badań użyto także programy, które przewidują patogenny wpływ wariantów opierając się na sztucznych sieciach neuronowych:

- **DEOGEN2** - program ten ocenia wpływ wariantu na funkcję białka bazując na danych o jego strukturze i właściwościach fizykochemicznych oraz szlakach sygnałowych, w których bierze ono udział. Do predykcji patogenności program stosuje algorytm Losowego Lasu (ang. *Random Forest*) bazującego na technice generowania dużej ilości danych ang. *bagging*, która pozwala na precyzyjniejszą analizę i klasyfikację zmiany.
- **Eigen, Eigen PC** - program ocenia funkcjonalność wariantów zlokalizowanych zarówno w sekwencjach kodujących jak i niekodujących. Dane do analiz czerpie m.in. z konsorcjum ENCODE (ang. *The Encyclopedia of DNA Elements Consortium*), którego celem jest stworzenie bazy danych, zawierającej kompletne informacje o wszystkich funkcjonalnych wariantach genetycznych ludzkiego genomu oraz *Roadmap Epigenomics Project* – źródło informacji o zmianach epigenetycznych w genomie człowieka. Program przedstawia tzw. meta-wynik w oparciu o wszystkie dostępne opublikowane badania związane z wariantami patogennymi i potencjalnie patogennymi, mającymi zawiązek z chorobami jedno- oraz i wielogenowymi. Zaletą otrzymanego wyniku jest możliwość uwzględnienia w analizie określonego typu tkanki lub komórki.
- **MVP** - program umożliwiający precyzyjną ocenę patogenności wariantów zmiany sensu; wykorzystuje on w tym celu technologię „*deep learning*”, która umożliwia kompilację informacji z wielu baz danych oraz korelację

wyników z innych programów predykcyjnych. Do analizy porównawczej używa m.in. danych o patogennych wariantach germinalnych typu *de novo* związanych z zaburzeniami rozwoju oraz o zmianach somatycznych zlokalizowanych w regionach obejmujących tzw. gorące miejsca (ang. *hot spots*) w genomie, które są związane z nowotworami.

- **PrimateAI** – program dokonuje analizy na podstawie danych dla ok. 380 000 częstych wariantów typu zmiany sensu, które zidentyfikowano u ludzi oraz 6 innych gatunków ssaków naczelnych. Do analizy wykorzystuje on sekwencje flankujące badany wariant oraz sekwencje ortologiczne różnych gatunków zwierząt. Aby precyzyjniej ocenić wpływ zmiany aminokwasu na strukturę białka, program uczy się przewidywać strukturę drugorzędową białka, oraz jego miejsca dostępne dla rozpuszczalnika. Wynik analizy przedstawia w skali 0-1, gdzie 0 – oznacza nieznaczną patogenność, a 1 najsilniejszą patogenność wariantu.

3.3.6 Potwierdzenie obecności potencjalnie patogennych wariantów u probanta oraz identyfikacja nosicielstwa wyselekcjonowanych zmian u członków rodziny

Do potwierdzenia obecności wybranych wariantów nukleotydowych u pacjentów, a także określenia ich sposobu dziedziczenia w rodzinie wykorzystano bezpośrednie sekwencjonowanie metodą Sangera lub też wysokorozdzielczą analizę topnienia HRM (ang. *High Resolution Melting*), opierającą się na metodzie PCR w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*).

Projektowanie Starterów

Pierwszym krokiem w metodologii badań replikacyjnych było zaprojektowanie starterów do reakcji PCR w celu amplifikacji fragmentów DNA zawierających w swojej sekwencji badany wariant genetyczny. Startery zaprojektowano przy użyciu programu Primer3Plus. Długość starterów wynosiła 18 – 22 pz, temperatura topnienia mieściła się w przedziale 60-64°C, zawartość par GC wynosiła 40-60%. Długość produktów PCR do reakcji genotypowania metodą HRM wynosiła średnio 190 pz (od 80 do 330 pz) natomiast produkty PCR przeznaczone do reakcji sekwencjonowania miały średnio 410 pz (od 270 do 660 pz).

Specyficzność zaprojektowanych starterów została sprawdzona przy wykorzystaniu programu PCR – *in silico* UCSC Genome Browser. (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr). Narzędzie to umożliwiło także potwierdzenie długości i sekwencji otrzymanego produktu amplifikacji.

Sekwencje starterów oraz ich temperatury hybrydyzacji, zostały przedstawione się w suplemencie w Tab.10.2 oraz 10.3.

3.3.6.1 Sekwencjonowanie metodą Sangera

Amplifikacja wybranych fragmentów metodą PCR

Reakcję PCR początkowo przeprowadzono w gradiencie temperatury w zakresie 55-67°C. Otrzymane w ten sposób produkty PCR poddano następnie rozdziałowi elektroforetycznemu w celu wyznaczenia temperatury przyłączania starterów (ang. *annealing temperature*), przy której amplifikacja zaszła z największą specyficznością oraz wydajnością. Wielkość otrzymanych fragmentów DNA potwierdzono na podstawie markera wielkości DNA GeneRuler 100 bp DNA Ladder firmy Thermo Scietific. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR oraz profil temperaturowy reakcji został przedstawiony odpowiednio w Tab.7 i Tab.8.

Tab.7 Mieszanina stosowana do reakcji PCR.

Składniki	Objętość
5X Q5 Bufor reakcyjny	10 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
10 µM Starter F (ang. *forward*)	2.5 µl
10 µM Starter R (ang. *reverse*)	2.5 µl
DNA (~100ng/µl)	1 µl
2U/µl Q5 High Fidelity DNA Polymerase*	0.5 µl
5X Q5 High GC Enhancer**	5 µl
H_20***	32.5 µl
Całkowita objętość reakcji	**50 µl**

*ok.280 razy wyższa wierności amplifikacji od polimerazy Taq
** zwiększa wydajność amplifikacji fragmentów bogatych w pary GC
***dejonizowana, wolna od nukleaz

Tab.8. Etapy i profil termiczny reakcji PCR.

Etap	Temp.	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	98°C	30 s	1
Denturacja	98°C	10 s	35
Przyłączanie starterów	59-67°C	15 s	
Elongacja	72°C	30 s	
Elongacja końcowa	72°C	2 min	1

W celu potwierdzenia obecności zamplifikowanego produktu PCR oraz oceny wydajności reakcji, przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym, nanosząc na niego 5 µl próby z dodatkiem 3 µl 6x buforu obciążającego.

Ekstrakcja produktów PCR z żelu agarozowego

W przypadku trudnych do amplifikacji sekwencji, dla których nie było możliwe uzyskanie specyficznego produktu PCR, zastosowano ekstrakcję właściwego produktu z 2% żelu agarozowego metodą gel- out.

Do oczyszczania produktów PCR z żelu agarozowego zastosowano zestaw SmartPure DNA purification firmy Eurogentec. Procedurę wykonywano zgodnie z zalecenia procudenta:

1. Po rozdziale elektroforetycznym, prążek wycinano z żelu agarozowego. Usuwano przy tym możliwie największą ilość nadmiarowej agarozy.
2. Wycięty fragment agarozowy wraz z zawartym w nim produktem PCR, przenoszono do 1,5 ml probówek typu Eppendorf, następnie ważono.
3. Na każde 100 mg żelu dodawano 300 µl buforu do ekstrakcji (ang. *extraction buffer*).
4. Całość inkubowano przez 5-10 min w 50°C, w trakcie trwania inkubacji, próbę worteksowano co 2-3 min w celu ułatwienia rozpuszczenia agarozy.
5. Rozpuszczoną mieszaninę przeniesiono na złoże minikolumny umieszonej w probówce odbierającej, następnie wirowano przez 1 minutę przy 6 000 x g.
6. Usunięto przesącz z probówki odbierającej i umieszczono w niej z powrotem minikolumnę.
7. Do minikolumny dodano 500 µl buforu do ekstrakcji, wirowano przez 1 minutę przy 12 000 x g.
8. Ponownie usunięto przesącz z probówki i umieszczono w niej kolumienkę.
9. W celu oczyszczenia złoża kolumny z zanieczyszczeń, dodano 750 µl buforu płuczącego (ang. *wash buffer*) i wirowano przez 1 minutę przy 12 000 x g.

10. Przesącz ponownie usunięto z probówki odbierającej i umieszczono w niej minikolumnę
11. Całość ponownie wirowano przez 1 minutę przy 12 000 x g, w celu osuszenia złoża w minikolumnie.
12. Umieszczono minikolumnę w nowej sterylnej probówce typu Eppendorf, następnie dodano centralnie na złoże minikolumny 30 µl buforu elucyjnego i inkubowano przez 1 minutę w temperaturze pokojowej.
13. W celu uwolnienia związanego ze złożem fragmentu DNA, wirowano przez 1 minutę przy prędkości 12 000 x g
14. Usunięto minikolumnę, a oczyszczony produkt PCR przechowywano temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.

Analiza sekwencjonowania

Matryce DNA (o stężeniu minimum 10 ng/µl w obj. 20 µl) oraz startery (rozcieńczone do stężenia 5 pmol/µl w obj. 12 µl), wysłano do firmy Genomed S.A., która przeprowadziła analizę sekwencjonowania metodą Sangera.

Do oczyszczenia produktów PCR z nadmiaru pozostałych po reakcji starterów i trifosforanów deoksyrybonukleotydów (ang. *dNTP*) użyto zestawów DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit oraz ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kit. Odczytu zamplifikowanych fragmentów dokonywano na sekwenatorze kapilarnym ABI Prism 3730 firmy Applied Biosystems, Foster City, CA. Analiza sekwencji badanego fragmentu DNA odbywała się w dwóch kierunkach, zarówno ze starterem przednim (ang. *forward)* jaki wstecznym (ang. *reverse*), co pozwoliło uniknąć ewentualnego pojawienia się wyników fałszywie pozytywnych lub negatywnych.

Analizy chromatogramów dokonano przy użyciu programu FinchTV 1.4.

3.3.6.2 Genotypowanie metodą HRM

W metodzie HRM różnice w stężeniu DNA pomiędzy próbkami uniemożliwiają prawidłową identyfikację genotypów, dlatego w celu uniknięcia problemów z analizą próby pochodzące od probanta i jego rodziców oraz kontrole doprowadzono do jednakowych stężeń tj. 20 ng/µl.

Przed przystąpieniem do analiz genotypowania, reakcję najpierw przeprowadzono w gradiencie temperatury w zakresie 55-67°C. Pozwoliło to dobrać właściwą temperaturę przyłączania starterów (ang. *annealing temperature*), przy której zarówno wydajność jak i specyficzność reakcji była optymalna.

Pierwsza część reakcji HRM polegała na amplifikacji krótkiej sekwencji DNA (~100-250 pz) zawierającej badany wariant nukleotydowy wykorzystując metodę PCR w czasie rzeczywistym. Mieszanina reakcyjna zawierała niespecyficzny barwnik fluorescencyjny - Eva Green interkalujący do dwuniciowych cząsteczek DNA (Tab. 9). Cząsteczki DNA nabierały w ten sposób zdolności do wzbudzania i emisji fluorescencji. Pozwalio to na pomiar jej poziomu po każdym cyklu i obserwację przyrostu ilości produktu PCR reakcji.

Tab. 9 Mieszanina stosowana do reakcji Real-time PCR-HRM.

Składniki	Objętość
5X Hot FirePol Eva Green HRM Mix	4 µl
10 µM Starter F (ang. *forward*)	0.16 µl
10 µM Starter R (ang. *reverse*)	0.16 µl
DNA (~25ng/µl)	1 µl
H_20*	14.68 µl
Całkowita objętość	**20 µl**

*dejonizowana, wolna od nukleaz

Drugi etap reakcji polegał na analizie profilu topnienia produktów PCR (HRM). Zamplifikowane fragmenty DNA były poddawane stopniowej denaturacji, która powodowała zmiany w poziomie fluorescencji poprzez odłączanie się barwnika fluorescencyjnego od jednoniciowych cząsteczek DNA. Na tej podstawie wyznaczone zostały krzywe topnienia produktów PCR z rozdzielczością sięgającą 0,01°C. Różnice w temperaturze topienia amplikonów oraz kształt krzywych, pozwoliły na identyfikację homo- i heterozygotycznych genotypów.

Obserwowane różnice pomiędzy genotypami spowodowane były zmianą liczby wiązań wodorowych w cząsteczce, która wynikała z pojawienia się badanego wariantu genetycznego. Wszystkie analizy HRM przeprowadzone w ramach tej pracy doktorskiej dotyczyły weryfikacji zmian heterozygotycznych. W związku z powyższym nie napotkano na problemy związane analizą wariantów polegających na zamianie A↔T oraz G↔C.

Tab. 10 Etapy i profil termiczny reakcji Real -Time PCR.-HRM.

PCR			
Etap	**Temp.**	**Czas**	**Liczba cykli**
Denaturacja wstępna	95°C	15 min	1
Denturacja	95°C	10 s	50
Przyłączanie starterów	53-60°C	10 s	
Elongacja*	72°C	10 s	
HRM			
Temp.		**Czas**	
95°C		60 s	
40°C		60 s	
70-80°C		1s	
90-98°C**		1s	
40°C***		30 s	

*Elongacja z pojedynczym pomiarem fluorescencji
**Ciągły pomiar fluorescencji, 25 pomiarów/°C (0.02°C/s)
***Chłodzenie

3.3.7 Analiza nadreprezentacji (ORA – ang. *Over-Representation Analysis*)

Dla genów, w których potwierdzono obecność potencjalnie patogennych zmian przeprowadzono analizę ORA, która jest jedną z tzw. analiz wzbogacenia (ang. *enrichment analysis*). Pozwala ona na weryfikację, czy wśród analizowanych genów występuje istotna „nadreprezentacja" określonych funkcji molekularnych oraz procesów biologicznych. Narzędziem bioinformatycznym użytym do tego celu było WebGestalt (ang. *WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit,* http://www.webgestalt.org/).

4. Wyniki

Analiza NGS pełnej sekwencji kodującej genów wyselekcjonowanych do panelu objęła w sumie 150 pacjentów, w tym 105 z nsCL/P oraz 45 z nsCP. Identyfikacji zmian sekwencyjnych dokonano z zastosowaniem technologii NGS przy użyciu platformy firmy Illumina.

Metoda ta umożliwiła wykrycie 41 potencjalnie patogennych zmian u 35 (24%) analizowanych pacjentów, w tym u 25 osób z nsCL/P oraz 10 osób z nsCP.

Dane naukowe sugerują, że nsCP charakteryzuje się odrębną etiologię genetyczną, dlatego wyniki dla tej grupy pacjentów zostały przedstawione w osobnych tabelach i analizowane jako odmienny typ wady twarzoczaszki.

Pacjenci z nsCL/P

W grupie 105 pacjentów z nsCL/P zidentyfikowano w sumie 27 potencjalnie patogennych zmian. Wśród nich stwierdzono obecność 21 heterozygotycznych wariantów zmiany sensu oraz 4 heterozygotycznych wariantów typu *nonsense*. Pozostałe wykryte warianty nukleotydowe to heterozygotyczna dwunukleotydowa delecja prowadząca do przesunięcia ramki odczytu, a także trójnukleotydowa hemizygotyczna delecja. Wśród analizowanych wariantów w grupie nsCL/P 14 stanowiły nowe, nieopisane dotąd zmiany, a 3 zidentyfikowano jako warianty powstałe *de novo,* wykluczając ich obecność u rodziców probanta.

Pacjenci z nsCP

W wyniku przeprowadzonych analiz u 45 pacjentów z nsCP zidentyfikowano 13 heterozygotycznych substytucji niesynonimicznych, oraz jedną zmianę typu *nonsense*. Wśród wykrytych zmian 7 stanowiły nowe warianty, które nie figurują w żadnej bazie danych (ClinVar, HGMD, GnomAD). Analiza członków rodziny probantów wykazała, że 2 zidentyfikowane substytucje nukleotydowe były wariantami powstałymi *de novo*.

U pozostałych 114 (76%) zakwalifikowanych do badań pacjentów (zarówno nsCL/P jaki i nsCP) analizy nie wykazały obecności patogennych wariantów, ani wariantów o prawdopodobnym patogennym charakterze, które mogłyby korelować z ryzykiem wystąpienia wady rozszczepowej.

W ramach niniejszej pracy, warianty mogące mieć znaczenie w etiologii wady rozszczepowej podzielono na 4 grupy:

Grupa I

- Zakwalifikowano do niej warianty, które w bazie ClinVar lub HGMD figurują jako zmiany patogenne. Warianty w tej grupie powstały *de novo* lub potwierdzono ich segregację z chorobą w rodzinie probanta.

Grupa II

Do tej grupy zaliczono warianty zarejestrowane w bazie ClinVar, a także w katalogu mutacji somatycznych w nowotworach (COSMIC) jako zmiany o niepewnym znaczeniu klinicznym. Wyniki analiz bioinformatycznych wskazały jednoznacznie na ich patogenny charakter. Prezentowane w tej grupie warianty genetyczne zostały odziedziczone od zdrowych rodziców lub są wariantami prawdopodobnie powstałymi *de novo* – przypadek pacjenta nr 4

Grupa III

Grupę III stanowią nowe, nieopisane jeszcze warianty, które powstały *de novo*. Warianty te nie figurują w żadnych bazach danych, a wyniki przeprowadzonych analiz *in silico* z zastosowaniem programów bioinformatycznych, wskazują w przeważającej większości na ich patogenny charakter. W bazie VarSome dedykowanej do oceny m.in. nowych wariantów, zmiany te zostały zakwalifikowane jako patogenne lub o niepewnym znaczeniu patogennym.

Grupa IV

W tej grupie znajdują się nowe warianty, które nie zostały zarejestrowane w żadnych bazach danych pozwalających ocenić ich wpływ na fenotyp pacjenta. Warianty przedstawione w tej grupie zostały odziedziczone od zdrowego rodzica lub nie mają określonego statusu dziedziczenia. W klasyfikacji brano pod uwagę rodzaj zmiany, wyniki analiz bioinformatycznych, status jaki uzyskały w bazie VarSome, a także dane literaturowe dotyczące związku danego genu, w którym zlokalizowany jest wykryty wariant z wadą rozszczepową.

Grupa V

Warianty przedstawione w grupie V to znane, rzadkie zmiany (MAF<0,01), które zostały zarejestrowane w genomach i eksonach referencyjnych bazy GnomAD. Nie są jednak zdeponowane w innych bazach danych, umożliwiających ocenę ich znaczenia klinicznego. W selekcji brano pod uwagę

te same aspekty jak przy klasyfikacji wariantów z grupy IV, a także uwzględniono piśmiennictwo naukowe wskazujące na związek zidentyfikowanych wariantów z etiopatogenezą wady rozszczepowej.

Dokładny opis zidentyfikowanych potencjalnie patogennych zmian dla nsCL/P wraz z wynikami analizy *in silico*, a także wynikami badań dziedziczności w triadach rodzinnych przedstawiono odpowiednio w **Tab. 11**, **12**.

W osobnych tabelach, ten sam opis przedstawiono dla grupy chorych z nsCP, odpowiednio w **Tab.15**, **16**.

W **Tab. 13**, **14**, oraz **17**, i **18**. przedstawiono wyniki analizy „wzbogacenia", która została wykonana dla genów, w których zidentyfikowano potencjalnie patogenne warianty nukleotydowe odpowiednio w grupie pacjentów nsCL/P oraz nsCP.

Tab. 11 Potencjalnie patogenne warianty nukleotydowe zidentyfikowane w sekwencjonowaniu panelu genowego metodą NGS oraz wyniki przeprowadzonych analiz *in silico* w grupie pacjentów z nsCL/P.

									częstość*		baza danych**		program stosowany do oceny patogenności***																
	nr przypadku	płeć	typ rozszczepu	gen	nr transkryptu	nr rs	wariant nukleotydowy	efekt białkowy	GnomAD eksomy	GnomAD genomy	VarSome	ClinVar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Grupa I	Warianty zarejestrowane w bazach danych ClinVar oraz HGMD jako zmiany patogenne - warianty *de novo* lub odziedziczone od chorego rodzica																												
	1	M	nsCLP	*COL17A1*	NM_000494.4	rs121912769	c.3676C>T	p.Arg1226*	2.1E-05	1.4E-05	P	P	D			D	N	N		P	P						T		
	2	K	nsCLP	*IRF6*	NM_006147.4	CM092352	c.905T>C	p.Leu302Pro	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D	M	D	D	D	D	D	P	P	D	D	D	P	P	D	D	D
Grupa II	Warianty zarejestrowane w bazach danych ClinVar oraz COSMIC jako zmiany o niepewnym znaczeniu klinicznym - warianty odziedziczone od zdrowego rodzica lub warianty o nieokreślonym statusie dziedziczenia																												
	3	K	nsCL	*COL8A1*	NM_001850.5	COSM4595504	c.1463C>T	p.Pro488Leu	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D	M	D	D	N	D	D	P	P	D	T	D	P	P	T	D	D
	4	M	nsCL	*CHD7*	NM_017780.4	rs1563644113	c.4033C>T	p.Arg1345Cys	0.0E+00	0.0E+00	LP	US	D	H	D	D	D	D	D	P	P	D	D	D	P	P	D	D	D
	5	K	nsCLP	*BMPR1A*	NM_004329.2	rs587781332	c.1216C>T	p.Arg406Cys	8.4E-05	4.2E-05	US	US	D	M	T	D	D	D	D	P	P	D	D	D	P	P	D	D	D
Grupa III	Nowe warianty o potencjalnie patogennym charakterze - warianty *de novo*																												
	6	K	nsCL	*KMT2D*	NM_003482.3	NOWY	c.16223G>A	p.Gly5408Asp	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D	M	D	D	D	N	T	P	P	D	D	D	P	P	D	D	D
	7	M	nsCLP	*MAML1*	NM_014757.5	NOWY	c.193C>T	p.Gln65*	0.0E+00	0.0E+00	P	NR	D			N	N	U		P	P						T		
Grupa IV	Nowe warianty o patencjalnie patogennym charakterze - warianty odziedziczone od zdrowego rodzica lub warianty o nieokreślonym statusie dziedziczenia																												
	8	M	nsCLP	*ARHGAP29*	NM_004815.4	NOWY	c.1060_1061delCT	p.Leu354ValfsTer33	0.0E+00	0.0E+00	LP	NR																	
	9	M	nsCLP	*ESRP2*	NM_024939.3	NOWY	c.697G>T	p.Glu233*	0.0E+00	0.0E+00	P	NR	D			D	N	D		P	P						T		
	10	M	nsCL	*FGD1*	NM_004463.3	NOWY	c.1251_1253delTGT	p.Val418del	0.0E+00	0.0E+00	LP	NR																	
	11	M	nsCLP	*SHH*	NM_000193.4	NOWY	c.787C>G	p.Arg263Gly	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D	M	D	D	D	D	D	P	P	D	T	D	P	P	T	D	D
	12	K	nsCL	*FGF4*	NM_002007.4	NOWY	c.460G>A	p.Glu154Lys	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D		D	D	D	N	D	P	P	D	D	D	B	P	T	D	D
	13	M	nsCLP	*TRPS1*	NM_014112.5	NOWY	c.2190G>T	p.Gln730His	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D	L	T	D	N	D	T	B	U	T	T	N	B	B	T	T	T
	14	M	nsCLP	*SKI*	NM_003036.4	NOWY	c.1280A>G	p.Gln427Arg	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	P	L	D	D	N	N	T	B	B	T	T	N	B	B	T	D	D

Grupa IV	15	M	nsCLP	*PLEKHA5*	NM_001256470.2	NOWY	c.1172A>G	p.Asp391Gly	0,0E+00	0,0E+00	US	NR	P,D	M	T	D	N	N	T	P	P	T	T,D	N	B	B	T	T	T
	16	M	nsCLP	*TOX3*	NM_001080430.4	NOWY	c.1618A>G	p.Ile540Val	0,0E+00	0,0E+00	US	NR	P	N	T	D	D	N	T	B	B	D	T	N	B	B	T	T	T
	17	M	nsCLP	*ADK*	NM_001123.3	NOWY	c.8C>G	p.Ser3*	0,0E+00	0,0E+00	US	NR	D			D	N			B	P						T		
	18	M	nsCLP	*LRP2*	NM_004525.3	NOWY	c.11896A>G	p.Lys3966Glu	0,0E+00	0,0E+00	LB	NR	P	L	D	D	N	N	T	B	B	T	T	N	B	B	T	T	T
	19	M	nsCLP	*EDAR*	NM_022336.4	NOWY	c.18C>G	p.Asp6Glu	0,0E+00	0,0E+00	US/P	NR	P	N	D	N	N	N	T	B	B	T	T	N	B	B	T	T	T
Grupa V	**Znane warianty o potencjalnie patogennym charakterze - warianty odziedziczone od zdrowego rodzica lub o nieokreślonym statusie dziedziczenia**																												
	20	K	nsCLP	*EFTUD2*	NM_004247.4	rs1467291243	c.956C>T	p.Thr319Met	0,0E+00	2,8E-05	LP	NR	D	H	T	D	D	D	D	P	P	D	D	D	B	B	D	D	D
	21	M	nsCL	*COL11A1*	NM_001854.4	rs775587076	c.4193A>C	p.Gln1398Pro	5,2E-05	5,6E-05	LP	NR	D	N	D	D	D	D	D	B	P	T,D	T	D	B	B	D	D	D
	22	K	nsCL	*CHD7*	NM_017780.4	rs1009126876	c.4477C>T	p.Arg1493Cys	8,7E-06	7,0E-06	US	NR	D	H	D	D	N	D	D	P	P	D	D	D	P	P	T	D	D
				ARHGAP29	NM_004815.4	rs140877322	c.1043G>T	p.Arg348Leu	6,8E-05	3,5E-05	LB	NR	D	M	T	D	D	N	T	P	P	D	T	D	B	B	D	T	T
	23	M	nsCLP	*FGFR3*	NM_001354809.2	rs761163163	c.1756C>T	p.Pro586Ser	1,3E-04	7,7E-05	US	NR	D	L	D	D	D	D	D	B	B	T	T	D	B	B	T	T	T
				POLR1C	NM_203290.4	rs371479150	c.845C>G	p.Thr282Ser	2,4E-04	1,8E-04	US	NR	D	M	D	D	D	D	D	B	P	T	T	N	B	B	D	T	T
	24	M	nsCLP	*COL9A1*	NM_001851.5	rs760070670	c.1802G>T	p.Gly601Val	1,2E-05	3,5E-05	US	NR	D	M	D	D	D	D	D	P	P	D	D	D	P	P	T	D	D
	25	K	nsCL	*ESRP2*	NM_024939.3	rs201908706	c.1058G>A	p.Arg353Gln	4,0E-04	4,5E-04	US	NR	D	M	T	D	D	D	T	P	P	D	D	D	B	B	D	T	T

K-kobieta, **M**-mężczyzna, **nsCL-** izolowony rozszczep wargi**, nsCLP –** rozszczep wargi i podniebienia ***GnomAD -** Genome aggregation database (https://gnomad.broadinstitute.org/)
****VarSome** – The Human Genomic Variant Search Engine (https://varsome.com/) **P** – Pathogenic, **LP** – Likely Pathogenic, **UP** - Uncertain Significance, **LB** – Likely Benign, **B** – Benign
****ClinVar** – Clinical Significance of Variants (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) **P** – Pathogenic, **US** – Uncertain Significance, **NR** – Not Reported
*****Programy: 1 - MutationTaster** (**D** – Disease causing, **P** - Polymorphism), **2 - MutationAssessor** (**H** – High, **M** –Medium, **N** – Neutral, **L** – Low), **3 - FATHMM** (**D** – Damaging, **T** - Tolerated), **4 - FATHMM-MKL** (**D** – Damaging, **N**– Neutral), **5 - FATHMM-XF** (**D** - Damaging, **N**– Neutral), **6 - LRT** (**D** - Deleterious, **N** – Neutral, **U** – Unknow), **7 - DEOGEN2** (**D** – Damaging, **T** – Tolerated)**, 8 - EIGEN** (**P** – Pathogenic, **B** – Benign), **9 - EIGEN PC** (**P** – Pathogenic **U** – Uncertain), **10 - SIFT** (**D** – Damaging, **T** – Tolerated), **11 - SIFT4G** (**D** –Damaging, **T** – Tolerated), **12 - PROVEAN** (**D** – Damaging, **N** – Neutral), **13 - MVP** (**P** – Pathogenic, **B** – Benign), **14 - REVEL** (**P** – Pathogenic, **B** – Benign), **15 - PrimateAI** (**D** – Damaging, **T** – Tolerated), **16 - MetaSVM** (**D** – Damaging, **T** – Tolerated), **17 - MetaLR** (**D** – Damaging, **T** – Tolerated)

Tab. 12 Potencjalnie patogenne warianty nukleotydowe, zidentyfikowane w sekwencjonowaniu panelu genowego metodą NGS wraz z wywiadem rodzinnym i wynikiem analizy nosicielstwa u rodziców pacjentów z nsCL/P.

	nr przypadku	płeć	typ rozszczepu	gen	nr transkryptu	nr rs	wariant nukleotydowy	efekt białkowy	postać rodzinna	probant	ojciec	matka	status dziedziczenia zmiany
Warianty zarejestrowane w bazach danych ClinVar oraz HGMD jako zmiany patogenne - warianty *de novo* lub odziedziczone od chorego rodzica													
Grupa I	**1**	M	nsCLP	*COL17A1*	NM_000494.4	rs121912769	c.3676C>T	p.Arg1226*	NIE	HET	P	P	***de novo***
	2	K	nsCLP	*IRF6*	NM_006147.4	CM092352	c.905T>C	p.Leu302Pro	TAK - ojciec, rodzeństwo, dziadek od strony ojca	HET	HET	P	dziedziczona od ojca CLP
Warianty zarejestrowane w bazach danych ClinVar oraz COSMIC jako zmiany o niepewnym znaczeniu klinicznym - warianty odziedziczone od zdrowego rodzica lub warianty o nieokreślonym statusie dziedzczenia													
Grupa II	**3**	K	nsCL	*COL8A1*	NM_001850.5	COSM4595504	c.1463C>T	p.Pro488Leu	NIE	HET	P	HET	dziedziczona od matki
	4	M	nsCL	*CHD7*	NM_017780.4	rs1563644113	c.4033C>T	p.Arg1345Cys	NIE	HET	brak DNA	P	*de novo* lub od ojca
	5	K	nsCLP	*BMPR1A*	NM_004329.2	rs587781332	c.1216C>T	p.Arg406Cys	NIE	HET	P	HET	dziedziczona od matki
Nowe warianty o potencjalnie patogennym charakterze - warianty *de novo*													
Grupa III	**6**	K	nsCL	*KMT2D*	NM_003482.3	**NOWY**	c.16223G>A	p.Gly5408Asp	NIE	HET	P	P	***de novo***
	7	M	nsCLP	*MAML1*	NM_014757.5	**NOWY**	c.193C>T	p.Gln65*	NIE	HET	P	P	***de novo***
Nowe warianty o patencjalnie patogennym charakterze - warianty odziedziczone od zdrowego rodzica lub warianty o nieokreślonym statusie dziedziczenia													
Grupa IV	**8**	M	nsCLP	*ARHGAP29*	NM_004815.4	**NOWY**	c.1060_1061delCT	p.Leu354ValfsTer33	NIE	HET	P	HET	dziedziczona od matki
	9	M	nsCLP	*ESRP2*	NM_024939.3	**NOWY**	c.697G>T	p.Glu233*	NIE	HET	brak DNA	brak DNA	–
	10	M	nsCL	*FGD1*	NM_004463.3	**NOWY**	c.1251_1253delTGT	p.Val418del	NIE	HEMI	P	HET	dziedziczona od matki
	11	M	nsCLP	*SHH*	NM_000193.4	**NOWY**	c.787C>G	p.Arg263Gly	NIE	HET	P	HET	dziedziczona od matki
	12	K	nsCL	*FGF4*	NM_002007.4	**NOWY**	c.460G>A	p.Glu154Lys	NIE	HET	nie ma	HET	dziedziczona od matki
	13	M	nsCLP	*TRPS1*	NM_014112.5	**NOWY**	c.2190G>T	p.Gln730His	NIE	HET	brak DNA	HET	dziedziczona od matki
	14	M	nsCLP	*SKI*	NM_003036.4	**NOWY**	c.1280A>G	p.Gln427Arg	NIE	HET	HET	P	dziedziczona od ojca

Grupa IV	**15**	M	nsCLP	*PLEKHA5*	NM_001256470.2	**NOWY**	c.1172A>G	p.Asp391Gly	NIE	HET	P	HET	dziedziczona od matki
	16	M	nsCLP	*TOX3*	NM_001080430.4	**NOWY**	c.1618A>G	p.Ile540Val	NIE	HET	P	HET	dziedziczona od matki
	17	M	nsCLP	*ADK*	NM_001123.3	**NOWY**	c.8C>G	p.Ser3*	NIE	HET	p	HET	dziedziczona od matki
	18	M	nsCLP	*LRP2*	NM_004525.3	**NOWY**	c.11896A>G	p.Lys3966Glu	TAK - dziadek od strony ojca CLP	HET	brak DNA	P	*de novo* lub od ojca
	19	M	nsCLP	*EDAR*	NM_022336.4	**NOWY**	c.18C>G	p.Asp6Glu	NIE	HET	P	HET	dziedziczona od matki
Grupa V	**Znane warianty o potencjalnie patogennym charakterze - warianty odziedziczone od zdrowego rodzica lub o nieokreślonym statusie dziedziczenia**												
	20	K	nsCLP	*EFTUD2*	NM_004247.4	rs1467291243	c.956C>T	p.Thr319Met	NIE	HET	HET	P	dziedziczona od ojca
	21	M	nsCL	*COL11A1*	NM_001854.4	rs775587076	c.4193A>C	p.Gln1398Pro	NIE	HET	P	HET	dziedziczona od matki
	22	K	nsCL	*CHD7* *ARHGAP29*	NM_017780.4 NM_004815.4	rs1009126876 rs140877322	c.4477C>T c.1043G>T	p.Arg1493Cys p.Arg348Leu	NIE	HET HET	P HET	brak DNA brak DNA	*de novo* lub od matki dziedziczona od ojca
	23	M	nsCLP	*FGFR3* *POLR1C*	NM_001354809.2 NM_203290.4	rs761163163 rs371479150	c.1756C>T c.845C>G	p.Pro586Ser p.Thr282Ser	NIE	HET HET	P HET	HET P	dziedziczona od matki dziedziczona od ojca
	24	M	nsCLP	*COL9A1*	NM_001851.5	rs760070670	c.1802G>T	p.Gly601Val	NIE	HET	brak DNA	brak DNA	–
	25	K	nsCL	*ESRP2*	NM_024939.3	rs201908706	c.1058G>A	p.Arg353Gln	NIE	HET	brak DNA	brak DNA	–

K-kobieta, **M**-mężczyzna, **nsCL**- izolowany rozszczep wargi, **nsCLP** – izolowany rozszczep wargi i podniebienia, **HET**- heterozygota, **P**-prawidłowy

Tab.13 Wyniki analizy wzbogacenia dla 25 genów, w których zidentyfikowano potencjalnie patogenne warianty w grupie pacjentów nsCL/P. Przedstawiono 30 najistotniejszych wyników dla „nadreprezentowanego" w tej grupie procesu biologicznego.

Lp.	Nazwa kategorii wg GO	Proces biologiczny	Geny	Wartość p	Wartość p po korekcie na wielokrotne testowanie
1	GO:0009888	rozwój tkanek	*BMPR1A , CHD7 , COL11A1 , COL17A1 ,COL8A1 , EDAR , ESRP2 , FGF4 , FGFR3 , IRF6 , LRP2 , MAML1 , SHH , SKI , TRPS1 ,WNT10A*	**9.29E-12**	**8.45E-08**
2	GO:0009887	rozwój morfogenetyczny narządów	*BMPR1A, CHD7, COL11A1, COL8A1, COL9A1, EDAR, ESRP2, FGD1, FGF4, FGFR3, LRP2, SHH, SKI, WNT10A*	**6.32E-11**	**5.75E-07**
3	GO:0060537	rozwój tkanek mięśniowych	*BMPR1A, CHD7, COL11A1, LRP2, MAML1, SHH, SKI*	**2.18E-08**	**1.98E-04**
4	GO:0060541	rozwój układu oddechowego	*BMPR1A, CHD7, ESRP2, SHH, SKI*	**6.60E-08**	**6.00E-04**
5	GO:0048729	morfogeneza tkanek	*BMPR1A, CHD7, COL11A1, ESRP2, LRP2, SHH, SKI, WNT10A*	**1.19E-07**	**1.09E-03**
6	GO:0035295	rozwój cewy nerwowej	*BMPR1A, CHD7, COL8A1, EDAR, ESRP2, LRP2, SHH, SKI*	**1.38E-07**	**1.25E-03**
7	GO:0060429	rozwój nabłonka	*CHD7, IRF6, WNT10A, SHH, ESRP2, SKI, EDAR, BMPR1A, LRP2*	**1.42E-07**	**1.29E-03**
8	GO:0035239	morfogeneza cewy nerwowej	*CHD7,COL8A1, SHH, ESRP2, SKI, EDAR, BMPR1A, LRP2*	**1.61E-07**	**1.46E-03**
9	GO:0014706	rozwój mięśni poprzecznie prążkowanych	*BMPR1A,CHD7 , COL11A1, LRP2, MAML1, SHH, SKI,*	**2.75E-07**	**2.50E-03**
10	GO:0001501	rozwój układu kostnego	*BMPR1A,CHD7 , COL11A1, FGF4, FGFR3, SHH, SKI, SOX9, TRPS1*	**3.08E-07**	**2.80E-03**
11	GO:0035107	morfogeneza przydatków	*BMPR1A,CHD7 , FGF4, SHH, SKI*	3.19E-07	2.90E-03
12	GO:0035108	morfogeneza kończyn	*BMPR1A, CHD7 , FGF4, SHH, SKI*	3.19E-07	2.90E-03
13	GO:0003223	morfogeneza komory mięśnia sercowego	*BMPR1A, CHD7, LRP2*	3.58E-07	3.25E-03
14	GO:0001503	kostnienie	*BMPR1A, COL11A1, FGFR3, SHH, SKI*	3.69E-07	3.35E-03

15	GO:0010628	pozytywna regulacja ekspresji genów	*BMPR1A, CHD7, EDAR, FGF4, IRF6, KMT2D, MAML1, POLR1C, SHH, SKI, TOX3, WNT10A*	6.21E-07	5.65E-03
16	GO:0001942	rozwój mieszków włosowych	*EDAR, SHH, WNT10A*	6.22E-07	5.66E-03
17	GO:0042475	odontogeneza	*BMPR1A, EDAR, FGF4, SHH, WNT10A,*	6.22E-07	5.66E-03
18	GO:0035137	morfogeneza kończyn tylnych	*BMPR1A, CHD7, FGF4, SHH,*	6.32E-07	5.74E-03
19	GO:0022404	proces złuszczania naskórka	*EDAR, ERCC2, SHH, WNT10A,*	6.97E-07	6.34E-03
20	GO:0022405	regulacja cyklu włosa	*EDAR, ERCC2, SHH, WNT10A*	6.97E-07	6.34E-03
21	GO:0098773	rozwój skóry	*EDAR, SHH, WNT10A,*	6.97E-07	6.34E-03
22	GO:0048598	rozwój embrionalny	*BMPR1A, CHD7, COL11A1, COL8A1, FGF4, LRP2, SHH, SKI*	8.47E-07	7.70E-03
23	GO:0048736	rozwój embrionalny przydatków	*BMPR1A, CHD7, FGF4, SHH, SKI*	9.51E-07	8.64E-03
24	GO:0060173	rozwój kończyn	*BMPR1A, CHD7, FGF4, SHH, SKI*	9.51E-07	8.64E-03
25	GO:0008283	proliferacja komórek	*BMPR1A, COL8A1, ESRP2, FGF4, FGFR3, IRF6, KMT2D, LRP2, SHH, SKI*	1.02E-06	9.31E-03
26	GO:0061061	rozwój strukturalny mięśnia	*BMPR1A, CHD7, COL11A1, FLNB, LRP2, MAML1, SHH, SKI*	1.47E-06	1.33E-02
27	GO:0010463	proliferacja komórek mezenchymalnych	*BMPR1A, FGF4, SHH*	1.58E-06	1.44E-02
28	GO:0008544	różnicownie oraz rozwój komórek naskórka	*COL17A1, EDAR, IRF6, SHH, WNT10A*	1.72E-06	1.56E-02
29	GO:0072359	rozwój układu krążenia	*BMPR1A, CHD7, COL11A1, COL8A1, LRP2, MAML1, SHH*	1.78E-06	1.62E-02
30	GO:0055010	morfogeneza komory mięśnia sercowego	*BMPR1A, CHD7, COL11A1, LRP2*	1.89E-06	1.71E-02

GO – Gene Ontology (http://geneontology.org/)

Tab. 14 Wyniki analizy wzbogacenia dla 25 genów, w których zidentyfikowano potencjalnie patogenne warianty w grupie pacjentów nsCL/P. Przedstawiono jedynie istotne statystycznie wyniki dla „nadreprezentowanej" w tej grupie funkcji molekularnej.

Lp.	Nazwa kategorii wg GO	Funkcja molekularna	Geny	Wartość p	Wartość p po korekcie na wielokrotne testowanie
1	GO:0030020	struktura macierzy zewnątrzkomórkowej zapeniająca wytrzymałość i elstyczność	*COL11A1* , *COL17A1* , *COL8A1* , *COL9A1*	7.07E-07	1.33E-03
2	GO:0005201	główny składnik strukturalny macierzy zewnątrzkomórkowej	*COL11A1* , *COL17A1* , *COL8A1* , *COL9A1*	1.18E-05	2.21E-02

GO – Gene Ontology (http://geneontology.org/)

Tab. 15 Potencjalnie patogenne warianty nukleotydowe zidentyfikowane w sekwencjonowaniu panelu eksomowego metodą NGS oraz wyniki przeprowadzonych analiz *in silico* w grupie pacjentów z nsCP

									częstość*		bazy danych**		program stosowany do oceny patogenności***																
	nr przypadku	płeć	typ rozszczepu	gen	nr transkryptu	nr rs	wariant nukleotydowy	efekt białkowy	GnomAD eksomy	GnomAD genomy	VarSome	ClinVar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Grupa III	**Nowe warianty o potencjalnie patogennym charakterze - warianty *de novo***																												
	26	M	nsCP	*IRF6*	NM_006147.4	NOWY	c.224A>G	p.Asp75Gly	0.0E+00	0.0E+00	LP	NR	D	M	D	D	D	D	D	P	P	D	D	D	P	P	D	D	D
				WNT10A	NM_025216.3	rs373695499	c.443C>T	p.Ala148Val	2.0E-05	1.4E-05	US	NR	D	M	T	D	D	D	D	P	P	D	D	D	P	P	T	D	D
	27	K	nsCP	*NHS*	NM_198270.4	NOWY	c.568G>C	p.Val190Leu	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D	N	T	D	D	D	T			T,D	T,D	N	B	B		T	T
Grupa IV	**Nowe warianty o patencjalnie patogennym charakterze - warianty odziedziczone od zdrowego rodzica lub warianty o nieokreślonym statusie dziedziczenia**																												
	28	K	nsCP	*NIPBL*	NM_133433.4	NOWY	c.2688A>C	p.Lys896Asn	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D	L	D	D	N	D	T	B	B	D	T	N	B	B	T	D	D
				IRF6	NM_006147.4	rs200808685	c.1060G>A	p.Asp354Asn	2.3E-04	2.0E-04	B	NR	D	L	D	D	D	N	D	B	P	T,D	T,D	N	B	B	D	D	D
	29	K	nsCP	*FLNB*	NM_001164317.2	NOWY	c.3605A>G	p.Tyr1202Cys	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D	M	T	D	D	D	D	P	P	D	D	D	P	P	D	D	D
	30	K	nsCP	*NOTCH2*	NM_024408.4	NOWY	c.1997A>G	p.Tyr666Cys	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D	H	D	D	D	U	D	P	P	D	D	D	P	P	T	D	D
				FGFR3	NM_001163213.1	rs755547723	c.1075C>T	p.Arg359*	1.8E-05	1.4E-05	P	NR	D			D	N			P	P						T		
	31	M	nsCP	*DHODH*	NM_001361.5	NOWY	c.749C>G	p.Ala250Gly	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D	M	D	D	D	D	D	B	B	D	D	N	P	B	D	D	D
	32	K	nsCP	*SPRY2*	NM_005842.4	NOWY	c.35A>T	p.Gln12Leu	0.0E+00	0.0E+00	US	NR	D	L	T	D	D	N	T	B	B	T	T	N	B	B	T	T	T
Grupa V	**Znane warianty o potencjalnie patogennym charakterze - warianty odziedziczone od zdrowego rodzica lub o nieokreślonym statusie dziedziczenia**																												
	33	M	nsCP	*WNT5B*	NM_032642.3	rs529807731	c.716G>T	p.Arg239Leu	2.0E-05	0.0E+00	US	NR	D	H	T	D	D	D	D	P	P	D	D	D	B	P	D	D	D
	34	K	nsCP	*LRP6*	NM_002336.3	rs769446193	c.481C>A	p.Pro161Thr	4.0E-06	0.0E+00	US	NR	D	H	D	D	D	D	D	P	P	D	D	D	P	P	D	D	D
	35	M	nsCP	*IRF6*	NM_006147.4	rs200808685	c.1060G>A	p.Asp354Asn	2.3E-04	2.0E-04	B	NR	D	L	D	D	D	N	D	B	P	T,D	T,D	N	B	B	D	D	D
				WNT10B	NM_003394.4	rs200116103	c.832C>T	p.Arg278Trp	1.2E-05	7.0E-06	US	NR	D	H	T	D	D	D	D	P	P	D	D	D	P	P	D	D	D

K-kobieta, **M**-mężczyzna, **nsCP**- izolowany rozszczep podniebienia ***GnomAD** - Genome aggregation database (https://gnomad.broadinstitute.org/)
****VarSome** – The Human Genomic Variant Search Engine (https://varsome.com/) **P** – Pathogenic, **LP** – Likely Pathogenic, **US** - Uncertain Significance, **LB** – Likely Benign, **B** – Benign
****ClinVar** – Clinical Significance of Variants (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) **P** – Pathogenic, **US** – Uncertain Significance, **NR** – Not Reported
*****Programy: 1 - MutationTaster** (**D** – Disease causing, **P** - Polymorphism), **2 - MutationAssessor** (**H** – High, **M** –Medium, **N** – Neutral, **L** – Low), **3 - FATHMM** (**D** – Damaging, **T** - Tolerated), **4 - FATHMM-MKL** (**D** – Damaging, **N**– Neutral), **5 - FATHMM-XF** (**D** - Damaging, **N**– Neutral), **6 - LRT** (**D** - Deleterious, **N** – Neutral, **U** – Unknow), **7 - DEOGEN2** (**D** – Damaging, **T** – Tolerated), **8 - EIGEN** (**P** – Pathogenic, **B** – Benign), **9 - EIGEN PC** (**P** – Pathogenic **U** – Uncertain), **10 - SIFT** (**D** – Damaging, **T** – Tolerated), **11 - SIFT4G** (**D** –Damaging, **T** – Tolerated), **12 - PROVEAN** (**D** – Damaging, **N** – Neutral), **13 - MVP** (**P** – Pathogenic, **B** – Benign), **14 - REVEL** (**P** – Pathogenic, **B** – Benign), **15 - PrimateAI** (**D** – Damaging, **T** – Tolerated), **16 - MetaSVM** (**D** – Damaging, **T** – Tolerated), **17 - MetaLR** (**D** – Damaging, **T** – Tolerated)

Tab.16 Potencjalnie patogenne warianty nukleotydowe zidentyfikowane w sekwencjonowaniu panelu genowego metodą NGS wraz z wywiadem rodzinnym i wynikiem analizy nosicielstwa u rodziców pacjentów z nsCP.

	nr przypadku	płeć	typ rozszczepu	gen	nr transkryptu	nr rs	wariant nukleotydowy	efekt białkowy	postać rodzinna	probant	ojciec	matka	status dziedziczenia zmiany
Nowe warianty o potencjalnie patogennym charakterze - warianty *de novo*													
Grupa III	**26**	M	nsCP	*IRF6*	NM_006147.4	**NOWY**	c.224A>G	p.Asp75Gly	NIE	HET	P	P	***de novo***
				WNT10A	NM_025216.3	rs373695499	c.443C>T	p.Ala148Val		HET	HET	P	dziedziczona od ojca
	27	K	nsCP	*NHS*	NM_198270.4	**NOWY**	c.568G>C	p.Val190Leu	NIE	HET	P	P	***de novo***
Nowe warianty o patencjalnie patogennym charakterze - warianty odziedziczone od zdrowego rodzica lub warianty o nieokreślonym statusie dziedziczenia													
Grupa IV	**28**	K	nsCP	*NIPBL*	NM_133433.4	**NOWY**	c.2688A>C	p.Lys896Asn	NIE	HET	brak DNA	P	*de novo* lub od ojca
				IRF6	NM_006147.4	rs200808685	c.1060G>A	p.Asp354Asn		HET	brak DNA	P	*de novo* lub od ojca
	39	K	nsCP	*FLNB*	NM_001164317.2	**NOWY**	c.3605A>G	p.Tyr1202Cys	NIE	HET	brak DNA	HET	dziedziczona od matki
	30	K	nsCP	*NOTCH2*	NM_024408.4	**NOWY**	c.1997A>G	p.Tyr666Cys	NIE	HET	HET	P	dziedziczona od ojca
				FGFR3	NM_001163213.1	rs755547723	c.1075C>T	p.Arg359*		HET	P	HET	dziedziczona od matki
	31	M	nsCP	*DHODH*	NM_001361.5	**NOWY**	c.749C>G	p.Ala250Gly	NIE	HET	P	HET	dziedziczona od matki
	32	K	nsCP	*SPRY2*	NM_005842.4	**NOWY**	c.35A>T	p.Gln12Leu	NIE	HET	brak DNA	brak DNA	–
Znane warianty o potencjalnie patogennym charakterze - warianty odziedziczone od zdrowego rodzica lub o nieokreślonym statusie dziedziczenia													
Grupa V	**33**	M	nsCP	*WNT5B*	NM_032642.3	rs529807731	c.716G>T	p.Arg239Leu	NIE	HET	HET	P	dziedziczona od ojca
	34	K	nsCP	*LRP6*	NM_002336.3	rs769446193	c.481C>A	p.Pro161Thr	NIE	HET	brak DNA	HET	dziedziczona od matki
	35	M	nsCP	*IRF6*	NM_006147.4	rs200808685	c.1060G>A	p.Asp354Asn	NIE	HET	HET	P	dziedziczona od ojca
				WNT10B	NM_003394.4	rs200116103	c.832C>T	p.Arg278Trp		HET	P	HET	dziedziczona od matki

K-kobieta, **M**-mężczyzna, **nsCP**- izolowany rozszczep podniebienia, **HET**- heterozygota, **P**-prawidłowy

Tab. 17 Wyniki analizy wzbogacenia dla 12 genów, w których zidentyfikowano potencjalnie patogenne warianty w grupie pacjentów nsCP. Przedstawiono wszystkie istotne wyniki dla „nadreprezentowanego" w tej grupie procesu biologicznego.

Lp.	Nazwa kategorii wg GO	Proces biologiczny	Geny	Wartość p	Wartość p po korekcie na wielokrotne testowanie
1	GO:0007423	rozwój narządów zmysłów	*LRP6, NHS, NIPBL, SPRY2, WNT10A, WNT10B, WNT5B*	6.13E-10	5.58E-06
2	GO:0045165	różnicowanie komórek	*NOTCH2, SPRY2, WNT10A, WNT10B, WNT5B*	1.13E-07	1.03E-03
3	GO:0001501	rozwój układu kostnego	*FGFR3, LRP6, NIPBL, NOTCH2, WNT10B, WNT5B,*	3.41E-07	3.10E-03
4	GO:0060429	rozwój nabłonka	*FLNB, IRF6, LRP6, SPRY2, WNT10A, WNT10B, WNT5B*	7.93E-07	7.21E-03
5	GO:0009887	rozwój narządów	*FGFR3, LRP6, NIPBL, NOTCH2, SPRY2, WNT10A, WNT10B,*	2.00E-06	1.82E-02
6	GO:0048705	rozwój morfogenetyczny układu kostnego	*FGFR3, LRP6, NIPBL, WNT10B*	2.82E-06	2.56E-02
7	GO:0009888	rozwój tkanek	*FGFR3, FLNB, IRF6, LRP6, SPRY2, WNT10A, WNT10B, WNT5B*	3.73E-06	3.39E-02
8	GO:0060325	rozwój twarzoczaszki	LRP6, NIPBL	3.90E-06	3.54E-02

GO – Gene Ontology (http://geneontology.org/)

Tab. 18 Wyniki analizy wzbogacenia dla 12 genów, w których zidentyfikowano potencjalnie patogenne warianty w grupie pacjentów nsCP. Przedstawiono istotną statystycznie „nadreprezentowaną" funkcję molekularną.

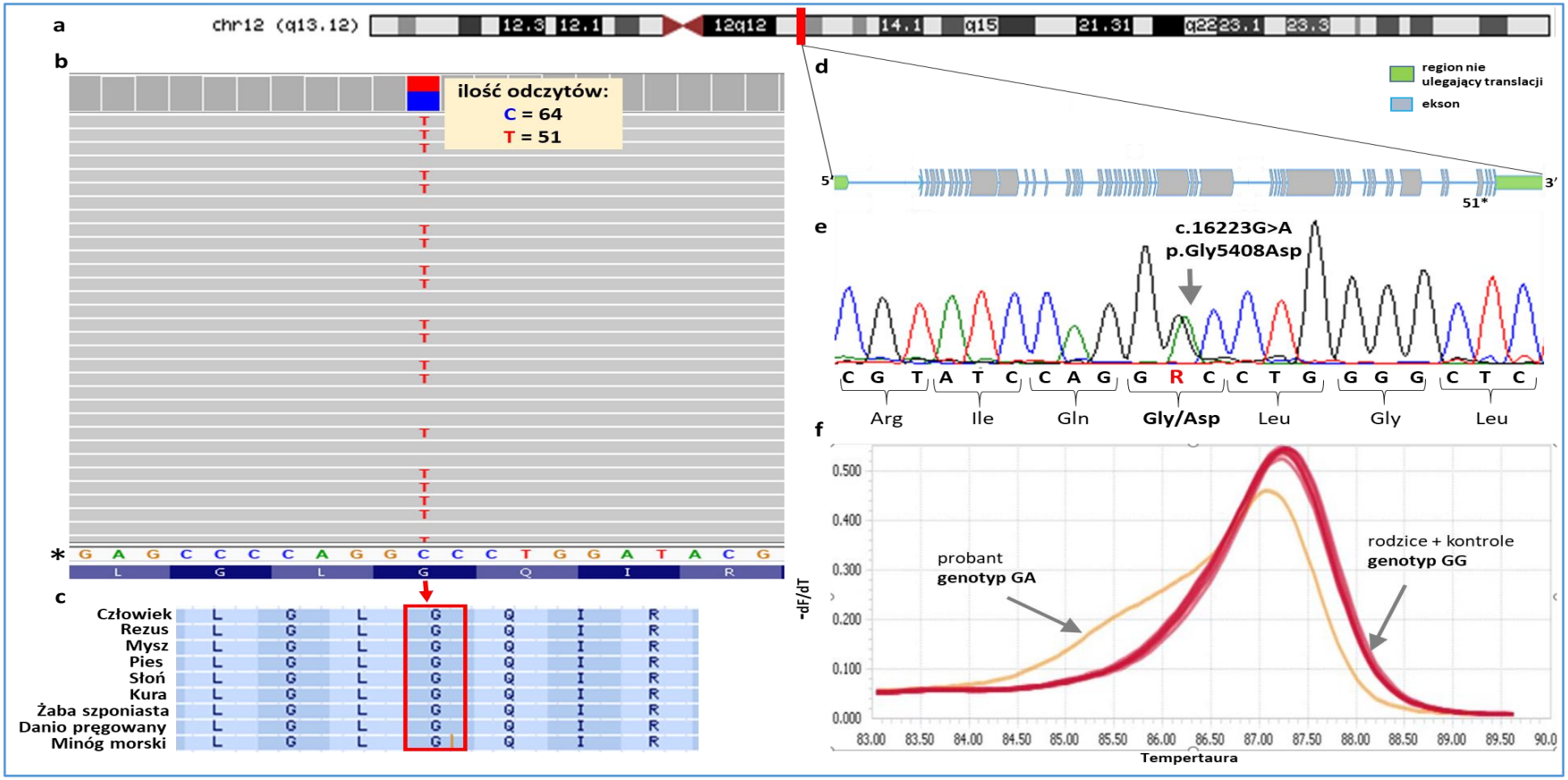
Lp.	Nazwa kategorii wg GO	Funkcja molekularna	Geny	Wartość p	Wartość p po korekcie na wielokrotne testowanie
1	GO:0005109	wiązanie do receptora frizzled	*WNT10A, WNT10B, WNT5B*	3.43E-08	6.44E-05

GO – Gene Ontology (http://geneontology.org/)

4.1 Opis nowych wariantów genetycznych zidentyfikowanych w grupie pacjentów z nsCL/P

Przypadek nr 6

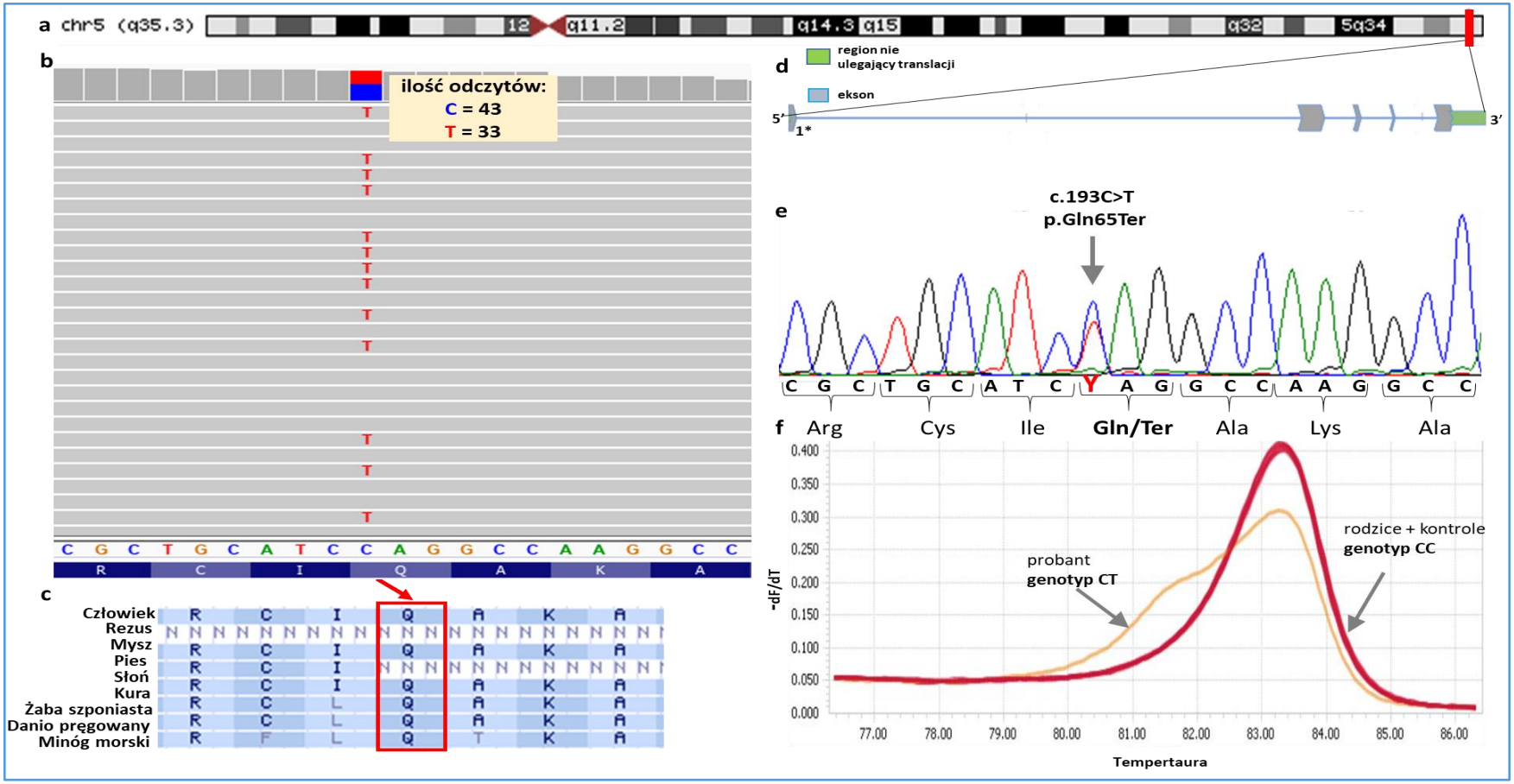
Pacjentem była 9-letnia dziewczynka z nsCL, u której stwierdzono również brak 5 zawiązków zębów stałych (brak drugich zębów przedtrzonowych oraz prawego bocznego siekacza w szczęce). Analiza NGS wykazała obecność nowej zmiany zlokalizowanej w 51 eksonie genu *KMT2D* (OMIM *****602113). Zidentyfikowana heterozygotyczna tranzycja c.16223G>A powoduje zamianę wysoce konserwatywnej glicyny na kwas asparaginowy w pozycji 5408 kodowanego białka (p.Gly5408Asp). Zmiana nie została dotychczas opisana w żadnych bazach danych. Z pośród 17 programów użytych do badań *in silico* 15 potwierdziło patogenny charakter wariantu, określając go najczęściej jako uszkadzający „*damaging*", patogenny „*pathogenic*" oraz chorobotwórczy „*diesase causing*" (Tab.11). Analiza HRM nie wykazała obecności badanej zmiany u rodziców probanta, wskazując że jest to wariant powstały *de novo*. W wywiadzie rodzinnym nie stwierdzono występowania wad rozszczepowych u pozostałych krewnych. Pacjentka posiada dizygotyczną siostrę bliźniaczkę, u której jedyną występującą anomalią rozwojową jest wada zgryzu. Zmiany c.16223G>A genu *KMT2D* nie zidentyfikowano w grupie 300 zdrowych osób, a także w bazie danych GnomAD. Wyniki analiz dla wariantu c.16223G>A genu *KMT2D* przedstawiono na **Ryc. 5**.



Ryc. 5 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu *de novo* c.16223G>A→p.Gly5408Asp w genie *KMT2D* zidentyfikowanego u pacjenta nr 6. **a)** lokalizacja genu *KMT2D* na długim ramieniu chromosomu 12 (locus q13.12), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą*przedstawiono prawidłową sekwencję nici matrycowej DNA (-) zgodnie z orientacją genu *KMT2D* w genomie; poniżej prawidłowa sekwencja aminokwasowa **c)** glicyna w pozycji 5408 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *KMT2D*, *ekson, w którym zlokalizowany jest wariant **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, który potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u probanta; wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+) **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznej zmiany u probanta oraz brak nosicielstwa u rodziców i kontroli.

Przypadek nr 7

Pacjentem zakwalifikowanym do projektu był 6 chłopiec z nsCLP. W wyniku przeprowadzonych analiz wykryto u niego nowy, niezidentyfikowany w genomach i eksomach referencyjnych heterozygotyczny wariant nukleotydowy genu *MAML1* (OMIM *****605424). Zmiana ta jest zlokalizowana w eksonie 1 i polega na tranzycji cytozyny na tyminę c.193C>T. Opisywana substytucja prowadzi do zmiany glutaminy w pozycji 65 kodowanego białka na kodon stop, powodując przedwczesną terminację translacji i powstanie krótszego produktu białkowego (p.Gln65Ter). Wpływa to negatywnie na strukturę i funkcję kodowanego białka, co potwierdziły 3 programy zastosowane do analizy *in silico.* Programy MutationTaster, EIGEN, EIGEN PC oceniły wpływ zamiany glutaminy na kodon terminacyjny jako chorobotwórczy „*disease causing*" bądź patogenny „*pathogenic*" (Tab.11). Pozostałe programy (FATHMM-MKL, LRT, PrimateAI) oceniły analizowany wariant jako neutralny, o nieznanym znaczeniu oraz tolerowany, określając go odpowiednio jako „*neutral*", „*unknown*" czy „*tolerated*" (Tab.11). W bazie danych VarSome zmiana c.193C>T otrzymała status zmiany patogennej „*pathogenic*". W badaniach replikacyjnych potwierdzono obecność zidentyfikowanego wariantu genu *MAML1* u probanta metodą sekwencjonowania Sangera. Analizy genotypowania wykazały, że pacjent nie odziedziczył wariantu od żadnego ze zdrowych rodziców, co sugeruje, że jest to wariant *de novo*. Nie stwierdzono występowania wariantu u 300 genotypowanych pod tym kątem kontroli z populacji polskiej. W dalszej rodzinie pacjenta nie zanotowano żadnych przypadków wad rozszczepowych. **Ryc. 6** przedstawia wyniki analiz dla wariantu genu *MAML1*.



Ryc. 6 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu *de novo* c.193C>T→p.Gln65Ter w genie *MAML1* zidentyfikowanego u pacjenta nr 7. a) lokalizacja genu *MAML1* na długim ramieniu chromosomu 5 (locus q35.3), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą, **c)** glutamina w pozycji 65 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *MAML1* * ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, potwierdzający obecność heterozygotycznego wariantu u probanta **f)** analiza genotypowania metodą HRM, przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznej zmiany u probanta i oraz brak nosicielstwa u rodziców i kontroli.

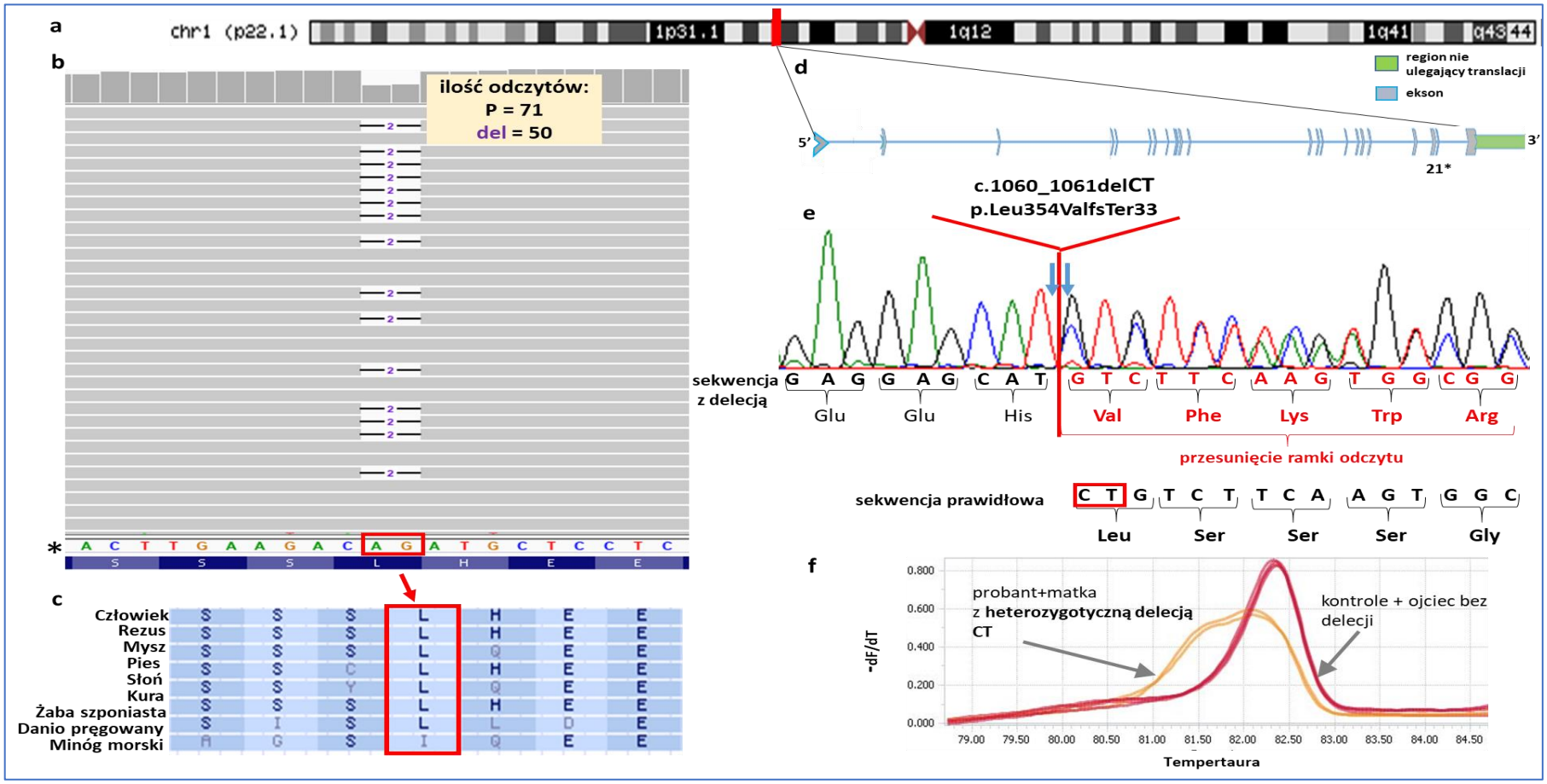
Przypadek nr 8

Analizy genetyczne wykonane u 9 letniego chłopca z nsCLP oraz wrodzonym brakiem 3 zawiązków zębów stałych wykazały obecność heterozygotycznej delecji c.1060_1061delCT w eksonie 11 genu *ARHGAP29*. Delecja ta powoduje przesunięcie ramki odczytu, która rozpoczyna się w pozycji 354 kodowanego białka. Skutkuje ona zmianą 33 aminokwasów i prowadzi do przedwczesnej terminacji translacji (p.Leu354ValfsTer33). Opisywany wariant nie został zidentyfikowanych w referencyjnych genomach ludzkich oraz nie jest opisywany w żadnej bazie danych. Baza VarSome potwierdziła negatywny wpływ wariantu na produkt ekspresji genu *ARHGAP29*, określając go jako „*likely pathogenic*" (Tab.11).

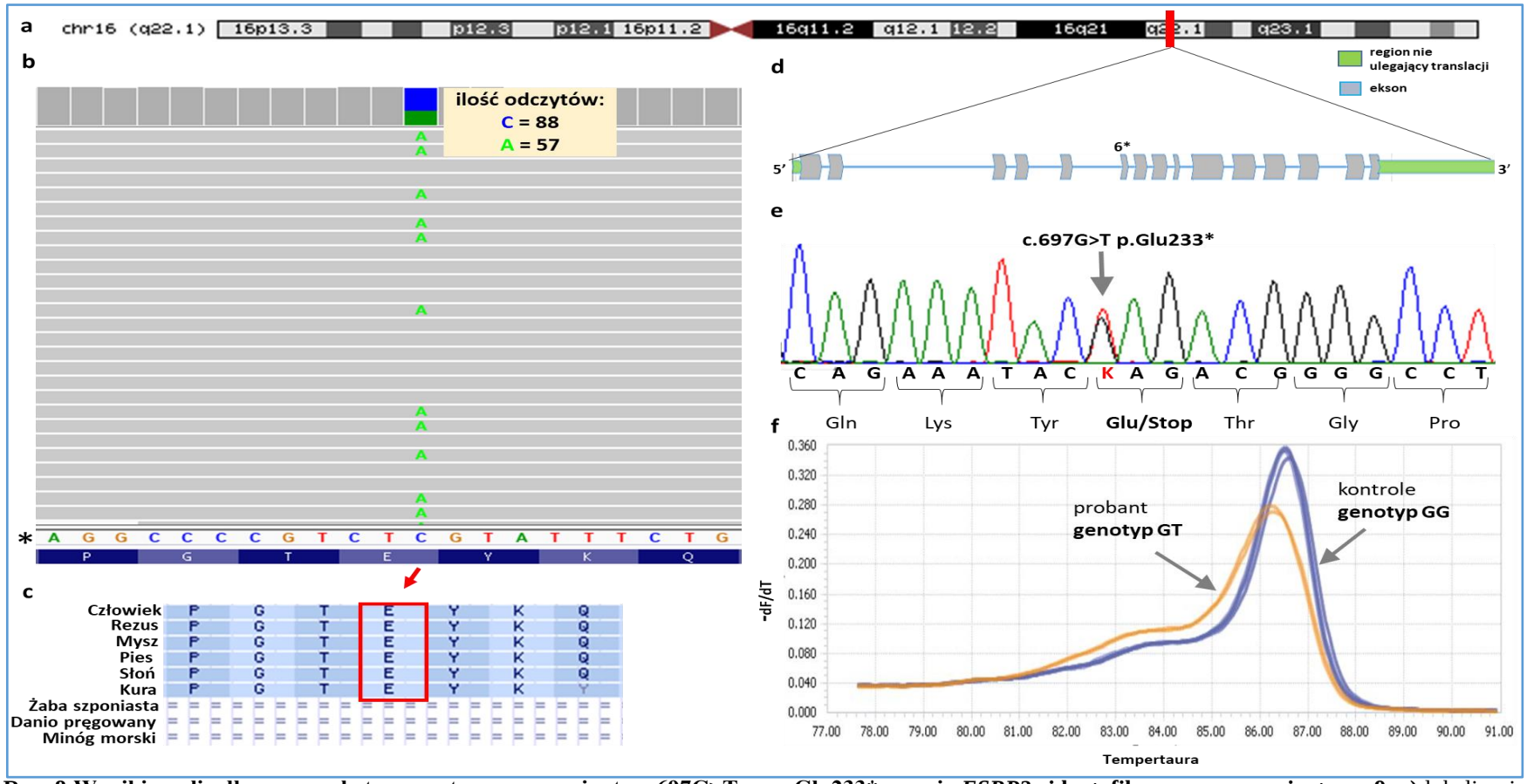
Obecność heterozygotycznej delecji c.1060_1061delCT potwierdzono także u matki pacjenta. Wariantu nie zidentyfikowano u ojca ani u 300 kontroli z populacji polskiej. W wywiadzie rodzinnym nie stwierdzono obecności wady rozszczepowej u pozostałych krewnych pacjenta. Wyniki analizy dla wariantu przedstawiono na **Ryc. 7**.

Przypadek nr 9

W wyniku przeprowadzonych analiz genetycznych u 6 letniego chłopca z nsCLP oraz wrodzonym brakiem 2 zawiązków zębów stałych zidentyfikowano nową, nieopisaną w bazach danych zmianę typu *nonsense* genu *ESRP2* (OMIM *****612960). Zmiana ta jest zlokalizowana w eksonie 6 i polega na heterozygotycznej transwersji guaniny na tyminę (c.697G>T). W wyniku opisywanej substytucji dochodzi do zmiany kwasu glutaminowego na kodon stop, powodując przedwczesne zakończenie procesu translacji w pozycji 233 kodowanego białka (p. Glu233*). Wpływa to negatywnie na aktywność i funkcję produktu ekspresji genu *ESRP2*, co potwierdzają wyniki uzyskane z analiz *in silico*. Większość wykorzystanych do tego celu programów (5/7) określiło wariant jako patogenny „*pathogenic",* uszkadzający *„damaging"* oraz szkodli*wy „deleterious"* (Tab.11). Nie stwierdzono obecności wariantu u żadnej z genotypowanych pod tym kątem kontroli z populacji polskiej. Wariantu nie zidentyfikowano również w bazie gnomAD. Ze względu na brak próbek DNA od rodziców probanta, nie zweryfikowano nosicielstwa analizowanej transwersji (Tab.12). Wywiad rodzinny nie wykazał obecności wady u pozostałych krewnych probanta charakteru. Wyniki analiz dla wariantu c.697G>T genu *ESPR2* przedstawiono na **Ryc. 8**.



Ryc. 7 Wyniki analiz dla heterozygotycznej delecji c.1060_1061delCT→p.Leu354ValfsTer33 w genie *ARHGAP29* zidentyfikowanej u pacjenta nr 8. a) lokalizacja genu *ARHGAP29* na krótkim ramieniu chromosomu 1 (locus p22.1), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną delecją,*****analiza przedstawia prawidłową sekwencję nici matrycowej DNA (-), zgodnie z orientacją genu *ARHGAP29* w genomie; poniżej prawidłowa sekwencja aminokwasowa **c)** leucyna w pozycji 354 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *ARHGAP29*, ***** ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, potwierdzający obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+) **f)** analiza genotypowania metodą HRM, przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznej delecji u pacjenta i matki oraz brak nosicielstwa u ojca i kontroli.



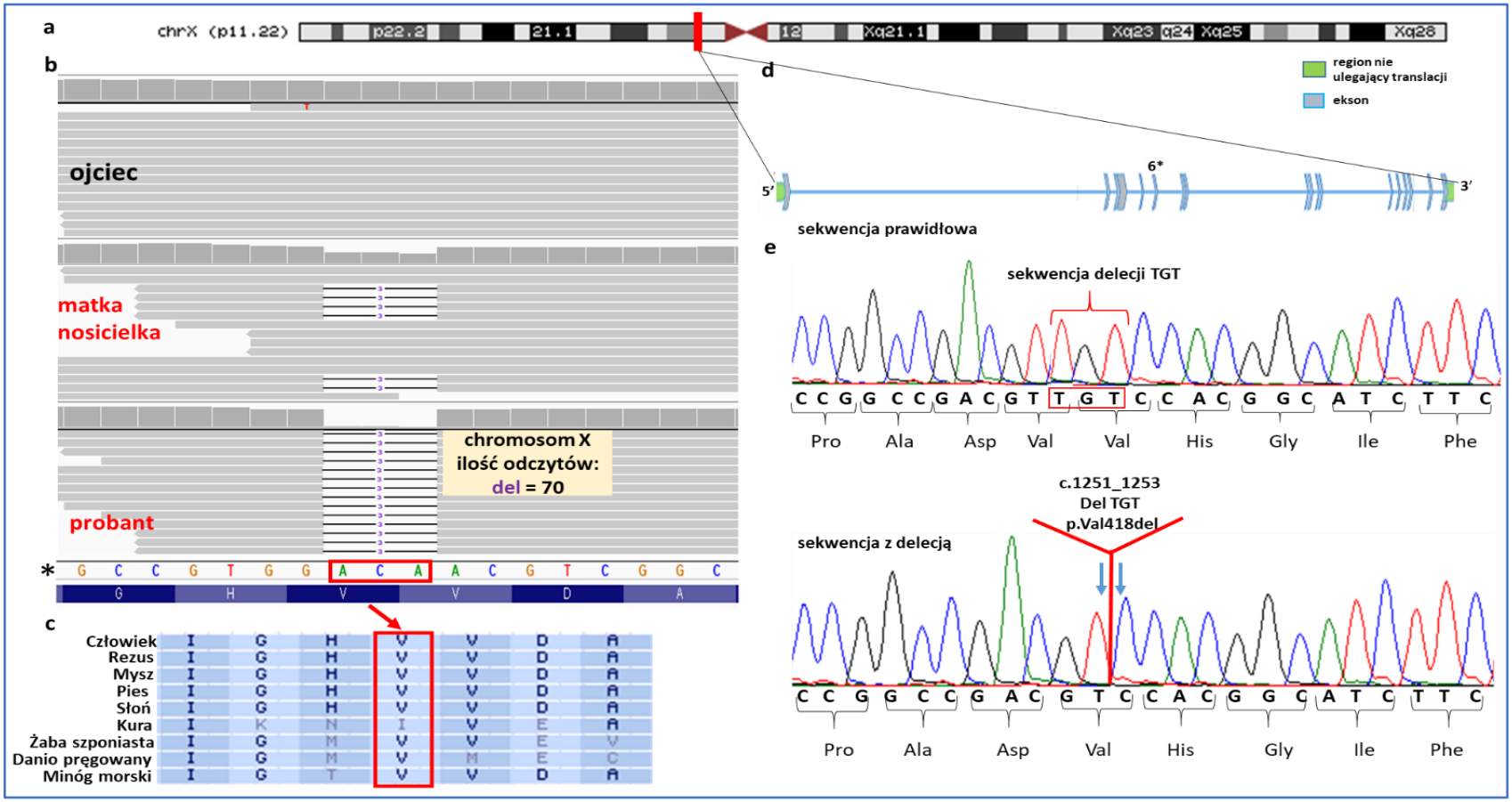
Ryc. 8 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.697G>T → p.Glu233*w genie *ESRP2* zidentyfikowanego u pacjenta nr 9. a) lokalizacja genu *ESRP2* na długim ramieniu chromosomu 16 (locus q22.1),**b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą,*****analiza przedstawia prawidłową sekwencję nici matrycowej DNA (-) zgodnie z orientacją genu *ESRP2* w genomie; poniżej prawidłowa sekwencja aminokwasowa **c)** kwas glutaminowy w pozycji 33 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *ESRP2*, ***** ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, który potwierdzaja obecność heterozygotycznego wariantu u probanta; wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+) **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta i matki oraz brak obecności u kontroli.

Przypadek nr 10

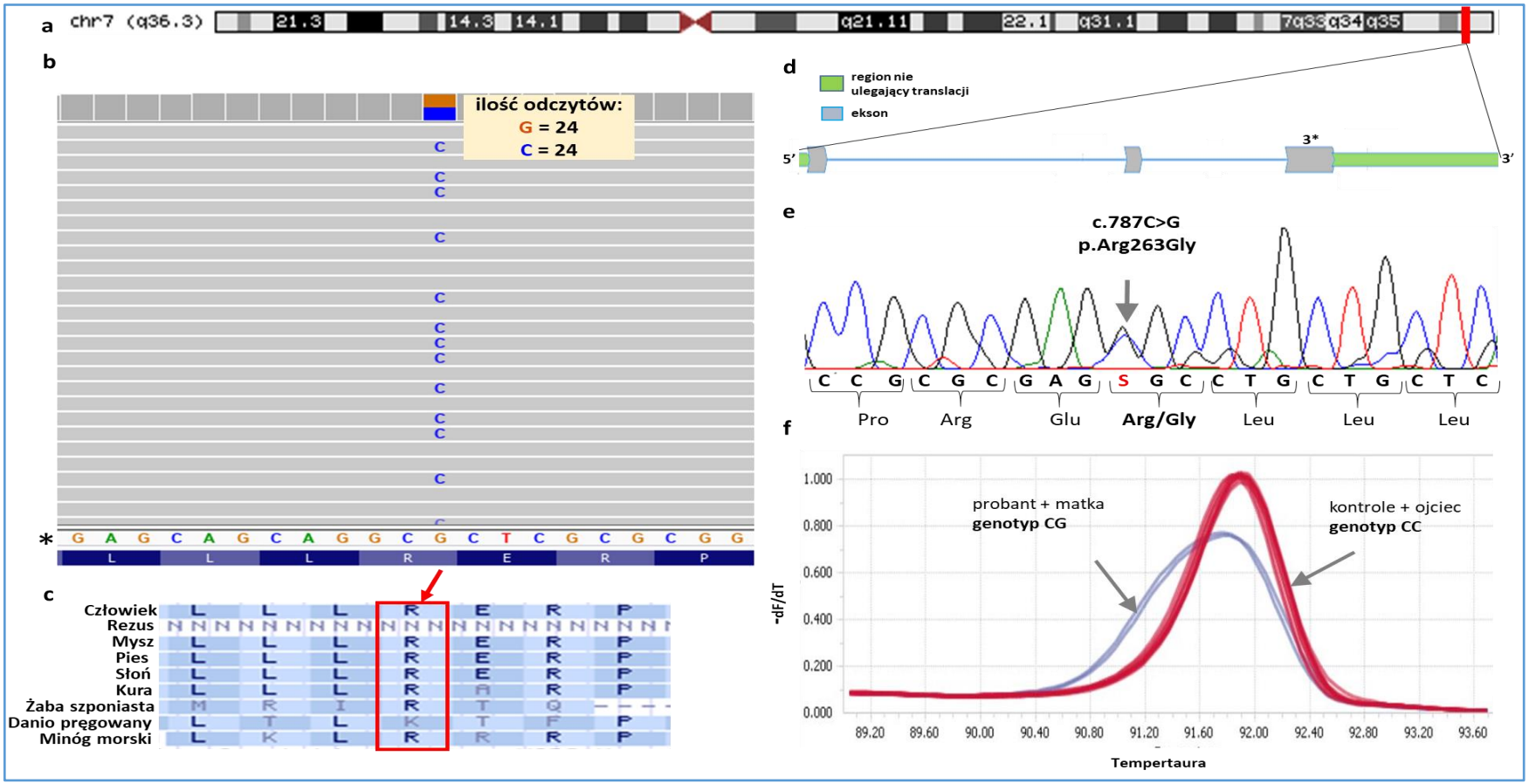
Pacjentem był 11 letni chłopiec z nsCL, u którego analiza radiogramów zębowych wykazała również wrodzony brak drugiego lewego zawiązka zęba przedtrzonowego w żuchwie. Przeprowadzone sekwencjonowanie NGS pozwoliło na identyfikację hemizygotycznej trójnukleotydowej delecji c.1251_1253delTGT w eksonie 6 genu *FGD1* (OMIM *300546). Gen ten zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu X. Opisywana delecja powoduje usunięcie konserwatywnej waliny w pozycji 418 kodowanego białka (p.Val418del). Wykryta zmiana jest nową, niezidentyfikowaną w genomach kontrolnych oraz bazach danych zmianą. W bazie VarSome wpływ wariantu na produkt białkowy genu został oceniony jako prawdopodobnie patogenny „*likely pathogenic*". W wywiadzie rodzinnym nie stwierdzono obecności wady rozszczepowej zarówno u rodziców jaki i krewnych probanta. Pacjent odziedziczył zmianę od matki, u której delecja występowała w postaci heterozygotycznej. Wyniki analiz dla wariantu c.1251_1253delTGT genu *FGD1* przedstawiono na **Ryc.9.** Nie zaprezentowano wyników genotypowania metodą HRM ze względu na problemy związane z zaprojektowaniem odpowiednich starterów do identyfikacji genotypów wybraną metodą.

Przypadek nr 11

Do projektu zakwalifikowano 4 letniego chłopca ze sporadycznym przypadkiem nsCLP. Analiza sekwencyjna wykazała obecność nowej, nieopisanej w żadnej bazie danych heterozygotycznej substytucji w genie *SHH* (OMIM *600725). Zmiana zlokalizowana w eksonie 3 to heterozygotyczna transwersja cytozyny na guaninę (c.787C>G), w wyniku której dochodzi do zamiany argininy w pozycji 263 na glicynę (p.Arg263Gly). Opisywana zmiana wpływa negatywnie na strukturę i funkcję kodowanego białka, co potwierdziło 14 programów bioinformatycznych użytych w analizach *in silico.* Oceniły one zmianę jako powodującą chorobę „*disease causing*", uszkadzającą „*damaging*" oraz patogenną „*pathogenic*". Pozostałe 3 programy określiły zmianę jako umiarkowanie patogenną „*medium*" oraz tolerowaną „*tolerated*", czyli nie mającą wpływu na funkcję białka (Tab.11). Analiza genotypowania u rodziców potwierdziła obecność wariantu w układzie heterozygotycznym u matki probanta. Wariantu nie zidentyfikowano u ojca ani żadnej z badanych pod tym kątem kontroli. Wyniki przeprowadzonych analiz dla wariantu c.787C>G genu *SHH* przedstawiono na **Ryc. 10**.



Ryc. 9 Wyniki analiz dla hemizygotycznego wariantu c.1251_1253delTGT → p.Val418del w genie *FGD1* zidentyfikowanego u pacjenta nr 10 oraz jego matki. a) lokalizacja genu *FGD1* na krótkim ramieniu chromosomu X (locus p11.22), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną delecją,*****przedstawiono prawidłową sekwencję nici matrycowej DNA (-) zgodnie z orientacją genu *FGD1* w genomie**, c)** – Walina w pozycji 418 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *FGD1*, * ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera; przedstawiono sekwencję kontrolną oraz sekwencję potwierdzającą obecność delecji u probanta; wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+).



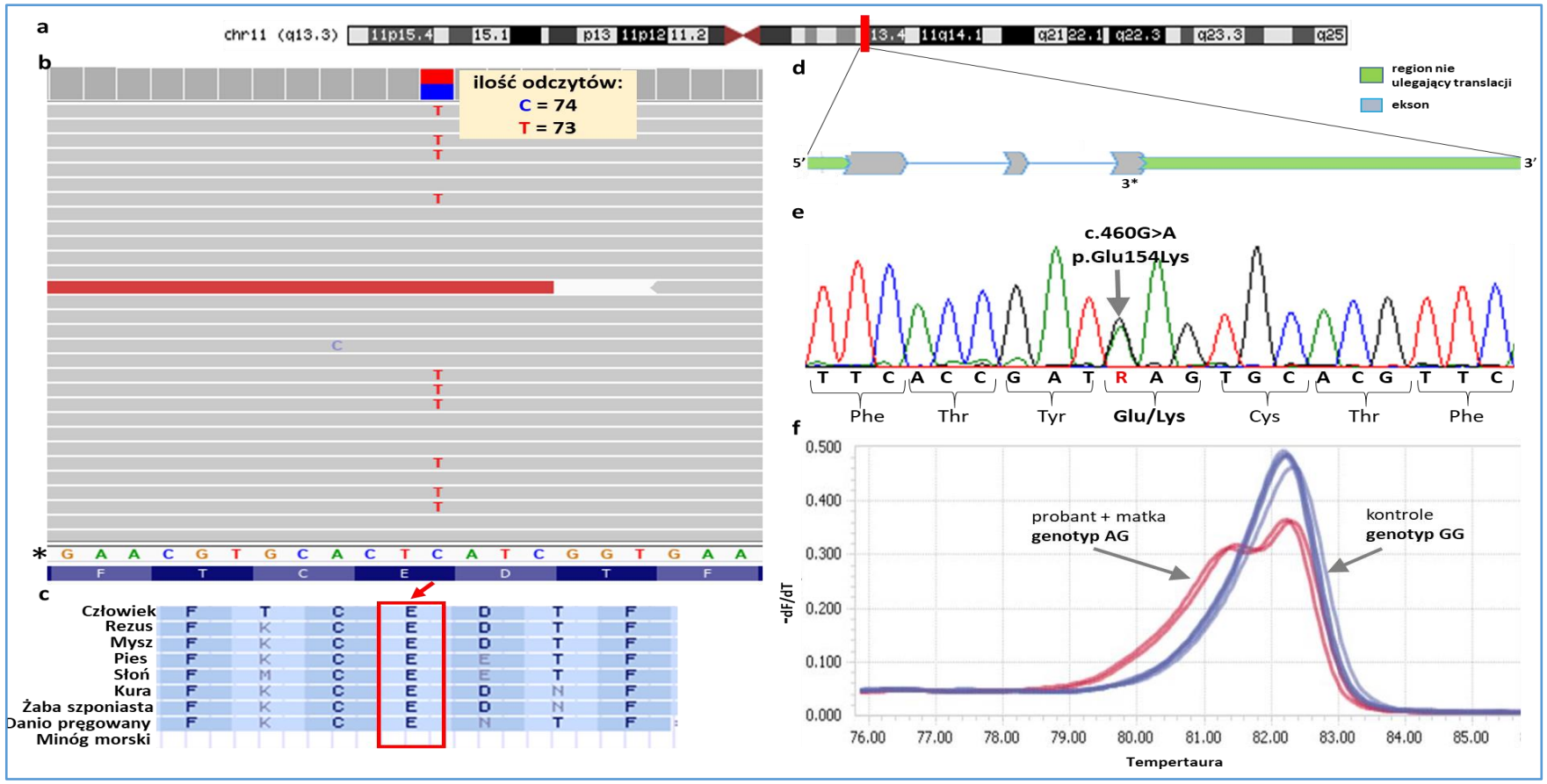
Ryc. 10 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.787C>G → p.Arg263Gly w genie *SHH* zidentyfikowanego u pacjenta nr 11. a) lokalizacja genu *SHH* na długim ramieniu chromosomu 7 (locus q36.3) **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą,*****analiza przedstawia prawidłową sekwencję nici matrycowej DNA (-) zgodnie z orientacją genu *SHH* w genomie; poniżej prawidłowa sekwencja aminokwasowa **c)** arginina w pozycji 263 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *SHH*, ***** ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, który potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+) **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta i matki oraz brak nosicielstwa u ojca i kontroli.

Przypadek nr 12

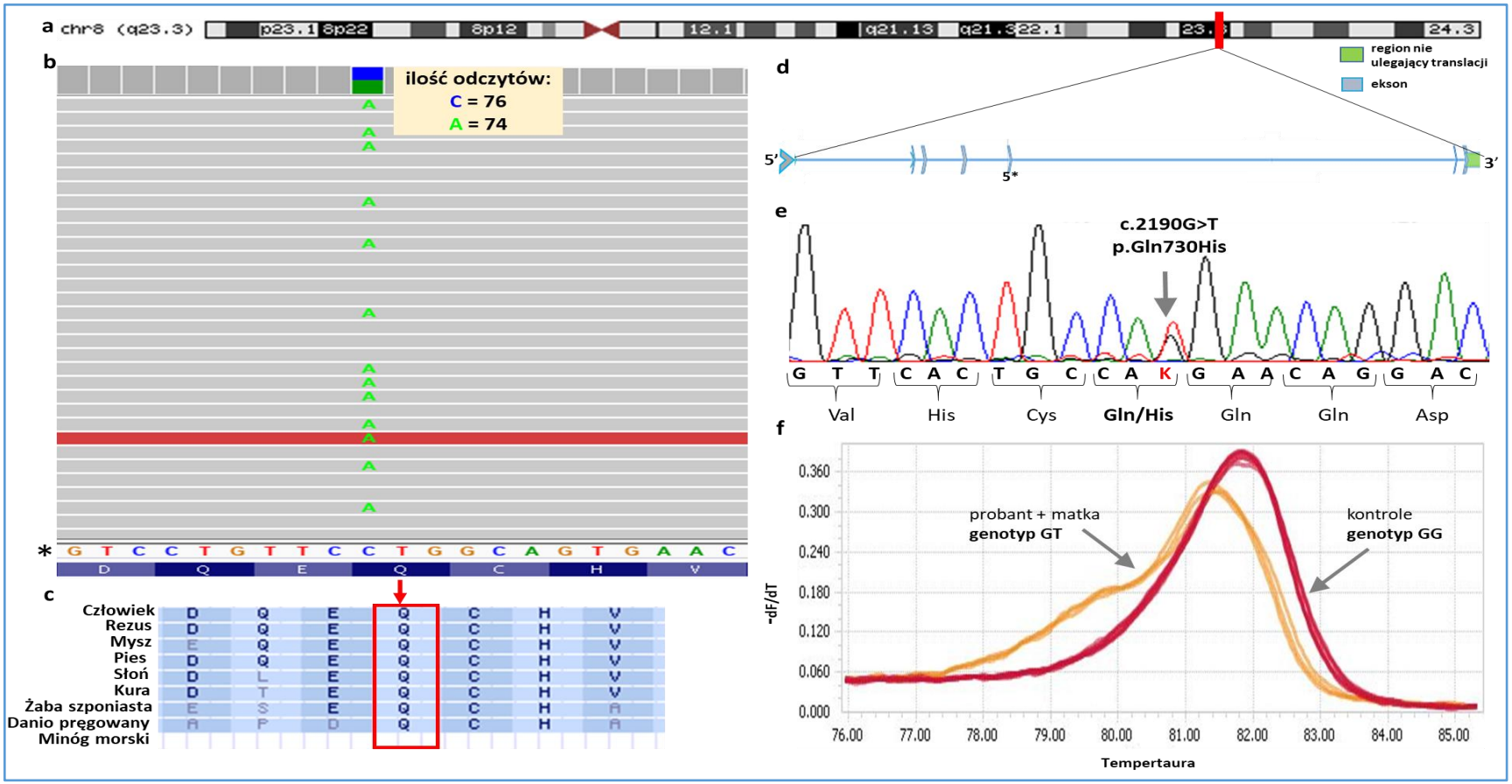
Pacjentką była 15 dziewczynka z rozpoznanym nsCL. W wywiadzie rodzinnym nie stwierdzono występowania wad rozszczepowych. Analiza sekwencyjna panelu genów pozwoliła na identyfikację heterozygotycznej tranzycji polegającej na zamianie guaniny na adeninę c.460G>A w eksonie 2 genu *FGF4* (OMIM *164980). W wyniku tej substytucji nukleotydowej dochodzi do zamiany wysoce konserwatywnego kwasu glutaminowego na lizynę w pozycji 154 kodowanego białka (p.Glu154Lys). Opisywany wariant w genie *FGF4* to nowa, niezidentyfikowana w genomach i eksomach referencyjnych zmiana. W bazie VarSome określana jest ona jako wariant o niepewnym znaczeniu „*uncertain significance*". W wyniku przeprowadzonej analizy *in silico* patogenny charakter wariantu c.460G>A potwierdziło 13 z 17 zastosowanych do tego celu programów bioinformatycznych (Tab.11). Wywiad nie wykazał rodzinnego występowania wady. Pacjentka odziedziczyła zmianę od heterozygotycznej matki. Analizy genotypowania nie potwierdziły obecności zidentyfikowanego wariantu u kontroli z populacji polskiej. Zmiany nie zidentyfikowano również w bazie GnomAD.Wyniki analiz dla wariantu c.460G>A genu *FGF4* przestawiono na **Ryc.11**.

Przypadek nr 13

Pacjentem był 7 letni chłopiec z nsCLP oraz wrodzonym brakiem 2 zawiązków zębów stałych. Przeprowadzone analizy molekularne pozwoliły na identyfikację heterozygotycznej transwersji guaniny na tyminę (c.2190G>T), która jest zlokalizowana w eksonie 5 genu *TRPS1* (OMIMI* 604386). Substytucja ta powoduje zamianę glutaminy na histydnę w pozycji 730 kodowanego białka (p.Gln730His). Opisywana zmiana to niezidentyfikowany w genomach referencyjnych ani w pozostałych dostępnych bazach danych wariant nukleotydowy genu *TRPS1*. Programy użyte do analiz *in silico* m.in. MutationTaster, FATHMM-MKL oraz LRT oceniły wariant odpowiednio jako: chorobotwórczy „*disease causing*", uszkadzający „*damaging*" lub szkodliwy „*deleterious*". Pozostałe programy zakwalifikowały zmianę jako łagodną lub neutralną (Tab.11). Pacjent odziedziczył opisywaną zmianę od matki, u której wariant zidentyfikowano również w układzie heterozygotycznym. Wywiad rodzinny nie ujawnił występowania wady rozszczepowej u żadnego członka rodziny. W grupie kontrolnej nie wykryto obecności badanej zmiany. Wyniki analiz dla wariantu w genie *TRPS1* przedstawiono na **Ryc. 12**.



Ryc. 11 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.460G>A → p.Glu154Lys w genie *FGF4* zidentyfikowanego u pacjenta nr 12. a) lokalizacja genu *FGF4* na długim ramieniu chromosomu 11 (locus q13.3), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą,*****analiza przedstawia prawidłową sekwencję nici matrycowej DNA (-) zgodnie z orientacją genu *FGF4* w genomie, poniżej prawidłowa sekwencja aminokwasowa **c)** kwas glutaminowy w pozycji 354 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *FGF4*, *****ekson, w którym zlokalizowana jest zmiana, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, który potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u probanta; wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+) **f)** analiza genotypowania metodą HRM, przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów.Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta i matki oraz brak obecności kontroli.



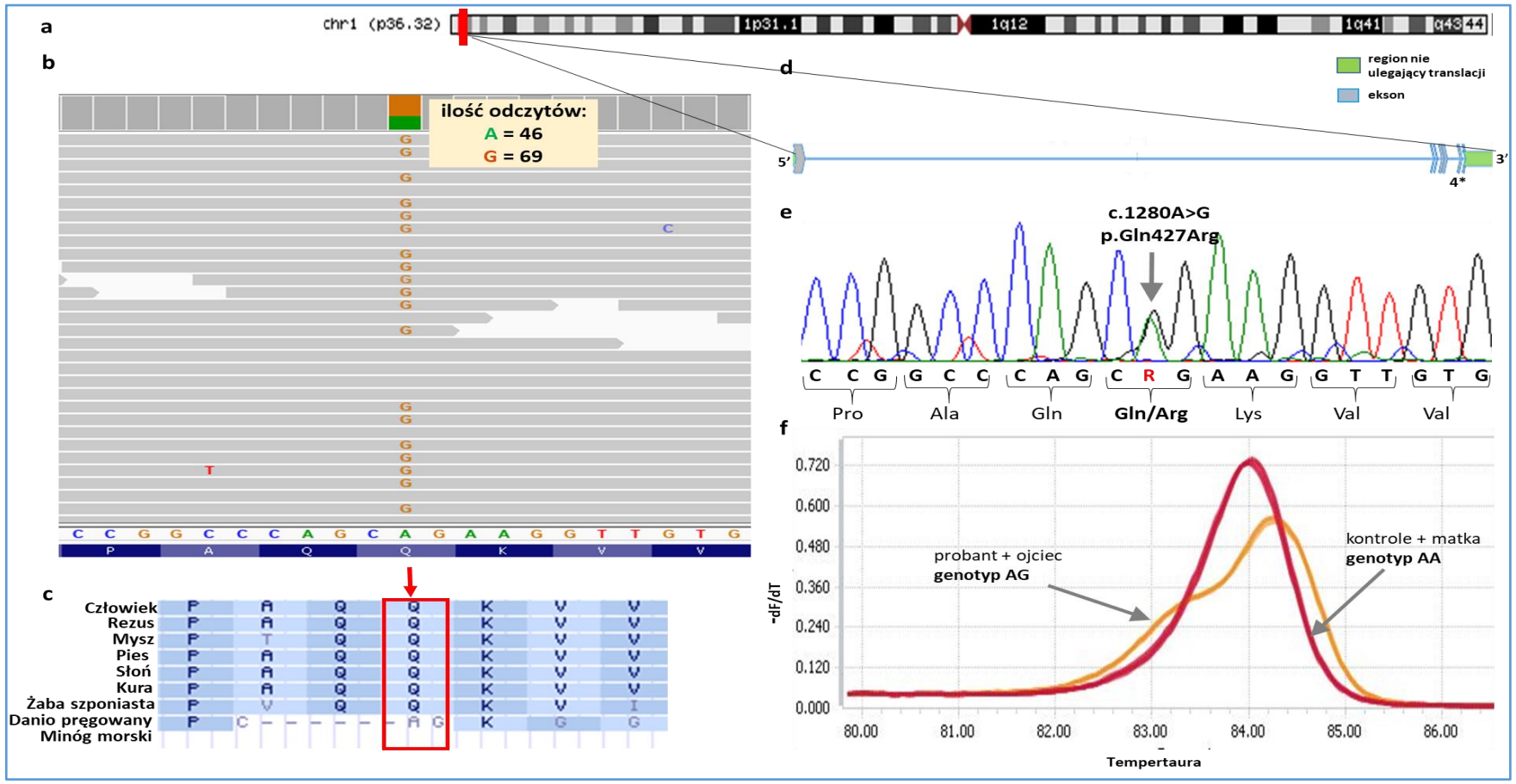
Ryc. 12 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.2190G>T → p.Gln730His w genie *TRPS1* zidentyfikowanego u pacjenta nr 13. a) lokalizacja genu *TRPS1* na długim ramieniu chromosomu 6 (locus q23.3), **b)** – wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą,*****przedstawiono prawidłową sekwencję nici matrycowej DNA (-), zgodnie z orientacją genu *TRPS1* w genomie**, c)** – glutamina w pozycji 730 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *TRPS1*, * ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, potwierdzający obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+) **f)** - analiza genotypowania metodą HRM, przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznej zmiany u probanta i jego matki oraz brak nosicielstwa u ojca i kontroli.

Przypadek nr 14

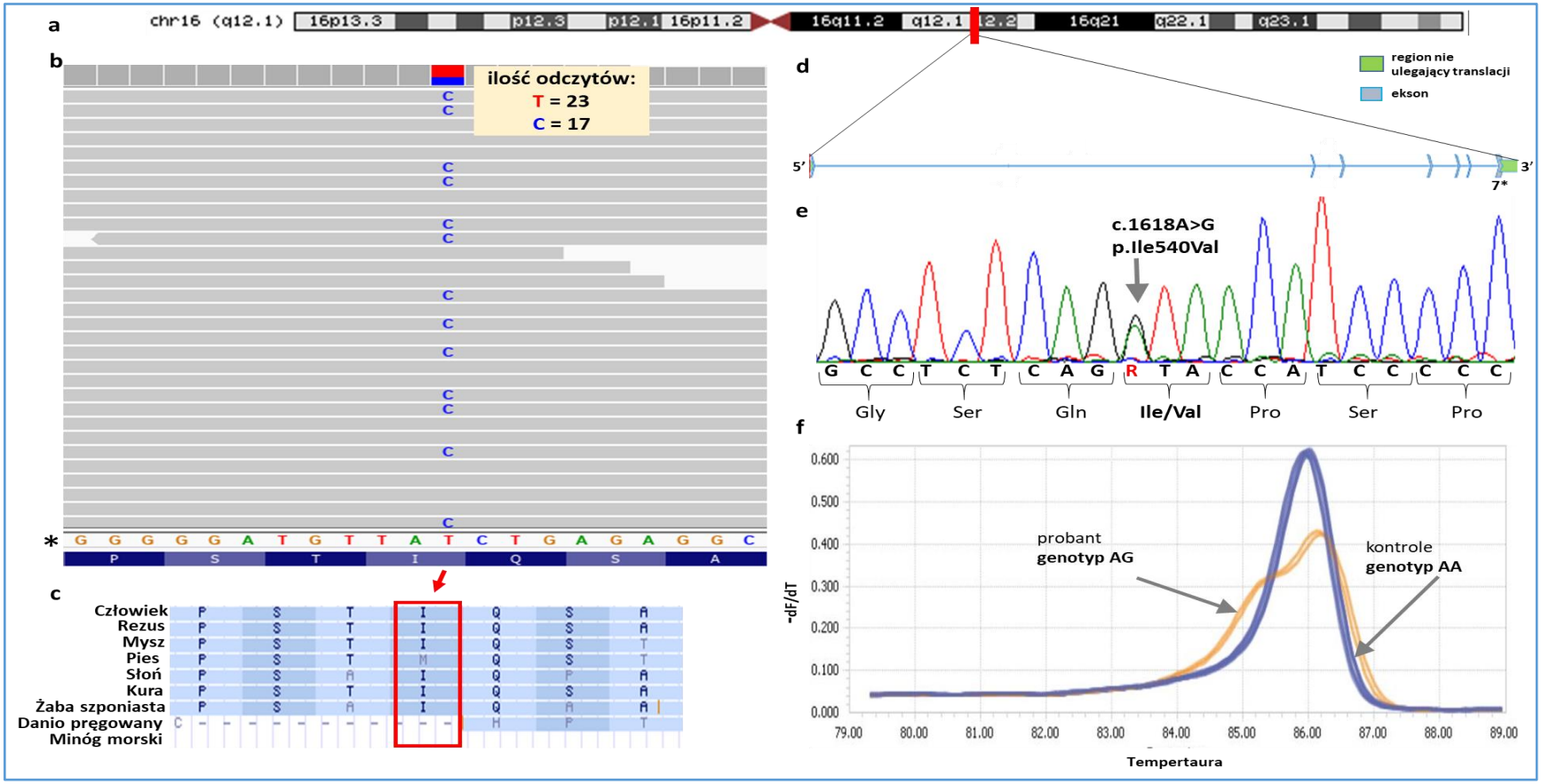
Przeprowadzone analizy genetyczne pozwoliły na wykrycie u 16-letniego pacjenta z nsCLP nowego wariantu w genie *SKI* (OMIM *164780). W analizie pantomogramu stwierdzono u niego również brak 4 zawiązków zębów stałych. Wariant zlokalizowany w eksonie 4 genu *SKI* to heterozygotyczna tranzycja adeniny w pozycji 1280 na guaninę (c.1280A>G) powodująca zamianę glutaminy w pozycji 427 kodowanego białka na argininę (p.Gln427Arg). Zmiany nie zidentyfikowano w bazie referencyjnych genomów i eksomów (GnomAD). W bazie VarSome wariant opisano jako zmianę o nieokreślonym wpływie na białko „*uncertain significance*". Spośród zastosowanych programów do analizy *in silico,* 4 oceniły wpływ substytucji jako uszkadzająca „*damaging*" (Tab.11). U pacjenta nie stwierdzono rodzinnego charakteru występowania wady rozszczepowej. Pacjent odziedziczył wariant od ojca, u którego występuje on również w układzie heterozygotycznym. U matki oraz u kontrol nie zidentyfikowano obecności zmiany. Wyniki analiz dla wariantu c.1280A>G genu *SKI* przedstawiono na **Ryc.13**.

Przypadek nr 16

Pacjentem był 18-latek z nsCLP oraz hiperdoncją (2 nadliczbowe zęby). W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono obecność heterozygotycznej tranzycji w eksonie 7 genu *TOX3* (OMIM *6114160). Tranzycja ta polega na zamianie adeniny na guaninę w pozycji 1618 (c.1618A>G) i prowadzi do substytucji izoleucyny na walinę w pozycji 540 kodowanego białka (p.Ile540Val). Analizowany wariant nukleotydowy to nowa, niezidentyfikowana w referencyjnych eksomach i genomach zmiana. W bazie VarSome zastał oceniony jako wariant o niepewnym, nieokreślonym znaczeniu „*uncertain significance*". Trzy z 17 programów bioinformatycznych wykorzystanych do oceny patogenności określiły zidentyfikowany wariant jako wariant jako uszkadzający „*damaging*" czyli wpływający negatywnie na strukturę i funkcję białka. Wada u pacjenta ma charakter sporadyczny. Odziedziczył on wariant od zdrowej matki, u której stwierdzono jego obecność również w postaci heterozygotycznej. U ojca oraz kontroli, nie stwierdzono obecności badanej zmiany. (Tab.12) Wyniki analiz dla tranzycji c.1618A>G genu *TOX3* przedstawiono na **Ryc. 14**.



Ryc. 13 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.1280A>G → p.Gln427Arg w genie *SKI* zidentyfikowanego u pacjenta nr 14. a) lokalizacja genu *SKI* na długim krótkim ramieniu chromosomu 1 (locus p36.32), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą **c)** glutamina w pozycji 427 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *SKI*, ***** ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, który potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta i ojca oraz brak nosicielstwa u matki oraz u kontroli.



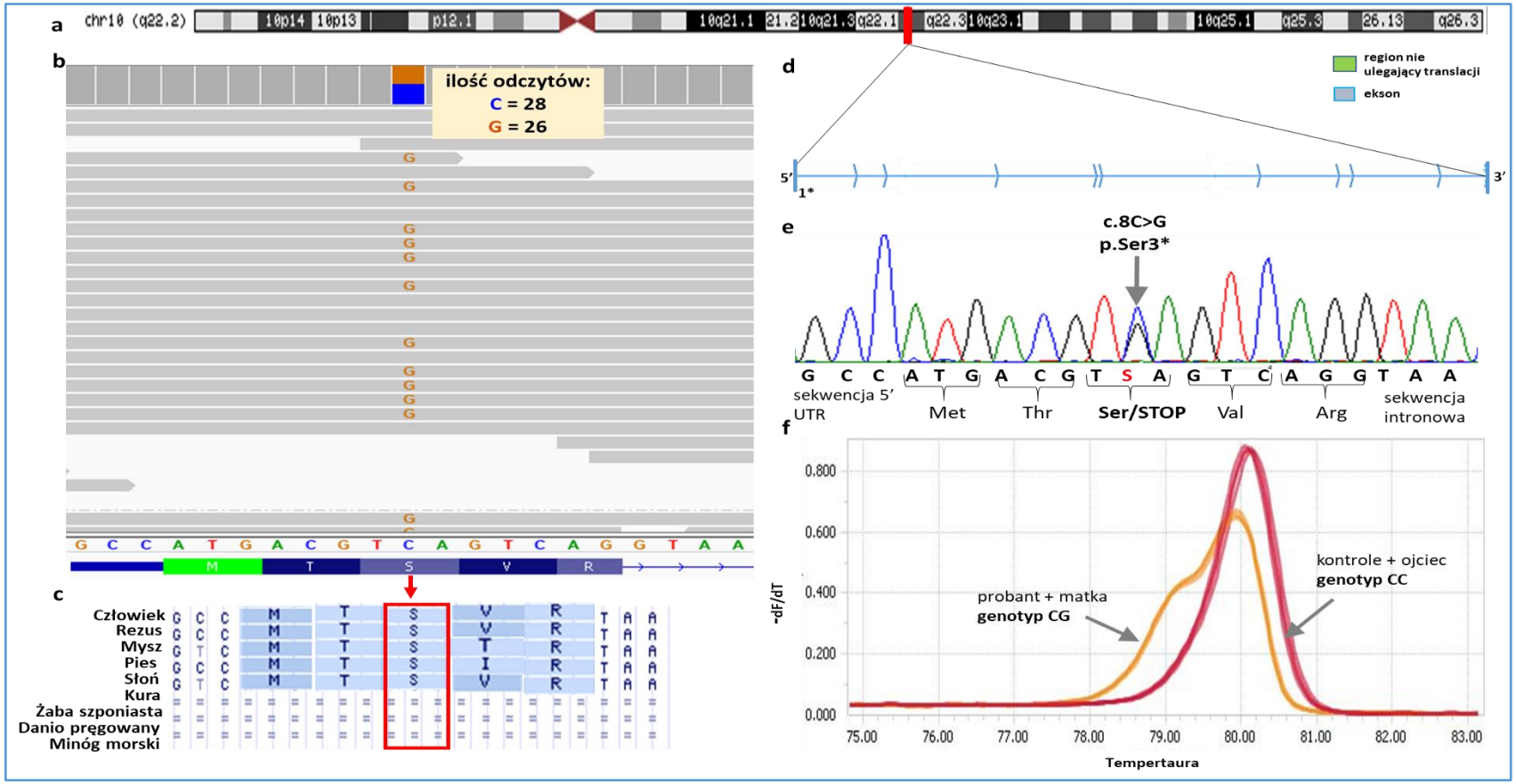
Ryc. 14 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.1618A>G → p.Ile540Val w genie *TOX3* zidentyfikowanego u pacjenta nr 16. a) lokalizacja genu *TOX3* na długim ramieniu chromosomu 16 (locus q12.1),), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą,*analiza przedstawia sekwencję nici matrycowej DNA (-) zgodnie z orientacją genu *TOX3* w genomie, poniżej prawidłowa sekwencja aminokwasowa **c)** izoleucyna w pozycji 540 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *TOX3*, * ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, która potwierdziła obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+) **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta i matki oraz brak obecności u kontroli.

Przypadek nr 17

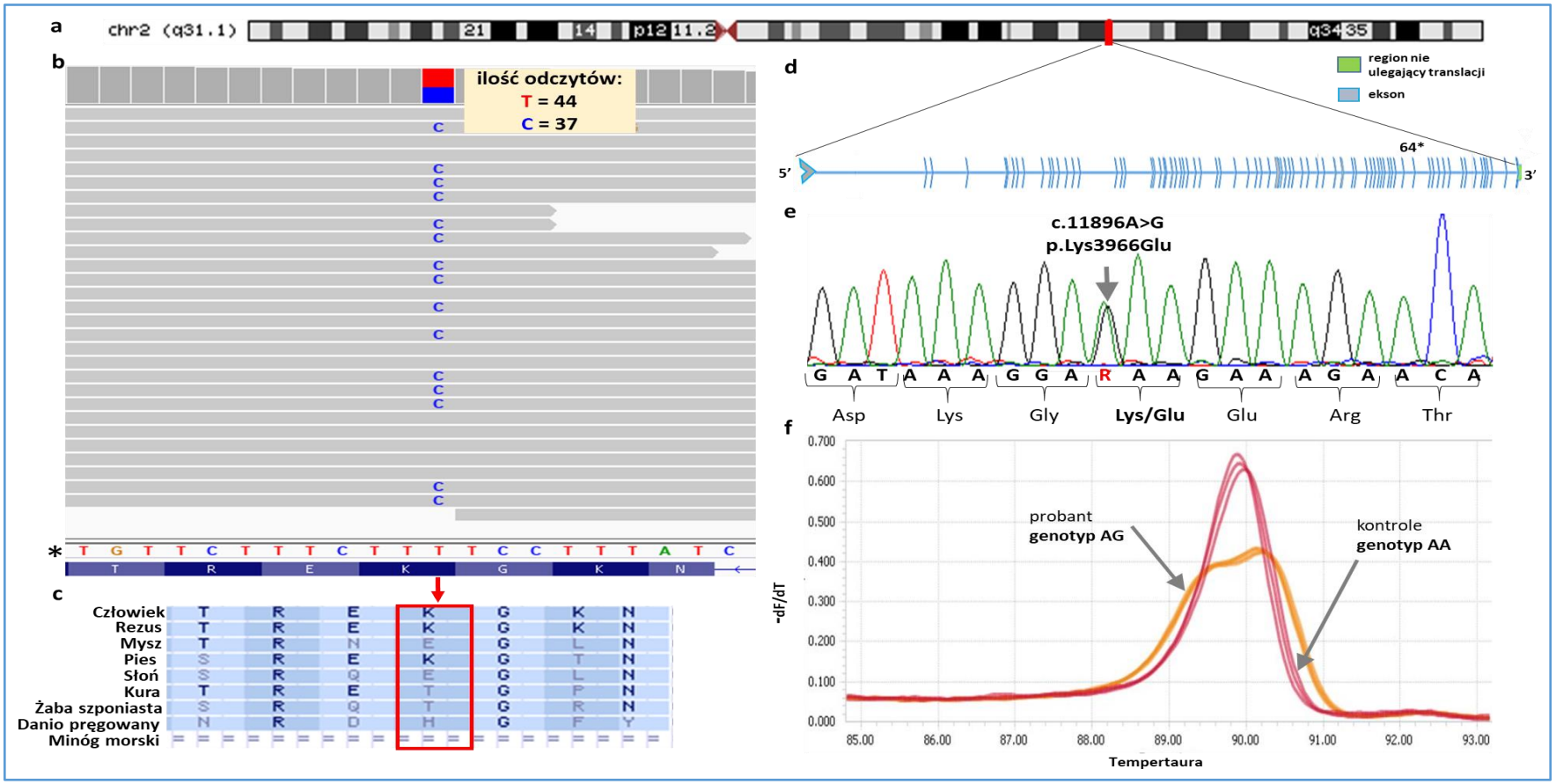
Pacjentem był 8-letni chłopiec z nsCLP. Badanie pantomograficzne wykazało u niego także wrodzony brak 2 zawiązków zębów stałych. W wyniku sekwencjonowania panelu 424 genów zidentyfikowano nieopisany dotychczas wariant nukleotydowy zlokalizowany w eksonie 1 genu *ADK* (OMIM *102750). Wariant ten to heterozygotyczna transwersja cytozyny na guaninę (c.8C>G), która prowadzi do powstania kodonu stop w pozycji 3 (p.Ser3*). Powoduje to przedwczesną terminację translacji i powstanie nieaktywnego produktu białkowego (prawidłowy transkrypt koduje białko o długości 346 reszt aminokwasowych). Wariantu nie zidentyfikowano w bazie gnomAD, a w bazie VarSome został zakwalifikowany jako wariant o niepewny znaczeniu „*uncertain significance*". Część programów do analizy *in silico* (4/7) potwierdziło patogenny wpływ wariantu (MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM-MKL, EIGEN PC). Pozostałe oceniły zmianę jako łagodną (Tab.11). W wywiadzie nie stwierdzono rodzinnego występowania rozszczepu. Pacjentka odziedziczyła zmianę od heterozygotycznej matki. U ojca oraz w grupie kontrolnej nie wykryto zidentyfikowanego wariantu (Tab.12). Wyniki analiz dla wariantu c.8C>G genu *ADK* przedstawiono na **Ryc. 15**.

Przypadek nr 18

Pacjentem był 4 letni chłopiec z nsCLP. Zidentyfikowany u niego nowy potencjalnie patogenny wariant nukleotydowy to heterozygotyczna tranzycja adeniny na guaninę (c.11896A>G) zlokalizowana w 64 eksonie genu *LRP2* (OMIM *600073). Opisywana substytucja powoduje zamianę lizyny na glutaminę w pozycji 3966 kodowanego białka (p.Lys3966Glu). Wariant ten nie został zidentyfikowany w żadnej bazie danych, w tym bazie GnomAD. Zmiana została oceniona jako patogenna przez 2 z 17 programów wykorzystanych do analiz *in silico* (FATHMM i FATHM-MK). Rozszczep u pacjenta ma charakter rodzinny (CLP ma także dziadek od strony ojca pacjenta). Niestety z powodu braku DNA nie udało się zweryfikować obecności zmiany u krewnego. Obecność zidentyfikowanego wariantu wykluczono u zdrowej matki pacjenta, ale z powodu braku DNA nie udało się zweryfikować obecności zmiany u ojca i dziadka pacjenta (Tab.12). Wariantu c.11896A>G nie wykryto również w grupie 300 kontroli z populacji polskiej genotypowanych metodą HRM. Wyniki analiz dla wariantu c.11896A>G genu *LRP2* zostały przedstawione na **Ryc. 16**.



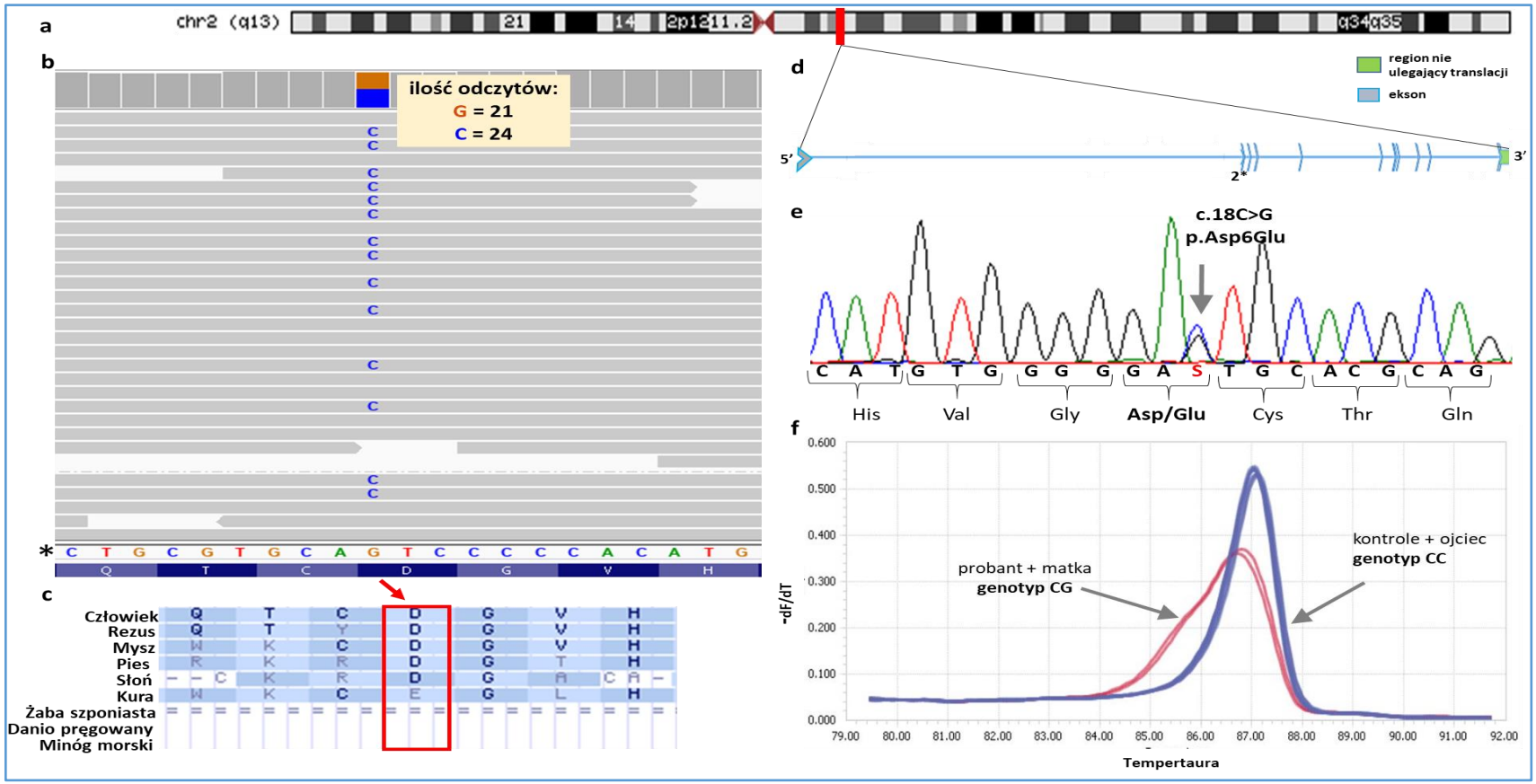
Ryc. 15 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.8C>G → p.Ser3*w genie *ADK* zidentyfikowanego u pacjenta nr 17. a) lokalizacja genu *ADK* na długim ramieniu chromosomu 10 (locus q22.2), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą, **c)** seryna w pozycji 3 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *ADK*, * ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, która potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta i matki oraz brak nosicielstwa u ojca i kontroli.



Ryc. 16 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.11896A>G → p.Lys3966Glu w genie *LRP2* zidentyfikowanego u pacjenta nr 18. a) lokalizacja genu *LRP2* na długim ramieniu chromosomu 2 (locus q31.1),), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą,*analiza przedstawia sekwencję nici matrycowej DNA (-) zgodnie z orientacją genu *LRP2* w genomie, poniżej prawidłowa sekwencja aminokwasowa **c)** lizyna w pozycji 3966 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *LRP2*, * ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, który potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+) **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta oraz brak nosicielstwa u kontroli.

Przypadek nr 19

Pacjentem zakwalifikowanym do badań był 3 letni chłopiec z nsCLP. Zidentyfikowano u niego nowy, nieopisany dotychczas w bazach danych wariant nukleotydowy w genie *EDAR* (OMIM *604095). Opisywana substytucja zlokalizowana w eksonie 2 polega na heterozygotycznej transwersji cytozyny w pozycji 18 na guaninę (c.18C>G). Powoduje ona zamianę kwasu asparaginowego na kwas glutaminowy w pozycji 6 kodowanego białka (p.Asp6Glu). Negatywny wpływ substytucji aminokwasowej p.Asp6Glu, opisując go jako szkodliwy „*damaging*" określił program FATHM. (Tab.11). Wywiad rodzinny wykazał, że rozszczep u pacjenta ma charakter sporadyczny. Chłopiec odziedziczył wariant od heterozygotycznej matki. Zarówno u ojca jak i u kontroli w populacji polskiej oraz bazie populacyjnej GnomAD nie zidentyfikowano badanej zmiany (Tab.12). Wyniki analizy dla wariantu c.18C>G genu *EDAR* przedstawiono na **Ryc. 17**



Ryc. 17 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.18C>G → p.Asp6Glu w genie *EDAR* zidentyfikowanego u pacjenta nr 19. **a)** lokalizacja genu *EDAR* na długim ramieniu chromosomu 2 (locus q13), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą,*analiza przedstawia prawidłową sekwencję nici matrycowej DNA (-) zgodnie z orientacją genu *EDAR* w genomie, poniżej prawidłowa sekwencja aminokwasowa **c)** kwas asparaginowy w pozycji 6 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *EDAR*, *ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, który potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+) **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta i matki oraz brak nosicielstwa u ojca i kontroli.

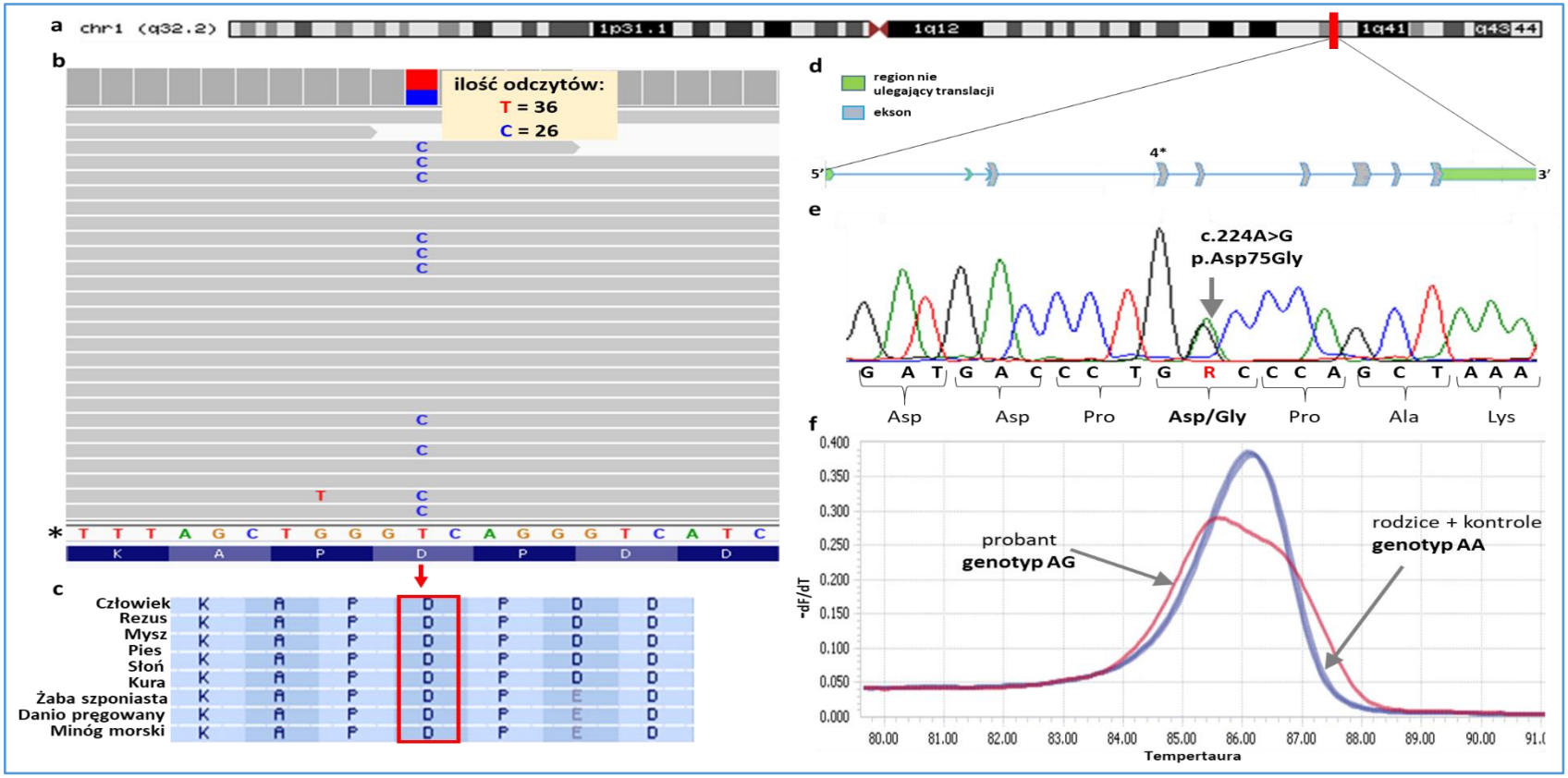
4.2 Opis nowych wariantów w grupie pacjentów z nsCP

Przypadek nr 26

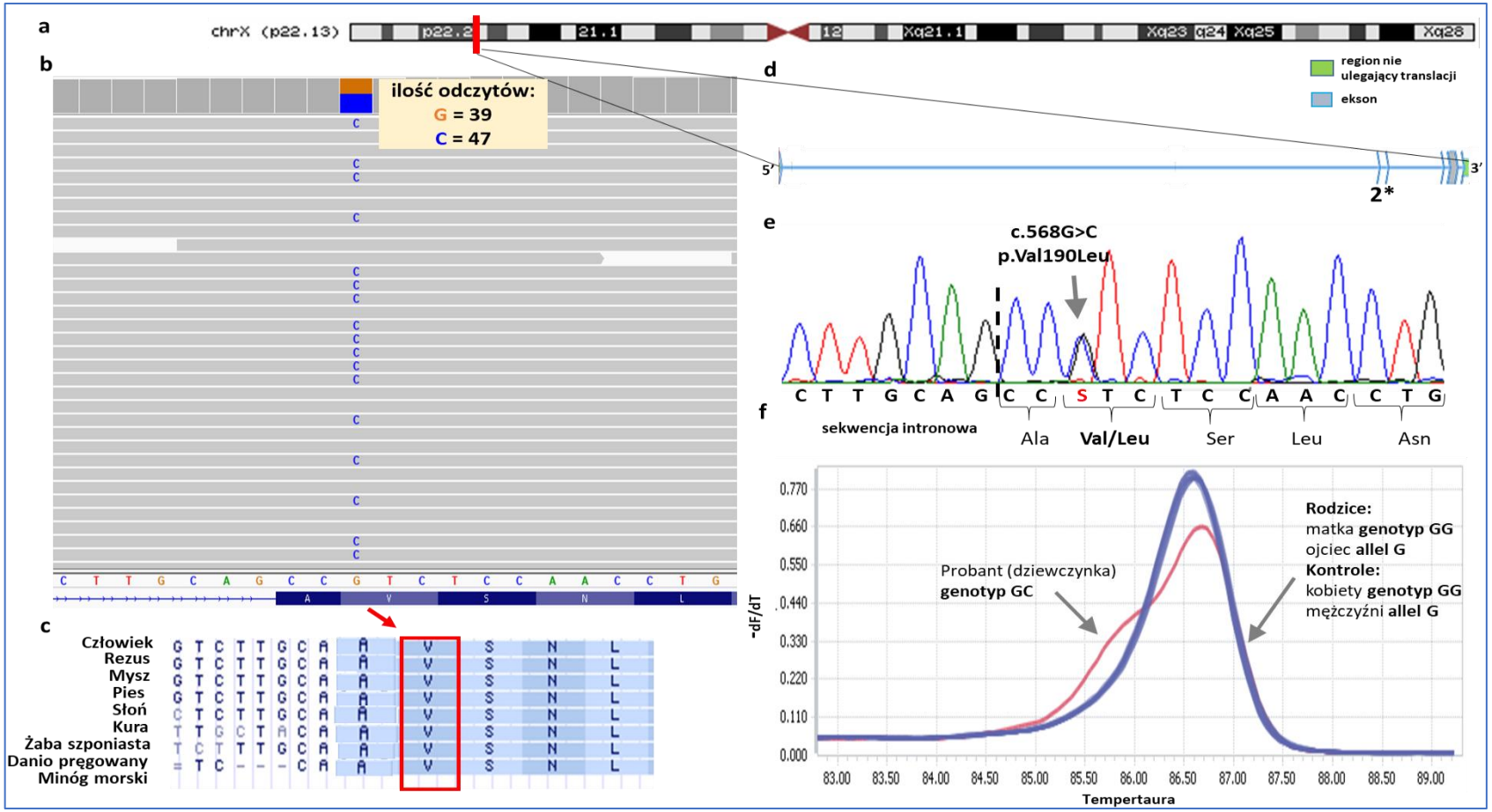
Pacjentem był 10 chłopiec z nsCP oraz wrodzonym brakiem zawiązka zęba stałego. Analiza sekwencjonowania NGS wykazała obecność nowego potencjalnie patogennego wariantu w eksonie 4 genu *IRF6* (OMIM* 607199). Opisywana zmiana to heterozygotyczna tranzycja c.224A>G, w wyniku której dochodzi do zamiany kwasu asparaginowego na glicynę w pozycji 75 kodowanego białka (p.Asp75Gly). Analizy *in silico* z wykorzystaniem 17 programów bioinformatycznych potwierdziły patogenność zidentyfikowanej substytucji, oceniając jej wpływ na funkcje białka jako „uszkadzający", „chorobotwórczy" (Tab.15). Zidentyfikowany wariant powstał *de novo*, gdyż nie został wykryty u rodziców pacjenta (Tab.14). Zmiany nie zidentyfikowano w kontrolach z populacji polskiej ani w bazie GnoamAD. Wyniki analiz dla wariantu c.224A>G genu *IRF6* przedstawiono na **Ryc.18.**

Przypadek nr 27

Analiza sekwencji kodującej 424 genów pozwoliła zidentyfikować u 11 letniej dziewczynki z nsCP nowy potencjalnie patogenny wariant w genie *NHS* (OMIM *****300457). Wykryta heterozygotyczna transwersja c.568G>C jest zlokalizowana w miejscu splicingowym eksonu 2. Skutkuje ona zamianą wysoce konserwatywnej waliny w pozycji 190 na leucynę (p.Val190Leu) i jednocześnie może mieć negatywny wpływ na proces składania mRNA (ADA score 0.99). Wariantu c.568G>C nie zidentyfikowano w żadnej bazie danych. Część programów (MutationTaster, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT) użytych w badaniach *in silico* określiły wpływ wariantu na produkt białkowy genu *NHS* jego patogenny, pozostałe oceniły zmianę jako łagodną (Tab.15). Rozszczep u pacjentki nie ma charakteru rodzinnego. Analizy genotypowania wykluczyły obecność wariantu u rodziców pacjentki, co oznacza, że badany wariant jest wariantem *de novo* (Tab. 16). Wyniki przeprowadzonych analiz dla wariantu c.568G>C genu *NHS* przedstawiono na **Ryc. 19**.



Ryc. 18 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu *de novo* c.224A>G → p.Asp75Gly w genie *IRF6* zidentyfikowanego u pacjenta nr 26. **a)** lokalizacja genu *IRF6* na długim ramieniu chromosomu 1 (locus q32.2) **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą,*****analiza przedstawia sekwencję nici matrycowej DNA (-) zgodnie z orientacją genu *IRF6* w genomie; poniżej prawidłowa sekwencja aminokwasowa **c)** kwas asparaginowy w pozycji 75 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *IRF6*, ***** ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, która potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u probanta; wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+) **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta oraz brak nosicielstwa u rodziców i kontroli.



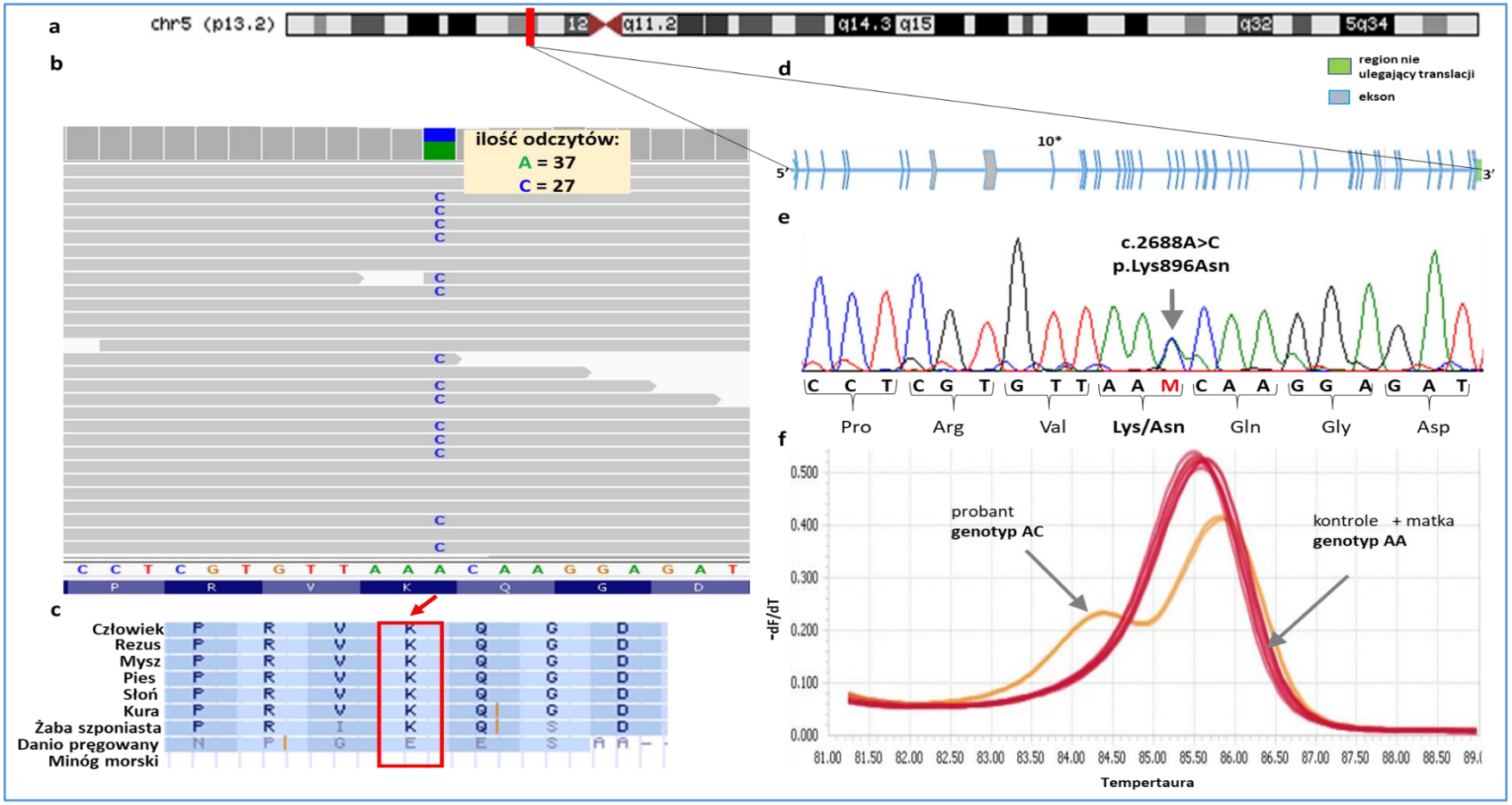
Ryc. 19 Rycina przedstawia wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu *de novo* c.568G>C → p.Val190Leu w genie *NHS* zidentyfikowanego u pacjenta nr 27. a) lokalizacja genu *NHS* na krótkim ramieniu chromosomu X (locus p22.13), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą **c)** walina w pozycji 190 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *NHS*, *****ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, która potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta oraz brak nosicielstwa kontroli.

Przypadek nr 28

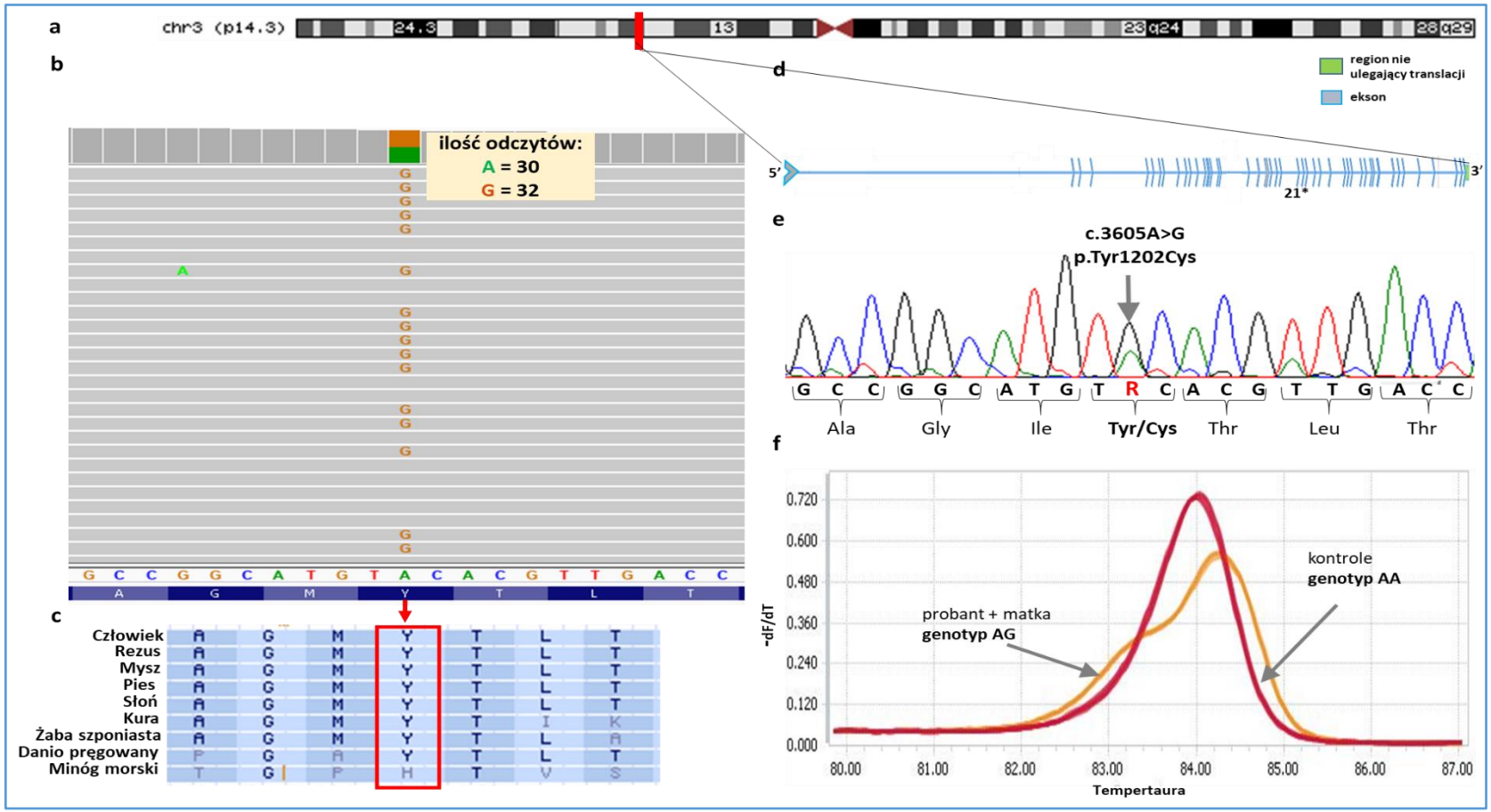
Pacjentką była 15-letnia dziewczynka z nsCP. Przeprowadzone analizy pozwoliły zidentyfikować potencjalnie patogenny wariant nukleotydowy w genie *NIPBL* (OMIM *608667). Wariant zlokalizowany w eksonie 10 to heterozygotyczna transwersja c.2688A>C powodująca zamianę lizyny na asparaginę (p.Lys896Asn). Jest to nowy, nieopisany dotychczas wariant nukleotydowy. Z pośród stosowanych programów oceniających wpływ tej substytucji aminokwasowej, 7 oceniło zmianę jako uszkadzającą „*damaging*", chorobotwórczą „*disease causing*" bądź szkodliwą „*deleterious*" (Tab.15). Pacjentka jest pierwszą osobą w rodzinie dotkniętą wadą rozszczepową. Nie potwierdzono obecności żadnego z opisywanych wariantów u zdrowej matki pacjentki. Z powodu braku DNA nie zweryfikowano obecności zmiany u ojca (Tab.16). Zidentyfikowany wariant nie został wykryty w grupie kontrolnej. Wyniki dla nowej zmiany c.2688A>C genu *NIPBL* przedstawiono na **Ryc. 20**.

Przypadek nr 29

Pacjentką była 8-letnia dziewczynka z nsCP. Przeprowadzone badania molekularne pozwoliły zidentyfikować nowy potencjalnie patogenny wariant nukleotydowy. Ta heterozygotyczna zmiana zlokalizowana w eksonie 21 genu *FLNB* (OMIM *603381) polega na tranzycji c.3605A>G, w wyniku której dochodzi do zamiany p.Tyr1202Cys. Wariant nie został zidentyfikowany w żadnej dostępnej bazie danych. Spośród 17 programów zastosowanych do analiz *in silico*, 15 oceniło wpływ opisywanej substytucji aminokwasowej m.in. jako patogenny „*pathogenic*", szkodliwy „*damaging*" oraz chorbotwórczy „*disease causing*". Pacjentka odziedziczyła zidentyfikowany wariant od matki, u której tranzycję c.3605A>G wykryto również w układzie heterozygotycznym. W grupie kontrolnej wariant nie został zidentyfikowany. Wyniki analizy dla wariantu c.3605A>G genu *FLNB* przedstawiono na **Ryc. 21**.



Ryc. 20 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.2688A>C → p.Lys896Asn w genie *NIPBL*, zidentyfikowanego u pacjenta nr 28. a) lokalizacja genu *NIPBL* na krótkim ramieniu chromosomu 5 (locus p13.2),), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą, **c)** lizyna w pozycji 896 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *NIPBL*, *ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, potwierdzający obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, **f)** analiza genotypowania metodą HRM, przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta i matki oraz brak obecności u kontroli.



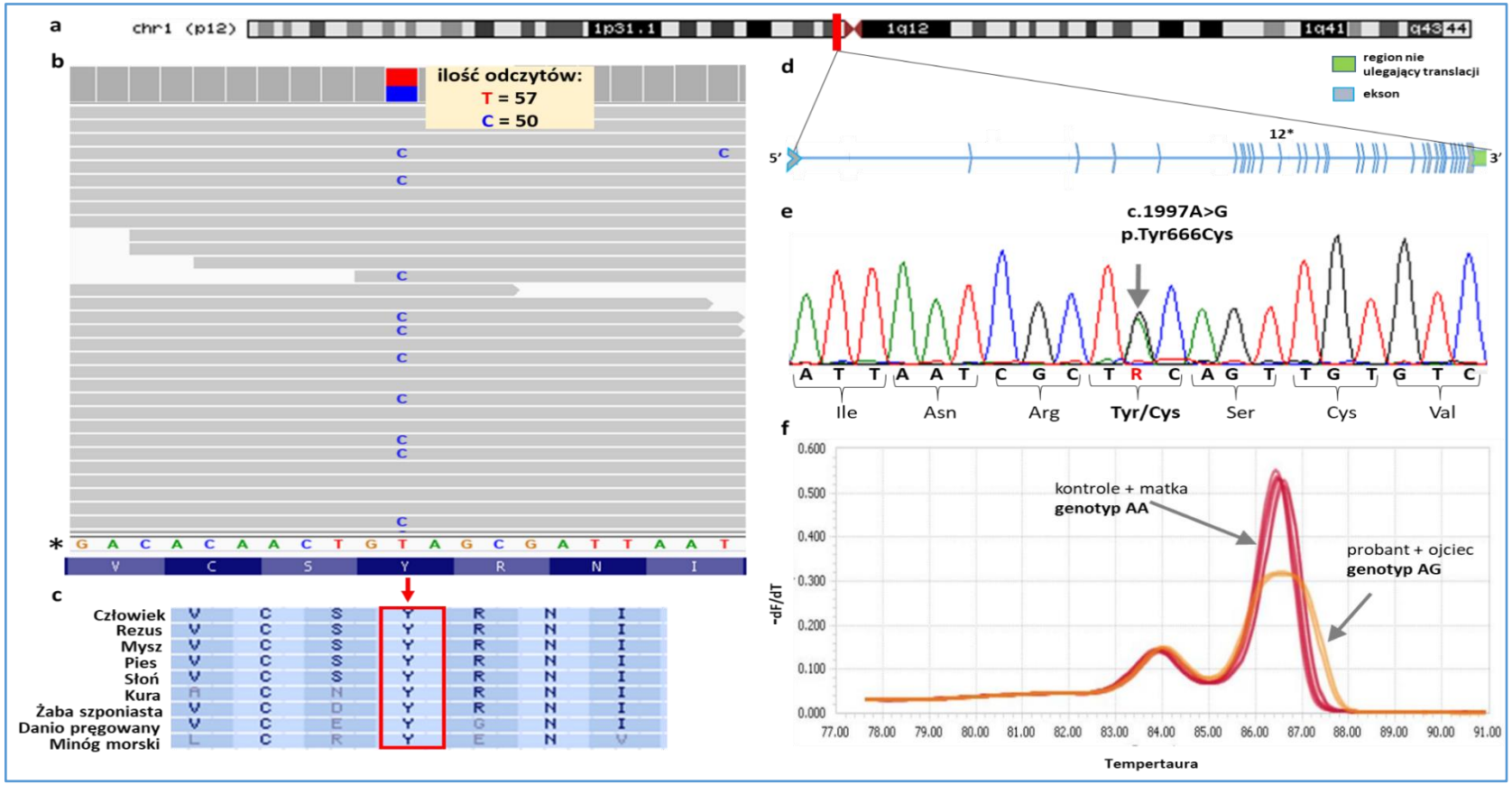
Ryc. 21 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.3605A>G → p.Tyr1202Cys w genie *FLNB* zidentyfikowanego u pacjenta nr 29. **a)** lokalizacja genu *FLNB* na krótkim ramieniu chromosomu 3 (locus p14.3), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą **c)** tyrozyna w pozycji 1202 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *FLNB*,* ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, która potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta. i matki oraz brak obecności u kontroli.

Przypadek nr 30

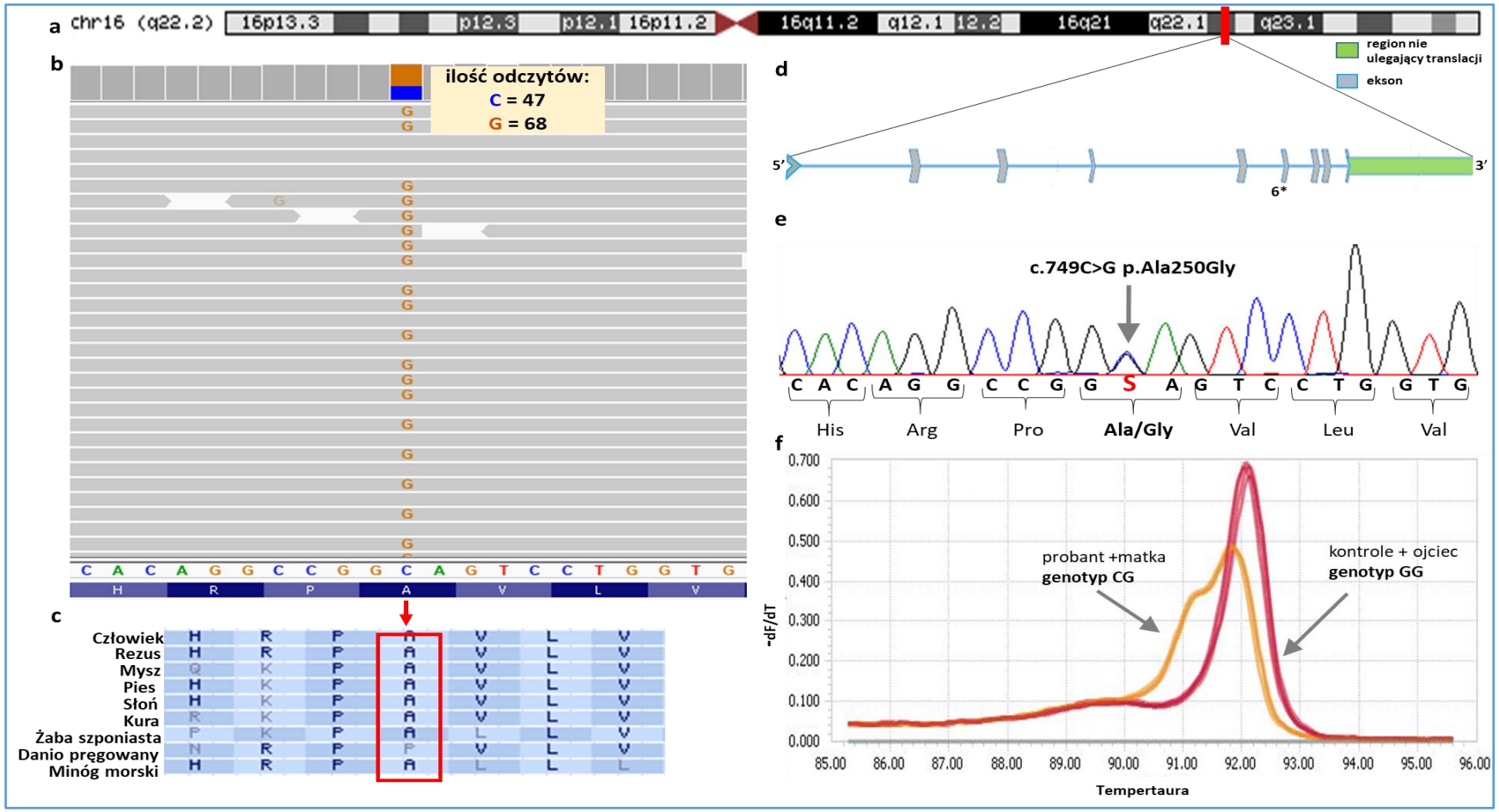
Pacjentką była 12-letnia dziewczynka z nsCP i hipodoncją (brak 2 zawiązków zębów stałych). W wywiadzie klinicznym stwierdzono także wadę wzroku. Dzięki przeprowadzonej analizie zidentyfikowano nową, nieopisaną dotychczas heterozygotyczną tranzycję c.1997A>G w eksonie 12 genu *NOTCH2* (OMIM *600275). Powoduje ona zamianę wysoce konserwatywnej tyrozyny na cysteinę w pozycji 666 kodowanego białka. Przeprowadzone analizy *in silico* potwierdziły patogenny wpływ badanej zmiany na strukturę białka (Tab.15). Niemal wszystkie użyte do tego celu programy bioinformatyczne (15/17) oceniły wariant jako uszkadzający „*damaging*", chorobotwórczy „*disease causing*" oraz szkodliwy „*deleterious*". Wywiad rodzinny nie potwierdził przypadków wystąpienia wady rozszczepowej u pozostałych krewnych. Opisywaną zmianę pacjentka odziedziczyła od zdrowego ojca (Tab.16). W grupie kontrolnej nie potwierdzono obecności badanego wariantu. Wyniki analiz dla wariantu c.1997A>G genu *NOTCH2* przedstawiono na **Ryc. 22**.

Przypadek nr 31

Pacjentem był 6-letni chłopiec z nsCP oraz hipodoncją (brak 1 zawiązka zębowego). W wyniku eksomowego sekwencjonowania 424 genów zidentyfikowano potencjalnie patogenny wariant w genie *DHODH* (OMIM *126064). Zmiana ta zlokalizowana w eksonie 6 to nowa heterozygotyczna transwersja cytozyny na guaninę w pozycji 749 (c.749C>G). Powoduje ona substytucję glicyny w miejsce 250 konserwatywnej alaniny (p.Ala250Gly). Zmiana została sklasyfikowana przez bazę VarSome jako wariant o niepewnym znaczeniu „*uncertain significance*", nie zidentyfikowano jej również w największej dostępnej bazie eksomów i genomów (GnomAD). Z przeprowadzonych analiz *in silico* wynika, że opisywana substytucja aminokwasowa może mieć patogenny wpływ na białko. Spośród użytych do tego celu programów, 13/17 określiło wariant jako uszkadzający „*damaging*", szkodliwy „*deleterious*" oraz chorobotwórczy „*disease causing*" (Tab.15). Wywiad rodzinny nie potwierdził występowania wad rozszczepowych u pozostałych członków rodziny. Chłopiec odziedziczył opisywany wariant od heterozygotycznej matki. Zarówno u ojca jaki i w grupie kontrolnej nie zidentyfikowano badanej zmiany. Wyniki analizy dla wariantu c.749C>G genu *DHODH* przedstawiono na **Ryc. 23**.



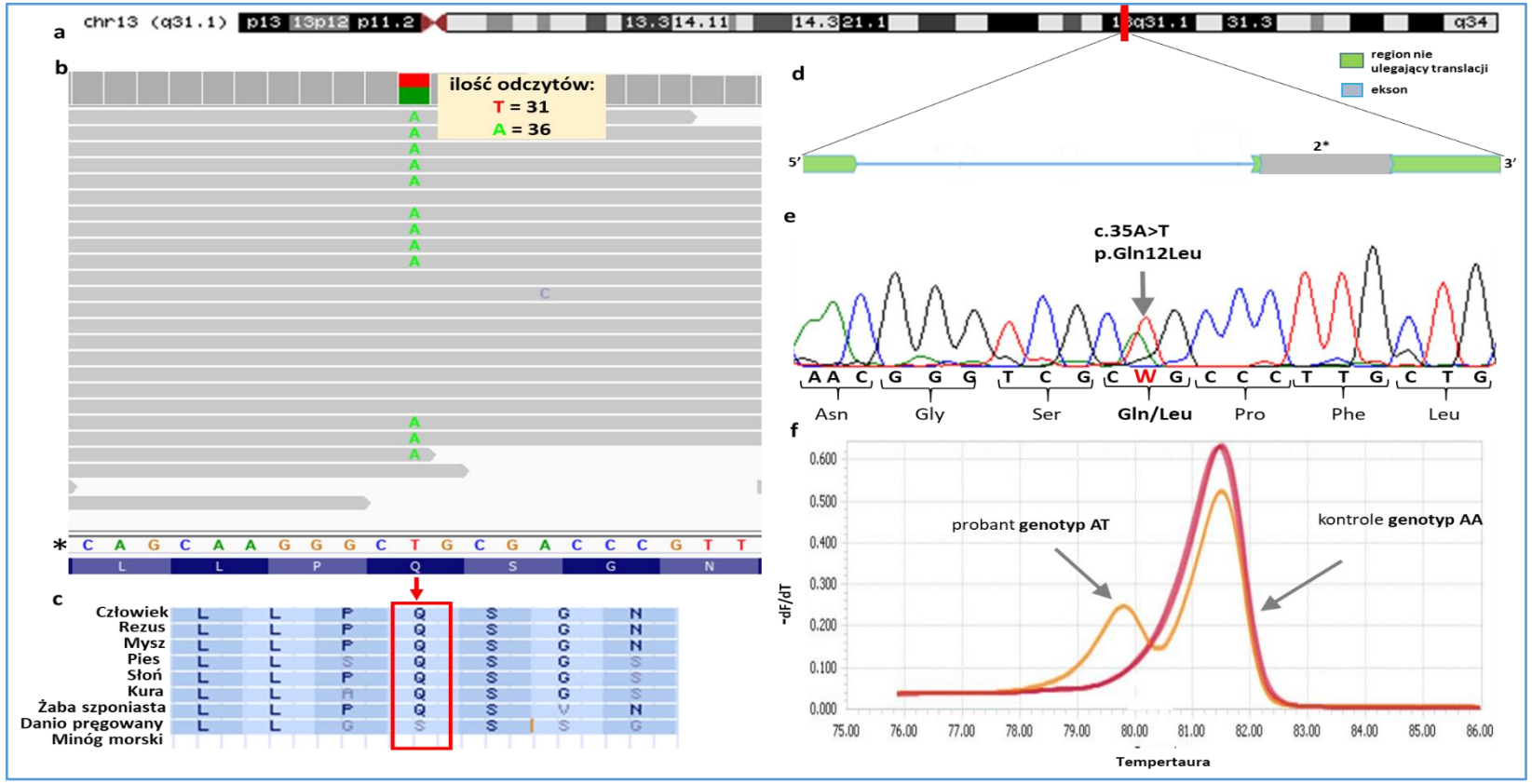
Ryc. 22 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.1997A>G → p.Tyr666Cys w genie *NOTCH2* zidentyfikowanego u pacjenta nr 30. **a)** lokalizacja genu *NOTCH2* na krótkim ramieniu chromosomu 1 (locus p12), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą,*****analiza przedstawia sekwencję nici matrycowej DNA (-), zgodnie z orientacją genu *NOTCH2* w genomie, poniżej prawidłowa sekwencja aminokwasowa **c)** tyrozyna w pozycji 666 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *NOTCH2*, ***** ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, potwierdzający obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+) **f)** analiza genotypowania metodą HRM, przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta i matki oraz brak nosicielstwa u ojca i kontroli.



Ryc. 23 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.749C>G → p.Ala250Gly w genie *DHODH* zidentyfikowanego u pacjenta nr 31. **a)** lokalizacja genu *DHODH* na długim ramieniu chromosomu 16 (locus q22.2), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą c) alanina w pozycji 250 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu DHODH, * ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, potwierdzający obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, **f)** analiza genotypowania metodą HRM, przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów. Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta i matki oraz brak nosicielstwa u ojca i kontroli.

Przypadek nr 32

W wyniku przeprowadzonych analiz u 17-letniej pacjentki z nsCP zidentyfikowano nowy potencjalnie patogenny wariant nukleotydowy zlokalizowany w eksonie 2 genu *SPRY2* (OMIM *602466). Ta heterozygotyczna transwersja c.35A>T powoduje zamianę kwasu glutaminowego na leucynę w pozycji 12 kodowanego białka (p.Gln12Leu). Wariant nie został zidentyfikowany w bazie ludzkich genomów referencyjnych (GnomAD). W bazie VarSome wariant c.35A>T uzyskał status zmiany o niepewnym znaczeniu. Programy użyte do analiz *in silico*, takie jak: MutationTaster, FATHMM-MKL, FATHMM-XF określiły wpływ substytucji p.Gln12Leu odpowiednio jako chorobotwórczy „*disease causing*" oraz niszczący „*damaging*" (Tab.15). Pozostałe programy nie potwierdziły negatywnego wpływu wariantu na produkt białkowy genu. Rozszczep u pacjentki miał charakter sporadyczny. Ze względu na brak próbek DNA od rodziców pacjentki, nie przeprowadzono genotypowania pod kątem nosicielstwa badanego wariantu. Wariantu nie zidentyfikowano w grupie kontrolnej z populacji polskiej . Wyniki analiz dla wariantu c.35A>T genu *SPRY2* przedstawiono na **Ryc. 24**.



Ryc. 24 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.35A>T → p.Gln12Leu w genie *SPRY2* zidentyfikowanego u pacjenta nr 32. **a)** lokalizacja genu *SPRY2* na długim ramieniu chromosomu 13 (locus q31.1), **b)** wynik sekwencjonowania NGS ze zidentyfikowaną zmianą,*****analiza przedstawia sekwencję nici matrycowej DNA (-), zgodnie z orientacją genu *SPRY2* w genomie; poniżej prawidłowa sekwencja aminokwasowa **c)** glutamina w pozycji 12 kodowanego białka u wybranych zwierząt (UCSC Genome Browser), **d)** schemat budowy genu *SPRY2*, ***** ekson, w którym zlokalizowany jest wariant, **e)** chromatogram DNA z analizy sekwencjonowania metodą Sangera, która potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u probanta, wynik przedstawia sekwencję nici kodującej (+), **f)** analiza genotypowania metodą HRM przedstawiająca znormalizowane piki topnienia produktów.Wynik potwierdza obecność heterozygotycznego wariantu u pacjenta oraz brak nosicielstwa u kontroli.

5. Dyskusja

5.1 Wprowadzenie

Na przestrzeni ostatnich lat wielokrotnie potwierdzano istotną rolę jaką pełnią czynniki genetyczne w etiopatogenezie izolowanych wad rozszczepowych. Grosen i wsp. sugerują, że ich udział w rozwoju nsCL/P może sięgać nawet 90% [125]. Jednak pomimo wielu badań wiedza na temat genetycznego podłoża izolowanych rozszczepów wciąż nie jest w pełni poznana. Przyczyną tego stanu rzeczy jest duża heterogenność genetyczna, a także wpływ czynników środowiskowych, które powodują, że identyfikacja czynników genetycznych zaangażowanych w etiologię izolowanych postaci rozszczepów jest niezwykle trudna. Dlatego też w przypadku izolowanych wad rozwojowych twarzy, nie udało się dotychczas opracować rutynowej diagnostyki genetycznej.

Badania GWAS stanowią doskonałe narzędzie, które pozwoliło na identyfikację wielu genów oraz chromosomowych loci, których warianty nukleotydowe istotnie częściej występują w grupie pacjentów z izolowanymi wadami rozszczepowymi. Jednak tylko w niewielkim stopniu zwiększają one ryzyko występowania tych anomalii rozwojowych, dlatego nie można ich traktować jako pewnego czynnika etiologicznego. Stoi za tym zjawisko brakującej odziedziczalności (ang. *missing heritability*), charakterystyczne dla chorób wieloczynnikowych, do których zaliczane są izolowane rozszczepy. Ponadto wiele zidentyfikowanych częstych wariantów, które zwiększają ryzyko rozszczepu jest zlokalizowanych w sekwencjach niekodujących, a ich związek z fenotypem wady rozszczepowej może wynikać ze sprzężenia z prawdziwym, jeszcze niezidentyfikowanym wariantem patogennym. Dlatego sugeruje się, że identyfikacja nowych oraz bardzo rzadkich (MAF<1%) wariantów nukleotydowych zlokalizowanych w sekwencjach kodujących genów, a więc mających bezpośredni wpływ na kodowane białko, umożliwi zidentyfikowanie nowych genetycznych czynników, które leżą u podłoża izolowanych wad rozszczepowych twarzoczaszki.

Dynamicznie rozwijające się techniki sekwencjonowania NGS stanowią doskonałe narzędzie do poszukiwania tego typu wariantów genetycznych.

5.1.1 Sekwencjonowanie panelu genowego oparte o technikę NGS

Głównym założeniem niniejszej rozprawy doktorskiej była próba wykrycia rzadkich oraz nowych, nieopisanych dotąd w piśmiennictwie naukowym wariantów oraz genów, które biorą udział w etiopatogenezie izolowanych przypadków rozszczepów wargi i podniebienia. W tym celu zaprojektowano panel składający się z pełnej eksomowej sekwencji 424 genów oraz 61 wariantów zlokalizowanych w sekwencjach niekodujących (w tym na pustyni genowej 8q24.21). Do analizy sekwencji kodującej wyselekcjonowanych genów wykorzystano technikę sekwencjonowania NGS. Zaprojektowany panel obejmował nie tylko geny, dla których związek z nsCL/P lub nsCP został już udokumentowany, ale również takie, które nie były dotychczas analizowane w kontekście izolowanych wad rozszczepowych twarzoczaszki. W selekcji tych drugich, brano pod uwagę rolę jaką pełnią kodowane przez nie białka podczas rozwoju struktur twarzowych oraz profil ich ekspresji. Analizowano także fenotyp myszy zmodyfikowanych genetycznie, u których brak lub zaburzenie funkcji produktu ekspresji danego genu prowadziło do anomalii rozwojowych twarzowej części czaszki. Ponieważ dane literaturowe coraz częściej wskazują na wspólne geny kandydackie dla izolowanych i zespołowych postaci rozszczepów, wzięto również pod uwagę geny związane z zespołami wad wrodzonych, w których CL/P lub CP jest jedną z anomalii rozwojowych [126]–[128].

Badania genetyczne przeprowadzone w ramach realizacji tej pracy doktorskiej umożliwiły identyfikację 41 potencjalnie patogennych wariantów nukleotydowych u 24% analizowanych pacjentów z nsCL/P, a także z nsCP. Wśród wykrytych wariantów genetycznych znalazły się 21 nowe zmiany, które nie zostały dotychczas opisane w piśmiennictwie naukowym.

Wszystkie potencjalnie patogenne warianty, które zidentyfikowano u pacjentów z wadą rozszczepową występowały w układzie heterozygotycznym. Większość z nich została odziedziczona od zdrowych rodziców, u których nie występowały żadne wady rozwojowe części twarzowej czaszki. Wynik ten jest tożsamy z wcześniejszymi doniesieniami naukowymi, które sugerują, że przyczyną tego stanu rzeczy może być niepełna penetracja patogennego wariantu. Na zmienną penetrację chorobotwórczych wariantów mogą wpływać dodatkowe czynniki genetyczne lub/oraz czynniki środowiskowe, których równoczesne wystąpienie z wykrytą zmianą warunkuje rozwój wady rozszczepowej. Dodatkowe czynniki genetyczne mogą być zlokalizowane

w sekwencjach regulujących proces transkrypcji genów, w których występują potencjalnie patogenne warianty nukleotydowe. Jednoczesne występowanie tych wariantów może powodować „odmaskowanie” rzeczywistego patogennego wpływu wariantów zlokalizowanych w sekwencjach kodujących, przyczyniając się do rozwoju wady rozszczepowej obserwowanej u pacjenta.

W 1992r. badacze Mitchell i Risch zaproponowali model dziedziczenia oligogenowego, w którym kilka głównych genów odgrywa znaczącą rolę w patogenezie rozszczepu u chorego, a za ostateczną manifestację fenotypu odpowiadają tzw. „geny modyfikujące” (ang. *modifier genes*) [129], [130]. Sugeruje się, że to właśnie „geny modyfikujące” mogą w znacznym stopniu wpływać na zmienną penetrację patogennych zmian.

W chwili obecnej najczęściej przyjmowana jest koncepcja modelu poligenowego, w którym w etiologii izolowanych wad rozszczepowych bierze udział wiele różnych genów oraz czynników środowiskowych, a także ich wzajemne oddziaływania. Model ten nie wyklucza również udziału czynników epigenetycznych, które mogą odgrywać ważną rolę w molekularnym podłożu tej anomalii [116], [131 - 134].

5.2 Analizy sekwencjonowania NGS w grupie pacjentów z nsCL/P

W grupie 105 pacjentów z nsCL/P zidentyfikowano 27 potencjalnie patogennych zmian, w tym 14 nowych oraz 13 bardzo rzadkich wariantów (MAF<0.01).

Dla grupy 25 genów, w których wykryto potencjalnie patogenne warianty przeprowadzono analizę nadreprezentacji ORA. Wykazała ona, że w grupie genów dla nsCL/P najistotniej „nadreprezentowane” procesy biologiczne dotyczyły rozwoju morfogenetycznego organizmu, czyli m.in. organogenezy oraz rozwoju embriologicznego tkanek, w tym tkanki mięśniowej. Elementem strukturalnym wyrostków twarzowych, które są zalążkami dla rozwijającej się twarzy jest tkanka mezenchematyczna, stanowiąca również tkankę zarodkową dla wszystkich tkanek łącznych (w tym tkanki kostnej i mięśniowej). Biorąc pod uwagę ten fakt, wyniki przedstawianej analizy wpisują się w przyjęte wcześniej założenia, które przy poszukiwaniu patogennych zmian genetyczny dla wad rozwojowych twarzoczaszki, skupiały się na genach zaangażowanych przede wszystkim w rozwój embrionalny organizmu.

W przypadku funkcji molekularnych najistotniej „nadreprezentowaną” okazała się być funkcja polegająca na uczestnictwie białka kodowanego przez dany gen w tworzeniu macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM ang. *extracellular matrix*), która zapewnia wytrzymałość i elastyczność tkanki nabłonkowej. W tej grupie znalazły się geny kodujące różne typy kolagenów, w których zidentyfikowano w sumie 4 potencjalnie patogenne warianty u chorych z nsCL/P.

Przypadek nr 1

Zaburzenia w strukturze różnych typów kolagenów są często wymieniane jako jedna z przyczyn wrodzonych wad rozwojowych, w tym anomalii rozwojowych twarzy [135–139]. Dlatego też bardzo ciekawą zmianą zidentyfikowaną dzięki analizom sekwencjonowania jest niezwykle rzadki wariant genu *COL17A1* (rs121912769, c.3676C>T, p.Arg1226*), który został wykryty u pacjenta z nsCLP. Gen *COL17A1* koduje kolagen typu XVII. Białko to należy do grupy kolagenów transbłonowych, w których część domeny przechodzi przez warstwę fosfolipidową błony, a N – koniec łańcucha polipeptydowego jest zatopiony wewnątrz komórki. Kodowane białko jest homotrimerem składającym się z 3 łańcuchów alfa-1 (XVII), każdy o masie cząsteczkowej 180 kDa. Gen *COL17A1* ulega silnej ekspresji w keratynocytach, umożliwiając interakcje pomiędzy komórkami nabłonka a macierzą zewnątrzkomórkową. Kolagen typu XVII pełni funkcję strukturalną hemidesmosomów odpowiedzialnych za utrzymanie adhezji komórek nabłonkowych do błony podstawnej (m.in w komórkach nabłonkowych błony śluzowej, spojówki, rogówki, górnej części przełyku oraz w komórkach nabłonka przejściowego pęcherza moczowego). Oprócz funkcji adhezyjnych, kolagen typu XVII utrzymuje polaryzację komórek i pełni ważną rolę w migracji macierzystych komórek pęcherzykowych [140].

Intersującym jest fakt, że patogenne warianty zlokalizowane w genie *COL17A1* są opisywane jako jedna z przyczyn pęcherzowego oddzielania się naskórka. Jest to heterogenna grupa zaburzeń, której patomechanizm polega na braku lub zaburzeniu funkcji jednego z białek adhezyjnych: lamininy-332, kolagenu typu XVII, integryny α6β4 lub integryny α3. W efekcie tych nieprawidłowości komórki nabłonkowe oddzielają się od błony podstawnej przy najmniejszym urazie mechanicznym, prowadząc do powstawania bolesnych ran i pęcherzy [141], [142].

Wykryty w prezentowanej pracy heterozygotyczny wariant typu *nonsense* p.Arg1226* został zarejestrowany w bazie ClinVar jako przyczyna ciężkiej postaci

pęcherzowego oddzielania się naskórka, tzw. postaci łączącej JEB typu *non-Herlitz* (ang. *Junctional Epidermolysis Bullosa, non-Herlitz type,* OMIM #226650) o autosomalnie recesywnym modelu dziedziczenia [143 – 145].

Biorąc pod uwagę, że jednym z wymienianych patomechanizmów wad rozszczepowych twarzoczaszki jest zaburzona adhezja komórek nabłonkowych, patogenny wariant c.3676C>T (p.Arg1226*) genu *COL17A1* przedstawia się szczególnie interesująco w kontekście jego możliwego wpływu na rozwój wady rozszczepowej.

Nie udowodniono do tej pory bezpośredniej roli jaką może pełnić produkt ekspresji genu *COL17A1* na rozwój twarzowej części czaszki. Jednakże wyniki analizy GWAS przeprowadzone przez Liu i wsp. w grupie dziesięciu tysięcy osób z populacji europejskiej sugerują, że warianty nukleotydowe zlokalizowane w *COL17A1* mogą mieć wpływ na budowę morfologiczną twarzy. Swoje przypuszczenie poparli tym, że wyniki dla wariantów nukleotydowych w *COL17A1* osiągnęły istotność genomową, co sugerowało ich silną asocjację z kształtem twarzy. Najistotniejszy wynik uzyskano dla wariantu zmiany sensu (rs805722, c.2107A>G, p.Met703Val, wartość $p = 3.97E^{-08}$) zlokalizowanego w eksonie 27 genu *COL17A1*. W swoich analizach zespół Liu i wsp. dowodzą, że wariant ten determinuje odległości między gałką oczną a szwem czołowo-nosowym [146].

Powyższe dane mogą wskazywać, że zidentyfikowana zmiana typu *nonsense* w genie *COL17A1* (rs121912769) ma prawdopodobny wpływ na etiologię wady rozszczepowej u badanego pacjenta. Wykryty wariant jest zlokalizowany w sekwencji kodującej funkcjonalny, potrójnie helikalny motyw białka, w którym wg bazy VarSome opisano dotychczas już 39 wariantów, w tym 17 wariantów patogennych. Zidentyfikowana tranzycja c.3676C>T powoduje przedwczesną terminację translacji (p. Arg1226*), która prowadzi do powstania łańcucha polipeptydowego skróconego o 271 reszt aminokwasowych. Można zatem przypuszczać, że ta heterozygotyczna substytucja nukleotydowa ma potencjalnie negatywny wpływ na strukturę i funkcję kodowanego białka. Spośród 7 programów bioinformatycznych wykorzystanych do przeprowadzenia analizy *in silico*, 4 oceniły wpływ badanej zmiany jako negatywny opisując go jako „patogenny", „uszkadzający" czy też „chorobotwórczy". O patogenności wariantu świadczy również fakt, że nie zidentyfikowano go u zdrowych rodziców pacjenta oraz w grupie kontroli z populacji polskiej.

Przypadek nr 2

Przeprowadzona analiza wielogenowego panelu umożliwiła zidentyfikowanie rzadkiej, niesynonimicznej zmiany u 3-letniej dziewczynki z nsCLP. Wykryty wariant to heterozygotyczna tranzycja c.905T>C zlokalizowana w eksonie 7 genu *IRF6*. Ta substytucja nukleotydowa powoduje zamianę wysoce konserwatywnej leucyny na prolinę w pozycji 302 kodowanego białka (p.Leu302Pro). Wynik ten przedstawia się niezwykle ciekawie, bowiem warianty nukleotydowe zlokalizowane w genie *IRF6* są uważane za jedne z głównych molekularnych przyczyn izolowanych wad rozszczepowych [58], [62], [147].

Wykryty wariant c.905T>C genu *IRF6* nie został zarejestrowany w bazie populacyjnej GnamAD ani bazie w VarSome oraz ClinVar. Jednakże w bazie HGMD wariant otrzymał status zmiany patogennej (CM092352), związanej z etiologią zespołu Van der Wouda. Jest to najczęstsza zespołowa postać wad rozszczepowych twarzy, o autosomalnie dominującym sposobie dziedziczenia [34]. U pacjentki nie stwierdzono jednak cech klinicznych wskazujących na występowanie u niej tego zespołu. Analizowaną zmianę odziedziczyła od chorego ojca z nsCLP, u którego badany wariant występuje także w układzie heterozygotycznym, co jest silnym argumentem przemawiającym za jego patogennością. Wywiad rodzinny wykazał występowanie wad rozszczepowych również u rodzeństwa oraz u dziadka od strony ojca. Jednakże z powodu braku materiału genetycznego, nie zweryfikowano obecności badanego wariantu u tych krewnych probantki, co pozwoliłaby potwierdzić chorobotwórczy charakter zmiany.

Przypadek nr 3

Kolejnym genem dla kolagenu, w którym zidentyfikowano potencjalnie patogenny wariant jest gen *COL8A1*. Heterozygotyczny wariant c.1463C>T zmiany sensu został zidentyfikowany u 8 letniej pacjentki z nsCL. Analizy GWAS wykonane dla wady rozszczepowej wykazały, że chromosomowe locus, w obrębie którego jest zlokalizowany gen *COL8A1*, wykazuje istotny związek ze zwiększonym ryzykiem nsCL/P. Warianty nukleotydowe, dla których uzyskano wyniki o najwyższej istotności statystycznej zidentyfikowano w sekwencjach intronowych zarówno genu *COL8A1* jak i genu *FILIP1L* [137].

Patogenny wpływ zmiany wykrytej w genie *COL8A1* (c.1463C>T, p.Pro488Leu) potwierdziło 14 programów użytych do analizy *in silico,* co świadczy o negatywnym wpływie substytucji p.Pro488Leu na strukturę i funkcję białka.

Informacji o wykrytym wariancie nie odnotowano w bazie ClinVar, ale został on zarejestrowany w katalogu mutacji somatycznych występujących w nowotworach COSMIC (ang. *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*). Zidentyfikowano go w tkance nowotworowej pochodzącej z rejonów głowy i szyi, co wpisuje się w liczne doniesienia na temat związku izolowanych rozszczepów twarzoczaszki z procesem nowotworzenia. Znaczenie kliniczne wykrytego wariantu pozostaje jednak nieznane.

Wyniki czternastu programów użytych do analizy *in silico* potwierdziły patogenny charakter zmiany. Przeprowadzone analizy genotypowania pod kątem obecności tranzycji c.1463C>T u zdrowych rodziców pacjentki, wykazały że odziedziczyła ona badany wariant genu *COL8A1* od swojej matki. Biorąc jednak pod uwagę możliwą niepełną penetrację patogennego wariantu, nie można wykluczyć korelacji wykrytej zmiany z wystąpieniem wady rozszczepowej u pacjentki.

Przypadek nr 4

Przeprowadzone analizy pozwoliły zidentyfikować u pacjenta z nsCL znany, heterozygotyczny wariant genu *CDH7* (rs1563644113, c.4033C>T, p.Arg1345Cys.). Gen ten zaliczany jest do tzw. „genów epigenetycznych", których zaburzenia mogą powodować liczne wady rozwojowe. *CDH7* koduje chromodomenę helikazy wiążącej DNA typu 7. Białko to bierze udział w procesie remodelingu chromatyny umożliwiając dostępność DNA dla różnych czynników transkrypcyjnych. Białko CHD7 wraz z białkiem SOX2 regulują wspólnie ekspresję wielu genów, w tym *SHH* oraz genów z rodziny *NOTCH*, które związane są ze szlakami sygnałowymi biorącymi udział w rozwoju morfogenetycznym [148]. Ponadto fenotyp myszy z inaktywowanym genem *Cdh7* (*Chd7*$^{-/-}$) charakteryzuje się licznymi nieprawidłowościami w rozwoju twarzoczaszki, w tym rozszczepem podniebienia.

Badania funkcjonalne wykazały, że białka Cdh7 oraz Sox9 mogą brać udział w aktywacji znanych protoonkogenów jak *N-ras* oraz genu dla czynnika transkrypcyjnego Mycn [149 – 151], co może potwierdzać związek izolowanych wad rozwojowych twarzoczaszki ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na choroby nowotworowe. Dane literaturowe wskazują, że patogenne warianty w *CHD7,* a w szczególności te powstałe *de novo,* są bezpośrednią przyczyną zespołu CHARGE (OMIM #214800). Spośród licznych wad rozwojowych obserwowanych u pacjentów z tym zespołem występują coloboma, wady serca, atrezja nozdrzy, opóźnione wzrastanie, niedorozwój układu moczowo-płciowego, a także rozszczep wargi [152], [153].

Prezentowana substytucja nukleotydowa c.4033C>T genu *CDH7* została już wcześniej zidentyfikowana w zespole CHARGE. W bazie ClinVar wariant został zrejestrowany jako zmiana o patogennym charakterze, jednak dowody na jego bezpośredni udział w rozwoju tej asocjacji są niewystarczające. Dane literaturowe sugerują, że do weryfikacji jego rzeczywistego patogennego wpływu niezbędne jest przeprowadzenie badań funkcjonalnych [154], [155]. Wykryta tranzycja c.4033C>T jest zlokalizowana w sekwencji kodującej funkcjonalną domenę C-końcową o aktywności katalitycznej helikazy, co może sugerować jej negatywny wpływ na funkcję kodowanego białka. Fakt, że wszystkie zastosowane programy do analizy *in silico* oraz bazy danych określiły zamianę jako patogenną, potwierdza przypuszczenia o jej chorobotwórczym charakterze.

Wariantu c.4033C>T genu *CDH7* nie zidentyfikowano u zdrowej matki pacjenta. Braku materiału genetycznego od ojca uniemożliwił ustalenie czy jest to zmiana powstała *de novo*, co wzmocniłoby przypuszczenia o jej możliwej roli w molekularnym podłożu wady rozszczepowej.

Przypadek nr 5

Wykryta u pacjentki z nsCLP rzadka tranzycja w genie *BMPR1A* (rs587781332, c.1216C>T, p.Arg406Cys) jest zarejestrowana w bazie ClinVar jako wariant o nieokreślonym znaczeniu klinicznym „*uncertain significance*". Niemniej jednak zmiana ta została już wcześniej zidentyfikowana u kilku chorych z polipowatością młodzieńczą (JPS - ang. *juvenile polyposis syndrome*,OMIM #174900), dziedziczoną autosomalnie dominująco. Choroba ta powoduje powstawanie polipów hamartomatycznych w przewodzie pokarmowym, które znacznie zwiększają ryzyko transformacji nowotworowej jelita grubego [156 – 159]. Gen *BMPR1A* koduje receptor dla białek morfogenetycznych kości BMP (ang. *Bone Morphogenetic Protein*), które regulują proces powstawania m.in. tkanki kostnej, podziały komórkowe, apoptozę i migrację komórek. Białka BMP należą do licznej rodziny TGF-β, a ich rola w rozwoju twarzoczaszki była wielokrotnie potwierdzana. W badaniach funkcjonalnych wykazano, że białka Bmp odgrywają istotną rolę w różnicowaniu się komórek cNCC, fuzji wyrostków podniebiennych, a w późniejszym etapie rozwoju biorą także udział w procesie osteogenezy, w tym w rozwoju twarzoczaszki, podniebienia i zawiązków zębowych [160]. W rozwijających się mysich zarodkach, gen *Bmpr1a* ulega silnej ekspresji w całej twarzoczaszce [161], a jego inaktywacja w tkance mezenchymalnej

i nabłonkowej podniebienia jest przyczyną zmniejszenia ekspresji genów *Msx1, Fgf10* oraz *Shh* przyczyniając się powstania rozszczepu [162].

Wobec powyższych danych możemy sugerować udział wariantu c.1216C>T genu *BMPR1A* w etiologii wady rozszczepowej u pacjentki z nsCLP. Dodatkowym argumentem świadczącym o możliwie znaczącym wpływie substytucji p.Arg406Cys na funkcję kodowanego białka jest fakt, że jej patogenność została potwierdzona przez 16 programów bioinformatycznych użytych do analizy *in silico*.

Identyfikacja potencjalnie patogennego wariantu genu *BMPR1A* u pacjentki z nsCLP ponownie zwraca uwagę na istotny związek wad rozszczepowych z procesem nowotworzenia.

Przypadek nr 6

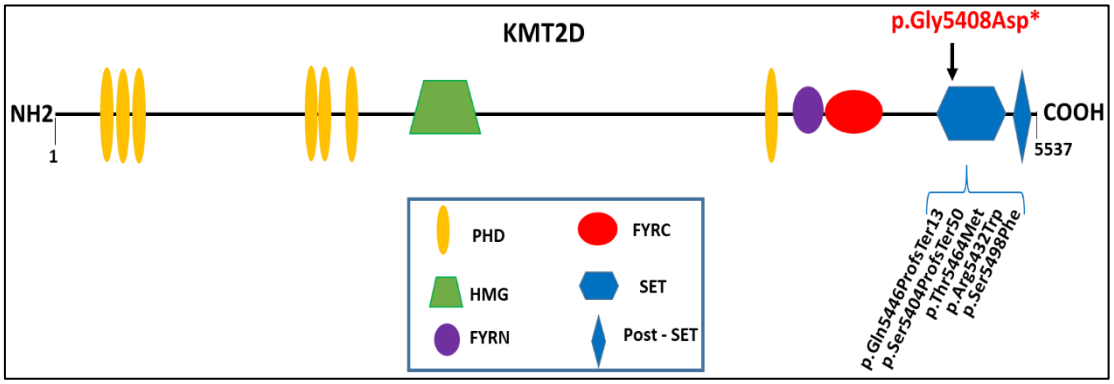
Przypuszcza się, że jednym z istotnych modyfikatorów mających wpływ na rozwój anomalii twarzowej części czaszki są czynniki epigenetyczne [133], [134].Wykazano, że patogenne warianty zlokalizowane w genach, których produkty białkowe są zaangażowane w potranslacyjne modyfikacje histonów czy też przebudowę nukleosomów są przyczyną licznych wad rozwojowych, w tym wad rozwojowych twarzy [148], [163].

Dlatego też szczególnie intersującym wariantem zidentyfikowanym w ramach niniejszej pracy jest nowa zmiana genu *KMT2D* (wariant *de novo,* p.Gly5408Asp, c.16223G>A) wykryta u pacjentki z nsCL. Gen *KMT2D* (nazywany również *MLL2*) koduje białko należące do rodziny metylotransferaz histonowych SET1, które indukują aktywną konformację chromatyny przez mono i dimetylację lizyny w pozycji 4 w obrębie histonu H3 (H3K4)[164].

Patogenne warianty genu *KMT2D* uważane są za jedną z przyczyn zespołu Kabuki (OMIM #147920). Jest to rzadki zespół wad wrodzonych powodujący liczne anomalie rozwojowe twarzoczaszki, który charakteryzuje się hipoplazją twarzy, zapadniętym koniuszkiem nosa, CL/P lub wysoko wysklepionym (gotyckim) podniebieniem. U pacjentów z zespołem Kabuki obserwuje się również wywinięcie powieki dolnej, łukowate brwi, wydłużone szpary powiekowe i wydatne dysplastyczne uszy. Często występują także anomalie zębów takie jak hipodoncja, mikrodoncja oraz zmiany w ich morfologii. Oprócz dysmorfii twarzoczaszki, znamienne jest współwystępowanie wrodzonych wad serca, niskorosłość oraz często występująca niepełnosprawność intelektualna [165 – 167].

Modele zwierzęce dla zespołu Kabuki potwierdzają funkcjonalne znaczenie patogennych wariantów w genie *KMT2D*, a w szczególności ich wpływ na zaburzenia rozwoju twarzoczaszki. *Knock-out* genu *kmt2d* w modelu Danio pręgowanego (*Danio rerio*) powoduje hipoplazję łuków skrzelowych (obszary analogiczne do ludzkich, z których rozwijają się struktury twarzoczaszki) oraz deformacje struktur chrzęstnych. Wykazano ponadto, że obniżenie ekspresji genu *kmt2d* po zastosowaniu antysensownego oligonukleotydu morfolino podczas rozwoju embrionalnego jest przyczyną licznych deformacji twarzoczaszki i chrząstek u żaby szponiastej. Z kolei całkowity *knock - out* genu *Kmt2d* u homozygotycznych myszy jest letalny już na wczesnym etapie zarodkowym [168 – 171].

Zidentyfikowany w badaniach własnych wariant genu *KMT2D* jest zlokalizowany w sekwencji kodującej katalityczną domenę SET, która zapewnia aktywność enzymatyczną białka. Dlatego można przypuszczać, że obecność tej substytucji aminokwasowej, polegającej na zamianie niepolarnego aminokwasu jakim jest glicyna na polarną cząsteczkę kwasu asparaginowego, ma negatywny wpływ na funkcjonalność białka KMT2D. Patogenność wykrytej zmiany została także potwierdzona przez 15 programów bioinformatycznych zastosowanych do analiz *in silico.*



Ryc. 25 Budowa białka KMT2D. Legenda przedstawia główne domeny białka. Strzałką zaznaczono zidentyfikowany wariant nukleotydowy zlokalizowany w domenie SET. Wyszczególniono również najważniejsze patogenne warianty nukleotydowe zidentyfikowane w tym rejonie u pacjentów z zespołem Kabuki. Opracowanie własne na postawie danych z bazy VarSome.

Dodatkowym argumentem potwierdzającym możliwy związek wariantu c.16223G>A genu *KMT2D* z obserwowanym u pacjenta fenotypem jest fakt, że nie zidentyfikowano tej tranzycji u zdrowych rodziców probanta oraz u żadnej z analizowanych kontroli z populacji polskiej, a także w populacji kontrolnej bazy danych GnomAD.

Przypadek nr 7

Ciekawie przedstawia się wynik sekwencjonowania pacjenta z nsCLP, u którego zidentyfikowano nową heterozygotyczną zmianę typu *nonsense* w genie *MAML1* (ang. *Mastermind-like 1*). Substytucja c.193C>T powoduje przedwczesną terminację translacji w pozycji 65 glutaminy i w konsekwencji powstanie skróconego łańcucha polipeptydowego (p.Gln65*). Warianty wprowadzające kodon stop zaliczane są do zmian, które szczególnie negatywnie wpływają na strukturę i funkcję kodowanego białka. Patogenny charakter wariantu potwierdziły 3 zastosowane programy bioinformatyczne. Wykluczono także obecność wariantu u zdrowych rodziców pacjenta, co wzmacnia przypuszczenia o jego negatywnym wpływie na produkt ekspresji genu *MAML1*.

Badania wskazują, że białko kodowane przez *MAML1* jest jednym z kluczowych koaktywatorów transkrypcji dla szlaku sygnalizującego JAG2-NOTCH1, a także Wnt/*β*-katenina [172], które biorą udział w rozwoju embrionalnym twarzoczaszki. Sugeruję się, że *MAML1* wzmacnia także transkrypcję genu *RUNX2*, odgrywając w ten sposób znaczącą rolę podczas rozwoju kości [173]. Produkt białkowy genu *MAML1* uważany jest także, za jeden z głównych regulatorów szlaku Sonic Hedgehog. Myszy z homozygotycznym *knock-outem* genu (*Maml1*$^{-/-}$) wykazują znaczną dystrofię mięśni i giną zaraz po urodzeniu [174].

Silną koekspresję genów *MAML1* oraz genu *TWIST1* zaobserwowano w komórkach raka płaskonabłonkowego głowy i szyi (HNSCC – ang. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) sugerując, że zaburzenia w funkcjonowaniu kodowanych przez nie białek może promować onkogenezę tego typu nowotworów [175], [176]. Wzajemna regulacja ekspresji genów *MAML1* oraz *TWIST1*, może wskazywać także na udział genu *MAML1* w etiologii wad rozszczepowych. Gen *TWIST1* koduje bowiem czynnik transkrypcyjny biorący udział w rozwoju żuchwy i podniebienia. Ulega on silnej ekspresji w komórkach mezenchymy w okolicach twarzoczaszki. Patogenne warianty w genie *TWIST1* są jedną z najczęstszych przyczyn zespołu Saethre-Chotzena (OMIM #101400) należącego do kraniosynostoz. Zespół ten charakteryzuje się m.in. hipoplazją twarzoczaszki, gotyckim podniebieniem występującym u 43% chorych lub rozszczepem podniebienia, który stwierdza się u 6% pacjentów. Całkowity *knock - out* genu *Twist1* jest letalny dla mysich zarodków już na wczesnym etapie rozwoju (E11.5), natomiast jego warunkowy *knock - out* w komórkach cNCC prowadzi do hipoplazji żuchwy, rozszczepu

podniebienia oraz agenezji kości czołowej i szczękowej u myszy. Badania funkcjonalne na mysim modelu wskazują, że gen *Twst1* wpływa także na ekspresję genu *Irf6*. Sugeruje się, że interakcja z *IRF6* może świadczyć o prawdopodobnym udziale genu *TWIST1* w rozwoju anomalii rozwojowych twarzoczaszki u człowieka [173].

Powyższe dane mogą wskazywać na zawiązek zidentyfikowanego wariantu w genie *MAML1* z rozwojem nsCLP u prezentowanego pacjenta. Należy jednak rozważyć możliwość oligo- lub poligenowego modelu dziedziczenia, w którym do manifestacji fenotypu konieczne jest równoczesne pojawienie się patogennych wariantów w kilku lub wielu genach głównych, na których ekspresję mogą wpływać dodatkowo różne modyfikatory genetyczne. Model ten sugeruje ponadto, że modyfikatory genetyczne i ich episatatyczne interakcje z głównymi genami odpowiadają za zmienną penetrację patogennych wariantów, zwiększając lub hamując ekspresję głównych genów, wpływając w ten sposób na manifestację rozszczepu [129], [177].

Przypadek nr 8

Przeprowadzona w ramach niniejszej pracy analiza wielogenowego panelu w oparciu o technikę NGS umożliwiła zidentyfikowanie nowej, heterozygotycznej delecji w genie *ARHGAP29* (c.1060_1061delCT, p.Leu354ValfsTer33). Zmianę tę wykryto u pacjenta z obustronnym całkowitym nsCLP.

ARHGAP29 jest zlokalizowany w znanym locus (1p22.1) dla izolowanych wad rozszczepowych, które zidentyfikowano głównie dzięki analizom GWAS [178–181]. Gen ten koduje aktywator GTPaz z rodziny Rho 29. Białka należące do tej rodziny są zaangażowane w regulację wielu ważnych procesów m.in. zmianę kształtu komórek oraz ich proliferację, a także rearanżację jej cytoszkieletu. Wszystkie te procesy są niezwykle istotne podczas rozwoju embrionalnego twarzoczaszki [22]. Białka z rodziny Rho są również efektorami wielu szlaków sygnałowych krytycznych dla rozwoju struktur twarzowych takich jak szlak Wnt/β-katenina (Wnt5a,Wnt9b) oraz TGF-β [98], [182]. Pierwszym doniesieniem naukowym wskazującym, że gen *ARHGAP29* może odgrywać istotną rolę w etiopatogenezie wad rozszczepowych była praca Bueno i wsp. Wykazano w niej, że poziom ekspresji genu *ARHAGP29* w komórkach macierzystych miazgi zęba pochodzących od pacjentów z nsCL/P jest 3-krotnie niższy niż w przypadku komórek pochodzących od osób zdrowych [183].

Leslie i wsp. jako jedni z pierwszych potwierdzili, że gen *ARHGAP29* może być genem kandydackim dla izolowanych wad rozszczepowych. Wykorzystując mysie

zarodki wykazali oni, że gen *Arhgap29* ulega silnej ekspresji podczas rozwoju struktur twarzoczaszki. Szczególnie wysoki poziom białka Arhgap29 był obserwowany w komórkach nabłonkowych i mezenchymalnych wyrostków nosowych, a także w wyrostkach żuchwowych i szczękowych.. W swoich badaniach sekwencjonowali oni także wybrane eksony genu *ARHGAP29* w grupie 972 pacjentów z nsCL/P pochodzących z populacji filipińskiej oraz amerykańskiej. Wykonane analizy pozwoliły na identyfikację 8 nowych patogennych wariantów zmiany sensu. Jedną z tych zmian była heterozygotyczna dwunukleotydowa delecja wykryta u pacjenta z nsCLP. Prowadziła ona do zmiany 20 aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym i w konsekwencji do powstania przedwczesnego kodonu stop (NM_004815.3, c.62_63delCT, p.Ser21Yfs*20) [184]. Co ciekawe, ta sama delecja została również zidentyfikowana u zdrowego rodzeństwa probanta. Lesie i wsp. wykryli także u jednego z pacjentów z nsCLP wariant typu *nonsense* (NM_004815.3, c.976A>T, p.Lys326*). Transwersja ta została odziedziczona od zdrowej matki, u której nie występowały żadne wady rozwojowe. Żaden z 8 wykrytych patogennych wariantów genu *ARHGAP29* nie został zidentyfikowany w grupie kontrolnej liczącej 962 zdrowe osoby [184].

Kolejne analizy sekwencjonowania genu *ARGHGAP29* przeprowadzane w różnych populacjach, zdawały się potwierdzać znaczącą rolę jaką może on odgrywać w etiologii wad rozwojowych [180], [184 – 186].

Zidentyfikowana w ramach niniejszej pracy nowa delecja genu *ARHGAP29* (c.1060_1061delCT, p.Leu354ValfsTer33), to zmiana zaliczana do wariantów utraty funkcji (ang. *loss-of-function*), które są uważane za warianty o potencjalnie najbardziej negatywnym wpływie na białko. O patogenności wykrytej delecji świadczy fakt, że powoduje ona przesunięcie ramki odczytu i przedwczesną terminację translacji prowadząc do powstania krótszego łańcucha polipeptydowego, co w istotny sposób może oddziaływać na strukturę i funkcję kodowanego białka.

Wykryta delecja została odziedziczona od zdrowej matki, co jest spójne z wieloma opublikowanymi analizami. Nosicielstwo patogennego wariantu u zdrowego członka rodziny jest zjawiskiem częstym w przypadku rzadkich wariantów nukleotydowych. Być może przyczyną wystąpienia wady są interakcje z innymi, częstymi wariantami lub/oraz współwystępującymi czynnikami środowiskowymi [184], dlatego nie można wykluczyć wpływu wykrytej delecji na fenotyp pacjenta. Za patogennością zmiany może świadczyć także fakt, że nie została ona wykryta w grupie

kontroli z populacji polskiej oraz nie figuruje w bazie populacyjnej GnomAD, która zawiera sekwencje genomów referencyjnych zdrowej populacji.

Przypadki nr 9, 15 oraz 25

Równie ciekawie przedstawiają się wyniki analiz sekwencjonowania genów *PLEKHA5* oraz *ESRP2*. Potencjalnie patogenne warianty zlokalizowane w tych genach zidentyfikowano w sumie u 3 pacjentów.

Geny *PLEKHA5* oraz *ESRP2* kodują białka składające się na kompleks E-kadheryna/β-katenina regulujący proces adhezji komórek nabłonkowych. W jego skład wchodzi katenina P120Ctn - kodowana przez gen *CTNND1* - będąca białkiem cytoplazmatycznym i głównym trzonem kompleksu oraz białka kodowane przez geny *PLEKHA7*, *PLEKHA5*, a także *ESRP2*. Podczas rozwoju embrionalnego geny te ulegają ekspresji wyłącznie w nabłonku jamy ustnej i podniebienia [187].

Z przeprowadzonych przez Cox i wsp. badań na mysich modelach wynika, że zaburzenia funkcjonowania powyższego kompleksu mogą być jednym z głównych patomechanizmów powstawania izolowanych wad rozszczepowych [187]. Obserwację tę poparły przeprowadzone przez nich analizy sekwencjonowania, dzięki którym zidentyfikowali m.in. patogenny wariant genu *PLEKHA5* (c.1769A>G, p.Tyr590Cys) w rodzinie obciążonej izolowaną wadą rozszczepową. Wykryta przez zespół Cox i wsp. tranzycja c.1769A>G u pacjenta z nsCLP powstała *de novo*. Potwierdzono także segregację wariantu z anomalią rozwojową w rodzinie pacjenta, w której trójka jego dzieci miała rozszczep, co świadczy o chorobotwórczym charakterze zmiany. W analizie przeprowadzonej przez ten zespół badawczy zidentyfikowano również potencjalnie patogenny wariant typu *nonsense* p.Arg520* w genie *ESRP2*. Zmianę wykryto u pacjenta z nsCLP, który odziedziczył ją od zdrowego ojca [187].

W badania przeprowadzonych w ramach realizacji niniejszej pracy potwierdzono obecność 2 potencjalnie patogennych wariantów genu *ESRP2*, w tym nową transwersję c.697G>T (p.Glu233*) u pacjenta z nsCLP (przyp. nr 9) oraz bardzo rzadką tranzycję c.1058G>A (rs201908706, p.Arg353Gln) u pacjentki nsCL (przyp. nr 25). Gen *ESPR2* ulega silnej ekspresji w twarzoczaszce podczas rozwoju embrionalnego. Produktem białkowym genu jest regulator procesu splicingu, który wiąże się bezpośrednio mRNA w komórkach nabłonkowych. Kodowane białko odgrywa ważną rolę w splicingu m.in. transkryptów CD44, CTNND1, ENAH, które ulegają modyfikacji w tzw. przejściu EMT. Proces ten jest kluczowy podczas łączenia się wyrostków podniebiennych w czasie

rozwoju embrionalnym. *ESPR2* wpływa także na ekspresję genu *FGFR2*, który był wielokrotnie wiązany z patogenezą rozszczepów [187].

Zidentyfikowane warianty genu *ESPR2* nie zostały zarejestrowane w bazach danych dedykowanych do oceny ich wpływu na fenotyp. Wyniki przeprowadzonych analiz *in silico* wskazują jednak na patogenny charakter wykrytych zmian.

Analizy sekwencjonowania pozwoliły także na identyfikację nowej, potencjalnie patogennej tranzycji c.1172A>G w genie *PLEKHA5* u pacjenta z nsCLP (przyp. nr 15). Produktem ekspresji genu *PLEHA5* jest białko o domenie homologicznej do plekstryny A typu 5, które zapewnia stabilność wspomnianego kompleksu E-kadheryna/β-katenina [187]. Z przeprowadzonych analiz *in silico* wynika, że zidentyfikowana substytucja aminokwasowa p.Asp391Gly polegająca na zmianie wysoce konserwatywnego kwasu asparaginowego na glutaminę może mieć negatywny wpływ na strukturę i funkcję kodowanego białka. Spośród użytych programów bioinformatycznych 3 oceniły wariant jako *damaging* „uszkadzający" lub patogenny.

Biorąc pod uwagę powyższe dane można przypuszczać, że zidentyfikowane w ramach niniejszej pracy potencjalnie patogenne warianty w genach *ESRP2* (c.697G>T; c.1058G>A) oraz *PLEKHA5* (*c.1172A>G*) mogą stanowić jedną z przyczyn molekularnych występujących u pacjentów anomalii.

Przypadek nr 10

Kolejną ciekawą zmianą jest hemizygotyczna trójnukleotydowa delecja (c.1251_1253delTGT, p.Val418del) wykryta w genie *FGD1* u pacjenta z nsCL. Białko kodowane przez *FGD1* pełni rolę aktywatora GTPazy Cdc42, która bierze udział m.in. w rozwoju kości twarzoczaszki podczas embriogenezy [188]. W modelach mysich z *knock-outem* genu *Fgd1* (*Fgd1*$^{-/}$) opisywano nieprawidłową morfologię części twarzowej czaszki. Wykryta delecja dotyczy reaktywnej oraz hydrofobowej reszty waliny zlokalizowanej w konserwatywnej domenie DH (ang. *Dbl Homology*), która pełni ważną rolę w interakcji białka FGD1 z innymi białkami. Dane literaturowe wskazują, że patogenne warianty genu *FGD1* zlokalizowane w sekwencji kodującej domenę DH oraz domenę PH (ang. *Pleckstrin Homology*) są przyczyną zespołu Aarskog-Scott (OMIM #305400) [189]. Zespół ten nazywany jest także dysplazją twarzowo-genitalną. Jest to choroba o recesywnym modelu dziedziczenia sprzężonym z chromosomem X. Charakteryzuje się dysmorfią twarzy, wadami narządów płciowych, niskorosłością, hipodoncją, a także wadami kończyn takimi jak: brachydaktylia, klinodaktylia

oraz syndaktylia. W zespole Aarskog-Scott obserwowane są również rozszczep wargi oraz podniebienia [190].

Ze względu na potencjalnie patogenny charakter wykrytej delecji p.Val418del oraz istotną rolę w rozwoju twarzoczaszki jaką pełnią kodowane przez *FGD1* białko, można sugerować wpływ zidentyfikowanej zmiany na prezentowany fenotyp pacjenta.

Przypadki nr 11 oraz nr 14

Kolejną nową, nieopisaną dotychczas w piśmiennictwie naukowym zmianą jest wariant c.787C>G zlokalizowany w genie *SHH*. Ta heterozygotyczna transwersja została zidentyfikowana u pacjentki nsCLP (przyp. nr 11). Wariant ten powoduje zmianę polarności w strukturze kodowanego białka wynikającą z substytucji hydrofilowej argininy na hydrofobową glicynę (p.Arg263Gly). Taka zamiana aminokwasowa może znacząco wpływać na stabilność łańcucha polipeptydowego. Patogenność wariantu została potwierdzona przez 15 programów do analiz *in silico*, które oceniły go jako wariant uszkadzający „*damaging*" lub chorobotwórczy „*disease causing*". O patogennym charakterze zidentyfikowanej substytucji może świadczyć również fakt, że nie znaleziono jej u żadnej z przebadanych kontroli z populacji polskiej ani w bazie danych GnomAD.

Gen *SHH* koduje, które jest główną cząsteczką sygnalizacyjną w bardzo konserwatywnym ewolucyjnie szlaku Hedgehog. Białko SHH należy do silnych morfogenów biorących udział w procesie tworzenia osi ciała, różnicowania układu nerwowego, kończyn, serca, ucha wewnętrznego, mieszków włosowych oraz zębów [1]. Gen *SHH* ulega silnej ekspresji już na wczesnym etapie rozwoju twarzoczaszki umożliwiając proliferację i różnicowanie komórek grzebienia nerwowego [191]. W rozwój tych komórek jest zaangażowanych wiele białek uczestniczących w przekaźnictwie sygnałów między komórkami oraz czynników transkrypcyjnych. Sugeruje się, że wszelkie zakłócenia tego procesu na niemal każdym jego poziomie, mogą skutkować wadami rozwojowymi twarzoczaszki [192]. Komórki grzebienia nerwowego wywodzą się z komórek neuroepitelialnych. Podczas rozwoju embrionalnego migrują one w kierunku brzusznym do łuków gardłowych oraz przodomózgowia i kubka ocznego, gdzie biorą udział w procesie kształtowania się wszystkich struktur twarzowych czaszki oraz błoniastych i chrzęstnych rejonów mózgoczaszki [191]. Ich mutlipotencjalny charakter został udowodniony w badaniach przeprowadzonych *in vivo* [193]. Dowiedziono także, że kluczową rolę w powstawaniu trzewioczaszki, dając początek mezenchymie głowowej, odgrywa wyspecjalizowana subpopulacja komórek grzebienia

nerwowego tj. komórki czaszkowe grzebienia nerwowego CNCC (ang. *Cranial Neural Crest Cells*) [191]. Komórki CNCC poprzez migrację i interakcję z komórkami ekto- i endodermy, stymulują powstanie 5 wyniosłości nazywanych też wyrostkami (wyniosłość czołowo-nosowa, para wyniosłości żuchwowych oraz szczękowych) będących zawiązkami struktur twarzy. Komórki CNCC biorą ponadto udział w tworzeniu chrząstki i kości szkieletu twarzoczaszki, a także formują wszystkie inne tkanki w tych okolicach m.in. tkankę łączną, odontoblasty zębów, neurony czuciowe i komórki glejowe [191], [194].

W badaniach na mysich modelach wykazano, że podstawowym receptorem dla białka Shh jest receptor Patched 1 (Ptch1), który po związaniu z ligandem jest internalizowany i degradowany w obrębie komórki [96]. Degradacja Ptch1 prowadzi do uwolnienia i aktywacji receptoro-podobnego białka Smo (ang. *Smoothened*), które stymuluje aktywność wielu czynników transkrypcyjnych m.in. białek Gli kontrolujących ekspresję *Shh*, a także wielu innych genów docelowych uczestniczących w rozwoju organizmu [96]. U myszy pozbawionych głównego receptora Ptch1 [195] i acylotransferazy Hedgehog (Hhat) [196] oraz u myszy, u których występuje zmniejszona ekspresja efektorów kaskady sygnałowej szlaku Shh (Forhead box f2, Fofx2, Gli1) obserwuje się rozszczep wargi [191]. Z badań tych wynika także, że zburzenia aktywności czynników transkrypcyjnych regulujących szlak Shh m.in. Foxf1, Foxf2, Ostr2 może prowadzić do utraty nabłonka podniebiennego oraz zahamowania wzrostu płyt podniebiennych, co w konsekwencji prowadzi do rozszczepu podniebienia u myszy [197].

Dowiedziono, że patogenne warianty nukleotydowe zlokalizowane w genie *SHH* są odpowiedzialne za rozwój licznych wad rozwojowych. Najczęstszym złożonym zaburzeniem jest dziedziczona autosomalnie dominująco holoprozencefalia, która wynika z nieprawidłowego podziału przodomózgowia oraz charakteryzuje się licznymi malformacjami w obrębie twarzoczaszki. Holoprozencefalii towarzyszy przede wszystkim CP; jednakże przypadki CL/P też są obserwowane [198]. W zwierzęcych modelach holopozencefalii, wyciszenie genu *Gas1* (kodującego głównego agonistę *Shh*) powoduje obok mikroformy holoprozencefali również rozszczep podniebienia [199], [200].

Do tej pory gen *SHH* był brany pod uwagę głównie jako gen kandydacki dla nsCP. U pacjentów z nsCL/P zidentyfikowano jedynie kilka potencjalnie patogennych

wariantów zmiany sensu w genach kodujących cząsteczki regulujące ścieżkę sygnałową Hedgehog, takich jak *PTCH1* [201], *GLI3* [202] oraz *FOXF2* [191], [203].

Dotychczas przeprowadzono jedną znaczącą analizę, w której sekwencjonowano gen *SHH* w grupie 220 noworodków z nsCL/P w populacji południowoamerykańskiej, ale nie znaleziono wariantów nukleotydowych, które mogłyby mieć bezpośredni związek z etiopatogenezą tej formy rozszczepów [204]. Dlatego też wyniki analiz niniejszej pracy wydają się rzucać nowe i ciekawe światło na gen *SHH* sugerując, że powinien on być brany pod uwagę jako gen kandydacki dla nsCL/P.

Opisywana powyżej sygnalizacja Hedgehog, bardzo istotna z punktu widzenia rozwoju twarzoczaszki, jest regulowana przez liczne białka, w tym białka należące do rodziny transformującego czynnika wzrostu β (TGF-β)[205], [206]. Jak pokazują liczne badania przeprowadzone na przestrzeni ostatnich lat, białka z rodziny TGF-β ulegają silnej ekspresji w rozwijającym się podniebieniu u myszy i pośredniczą w proliferacji komórek mezenchymalnych oraz fuzji płyt podniebiennych [100]. W badaniach poświęconych rozwojowi twarzoczaszki wykazano, że inaktywacja genów kodujących rodzinę czynników TGF-β, w tym głównie TGF-*β3*, powodowały wady rozwojowe w obrębie twarzoczaszki, a także rozszczep podniebienia u myszy [207]. W późniejszych analizach z wykorzystaniem modeli zwierzęcych wykazano ponadto, że delecja genu *Tgf-β3* lub jego częściowa inaktywacja zmniejsza ekspresję *Pax9* i *Shh* [208], a także genu dla naskórkowego czynnika wzrostu *Egf* (ang. *Epidermal growth factor*) oraz *Msx1* [209]. Zaburzona funkcja *Tgf-β3* u myszy prowadziła również do zmniejszenia ekspresji „*downregulation*" genu *p63*, który pełni istotną rolę w różnicowaniu perydermy i reguluje proces fuzji płytek podniebiennych. U myszy białko p63 bierze także udział w aktywacji transkrypcji genów *Fgfr2* i *Irf6*, których produkty ekspresji odgrywają krytyczną rolę w rozwoju twarzoczaszki, a ich wpływ na rozwój izolowanych oraz zespołowych form rozszczepów został potwierdzony w wielu wcześniejszych analizach [210], [211].

Ponadto badania asocjacyjne przeprowadzone w licznych populacjach potwierdzają silny związek pomiędzy wariantami nukleotydowymi zlokalizowanymi w genach z rodziny *TGF-β* oraz ryzykiem nsCP i nsCL/P[119], [212–214].

Wobec powyższych doniesień, interesującym wydaje się być zidentyfikowany nowy wariant zlokalizowany w genie *SKI* (c.1280A>G, p.Gln427Arg) u pacjenta z nsCLP (przyp. nr 14). Gen *SKI* koduje białko będące jednym z represorów szlaku TGF-β poprzez

wiązanie białek SMAD, które pełnią kluczową rolę w przekazywaniu sygnału. W najważniejszych bazach danych, gromadzących informacje o wszystkich zidentyfikowanych do tej pory wariantach nukleotydowych (gnomAD, ClinVar, VarSome oraz HGMD) nie stwierdzono występowania wykrytej tranzycji. Wśród programów zastosowanych do analiz *in silico* 4 wskazały na jego patogenny oraz „chorobotwórczy" charakter.

Meta-analiza wykonana z wykorzystaniem wyników kliku badań GWAS przeprowadzonych dla wady rozszczepowej w populacjach europejskich wykazała istotny związek wariantów genu SKI z etiologią nsCL/P [28]. Ponadto sekwencjonowanie genu *SKI* przez zespół Vieira i wsp. w grupie pacjentów z izolowanymi postaciami rozszczepów, pozwoliło zidentyfikować potencjalnie patogenny wariant zmiany sensu u pacjenta z nsCLP [215].

Wobec powyższych danych, prawdopodobieństwo udziału wykrytej zmiany w etiologii nsCLP u pacjenta może być znaczące.

Przypadek nr 12 oraz nr 23

Techniki sekwencjonowania NGS pozwoliły na identyfikację nowego wariantu zlokalizowanego w genie *FGF4* (c.460G>A p.Glu154Lys) u pacjentki z nsCL (przyp. nr 12), a także rzadkiego wariantu w genie *FGFR3* (rs761163163, c.1756C>T p.Pro586Ser) u pacjenta nsCLP (przyp.nr 23). Warianty te wydały się intersujące ze względu na wiele literaturowych odniesień na temat roli jaką pełni rodzina genów kodujących ligandy oraz receptory szlaku sygnałowego FGF w morfogenezie twarzoczaszki [97], [216]. U ssaków rodzina białek FGF składa się z 23 ligandów i 7 receptorów [97]. Udowodniono m.in. jej krytyczną rolę w migracji komórek grzebienia nerwowego, które w pierwszym etapie rozwoju embrionalnego stymulują powstawanie zawiązków twarzy. Szlak sygnałowy FGF odgrywa również kluczową rolę w regulacji przemian EMT, a także w stymulacji wzrostu szkieletu, rozwoju podniebienia, gruczołów podżuchwowych i zębów [217], [218]. Badania na mysich modelach dowiodły, że inaktywacja genów *Fgf* lub genów kodujących jeden z ich receptorów powodują anomalie twarzoczaszki, w tym różnego rodzaju kraniosynostozy, wady rozwojowe żuchwy, a także CL/P [217], [219 – 221].

Analizy sekwencjonowania przeprowadzane przez różne zespoły naukowe, zdają się potwierdzać ważną rolę jaką pełni ścieżka sygnałowa FGF w etiopatogenezie wad rozszczepowych. Pozwoliły one zidentyfikować wiele potencjalnie patogennych

wariantów, zarówno w genach kodujących ligandy, jak i receptory szlaku sygnałowego FGF [221–224]. Zespół Riley i wsp. zasugerował, że zaburzenia szlaku sygnałowego FGF mogą odpowiadać za około 3-5% wszystkich obserwowanych przypadków rozszczepów twarzy a geny kodujące ligandy i receptory szlaku FGF powinny być uwzględniane przy opracowywaniu genowego panelu diagnostycznego [225].

Dlatego też wykryty w badaniach własnych nowy, nieopisany dotąd w literaturze wariant genu *FGF4* (c.460G>A p.Glu154Lys) wydaje się być szczególnie intersujący. Jego patogenny wpływ na funkcje i strukturę białka potwierdziło 13 programów bioinformatycznych zastosowanych do analizy *in silico* Co ciekawe, w badaniach przeprowadzonych przez Riley i wsp. jedyne warianty jakie zidentyfikowano w genie *FGF4* u pacjentów z wadą rozszczepową były to warianty intronowe oraz warianty zlokalizowane w sekwencjach kodujących 3' i 5' UTR [225].

Kolejną zmianą, którą wykryto w genie kodującym jedno z ważnych białek receptorowych szlaku sygnałowego FGF jest tranzycja c.1756C>T zlokalizowana w genie *FGFR3* (rs761163163, p.Pro586Ser). Wariant ten zidentyfikowano u pacjenta ze sporadycznym przypadkiem nsCLP. Co ciekawe, drugą potencjalnie patogenną zmianą, która również może mieć wpływ na obserwowany fenotyp pacjenta jest wariant genu *POLR1C* (rs371479150, c.845C>G, p.Thr282Ser). Gen koduje podjednostkę C polimerazy RNA I oraz III. Patogenne warianty *POLR1C* są opisywane jako przyczyna zespołu Treachera Collinsa (OMIM #248390). W zespole tym obok licznych malformacji twarzowej części czaszki może wystąpić również rozszczep podniebienia. Opisywana substytucja niesynonimiczna p.Thr282Ser w genie *POLR1C* została oceniona przez 9 programów bioinformatycznych jako patogenna, co wzmacnia przypuszczenia o jej negatywnym wpływie na produkt białkowy genu.

Przypadek nr 13

Wyniki przedstawianych w niniejszej pracy analiz wpisują się w dotychczasowe ustalenia na temat genu *TRSPS1*, którego warianty od niedawna są brane pod uwagę jako potencjalne czynniki genetyczne biorące udział w patomechanizmie zarówno nsCP, jak i nsCL/P [226]. Wykryty w tym genie nowy niezidentyfikowany w żadnej bazie danych wariant (c.2190G>T, p.Gln730His) został zakwalifikowany jako potencjalnie patogenny przez 3 programy do analizy *in silico*, co może sugerować jego negatywny wpływ na funkcję kodowanego białka.

Patogenne warianty zlokalizowane w tym genie są opisywane jako przyczyna

zespołu włosowo-nosowo-paliczkowego (TRPS,OMIM #190350), który objawia się znacznymi malformacjami twarzoczaszki, a także rozszczepem podniebienia. Dlatego też sugeruje się, że kodowany przez *TRPS1* czynnik transkrypcyjny może odgrywać istotną rolę w regulacji procesów wzrostu kości i chrząstek podczas rozwoju embrionalnego. [226].

W badania przeprowadzonych na modelach mysich wykazano silną ekspresję genu *Trsp1* w komórkach mezenchymalnych i nabłonkowych podniebienia podczas rozwoju embrionalnego. U myszy *Trps1*$^{-/-}$ oprócz rozszczepu podniebienia, obserwowano także hipoplazję przedniej podstawy czaszki oraz chrząstek wyrostków kłykciowych i kątowych żuchwy [226]. Sugeruje się, że ekspresja tego genu jest niezbędna do zapoczątkowania fuzji wyrostków podniebiennych, ale molekularne mechanizmy, za pomocą których *TRPS1* reguluje ekspresję genów wymaganych do zainicjowania tego procesu są niejasne [226].

Wyniki analizy sekwencjonowania eksomowego przeprowadzone przez Bureau i wsp. jako pierwsze wskazały, że *TRSP1* może być jednym z genów kandydackich dla nsCL/P. Zidentyfikowali oni kilka patogennych wariantów u pacjentów z izolowanymi wadami rozszczepowymi. U pacjenta z nsCLP pochodzącego z populacji filipińskiej stwierdzono obecność heterozygotycznego wariant genu *TRPS1* (c.1883A>G, p.Gln628Arg) zlokalizowanego w sekwencji kodującej domenę palców cynkowych. Obecność patogennej substytucji p.Gln628Arg w *TRPS1* potwierdzono również u zdrowego ojca oraz jego brata z wadą rozszczepową, co według zespółu Bureau i wsp.,potwierdza tylko złożony charakter dziedziczenia izolowanych rozszczepów [224].

W ramach badań własnych zidentyfikowano nowy wariant w genie *TRPS1* (c.2190G>T, p.Gln730His) u pacjentki z nsCLP. Wykryta transwersja jest zlokalizowana w sekwencji kodującej ważny region białka TRSP1 biorący udział w interakcjach z czynnikiem transkrypcyjnym GLI3, który odgrywa kluczową rolę podczas rozwoju twarzoczaszki. Co ciekawe, patogenne warianty genu *GLI3* zidentyfikowano u chorych z nsCL/P w populacji chińskiej sugerując, że mogą mieć one wpływ na patogenezę izolowanych wad rozszczepowych [202].

Obecność prezentowanej niesynonimicznej zmiany (c.2190G>T, p.Gln730His) w genie *TRPS1* potwierdzono również u zdrowej matki pacjenta, co jak demonstrują wyniki analiz sekwencjonowania przeprowadzone przez inne zespoły badawcze, nie musi wykluczać jej potencjalnego wpływu na postawanie wady rozszczepowej.

Biorąc po uwagę lokalizację wariantu oraz fakt, że 3 programy bioinformatyczne oceniły jego wpływ na produkt białkowy jako patogenny, można sugerować potencjalną rolę wykrytej substytucji w rozwój wady rozszczepowej u pacjenta.

Przypadek nr 16

W wyniku przeprowadzonych analiz wykryto nowy interesujący wariant c.1618A>G (p.Ile540Val) genu *TOX3* u pacjenta z nsCLP. Produkt ekspresji tego genu należy do rodziny białek o dużej ruchliwości elektroforetycznej (ang. *high mobility group box familiy memeber 3*). Białko pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego specyficznego dla Polimerazy RNA II, regulującego liczne procesy komórkowe m.in. apoptozę i różnicowanie komórek ektodermy oraz mezodermy. Najnowsze badania sugerują, że patogenne warianty liczby kopii CNVs (ang. *Copy Number Variants*) znajdujące się w chromosomowym locus 16q12.1, mogą istotnie zwiększać ryzyko wystąpienia wady rozszczepowej, a zlokalizowany w tym regionie gen *TOX3* jest jednym z genów kandydacki dla tej wady rozwojowej. Wyniki analiz wskazują bowiem, że „zmiana dawki*" TOX3* może mieć istotny na rozwój anomalii rozwojowej twarzowej części czaszki [227], [228].

Trzy programy bioinformatyczne służące do predykcji patogenności, wskazały na uszkadzający „*damaging*" wpływ opisywanej w prezentowanej pracy substytucji p.Ile540Val na strukturę i funkcję białka. Można zatem przypuszczać, że wykryty wariant c.1618A>G genu *TOX 3* prawdopodobnie koreluje z wystąpieniem wady rozszczepowej u pacjenta.

Przypadek nr 17

Analiza NGS wykazała także obecność nowego, prawdopodobnie patogennego wariantu c.8C>G (p.Ser3*) genu *ADK* u pacjenta z nsCLP. Gen ten koduje kinazę adenozynową, która katalizuje przeniesienie gamma-fosforanu pochodzącego z adenozyno-5′-trifosforanu (ATP) na cząsteczkę adenozyny, prowadząc do powstania adenozyno-5′-monofosforanu (AMP). Kinaza adenozynowa reguluje w ten sposób wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe stężenie adenozyny, która pełni znaczącą rolę w wielu procesach biochemicznych zachodzących w komórce, wpływając na układ sercowo-naczyniowy, nerwowy, oddechowy oraz immunologiczny. Inhibitory tego enzymu używane są w farmakoterapii m.in do zahamowania procesów zapalnych w organizmie. Kinaza adenozynowa reguluje także procesy metylacji zachodzące w komórce. Deficyt enzymu spowodowany patogennymi wariantami w genie *ADK*

powoduje powstanie hipermetioninemii (OMIM #614300). Ta metaboliczna choroba, o autosomalnie recesywnym modelu dziedziczenia, charakteryzuje się m.in. spowolnionym rozwojem intelektualnym oraz wadami rozwojowymi w obrębie twarzoczaszki [229].

Nie udowodniono do tej pory bezpośredniej roli jaką mogą pełnić produkty ekspresji genu *ADK* na rozwój twarzowej części czaszki. Jednakże wyniki analizy GWAS przeprowadzonej w grupie pacjentów z wrodzonymi nieprawidłowościami zębowymi w populacji europejskiej, wykazały że częste warianty genu *ADK*, mogą mieć również wpływ na budowę morfologiczną twarzy. W swoich analizach zespół Fatemifar i wsp. dowodzą, że w istotny sposób determinują one m.in szerokość nosa [230].

Wykryta transwersja c.8C>G powoduje wprowadzenie przedwczesnego kodonu stop w pozycji 3 (p.Ser3*). Prowadzi to do skrócenia o 343 reszty aminokwasowe produktu ekspresji genu *ADK*, co poważnie zaburza funkcje katalityczne kodowanego enzymu. Negatywny wpływ zmiany na właściwości fizykochemiczne białka potwierdziły także wyniki analizy bioinformatycznej. Trzy z 6 użytych programów do predykcji patogenności oceniły wariant jako „chorobotwórczy", „uszkadzający".

Wobec powyższych danych można wysunąć hipotezę, że zmiana ta ma potencjalny wpływ na rozwój wady rozszczepowej u pacjenta.

Przypadek nr 18

Nowy, interesujący wariant c.11896A>G (p.Lys3966Glu) w genie *LRP2* zidentyfikowano u pacjenta z nsCLP. Gen ten koduje receptor związany z lipoproteinami o niskiej gęstości typu 2. To receptorowe białko nazywane również megaliną bierze udział w szeregu ważnych procesów zachodzącym w organizmie, takich jak: wchłanianie witamin A i D, funkcjonowanie układu odpornościowego, odpowiedź na stres i transport lipidów we krwi. Białko ulega ekspresji w komórkach nabłonkowych, pełniąc istotną rolę w ścieżce sygnałowej regulującej rozwój i funkcjonowanie m.in. mózgu i rdzenia kręgowego, oczu, uszu, płuc, jelit, układu rozrodczego i kanalików nerkowych. Patogenne warianty nukleotydowe w genie *LRP2* związane są z zespołem twarzowo-oczno-uszno-nerkowym nazywanym również zespołem Donnai-Barrowa (OMIM #222448). Zespół oprócz szeregu wad rozwojowych charakteryzuje się także licznymi anomaliami twarzoczaszki, w tym rozszczepem wargi [231], [232]. Receptor LRP2 uważany jest za ważny modulator SHH, będącym jednym z kluczowych szlaków sygnalizacyjnych uczestniczących w rozwoju twarzoczaszki. Ponadto u myszy $Lrp2^{-/-}$ obserwuje się rozszczep podniebienia [233], [234].

Opisywana substytucja p.Lys3966Glu genu *LRP2* została oceniona jako patogenna przez dwa programy użyte do analizy *in silico*, co pozwala przypuszczać, że może ona mieć negatywny wpływ na aktywność kodowanego receptora. Wariantu nie zidentyfikowano u zdrowej matki pacjenta, ale z powodu braku materiału genetycznego od ojca, nie udało się ocenić statusu dziedziczenia wykrytej zmiany. Z wywiadu rodzinnego wynika jednak, że wadą rozszczepową dotknięty jest także dziadek ze strony ojca, dlatego w celu potwierdzenia możliwego wpływu wariantu c.11896A>G na obserwowany fenotyp u pacjenta, wskazana byłaby weryfikacja obecności wariantu u chorego krewnego.

Przypadek nr 19

Zastosowana w niniejszych analizach technika NGS umożliwiła identyfikację nowego wariantu c.18C>G (p.Asp6Glu) genu *EDAR* u pacjenta z nsCLP. Gen ten koduje białko receptorowe o nazwie ektodysplazyna A, które pełni kluczową rolę w szlaku sygnałowym biorącym udział w proliferacji, różnicowaniu oraz wzroście komórek. Szczególnie istotne znaczenie pełni w interakcjach pomiędzy warstwą ektodermalną a mezodermalną podczas wczesnego rozwoju embrionalnego. Interakcje te umożliwiają tworzenie różnych struktur z warstwy ektodermalnej takich jak: skóra, gruczoły łojowe, gruczoły potowe mieszki włosowe, paznokcie oraz zęby. Sugeruje się również, że produkt ekspresji genu *EDAR* uczestniczy w szlaku sygnalizacyjnym zaangażowanym w rozwoju podniebienia [235]. Patogenne warianty nukleotydowe zlokalizowane w genie *EDAR* odpowiadają za hipohydrotyczną dysplazję ektodermalną typu 10A (OMIM #129490) oraz typu 10B (OMIM # 224900). W fenotypie osoby dotkniętej dysplazją ektodermalną obserwuje się znaczną dysmorfię twarzoczaszki, a także rzadko występujący rozszczep wargi lub podniebienia [236]. Ponadto patogenne warianty nukleotydowe zlokalizowane w genie *EDAR* uważane są za jedną z przyczyn izolowanej agenezji zębów stałych. Dane literaturowe wskazują na te same mechanizmy molekularne, które mogą odgrywać rolę zarówno podczas rozwoju zawiązków zębów jak również rozwoju wargi i podniebienia [237]–[239], dlatego można przypuszczać, że wykryty wariant c.18C>G mógł mieć wpływ na rozwój nsCLP u analizowanego pacjenta. Zidentyfikowana substytucja p.Asp6Glu została oceniona przez program bioinformatyczny FATHM za zmianę uszkadzającą „*damaging*” wskazując, że może mieć ona negatywny wpływ na funkcje kodowanego. W bazie VarSome wykryta zmiana figuruje jako wariant o niepewnym znaczeniu, przy czym dopuszcza jej patogenny

charakter. Ponadto opisywana transwersja c.18C>G genu *EDAR* jest zlokalizowana w sekwencji „*hot spot*”, która koduje funkcjonalną domenę białkową – peptyd sygnalny. W rejonie tym zidentyfikowano m.in heterozygotyczny, patogenny wariant tworzący allel złożony w obrębie eksonu i intronu 2, który w bazie ClinVar podawany jest za jest przyczynę hipohydrotycznej dysplazji ektodermalnej typu 10B [240].

Nie można zatem wykluczyć patogennego wpływu zidentyfikowanej zmiany na prawidłową aktywność produktu ekspresji genu, a także jej możliwej roli w rozwoju izolowanej wady rozszczepowej u pacjenta.

Przypadek nr 20

U jednej z pacjentek z nsCLP zidentyfikowano bardzo rzadki i potencjalnie patogenny wariant genu *EFTUD2* (rs1467291243, c.956C>T, p.Thr319Met). *EFTUD2* koduje białko o aktywności GTPazy, które jest składową spliceosomu. Dane wskazują, że *de novo* heterozygotyczne patogenne warianty lub delecje genu *EFTUD2* są odpowiedzialnie za dystozę żuchwowo – twarzową typu Guiona Almeida (OMIM #610536) dziedziczoną autosomalnie dominująco. U niektórych pacjentów z tym typem dysostozy jednym z objawów klinicznych jest rozszczep podniebienia [241]. W związku z licznymi deformacjami twarzy w przebiegu zespołu Guiona i Almeida wywołanego przez patogenne warianty w genie *EFTUD2,* nie można wykluczyć wpływu wykrytej substytucji aminokwasowej p.Thr319Met na rozwój nsCLP u pacjentki. Patogenny charakter analizowanej zmiany potwierdziło 14 programów wykorzystanych do analiz *in silico*. Ponadto zidentyfikowany wariant zlokalizowany jest w sekwencji kodującej funkcjonalną domenę białkową, co może dodatkowo sugerować jego negatywny wpływ na funkcję białka EFTUD2.W bazie VarSome wariant c.956C>T genu *EFTUD2* jest określony jako zmiana potencjalnie patogenna. W bazie ClinVar zmiana ta nie została do tej pory zarejestrowana.

Pacjentka z analizowaną tranzycja genu *EFTUD2* jest jedyną osobą w rodzinie z wrodzoną wadą rozwojową części twarzowej czaszki. Wariant ten odziedziczyła od swojego zdrowego ojca, co może prawdopodobnie wykluczać jego bezpośredni wpływ na rozwój wady rozszczepowej. Jednakże biorąc po uwagę niepełną penetrację patogennych wariantów, a także znaczącą rolę białek EFTUD2 w prawidłowym rozwoju twarzy, można sugerować udział opisywanej substytucji aminokwasowej p.Thr319Met w etiologii wady rozszczepowej u badanej pacjentki.

Przypadki nr 21 oraz nr 24

W badaniach zrealizowanych w ramach niniejszej pracy zidentyfikowano również rzadki wariant genu *COL9A1* (rs760070670, c.1802G>T, p.Gly601Val) u pacjenta z nsCLP (przyp. nr 24), a także zmianę w genie *COL11A1* (rs775587076, p.Gln1398Pro, c.4193A>C) u pacjenta nsCL (przyp. nr 21). Oba warianty sklasyfikowano przez odpowiednio 16 oraz 11 programów do analiz *in silico* jako warianty patogenne. Wyniki te pozwalają przypuszczać, że wykryte substytucje mogą negatywnie wpływać na strukturę i funkcje kodowanych białek. Dodatkowym argumentem świadczącym o ich potencjalnej patogenności jest fakt, że substytucje te są zlokalizowane w sekwencjach kodujących ważne domeny białkowe, które zapewniają stabilność kodowanych białek.

Gen *COL11A1* koduje jeden z dwóch łańcuchów α1 w kolagenie typu XI. Jego ekspresję wykrywa się już na wczesnym etapie zarodkowym m.in w chrząstce Meckela, która zanika na dalszym etapie rozwojowym. Chrząstka ta zapewnia wsparcie mechaniczne dla rozwijającej się żuchwy umożliwiając zagęszczenie się wokół niej tkanki mezenchematycznej. Pozwala to w dalszym procesie na jej kostnienie i rozwój żuchwy. W badaniach funkcjonalnych na mysich modelach wykazano, że patogenne warianty w *Col11a1* powodują chondrodysplazję, której efektem jest mikrognacja oraz anomalie rozwojowe podniebienia, w tym jego rozszczep. Chorobotwórcze warianty *COL11A1* zostały także zidentyfikowane u pacjentów z zespołem Pierre'a Robina, w którym jednym z charakterystycznych objawów jest CP, a w ciężkiej postaci może występować także CLP [139].

Patogenne warianty w genach *COL11A1* oraz *COL9A1* są opisywane również jako jedna z przyczyn zespołu Sticlera, odpowiednio typu II (OMIM #604841, dziedziczenie autosomalne dominujące) oraz IV (OMIM #614134, dziedziczenie złożone). Wspólną cechą, charakterystyczną dla wszystkich sześciu typów zespołu Sticklera jest płaska twarz, która jest efektem zaburzeń rozwoju kości twarzoczaszki, mikrognacja, zapadanie się języka oraz CP [136], [242].

Przypadek pacjenta z nsCL, u którego zidentyfikowano potencjalnie patogenny wariant c.4193A>C w genie *COLL11A1* oraz pacjenta z nsCLP ze zmianą c.1802G>T w *COL9A1* nie wpisują się w dotychczasowe ustalenia, które sugerują raczej na związek tych genów z patogenezą rozszczepów samego podniebienia. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że zaburzenia funkcji genów *COL11A1*, *COL9A1* powodują także inne

deformacje twarzoczaszki, więc nie można wykluczyć ich potencjalnego wpływu na rozwój opisywanych u pacjentów wad rozszczepowych.

Przypadek nr 22

Kolejny potencjalnie patogenny wariant genu *CDH7* (rs1009126876, c.4477C>T, p.Arg1493Cys), wykryto u pacjentki z nsCL. Zmiana została oceniona przez 15 programów bioinformatycznych jako wariant patogenny. U chorej zidentyfikowano również potencjalnie patogenny wariant w znanym genie kandydackim *ARHGAP29* (rs140877322, c.1043G>T). Substytucja p.Arg348Leu została oceniona przez 9 programów użytych do analizy *in silico* jako zmiana o patogennym, „uszkadzającym" wpływie na białko, co pozwala przypuszczać, że ma ona także znaczący wpływ na fenotyp pacjentki. Być może ujawnienie się u niej wady rozszczepowej jest związane z wystąpieniem dopiero dwóch patogennych wariantów, zarówno w genie *CDH7*, jak i *ARHGAP29*.

Nosicielstwo analizowanych zmian, udało się zweryfikować jedynie u ojca. Pacjentka odziedziczyła od niego wariant c.1043G>T genu *ARHGAP29*. Z powodu braku materiału genetycznego od matki pacjentki, nie określono charakteru dziedziczenia zmiany zlokalizowanej w *CDH7*, co w przypadku zmiany *de novo*, wzmocniłoby przypuszczenia o patogenności zidentyfikowanego wariantu.

5.3 Analizy sekwencjonowania NGS w grupie pacjentów z nsCP

5.3.1 Czynniki genetyczne w rozszczepie podniebienia

Liczne dane naukowe wskazują na ważna rolę czynników genetycznych w etiologii izolowanych rozszczepów samego podniebienia. Świadczy o tym choćby fakt, że ryzyko wystąpienia nsCP u rodzeństwa pacjentów z tą anomalią jest zwiększone 50 - 60 razy [243]. Jednakże przeprowadzone dotychczas dwie analizy GWAS [244], [245] oraz meta - analiza [77] pozwoliły zidentyfikować tylko jedno chromosomowe locus (1p36), które miało istotny statystycznie związek z ryzykiem nsCP. Najsilniejszy sygnał w obrębie tego regionu chromosomalnego pochodził z genu *GRHL3* (OMIM * 608317). Wariant nukleotydowy *GRHL3* (rs41268753), dla którego wynik osiągnął istotność statystyczną na poziomie genomowym ($p = 4.08E^{-09}$) to zmiana niesynonimiczna, polegająca na substytucji aminokwasowej p.Thr454Met w eksonie 11 tego genu [245]. *GRHL3* koduje czynnik transkrypcyjnych z rodziny *Grainyhead-like*, który stymuluje migrację komórek śródbłonka podczas rozwoju embrionalnego

podniebienia. Patogenne warianty genu *GRHL3* są również opisywane jako jedna z przyczyn zespołu Van der Woud'a [246].

Od lat sugeruje się, że nsCL/P oraz nsCP mają odmienną patogenezę oraz etiologię genetyczną. Ważnych dowodów potwierdzających te przypuszczenia dostarczyły analizy Ludwig i wsp.[247], w których wykazano, że z wyjątkiem genu *FOXE1* (locus 9q22), żadne ze zidentyfikowanych 37 loci dla nsCL/P [1], [28], [63], [65], [66], [179] nie wykazuje związku z ryzykiem nsCP. Wyniki tych analiz potwierdziło także badanie populacyjne przeprowadzone przez Moreno-Uribe i wsp. [248].

Trudności jakie przysparza identyfikacja genów kandydackich oraz chromosomowych loci ryzka dla nsCP mogą wynikać z faktu, że w etiologii izolowanych rozszczepów podniebienia większą rolę odgrywają rzadkie warianty nukleotydowe, które w analizach GWAS mogły być pomijane. Może świadczyć o tym fakt, że jedyny wariant dla którego wyniki osiągnęły istotność genomową w analizie GWAS (wariant rs41268753 genu *GRHL3*) występuje w populacji europejskiej stosunkowo rzadko, bo z częstością ok. 3%. Przypuszcza się również, że w etiologii tej postaci rozszczepów istotniejszą rolę odgrywają czynniki środowiskowe w porównaniu do czynników genetycznych [243], [249].

5.3.2 Wyniki sekwencjonowania NGS

W grupie 45 chorych z izolowanym rozszczepem podniebienia zidentyfikowano 14 potencjalnie patogennych wariantów, w tym 7 nowych oraz 7 rzadkich zmian.

Przeprowadzona analiza wzbogacenia (ang. *enrichment analysis*) dla grupy 12 genów, w których zidentyfikowano powyższe warianty wykazała, że najistotniej „nadreprezentowane" procesy biologiczne dotyczyły rozwoju narządów zmysłu. Wynik ten można tłumaczyć wspólnym pochodzeniem struktur twarzoczaszki oraz narządów zmysłów. Istotnie nadreprezentowane były także procesy różnicowania komórek oraz osteogenezy. Spośród analizowanych funkcji molekularnych w grupie badanych genów najistotniejszy wynik dotyczył białka Frizzled, który jest jednym z głównych receptorów dla szlaku sygnalizacyjnego WNT/β-katenina. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy zdają się potwierdzać istotną rolę jaką pełnią ligandy i receptory szlaku WNT w prawidłowym rozwoju twarzoczaszki.

Przypadek nr 26

Ciekawy wynik analizowanego panelu genowego przedstawia się u pacjenta z nsCP, u którego zidentyfikowano nowy potencjalnie patogenny wariant w genie *IRF6*

(c.224A>G, p.Asp75Gly). Wszystkie programy zastosowane do analizy *in silico* określiły wpływ wariantu na produkt białkowy genu *IRF6* jako patogenny. Dane literaturowe wskazują, że warianty zlokalizowane w sekwencji kodującej genu *IRF6*, są jedną z głównych molekularnych przyczyn nsCL/P [34], [58], [62], [250], [251].Patogenne warianty w genie *IRF6* dziedziczone są zwykle autosomalnie dominująco. Oznacza to, że ryzyko wystąpienia wady rozszczepowej u przyszłego potomstwa pacjenta wynosi 50%. Dotychczas nie wykazano istotnego związku pomiędzy wariantami genu *IRF6* a izolowanym rozszczepem podniebienia, dlatego otrzymane wyniki sekwencjonowania wydają się być szczególnie interesujące. Wariantu nie zidentyfikowano u zdrowych rodziców, co jest silnym argumentem przemawiającym za jego patogennym wpływem na rozwój tej anomalii.

U pacjenta z opisywanym powyżej wariantem c.224A>G w genie *IRF6* analiza sekwencyjna wykazała także obecność rzadkiej tranzycji c.443C>T zlokalizowanej w eksonie 3 genu *WNT10A* (rs373695499,p.Ala148Val). Spośród zastosowanych programów bioinformatycznych użytych do oceny *in silico* 15 określiło ją jako patogenną.

W mysim modelu wykazano, że geny z rodziny *Wnt* ulegają silnej ekspresji podczas rozwoju embrionalnego w migrujących komórkach cNCC, a także w tkance ektodermalnej oraz mezenchymalnej, z której formują się wyrostki twarzowe. Wszelkie zaburzenia w szlaku sygnałowym Wnt prowadzą u nich do licznych anomalii rozwojowych twarzoczaszki [252], [253]. Liczne badania, w tym badania asocjacyjne przeprowadzone w populacji polskiej, wskazują że warianty nukleotydowe genów z rodziny *WNT* są czynnikami zwiększającymi ryzyko izolowanych wad rozszczepowych. [196], [206], [254]–[257].

W fenotypie opisywanego pacjenta obserwuje się również wrodzony brak zawiązka zęba stałego. Co ciekawe, częste i rzadkie warianty nukleotydowe *WNT10A* opisywane są również jako przyczyna lub też czynnik zwiększający ryzyko izolowanej agenezji zębów stałych. [38], [258], [259]. Należy zatem przypuszczać, że wariant ten, obok potencjalnej roli w patogenezie rozszczepu, może być bezpośrednią przyczyną występowania hipodoncją u pacjenta.

Przypadek nr 27

U jednej z pacjentek z izolowanym rozszczepem podniebienia zidentyfikowano nowy wariant genu *NHS*. Wykryta zmiana polega na transwersji c.568G>C, która

prowadzi do substytucji waliny na leucynę w pozycji 190 kodowanego białka (p.Val190Leu).

Gen *NHS* podczas rozwoju embrionalnego ulega silnej ekspresji szczególnie w tkance mezenchymalnej znajdującej się w rejonach tworzącej się twarzoczaszki oraz w zawiązkach zębowych. Podczas translacji powstają co najmniej 4 izoformy białka NHS, różniące się lokalizacją komórkową. Główny transkrypt genu (NHS-A) koduje białko składające się z 1630 aminokwasów, które znajduje się na powierzchni błony komórek nabłonkowych. Pozostałe izoformy są zlokalizowane w cytoplazmie i ulegają ekspresji w komórkach nienabłonkowych. Funkcja białka NHS nie została jeszcze dokładnie poznana. Wiadomo jednak, że jego struktura zawiera funkcjonalną domenę homologiczną do kompleksu WAVE (ang. *verprolin-homologous protein*), który odgrywa ważną rolę w regulacji przebudowy filamentów aktynowych. Produkt ekspresji genu *NHS* prawdopodobnie wchodzi w interakcję z białkiem ZO-1 (ang. *zonula occludens*), które należy do białek zamykających odpowiedzialnych za tzw. połączenia ścisłe w komórkach nabłonkowych (ang. *tight junction*). Ten rodzaj połączeń międzykomórkowych zapewnia ścisłe przyleganie do siebie komórek, utrzymując w ten sposób stabilną strukturę tkanki, a także umożliwiając komunikację i koordynację procesów metabolicznych między komórkami [260].

Patogenne warianty nukleotydowe zlokalizowane w genie *NHS* są opisywane jako przyczyna zespołu Nance'a – Horana (OMIM #302350). Jest to choroba sprzężona z chromosomem X dziedziczona w sposób dominujący. Według bazy danych HGMD (http://www.hgmd.cf.ac.uk) zidentyfikowano dotychczas około 40 patogennych wariantów w genie *NHS*, które są przyczyną tego rzadkiego zaburzenia. Większość opisywanych zmian to warianty typu *nonsense* lub małe delecje. Według danych literaturowych, do tej pory zidentyfikowano kilkadziesiąt rodzin z zespołem Nance'a-Horana pochodzących głównie z populacji kaukaskiej [261]. Kobiety będące nosicielkami patogennego wariantu genu *NHS* manifestują znacznie lżejsze objawy. Najczęściej występują u nich łagodne zaburzenia gałki ocznej, zmętnienie soczewki oka, a także nieznaczna dysmorfia twarzy. U mężczyzn zespół ten przebiega z charakterystycznymi malformacjami twarzoczaszki, zaburzeniami w strukturze i liczbie zębów, zaburzeniami rozwoju kończyn oraz anomaliami gałki ocznej, do których należą małoocze, zaburzenia w rozwoju rogówki czy też wrodzona zaćma. Często obserwowanym objawem jest także lekka lub umiarkowana niepełnosprawność

intelektualna. U pacjentów z zespołem Nance'a - Horana obok opisywanych wad rozwojowych twarzoczaszki występuje także rozszczep podniebienia [261 – 263], co pozwala przypuszczać, że zaburzenie produktu białkowego genu *NHS* może również odgrywać rolę w patomechanizmie powstawania izolowanego rozszczepu u pacjentki.

Wykryty w przedstawianych badaniach wariant genu *NHS* (c.568G>C, p.Val190Leu) jest zlokalizowany w miejscu splicingowym, co sugeruje, że może on w istotny sposób wpływać na proces składania transkryptu genu *NHS*. Ponadto 4 programy bioinformatyczne zastosowane do analiz *in silico* oceniły wpływ wariantu na funkcję białka jako „chorobotwórczy", „uszkadzający" Zmiany nie zidentyfikowano do tej pory w żadnej bazie danych. Wariant c.568G>C genu *NHS* powstał *de novo*, co dodatkowo wzmacnia przypuszczenia o jego patogennym charakterze.

Przypadek nr 28

Ciekawie przedstawia się przypadek pacjentki z nsCP, która jest nosicielką substytucji nukleotydowych w genach *IRF6* oraz *NIPBL*.

Wykryta u niej zmiana w *IRF6* jest to wariant splicingowy (rs200808685, c.1060G>A, p.Asp354Asn) o wysokiej wartości współczynnika *adaptive boosting score* (ada = 0,9998), który wskazuje na silny wpływ tej zmiany na proces składnia transkryptu. Wykryta transwersja c.1060G>A została już wcześniej zidentyfikowana przez zespół Jehee i wsp. w grupie pacjentów z nsCL/P [264], a także w pojedynczych przypadkach zespołu van der Wouda oraz płetwistości podkolanowej. [250], [265]. Programy bioinformatyczne pozwalające ocenić *in silico* wpływ badanej substytucji p.Asp354Asn na produkt białkowy genu potwierdziły jej patogenny charakter.

Drugą zidentyfikowaną zmianą u tej samej pacjentki, był nowy nieraportowany dotychczas w żadnej dostępnej bazie danych wariant w genie *NIPBL* (c.2688A>C, p.Lys896Asn). Gen *NIPBL* w okresie embrionalnym ulega silnej ekspresji w rozwijających się kościach oraz tkankach w rejonie twarzoczaszki. Wariant c.2688A>C według 7 zastosowanych programów bioinformatycznych został oceniony jako zmiana patogenna, co pozwala przypuszczać, że ma ona negatywny wpływu na kodowane białko. Dodatkowym argumentem sugerującym, że wykryta transwersja genu *NIPBL* może mieć potencjalny wpływ na manifestację fenotypu pacjenta są dane z bazy VarSome oraz ClinVar, w których zdeponowano informacje o 399 patogennych wariantach genu *NIPBL*. Warianty te opisywane są przede wszystkim jako przyczyna zespołu Cornelii de Lange typu 1 (OMIM #122470) o autosomalnie dominującym modelu

dziedziczenia. Choroba ta należy do zespołów wad rozwojowych, w których rozszczep podniebienia jest jednym z objawów towarzyszących [266].

Na podstawie powyższych danych można przypuszczać, że zidentyfikowana zmiana c.2688A>C w *NIBL* wraz z transwersją c.1060G>A w *IRF6* mogą być jednymi z molekularnych przyczyn wady rozszczepowej u pacjenta.

Przypadek nr 29

Interesującą zmianą jest także nowy wariant c.3605A>G (p.Tyr1202Cys) genu *FLNB*. Gen ten koduje białko o nazwie filamina typu B, które jest ważnym elementem strukturalnym i funkcjonalnym cytoszkieletu komórki. Filmina typu B ulega ekspresji m.in. w chondrocytach, regulując proces ich różnicowania oraz prawdopodobnie reguluje proces kostnienia chrząstki w okresie prenatalnym. Według bazy VarSome zidentyfikowano dotychczas 95 patogennych wariantów genu *FLNB* o poznanym znaczeniu klinicznym, które powodują m.in. zespołu Larsena (OMIM #150250). o autosomalnie dominującym sposobie dziedziczenia, w którym jedną z często towarzyszących anomalii jest rozszczep podniebienia [267].

Opisywany wariant c.3605A>G nukleotydowy zlokalizowany jest w sekwencji kodującej repetetywne regiony funkcjonalnej domeny białkowej, która odpowiada za interakcje z innymi białkami. Pozwala to przypuszczać, że substytucja p.Tyr1202Cys zlokalizowana w tym regionie, nie pozostaje bez wpływu na prawidłowe funkcjonowanie kodowanego białka. Potwierdzają to wyniki analiz *in silico* uzyskane dzięki wykorzystaniu narzędzi bioinformatycznych. Spośród 17 zastosowanych do celu programów, 16 oceniło zmianę jako patogenną.

Przypadek nr 30

Na uwagę zasługuje również pacjent z nsCP, u którego zidentyfikowano 2 potencjalnie patogenne warianty. Pierwszy z nich to nowa, nieopisana w żadnej dostępnej bazie danych tranzycja c.1997A>G (p.Tyr666Cys) zlokalizowana w genie *NOTCH2*. Drugą zidentyfikowaną u pacjenta zmianą jest wariant c.1075C>T (rs755547723, p.Arg359*) w genie *FGFR3*.

NOTCH2 należy do rodziny genów kodujących receptory, dla których istnieje pięć ligandów (JAG 1,2 i Delta 1, 2, 3). Receptory NOTCH są zlokalizowane na powierzchni błony komórkowej pełniąc rolę w przekazywaniu sygnału między komórkami. Białka te mają wiele wysoce konserwatywnych ewolucyjnie domen, w tym m.in. domenę zewnątrzkomórkową Notch (NECD - ang. *Notch extracellular domain*) z repetetywnym

motywem podobnym do EGF (ang. *EGF - like*) [268], który jest miejscem wiązania ligandów. To właśnie w sekwencji kodującej ten motyw jest zlokalizowany nowy opisywany wariant c.1997A>G. Można zatem przypuszczać, że ma on potencjalnie patogenny wpływ na funkcje kodowanego białka, co potwierdziło 15 programów stosowanych do analizy *in silico.*

Zaburzona sygnalizacja NOTCH jest przyczyną zespołów wad wrodzonych, w których występują liczne anomalie twarzoczaszki, sugerując jego istotny wpływ na prawidłowy rozwój struktur twarzowych. Wykazano, że szlak sygnalizacyjny NOTCH odgrywa istotną rolę zarówno w chondro-, osteoklasto-, jak i osteoblastogenezie [268].

Z patogennymi wariantami genu *NOTCH2* związany jest dziedziczony autosomalnie dominująco zespół Hajdu-Cheneya (OMIM #102500). Charakteryzuje się on dysplazją kostną, anomaliami twarzowo – czaszkowymi, w tym również nieprawidłowościami w rozwoju podniebienia (gotyckie podniebienie) [269]. Patogenne warianty zlokalizowane w genie *NOTCH2* są również przyczyną zespołu Alagille' a typu 2 (OMIM #610205) o autosomalnie dominującym sposobie dziedziczenia. W tym zespole zaburzeń, oprócz wad serca i wątroby, obserwuje się charakterystyczny wygląd twarzy, w tym wydatne czoło, głęboko osadzone oczy oraz małą i szpiczastą brodę. Częstość występowania zespołu Alagille'a wynosi 1 na 700 000 żywych urodzeń. Jego główną przyczyną są patogenne warianty genu *JAG1*, którego produkt białkowy jest jednym z regulatorów szlaku NOTCH, w tym głównym ligandem dla NOTCH2. Dlatego można przypuszczać, że zaburzenia w strukturze receptora NOTCH2 mogą mieć istotny wpływ na transdukcję sygnału w opisywanym szlaku sygnalizacyjnym [268], [270], [271].

W badania wykorzystujących modele mysie wykazano ponadto epistatyczne interakcje pomiędzy genem *Jagged1 (JAG1)* a genem *Twist1* [272], [273]. Gen *TWIST1* jest również sugerowanym czynnikiem regulującym prawidłowy rozwój twarzoczaszki. Patogenne warianty genu *TWIST1* są opisywane jako przyczyna zespołu Saethre-Chotzena (OMIM #101400), w którym oprócz wielu wad rozwojowych twarzoczaszki może wystąpić również rozszczep podniebienia [274]. Co ciekawe, wykazano silną koekspresję genu *Twist1* z genem *Irf6* podczas rozwoju twarzoczaszki u myszy, a pojedynczy *knock-out* genowy *Irf6/Twist1* powodował u nich liczne anomalie, w tym rozszczep podniebienia. [173].

W badaniach funkcjonalnych na modelu ryby Danio wykazano, że szlak sygnałowy Notch może uczestniczyć w rozwoju twarzoczaszki również poprzez jego

rolę/funkcję w regulacji ekspresji genów z rodziny *Fgf* [268], [275]. Ligandy oraz receptory szlaku sygnalizującego FGF odgrywają niezwykle istotną rolę w patogenezie wad rozwojowych twarzoczaszki. Dlatego szczególnie interesująca wydaje się być druga zidentyfikowana u pacjenta zmiana zlokalizowana w genie kodującym jeden z głównych receptorów tego szlaku. Potencjalnie patogenny wariant c.1075C>T (rs755547723, p.Arg359*) wykryto u niego w genie *FGFR3*.

W badaniach funkcjonalnych przeprowadzonych na mysich modelach wykazano, że produkt ekspresji genu *Fgfr3* jest negatywnym regulatorem ścieżki sygnałowej uczestniczącej w osteogenezie, a także reguluje ekspresję genu *Ihh* (ang. *Indian Hedgehog* kodujący białko z rodziny Hegehog*)* oraz *Bmp4* (koduje białko morfogenetyczne kości 4, należące do rodziny TGF-β) w chondrocytach. Wykazano, że stanowi to główny patomechanizm odpowiedzialny za rozwój achondroplazji (OMIM #100800) u pacjentów z patogennymi wariantami w genie *FGFR3.* Achondroplazja charakteryzuje się autosomalnie dominującym sposobem dziedziczenia. Głównym objawem tej choroby jest karłowatość, ale także znaczna dysmorfia twarzoczaszki [276].

Kolejnym zaburzeniem związanym z patogennymi wariantami w genie *FGFR3* jest zespół Crouzona z rogowaceniem ciemnym (OMIM #612247) przebiegającym ze znacznymi deformacjami w obrębie twarzowej części czaszki, w tym również rozszczepem podniebienia [277], [278].

Prezentowana w niniejszej pracy tranzycja c.1075C>T genu *FGFR3* ma prawdopodobnie negatywny wpływ na strukturę kodowanego białka. Wariant ten prowadzi powstania kodonu stop (p.Arg359*) i przedwczesnej terminację translacji. Jego patogenny charakter potwierdziły wyniki uzyskane przez 4 programy bioinformatyczne, których użyto do analizy *in silico*. Opisywana substytucja nukleotydowa c.1075C>T zlokalizowana jest w sekwencji kodującej funkcjonalną domenę immunoglobulinopodobną C2 typu 3 (ang. *Ig-like C2-type 3*). Region ten odpowiada za interakcje białko - białko oraz białko – ligand. Dlatego też można przypuszczać, że opisywany wariant ma prawdopodobnie znaczący wpływ na funkcje kodowanego receptora.

Sugeruje to, że zarówno wariant genu *NOTCH2* (c.1997A>G) jak i *FGFR3* (c.1075C>T) mogą mieć wpływ na obserwowany fenotyp u pacjenta.

Przypadek nr 31

Wariantem o niepewnym patogennym znaczeniu, który może mieć prawdopodobny wpływ na rozwój wady rozszczepowej to nowa zmiana c.749C>G (p.Ala250Gly) w genie *DHODH*, kodującego dehydrogenazę dihydroorotanu. Enzym ten zlokalizowany jest na powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej. Katalizuje utlenianie dihydroorotanu do kwasu orotanowego, który jest niezbędnym substratem do biosynytezy pirymidyn, będących budulcem DNA, RNA, a także cząsteczek przenoszący energię w komórce (ATP, GTP).

Dane literaturowe wskazują, że patogenne warianty zlokalizowane w genie *DHODH* są przyczyną m.in. zespołu Millera, nazywanego też zespołem Genee - Widemanna (OMIM #263750), który jest chorobą o autosomalnie recesywnym modelu dziedziczenia. Zespół charakteryzuje się mikrognacją, hipoplazją lub dysplazją kończyn, colobomą (rozszczepem) powieki oraz politelią (dodatkowy sutek), a także rozszczepem wargi lub podniebienia [279]. Biorąc pod uwagę, że opisywana substytucja aminokwasowa p.Ala250Gly została oceniona przez 13 programów bioinformatycznych jako zmiana patogenna, można przypuszczać że ma ona negatywny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie produktu ekspresji genu *DHODH.*

Przypadek nr 32

Wykryty nowy wariant c.35A>T (p.Gln12Leu) genu *SPRY2* wydaje się być równie interesujący. Gen ten koduje białko sygnałowe Sprouty 2, które pełni rolę ligandu dla receptora kinazy tyrozynowej, uczestnicząc w ten sposób w regulacji procesu różnicowania ektodermy. Białko Spry2 jest także antagonistą szlaku sygnałowego FGF, niezbędnego do prawidłowego rozwoju podniebienia w czasie embriogenezy, a u myszy pozbawionych funkcjonalnej formy genu (Spry2$^{-/-}$) obserwuje się jego rozszczep [280]. Przeprowadzona meta-analiza wykorzystująca wyniki uzyskane z kilku badań GWAS wykazała, że zlokalizowane w regionie chromosomalnym 13q31 częste warianty nukleotydowe, mogą zwiększać ryzyko wystąpienia izolowanych wad rozszczepowych, a znajdujący w tym locus gen *SPRY2*, został uznany za jeden z najważniejszych w tej lokalizacji [28]. Ponadto przeprowadzone przez Vieira i wsp. analizy sekwencjonowania pozwoliły na identyfikacje rzadkich patogennych wariantów nukleotydowych genu *SPRY2* w grupie pacjentów z izolowanymi wadami rozszczepowymi, potwierdzając tym samym, że gen *SPRY2* może odgrywać istotną rolę w etiologii tej anomalii rozwojowej [215].

Zidentyfikowany w ramach niniejszej pracy nowy wariant c.35A>T genu *SPRY2* prowadzi do substytucji konserwatywnego w tej pozycji kwasu glutaminowego na leucynę (p.Gln12Leu), co z pewnością nie pozostaje bez wpływu na prawidłową aktywność kodowanego białka. Patogenny charakter wariantu potwierdziły 3 programy bioinformatyczne zastosowane do analizy *in silico*. Z powodu braku materiału genetycznego od zdrowych rodziców, nie udało się ustalić statusu dziedziczenia. Nie można zatem stwierdzić czy jest to zmiana *de novo*, co wzmocniłoby przypuszczenia o jego możliwej roli w etiopatogenezie wady rozszczepowej u analizowanej pacjentki.

Przypadek nr 33

Potwierdzeniem istotnej roli jaką pełnią białka sygnałowe szlaku WNT w etiologii wad rozszczepowych jest identyfikacja potencjalnie patogennego wariantu genu *WNT5B* u jednego z pacjentów z izolowaną postacią rozszczepu podniebienia. Wykryta tranzycja c.716G>T genu *WNT5B* (rs529807731, p.Arg239Leu) nie została zarejestrowana w bazie ClinVar, ale jej patogenny wpływ na białko potwierdziło 15 programów użytych do analiz *in silico*. W modelach zwierzęcych wykazano istotną rolę jaką pełnią produkty ekspresji genów *Wnt5a* oraz *Wnt5b* w różnicowaniu chondorocytów [281]. Zespół Kim i wsp. wykazał epistatyczne interakcje pomiędzy wariantami nukleotydowymi zlokalizowanymi w genie *WNT5B* a wariantami genu *MAFB* i regionu 8q24.21. Sugerując, że warianty tego genu mogą być czynnikiem biorącym udział w etiopatogenezie wad rozszczepowych [282].

Przypadek 34

Głównymi receptorami dla kanonicznej ścieżki WNT zależnej od β-kateniny jest transbłonowy receptor Frizzled (Fzd) oraz receptor lipoproteinowy kodowany przez gen *LRP6*, którego zaburzenia są wiązane z ryzykiem wad rozszczepowych [128], [284]. Patogenne warianty w genie *LRP6* są opisywane także w kontekście wrodzonych wad cewy nerwowej [283] oraz jako jedna z możliwych przyczyn agenezji zębów stałych [284]. Zespół Basha i wsp. zidentyfikował patogenny wariant genu *LRP6* w rodzinie obciążonej izolowanym rozszczepem wargi i podniebienia. W opisywanym przez nich przypadku zarówno pacjentka oraz jej córka z nsCLP były nosicielkami tego samego patogennego wariantu typu *nonsense* (NM_002336.2: c.3373C>T, p.Arg1125*). Heterozygotyczny wariant odziedziczył również zdrowy syn probantki, co potwierdza złożoną etiopatogenezę izolowanych wad strukturalnych twarzoczaszki [128].

Potencjalnie patogenny wariant genu *LRP6* u pacjentki z nsCP zidentyfikowany w ramach niniejszej pracy polega na transwersji c.481C>A (rs769446193, p.Pro161Thr). Według bazy GnomAD częstość występowania tego wariantu wynosi 0,00000398. Transwersja c.481C>A jest zlokalizowana w eksonie 3 genu w sekwencji kodującej jedną ze struktur tzw. śmigła β (ang. *beta - propeller*), którego funkcją jest regulacja tworzenia oddziaływań między białkami. Dlatego można przypuszczać, że substytucja aminokwasowa p.Pro161Thr w tej lokalizacji ma prawdopodobnie negatywny wpływ na funkcje kodowanego białka. Potwierdziły to wyniki analiz *in silico*, które przeprowadzono z zastosowaniem dedykowanych do tego narzędzi bioinformatycznych. Wszystkie użyte do tego celu programy sklasyfikowały opisywany wariant jako „chorobotwórczy", „uszkadzający". Jego patogenny charakter może podważać nosicielstwo wariantu c.481C>A u zdrowej matki pacjentki. Jednakże biorąc pod uwagę niepełną penetrację wcześniej raportowanych patogennych wariantów genu *LRP6*, można z dużym prawdopodobieństwem założyć, że zmiana ta ma wpływ na fenotyp pacjentki.

Przypadek nr 35

Wyniki analiz genetycznych pacjenta z nsCP, u którego zidentyfikowano 2 rzadkie warianty w genie *IRF6* oraz *WNT10B* przedstawiają się równie intersująco.

W przypadku genu *IRF6* u pacjenta wykryto ten sam wariant, który został zidentyfikowany u dziewczynki z nsCP opisany wcześniej – wariant c.1060G>A (rs200808685, p.Asp354Asn). Częstość występowania opisywanej tranzycji c.1060G>A w eksonach i genomach referencyjnych w bazie gnomAD wynosi odpowiednio 0,000227 oraz 0,000195, dlatego identyfikacja zmiany u niespokrewnionego pacjenta dotkniętego tą samą wadą stanowi ważny argument przemawiający za patogennością zidentyfikowanego wariantu. Można zatem przypuszczać, że wykryta substytucja p.Asp354Asn w genie *IRF6* stanowi ważny genetyczny czynnik w rozwoju wady u pacjenta.

Drugą zidentyfikowaną u pacjenta zmianą była tranzycja c.832C>T w genie *WNT10B* (rs200116103, p.Arg278Trp). Wariant ten został oceniony przez 16 programów do analiz *in silico* jako patogenny. Wielokrotnie wykazywano istotny związek pomiędzy wariantami nukleotydowych zlokalizowanymi w genach z rodziny *WNT* a zwiększonym ryzykiem rozwoju wad rozszczepowych [254], [256], [285], [286]. Pozwala to przypuszczać, że manifestacja obserwowanego u pacjenta fenotypu związana jest

z obecnością wariantu zarówno c.1060G>A w genie *IRF6* jak i c.832C>T w genie *WNT10B.*

5.4 Podsumowanie

Stworzony wielogenowy panel dla izolowanych wad rozwojowych twarzoczaszki, oparty o technikę NGS umożliwił identyfikację potencjalnie patogennych wariantów nukleotydowych u 24% analizowanych pacjentów. Spośród analizowanych potencjalnie patogennych zmian 51% stanowiły nowe, nieopisane dotąd w piśmiennictwie naukowym warianty.

Najlepszym sposobem weryfikacji patogenności nowych zmian jest przeprowadzenie badań funkcjonalnych na modelach mysich lub coraz częściej używanej w modelach rozszczepów ryby danio (*Danio rerio*). Ponadto bardzo przydatne w ocenie rzeczywistego wpływu zmiany na etiologię badanej anomalii rozwojowej, byłoby potwierdzenie segregacji wariantu z fenotypem w rodzinie. Oczywiście również istotna byłaby weryfikacja tej samej zmiany u niespokrewnionych pacjentów, manifestujących ten sam fenotyp. Jednak biorąc pod uwagę bardzo niską częstość występowania zidentyfikowanych zmian oraz ich „prywatny" charakter, prawdopodobieństwo znalezienia tych samych wariantów u innych pacjentów jest bardzo niewielkie.

U pozostałych 114 pacjentów, dla których wykonano analizy genetyczne, nie udało się zidentyfikować wariantów nukleotydowych mogących odgrywać istotną rolę w etiologii wady rozszczepowej. Nie można jednak wykluczyć u nich obecności patogennych wariantów ze względu na to, że zmiany te mogą być zlokalizowane w regionach kodujących, nieobjętych analizą NGS lub też w sekwencjach niekodujących. Dlatego należałoby przeprowadzić u nich sekwencjonowanie całoeksomowe (WES, ang. *Whole Exome Sequencing*) bądź sekwencjonowanie całego genomu (WGS, ang. *Whole Genome Sequencing*). Brak patogennych wariantów w tej grupie pacjentów wynikają również z ograniczeń metody NGS. Potencjalnie chorobotwórcze zmiany mogą być zlokalizowane w regionach genów, gdzie nie uzyskano optymalnego poziomu pokrycia lub też w regionach o ograniczonej czułości metody.

Większość zidentyfikowanych w niniejszej pracy zmian jest zlokalizowana w genach związanych z syndromicznymi formami wad rozszczepowych twarzoczaszki. Wyniki przeprowadzonych analiz potwierdzają m.in. doniesienia zespołu Basha i wsp., wykazujące, że pacjenci z izolowanym rozszczepem są często nosicielami

wariantu w genie związanym z zespołem wad rozwojowych, w których rozszczep jest jedną z anomalii towarzyszących. Zespół ten wysunął hipotezę, jakoby identyfikacja rzadkich wariantów nukleotydowych w sekwencjach kodujących jak i niekodujących genów związanych z chorobami jednogenowymi może pomóc wyjaśniać zjawisko brakującej odziedziczalności (ang. *missing heritability*), które jest obserwowane w przypadka izolowanych wad rozszczepowych [128].

Identyfikacja zwłaszcza nowych, nieopisanych dotychczas zmian genetycznych jest szczególnie istotna dla pogłębienia stanu wiedzy z zakresu molekularnego podłoża izolowanych wad twarzoczaszki oraz zrozumienia nowych patomechanizmów odgrywających istotną rolę się w rozwoju tych anomalii.

Uzyskane wyniki zdają się potwierdzać słuszność opracowywania wielogenowych paneli opartych na technikach sekwencjonowania następnej generacji. Wskazują, że jest to wiarygodne narzędzie diagnostyczne, generujące mniej kosztów od sekwencjonowania całego eksomu.

Analizy wielogenowych paneli oparte na technice NGS mogą przyczynić się do opracowania schematu postępowania diagnostycznego dla nsCL/P oraz nsCP, a tym samym do rozwóju poradnictwa genetycznego tych niezwykle złożonych i zarazem najczęściej występujących anomalii rozwojowych.

6. Wnioski

1. W prezentowanej pracy potwierdzono, że patogenne warianty zlokalizowane w genach *ARHGAP29, ESRP2, FGFR3, FGF4, PLEKHA5, SHH, SKI, TOX3* oraz *TRPS1* są istotnym czynnikiem etiologicznym, przyczyniającym się do powstawania izolowanych wad rozszczepowych.

2. Potwierdzono, że patogenne warianty genu *IFR6* są jedną z najistotniejszych molekularnych przyczyn zarówno nsCL/P jak i nsCP.

3. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że geny *ADK, BMPR1A, COL8A1, COL9A1, COL11A1, COL17A1, CHD7, EDAR, EFTUD2, FGD1, KMT2D, LRP2, MAML1* są nowymi genami kandydackimi dla nsCL/P; warianty nukleotydowe tych genów mogą być przyczyną lub też mogą zwiększać ryzyko tej anomalii rozwojowej.

4. Geny *FGFR3, FLNB, LRP6, NHS, NIPBL, NOTCH2, SPRY2* oraz geny z rodziny *WNT* (*WNT5B, WNT10A,WNT10B*) są nowymi genami kandydackimi dla nsCP; warianty nukleotydowe zlokalizowane w tych genach mogą odgrywać istotna rolę w etiopatogenezie rozszczepu podniebienia.

5. W przypadku pacjentów, u których nie zidentyfikowano potencjalnie patogennych wariantów badanych genów, nie można wykluczyć udziału czynnika genetycznego w etiologii ich wady rozszczepowej; warianty te mogą być zlokalizowane w rejonach nieobjętych analizą tj. w sekwencjach eksomowych spoza zaprojektowanego panelu oraz w sekwencjach niekodujących, a także w regionach o ograniczonej czułości metody.

6. Dziedziczenie patogennych zmian od zdrowych rodziców, świadczy o złożonej etiopatogenezie izolowanych rozszczepów twarzowej części czaszki, w której ważną rolę odgrywają zarówno czynniki genetyczne, jak również czynniki środowiskowe oraz ich wzajemne złożone interakcje.

7. Geny, których patogenne warianty są przyczyną zespołowych postaci rozszczepów twarzoczaszki mogą być genami kandydackimi także dla izolowanych postaci tej wady rozwojowej.

8. Analiza panelu genowego oparta na technice sekwencjonowania NGS jest skutecznym i wiarygodnym narzędziem diagnostycznym, umożliwiającym identyfikacje wariantów nukleotydowych odgrywających rolę w etiologii izolowanej wady rozszczepowej.

7. Streszczenie

Wady rozwojowe twarzoczaszki, w tym rozszczepy wargi i/lub podniebienia powstają w wyniku nieprawidłowego rozwoju pierwszego i drugiego łuku gardłowego (dawniej nazywanymi łukami skrzelowymi) w 5 tygodniu życia płodowego. Rozszczepy wargi połączone lub nie z rozszczepem podniebienia CL/P (ang. *Cleft Lip with of without Cleft Palate*) oraz rozszczepy samego podniebienia CP (ang. *Cleft Palate*) to jedne z najczęstszych wad strukturalnych twarzowej części czaszki. Szacuje się, że częstość występowania wszystkich form rozszczepów na świecie wynosi 1 na 700 żywych urodzeń. W Polsce z tą wadą rozwojową rodzi się 1 na około 1000 żywo urodzonych noworodków. Dane wskazują, że 70% wszystkich CL/P i 50% wszystkich CP to przypadki klasyfikowane jako formy izolowane.

Wiedza na temat molekularnego podłoża izolowanych rozszczepów obejmujących twarzową część czaszki, wciąż nie jest w pełni poznana. Przyczyną jest wieloczynnikowa etiologia, w której biorą udział zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe, w tym zależna od populacji heterogenność pod względem genów kandydackich oraz ich wariantów nukleotydowych (ang. *locus and allelic heterogenity*), a także udział epistatycznych interakcji między genami oraz oddziaływań gen-środowisko.

Znaczący wpływ na identyfikację czynników genetycznych związanych z etiopatogenezą izolowanych rozszczepów miały badania asocjacyjne w skali całego genomu, wykorzystujące technologię mikromacierzową GWAS (ang. *Genome-Wide Association Study)*. Pozwoliły one na identyfikację częstych wariantów nukleotydowych, mogących zwiększać ryzyko wystąpienia izolowanego rozszczepu. Jednak wykryte warianty są zlokalizowane głównie w sekwencjach niekodujących, a ich związek z fenotypem wady rozszczepowej może wynikać ze sprzężenia z prawdziwym, jeszcze niezidentyfikowanym wariantem patogennym. Dlatego zaczęto sugerować, że rzadkie, patogenne warianty nukleotydowe zlokalizowane w sekwencjach kodujących genów, a więc mających bezpośredni wpływ na kodowane białko, mogą leżeć u molekularnego podłoża tych anomalii rozwojowych. Dynamiczny rozwój wysokoprzepustowych technik sekwencjonowania, daje możliwość identyfikacji tego rodzaju zmian.

Dlatego też głównym założeniem prezentowanej pracy była identyfikacja rzadkich oraz nowych, nieopisanych dotąd wariantów nukleotydowych , które mogą być przyczyną lub też zwiększać ryzyko izolowanych wad rozszczepowych. W tym celu zaprojektowano panel wad rozwojowych twarzy, obejmujący pełną eksomową sekwencję 424 genów i 61 wariantów nukleotydowych o całkowitej wielkości 1614841 pz = 1,6 Mpz. Do analizy sekwencji kodującej genów włączonych do panelu wykorzystano

metodę wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji (NGS - ang. *Next Generation Sequencing*). Zaprojektowany panel obejmował geny, dla których związek z izolowanymi postaciami rozszczepu został już udokumentowany oraz takie, które nie były dotychczas analizowane w kontekście tych anomalii rozwojowych. Analiza genetyczna objęła w sumie 150 pacjentów, w tym 105 z nsCL/P oraz 45 z nsCP.

Zastosowana metoda umożliwiła identyfikację potencjalnie patogennych wariantów u 35 (23%) pacjentów. Wśród wykrytych 41 heterozygotycznych zmian, zidentyfikowano 34 wariantów zmiany sensu oraz 5 wariantów typu *nonsense*. Pozostałe warianty nukleotydowe to zmiana prowadząca do przesunięcia ramki odczytu, a także trójnukleotydowa hemizygotyczna delecja. Nowe, nieopisane dotąd w literaturze substytucje i delecje stanowiły 51% wszystkich powyższych zmian.

W wyniku przeprowadzonych analiz sekwencyjnych stwierdzono obecność potencjalnie patogennych wariantów w najważniejszym genie dla izolowanych rozszczepów - *IRF6*, a także w znanych genach kandydackich związanych z tą wadą rozwojową tj. *ARHGAP29, ESRP2, FGFR3, FGF4, PLEKHA5, SHH, SKI, TOX3* oraz *TRPS1*. Potwierdzono tym samym, że zaburzenia ich produktów ekspresji mogą odgrywać istotną rolę w etiopatogenezie opisywanych wad strukturalnych twarzoczaszki.

Wytypowano także nowe geny kandydackie, których warianty nukleotydowe są prawdopodobną molekularną przyczyną bądź możliwym czynnikiem zwiększającym ryzyko rozwoju wad rozszczepowych u analizowanych pacjentów. Nowe i rzadkie zmiany mogące mieć związek z etiologią nsCL/P zidentyfikowano w genach *ADK, BMPR1A, COL8A1, COL9A1, COL11A1, COL17A1, CHD7, EDAR, EFTUD2, FGD1, KMT2D, LRP2* oraz *MAML1*.

Warianty nukleotydowe pełniące prawdopodobnie istotną rolę w patomechanizmie powstawania nsCP wykryto w genach *FGFR3, FLNB, LRP6, NHS, NIPBL, NOTCH2, SPRY2* oraz genach z rodziny WNT (*WNT5B, WNT10A, WNT10B*). Analiza genetyczna w tej grupie pacjentów umożliwiła także identyfikację patogennych wariantów genu *IRF6*, wskazując tym samym, że warianty te, mogą odgrywać istotną rolę w etiopatogenezie nie tylko nsCL/P, ale również rozszczepu samego podniebienia.

Wielogenowe panele oparte na technice NGS są wiarygodnym i skutecznym narzędziem do identyfikacji znanych i nowych, nieopisanych dotąd patogennych wariantów nukleotydowych.

Uzyskane wyniki poszerzają stan wiedzy na temat genetycznego podłoża izolowanych rozszczepów twarzoczaszki, a także mogą stanowić istotny wkład w rozwój poradnictwa genetycznego tych niezwykle złożonych anomalii rozwojowych.

8. Summary

Cleft lip with or without cleft palate (CL/P) or cleft palate only (CPO) is one of the most commonly observed congenital defects within the facial skeleton. It has been estimated that globally this congenital anomaly affects about 1 in every 700 children. In Poland, this defect occurs in approximately 1 in every 1000 live births. Data show that 70% of all CL/P and 50% of all CP are isolated forms.

Treatment of this congenital defect requires long-term, multi-specialist care. This malformation constitutes an extreme psychical discomfort for the patient, and increases the risk related with the occurrence of neoplastic diseases. What is more, the consequences associated with this deformation frequently include hearing loss and cardiovascular pathology.

It is well known that apart from environmental factors, genetic factors play a crucial role in the etiopathogenesis of non – syndromic cleft lip with or without cleft palate (nsCL/P) and non– syndromic cleft palate only (nsCPO) as well. However, despite numerous researches, the molecular background underlying this defect is still not completely understood. The above is related to multiple factors connected with the etiology of the defect, along with considerable genetic heterogeneity of this developmental anomaly.

The main objective of this doctoral dissertation was to identify new, previously undescribed pathogenic nucleotide variants in patients with nsCL/P and nsCP, as well as the analysis covering genotype-phenotype correlations. A gene panel for congenital facial defects has been created in order to conduct genetic tests. This panel covered 424 genes and 61 nucleotide variants, which have a documented association with cleft defects, or the ones that, based on the currently available data, can be taken into consideration as a factor participating in etiopathogenesis correlated with this developmental anomaly. the analysis including the whole coding sequence of selected genes covered 150 patients, 105 with nsCL/P and 45 with nsCP. Sequence changes have been identified using the NGS technology and the platform produced by the Illumina company.

This technique allowed the identification of likely pathogenic nucleotide variants in 24% of all patients, including 25 cases with nsCL/P and 10 with nsCP. Among the 41 detected variants, 21 changes were novel substitutions and deletions, previously not described in scientific literature.

The study enabled to reveal new, possible candidate genes for nsCP and nsCL/P. It has been shown that likely pathogenic variants identified within these genes can be engaged in the pathomechanism underlying the occurrence of isolated cleft anomalies. The eventual candidate genes for nsCL/P are *BMPR1A, COL8A1, COL9A1, COL11A1, COL17A1, CHD7, EFTUD2, FGD, KMT2D, MAML1*. The candidate genes which can be involved in the pathogenesis of nsCP including *FGFR3, FLNB, LRP6, NHS, NIPBL, NOTCH2, SPRY2,* and the WNT family genes (*WNT5B, WNT10A, WNT10B*).

Furthermore, the study made it possible to identify the pathogenic variants within the known candidate genes for isolated orofacial clefts. It has been confirmed that *ARHGAP29, ESRP2, FGFR3, IRF6, PLEKHA5, SHH, SKI,* and *TRPS1* genes play a crucial role in the etiopathogenesis of craniofacial anomalies. Based on conducted genetic tests, it was stated that *IRF6* revealed a previously unknown relation with the pathogenesis of the cleft palate only. Interestingly, previous studies have demonstrated an association only between *IRF6* and nsCL/P.

NGS-based multi-gene panels are a perfect tool to identify new, previously undescribed nucleotide variants. This may undoubtedly contribute to substantial progress leading to a complete understanding of the genetic basis of multifactorial diseases, including isolated craniofacial anomalies, and would let to improve genetic counseling of this highly heterogeneous anomaly.

9. Piśmiennictwo

[1] F. Rahimov, A. Jugessur, i J. C. Murray, „Genetics of nonsyndromic orofacial clefts.", *Cleft palate-craniofacial J. Off. Publ. Am. Cleft Palate-Craniofacial Assoc.*, t. 49, nr 1, ss. 73–91, sty. 2012.

[2] „Strona główna | Katedra i Zakład Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu". [Online]. Dostępne na: http://www.rejestrwad.pl/. [Udostępniono: 13-cze-2020].

[3] M. L. Marazita, „The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate", *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, t. 13, ss. 263–283, 2012.

[4] G. L. Wehby *i in.*, „Description of the methodology used in an ongoing pediatric care interventional study of children born with cleft lip and palate in South America [NCT00097149].", *BMC Pediatr.*, t. 6, s. 9, mar. 2006.

[5] K. Christensen, K. Juel, A. M. Herskind, i J. C. Murray, „Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth.", *BMJ*, t. 328, nr 7453, s. 1405, cze. 2004.

[6] G. L. Wehby i C. H. Cassell, „The impact of orofacial clefts on quality of life and healthcare use and costs.", *Oral Dis.*, t. 16, nr 1, ss. 3–10, sty. 2010.

[7] P. Nopoulos, D. R. Langbehn, J. Canady, V. Magnotta, i L. Richman, „Abnormal brain structure in children with isolated clefts of the lip or palate", *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, t. 161, nr 8, ss. 753–758, 2007.

[8] J. L. Zhu, O. Basso, H. Hasle, J. F. Winther, J. H. Olsen, i J. Olsen, „Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? A nationwide study in Denmark.", *Br. J. Cancer*, t. 87, nr 5, ss. 524–528, sie. 2002.

[9] C. Bille, L. B. Knudsen, i K. Christensen, „Changing lifestyles and oral clefts occurrence in Denmark.", *Cleft palate-craniofacial J. Off. Publ. Am. Cleft Palate-Craniofacial Assoc.*, t. 42, nr 3, ss. 255–259, maj 2005.

[10] R. Menezes *i in.*, „AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer.", *J. Am. Dent. Assoc.*, t. 140, nr 1, ss. 80–84, sty. 2009.

[11] A. Dietz, D. A. Pedersen, R. Jacobsen, G. L. Wehby, J. C. Murray, i K. Christensen, „Risk of breast cancer in families with cleft lip and palate.", *Ann. Epidemiol.*, t. 22, nr 1, ss. 37–42, sty. 2012.

[12] M. J. Dixon, M. L. Marazita, T. H. Beaty, i J. C. Murray, „Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences", *Nat. Rev. Genet.*, t. 12, nr 3, ss. 167–178, mar. 2011.

[13] E. J. Leslie i M. L. Marazita, „Genetics of Cleft Lip and Cleft Palate", *Am. J. Med. Genet. Part C (Seminars Med. Genet.*, t. 163, nr 4, ss. 246–258, lis. 2013.

[14] M. L. Marazita i M. P. Mooney, „Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate.", *Clin. Plast. Surg.*, t. 31, nr 2, ss. 125–140, kwi. 2004.

[15] B. Racka, „Ocena wybranych struktur kostnych twa rzowej części czaszki i warunków zgryzowych u pacjentów z rozszczepem podniebienia wtórnego leczonych chirurgicznie we wczesnym dzieciństwie.", *Pr. Doktorska, Gdańsk*, 2013.

[16] „Joanna Parulska-Guzewicz Ocena warunków anatomicznych twarzowej części czaszki oraz zmian wewnątrzustnych u pacjentów z całkowitymi obustronnymi rozszczepami podniebienia pierwotnego i wtórnego przed wdrożeniem leczenia ortodontycznego G DAŃSK 2016", 2016.

[17] L. Merritt, „Part 1. Understanding the embryology and genetics of cleft lip and palate.", *Adv. neonatal care Off. J. Natl. Assoc. Neonatal Nurses*, t. 5, nr 2, ss. 64–71, kwi. 2005.

[18] A. Gritli-Linde, „Molecular control of secondary palate development.", *Dev. Biol.*, t. 301, nr 2, ss. 309–326, sty. 2007.

[19] R. Jiang, J. O. Bush, i A. C. Lidral, „Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms.", *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, t. 235, nr 5, ss. 1152–1166, maj 2006.

[20] A. Jugessur i J. C. Murray, „Orofacial clefting: recent insights into a complex trait.", *Curr. Opin.*

Genet. Dev., t. 15, nr 3, ss. 270–278, cze. 2005.

[21] E. W. Harville, A. J. Wilcox, R. T. Lie, H. Vindenes, i F. Abyholm, „Cleft lip and palate versus cleft lip only: are they distinct defects?", *Am. J. Epidemiol.*, t. 162, nr 5, ss. 448–453, wrz. 2005.

[22] P. A. Mossey, J. Little, R. G. Munger, M. J. Dixon, i W. C. Shaw, „Cleft lip and palate.", *Lancet (London, England)*, t. 374, nr 9703, ss. 1773–85, lis. 2009.

[23] A. Jugessur, P. G. Farlie, i N. Kilpatrick, „The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes.", *Oral Dis.*, t. 15, nr 7, ss. 437–453, paź. 2009.

[24] J. C. Murray, „Gene/environment causes of cleft lip and/or palate.", *Clin. Genet.*, t. 61, nr 4, ss. 248–56, kwi. 2002.

[25] F. Carinci *i in.*, „Recent developments in orofacial cleft genetics.", *J. Craniofac. Surg.*, t. 14, nr 2, ss. 130–143, mar. 2003.

[26] D. Grosen *i in.*, „A cohort study of recurrence patterns among more than 54,000 relatives of oral cleft cases in Denmark: support for the multifactorial threshold model of inheritance.", *J. Med. Genet.*, t. 47, nr 3, ss. 162–168, mar. 2010.

[27] F. Rahimov *i in.*, „Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip.", *Nat. Genet.*, t. 40, nr 11, ss. 1341–7, lis. 2008.

[28] K. U. Ludwig *i in.*, „Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci", *Nat. Genet.*, t. 44, nr 9, ss. 968–971, wrz. 2012.

[29] J. Bardach i W. Perczyńska-Partyka, „[Surgical and orthodontic treatment of the upper lip, alveolar process and palatal clefts].", *Czas. Stomatol.*, t. 21, nr 6, ss. 615–621, cze. 1968.

[30] M. L. Marazita *i in.*, „Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results.", *Hum. Hered.*, t. 68, nr 3, ss. 151–170, 2009.

[31] A. B. Burdick, „Genetic epidemiology and control of genetic expression in van der Woude syndrome.", *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol. Suppl.*, t. 2, ss. 99–105, 1986.

[32] A. B. Burdick, D. Bixler, i C. L. Puckett, „Genetic analysis in families with van der Woude syndrome.", *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, t. 5, nr 2, ss. 181–208, 1985.

[33] A. K. Lam, D. J. David, G. C. Townsend, i P. J. Anderson, „Van der Woude syndrome: dentofacial features and implications for clinical practice.", *Aust. Dent. J.*, t. 55, nr 1, ss. 51–58, mar. 2010.

[34] S. Kondo *i in.*, „Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes.", *Nat. Genet.*, t. 32, nr 2, ss. 285–9, paź. 2002.

[35] R. J. Gorlin, H. O. Sedano, i J. Cervenka, „Popliteal pterygium syndrome . A syndrome comprising cleft lip-palate, popliteal and intercrural pterygia, digital and genital anomalies.", *Pediatrics*, t. 41, nr 2, ss. 503–509, luty 1968.

[36] G. Dewinter, M. Quirynen, K. Heidbüchel, A. Verdonck, G. Willems, i C. Carels, „Dental abnormalities, bone graft quality, and periodontal conditions in patients with unilateral cleft lip and palate at different phases of orthodontic treatment.", *Cleft palate-craniofacial J. Off. Publ. Am. Cleft Palate-Craniofacial Assoc.*, t. 40, nr 4, ss. 343–350, lip. 2003.

[37] Y. Shapira, E. Lubit, i M. M. Kuftinec, „Hypodontia in children with various types of clefts.", *Angle Orthod.*, t. 70, nr 1, ss. 16–21, luty 2000.

[38] A. D. Gaczkowska, P. P. Jagodziński, i A. Mostowska, „The molecular basis of non-syndromic orofacial clefts and tooth agenesis", *J. Med. Sci.*, t. 86, nr 4, s. 321, 2018.

[39] B. L. Jensen, S. Kreiborg, E. Dahl, i P. Fogh-Andersen, „Cleft lip and palate in Denmark, 1976-1981: epidemiology, variability, and early somatic development.", *Cleft Palate J.*, t. 25, nr 3, ss. 258–269, lip. 1988.

[40] K. K. H. Gundlach i C. Maus, „Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and

world-wide.”, *J. cranio-maxillo-facial Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-Facial Surg.*, t. 34 Suppl 2, ss. 1–2, wrz. 2006.

[41] R. Bomprezzi, P. E. Kovanen, i R. Martin, „New approaches to investigating heterogeneity in complex traits.”, *J. Med. Genet.*, t. 40, nr 8, ss. 553–559, sie. 2003.

[42] M. A. Honein, O. Devine, S. D. Grosse, i J. Reefhuis, „Prevention of orofacial clefts caused by smoking: implications of the Surgeon General’s report.”, *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, t. 100, nr 11, ss. 822–825, lis. 2014.

[43] C. M. Kummet *i in.*, „Passive Smoke Exposure as a Risk Factor for Oral Clefts-A Large International Population-Based Study.”, *Am. J. Epidemiol.*, t. 183, nr 9, ss. 834–841, maj 2016.

[44] L. A. DeRoo *i in.*, „Maternal alcohol binge-drinking in the first trimester and the risk of orofacial clefts in offspring: a large population-based pooling study.”, *Eur. J. Epidemiol.*, t. 31, nr 10, ss. 1021–1034, paź. 2016.

[45] I. P. Krapels, C. Vermeij-Keers, M. Müller, A. de Klein, i R. P. Steegers-Theunissen, „Nutrition and genes in the development of orofacial clefting.”, *Nutr. Rev.*, t. 64, nr 6, ss. 280–288, cze. 2006.

[46] D. F. Wyszynski i T. H. Beaty, „Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts.”, *Teratology*, t. 53, nr 5, ss. 309–317, maj 1996.

[47] S. L. Carmichael, V. Nelson, G. M. Shaw, C. R. Wasserman, i L. A. Croen, „Socio-economic status and risk of conotruncal heart defects and orofacial clefts.”, *Paediatr. Perinat. Epidemiol.*, t. 17, nr 3, ss. 264–271, lip. 2003.

[48] J. D. Clark, P. A. Mossey, L. Sharp, i J. Little, „Socioeconomic status and orofacial clefts in Scotland, 1989 to 1998.”, *Cleft palate-craniofacial J. Off. Publ. Am. Cleft Palate-Craniofacial Assoc.*, t. 40, nr 5, ss. 481–485, wrz. 2003.

[49] J. Yang, S. L. Carmichael, M. Canfield, J. Song, i G. M. Shaw, „Socioeconomic status in relation to selected birth defects in a large multicentered US case-control study.”, *Am. J. Epidemiol.*, t. 167, nr 2, ss. 145–154, sty. 2008.

[50] J. Little i E. Bryan, „Congenital anomalies in twins.”, *Semin. Perinatol.*, t. 10, nr 1, ss. 50–64, sty. 1986.

[51] A. Sivertsen *i in.*, „Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives.”, *BMJ*, t. 336, nr 7641, ss. 432–434, luty 2008.

[52] T. Tamura, H. Yanai, D. Savitsky, i T. Taniguchi, „The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis.”, *Annu. Rev. Immunol.*, t. 26, ss. 535–584, 2008.

[53] C. R. Ingraham *i in.*, „Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6).”, *Nat. Genet.*, t. 38, nr 11, ss. 1335–1340, lis. 2006.

[54] R. J. Richardson *i in.*, „Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch.”, *Nat. Genet.*, t. 38, nr 11, ss. 1329–1334, lis. 2006.

[55] C. M. Bailey, D. E. Abbott, N. V Margaryan, Z. Khalkhali-Ellis, i M. J. C. Hendrix, „Interferon regulatory factor 6 promotes cell cycle arrest and is regulated by the proteasome in a cell cycle-dependent manner.”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 28, nr 7, ss. 2235–2243, kwi. 2008.

[56] A. Jugessur *i in.*, „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.”, *Genet. Epidemiol.*, t. 32, nr 5, ss. 413–424, lip. 2008.

[57] M. Ghassibé *i in.*, „Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population.”, *Eur. J. Hum. Genet.*, t. 13, nr 11, ss. 1239–1242, lis. 2005.

[58] S. H. Blanton, A. Cortez, S. Stal, J. B. Mulliken, R. H. Finnell, i J. T. Hecht, „Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate.”, *Am. J. Med. Genet. A*, t. 137A, nr 3, ss. 259–262, wrz. 2005.

[59] L. Scapoli *i in.*, „Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population.”, *Am. J. Hum. Genet.*, t. 76, nr 1, ss. 180–183, sty. 2005.

[60] X. Du *i in.*, „Novel IRF6 mutations in Chinese patients with Van der Woude syndrome.”, *J. Dent. Res.*, t. 85, nr 10, ss. 937–940, paź. 2006.

[61] A. Mostowska, K. K. Hozyasz, P. Wojcicki, B. Biedziak, P. Paradowska, i P. P. Jagodzinski, „Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the polish population.”, *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, t. 88, nr 7, ss. 538–545, lip. 2010.

[62] J. W. Park *i in.*, „Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations.”, *Genet. Med.*, t. 9, nr 4, ss. 219–227, kwi. 2007.

[63] S. Birnbaum *i in.*, „Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24”, *Nat. Genet.*, t. 41, nr 4, ss. 473–477, kwi. 2009.

[64] S. F. A. Grant *i in.*, „A Genome-Wide Association Study Identifies a Locus for Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate on 8q24”, *J. Pediatr.*, t. 155, nr 6, ss. 909–913, grudz. 2009.

[65] T. H. Beaty *i in.*, „A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4”, *Nat. Genet.*, t. 42, nr 6, ss. 525–529, cze. 2010.

[66] E. Mangold *i in.*, „Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate”, *Nat. Genet.*, t. 42, nr 1, ss. 24–26, sty. 2010.

[67] C. A. Haiman *i in.*, „Multiple regions within 8q24 independently affect risk for prostate cancer.”, *Nat. Genet.*, t. 39, nr 5, ss. 638–644, maj 2007.

[68] B. W. Zanke *i in.*, „Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24.”, *Nat. Genet.*, t. 39, nr 8, ss. 989–994, sie. 2007.

[69] M. S. Haerian, L. Baum, i B. S. Haerian, „Association of 8q24.21 loci with the risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis.”, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, t. 26, nr 10, ss. 1475–1484, paź. 2011.

[70] L. A. Kiemeney *i in.*, „Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer.”, *Nat. Genet.*, t. 40, nr 11, ss. 1307–1312, lis. 2008.

[71] D. F. Easton *i in.*, „Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci.”, *Nature*, t. 447, nr 7148, ss. 1087–1093, cze. 2007.

[72] T. Ozawa *i in.*, „CCAT1 and CCAT2 long noncoding RNAs, located within the 8q.24.21 «gene desert», serve as important prognostic biomarkers in colorectal cancer.”, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, t. 28, nr 8, ss. 1882–1888, sie. 2017.

[73] J. Sotelo *i in.*, „Long-range enhancers on 8q24 regulate c-Myc.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 107, nr 7, ss. 3001–3005, luty 2010.

[74] A. Bellmeyer, J. Krase, J. Lindgren, i C. LaBonne, „The protooncogene c-myc is an essential regulator of neural crest formation in xenopus.”, *Dev. Cell*, t. 4, nr 6, ss. 827–839, cze. 2003.

[75] K. Wei, J. Chen, K. Akrami, G. C. Galbraith, I. A. Lopez, i F. Chen, „Neural crest cell deficiency of c-myc causes skull and hearing defects.”, *Genesis*, t. 45, nr 6, ss. 382–390, cze. 2007.

[76] „Welcome | FaceBase”. [Online]. Dostępne na: https://www.facebase.org/. [Udostępniono: 25-cze-2020].

[77] E. J. Leslie *i in.*, „Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic orofacial clefts identify novel associations between FOXE1 and all orofacial clefts, and TP63 and cleft lip with or without cleft palate”, *Hum. Genet.*, t. 136, nr 3, ss. 275–286, mar. 2017.

[78] W. Liu *i in.*, „Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice.”, *Development*, t. 132, nr 6, ss. 1453–1461, mar. 2005.

[79] A. Mostowska *i in.*, „Common variants in DLG1 locus are associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate”, *Clin. Genet.*, t. 93, nr 4, ss. 784–793, kwi. 2018.

[80] A. Gaczkowska *i in.*, „Association of CDKAL1 nucleotide variants with the risk of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate”, *J. Hum. Genet.*, t. 63, nr 4, ss. 397–406, kwi. 2018.

[81] D. F. Woods, C. Hough, D. Peel, G. Callaini, i P. J. Bryant, „Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in Drosophila epithelia.”, *J. Cell Biol.*, t. 134, nr 6, ss. 1469–1482, wrz. 1996.

[82] T. Yamanaka i S. Ohno, „Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth.”, *Front. Biosci.*, t. 13, ss. 6693–6707, maj 2008.

[83] G. Caruana i A. Bernstein, „Craniofacial dysmorphogenesis including cleft palate in mice with an insertional mutation in the discs large gene.”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 21, nr 5, ss. 1475–1483, mar. 2001.

[84] A. Iizuka-Kogo, T. Ishidao, T. Akiyama, i T. Senda, „Abnormal development of urogenital organs in Dlgh1-deficient mice.”, *Development*, t. 134, nr 9, ss. 1799–1807, maj 2007.

[85] A. Iizuka-Kogo *i in.*, „Requirement of DLG1 for cardiovascular development and tissue elongation during cochlear, enteric, and skeletal development: possible role in convergent extension.”, *PLoS One*, t. 10, nr 4, s. e0123965, 2015.

[86] R. S. Seelan *i in.*, „Requirement for Dlgh-1 in Planar Cell Polarity and Skeletogenesis during Vertebrate Development”, *Development*, t. 134, nr 1, ss. 6693–6707, maj 2013.

[87] D. Qian *i in.*, „Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice.”, *Dev. Biol.*, t. 306, nr 1, ss. 121–133, cze. 2007.

[88] F. He *i in.*, „Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development.”, *Development*, t. 135, nr 23, ss. 3871–3879, grudz. 2008.

[89] A. L. Petrin, S. Daack-Hirsch, J. L’Heureux, i J. C. Murray, „A case of 3q29 microdeletion syndrome involving oral cleft inherited from a nonaffected mosaic parent: molecular analysis and ethical implications.”, *Cleft palate-craniofacial J. Off. Publ. Am. Cleft Palate-Craniofacial Assoc.*, t. 48, nr 2, ss. 222–230, mar. 2011.

[90] T. Okamura *i in.*, „Deletion of CDKAL1 affects high-fat diet-induced fat accumulation and glucose-stimulated insulin secretion in mice, indicating relevance to diabetes.”, *PLoS One*, t. 7, nr 11, s. e49055, 2012.

[91] A. Ragvin *i in.*, „Long-range gene regulation links genomic type 2 diabetes and obesity risk regions to HHEX, SOX4, and IRX3.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 107, nr 2, ss. 775–780, sty. 2010.

[92] M. W. Schilham, P. Moerer, A. Cumano, i H. C. Clevers, „Sox-4 facilitates thymocyte differentiation.”, *Eur. J. Immunol.*, t. 27, nr 5, ss. 1292–1295, maj 1997.

[93] M. Cheung, M. Abu-Elmagd, H. Clevers, i P. J. Scotting, „Roles of Sox4 in central nervous system development.”, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, t. 79, nr 1–2, ss. 180–191, cze. 2000.

[94] V. Lefebvre i P. Bhattaram, „SOXC Genes and the Control of Skeletogenesis.”, *Curr. Osteoporos. Rep.*, t. 14, nr 1, ss. 32–38, luty 2016.

[95] R. S. Seelan, P. Mukhopadhyay, D. R. Warner, C. L. Webb, M. Pisano, i R. M. Greene, „Epigenetic regulation of Sox4 during palate development.”, *Epigenomics*, t. 5, nr 2, ss. 131–146, kwi. 2013.

[96] E. Pak i R. A. Segal, „Hedgehog Signal Transduction: Key Players, Oncogenic Drivers, and Cancer Therapy.”, *Dev. Cell*, t. 38, nr 4, ss. 333–344, sie. 2016.

[97] D. M. Ornitz i N. Itoh, „The Fibroblast Growth Factor signaling pathway.”, *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, t. 4, nr 3, ss. 215–266, 2015.

[98] K. Schlessinger, A. Hall, i N. Tolwinski, „Wnt signaling pathways meet Rho GTPases”, *Genes Dev.*, t. 23, nr 3, ss. 265–277, luty 2009.

[99] M. Wan i X. Cao, „BMP signaling in skeletal development.", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, t. 328, nr 3, ss. 651–657, mar. 2005.

[100] L. Meng, Z. Bian, R. Torensma, i J. W. Von den Hoff, „Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate.", *J. Dent. Res.*, t. 88, nr 1, ss. 22–33, sty. 2009.

[101] R. M. Greene i M. M. Pisano, „Palate morphogenesis: Current understanding and future directions", *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.*, t. 90, nr 2, ss. 133–154, 2010.

[102] A. B. Roberts i M. B. Sporn, „Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta).", *Growth Factors*, t. 8, nr 1, ss. 1–9, 1993.

[103] S. Barr *i in.*, „Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to- mesenchymal-like transitions", *Clin. Exp. Metastasis*, t. 25, nr 6, ss. 685–693, 2008.

[104] S. A. Mani *i in.*, „Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 104, nr 24, ss. 10069–10074, cze. 2007.

[105] A. Bruna *i in.*, „High TGFβ-Smad Activity Confers Poor Prognosis in Glioma Patients and Promotes Cell Proliferation Depending on the Methylation of the PDGF-B Gene", *Cancer Cell*, t. 11, nr 2, ss. 147–160, 2007.

[106] C. Bille, J. F. Winther, A. Bautz, J. C. Murray, J. Olsen, i K. Christensen, „Cancer risk in persons with oral cleft - A population-based study of 8,093 cases", *Am. J. Epidemiol.*, t. 161, nr 11, ss. 1047–1055, 2005.

[107] T. Frebourg *i in.*, „Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer.", *J. Med. Genet.*, t. 43, nr 2, ss. 138–142, luty 2006.

[108] S. Hansford *i in.*, „Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome CDH1 Mutations and Beyond", *JAMA Oncol*, t. 1, nr 1, ss. 23–32, 2015.

[109] G. Corso, M. Intra, • Chiara Trentin, P. Veronesi, i V. Galimberti, „CDH1 germline mutations and hereditary lobular breast cancer", *Fam. Cancer*, t. 15, 2016.

[110] F. Obermair *i in.*, „Cleft lip/palate and hereditary diffuse gastric cancer: report of a family harboring a CDH1 c.687 + 1G > A germline mutation and review of the literature.", *Fam. Cancer*, t. 18, nr 2, ss. 253–260, kwi. 2019.

[111] A. Letra, R. Menezes, J. M. Granjeiro, i A. R. Vieira, „AXIN2 and CDH1 polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts.", *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, t. 85, nr 2, ss. 169–173, luty 2009.

[112] Y. Song i S. Zhang, „Association of CDH1 promoter polymorphism and the risk of non-syndromic orofacial clefts in a Chinese Han population.", *Arch. Oral Biol.*, t. 56, nr 1, ss. 68–72, sty. 2011.

[113] D. J. Hunter *i in.*, „A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer", *Nat. Genet.*, t. 39, nr 7, ss. 870–874, 2007.

[114] M. R. Stratton i N. Rahman, „The emerging landscape of breast cancer susceptibility", *Nat. Genet.*, t. 40, nr 1, ss. 17–22, 2008.

[115] S. Ahmed *i in.*, „Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2.", *Nat. Genet.*, t. 41, nr 5, ss. 585–590, maj 2009.

[116] M. Garcia-Closas *i in.*, „Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility loci by clinical and pathological characteristics.", *PLoS Genet.*, t. 4, nr 4, s. e1000054, kwi. 2008.

[117] M. Ghoussaini *i in.*, „Multiple loci with different cancer specificities within the 8q24 gene desert.", *J. Natl. Cancer Inst.*, t. 100, nr 13, ss. 962–966, lip. 2008.

[118] M. M. Pomerantz *i in.*, „The 8q24 cancer risk variant rs6983267 shows long-range interaction with MYC in colorectal cancer.", *Nat. Genet.*, t. 41, nr 8, ss. 882–884, sie. 2009.

[119] T. Ripperger, D. Gadzicki, A. Meindl, i B. Schlegelberger, „Breast cancer susceptibility: current

knowledge and implications for genetic counselling.”, *Eur. J. Hum. Genet.*, t. 17, nr 6, ss. 722–731, cze. 2009.

[120] G. Thomas *i in.*, „A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1).”, *Nat. Genet.*, t. 41, nr 5, ss. 579–584, maj 2009.

[121] E. L. Goode *i in.*, „A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ovarian cancer at 2q31 and 8q24.”, *Nat. Genet.*, t. 42, nr 10, ss. 874–879, paź. 2010.

[122] A. Latif *i in.*, „Breast cancer susceptibility variants alter risks in familial disease.”, *J. Med. Genet.*, t. 47, nr 2, ss. 126–131, luty 2010.

[123] C. Turnbull *i in.*, „Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci.”, *Nat. Genet.*, t. 42, nr 6, ss. 504–507, cze. 2010.

[124] N. J. Marini, K. Asrani, W. Yang, J. Rine, i G. M. Shaw, „Accumulation of rare coding variants in genes implicated in risk of human cleft lip with or without cleft palate”, *Am. J. Med. Genet. Part A*, t. 179, nr 7, ss. 1260–1269, 2019.

[125] D. Grosen *i in.*, „Risk of oral clefts in twins.”, *Epidemiology*, t. 22, nr 3, ss. 313–319, maj 2011.

[126] P. Stanier i G. E. Moore, „Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts”.

[127] L. Stuppia *i in.*, „Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate.”, *J. Craniofac. Surg.*, t. 22, nr 5, ss. 1722–1726, wrz. 2011.

[128] M. Basha *i in.*, „Whole exome sequencing identifies mutations in 10% of patients with familial non-syndromic cleft lip and/or palate in genes mutated in well-known syndromes.”, *J. Med. Genet.*, t. 55, nr 7, ss. 449–458, lip. 2018.

[129] L. E. Mitchell i N. Risch, „Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis.”, *Am. J. Hum. Genet.*, t. 51, nr 2, ss. 323–332, sie. 1992.

[130] J. H. Nadeau, „Modifier genes in mice and humans.”, *Nat. Rev. Genet.*, t. 2, nr 3, ss. 165–174, mar. 2001.

[131] A. Aylward, Y. Cai, A. Lee, E. Blue, D. Rabinowitz, i J. J. Haddad, „Using Whole Exome Sequencing to Identify Candidate Genes With Rare Variants In Nonsyndromic Cleft Lip and Palate.”, *Genet. Epidemiol.*, t. 40, nr 5, ss. 432–441, lip. 2016.

[132] V. E. Morris *i in.*, „Evidence for craniofacial enhancer variation underlying nonsyndromic cleft lip and palate.”, *Hum. Genet.*, t. 139, nr 10, ss. 1261–1272, paź. 2020.

[133] G. C. Sharp *i in.*, „Distinct DNA methylation profiles in subtypes of orofacial cleft.”, *Clin. Epigenetics*, t. 9, s. 63, 2017.

[134] G. C. Sharp, E. Stergiakouli, J. Sandy, i C. Relton, „Epigenetics and Orofacial Clefts: A Brief Introduction.”, *The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, t. 55, nr 6. United States, ss. 795–797, lip-2018.

[135] Y. Higuchi, K. Hasegawa, M. Yamashita, H. Tanaka, i H. Tsukahara, „A novel mutation in the COL2A1 gene in a patient with Stickler syndrome type 1: a case report and review of the literature.”, *J. Med. Case Rep.*, t. 11, nr 1, s. 237, sie. 2017.

[136] J. Čopíková *i in.*, „Expanding the phenotype spectrum associated with pathogenic variants in the COL2A1 and COL11A1 genes”, *Ann. Hum. Genet.*, t. 84, nr 5, ss. 380–392, 2020.

[137] T. H. Beaty *i in.*, „Confirming genes influencing risk to cleft lip with/without cleft palate in a case–parent trio study”, *Hum. Genet.*, t. 132, nr 7, ss. 771–781, lip. 2013.

[138] N. H. Robin, R. T. Moran, i L. Ala-Kokko, „Stickler Syndrome.”, M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, G. Mirzaa, i A. Amemiya, Red. Seattle (WA), 1993.

[139] M. Melkoniemi *i in.*, „Collagen XI sequence variations in nonsyndromic cleft palate, Robin sequence and micrognathia”, *Eur. J. Hum. Genet.*, t. 11, nr 3, ss. 265–270, 2003.

[140] J. Kroeger, E. Hoppe, C. Galiger, C. Has, i C. W. Franzke, „Amino acid substitution in the C-terminal domain of collagen XVII reduces laminin-332 interaction causing mild skin fragility with atrophic scarring”, *Matrix Biol.*, t. 80, ss. 72–84, 2019.

[141] I. Condrat, Y. He, R. Cosgarea, i C. Has, „Junctional epidermolysis bullosa: Allelic heterogeneity and mutation stratification for precision medicine”, *Front. Med.*, t. 6, nr JAN, sty. 2019.

[142] A. M. G. Pasmooij, H. H. Pas, G. H. L. Jansen, H. H. Lemmink, i M. F. Jonkman, „Localized and generalized forms of blistering in junctional epidermolysis bullosa due to COL17A1 mutations in the Netherlands.”, *Br. J. Dermatol.*, t. 156, nr 5, ss. 861–870, maj 2007.

[143] H. Schumann *i in.*, „Three novel homozygous point mutations and a new polymorphism in the COL17A1 gene: relation to biological and clinical phenotypes of junctional epidermolysis bullosa.”, *Am. J. Hum. Genet.*, t. 60, nr 6, ss. 1344–1353, cze. 1997.

[144] R. Varki, S. Sadowski, E. Pfendner, i J. Uitto, „Epidermolysis bullosa. I. Molecular genetics of the junctional and hemidesmosomal variants.”, *J. Med. Genet.*, t. 43, nr 8, ss. 641–652, sie. 2006.

[145] M. Floeth *i in.*, „Novel homozygous and compound heterozygous COL17A1 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa.”, *J. Invest. Dermatol.*, t. 111, nr 3, ss. 528–533, wrz. 1998.

[146] F. Liu *i in.*, „A Genome-Wide Association Study Identifies Five Loci Influencing Facial Morphology in Europeans”, *PLoS Genet.*, t. 8, nr 9, 2012.

[147] T. M. Zucchero *i in.*, „Interferon Regulatory Factor 6 (*IRF6*) Gene Variants and the Risk of Isolated Cleft Lip or Palate”, *N. Engl. J. Med.*, t. 351, nr 8, ss. 769–780, sie. 2004.

[148] M. Berdasco i M. Esteller, „Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes”, *Hum. Genet.*, t. 132, nr 4, ss. 359–383, 2013.

[149] C. M. van Ravenswaaij-Arts, M. Hefner, K. Blake, i D. M. Martin, „CHD7 Disorder.”, M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, G. Mirzaa, i A. Amemiya, Red. Seattle (WA), 1993.

[150] J. Puc i M. G. Rosenfeld, „SOX2 and CHD7 cooperatively regulate human disease genes.”, *Nature genetics*, t. 43, nr 6. United States, ss. 505–506, cze-2011.

[151] E. Engelen *i in.*, „Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes.”, *Nat. Genet.*, t. 43, nr 6, ss. 607–611, cze. 2011.

[152] M. A. Basson i C. van Ravenswaaij-Arts, „Functional Insights into Chromatin Remodelling from Studies on CHARGE Syndrome.”, *Trends Genet.*, t. 31, nr 10, ss. 600–611, paź. 2015.

[153] L. E. L. M. Vissers *i in.*, „Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome.”, *Nat. Genet.*, t. 36, nr 9, ss. 955–957, wrz. 2004.

[154] S. Marcos *i in.*, „The prevalence of CHD7 missense versus truncating mutations is higher in patients with Kallmann syndrome than in typical CHARGE patients.”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, t. 99, nr 10, ss. E2138-43, paź. 2014.

[155] C. F. Bartels, C. Scacheri, L. White, P. C. Scacheri, i S. Bale, „Mutations in the CHD7 gene: the experience of a commercial laboratory.”, *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, t. 14, nr 6, ss. 881–891, grudz. 2010.

[156] L. Raskin *i in.*, „Targeted sequencing of established and candidate colorectal cancer genes in the Colon Cancer Family Registry Cohort.”, *Oncotarget*, t. 8, nr 55, ss. 93450–93463, lis. 2017.

[157] Y. Kobayashi, S. Yang, K. Nykamp, J. Garcia, S. E. Lincoln, i S. E. Topper, „Pathogenic variant burden in the ExAC database: an empirical approach to evaluating population data for clinical variant interpretation.”, *Genome Med.*, t. 9, nr 1, s. 13, luty 2017.

[158] J. R. Howe *i in.*, „The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations.”, *J. Med. Genet.*, t. 41, nr 7, ss. 484–491, lip. 2004.

[159] X. P. Zhou *i in.*, „Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile

polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes.”, *Am. J. Hum. Genet.*, t. 69, nr 4, ss. 704–711, paź. 2001.

[160] D. Graf, Z. Malik, S. Hayano, i Y. Mishina, „Common mechanisms in development and disease: BMP signaling in craniofacial development.”, *Cytokine Growth Factor Rev.*, t. 27, ss. 129–139, luty 2016.

[161] N. Dewulf *i in.*, „Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis.”, *Endocrinology*, t. 136, nr 6, ss. 2652–2663, cze. 1995.

[162] J.-A. Baek, Y. Lan, H. Liu, K. M. Maltby, Y. Mishina, i R. Jiang, „Bmpr1a signaling plays critical roles in palatal shelf growth and palatal bone formation.”, *Dev. Biol.*, t. 350, nr 2, ss. 520–531, luty 2011.

[163] D. Lederer *i in.*, „Deletion of KDM6A, a histone demethylase interacting with MLL2, in three patients with Kabuki syndrome.”, *Am. J. Hum. Genet.*, t. 90, nr 1, ss. 119–124, sty. 2012.

[164] A. Shilatifard, „The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis.”, *Annu. Rev. Biochem.*, t. 81, ss. 65–95, 2012.

[165] M. P. Adam, L. Hudgins, i M. Hannibal, „Kabuki Syndrome.”, M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, G. Mirzaa, i A. Amemiya, Red. Seattle (WA), 1993.

[166] Y. Handa *i in.*, „Kabuki make-up syndrome (Niikawa-Kuroki syndrome) with cleft lip and palate.”, *J. cranio-maxillo-facial Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-Facial Surg.*, t. 19, nr 3, ss. 99–101, kwi. 1991.

[167] C. Lintas i A. M. Persico, „Unraveling molecular pathways shared by Kabuki and Kabuki-like syndromes.”, *Clin. Genet.*, t. 94, nr 3–4, ss. 283–295, paź. 2018.

[168] N. Bögershausen *i in.*, „RAP1-mediated MEK/ERK pathway defects in Kabuki syndrome.”, *J. Clin. Invest.*, t. 125, nr 9, ss. 3585–3599, wrz. 2015.

[169] P. M. Van Laarhoven *i in.*, „Kabuki syndrome genes KMT2D and KDM6A: functional analyses demonstrate critical roles in craniofacial, heart and brain development.”, *Hum. Mol. Genet.*, t. 24, nr 15, ss. 4443–4453, sie. 2015.

[170] J. Schwenty-Lara, D. Nehl, i A. Borchers, „The histone methyltransferase KMT2D, mutated in Kabuki syndrome patients, is required for neural crest cell formation and migration”, *Hum. Mol. Genet.*, t. 29, nr 2, ss. 305–319, 2020.

[171] J. Schwenty-Lara, A. Nürnberger, i A. Borchers, „Loss of function of Kmt2d, a gene mutated in Kabuki syndrome, affects heart development in Xenopus laevis.”, *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, t. 248, nr 6, ss. 465–476, cze. 2019.

[172] S. M. Shariat Razavi, M. M. Forghanifard, D. M. Kordi-Tamandani, i M. R. Abbaszadegan, „MAML1 regulates EMT markers expression through NOTCH-independent pathway in breast cancer cell line MCF7”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, t. 510, nr 3, ss. 376–382, 2019.

[173] W. D. Fakhouri *i in.*, „Intercellular Genetic Interaction between Irf6 and Twist1 during Craniofacial Development”, *Sci. Rep.*, t. 7, nr 1, ss. 1–14, 2017.

[174] 2017.oberta Quaranta, R1. R. Quaranta i in., „Maml1 acts cooperatively with Gli proteins to regulate sonic hedgehog signaling pathway”, Nat. Publ. Gr., t. 8 *i in.*, „Maml1 acts cooperatively with Gli proteins to regulate sonic hedgehog signaling pathway”, *Nat. Publ. Gr.*, t. 8, 2017.

[175] M. M. Forghanifard, S. Azaraz, S. Ardalan Khales, D. Morshedi Rad, i M. R. Abbaszadegan, „MAML1 promotes ESCC aggressiveness through upregulation of EMT marker TWIST1”, *Mol. Biol. Rep.*, t. 47, nr 4, ss. 2659–2668, 2020.

[176] S. Ardalan Khales, E. Ebrahimi, E. Jahanzad, S. Ardalan Khales, i M. M. Forghanifard, „MAML1 and TWIST1 co-overexpression promote invasion of head and neck squamous cell carcinoma”, *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.*, t. 14, nr 5, ss. e434–e441, 2018.

[177] J. D. Riordan i J. H. Nadeau, „From Peas to Disease: Modifier Genes, Network Resilience, and the

Genetics of Health.”, *Am. J. Hum. Genet.*, t. 101, nr 2, ss. 177–191, sie. 2017.

[178] E. J. Leslie *i in.*, „A multi-ethnic genome-wide association study identifies novel loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on 2p24.2, 17q23 and 19q13”, *Hum. Mol. Genet.*, t. 25, nr 13, ss. 2862–2872, mar. 2016.

[179] E. J. Leslie *i in.*, „Identified By Genome Wide Association on Chromosome 1P22”, ss. 1–18, 2013.

[180] C. P. Savastano *i in.*, „Impact of rare variants in ARHGAP29 to the etiology of oral clefts: role of loss-of-function vs missense variants”, *Clin. Genet.*, t. 91, nr 5, ss. 683–689, 2017.

[181] H. Liu *i in.*, „Identification of common non-coding variants at 1p22 that are functional for non-syndromic orofacial clefting”, *Nat. Commun.*, t. 8, ss. 1–13, 2017.

[182] V. Kaartinen *i in.*, „Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction.”, *Nat. Genet.*, t. 11, nr 4, ss. 415–421, grudz. 1995.

[183] D. F. Bueno *i in.*, „Human stem cell cultures from cleft lip/palate patients show enrichment of transcripts involved in extracellular matrix modeling by comparison to controls.”, *Stem cell Rev. reports*, t. 7, nr 2, ss. 446–457, cze. 2011.

[184] E. J. Leslie *i in.*, „Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome-wide association on chromosome 1p22”, *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.*, t. 94, nr 11, ss. 934–942, lis. 2012.

[185] H. Liu *i in.*, „Exome sequencing provides additional evidence for the involvement of *ARHGAP29* in Mendelian orofacial clefting and extends the phenotypic spectrum to isolated cleft palate”, *Birth Defects Res.*, t. 109, nr 1, ss. 27–37, sty. 2017.

[186] E. J. Leslie *i in.*, „Identification of functional variants for cleft lip with or without cleft palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by targeted sequencing of GWAS loci”, *Am. J. Hum. Genet.*, t. 96, nr 3, ss. 397–411, 2015.

[187] L. L. Cox *i in.*, „Mutations in the Epithelial Cadherin-p120-Catenin Complex Cause Mendelian Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate”, *Am. J. Hum. Genet.*, t. 102, nr 6, ss. 1143–1157, 2018.

[188] J. L. Gorski, L. Estrada, C. Hu, i Z. Liu, „Skeletal-specific expression of Fgd1 during bone formation and skeletal defects in faciogenital dysplasia (FGDY; Aarskog syndrome).”, *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, t. 218, nr 4, ss. 573–586, sie. 2000.

[189] K. Yanagi, T. Kaname, Y. Chinen, i K. Naritomi, „Novel alternative splicing of human faciogenital dysplasia 1 gene.”, *Congenit. Anom. (Kyoto).*, t. 44, nr 3, ss. 137–141, wrz. 2004.

[190] C. Völter, R. Martínez, R. Hagen, i W. Kress, „Aarskog-Scott syndrome: a novel mutation in the FGD1 gene associated with severe craniofacial dysplasia.”, *Eur. J. Pediatr.*, t. 173, nr 10, ss. 1373–1376, paź. 2014.

[191] J. L. Everson *i in.*, „Sonic hedgehog regulation of Foxf2 promotes cranial neural crest mesenchyme proliferation and is disrupted in cleft lip morphogenesis”, 2017.

[192] A. H. Monsoro-Burq, „PAX transcription factors in neural crest development.”, *Semin. Cell Dev. Biol.*, t. 44, ss. 87–96, sie. 2015.

[193] A. Baggiolini *i in.*, „Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo”, *Cell Stem Cell*, t. 16, nr 3, ss. 314–322, mar. 2015.

[194] E. Dupin i L. Sommer, „Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood.”, *Dev. Biol.*, t. 366, nr 1, ss. 83–95, cze. 2012.

[195] V. Metzis *i in.*, „Patched1 is required in neural crest cells for the prevention of orofacial clefts.”, *Hum. Mol. Genet.*, t. 22, nr 24, ss. 5026–5035, grudz. 2013.

[196] H. Kurosaka, A. Iulianella, T. Williams, i P. A. Trainor, „Disrupting hedgehog and WNT signaling

interactions promotes cleft lip pathogenesis.”, *J. Clin. Invest.*, t. 124, nr 4, ss. 1660–1671, kwi. 2014.

[197] Y. Lan, C. E. Ovitt, E.-S. Cho, K. M. Maltby, Q. Wang, i R. Jiang, „Odd-skipped related 2 (Osr2) encodes a key intrinsic regulator of secondary palate growth and morphogenesis.”, *Development*, t. 131, nr 13, ss. 3207–3216, lip. 2004.

[198] D. F. Bueno *i in.*, „Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly.”, *Nat. Genet.*, t. 14, nr 3, ss. 357–360, lis. 1996.

[199] M. L. Marazita *i in.*, „Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35.”, *Am. J. Hum. Genet.*, t. 75, nr 2, ss. 161–173, sie. 2004.

[200] M. Seppala, M. J. Depew, D. C. Martinelli, C.-M. Fan, P. T. Sharpe, i M. T. Cobourne, „Gas1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interacts with sonic hedgehog.”, *J. Clin. Invest.*, t. 117, nr 6, ss. 1575–1584, cze. 2007.

[201] M. A. Mansilla *i in.*, „Contributions of PTCH gene variants to isolated cleft lip and palate.”, *Cleft palate-craniofacial J. Off. Publ. Am. Cleft Palate-Craniofacial Assoc.*, t. 43, nr 1, ss. 21–29, sty. 2006.

[202] Y. Wang *i in.*, „The association study of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identified risk variants of the GLI3 gene in a Chinese population.”, *J. Genet.*, t. 96, nr 4, ss. 687–693, wrz. 2017.

[203] L. Bu *i in.*, „Novel evidence of association with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate was shown for single nucleotide polymorphisms in FOXF2 gene in an Asian population.”, *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, t. 103, nr 10, ss. 857–862, paź. 2015.

[204] I. M. Orioli, A. R. Vieira, E. E. Castilla, J. E. Ming, i M. Muenke, „Mutational analysis of the Sonic Hedgehog gene in 220 newborns with oral clefts in a South American (ECLAMC) population.”, *Am. J. Med. Genet.*, t. 108, nr 1, ss. 12–15, luty 2002.

[205] D. Hu, N. M. Young, X. Li, Y. Xu, B. Hallgrímsson, i R. S. Marcucio, „A dynamic Shh expression pattern, regulated by SHH and BMP signaling, coordinates fusion of primordia in the amniote face.”, *Development*, t. 142, nr 3, ss. 567–574, luty 2015.

[206] C. Li, Y. Lan, i R. Jiang, „Molecular and Cellular Mechanisms of Palate Development.”, *J. Dent. Res.*, t. 96, nr 11, ss. 1184–1191, paź. 2017.

[207] G. Proetzel *i in.*, „Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion.”, *Nat. Genet.*, t. 11, nr 4, ss. 409–414, grudz. 1995.

[208] Y. Sasaki, S. O’Kane, J. Dixon, M. J. Dixon, i M. W. J. Ferguson, „Temporal and spatial expression of Pax9 and Sonic hedgehog during development of normal mouse palates and cleft palates in TGF-beta3 null embryos.”, *Arch. Oral Biol.*, t. 52, nr 3, ss. 260–267, mar. 2007.

[209] A. del Río *i in.*, „Analysis of the presence of cell proliferation-related molecules in the Tgf-β3 null mutant mouse palate reveals misexpression of EGF and Msx-1.”, *Cells. Tissues. Organs*, t. 193, nr 3, ss. 135–150, 2011.

[210] H. A. Thomason *i in.*, „Cooperation between the transcription factors p63 and IRF6 is essential to prevent cleft palate in mice.”, *J. Clin. Invest.*, t. 120, nr 5, ss. 1561–1569, maj 2010.

[211] G. Ferone *i in.*, „Mutant p63 causes defective expansion of ectodermal progenitor cells and impaired FGF signalling in AEC syndrome.”, *EMBO Mol. Med.*, t. 4, nr 3, ss. 192–205, mar. 2012.

[212] D. A. Oner i H. Tastan, „Association Between the Transforming Growth Factor Beta 1 Gene Polymorphisms and Turkish Patients with Nonsyndromic Cleft Lip With/Without Cleft Palate.”, *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, t. 20, nr 5, ss. 265–268, maj 2016.

[213] S. L. Nasroen *i in.*, „TGFß3 / SfaN1 gene variant and the risk factor of nonsyndromic cleft palate only among Indonesian patients.”, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).*, t. 63, nr 2, ss. 88–91, luty 2017.

[214] J. Suazo *i in.*, „Screening of Transforming Growth Factor Beta 3 and Jagged2 Genes in the Malay

Population With Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate.", *Cleft palate-craniofacial J. Off. Publ. Am. Cleft Palate-Craniofacial Assoc.*, t. 100, nr 4, ss. e88-94, wrz. 2017.

[215] A. R. Vieira *i in.*, „Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate", *PLoS Genet.*, t. 1, nr 6, ss. 0651–0659, 2005.

[216] V. P. Eswarakumar, I. Lax, i J. Schlessinger, „Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors.", *Cytokine Growth Factor Rev.*, t. 16, nr 2, ss. 139–149, kwi. 2005.

[217] X. Nie, K. Luukko, i P. Kettunen, „FGF signalling in craniofacial development and developmental disorders.", *Oral Dis.*, t. 12, nr 2, ss. 102–111, mar. 2006.

[218] X. Nie, „Developmentally regulated expression of MSX1, MSX2 and Fgfs in the developing mouse cranial base.", *Angle Orthod.*, t. 76, nr 6, ss. 990–995, lis. 2006.

[219] R. Abu-Issa, G. Smyth, I. Smoak, K. Yamamura, i E. N. Meyers, „Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse.", *Development*, t. 129, nr 19, ss. 4613–4625, paź. 2002.

[220] N. Trokovic, R. Trokovic, P. Mai, i J. Partanen, „Fgfr1 regulates patterning of the pharyngeal region.", *Genes Dev.*, t. 17, nr 1, ss. 141–153, sty. 2003.

[221] E. Pauws i P. Stanier, „FGF signalling and SUMO modification: new players in the aetiology of cleft lip and/or palate.", *Trends Genet.*, t. 23, nr 12, ss. 631–640, grudz. 2007.

[222] B. M. Riley i J. C. Murray, „Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases.", *Am. J. Med. Genet. A*, t. 143A, nr 24, ss. 3228–3234, grudz. 2007.

[223] G. T. Raju, B. L V K S, V. B. Gurramkonda, S. A. Hussain, i S. F. D. Paul, „Genetic variations at 10q26 regions near FGFR2 gene and its association with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate.", *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, t. 143, s. 110648, kwi. 2021.

[224] A. Bureau *i in.*, „Whole Exome sequencing of distant relatives in multiplex families implicates rare variants in candidate genes for oral clefts", *Genetics*, t. 197, nr 3, ss. 1039–1044, lip. 2014.

[225] B. M. Riley *i in.*, „Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate", *Hum. Mol. Genet.*, t. 8, nr 1, ss. 4512–4517, mar. 2019.

[226] K. Y. Cho, B. P. Kelley, D. Monier, B. Lee, H. Szabo-Rogers, i D. Napierala, „TRPS1 regulates development of craniofacial skeleton and is required for the initiation of palatal shelves fusion", *Front. Physiol.*, t. 10, nr MAY, 2019.

[227] N. S. Mohamad Shah, S. Sulong, W. A. Wan Sulaiman, i A. S. Halim, „Two novel genes TOX3 and COL21A1 in large extended Malay families with nonsyndromic cleft lip and/or palate.", *Mol. Genet. genomic Med.*, t. 7, nr 5, s. e635, maj 2019.

[228] N. S. Mohamad Shah, I. Salahshourifar, S. Sulong, W. A. Wan Sulaiman, i A. S. Halim, „Discovery of candidate genes for nonsyndromic cleft lip palate through genome-wide linkage analysis of large extended families in the Malay population.", *BMC Genet.*, t. 17, s. 39, luty 2016.

[229] P.-H. Becker *i in.*, „Adenosine kinase deficiency: Three new cases and diagnostic value of hypermethioninemia.", *Mol. Genet. Metab.*, t. 132, nr 1, ss. 38–43, sty. 2021.

[230] G. Fatemifar *i in.*, „Genome-wide association study of primary tooth eruption identifies pleiotropic loci associated with height and craniofacial distances.", *Hum. Mol. Genet.*, t. 22, nr 18, ss. 3807–3817, wrz. 2013.

[231] M. K. Robinson *i in.*, „Variable expression pattern in Donnai-Barrow syndrome: Report of two novel LRP2 mutations and review of the literature.", *Eur. J. Med. Genet.*, t. 58, nr 5, ss. 293–299, maj 2015.

[232] M. K. Robinson, K. Coe, i W. T. Bradshaw, „A Case Report of Donnai-Barrow Syndrome.", *Adv. neonatal care Off. J. Natl. Assoc. Neonatal Nurses*, t. 21, nr 2, ss. 133–141, kwi. 2021.

[233] G. M. Xavier, M. Seppala, W. Barrell, A. A. Birjandi, F. Geoghegan, i M. T. Cobourne, „Hedgehog

receptor function during craniofacial development", 2016.

[234] A. Christ, K. Herzog, i T. E. Willnow, „LRP2, an auxiliary receptor that controls sonic hedgehog signaling in development and disease.", *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, t. 245, nr 5, ss. 569–579, maj 2016.

[235] S. Jia, J. Zhou, Y. Wee, M. L. Mikkola, P. Schneider, i R. N. D'Souza, „Anti-EDAR Agonist Antibody Therapy Resolves Palate Defects in Pax9-/- Mice", *J. Dent. Res.*, t. 96, nr 11, ss. 1282–1289, 2017.

[236] T. Okita *i in.*, „Functional studies for a dominant mutation in the EDAR gene responsible for hypohidrotic ectodermal dysplasia.", *J. Dent. Res.*, t. 41, nr 11, ss. 1282–1289, sie. 2019.

[237] A. Letra, R. Menezes, J. M. Granjeiro, i A. R. Vieira, „Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development.", *J. Dent. Res.*, t. 86, nr 10, ss. 986–991, paź. 2007.

[238] M. Phan *i in.*, „Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arms?", *Hum. Genet.*, t. 135, nr 12, ss. 1299–1327, grudz. 2016.

[239] T. N. Bartzela, C. E. L. Carels, E. M. Bronkhorst, i A. M. Kuijpers-Jagtman, „Tooth agenesis patterns in unilateral cleft lip and palate in humans.", *Arch. Oral Biol.*, t. 58, nr 6, ss. 596–602, cze. 2013.

[240] Y. Shimomura, N. Sato, A. Miyashita, T. Hashimoto, M. Ito, i R. Kuwano, „A rare case of hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by compound heterozygous mutations in the EDAR gene.", *J. Invest. Dermatol.*, t. 123, nr 4, ss. 649–655, paź. 2004.

[241] J. C. Lacour *i in.*, „Novel De Novo EFTUD2 Mutations in 2 Cases With MFDM, Initially Suspected to Have Alternative Craniofacial Diagnoses.", *Cleft palate-craniofacial J. Off. Publ. Am. Cleft Palate-Craniofacial Assoc.*, t. 56, nr 5, ss. 674–678, maj 2019.

[242] I. O. Lavrin, W. McLean, R. E. Seegmiller, B. R. Olsen, i E. D. Hay, „The mechanism of palatal clefting in the Col11a1 mutant mouse", *Arch. Oral Biol.*, t. 46, nr 9, ss. 865–869, 2001.

[243] N. Ishorst *i in.*, „Nonsyndromic cleft palate: An association study at GWAS candidate loci in a multiethnic sample", *Birth Defects Res.*, t. 110, nr 10, ss. 871–882, 2018.

[244] T. H. Beaty *i in.*, „Evidence for gene-environment interaction in a genome wide study of nonsyndromic cleft palate", *Genet. Epidemiol.*, t. 35, nr 6, ss. 469–478, 2011.

[245] E. J. Leslie *i in.*, „A Genome-wide Association Study of Nonsyndromic Cleft Palate Identifies an Etiologic Missense Variant in GRHL3", *Am. J. Hum. Genet.*, t. 98, nr 4, ss. 744–754, 2016.

[246] E. Mangold *i in.*, „Sequencing the GRHL3 Coding Region Reveals Rare Truncating Mutations and a Common Susceptibility Variant for Nonsyndromic Cleft Palate.", *Am. J. Hum. Genet.*, t. 98, nr 4, ss. 755–762, kwi. 2016.

[247] K. U. Ludwig *i in.*, „Imputation of Orofacial Clefting Data Identifies Novel Risk Loci and Sheds Light on the Genetic Background of Cleft Lip ± Cleft Palate and Cleft Palate Only.", *Hum. Mol. Genet.*, s. ddx012, sty. 2017.

[248] L. M. Moreno Uribe *i in.*, „A Population-Based Study of Effects of Genetic Loci on Orofacial Clefts.", *J. Dent. Res.*, t. 96, nr 11, ss. 1322–1329, paź. 2017.

[249] M. Martinelli, A. Palmieri, F. Carinci, i L. Scapoli, „Non-syndromic Cleft Palate: An Overview on Human Genetic and Environmental Risk Factors", *Front. Cell Dev. Biol.*, t. 8, nr October, paź. 2020.

[250] E. J. Leslie, J. Standley, J. Compton, S. Bale, B. C. Schutte, i J. C. Murray, „Comparative analysis of IRF6 variants in families with Van der Woude syndrome and popliteal pterygium syndrome using public whole-exome databases.", *Genet. Med.*, t. 15, nr 5, ss. 338–344, maj 2013.

[251] L. C. Biggs, L. Rhea, B. C. Schutte, i M. Dunnwald, „Interferon regulatory factor 6 is necessary, but not sufficient, for keratinocyte differentiation.", *J. Invest. Dermatol.*, t. 132, nr 1, ss. 50–58, sty. 2012.

[252] Y. Lan *i in.*, „Expression of Wnt9b and activation of canonical Wnt signaling during midfacial morphogenesis in mice.”, *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, t. 235, nr 5, ss. 1448–1454, maj 2006.

[253] P. Mani, A. Jarrell, J. Myers, i R. Atit, „Visualizing canonical Wnt signaling during mouse craniofacial development.”, *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, t. 239, nr 1, ss. 354–363, sty. 2010.

[254] A. Mostowska, K. K. Hozyasz, B. Biedziak, P. Wojcicki, M. Lianeri, i P. P. Jagodzinski, „Genotype and haplotype analysis of WNT genes in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate.”, *Eur. J. Oral Sci.*, t. 120, nr 1, ss. 1–8, luty 2012.

[255] C. Fontoura, R. M. Silva, J. M. Granjeiro, i A. Letra, „Association of WNT9B Gene Polymorphisms With Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Brazilian Nuclear Families.”, *Cleft palate-craniofacial J. Off. Publ. Am. Cleft Palate-Craniofacial Assoc.*, t. 52, nr 1, ss. 44–48, sty. 2015.

[256] R. Menezes *i in.*, „Studies with Wnt genes and nonsyndromic cleft lip and palate.”, *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, t. 88, nr 11, ss. 995–1000, lis. 2010.

[257] T. Yao *i in.*, „Association of Wnt3A gene variants with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in Chinese population.”, *Arch. Oral Biol.*, t. 56, nr 1, ss. 73–78, sty. 2011.

[258] C. P. Vink *i in.*, „Variability in dentofacial phenotypes in four families with WNT10A mutations.”, *Eur. J. Hum. Genet.*, t. 22, nr 9, ss. 1063–1070, wrz. 2014.

[259] M.-J. van den Boogaard *i in.*, „Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases.”, *J. Med. Genet.*, t. 49, nr 5, ss. 327–331, maj 2012.

[260] S. Sharma *i in.*, „NHS-A isoform of the NHS gene is a novel interactor of ZO-1.”, *Exp. Cell Res.*, t. 315, nr 14, ss. 2358–2372, sie. 2009.

[261] H. Li, L. Yang, Z. Sun, Z. Yuan, S. Wu, i R. Sui, „A novel small deletion in the NHS gene associated with Nance-Horan syndrome”, *Sci. Rep.*, t. 8, nr 1, ss. 1–7, 2018.

[262] S. P. Brooks *i in.*, „The Nance-Horan syndrome protein encodes a functional WAVE homology domain (WHD) and is important for co-ordinating actin remodelling and maintaining cell morphology”, *Hum. Mol. Genet.*, t. 19, nr 12, ss. 2421–2432, 2010.

[263] M. Wei, A. Qi, H. Mo, K. Wu, X. Ma, i B. Wang, „A novel NHS mutation in a Chinese family with Nance-Horan Syndrome”, *Mol. Med. Rep.*, t. 49, nr 5, ss. 4419–4424, 2019.

[264] F. S. Jehee *i in.*, „Novel mutations in IRF6 in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: when should IRF6 mutational screening be done?”, *Am. J. Med. Genet. A*, t. 149A, nr 6, ss. 1319–1322, cze. 2009.

[265] E. J. Leslie *i in.*, „Search for genetic modifiers of IRF6 and genotype-phenotype correlations in Van der Woude and popliteal pterygium syndromes.”, *Am. J. Med. Genet. A*, t. 161A, nr 10, ss. 2535–2544, paź. 2013.

[266] I. D. Krantz *i in.*, „Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of Drosophila melanogaster Nipped-B.”, *Nat. Genet.*, t. 36, nr 6, ss. 631–635, cze. 2004.

[267] A. Wessels, H. C. Wainwright, i P. Beighton, „Atelosteogenesis type I: autopsy findings.”, *Pediatr. Dev. Pathol. Off. J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.*, t. 14, nr 6, ss. 496–500, 2011.

[268] M. Pakvasa *i in.*, „Notch signaling: Its essential roles in bone and craniofacial development”, *Genes Dis.*, t. 8, nr 1, ss. 8–24, 2021.

[269] E. Canalis i S. Zanotti, „Hajdu-Cheney Syndrome, a Disease Associated with NOTCH2 Mutations.”, *Curr. Osteoporos. Rep.*, t. 14, nr 4, ss. 126–131, sie. 2016.

[270] M. A. Gilbert *i in.*, „Alagille syndrome mutation update: Comprehensive overview of JAG1 and NOTCH2 mutation frequencies and insight into missense variant classification.”, *Hum. Mutat.*, t. 40, nr 12, ss. 2197–2220, grudz. 2019.

[271] E. Canalis, „Notch in skeletal physiology and disease.", *Osteoporos. Int. a J. Establ. as result Coop. between Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA*, t. 29, nr 12, ss. 2611–2621, grudz. 2018.

[272] H.-Y. Yen, M.-C. Ting, i R. E. Maxson, „Jagged1 functions downstream of Twist1 in the specification of the coronal suture and the formation of a boundary between osteogenic and non-osteogenic cells.", *Dev. Biol.*, t. 347, nr 2, ss. 258–270, lis. 2010.

[273] H.-F. Chen *i in.*, „Twist1 induces endothelial differentiation of tumour cells through the Jagged1-KLF4 axis.", *Nat. Commun.*, t. 5, s. 4697, sie. 2014.

[274] J. M. Stoler, G. F. Rogers, i J. B. Mulliken, „The frequency of palatal anomalies in Saethre-Chotzen syndrome.", *Cleft palate-craniofacial J. Off. Publ. Am. Cleft Palate-Craniofacial Assoc.*, t. 46, nr 3, ss. 280–284, maj 2009.

[275] L. Wei, A. Al Oustah, P. Blader, i M. Roussigné, „Notch signaling restricts FGF pathway activation in parapineal cells to promote their collective migration.", *Elife*, t. 8, wrz. 2019.

[276] M. C. Naski, J. S. Colvin, J. D. Coffin, i D. M. Ornitz, „Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3.", *Development*, t. 125, nr 24, ss. 4977–4988, grudz. 1998.

[277] H. Kariya *i in.*, „Crouzon syndrome with acanthosis nigricans and prominent diffuse hyperpigmentation associated with gain-of-function A391E mutation in FGFR3 gene.", *The Journal of dermatology*, t. 47, nr 12. England, ss. e451–e452, grudz-2020.

[278] L. Arnaud-López, R. Fragoso, J. Mantilla-Capacho, i P. Barros-Núñez, „Crouzon with acanthosis nigricans. Further delineation of the syndrome.", *Clin. Genet.*, t. 72, nr 5, ss. 405–410, lis. 2007.

[279] S. B. Ng *i in.*, „Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder.", *Nat. Genet.*, t. 42, nr 1, ss. 30–35, sty. 2010.

[280] K. Matsumura *i in.*, „Sprouty2 controls proliferation of palate mesenchymal cells via fibroblast growth factor signaling.", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, t. 404, nr 4, ss. 1076–1082, sty. 2011.

[281] Y. Yang, L. Topol, H. Lee, i J. Wu, „Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation.", *Development*, t. 130, nr 5, ss. 1003–1015, mar. 2003.

[282] Q. Li *i in.*, „Gene-Gene Interaction Among WNT Genes for Oral Cleft in Trios.", *Genet. Epidemiol.*, t. 39, nr 5, ss. 385–394, lip. 2015.

[283] Y. Lei *i in.*, „Rare LRP6 variants identified in spina bifida patients.", *Hum. Mutat.*, t. 36, nr 3, ss. 342–349, mar. 2015.

[284] C. W. Ockeloen *i in.*, „Novel mutations in LRP6 highlight the role of WNT signaling in tooth agenesis.", *Genet. Med.*, t. 18, nr 11, ss. 1158–1162, lis. 2016.

[285] Y. Yu *i in.*, „Genome-wide analyses of non-syndromic cleft lip with palate identify 14 novel loci and genetic heterogeneity", *Nat. Commun.*, t. 8, nr 1, s. 14364, kwi. 2017.

[286] B. T. Chiquet *i in.*, „Variation in WNT genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate", *Hum. Mol. Genet.*, t. 17, nr 14, ss. 2212–2218, 2008.

10. Spis rycin

Ryc.1 Rozwój embrionalny wargi i podniebienia……...10

Ryc.2 Podział rozszczepów……11

Ryc.3 Rozszczepy podniebienia wg mianownictwa Kernahana i Starka……12

Ryc.4 Etiologia rozszczepów wargi i podniebienia……....18

Ryc.5 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu *de novo* c.16223G>A → p.Gly5408Asp w genie *KMT2D* zidentyfikowanego u pacjenta nr 6….……62

Ryc.6 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu *de novo* c.193C>T→ p.Gln65Ter w genie *MAML1*, zidentyfikowanego u pacjenta nr 7…….……64

Ryc.7 Wynik analiz dla heterozygotycznej delecji c.1060_1061delCT →p.Leu354ValfsTer33 w genie *ARHGAP29*, zidentyfikowanej u pacjenta nr 8……...……66

Ryc.8 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.697G>T → p.Glu233*w genie *ESRP2* zidentyfikowanego u pacjenta nr 9……..67

Ryc.9 Wyniki analiz dla hemizygotycznego wariantu c.1251_1253delTGT → p.Val418del w genie *FGD1* zidentyfikowanego u pacjenta nr 10 oraz jego matki…....69

Ryc.10 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.787C>G → p.Arg263Gly w genie *SHH* zidentyfikowanego u pacjenta nr 11……..70

Ryc.11 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.460G>A → p.Glu154Lys w genie *FGF4* zidentyfikowanego u pacjenta nr 12……....72

Ryc.12 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.2190G>T → p.Gln730His w genie *TRPS1* zidentyfikowanego u pacjenta nr 13……...73

Ryc.13 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.1280A>G → p.Gln427Arg w genie *SKI* zidentyfikowanego u pacjenta nr 14……75

Ryc.14 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.1618A>G → p.Ile540Val w genie *TOX3* zidentyfikowanego u pacjenta nr 16……76

Ryc.15 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.8C>G → p.Ser3* w genie *ADK* zidentyfikowanego u pacjenta nr 17…….....78

Ryc.16 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.11896A>G → p.Lys3966Glu w genie LRP2 zidentyfikowanego u pacjenta nr 18……79

Ryc.17 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.18C>G → p.Asp6Glu w genie *EDAR* zidentyfikowanego u pacjenta nr 19……..…….....81

Ryc.18 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu de novo c.224A>G → p.Asp75Gly w genie *IRF6* zidentyfikowanego u pacjenta nr 26……..……..83

Ryc.19 Rycina przedstawia wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu *de novo* c.568G>C → p.Val190Leu w genie *NHS* zidentyfikowanego u pacjenta nr 27...84

Ryc.20 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.2688A>C → p.Lys896Asn w genie *NIPBL*, zidentyfikowanego u pacjenta nr 28……....86

Ryc.21 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.3605A>G → p.Tyr1202Cys w genie *FLNB* zidentyfikowanego u pacjenta nr 29…….87

Ryc.22 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.1997A>G → p.Tyr666Cys w genie *NOTCH2* zidentyfikowanego u pacjenta nr 30……..89

Ryc.23 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.749C>G → p.Ala250Gly w genie *DHODH* zidentyfikowanego u pacjenta nr 31……...90

Ryc.24 Wyniki analiz dla nowego heterozygotycznego wariantu c.35A>T → p.Gln12Leu w genie *SPRY2* zidentyfikowanego u pacjenta nr 32 ……92

Ryc. 25 Budowa białka KMT2D..…….…..102

11. Spis tabel

Tab.1 Zespoły wad wrodzonych, spowodowane patogennymi wariantami nukleotydowymi w pojedynczych genach,w których rozszczep jest jedną z anomalii towarzyszących……...14

Tab.2 Wybrane geny kandydackie dla nsCL/P oraz nsCP…….23

Tab.3 Wykaz stosowanej aparatury……30

Tab.4 Spis stosowanych odczynników i roztworów……...31

Tab.5 Spis stosowanego sprzętu jednorazowego……32

Tab.6 Charakterystyka grupy badanej…….32

Tab.7 Mieszanina stosowana do reakcji PCR……..43

Tab.8 Etapy i profil termiczny reakcji PCR……44

Tab.9 Mieszanina stosowana do reakcji Real-time PCR-HRM……..46

Tab.10 Etapy i profil termiczny reakcji Real -Time PCR.-HRM…….47

Tab.11 Potencjalnie patogenne warianty nukleotydowe zidentyfikowane w sekwencjonowaniu panelu genowego metodą NGS oraz wyniki przeprowadzonych analiz *in silico* w grupie pacjentów z nsCL/P…….51

Tab.12 Potencjalnie patogenne warianty nukleotydowe, zidentyfikowane w sekwencjonowaniu panelu genowego metodą NGS wraz z wywiadem rodzinnym i wynikiem analizy nosicielstwa u rodziców pacjentów z nsCL/P…….53

Tab.13 Wyniki analizy wzbogacenia dla 25 genów, w których zidentyfikowano potencjalnie patogenne warianty w grupie pacjentów nsCL/P. Przedstawiono 30 najistotniejszych wyników dla „nadreprezentowanego” w tej grupie procesu biologicznego…….55

Tab.14 Wyniki analizy wzbogacenia dla 25 genów, w których zidentyfikowano potencjalnie patogenne warianty w grupie pacjentów nsCL/P. Przedstawiono jedynie istotne statystycznie wyniki dla „nadreprezentowanej” w tej grupie funkcji molekularnej……..57

Tab.15 Potencjalnie patogenne warianty nukleotydowe zidentyfikowane w sekwencjonowaniu panelu eksomowego metodą NGS oraz wyniki przeprowadzonych analiz *in silico* w grupie CP……...58

Tab.16 Potencjalnie patogenne warianty nukleotydowe zidentyfikowane w sekwencjonowaniu panelu genowego metodą NGS wraz z wywiadem rodzinnym i wynikiem analizy nosicielstwa u rodziców pacjentów z nsCP……59

Tab.17 Wyniki analizy wzbogacenia dla 12 genów, w których zidentyfikowano potencjalnie patogenne warianty w grupie pacjentów nsCP. Przedstawiono wszystkie istotne wyniki dla „nadreprezentowanego" w tej grupie procesu biologicznego.……60

Tab.18 Wyniki analizy wzbogacenia dla 12 genów, w których zidentyfikowano potencjalnie patogenne warianty w grupie pacjentów nsCP. Przedstawiono istotną statystycznie „nadreprezentowaną" funkcję molekularną …….60

12. Suplement

12.1 Panel dla wad rozwojowych części twarzowej czaszki – lista genów (n=424)

			Zespołowe formy		Izolowane formy nsCL/P				Izolowane formy nsTA	MGI*		Malokuzje
Lp.	Gen	OMIM	sCL/P	sTA	Analiza asocjac.	Analiza sprzężeń	GWAS	SEQ/WES		Typ rozszczepu lub nieprawdłowości twarzoczaszki	Rodzaj nieprawidłowości zębowych	
1	*ABCA4*	* *601691*					X			NA	NA	
2	*ACSS2*	* 605832						X		NA	NA	
3	*ACVR2A*	* 102581								CP	brak siekaczy	
4	*ADAMTS1*	* 605174								NA	NA	X
5	*ADAMTS2*	* 604539		X						NA	nieprawidłowa morfologia trzonowców	
6	*ADAMTS20*	* 611681					X			NA	NA	
7	*ADAMTS9*	* 605421						X		NA	NA	
8	*ADGRL2*	* 607018				X				NA	NA	
9	*ADK*	* 102750								NA	NA	X
10	*AJUBA*	* 609066								NA	NA	X
11	*ALPL*	* 171760								NA	nieprawidłowy rozwój zębów	
12	*ALX1*	* 601527	X							NA	NA	
13	*ALX3*	* 606014	X							rozszczep twarzy	NA	
14	*ALX4*	* 605420	X							NA	NA	
15	*AMBN*	* 601259								NA	nieprawidłowa morfologia zębów	
16	*ANTXR1*	* 606410		X						NA	nieprawidłowy rozwój zębów	X
17	*APC*	* 611731								NA	braki zębowe	
18	*APOC2*	* 608083				X				NA	NA	
19	*ARHGAP21*	* 609870								NA	NA	X
20	*ARHGAP29*	* 610496					X	X		CP	NA	

21	***ARID3B***	* 612457					**X**				NA	NA	
22	***ARVCF***	* 602269	**X**								NA	NA	
23	***AXIN1***	* 603816									NA	NA	
24	***AXIN2***	* 604025		**X**	**X**					**X**	NA	NA	
25	***BAALC***	* 606602					**X**				NA	NA	
26	***BARX1***	* 603260									CP	zatrzymanie rozwoju zębów	
27	***BARX2***	* 604823									NA	NA	
28	***BCL3***	* 109560				**X**					NA	NA	
29	***BCOR***	* 300485	**X**	**X**							NA	NA	
30	***BDH1***	* 603063					**X (PL)**				NA	NA	
31	***BHMT***	* 602888				**X**					NA	NA	
32	***BHMT2***	* 605932				**X**					NA	NA	
33	***BMP2***	* 112261			**X**						NA	NA	
34	***BMP3***	* 112263									NA	NA	**X**
35	***BMP4***	* 112262			**X**			**X**			CP; nieprawidłowy rozwój podniebienia wtórnego	NA	
36	***BMP7***	* 112267									CP; nieprawidłowa morfologia podniebienia miękkiego twardego	brak górnych siekaczy; zmniejszona liczba trzonowców	
37	***BMPR1A***	* 601299									CP; rozszczep twarzy; rozszczep twarzy w linii	brak zębów	
38	***BRCA1***	* 113705			**X**						NA	NA	
39	***BRCA2***	* 600185			**X**						NA	NA	
40	***BRIP1***	* 605882			**X**						NA	NA	
41	***CASP4***	* 602664									NA	NA	**X**
42	***CASP8***	* 601763			**X**						NA	NA	
43	***CDH1***	* 192090	**X**	**X**				**X**			NA	NA	
44	***CDH3***	* 114021		**X**							NA	NA	
45	***CDKAL1***	* 611259					**X (PL)**				NA	NA	
46	***CDON***	* 608707	**X**								nieprawidłowy rozwój podniebienia	brak górnych siekaczy	
47	***CFAP57 = WDR65***	* 614259	**X**								NA	NA	
48	***CHD1***	* 602118					**X (PL)**				NA	nieprawidłowa morfologia zębów	
49	***CHD7***	* 608892	**X**								CP wtórnego	NA	

50	***CHRNG***	* 100730	**X**								NA	NA	
51	***CHUK***	* 600664									CP	nieprawidłowa morfologia siekaczy; guzków trzonowych	
52	***CLPTM1***	* 604783						**X**			NA	NA	
53	***COL11A1***	* 120280	**X**								CP	NA	**X**
54	***COL11A2***	* 120290	**X**								NA	NA	
55	***COL17A1***	* 113811								**X**	NA	NA	
56	***COL1A1***	+ 120150		**X**							NA	nieprawidłowa morfologia miazgi zębowej; nieprawidłowa mineralizacja zębiny	**X**
57	***COL1A2***	* 120160		**X**							NA	NA	
58	***COL21A1***	* 610002				**X**							
59	***COL2A1***	+ 120140	**X**								CP	NA	**X**
60	***COL3A1***	* 120180		**X**							NA	NA	
61	***COL5A1***	* 120215								**X**	NA	NA	
62	***COL8A1***	* 120251					**X**				NA	NA	
63	***COL9A1***	* 120210	**X**								NA	NA	
64	***COL9A2***	* 120260	**X**								NA	NA	
65	***COL9A3***	* 120270	**X**								NA	NA	
66	***COLEC11***	* 612502	**X**								NA	NA	
67	***CREBBP***	* 600140		**X**	**X**		**X**					zęby nadliczbowe	
68	***CRISPLD2***	* 612434			**X**	**X**					NA	NA	
69	***CSF1***	* 120420									NA		
70	***CSF1R***	* 164770									NA	brak zębów	
71	***CTNNB1***	* 116806								**X**	CP	brak dolnych siekaczy; nieprawidłowy rozwój zębów	
72	***CTNND1***	* 601045	**X**	**X**				**X**			NA	NA	
73	***CYP1A1***	* 108330			**X**						NA	NA	
74	***DCAF4***	* 616372				**X (meta)**							
75	***DEFB112***	* 615243				**X(PL)**							
76	***DHCR24***	* 606418	**X**								NA	NA	
77	***DHCR7***	* 602858	**X**								CP wtórnego	NA	
78	***DHODH***	* 126064	**X**								NA	NA	
79	***DICER1***	* 606241					**X**				NA	NA	
80	***DISP1***	* 607502											
81	***DKK1***	* 605189								**X**	NA	braki zębowe	

82	***DLG1***	* 601014	**X**			**X**	**X (PL)**				CP	NA	
83	***DLG1-AS1***	HGNC:44154					**X (PL)**						
84	***DLL3***	* 602768	**X**								NA	NA	
85	***DLX1***	* 600029									CP	*DLX1/DLX2* (-/-) - brak zawiązków zębowych	
86	***DLX2***	* 126255									CP	*DLX1/DLX2* (-/-) - brak zawiązków zębowych	
87	***DLX3***	* 600525									NA	NA	**X**
88	***DLX4***	* 601911	**X**						**X**		NA	NA	
89	***DLX5***	* 600028	**X**								CP	nieprawidłowa morfologia siekaczy, trzonowców; nieprawidłowa mineralizacja zębów	
90	***DLX6***	* 600030									nieprawidłowa morfologia podniebienia	NA	
91	***DMD***	* 300377			**X**						NA	NA	
92	***DSP***	* 125647		**X**							NA	NA	
93	***DUSP6***	* 602748	**X**								NA	NA	**X**
94	***EDA***	* 300451		**X**						**X**	NA	brak siekaczy; zęby nadliczbowe; zmniejszona liczba trzonowców; zaburzony rozwój zębów	
95	***EDA2R = XEDAR***	* 300276		**X**							NA	NA	
96	***EDAR***	* 604095		**X**						**X**	NA	nieprawidłowa morfologia zębów; brak siekaczy; brak trzonowców; zęby nadliczbowe	
97	***EDARADD***	* 606603		**X**						**X**	NA	nieprawidłowa morfologia zębów; zmniejszona liczba trzonowców	
98	***EDN1***	* 131240	**X**				**X**				CP	NA	**X**
99	***EDNRB***	* 131244									CL; CP	NA	
100	***EFNB1***	* 300035	**X**								CP	NA	
101	***EFTUD2***	* 603892	**X**								NA	NA	
102	***EGF***	* 126150									NA	NA	
103	***EGFL6***	* 300239				**X**					NA	NA	
104	***EGFR***	* 131550									CP	NA	
105	***EHMT1***	* 607001									NA	NA	
106	***ENPP1***	* 173335									NA	NA	**X**
107	***EP300***	* 602700	**X**								NA	NA	
108	***EPHA3***	* 179611				**X**		**X (meta)**			NA	NA	

109	***EPHX1***	* 132810			**X**				NA	NA	
110	***ERCC2***	* 126340							NA	NA	
111	***ESCO2***	* 609353	**X**						NA	NA	
112	***ERF***	* 611888							NA	NA	
113	***ESRP2***	* 612960							NA	NA	
114	***EVC***	* 604831		**X**					NA	nieprawidłowa morfologia zębów	
115	***EVC2***	* 607261		**X**					NA	małe górne siekacze	**X**
116	***EYA1***	* 601653	**X**						nieprawidłowy rozwój podniebienia; CP	NA	
117	***FAM174A***	HGNC:24943				**X (PL)**			NA	NA	
118	***FAM19A2***	* 617496				**X (PL)**			NA	NA	
119	***FAM49A***	HGNC:25373				**X**			NA	NA	
120	***FBN3***	* 608529									**X**
121	***FBXO11***	* 607871	**X**						CP; rozszczep twarzy	NA	
122	***FBXW4***	* 608071	**X**						NA	NA	
123	***FGD1***	* 300546									
124	***FGF1***	* 131220							NA	NA	
125	***FGF10***	* 602115		**X**					nieporawidłowy rozwój podniebienia wtórnego; CP wtórnego	nieprawidłowa morfologia zębów	**X**
126	***FGF12***	* 601513							NA	NA	
127	***FGF13***	* 300070			**X**				NA	NA	
128	***FGF18***	* 603726							CP	NA	
129	***FGF2***	* 134920							NA	NA	
130	***FGF23***	* 605380							NA	NA	**X**
131	***FGF3***	* 164950							NA	NA	
132	***FGF4***	* 164980							NA	NA	
133	***FGF7***	* 148180							NA	NA	**X**
134	***FGF8***	* 600483	**X**						NA		**X**
135	***FGF9***	* *600921*	**X**						CP	nieprawidłowy rozwój zębów	
136	***FGFR1***	* 136350	**X**				**X**		nieporawidłowy rozwój podniebienia wtórnego; CP	długie kły	**X**
137	***FGFR2***	* 176943	**X**	**X**			**X**		CP	brak zawiązków zębowych	**X**

138	***FGFR3***	* 134934	**X**	**X**						NA	długie kły	
139	***FGFR4***	* 134935								NA	NA	
140	***FILIP1L***	* 612993					**X (PL)**			NA	NA	
141	***FLNA***	* 300017	**X**							CP	NA	
142	***FLNB***	* 603381	**X**	**X**						NA	NA	
143	***FMN1***	* 136535					**X (PL, meta)**			NA	NA	
144	***FOS***	* 164810			**X**					NA	brak zawiązków zębowych; zahamowanie wyrzynania się zębów	
145	***FOXC1***	* 601090		**X**						NA	NA	**X**
146	***FOXC2***	* 602402	**X**							CP	NA	
147	***FOXE1***	* 602617	**X**		**X**	**X**	**X**	**X**		CP	NA	
148	***FOXG1***	* 164874				**X**				NA	NA	
149	***FOXL2***	* 605597								NA	NA	**X**
150	***FOXO3***	* 602681								NA	NA	**X**
151	***FOXO6***	* 611457								NA	NA	**X**
152	***FOXP2***	* 605317	**X**			**X**				NA	NA	
153	***FRAS1***	* 607830	**X**							CP	NA	
154	***FST***	* 136470								CP	brak siekaczy; zaburzony rozwój zębów	
155	***FUZ***	* 610622								CP; nieprawidłowy rozwój podniebienia	brak siekaczy; zaburzony rozwój zębów	
156	***FYCO1***	* 607182					**X (PL)**			NA	NA	
157	***FZD2***	* 600667								CP	NA	
158	***FZD6***	* 603409								NA	NA	
159	***GAB4***	HGNC:18325					**X (PL)**					
160	***GABRB3***	* 137192			**X**	**X**				CP	NA	
161	***GAD1***	* 605363	**X?**		**X**					CP; CP	NA	
162	***GADD45G***	* 604949					**X**			NA	NA	
163	***GALC***	* 606890								NA	brak siekaczy	
164	***GAS1***	* 139185								NA	zrośnięte siekacze	
165	***GC***	* 139200								NA	NA	
166	***GCH1***	* 600225					**X (PL)**			NA	NA	

167	***GDF5***	* 601146		**X**							NA	NA	
168	***GDF6***	* 601147	**X**								NA	NA	
169	***GH1***	* 139250									NA	NA	**X**
170	***GHR***	* 600946									NA	NA	**X**
171	***GJA1***	* 121014	**X**	**X**							NA	zaburzony rozwój zębów	
172	***GJB2***	* 121011	**X**								NA	NA	
173	***GJB6***	* 604418									NA	NA	
174	***GLI2***	* 165230	**X**								CP	brak siekaczy	
175	***GLI3***	* 165240	**X**								CL; CP	zaburzony rozwój zębów	
176	***GNAI3***	* 139370	**X**								NA	NA	
177	***GPC3***	* 300037	**X**								NA	NA	
178	***GREM1***	* 603054					**X**				NA	NA	
179	***GREM2***	* 608832								**X**	NA	nieprawidłowa morfologia siekaczy/ guzków trzonowych	
180	***GRHL2***			**X**							rozszczep twarzy	NA	
181	***GRHL3***	* 608576	**X**	**X**	**X**		**X**	**X**			CP; nieprawidłowy rozwój podniebienia	NA	
182	***GSK3B***	* 605004									CP	NA	
183	***HDAC8***	* 300269	**X**								NA	NA	
184	***HECTD1***					**X**					NA	NA	
185	***HOXA2***	* 604685	**X**								CP	NA	
186	***HMGA2***	* 600698									NA	NA	**X**
187	***HOXB1***	* 142968	**X**	**X**							nieprawidłowa morfologia dolnej wargi	nieprawidłowa morfologia zębów	
188	***HOXC13***	* 142976									NA	NA	
189	***HSD11B2***	* 614232									NA	NA	
190	***HSPG2***	* 142461	**X**								CP	NA	
191	***HYAL2***	* 603551	**X**								NA	NA	
192	***IFT122***	* 606045		**X**							NA	NA	
193	***IFT88***	* 600595									CP	nadliczbowe trzonowce	
194	***IGF1***	* 147440									NA	NA	**X**
195	***IKBKG***	* 300248		**X**							NA	NA	
196	***IL11RA***	* 600939		**X**							NA	NA	

197	***INHBA***	* 147290								CP lub brak podniebienia	brak siekaczy	
198	***INHBB***	* 147390								CP	brak siekaczy	
199	***IRF6***	* 607199	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**		CP	zaburzony rozwój zębów	
200	***IRX1***	* 606197								NA	zaburzony rozwój zębów	**X**
201	***IRX2***	* 606198								NA	NA	**X**
202	***ISL1***	* 600366								NA	NA	**X**
204	***JAG1***	* 601920		**X**						nieprawdiłowa morfologia podniebienia	NA	
205	***JAG2***	* 602570				**X**				CP	NA	
206	***KAL1 = ANOS1***	* 300836	**X**							NA	NA	
207	***KAT6B***	* 605880						**X**	**X?**	NA	NA	
208	***KCNJ2***	* 600681	**X**	**X**						CP	NA	
209	***KDF1***	* 616758		**X**						CP	NA	
210	***KDM6A***	* 300128	**X**	**X**				**X**		NA	NA	
211	***KIAA0196 = WASHC5***	* 610657								NA	NA	
212	***KISS1R***	* 604161	**X**	**X**						NA	NA	
213	***KMT2D***	* 602113	**X**	**X**						NA	NA	
214	***KREMEN1***	* 609898		**X**						NA	NA	
215	***KRT18***	* 148070					**X**			NA	NA	
216	***KRT7***	* 148059								NA	NA	**X**
217	***LAMA3***	* 600805							**X**	NA	nieprawidłowa morfologia ameloblastu i szkliwa	
218	***LAMB3***	* 150310		**X**						NA	hipodoncja;mikrodoncja	
219	***LATS1***	* 603473								NA	NA	**X**
220	***LEF1***	+ 153245								NA	zatrzymanie rozwoju zębów; brak siekaczy; trzonowców; brak zawiązków zębowych	
221	***LEFTY1***	* 603037								NA	NA	**X**
222	***LHX2***	* 603759								NA	NA	**X**
223	***LHX6***	* 608215								NA	NA	
224	***LHX8***	* 604425						**X**		CP	NA	
225	***LIFR***	* 151443								NA	NA	
226	***LMO4***	* 603129								NA	NA	**X**
227	***LOXL3***	* 607163	**X**							nieprawidłowy rozwój podniebienia; CP	NA	

228	***LRP2***	* 600073								CP	NA	
229	***LRP4***	* 604270	**X**							NA	zaburzony rozwój zębów; nadliczbowe siekacze	
230	***LRP6***	* 603507							**X**	CL; CP	zmniejszona liczba trzonowców; zaburzony rozwój zębów	
231	***LTBP3***	* 602090		**X**				**X**		NA	nieprawidłowa morfologia szkliwa	
232	***MAFB***	* 608968					**X**			NA	NA	**X**
233	***MAML1***	* 605424								**NA**	NA	
234	***MASP1***	* 600521	**X**							NA	NA	
235	***MATN1***	* 115437								NA	NA	**X**
236	***MEIS2***	* 601740	**X**							NA	NA	
237	***MID1***	* 300552	**X**							NA	NA	
238	***MITF***	* 156845	**X**							NA	nieprawidłowa morfologia siekaczy; zahamowanie	
239	***MKKS***	* 604896		**X**						NA	NA	
240	***MMP14***	* 600754					**X**			NA	zaburzony rozwój zębów; opóźnione wyrzynanie	
241	***MMP16***	* 602262					**X**			NA	NA	
242	***MMP2***	* 120360			**X**					NA	NA	
243	***MMP20***	* 604629								NA	nieprawidłowa morfologia zębów	
244	***MRPL53***	* 611857			**X**					NA	NA	
245	***MSX1***	* 142983		**X**	**X**			**X**	**X**	CP	zatrzymanie rozwoju zębów	
246	***MSX2***	* 123101	**X**							NA	nierozwinięte zęby trzonowe	
247	***MYC***	* 190080					**X**			NA	NA	
248	***MYCN***	* 164840								NA	NA	
249	***MYH9***	* 160775			**X**					NA	NA	
250	***MYO1H***	* 614636								NA	NA	**X**
251	***MYT1***	* 600379								NA	NA	
252	***NAT1***	* 108345			**X**					NA	NA	
253	***NAT2***	* 612182			**X**					NA	NA	

254	***NAV2***	* 607026								NA	NA	**X**
255	***NBN***	* 602667			**X**					NA	NA	
256	***NFATC1***	* 600489								NA	brak dolnych siekaczy	
257	***NFIC***	* 600729								NA	brak dolnych siekaczy; zaburzony rozwój zębów	
258	***NGFR***	* 162010								NA	nieprawidłowa morfologia zębów	
259	***NHS***	* 300457								NA	NA	
260	***NIPBL***	* 608667	**X**							CL	NA	
261	***NOG***	* 602991					**X**			CP	NA	
262	***NOTCH2***	* 600275	**X**							NA	nieprawidłowa morfologia zębów	
263	***NRIP2***	HGNC:23078								NA	NA	**X**
264	***NSD1***	* 606681	**X**	**X**						NA	NA	
265	***NTN1***	* 601614					**X (meta)**			NA	NA	
266	***OFD1***	* 300170	**X**	**X**						NA	NA	
267	***OSR1***	* 608891								NA	NA	
268	***OSR2***	* 611297								CP; CP	zaburzony rozwój zębów; zęby nadliczbowe	
269	***PAFAH1B1***	* 601545	**X**							NA	NA	
270	***PAK1IP1***	* 607811						**X**		CP; rozszczep twarzy	NA	
271	***PARK2 = PRKN***	* 602544								NA	NA	**X**
272	***PAX3***	* 606597	**X**		**X**					nieprawidłowy rozwój podniebienia wtórnego; CP	NA	
273	***PAX5***	* 167414								NA	NA	**X**
274	***PAX6***	* 607108								NA	nadliczbowe siekacze	
275	***PAX7***	* 167410			**X**		**X**	**X**		NA	NA	
276	***PAX9***	* 167416			**X**				**X**	CP	zatrzymanie rozwoju zębów; brak zawiązków zębowych	
277	***PBX1***	* 176310								NA	NA	
278	***PBX2***	* 176311								NA	NA	
279	***PBX3***	* 176312								NA	nieprawidłowa morfologia zębów	
280	***PDGFC***	* 608452			**X**					CP wtórnego	NA	
281	***PHF8***	* 300560	**X**							NA	NA	
282	***PHGDH***	* 606879	**X**	**X**						NA	NA	
283	***PHYH***	* 602026						**X**		NA	NA	

284	***PIK3R5***	* 611317						**X**		NA	NA	
285	***PITX1***	* 602149	**X**							CP	NA	**X**
286	***PITX2***	* 601542		**X**						CP	zatrzymanie rozwoju zębów	**X**
287	***PKN2***	* 602549								NA	NA	**X**
288	***PLCB4***	* 600810	**X**							NA	NA	
289	***PLEKHA5***	* 607770						**X**		NA	NA	
290	***PLEKHA7***	* 612686						**X**		NA	NA	
291	***PLXNA2***	* 601054								NA	NA	**X**
292	***POLD3***	* 611415					**X (PL)**			NA	NA	
293	***POLR1C***	* 610060	**X**							NA	NA	
294	***POLR1D***	* 613715	**X**							NA	NA	
295	***POMT1***	* 607423	**X**							NA	NA	
296	***PORCN***	* 300651	**X**	**X**						CP	nieprawidłowa morfologia zębów	
297	***PQBP1***	* 300463	**X**							NA	NA	
298	***PRDM16***	* 605557					**X**			CP	NA	
299	***PRKD1***	* 605435								NA	NA	
300	***PRRX1***	* 167420	**X**							CP	Prx1/Prx2 homozygotyczna mutacja - brak siekaczy	**X**
301	***PRRX2***	* 604675								NA	Prx1/Prx2 homozygotyczna mutacja - brak siekaczy	
302	***PTCH1***	* 601309	**X**		**X**			**X**		CP	nieprawidłowa morfologia górnych siekaczy	
303	***PTCH2***	* 603673	**X**							NA	NA	
304	***PTEN***	* 601728	**X**							NA	NA	
305	***PTH1R***	* 168468								**NA**	NA	
306	***PTPN11***	* 176876	**X**							NA	NA	
307	***PVRL1 = NECTIN1***	* 600644	**X**	**X**		**X**		**X**		NA	zaburzony rozwój zębów	
308	***PVRL2 = NECTIN2***	* 600798				**X**		**X**		NA	NA	
309	***PVRL3 = NECTIN3***	* 607147				**X**				NA	nieprawidłowa morfologia dolnych siekaczy	
310	***RAD21***	* 606462	**X**							NA	NA	
311	***RAD54B***	* 604289					**X**			NA	NA	
312	***RARA***	* 180240								NA	NA	
313	***RAX***	* 601881	**X**							nieprawdiłowa morfologia podniebienia; CP	NA	

314	***RB1***	* 614041	**X**						NA	NA	
315	***RBFOX3***	* 616999				**X**			NA	NA	
316	***RBL1***	* 116957							NA	brak siekaczy	
317	***RBL2***	* 180203							NA	brak siekaczy	
318	***RECQL4***	* 603780	**X**	**X**					CP	zaburzony rozwój trzonowców i siekaczy	
319	***RFC1***	* 102579			**X**				NA	NA	
320	***RHPN2***	* 617932				**X**			NA	NA	
321	***RIPK4***	* 605706	**X**						NA	NA	
322	***RMRP***	* 157660		**X**					NA	NA	
323	***ROR2***	* 602337	**X**		**X**				CP; CP	NA	
324	***RPS26***	* 603701				**X**			NA	NA	
325	***RPS6KA3***	* 300075		**X**					NA	nieprawidłowa morfologia zębów; zęby nadliczbowe	
326	***RUNX2***	* 600211	**X**						CP	zatrzymanie rozwoju zębów	**X**
327	***RUNX3***	* 600210							NA	NA	**X**
328	***RXRA***	* 180245							NA	NA	
329	***RYK***	* 600524					**X**		CP	NA	
330	***SALL1***	* 602218	**X**						NA	NA	
331	***SALL4***	* 607343	**X**						NA	NA	
332	***SAMD4A***	* 610747				**X (PL)**			NA	NA	
333	***SATB1***	* 602075							NA	NA	**X**
334	***SATB2***	* 608148	**X**	**X**			**X**		CL; CP	brak siekaczy; nieprawidłowa morfologia trzonowców	**X**
335	***SCG5***	HGNC:10816				**X (PL)**			NA	NA	
336	***SEMA3E***	* 608166	**X**						NA	NA	
337	***SF3B4***	* 605593	**X**						NA	NA	
338	***SHH***	* 600725	**X**						CP	zahamowany rozwój zębów	
339	***SIX1***		**X**						NA	NA	
340	***SIX3***	* 601205	**X**						NA	NA	
341	***SIX5***	* 600963	**X**						NA	NA	
342	***SKI***	* 164780	**X**		**X**				rozszczep twarzy	NA	
343	***SLC12A9***	* 616861				**X (PL)**			NA	NA	
344	***SLC26A2***	* 606718	**X**	**X**					NA	NA	
345	***SLX4***	* 613278							NA	nieprawidłowa morfologia zębów	
346	***SMAD2***	* 601366							NA	NA	
347	***SMAD3***	* 603109	**X**						NA	NA	
348	***SMC1A***	* 300040	**X**						NA	NA	
349	***SMC2***	* 605576				**X**			NA	NA	
350	***SMC3***	* 606062	**X**						NA	NA	

351	***SMO***	* 601500								NA	brak dolnych siekaczy; nieprawidłowa morfologia trzonowców	
352	***SMOC2***	* 607223								NA	NA	
353	***SMS***	* 300105	**X**							NA	NA	
354	***SNAI1***	* 604238								NA	NA	**X**
355	***SNAI3***	* 612741								NA	NA	**X**
356	***SNX3***	* 605930	**X**							NA	NA	
357	***SOX11***	* 600898								CL; CP	NA	
358	***SOX12***	* 601947								NA	NA	
359	***SOX13***	* 604748								NA	NA	
360	***SOX2***	* 184429	**X**							nieprawdiłowa morfologia podniebienia	NA	
361	***SOX4***	* 184430								NA	NA	
362	***SOX5***	* 604975								CP	NA	
363	***SOX6***	* 607257								NA	NA	
364	***SOX9***	* 608160	**X**							CP	NA	
365	***SP6***	* 608613								NA	zaburzony rozwój zębów; zęby nadliczbowe	
366	***SPECC1L***	* 614140	**X**							NA	NA	
367	***SPRY1***	* 602465					**X**			NA	NA	
368	***SPRY2***	* 602466					**X (meta)**			NA	zaburzony rozwój zębów; zęby nadliczbowe	
369	***SRC***	* 190090								NA	brak siekaczy; zmniejszona liczba trzonowców	
370	***STAG2***	* 300826	**X**							NA	NA	
371	***SUMO1***	* 601912			**X**			**X**		CP; skośny rozszczep twarzy	NA	
372	***TAF1B***	* 604904					**X**			NA	NA	
373	***TANC2***	* 615047					**X**			NA	NA	
374	***TBK1***	* 604834					**X**			NA	NA	
375	***TBL1XR1***	* 608628								NA	NA	**X**
376	***TBX1***	* 602054	**X**					**X**		CP; CP	absent upper incisors	**X**
377	***TBX10***	* 604648								CL; CP; CP	NA	
378	***TBX22***	* 300307	**X**							CP	NA	
379	***TBX3***	* 601621		**X**						CP	NA	
380	***TBX5***	* 601620								NA	NA	**X**
381	***TCIRG1***	* 604592								NA	brak zawiązków zębowych	
382	***TCOF1***	* 606847	**X**							nieprawidłowy rozwój wargi; CP	NA	
383	***TFAP2A***	* 107580	**X**							CP; rozszczep twarzy	NA	
384	***TFAP2B***	* 601601		**X**						NA	NA	
385	***TGDS***	* 616146	**X**							NA	NA	
386	***TGFA***	* 190170			**X**	**X**				NA	NA	
387	***TGFB1***	* 190180				**X**				NA	nieprawidłowa morfologia zębów	
388	***TGFB2***	* 190220								CP	NA	

389	***TGFB3***	* 190230	**X**		**X**						CP	NA	
390	***TGFBR1***	* 190181	**X**								NA	NA	
391	***TGFBR2***	* 190182	**X**								nieprawidłowy rozwój podniebienia; CP	NA	
392	***TGFBR3***	* 600742					**X**				NA	NA	
393	***TGIF1***	* 602630	**X**								CL	NA	
394	***THADA***	* 611800					**X (meta)**				NA	NA	
395	***TLX1***	* 186770									NA	NA	**X**
396	***TMEM19***	HGNC:25605					**X**				NA	NA	
397	***TOX3***	* 611416				**X**					NA	NA	
398	***TP53***	* 191170									CL; CP		
399	***TP63***	* 603273	**X**	**X**		**X**		**X**			CP	brak zawiązków zębowych	**X**
400	***TPM1***	* 191010					**X (meta)**	**X**			NA	NA	
401	***TRAF6***	* 602355									NA	brak siekaczy i zębów trzonowych	
402	***TRPS1***	* 604386	**X**								NA	nieprawidłowa morfologia siekaczy	
403	***TSPEAR***	* 612920		**X**							NA	NA	
404	***TWIST1***	* 601622	**X**								CP	NA	**X**
405	***UBB***	* 191339											
406	***UBR1***	* 605981		**X**							NA	NA	
407	***VAX1***	* 604294	**X**				**X**				CP	nieprawidłowa morfologia górnych siekaczy	
408	***VDR***	* 601769									NA	NA	
409	***VEGFA***	* 192240									CP	brak siekaczy	
410	***WDR35***	* 613602	**X**								NA	NA	
411	***WNT10A***	* 606268		**X**						**X**	NA	brak trzonowców; nadliczbowe trzonowce; taurodontia	
412	***WNT10B***	* 601906	**X**							**X**	NA	NA	
413	***WNT11***	* 603699									NA	NA	
414	***WNT3***	* 165330	**X**								NA	NA	
415	***WNT3A***	* 606359									NA	NA	
416	***WNT5A***	* 164975	**X**								CL; CP	NA	
417	***WNT5B***	* 606361									NA	NA	
418	***WNT8A***	* 606360									NA	NA	
419	***WNT9A***	* 602863									NA	NA	
420	***WNT9B***	* 602864									CL; CP	NA	
421	***YAP1***	* 606608	**X**								NA	NA	**X**
422	***ZDHHC4***	HGNC:18471					**X (PL)**				NA	NA	
423	***ZEB2***	* 605802	**X**										
424	***ZIC2***	* 603073	**X**								NA	NA	

nsCL/P – izolowany rozszczep wargi z/lub bez rozszczepu podniebienia (ang. *non-syndromic Cleft Lip with/or without Cleft Palate*), **sCL/P** – zespołowa forma rozszczepu wargi z/lub bez rozszczepu podniebienia (ang. *syndromic Cleft Lip with/or without Cleft Palate*), **nsTA** – izolowana agenezja zębów (ang. *non - syndromic Tooth Agenesis*), **sTA** – zespołowa forma agnezji zębów (ang.*syndromic Tooth Agenesis*), **NA** – nie dotyczy (ang. *not applicable*) **GWAS** – analiza asocjacyjna w skali całego genomu (ang. *Genome Wide Association Study),* **SEQ** – sekwencjonowanie, **WES** – sekwencjonowanie całoeksomowe (ang. *Whole Exome Sequencing*),***MGI** – bazy danych Mouse Genome Informatics *(http://www.informatics.jax.org/)*

12.2 Sekwencje starterów zastosowane do amplifikacji produktów PCR użytych w analizie sekwencjonowania metodą Sangera.

				Produkty PCR do analizy sekwencjonowania metodą Sangera	
Gen	**Numer rs**	**Pozycja badanej zmiany**	**Sekwencja starterów 5'- 3'**	**Długość analizowanego produktu PCR**	**Temp.przyłączania starterów**
ADK	NOWY	c.8C>G	F:AGTGAGCTGGCACGAGACAC R:CAAGCAGCGACACACAGAAC	498pz	67°C
ARHGAP29	rs140877322	c.1043G>T	F:AATCCGCCACTTGAAGACAG R:AATTGCAGCTCTCCAGGCTA	526pz	66.3°C
ARHGAP29	NOWY	c.1060_1061delCT	F:GAGCTTTGGAAACAGGAGCA R:AGTCTTGGCAGACGCAGAAC	492pz	65°C
BMPR1A	rs587781332	c.1216C>T	F:CCCTCAACTTGGACCTTGG R:TAGCACAACGGGGAGGACTA	506pz	67°C
CHD7	rs1563644113	c.4033C>T	F:TCAGGCCTCCTTGTTCACAC R:CTGAGTGACGACGCAACATT	335pz	67°C
CHD7	rs1009126876	c.4477C>T	F:TCTACGAAAAGGGGCCTATG R:AGAGAAGGAAGATGCCAACG	457pz	67°C
COL11A1	rs775587076	c.4193A>C	F:AACAGAGACACAAATGCTCCAG R:GCTTCCAGATGCAAACTGTC	289pz	65°C
COL17A1	rs121912769	c.3676C>T	F:CTCCCTGCCCCACTTACAG R:CTTCCTCCGCAGCACTACC	269pz	67°C
COL8A1	COSM4595504	c.1463C>T	F:AAGCCAGGTTTCCTTGGTG R:TCCGGGTTTCCCTATACCAG	294pz	66.3°C
COL9A1	rs760070670	c.1802G>T	F:ATGGTGTCTTACCGGTTTGC R:GCTTTCCCTAGAGCTTGCTG	522pz	67°C

DHCR7	rs547012639	c.1087C>T	F:TCGCCGACGTAGTTGAAGTG R:GAAGAGAACACGGAGGCAAG	404pz	65°C
DHODH	NOWY	c.749C>G	F:CGCTATTGTGGAAACCCACT R:GCCTTAAACTTGCTGGATGC	455pz	65°C
DLX5	rs887777137	c.830T>C	F:AGAGAGAGCAGCCCATCTAA R:CATAGCTTCTTGGCGGTAGG	500pz	66.3°C
EDAR	NOWY	c.18C>G	F:AAGTGGCATGGGTACAGCTT R:ATCATGAGGATGAGGGTGCT	286pz	67°C
EFTUD2	rs1467291243	c.956C>T	F:ATGCCACCTGTGAGAAGGTC R:TCCTGGGTAACGTCTGCTTC	420pz	67°C
ERCC2	rs780844758	c.1361T>C	F:GGATCTTGGGGTAGATGTCC R:GAGCCCTTTGACGACAGAAC	345pz	67°C
ESRP2	NOWY	c.697G>T	F:GGCCATCTTTTCTCAGGTCA R:GAGTGCTACACCACCCCTGT	344pz	62.6°C
ESRP2	rs201908706	c.1088G>A	F:GCTCCGGAAGAGTTCAATGT R:TCTGGAGGAGCATGAGTGAA	326pz	59.7°C
FGD1	NOWY	c.1251_1253delTGT	F:AGCCTAACTCTTGGCAGCAG R:ATGCGCTTCTCTAGCTCAGG	469pz	65°C
FGF4	NOWY	c.460G>A	F:TGAATTCTCTGGCTGCTAGGT R:TCTTCCCATTCTTGCTCAGG	343pz	64.5°C
FGFR3	rs755547723	c.1075C>T	F:AGACGTGCATCCTGTGAAAC R:AGACGTGCATCCTGTGAAAC	347pz	65°C
FGFR3	rs761163163	c.1759C>T	F:TAACCTGCGGGAGTTTCTG R:CTGCGATCTTCATCACGTTG	331pz	66.3°C
FLNA	rs781939268	c.2419G>A	F:ACCTGGTCAGCAAAGAGGAC R:TAGCCAAGACAGGGCTCAAG	314pz	67°C

FLNB	NOWY	c.3605A>G	F:GCCGAGTTCACCATCGATAC R:CTTTGATCCTGCTGGTGTCC	523pz	67°C
FLNB	rs892500905	c.4030A>T	F:ATGACGTGCCTATCCCAAAC R:GCAAGTACAACGCAGGCATA	454pz	67°C
HSPG2	rs962884439	c.8293G>A	F:GGTCTGAATAGGGGACAGGA R:TGAGTCATCCTCCTCACACG	319pz	65°C
IFT88	rs201076403	c.742A>G	F:CCATTTCTTCACAGGAGGTAAG R:TGATTTTGTGTCCGCATTAAG	587pz	60°C
IRF6	NOWY	c.224A>G	F:AGTGGCTCTGGGCAATGATA R:GCCAGGTTTAGAACGCAAAC	589pz	62.8°C
IRF6	CM092352	c.905T>C	F:TCAGTACCGTGGGAAGGAGT R:CTCCCTTGACCTCCTCCAG	509pz	67°C
IRF6	rs200808685	c.1060G>A	F:ACATCACGGTGCTTTCCCTA R:ATCACTTGTTGCTCCCAACC	490pz	66.6°C
KMT2D	NOWY	c.16223G>A	F:CAGCACCAGCATGTCTAAGG R:GCAGAGGTTGCAGAAGAAGG	499pz	65°C
LOXL3	rs375983669	c.752C>T	F:TGAGGCTTCGACTGTTGTTG R:AGCCTGAAACCACTTGGAAC	517pz	64.5°C
LRP2	rs749942746	c.2455C>T	F:CATTGTTTGGTCCTCTGCAAC R:ATCAGTGTCATGAGGCTAGCTG	370pz	64.5°C
LRP2	NOWY	c.11896A>G	F:TTGTGGCTGATCTGGTTTGT R:TGCAATAAGCAGCCATCATC	460pz	62.8°C
LRP6	rs769446193	c.481C>A	F:TCCCCTCTGGCACTTAGTCA R:TGGACAGACTGGGGAGAAGT	303pz	60.5°C
MAML1	NOWY	c.193C>T	F:GAGCGCCAACACACCTTC R:AGCTCCCTGCCATGTTACC	311pz	65°C

NHS	NOWY	c.568G>C	F:TAGACGGTTGGTGTCTTGGA R:AAGCCCAGGATCTGTCACCT	406pz	67°C
NIPBL	NOWY	c.2688A>C	F:GGGTTCGAAGACCAGAAACA R:TGCCTTATTGTCAGGGTGTG	302pz	61.4°C
NOTCH2	NOWY	c.1997A>G	F:TCCTGAACGAGTCTGTGGAC R:ACCTGTGAATCCTGGTGAGC	278pz	66.6°C
PLEKHA5	NOWY	c.1154A>G	F:CTGAATATGAGAGTGGGTCAGC R:CTCAGAAACCAATCTCCACCA	314pz	61.4°C
POLR1C	rs371479150	c.845C>G	F:GCAGGAAGTCCAAGGTATGG R:GAAGCATCCAAGCTCAGTCC	553pz	62.8°C
PRKD1	NOWY	c.1649T>A	F:CTGAAATTTTGTCTCTGGAACC R:CTAAGCAAGGGGTAGGCACAT	326pz	60.5°C
SHH	NOWY	c.787C>G	F:GGCTGCTCTACAGCGACTTC R:GGAGCGGTTAGGGCTACTCT	559pz	66.6°C
SKI	NOWY	c.1280A>G	F:CTGCCCCTCCAGCTTCTA R:GCACAGAAAGCGACTCACAC	299pz	60.5°C
SOX9	rs1224146749	c.718A>C	F:AAGTCGATAGGGGGCTGTCT R:CCTGATAAAAGGGGGCTGTC	324pz	65.9°C
SPRY2	NOWY	c.35A>T	F:TGTGTTCTAAGCCTGCTGGA R:CGTGGAGTCTCTCGTGTTTG	292pz	66.6°C
TOX3	rs200208189	c.464G>A	F:TCCCATATTCTCTGGCAGGT R:CCACACACAAGTGTCCCAGT	308pz	61.4°C
TOX3	NOWY	c.1618A>G	F:ACACATGCAGCACCAGTCTC R:TGAGAGGACCGTTTGATCTG	301pz	64.5°C
TRPS1	NOWY	c.2190G>T	F:TCAGAACGCTGTCTTTGCAG R:TGGAACTCTCGGTCCAAACT	341pz	60.5°C

TSPEAR	rs782537440	c.1139T>A	F:CGATTTGTGGGTTCTTGACC R:AGGAGTCGTGGCTTGTGACT	659pz	62.8°C
WNT10A	rs121908119	c.321C>A	F:CCGTTGGGACAGAGTGTGTG R:CAGCTTGAGGCAGTGGGTTAG	441pz	67°C
WNT10A	rs373695499	c.443C>T	F:GGGCTTCAGTTTCTCCTTGG R:AGCAACGTGGTCCTCAGAAG	570pz	61.7°C
WNT10B	rs200116103	c.832C>T	F:TGCCACAGCCATCCAACAG R:GAAGCGGAAATGCAAGTGTC	308pz	66.6°C
WNT5B	rs529807731	c.716G>T	F:CTGAGCACCTGAGCATCTTG R:TACACCTGACGAAGCAGCAC	584pz	67°C

12.3 Sekwencje starterów zastosowane do amplifikacji produktów PCR użytych w analizie Real-Time PCR-HRM.

					Analiza HRM	
Gen	**Numer rs**	**Pozycja badanej zmiany**	**Sekwencja starterów 5'- 3'**	**Długość analizowanego produktu PCR**	**Temp.przyłączania starterów**	**Zakres temp. topnienia**
ADK	NOWY	c.8C>G	F:AGGAGGGCGAAGCCATGA R:AACACGAGGGGGACCAGA	152pz	55°C	88-98°C
ARHGAP29	rs140877322	c.1043G>T	F:AATCCGCCACTTGAAGACAG R:TGTAGCTTGAAGCAGAGAATGC	130pz	55°C	76-86°C
BMPR1A	rs587781332	c.1216C>T	F:CCCTCAACTTGGACCTTGG R:ACTTCGGGAGCCATGTAGC	104pz	60°C	74-92°C
CHD7	rs1563644113	c.4033C>T	F:TCAGGCCTCCTTGTTCACAC R:CTGAGTGACGACGCAACATT	159pz	55°C	81 - 91°C
CHD7	rs1009126876	c.4477C>T	F:CTACGAAAAGGGGCCTATGG R:GGTAATGGTGTGGGTTCGAC	108pz	55°C	78-88°C
COL11A1	rs775587076	c.4193A>C	F:ACACAGATGCTCACCACAGG R:TTTCTAACAGGGGGAAGCAG	132pz	57°C	84-94°C
COL17A1	rs121912769	c.3676C>T	F:CTCCCTGCCCCACTTACAG R:CTTCCTCCGCAGCACTACC	269pz	60°C	87-97°C
COL8A1	COSM4595504	c.1463C>T	F:AAGCCAGGTTTCCTTGGTG R:TCCGGGTTTCCCTATACCAG	294pz	60°C	87-97°C
COL9A1	rs760070670	c.1802G>T	F:CCCTGTTGGCCCTGTTATC R:AGGGAAGCCTGGTCAGATG	136pz	55°C	77-87°C
DHCR7	rs547012639	c.1087C>T	F:AGGAGCACTCGATGACCTTG R:GCCTGGTGGGCTACTACATCT	114pz	56°C	84-94°C

DHODH	NOWY	c.749C>G	F:CGCTATTGTGGAAACCCACT R:TGAGGTCAGGAGCGATCTTC	171pz	55°C	84-95°C
DLX5	rs887777137	c.830T>C	F:AGAGAGAGCAGCCCATCTAA R:AGTGCAGCCAGCTCAATCA	103pz	53°C	82-96°C
EDAR	NOWY	c.18C>G	F:AAGTGGCATGGGTACAGCTT R:ATCATGAGGATGAGGGTGCT	286pz	60°C	87-97°C
EFTUD2	rs1467291243	c.956C>T	F:ACCAAAGGTGTCGGCATAGA R:TCCTGGGTAACGTCTGCTTC	89pz	55°C	80-95°C
ERCC2	rs780844758	c.1361T>C	F:GTCCTTACCCCAGATGTGATG R:GTGAGGGTGTGAATGCTCTG	149pz	60°C	86-96°C
ESRP2	NOWY	c.697G>T	F:GGCCATCTTTTCTCAGGTCA R:TCTCACTGTCCACCACATCA	173pz	61°C	85-93°C
ESRP2	rs201908706	c.1088G>A	F:GCTCCGGAAGAGTTCAATGT R:TCTGGAGGAGCATGAGTGAA	326pz	56°C	91-99°C
FGF4	NOWY	c.460G>A	F:GGTACCTTGCCCAAGAGGT R:ACATGCCGGGGTACTTGTAG	141pz	56°C	81-92°C
FGFR3	rs755547723	c.1075C>T	F:GCAGTCCTGGATCAGTGAGA R:TGGGACAGAGTCGTTACCTG	172pz	55°C	88-97°C
FGFR3	rs761163163	c.1759C>T	F:TAACCTGCGGGAGTTTCTG R:CTGCGATCTTCATCACGTTG	331pz	55°C	90-98°C
FLNA	rs781939268	c.2419G>A	F:ACTCCAGGGGCACACTTGAT R:ACGAGCCCACCTACTTCACT	164pz	64°C	86-96°C
FLNB	NOWY	c.3605A>G	F:AACAAAGATGGCACCTACGC R:GCCACCATACTTCATGGTCA	78pz	55°C	80-95°C
FLNB	rs892500905	c.4030A>T	F:CGTGCCTATCCCAAACAGTC R:ACACCAAATGTAGGGCCTTG	157pz	55°C	80-95°C

HSPG2	rs962884439	c.8293G>A	F:GGTCTGAATAGGGGACAGGA R:TGAGTCATCCTCCTCACACG	319pz	56°C	86-99°C
IFT88	rs201076403	c.742A>G	F:CCATTTCTTCACAGGAGGTAAGT R:CACTTGGAACTTGGTCTAATGC	278pz	56°C	74-86°C
IRF6	NOWY	c.224A>G	F:AGTACCAGGAAGGGGTGGAT R:CCTCCTTGGTGCCATCATAC	111pz	55°C	80-92°C
IRF6	CM092352	c.905T>C	F:CAGAAGCTGTTCACTAGCAAGC R:CCGCTAAGGAATGTTTCCAGAC	203pz	66°C	84-94°C
IRF6	rs200808685	c.1060G>A	F:TTCCCACGATCAACTTTCTG R:ATCACTTGTTGCTCCCAACC	107pz	55°C	74-88°C
LOXL3	rs375983669	c.752C>T	F:TGAGGCTTCGACTGTTGTTG R:AGCAACACTCCTTTGGTCTG	196pz	55°C	88-98°C
LRP2	rs749942746	c.2455C>T	F:ACTTACCCGGCAAAAGGATG R:TCAGTGTCATGAGGCTAGCTG	97pz	55°C	78-88°C
LRP2	NOWY	c.11896A>G	F:TGTGAAAATTGCCTCAAAGT R:CCTCCTTCATTTAATTGGGTACA	306pz	52°C	78-88°C
LRP6	rs769446193	c.481C>A	F:TCCCCTCTGGCACTTAGTCA R:TGGACAGACTGGGGAGAAGT	303pz	55°C	77-87°C
MAML1	NOWY	c.193C>T	F:GAGCGCCAACACACCTTC R:AGCTCCCTGCCATGTTACC	311pz	55°C	84-94°C
NHS	NOWY	c.568G>C	F:CTTCCACTCCACCCAGACTT R:CGCGGTAGTACACACTCAGC	155pz	55°C	82-92°C
NIPBL	NOWY	c.2688A>C	F:GGGTTCGAAGACCAGAAACA R:TGCCTTATTGTCAGGGTGTG	302pz	55°C	76-86°C
NOTCH2	NOWY	c.1997A>G	F:TCCTGAACGAGTCTGTGGAC R:ACCTGTGAATCCTGGTGAGC	278pz	55°C	78-88°C

PLEKHA5	NOWY	c.1154A>G	F:CTGAATATGAGAGTGGGTCAGC R:GTATTGGGGCGATTTCCAC	130pz	55°C	80-96°C
POLR1C	rs371479150	c.845C>G	F:TGCTACCAAGTGGCAAATTAGA R:CAAGCCTCACAACCTTCTTTAG	150pz	53°C	76-88°C
PRKD1	NOWY	c.1649T>A	F:ATGTGGGAGATAGCCATCCA R:TCACTGTGCAAGTTGGTTCC	86pz	55°C	84-94°C
SHH	NOWY	c.787C>G	F:GCTCTACAGCGACTTCCTCAC R:GCGCCACAAAGAGCAGGT	128pz	64°C	88-98°C
SKI	NOWY	c.1280A>G	F:TGCCCCTCCAGCTTCTACT R:ACAGTCAGCTTCCGCTTCC	176pz	65°C	87-97°C
SOX9	rs1224146749	c.718A>C	F:AAGTCGATAGGGGGCTGTCT R:CCTGATAAAAGGGGGCTGTC	324pz	53°C	80-90°C
SPRY2	NOWY	c.35A>T	F:TGTGTTCTAAGCCTGCTGGA R:CGTGGAGTCTCTCGTGTTTG	292pz	57°C	84-96°C
TOX3	rs200208189	c.464G>A	F:TCCCATATTCTCTGGCAGGT R:CCACACACAAGTGTCCCAGT	308pz	55°C	84-94°C
TOX3	NOWY	c.1618A>G	F:TTCTCCTCGGCAGCACTC R:TGAGACTGTATTTGCGACTGG	108pz	66°C	84-94°C
TRPS1	NOWY	c.2190G>T	F:TGCCGTCAGTGCAGTTTTAC R:ATATGGCATGACCGTCCTCT	121pz	55°C	81-91°C
TSPEAR	rs782537440	c.1139T>A	F:TGGAGAAAGTCACCGAACAC R:ACATCCGCCGTCTACAAGT	130pz	55°C	80-90°C
WNT10A	rs121908119	c.321C>A	F:CATACAGGGCATCCAGATCG R:CCTCTGCTGAAGATGGGACT	123pz	53°C	81-91°C

WNT10A	rs373695499	c.443C>T	F:GAGAGAGCGCTTTTGCCTAC R:TAAGCGGTGCAGCTTCCTAC	149pz	55°C	86-96°C
WNT10B	rs200116103	c.832C>T	F:TGCCACAGCCATCCAACAG R:GAAGCGGAAATGCAAGTGTC	308pz	60°C	86-97°C
WNT5B	rs529807731	c.716G>T	F:GCAGACGTAGCCTGCAAATG R:GCGCTGTCGTACTTCTCCTT	119pz	56°C	86-97°C

13. Załączniki

UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 364/19

Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 617 z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 2211 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 38 kwietnie 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2005 r. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 38 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem nadzolnich (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1100); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 38 kwietnie 2004 r. w sprawie zgłaszanie niezapodzianowego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2004 r. Nr 184, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 288); Ustawy z dnia 28 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017 r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z przeprowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r. Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 489); Rozporządzenie ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymencie Medycznym z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 07 marca 2019 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownicy projektu: **dr hab. n. med. Adrianna Mostowska**
dr hab. n. med. Barbara Biedziak

Miejsce prowadzenia badań:
Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej oraz Klinika Wad Rozwojowych Twarzy Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Główni badacze: **dr hab. n. med. Adrianna Mostowska**
dr hab. n. med. Barbara Biedziak

Członkowie zespołu badawczego: **mgr Justyna Dąbrowska, lek. dent. Agnieszka Bogdanowicz, lek. dent. Anna Szponar-Żurowska, lek. dent. Ewa Firlej**

Temat badań:
„Identyfikacja patogennych wariantów nukleotydowych u chorych z wrodzonymi wadami twarzy".

Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na wydzieleniu tematu pracy doktorskiej mgr Justyny Dąbrowskiej - „Identyfikacja patogennych wariantów nukleotydowych u chorych z izolowanym rozszczepem wargi połączonym lub nie z rozszczepem podniebienia", zgodnie z Aneksem nr 1 z dnia 07.03.2019r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 1115/18z dnia 07.11.2018 r.
Przyjęto do wiadomości informację dotyczącą zmiany nazwy jednostki, w której prowadzone są badania.
Metodyka badania pozostaje bez zmian.

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Podpisy członków Komisji Bioetycznej podejmujących Uchwałę nr 364/19 ***z dnia 07.03.2019r.***

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy	Podpis
1.	Przewodniczący Komisji **prof. dr hab. Paweł Chęciński**	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UMP, ZOZ MSWiA, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań.	
2.	Z- ca Przewodniczącego Komisji **prof. dr hab. Janusz Wiśniewski**	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, 61-614 Poznań.	
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań	
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Kancelaria Radcy Prawnego, dr Krystyna Babiak, ul. Czartoria 1/2, 61-102 Poznań.	
5.	ks. prof. UAM dr hab. Andrzej Bohdanowicz	teologia	Wydział Teologiczny Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul Wieżowa 2/4, Poznań	
6.	prof. dr hab. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
7.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
8.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
9.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów UMP, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.	
10.	prof. dr hab. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Zakład Zdrowia Publicznego UMP, ul. Dąbrowskiego 79, 60-529 Poznań.	
11.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
12.	prof. dr hab. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
13.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UMP, ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań.	----------
14.	prof. dr hab. Joanna Twarowska-Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Wyższa Szkoła Pedagogiki i Administracji im. Mieszka I w Poznaniu, ul. Bułgarska 55, 60-320 Poznań.	----------