**Lek. Agnieszka Gaczkowska**

**Promotor: dr hab. n. med. Adrianna Mostowska**

**Tytuł rozprawy doktorskiej:**

**„Rola czynników genetycznych w etiologii najczęstszych wad rozwojowych twarzoczaszki: izolowanych rozszczepów wargi i podniebienia oraz wrodzonego braku zawiązków zębów stałych”**

Uwaga: rozszczepy wargi i podniebienia są heterogenną grupą nieprawidłowości rozwojowych.
W zależności od miejsca, w którym nie wystąpiła fuzja lub też doszło do niecałkowitego połączenia się właściwych wyrostków, wyróżniamy rozszczep wargi i wyrostka zębodołowego połączony lub też nie
z rozszczepem podniebienia (CL/P) oraz rozszczep samego podniebienia (CP). Etiologia obu tych typów rozszczepów jest różna. W ramach tej rozprawy doktorskiej badano rolę czynników genetycznych w etiologii izolowanych CL/P.

Izolowane rozszczepy wargi połączone lub nie z rozszczepem podniebienia (nsCL/P) należą do najczęstszych wad wrodzonych twarzoczaszki [OMIM #119530]. Częstość występowania tych nieprawidłowości rozwojowych zależy od populacji, a także od warunków socjoekonomicznych[1]. W Polsce według Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych częstość występowania wady rozszczepowej w latach 1998-2008 zawiera się w przedziale od 7,6/10000 do 11,4/10000 urodzeń [2]. Leczenie pacjentów z nsCL/P stanowi poważny problem w praktyce klinicznej, gdyż jest długotrwałe i przebiega wieloetapowo. Dzieci z wadą rozszczepową wymagają nie tylko leczenia chirurgicznego, ale także muszą być objęte wielospecjalistyczną opieką pediatryczną, stomatologiczną, ortodontyczną, logopedyczną czy też foniatryczną. Wykazano ponadto, że osoby dorosłe dotknięte tą nieprawidłowością rozwojową mają znacznie zwiększone ryzyko wystąpienia zaburzeń psychicznych oraz zwiększone ryzyko zachorowania na różne nowotwory [3,4].

Etiologia nsCL/P jest bardzo złożona, gdyż w powstawaniu tej wady biorą udział zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe oraz ich złożone wzajemne oddziaływania [5]. Bardzo ważną rolę odgrywa także dieta matki, psychologiczny stres oraz zaburzony status hormonalny ciężarnej kobiety [6,7]. Pomimo licznych badań, wiedza na temat roli czynników genetycznych w etiologii nsCL/P wciąż nie jest kompletna. Znaczny postęp w identyfikacji częstych wariantów nukleotydowych, które zwiększają ryzyko nsCL/P był możliwy dzięki zastosowaniu badań asocjacyjnych prowadzonych w skali całego genomu (ang. *Genome-Wide Association Studies*, GWAS). Dotychczas opublikowano wyniki siedmiu niezależnych analiz GWAS, które pozwoliły na identyfikację licznych chromosomowych loci, które wykazują związek z ryzykiem wady rozszczepowej: 1p22.1 (*ARHGAP29*), 2p24.2 (*FAM49A*), 8q24.21 (pustynia genowa), 10q25.3 (VAX1), 12q12 (*ADAMTS20*), 16p13.3 (ADCY9), 17q22 (NOG), 17q23 (*TANC2*), 19q13 (*RHPN2*) oraz 20q12 (MAFB) [8-14]. Analiza GWAS dla nsCL/P,
z wykorzystaniem mikromacierzy umożliwiających jednoczesną analizę ponad 950 tysięcy wariantów nukleotydowych, została wykonana także w populacji polskiej. Analiza statystyczna otrzymanych wyników pozwoliła na identyfikację dwóch nowych genów: *DLG1* oraz *CDKAL1*, których warianty nukleotydowe wykazują istotny związek z ryzykiem wady rozszczepowej. Potwierdziła ona także status regionu chromosomowego 8q24.21 jako najważniejszego locus dla nsCL/P w populacjach europejskich.

Wrodzony brak związków zębów stałych [OMIM #106600] jest jedną z najczęstszych nieprawidłowości rozwojowych uzębienia i jedną z najczęstszych wad rozwojowych części twarzowej czaszki. Częstość występowania tej wady zależy od populacji i wynosi od 1,6 do 9,6% - dane te nie obejmują trzecich zębów trzonowych, których brak stwierdza się u około 20-25% osób [15]. W zależności od liczby brakujących zawiązków zębowych wyróżnia się hipodoncję (brak od 1 do 5 zawiązków zębów, wyłączając trzecie zęby trzonowe), oligodoncję (brak 6 lub więcej zawiązków zębów, wyłączając trzecie zęby trzonowe) oraz anodoncję, czyli brak wszystkich zawiązków zębów. Wrodzone braki zawiązków zębów stałych mogą występować zarówno jako wada samodzielna (wada izolowana) jak i mogą stanowić jeden
z objawów złożonych wad rozwojowych [16]. Postać rodzinna agenezji zębowej jest dziedziczona przede wszystkim w sposób autosomalny dominujący, ale obserwowane są również przypadki dziedziczenia recesywnego lub też związanego z chromosomem X [15, 16].

Etiologia wrodzonego braku zawiązków zębów stałych jest bardzo złożona, a za jedną z głównych przyczyn tej wady, obok zaburzeń rozwojowych ektodermy, czy też negatywnego wpływu czynników środowiskowych, uważa się czynniki genetyczne [17]. Do najważniejszych genów kandydackich, których mutacje powodują zatrzymanie rozwoju zawiązków zębów stałych należą *WNT10A*, *PAX9, MSX1, AXIN2* oraz *EDA* [18]. Mutacje genu *EDA* są opisywane zarówno jako przyczyna wrodzonego braku zawiązków zębów stałych jak
i hipohydrotycznej dysplazji ektodermalnej, która jest zespołem zaburzeń rozwojowych tkanek pochodzenia ektodermalnego [19]. Główne objawy dysplazji ektodermalnej dotyczą skóry i jej przydatków, uzębienia, budowy części twarzowej czaszki, tkanek oka, ucha, nadnerczy, układu nerwowego oraz rozwoju umysłowego. Wśród genów kandydackich dla agenezji zębów stałych wymienia się także geny, których warianty nukleotydowe wykazują związek z ryzykiem wady rozszczepowej [20]. Należą do nich geny kodujące białka szlaku sygnalizacyjnego TGF czy też gen *CDH1*. Na tej podstawie zaproponowano hipotezę według której wrodzone braki zębów stałych są jednym z fenotypów wady rozszczepowej [21]. Potwierdzeniem tej hipotezy są dane wskazujące, że nieprawidłowości zębowe dotyczące liczby zębów oraz ich rozmiaru, kształtu i czasu wyżynania znacznie częściej występują w populacji osób z rozszczepami wargi i podniebienia w porównaniu do populacji ogólnej [22, 23]. Zwiększona częstość agenezji zębów u osób z wadą rozszczepową jest obserwowana zarówno w obrębie rozszczepu jak
i poza nim [22, 23].

Głównym celem rozprawy doktorskiej była identyfikacja czynników genetycznych, które mogą znacząco wpływać na ryzyko wystąpienia nsCL/P oraz wrodzonego braku zawiązków zębów stałych w populacji polskiej.

Cele szczegółowe pracy doktorskiej obejmowały:

1. identyfikację etiologicznych mutacji wybranych genów kandydackich w rodzinach
z wrodzonym brakiem zawiązków zębów stałych oraz analizę korelacji genotypowo-fenotypowych
2. sprawdzenie czy warianty polimorficzne genu *DLX1* wykazują związek z występowaniem nsCL/P
3. potwierdzenie w niezależnej grupie chorych z wadą rozszczepową oraz grupie kontrolnej najistotniejszych wyników analizy GWAS, która została wykonana dla nsCL/P w populacji polskiej (weryfikacja wyników analiz GWAS w niezależnych badaniach replikacyjnych jest „złotym standardem” w badaniach genomowych); analiza replikacyjna polegała na:
* badaniu asocjacyjnym wybranych wariantów polimorficznych genów *DLG1* oraz *CDKAL1*
* poszukiwaniu etiologicznych wariantów w sekwencji kodującej genu *CDKAL1*
* analizie korelacji genotypowo-fenotypowych

Materiał*:*

Materiałem do badań było DNA wyizolowane z krwi obwodowej chorych z nsCL/P oraz wrodzonym brakiem zawiązków zębów stałych. Do badań wykorzystano także próbki DNA wyizolowane z krwi obwodowej osób zdrowych bez żadnych wad rozwojowych. Próbki krwi wraz ze szczegółowym opisem klinicznym uzyskano w ramach współpracy z wieloma ośrodkami zarówno w kraju jak i zagranicą. Na badania i przechowywanie DNA uzyskano pisemną zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (numer 891/11).

 Metodyka:

* izolacja DNA z krwi obwodowej techniką wysalania
* identyfikacja mutacji: bezpośrednie sekwencjonowanie DNA
* analiza wybranych wariantów nukleotydowych: metoda HRM(ang. *High Resolution Melting*)
* analiza *in silico*zidentyfikowanych mutacji: programy PolyPhen-2 oraz SIFT
* analiza statystyczna:
* ocena związku badanych wariantów nukleotydowych z ryzkiem nsCL/P: test trendu Cochrana-Armitage (ang. *Cochran-Armitage trend test*)
* porównanie częstości alleli oraz genotypów pomiędzy grupą chorych z nsCL/P oraz grupą kontrolną: test X2 oraz test Fisher’a
* kalkulacja ilorazu szans (OR) przy uwzględnieniu odpowiednich przedziałów ufności (95%CI)
* analiza haplotypów: program Haploview 4.2

w przypadku badań replikacyjnych - analizy statystyczne zostały przeprowadzone zarówno dla wyników uzyskanych w analizie replikacyjnej oraz po połączniu wyników analizy replikacyjnej oraz analizy GWAS (tzw. analiza łączona); wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone także po podziale pacjentów ze względu na płeć i typ rozszczepu.