

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



**Bc. Kristýna Králíková**

Genetická determinace a dědičnost kraniofaciálních znaků na základě  
vybraných lokusů DNA

Genetic determination and heredity of craniofacial traits based on specific DNA loci

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

Praha, 2017

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci „Dědičnost kraniofaciálních znaků na základě vybraných lokusů DNA“ zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavlína Daňkové, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 2.1.2018

Kristýna Králíková

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a trpělivost během zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Anastasii Lebedeva za odborné rady a pomoc a také celému kolektivu Laboratoře molekulární antropologie za podporu a skvělou pracovní atmosféru. Poděkování patří také celé rodině za podporu po celou dobu studia.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
1.1	<i>Kraniofaciální růst a vývoj.....</i>	8
1.1.1	Geny zapojené do vývoje a růstu obličeje.....	9
1.2	<i>Modely dědičnosti.....</i>	13
1.3	<i>Heritabilita kraniofaciálních znaků.....</i>	15
1.3.1	Geminologické studie.....	16
1.4	<i>Možnosti a limity studia kraniofaciální morfologie a její dědičnosti.....</i>	17
1.4.1	Studie na zvířecích modelech.....	18
1.4.2	Studie rodin.....	18
1.4.3	Populační studie.....	19
1.4.4	Studie dysmorfologických syndromů.....	21
1.4.5	Asociační studie.....	22
1.5	<i>Výběr genetických markerů pro diplomovou práci.....</i>	28
<b>2</b>	<b>Hypotézy a cíle diplomové práce.....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a metody.....</b>	<b>34</b>
3.1	<i>Materiál.....</i>	34
3.2	<i>Odběr slin a izolace DNA.....</i>	35
3.3	<i>Polymerázová řetězová reakce PCR.....</i>	36
3.3.1	PCR podmínky jednotlivých SNP.....	37
3.4	<i>Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP).....</i>	44
3.5	<i>Gelová elektroforéza.....</i>	46
3.6	<i>SNaPshot.....</i>	48
3.7	<i>Korekce dat.....</i>	53
3.8	<i>Statistické zpracování.....</i>	55
<b>4</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>58</b>
4.1	<i>Populační analýza genetických dat.....</i>	58
4.1.1	Frekvence alel.....	58
4.1.2	Hardy-Weinbergova rovnováha.....	59

4.1.3	Vazebná nerovnováha .....	60
4.2	<i>Asociace SNP a vybraných znaků obličeje</i> .....	61
4.2.1	Šířka oka .....	61
4.2.2	Exocanthion-nasion .....	63
4.2.3	Exocanthion-pronasale .....	64
4.2.4	Vzdálenost očí .....	64
4.2.5	Pronasale-chelion .....	66
4.2.6	Nasion-chelion.....	67
4.2.7	Nasion-pogonion .....	70
4.2.8	Pronasale-pogonion a nasion-pronasale .....	70
4.2.9	Šířka úst .....	70
4.3	<i>Dědičnost parametrů obličeje</i> .....	71
4.3.1	Šířka oka .....	71
4.3.2	Exocanthion-nasion .....	72
4.3.3	Exocanthion-pronasale .....	73
4.3.4	Vzdálenost očí .....	73
4.3.5	Pronasale-chelion .....	74
4.3.6	Nasion-chelion.....	74
4.3.7	Nasion-pogonion .....	75
4.3.8	Pronasale-pogonion .....	76
4.3.9	Nasion-pronasale .....	77
4.3.10	Šířka úst .....	78
4.3.11	Pearsonův korelační koeficient .....	78
4.4	<i>Dědičnost parametrů obličeje ve vztahu ke genotypu</i> .....	79
4.4.1	Šířka oka P.....	80
4.4.2	Vzdálenost očí .....	81
4.4.3	Pronasale-chelion P .....	82
4.4.4	Nasion-chelion.....	83
<b>5</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy</b> .....	<b>110</b>

## **Abstrakt**

**Úvod:** Genetická podmíněnost lidského obličeje je zřejmá při pohledu na členy rodin a pozoruhodná je podobnost monozygotních dvojčat, která jsou geneticky identická. Možnost spolehlivé predikce komplexní morfologie faciálních znaků na základě analýzy genomu a schopnost postihnout variabilitu morfologie lidského obličeje prostřednictvím variability genotypové je zatím silně omezená. Kompletní genetický podklad fyziologické variability kraniofaciálních znaků zůstává v podstatě neznámý. Tato diplomová práce vznikla jako pilotní studie společného projektu Laboratoře 3D zobrazovacích a analytických metod a Laboratoře molekulární antropologie Katedry antropologie a genetiky člověka.

**Materiál a metody:** Soubor vzorků je tvořený 30 rodinami (29 rodin čtyřčlenných a 1 rodina pětičlenná), které splnily stanovené požadavky. Na základě dostupných informací bylo vybráno 9 jednonukleotidových polymorfismů; osm z nich je již spojováno s normální variabilitou obličeje, jeden byl vybrán na základě předpokladu funkce genu, ve kterém polymorfismus leží. Genotypizace probíhala dvěma metodami – pomocí restrikční endonukleázy metodou RFLP a metodou SNaPshot. Morfologická data byla poskytnuta Laboratoří 3D zobrazovacích a analytických metod.

**Závěr:** Potvrdili jsme asociaci dvou polymorfismů s morfologií lidského obličeje. SNP rs6569759 ovlivňuje šířku oka, vzdálenost očí a rozměr nasion-chelion a polymorfismus rs4648379 je spojen s rozměry pronasale-chelion a nasion-chelion. Zjistili jsme, že se účinek genotypu nemusí shodovat mezi muži a ženami, a u některých případů jsme pozorovali odlišné trendy. Při hledání vztahů mezi potomky a rodiči jsme našli silnou korelaci mezi dcerami a matkami a výškou obličeje, u synů pozorujeme obecněji vyšší korelaci s otci. Příspěvek rodičů k fenotypu dítěte nemusí být u všech parametrů přesně 50 % a i tady mohou nastat odlišnosti mezi pohlavími.

### **Klíčová slova:**

genetická podmíněnost kraniofaciální morfologie – dědičnost – SNP – SNaPshot

## **Abstract**

**Introduction:** Genetic determination of human face is clearly visible in family members. The resemblance between monozygotic twins who are genetically identical is especially remarkable. So far the possibilities of reliable prediction of the complex morphology of facial traits on the basis of genome analysis and the ability to capture the variability of human facial morphology through genotype variability are highly limited. Complete genetic basis of the physiological variability of craniofacial traits remains more or less unknown. This master's thesis was created as a pilot study of the shared project of the Laboratory of 3D Imaging and Analytical Methods and the Laboratory of Molecular Anthropology on Department of Anthropology and Human Genetics.

**Material and Methods:** The specimen collection is composed of DNA samples derived from 30 families (29 with 4 members, 1 with 5 members) who fulfilled required criteria. Nine single nucleotide polymorphisms were chosen based on the available information. Eight of them are linked to normal facial variability and one was chosen based on the assumed function of the gene where the polymorphism is located. There were two methods of genotyping: RFLP method with the use of restriction endonuclease and SNaPshot method. Morphological data were provided by the Laboratory of 3D Imaging and Analytical Methods.

**Conclusion:** We confirmed the association of two polymorphisms with human facial morphology. SNP rs6569759 influences the eye width, the biocular length and the nasion-chelion dimension, and the rs4648379 polymorphism is linked with pronasale-chelion and nasion-chelion dimensions. We found that the genotype effect does not have to be identical in men and women and in some cases we observed different trends. While looking for links between parents and their children, we discovered a strong correlation between mothers and daughters and their facial height, and stronger general correlation between sons and fathers. The parental contribution to the child's phenotype does not have to be 50% in all parameters and differences between sexes might occur.

### **Key words:**

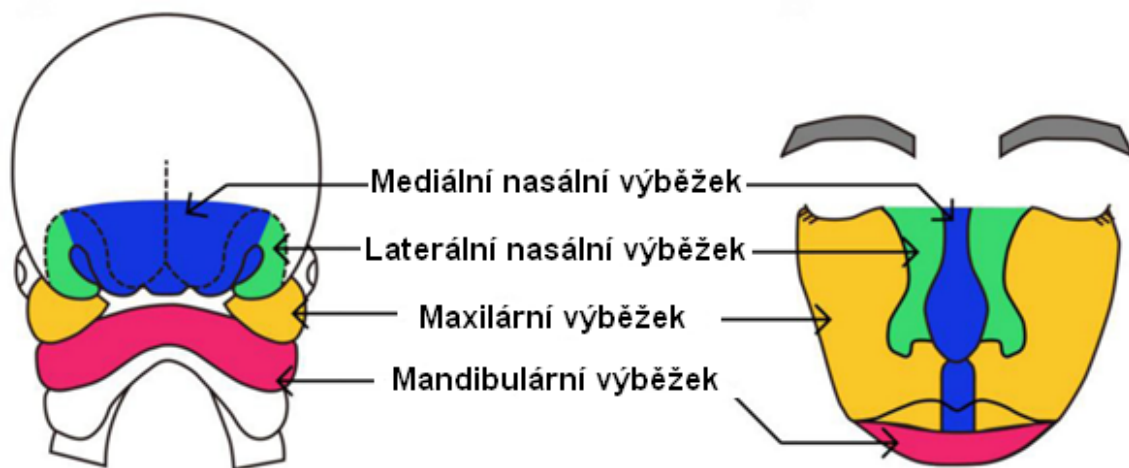
genetic determination of craniofacial morphology – heredity – SNP – SNaPshot

# 1 Úvod

## 1.1 Kraniofaciální růst a vývoj

Vývoj obličeje začíná u člověka ve čtvrtém týdnu intrauterinního života, kdy se kolem primordiálního stomodea (primitivní ústní jamka) začínají objevovat primordia: frontonasální výběžek (FNP), párové maxilární (Mx) a mandibulární výběžky (Md).

Z frontonasální masy vznikají nasální výběžky. Z laterálních nasálních výběžků (LNP) se tvoří nosní křídla, z mediálních (MNP) se utváří *dorsum et apex nasi*. Srůstem s Mx vzniká základ horní čelisti a horního rtu. Maxilární a mandibulární výběžky vznikají z 1. žaberního oblouku, ze kterého se formují krycí kosti splanchnokrania: *premaxilla*, *maxilla*, *os palatinum*, *os zygomaticum* a *mandibula* (Obr. 1). Z 1. žaberního oblouku vznikají také žvýkácí svaly. Mimické svaly mají základ v 2. žaberním oblouku, stejně jako *os hyoideum*. Rozpoznat obličej lze již koncem embryonálního období – konec 8. týdne intrauterinního života (Čihák 1988; Welbury et al. 2012; Moore, et al. 2016).



**Obr. 1** - Schématické znázornění fúze valů (upraveno podle Graf et. al. 2016)

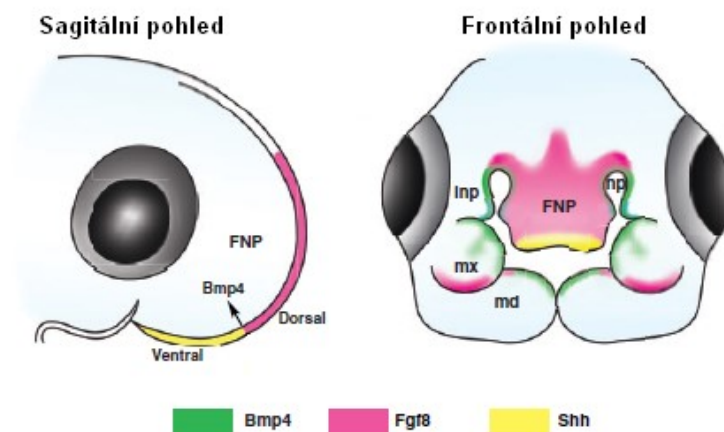


Obecně na lebce můžeme pozorovat převážně dva typy růstu: neurální a faciální. Mozkovna a orbita roste neurálním typem, u kterého je v 6 letech dosaženo přes 90 % konečné velikosti znaku. Zygomaticomaxilární komplex vykazuje faciální typ růstu – v 6 letech je dosaženo více než 80 % konečné velikosti znaku. Mandibula se pak vyznačuje smíšeným typem růstu. U dívek po 15. roce zygomaticomaxilární komplex neroste, mandibula velmi málo. U chlapců zygomaticomaxilární komplex ještě mírně roste, mandibula roste intenzivně. Celkový růst obličeje je komplexní proces a souhra apozice a resorpce kostí, translokačních posunů a V-principu růstu (Šmahel 2001; Welbury et al. 2012), je podmíněn také vývojem mozku a oka (Hu, Young, Xu, et al. 2015).

### **1.1.1 Geny zapojené do vývoje a růstu obličeje**

Během embryonálního vývoje je aktivováno mnoho signálních molekul, například FGF – fibroblastové růstové faktory, BMP – kostní morfogenetické proteiny, HH – rodina proteinů hedgehog, WNT proteiny – wingless type MMTV (mouse mammary tumor virus) integration site family či kyselina retinová (Kohoutová 2012). Jako signální molekulu označujeme jakoukoliv molekulu či makromolekulu, která zprostředkovává a předává informaci (Rosypal 2002).

Velkou roli hrají ve vývoji embrya transkripční faktory (Obr. 2). Ty se váží přímo na konkrétní sekvenci nukleotidů v DNA, a to buď na promotory, které se nachází na počátku genu, nebo mohou nasedat na místa vzdálená od počátku transkripce – pak mluvíme o enhancerech, které posilují transkripci, nebo o silencerech, které transkripci naopak potlačují. Mezi významné transkripční faktory patří například HOX geny (homeoboxové geny), SRY geny (pohlaví determinující region Y), SOX geny (geny obsahující SRY-box), PAX geny (paired box geny), gen pro transkripční faktor MyoD (myogenní regulační faktor), TBX geny (T-Box geny) (Kohoutová 2012).



**Obr. 2** - Schématické znázornění vlivu signálních drah (upraveno podle Minoux et al. 2010)

FNP – frontonasální výběžek; mx – maxilární výběžek; md – mandibulární výběžek; lnp – laterální nosní výběžek; np – čichová jamka

### **FGF – fibroblastové růstové faktory**

Rodina fibroblastových růstových faktorů se skládá z 22 sekretovaných proteinů, které pak dále reagují se 4 tyrosin-kinázovými FGF receptory (FGFR). Tyto faktory jsou důležité již v prvních stádiích embryogeneze, ale i během organogeneze. Regulují růst, diferenciaci a migraci buněk. Tato signalizační dráha se podílí i na reparačních mechanismech dospělé tkáně a její regeneraci (Ornitz and Marie 2015). Během embryogeneze podporují diferenciaci neuroektodermu se souhrou antagonistů BMP a WNT (Kudoh et al. 2004; Singh et al. 2016). FGF aktivují dráhu MAP kináz (mitogen-activated protein), které mohou blokovat fosforylaci a tím i aktivaci celé MAP/ERK kaskády. Poruchy v této kaskádě dějů mohou vést k deformitám lebky (Mishina and Snider 2014).

### **BMP – kostní morfogenetické proteiny**

Jednou z klíčových signálních drah, které regulují kraniofaciální vývoj, je BMP signální dráha. BMP dráha ovlivňuje buňky neurální lišty embrya a obličejová primordia, hraje roli při fúzi obličejových valů, tvorbě a přestavbě kostí, vývoji dolní čelisti a zasahuje

do morfogeneze zubů. Reguluje buněčnou smrt a interaguje s dalšími signálními dráhami při vývoji, například FGF, HH, Wnt nebo Notch dráhy (Graf et al. 2016). BMP se také podílí na imunitní reakci při zánětu (Martínez et al. 2015).

BMP signální molekuly jsou ve velké míře exprimovány v migrujících buňkách neurální lišty (Mishina and Snider 2014). V časných fázích vývoje obličeje jsou u myši exprimovány především *Bmp2* a *Bmp4* (Bennett et al. 1995). BMP u kuřecích embryí ovlivňují geny *MSX1* a *MSX2*, které se také exprimují při vývoji obličeje, zejména v maxilárních a mandibulárních výběžcích (Brown et al. 1993).

Jednou z malformací způsobenou mutacemi v genech BMP dráhy, je rozštěp rtu a patra. Ty vznikají nedokonalým spojením nasálních či maxilárních výběžků. U člověka je známo několik genů, jejichž mutace vedou ke vzniku rozštěpů, například *MSX1*, *TP63* nebo *IRF6* (Mostowska et al. 2010). Mutace v genech rodiny *ALX* vedou k frontonasální dysplasii, charakteristickou hypertelorismem nebo například sníženým kořenem a hřbetem nosu (Graf et al. 2016).

### **Hedgehog proteiny**

Signalizační dráha Hedgehog (HH) je nepostradatelná při vývoji mnoha orgánů, kraniofaciálních struktur nevyjímaje. Rodina HH se skládá ze tří proteinů: Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) a Desert Hedgehog (DHH). Kraniofaciálního vývoje se účastní SHH a IHH. Poruchy v této signalizační dráze mohou vést k rozštěpům patra či rtu nebo například k hypertelorismu (Pan et al. 2013; Kurosaka et al. 2014). SHH je aktivní v neurální trubici ještě před viditelným růstem mediálního a laterálního nasálního valu. Mezenchymální buňky ve frontonasálním valu přijímají SHH ligand a aktivují tím celou signalizační kaskádu. To se děje u myši během 10. embryonálního dne. V průběhu 11. dne je možné pozorovat expresi SHH i v mediálním nasálním valu. Spolu s *Fgf8* ovlivňují růst a vývoj frontálního nasálního valu, ke správnému vývoji FNP je potřebná přítomnost kostních morfogenetických proteinů (Kurosaka 2015). Exprese IHH je pozorována převážně v osteogenních částech dávajících základ kostem lebeční klenby (Pan et al. 2013). Tato signalizační dráha může podněcovat vznik tumorů, jejich růst a progresi. Podílí se také na správné funkci centrálního nervového systému (Rimkus et al. 2016).

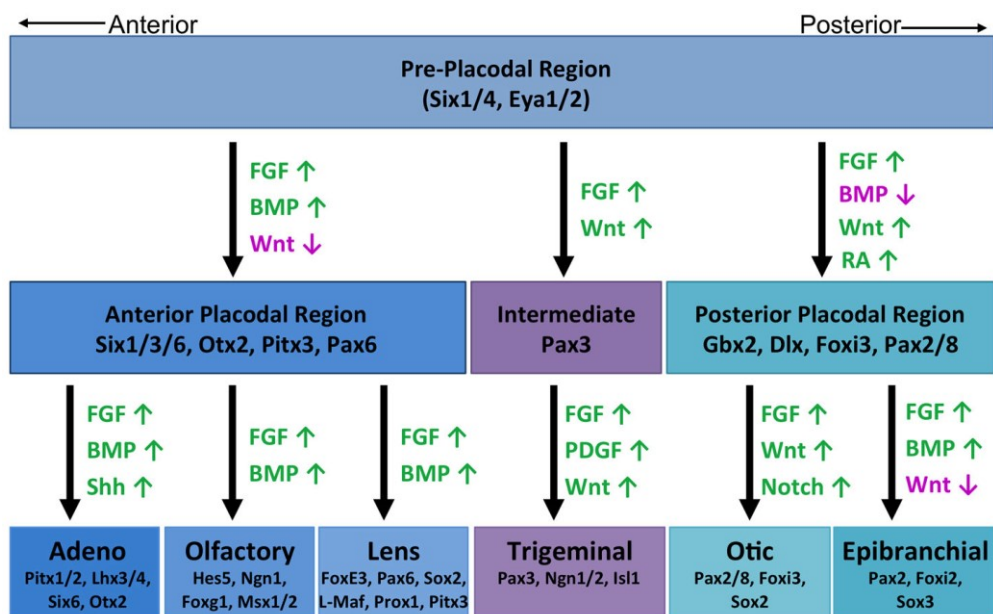
## **WNT proteiny – wingless-type MMTV**

Tato rodina proteinů se podílí na celé řadě procesů během embryogeneze, zejména na diferenciaci buněk neurální lišty a zubů. Jejich expresi můžeme pozorovat hlavně v laterálních regionech embrya, kde blokují diferenciaci neurální lišty inhibicí FGF signalizační dráhy a indukují zde proliferaci epidermálních buněk spolu s BMP proteiny (Singh et al. 2016).

## **Kyselina retinová**

Ačkoliv kyselina retinová není složitým proteinem, ale nízkomolekulární látkou, je její role nezastupitelná. Prekurzorem její výroby je vitamín A. Vytváří koncentrační gradienty mezi intracelulárním prostorem buňky a prostorem extracelulárním, které jsou nezbytné pro správný vývoj struktur mozku, končetin, gonád a dalších (Kohoutová 2012). Během normálního vývoje je syntéza kyseliny retinové řízena proteiny Cyp26. Tyto proteiny patří do rodiny cytochromů P450 a degradují nepotřebnou kyselinu retinovou oxidací na inaktivní metabolity. Nesprávné odbourání přebytečné kyseliny retinové vede ke kraniosynostózám, arachnodaktýlii a fúzi loketního kloubu (Laue et al. 2011).

Na Obr. 3 jsou schématicky znázorněny nejdůležitější signální molekuly a transkripční faktory, které se účastní při vývoji kraniálních plakod. Aktivní (zelené) či inhibované (fialové) signální dráhy jsou odlišeny barevně. Na obrázku vidíme rozdílné plakody a transkripční faktory, které se na diferenciaci podílejí.



**Obr. 3** - Schématické znázornění signálních molekul a transkripčních faktorů účastnících se embryogeneze (převzato z Singh et al. 2016)

## 1.2 Modely dědičnosti

Pokud budeme sledovat počet zapojených genů potřebných k projevu fenotypu, můžeme dědičnost rozdělit na dva typy. Prvním typem dědičnosti je dědičnost monogenní, u které je fenotyp znaku určen pouze jedním genem a dědičnost odpovídá Mendelovým zákonům. Enviromentální prostředí nemá téměř žádný vliv na výsledný fenotyp. Mezi alelami genu pozorujeme vztahy úplné dominance či recesivity, neúplné dominance nebo kodominance.

Druhým typem je dědičnost polygenní. U kvantitativních (měřitelných) znaků, jakými jsou například tělesná výška, hmotnost či krevní tlak, má na pozorovaný znak vliv řada genů s malým účinkem (tzv. minor geny). Fenotypová variabilita je pak dána genetickou a enviromentální složkou (Snustad and Simmons 2009; Otová et al. 2006). Mezi alelami pozorujeme složitější vztahy, než je tomu u monogenní dědičnosti. Příkladem může být aditivní model, u kterého se předpokládá interakce mezi alelami – semidominance. Účinky jednotlivých alel či genů se tak sčítají či vyrušují.

Varianci fenotypu bychom pak mohli zapsat jako:

$$V_p = V_g + V_e + V_{ge}$$

$V_p$  značí fenotypovou varianci,  $V_g$  je variance způsobená rozdíly v genotypu,  $V_e$  označuje varianci způsobenou odlišným enviromentálním prostředím a  $V_{ge}$  pak varianci vzniklou interakcemi genotypu a enviromentálního prostředí.

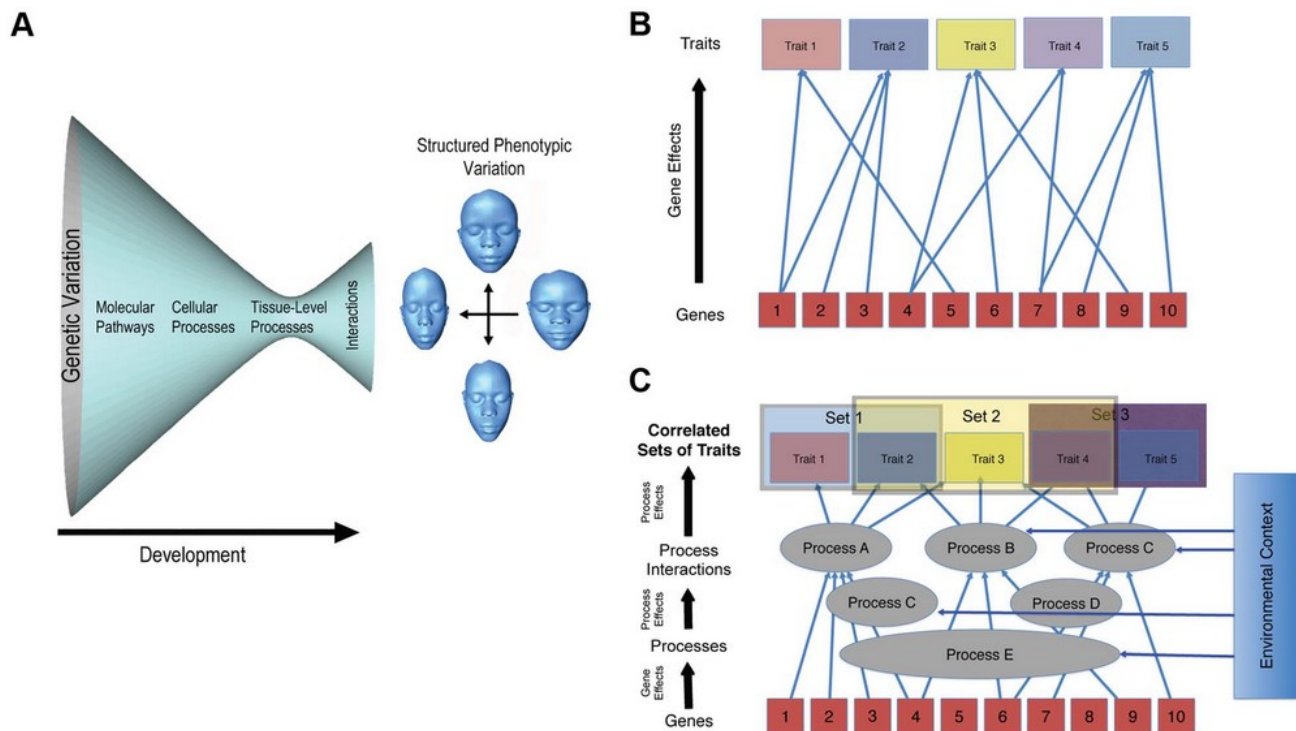
Varianci vzniklou rozdíly genotypu můžeme označit jako součet několika příspěvků:

- $V_a$ , který odpovídá aditivnímu účinku genů, jejichž výsledný efekt odpovídá součtu působení jednotlivých alel,
- $V_d$ , který zahrnuje geny, u nichž se uplatňuje princip dominance a recesivity a výsledný efekt této složky není aditivní,
- $V_i$ , který představuje interakce mezi geny.

Výslednou fenotypovou varianci můžeme tedy zapsat jako:

$$V_p = V_a + V_d + V_i + V_e + V_{ge}$$

Na Obr. 4 jsou znázorněny možnosti polygenní dědičnosti komplexních znaků. Obr. 4 A zachycuje ideu, že z celkového množství genetické variace se nakonec projeví a ovlivní fenotyp jen některé molekulární dráhy a buněčné procesy. Tyto procesy se navzájem ovlivňují a vytváří fenotypovou variabilitu komplexní struktury, jakou je obličej. Obr. 4 B poukazuje na polygenní dědičnosti jednotlivých znaků. Obr. 4 C pak znázorňuje modulární vzorec efektu genů na biologické procesy a účinky těchto procesů na různé fenotypové znaky. Z těchto ilustrací lze vidět, jak složitý je vztah genotypu a fenotypu obličeje (Hallgrímsson et al. 2014).



**Obr. 4** - Genotyp-fenotypové mapy komplexních znaků (převzato z Hallgrímsson et al. 2014)

### 1.3 Heritabilita kraniofaciálních znaků

Heritabilita  $H^2$  čili dědivost udává, jaká část z fenotypové variance je podmíněna genetickými rozdíly. Lze ji zapsat:

$$H^2 = \frac{V_g}{V_f} = \frac{V_g}{(V_g + V_e)}$$

$V_g$  – genetická variance

$V_e$  – enviromentální variance

$V_f$  – celková fenotypová variance

Heritabilita nabývá hodnot od 0 po 1. Čím vyšší hodnota heritability, tím více je znak determinován genotypem. Čím nižší hodnota, tím je větší vliv enviromentální složky a například i lepší možnost prevence vzniku onemocnění (Snustad and Simmons 2009).

### 1.3.1 Geminologické studie

Ke zjištění příspěvku genetických a enviromentálních faktorů k výslednému fenotypu se využívají dvojčecí (geminologické) studie. U společně žijících dizygotních dvojčat (DZ), které v průměru sdílejí 50 % genetického materiálu, můžeme pozorovat vliv genotypu na znak při stejných enviromentálních podmínkách. U monozygotních dvojčat (MZ) naopak můžeme odhadovat vliv vnějšího prostředí, protože mají identickou genetickou výbavu (Nussbaum et al. 2004).

U dvojčecí metody pozorujeme konkordantní znaky (shodné) a diskordantní znaky (rozdílné) mezi členy dvojčecího páru. Pro výpočet se využívá Holzingerovy H statistiky:

$$H = \frac{K_{MZ} - K_{DZ}}{1 - K_{DZ}}$$

K je konkordance MZ nebo DZ, tzn. podíl počtu párů dvojčat, u kterých nesou znak obě dvojčata, ku celkovému počtu párů, kde daný znak nese jedno dvojče.

Při geminologických studiích musíme brát ohled na to, že i když mají MZ identický genotyp, nemusí mít stejnou genovou expresi. Ta může být ovlivněna již prenatálně nerovnoměrným krevním zásobením v ontogenetickém vývoji, epigenetickými interakcemi (např. metylací DNA) či rozdíly ve specifické imunitě. Čím starší jsou dvojčata, tím budou rozdíly v genové expresi větší (Nussbaum et al. 2004; Otová et al. 2008; Snustad and Simmons 2009).

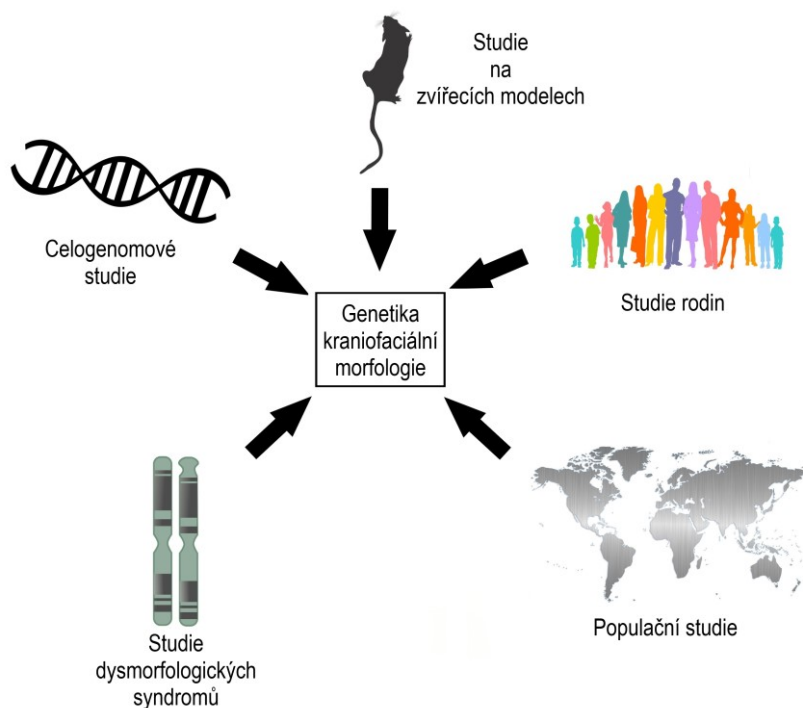
Tento typ výzkumů má své uplatnění ve studiu multifaktoriálních onemocnění, při zkoumání interakcí mezi genotypem a pohlavím, věkem a životním stylem, a výsledky výzkumů tak poskytují informace k dalším asociačním studiím (Boomsma et al. 2002). Heritabilita kraniofaciálních znaků, odhadovaná na základě údajů z geminologických studií až na 80 % (Savoie et al. 1998; Johannsdottir et al. 2005; Jelenkovic et al. 2008; Martínez-Abadías et al. 2009), bude u různých kraniofaciálních znaků odlišná.



## 1.4 Možnosti a limity studia kraniofaciální morfologie a její dědičnosti

V současnosti dokážeme z DNA získat informace o některých vnějších charakteristikách, jako je například pigmentace kůže (Beleza et al. 2013; Liu et al. 2015; Walsh et al. 2017), barva vlasů (Han et al. 2008; Norton et al. 2016) nebo barva očí (Candille et al. 2012; Walsh et al. 2012). Pro forenzní a antropologické účely se využívají komerční kity IrisPlex pro zjištění barvy duhovky (Walsh et al. 2012), pro současné určení barvy vlasů a očí HIrisPlex (Walsh et al. 2013). Lidský obličej jako celek je jistě také geneticky podmíněn, nicméně o genetickém základu způsobujícím jeho variabilitu víme velmi málo. Mimo obličej existují i studie identifikující například geny, které ovlivňují morfologii vnějšího ucha (Adhikari et al. 2015).

Obecně můžeme pozorovat několik typů přístupů zkoumání fyziologické variability obličeje (Obr. 5), například studie na zvířecích modelech, studie rodin, populační studie, studie dysmorfologických syndromů a dnes hojně využívané celogenomové studie (GWAS) (Roosenboom et al. 2016). Každý z těchto přístupů má své výhody i limity.



**Obr. 5** - Zdroje informací ke zkoumání genetické etiologie kraniofaciální variability (přepřacováno podle Roosenboom et al. 2016)

### 1.4.1 Studie na zvířecích modelech

Studie na zvířecích modelech poskytují velmi užitečné informace o genetickém podkladu lidského obličeje. Nespornou výhodou je možnost studia kraniofaciálního vývoje již v prenatálním období. Vývoj obličeje u mnoha placentárních zvířat vykazuje velký stupeň podobnosti, což umožňuje sledování signálních drah během embryonálního vývoje popsanych výše (Hu et al. 2015). U zvířat lze také sledovat vliv konkrétního genu na pozorovaný znak v podobě knock-out a knock-in experimentů. Nejvyužívanějšími modely jsou ryby dánia pruhovaná, myši a kuřata.

### 1.4.2 Studie rodin

Podobnost mezi rodinnými příslušníky je jeden z ukazatelů genetické podmíněnosti lidského obličeje. Pro studium heritability jsou hojně využívány dvojčecí metody zmíněné výše v kapitole 1.3.1. Výhodou těchto přístupů je, že data nejsou zatížena rozdílným růstem a věkem dětí a odlišným životním stylem a prostředím.

Na základě těchto studií byla zjištěna velká míra vlivu genotypu na velikost obličeje, tvar nosu, prominenci rtů a vzdálenost očí. Naopak na tvar dolní čelisti a horizontální asymetrii má vliv spíše vnější prostředí (Weinberg et al. 2013; Djordjevic et al. 2016) stejně jako na oblast tváří, která je silně závislá na celkové hmotnosti člověka a na věku (Coleman et al. 2009). Zdá se, že horizontální rozměry vykazují vyšší dědivost než rozměry vertikální (Carels et al. 2001; Djordjevic et al. 2016; Cole et al. 2017). Zajímavou studií je práce týmu Johannsdottir, v níž se zabývali heritabilitou mezi rodiči a dětmi. Jejich výsledky poukazují na vyšší dědivost mezi syny a matkami. U dcer se heritabilita vůči otcům či matkám výrazně nelišila, ale ve dvojici dcera/otec bylo nalezeno více znaků vykazujících statisticky významně podpořené ( $p < 0,001$ ) hodnoty dědivosti oproti dvojici dcera/matka (Johannsdottir et al. 2005).

Jedním ze způsobů identifikace genů způsobujících pozorovaný fenotyp jsou studie na rodinách. Příkladem takové studie je práce Ermakova et al (2010), kde byl využit rodinný model ke studiu souvislostí mezi variantami genu *ENPPI* (Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1) a kraniofaciální morfologií. Studie se účastnilo 297

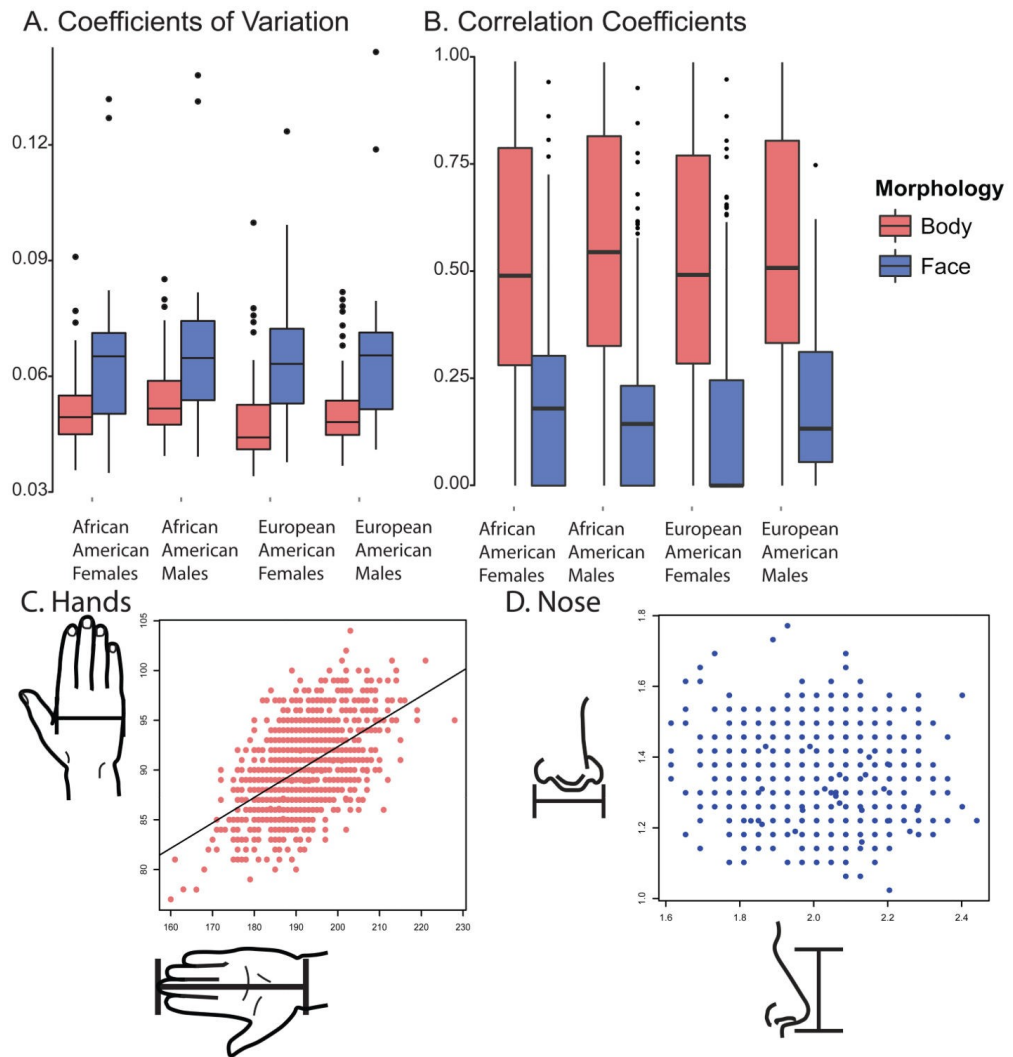
rodin s původem definovaným jako západní euroasijská populace. Nejsilnější asociace jsou pozorovány mezi výškou neurokrania a polymorfismy blízko promotoru genu *ENPPI*. Vliv na šířku hlavy a výšku dolní třetiny obličeje (vzdálenost mezi body subnasale a gnathion) mají taktéž polymorfismy ležící blízko či v promotoru genu a v nepřekládaném 3' UTR regionu *ENPPI*. Funkce genu *ENPPI* jsou popsány níže v kapitole 1.5. Studie poukázala na velký význam tohoto genu v morfologii obličeje (Ermakov et al. 2010).

### 1.4.3 Populační studie

Tak jako pozorujeme značnou variabilitu mezi jedinci, pozorujeme i rozdíly napříč jednotlivými populacemi. Tato fenotypová i genotypová variabilita populací je způsobena čtyřmi evolučními silami – genetický drift, přírodní výběr, mísení mezi populacemi a mutace (Guo et al. 2014). Rozdíly v kraniofaciálních rozměrech jsou dány rozdílnou populační historií, zejména geografickými vzdálenostmi a enviromentálními podmínkami.

Velká část neurokraniální variability je závislá hlavně na geografických vzdálenostech, variabilita faciální morfologie vykazuje závislost jak na geografických vzdálenostech, tak i na klimatických podmínkách (Hubbe et al. 2009). Kraniální šířka, výška a šířka obličeje a šířka a výška nosu korelují s teplotou a vlhkostí podnebí (Roseman 2004; Hubbe et al. 2009). Tato korelace se projevuje zejména u populací severní Evropy, severovýchodní Asie a Severní Ameriky, což může být dáno adaptací na chladné podnebí. Tyto populace mají nejmenší nasální index (poměr šířky k výšce nosu). Zatímco populace severní Evropy mají nejmenší rozměry šířky nosu, u populací severovýchodní Asie a Severní Ameriky se projevuje nasální výška – obě tyto cesty ale vedou k malým hodnotám nasálního indexu. Obdobně je tomu i u kraniální šířky – populace severních oblastí se vyznačují širším neurokraniem (Hubbe et al. 2009). To může opět souviset s adaptací v extrémním chladném podnebí, kde zvětšením šířky lebky dochází ke zmenšení poměru plochy k objemu, což redukuje ztrátu tepla. Ve studii, která se zabývala variabilitou měkké tkáně, byly porovnávány euroasijské populace. Největší rozdíly byly identifikovány v oblasti obočí, nosu a lící, vysvětlovány jsou buďto jako adaptace anebo pohlavní selekce (Guo et al. 2014).

Podle studie Sheehana a kol. vznikla neobyčejně velká variabilita lidského obličejí kvůli signalizaci individuální identity a její klíčové roli v sociální interakci. Variace faciálních znaků je signifikantně vyšší než u ostatních rozměrů těla. Například velikost ruky člověka koreluje s jeho výškou, jak je znázorněno na Obr. 6. Toto tvrzení však neplatí pro rozměry nosu (Sheehan and Nachman 2014).



**Obr. 6** - Příklady rozdílů variability mezi faciálními a jinými morfologickými znaky (převzato z Sheehan et al. 2014)

#### 1.4.4 Studie dysmorfologických syndromů

Dnes známe přes 6000 různých fenotypů, u kterých je objasněna molekulární příčina (“OMIM Gene Map Statistics”). Existuje databáze dědičných onemocnění člověka Online Mendelian Inheritance in Man – OMIM (“OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man”). Přes 30 % dědičných chorob je asociováno s atypickým vzhledem obličeje (Jones et al. 2013). Při studiu těchto syndromů jsou získávána data celé rodiny. Lze tak porovnat postižené a nepostižené členy rodiny probanda. Varianty genů, které se objeví pouze u postižených členů, mohou být příčinou vzniku onemocnění nebo mohou být ve vazbě s genem, který nemoc způsobuje. Geny zapojené v etiologii onemocnění, u něhož je jedním z projevů atypický faciés, tak mohou ovlivňovat i normální variabilitu obličeje.

Příkladem může být gen *PAX3*, jehož mutace způsobují Waardenburgův syndrom (OMIM # 193500). Jedním z projevů tohoto syndromu je hypertelorismus, anomálie očních víček a široký nos (Waardenburg 1951). V posledních letech byla potvrzena spojitost genu *PAX3* s vývojem normálního obličeje, konkrétně se vzdáleností očí, šířkou a prominencí nosu (Paternoster et al. 2012; Claes and Shriver 2016; Shaffer et al. 2016).

Dalším z příkladů je rozštěp patra či rtu (OMIM # 119530). Je to multifaktoriální onemocnění, což znamená, že je ovlivněno jak genetickou, tak i enviromentální složkou. Varianty genů *IRF6* (Birnbau et al. 2009; Krasone et al. 2014), polymorfismy v oblasti 8q24 (Birnbau et al. 2009; Wattanawong et al. 2016), polymorfismy genu *MSX1* (Vieira et al. 2008; Gurramkonda et al. 2015), *BCL3* (Lace et al. 2012) a mnoho dalších je asociováno právě s tímto onemocněním. Bylo zjištěno, že jedna z variant genu *IRF6* ovlivňuje tvar rtů (Peng et al. 2013) a bodové mutace v oblasti 8q24 se podílejí na bizygomatické šířce (Boehringer et al. 2011).

Pfeiferův syndrom (OMIM # 101600), Kallmanův syndrom 2 (OMIM # 147950) a Jackson-Weissův syndrom (OMIM # 123150) jsou všechny způsobeny mutacemi genu *FGFR1* kódujícího receptor pro fibroblastový růstový faktor (FGF). Projevy Pfeiferova syndromu jsou mimo jiné kraniosynostózy a atypický tvar lebky (Muenke et al. 1994; Passos-Bueno et al. 1999). U Kallmanova syndromu 2, známého také jako hypogonadotropní hypogonadismus 2, se současně může vyskytovat také rozštěp patra či rtu (White et al. 1983). Mutace v receptorech růstových faktorů *FGFR2* způsobují mnohé

další syndromy, např. Apertův syndrom (OMIM # 101200), další formy Pfeiferova a Jackson-Weissova syndromu. Mutace ve *FGFR3* způsobuje achondroplázii (OMIM # 100800). Všechna tato onemocnění vykazují atypický vzhled lebky a obličeje (Suri 2005). Několik studií poukázalo na souvislost genu *FGFR1* i s fyziologickým vývojem tvaru lebky, zejména s transversálním cefalickým indexem TCI poměřujícím výšku a šířku lebky, cefalickým indexem CI poměřujícím šířku a délku lebky a vertikálním cefalickým indexem dávajícím do poměru výšku a délku lebky (Coussens and Daal 2005; Peng et al. 2013; Gómez-Valdés et al. 2013). Varianta genu *FGFR1* byla také použita ve studii, v níž se autoři snažili o modelování tvaru obličeje na základě genetické informace (Claes et al. 2014).

#### **1.4.5 Asociační studie**

Kromě zmíněných vazebných analýz rodin můžeme k hledání genů a jejich variant (velmi často se jedná o jednonukleotidové polymorfismy SNP – single nucleotide polymorphism) zodpovědných za sledovaný znak využít tzv. asociační studie. V těchto studiích se pracuje s velkým počtem nepříbuzných jedinců a mohou být využity ke sledování jak kvalitativních, tak i kvantitativních znaků (Donnelly 2008).

#### **Asociační studie**

Je známo mnoho genetických příčin vzniku rozštěpových vad. Tým Boehringer si položil otázku, jestli tyto varianty genů mají vliv i na normální variaci lidského obličeje (Boehringer et al. 2011). Studie byla vypracována na evropské populaci. Zjistili, že geny, které hrají roli při patologiích obličeje, ovlivňují také vývoj fyziologické faciální morfologie. Konkrétně se jedná o SNP rs1258763 nacházející se v blízkosti genu *GREM1* (Gremlin 1, DAN Family BMP Antagonist), který ovlivňuje šířku nosu, a to nejspíše recesivním účinkem majoritní alely. Silnější asociace byla nalezena u mužů. SNP rs987525 lokalizovaný v oblasti 8q24.21 v blízkosti genu *CCDC26* (*CCDC26* Long Non-Coding RNA) koreluje s bizygomatickou vzdáleností, kde minoritní alela vede k zúžení této šířky. U toho SNP se nejspíše uplatňuje aditivní model se silnějším efektem u žen. Obdobně

tomu bylo i u polymorfismu rs7590268. Funkce genu *GREM1* je popsána v kapitole 1.5, funkce genu *CCDC26* není známa.

Další kandidátní geny našel tým Penga (2013), zejména gen *IRF6* a jeho bodový polymorfismus rs642961, který má silný vliv na tvar rtů u žen. Na čínské populaci potvrdili vliv dvou polymorfismů rs6925433 a rs7773292 genu *ENPP1*, které byly ohlášeny ve studii Ermakova (2010). rs7773292 ovlivňuje tvar čela mužů, kdežto rs6925433 je asociovaný spíše s oblastí brady.

V roce 2017 He a kolektiv publikovali práci, v níž se zabývali 10 SNP, které byly v dřívějších studiích asociovány s různými znaky lidského obličeje. Našli několik korelací, z nichž učinili závěr, že bodové polymorfismy genů *ENPP1* (rs7754561) a *FGFR1* (rs4647905) ovlivňují výšku obličeje, vzdálenost nosu a rtů a tvar rtů, gen *GHR* (Growth Hormone Receptor), konkrétně rs6180 a rs6184, je spojován se šířkou a výškou rtů. Studie byla vypracována na populaci Ujgurů – turkické etnikum střední Asie (He et al. 2017). Funkce genů *ENPP1* a *FGFR1* jsou popsány v kapitole 1.5. Gen *GHR* kóduje receptor pro růstový hormon. Po navázání růstového hormonu se receptor dimerizuje, což vede k aktivaci drah, které dávají impuls k růstu. Mutace v tomto genu jsou spojeny s poruchami růstu, například Laronův syndrom (“GHR Gene - GeneCards | GHR Protein | GHR Antibody”).

### **Celogenomové asociační studie**

První celogenomové analýzy zabývající se genetikou kraniofaciální morfologie jsou studie Liu et al. a Paternoster et al., obě publikované nezávisle na sobě v roce 2012. Paternoster et al. se ve studii zaměřili na gen *PAX3* (Paired Box 3). Ze všech studovaných SNP v tomto genu vykazoval polymorfismus rs7559271 nejvyšší korelaci s prominencí nosu a jeho výškou. SNP rs1978860 ovlivňuje hlavně prominenci nosu. Oba tyto polymorfismy leží v intronové oblasti genu *PAX3*. Funkce tohoto genu je popsána v kapitole věnující se výběru genetických markerů. Ve své práci se autoři zaměřili i na asociaci rs1258763 se šířkou nosu, která byla zveřejněna v dřívější publikaci (Boehringer et al. 2011) zabývající se genetickými variantami u zdravých jedinců a u jedinců s rozštěpem rtu. Paternoster et al. však nenašli žádnou korelaci.

Liu et al. identifikovali 5 kandidátních genů majících vliv na formu lidského obličeje – *PRDM16* (PR Domain Containing 16), *PAX3*, *TP63* (Tumor Protein p63), *C5orf50* (Chromosome 5 open reading frame 50) a *COL17A1* (Collagen, type XVII, alpha 1) (Liu et al. 2012). *PAX3* a konkrétně SNP rs7559271 byl taktéž asociován s pozicí bodu nasion, stejně jako v publikaci Paternoster et al. 2012, a dále také se vzdáleností mezi okem a nosem. Mimo tento SNP identifikovali další 3 polymorfismy rs16863422, rs12694574 a rs974448 genu *PAX3*, které jsou ve vazbě s rs7559271, ovlivňující vzdálenost středu oka a bodu nasion. Varianty v intronu genu *PRDM16*, např. rs4648379, byly spojovány s šířkou a výškou nosu. Bodový polymorfismus rs17447639 v genu *TP63* má vliv na vzdálenost očí. Gen *TP63* kóduje transkripční faktor patřící do rodiny p53 proteinů. Účastní se vývojových signálních drah a jeho mutace mohou vést k řadě syndromů spojených s poruchami orofaciálního vývoje (Leoyklang et al. 2006). SNP v blízkosti *C5orf50* rs6555969 je asociován s pozicí bodu nasion. Missense SNP rs805722 v *COL17A1* taktéž ovlivňuje vzdálenost očí a vzdálenost mezi okem a nosem. Funkce *C5orf50* a *COL17A1* ve vývoji obličeje nejsou známy. Funkce genů *PAX3* a *PRDM16* jsou popsány v kapitole 1.5. Studie se týkala populací s evropským původem. Závěrem tato studie zdůrazňuje, že se varianty genů nezbytných pro správný vývoj obličeje podílejí na jeho variabilitě malou měrou a do procesu vývoje obličeje je zahrnuto velké množství takovýchto genů s malým účinkem.

Další studie GWAS se týká populací latinské Ameriky (Adhikari et al. 2016). Adhikari a jeho tým identifikovali několik SNP souvisejících s variabilitou obličeje v 5 kandidátních genech *EDAR* (Ectodysplasin A Receptor), *DCHS2* (Dachous Cadherin-Related 2), *RUNX2* (Runt Related Transcription Factor 2), *GLI3* (GLI Family Zinc Finger 3) a *PAX1*. Byla také potvrzena spojitost genu *PAX3* s pozicí bodu nasion. Všechny z těchto genů jsou nezbytné pro kraniofaciální vývoj. V oblasti 2q12 identifikovali rs3827760 v intronu genu *EDAR*, tento SNP ovlivňuje protruzi brady. *EDAR* je součástí signální dráhy EDA, která se podílí na umístění, tvaru a velikosti ektodermálních struktur, jako jsou vlasové folikuly, zuby a žlázy (Morlon et al. 2005; Sadier et al. 2014). Mutace v genech této signální dráhy pak postihují vývoj právě těchto struktur a mohou vést například k ektodermální dysplázii (OMIM #129490 a #224900). SNP rs2045323 a rs12644248 na 4q31 byly asociovány s tvarem nosu, konkrétně s prominencí nosu a úhlem špičky nosu. Kandidátním genem pro tuto oblast je *DCHS2*. *DCHS2* je kalcium-dependentní protein účastnící se regulační sítě kontrolující diferenciaci chrupavky. Této



sítě se účastní i produkt genu *SOX9*, jehož mutace vedou k řadě onemocnění postihující mimo jiné i morfologii obličej (‘‘DCHS2 Gene - GeneCards | PCD23 Protein | PCD23 Antibody’’). Dalším kandidátním genem této oblasti by mohl být *SFRP2* (Secreted Frizzled Related Protein 2). Produkt tohoto genu je exprimovaný v osteoblastech a podílí se na Wnt signalizační dráze (Nakajima et al. 2009). SNP rs1852985 lokalizovaný na 6p21 v intronu *RUNX2* koreluje se šířkou nosu. Gen *RUNX2* a jeho produkt jsou nezbytné pro diferenciaci osteoblastů a morfogenezi kostí (‘‘RUNX2 Gene - GeneCards | RUNX2 Protein | RUNX2 Antibody’’). Mutace v tomto genu způsobují kleidokraniální dysplázii (OMIM #119600), u které se vyskytuje atypický facies. rs17640804 v regionu 7p13 ovlivňuje šířku nosních křídel. Leží na genu *GLI3*, který patří k DNA vazebným transkripčním faktorům. Ty mohou být aktivátory i represory sonic hedgehog signalizační dráhy (Pan et al. 2013). Na základě studie Rice, která poukázala na interakci mezi geny *GLI3* a *RUNX2*, dnes víme, že i interakce SNP v těchto oblastech jsou signifikantní (Rice et al. 2010). Mutace genu *GLI3* způsobují Greigův syndrom (OMIM # 175700), pro který je charakteristický mimo jiné široký nos. Oblast na krátkém raménku 20. chromosomu 20p11, obzvláště rs927833, ukázala signifikantní asociaci se šířkou nosu. Kandidátním genem pro tuto oblast je gen *PAX1*, který zasahuje do diferenciaci chondrocytů přes signální dráhu zahrnující také *RUNX2* a *SOX9*.

V roce 2016 byla publikována další celogenomová studie (Shaffer et al. 2016). Studie se účastnili nepříbuzní jedinci z Ameriky s evropským původem. Autoři práce našli 6 regionů asociovaných s faciálními znaky, přičemž některé z genů přítomných v těchto regionech souvisí s kraniofaciálním vývojem – *MAFB* (MAF BZIP Transcription Factor B), *PAX9*, *MIPOL1* (Mirror-Image Polydactyly 1), *ALX3* (ALX Homeobox 3), *HDAC8* (Histone Deacetylase 8) a *PAX1*. Konkrétní lokusy a polymorfismy jsou shrnuty v Tab. 1. *MAFB* je gen ležící v oblasti 20q12. *MAFB* reguluje migraci neurálních buněk během formování hlavy (‘‘MAFB Gene - GeneCards | MAFB Protein | MAFB Antibody’’). Některé varianty toho genu, který kóduje transkripční faktor, jsou spojovány s rozštěpy rtu a patra (Miller et al. 2014), nicméně bodové varianty genu hlášené ve studii Miller et al. jako rizikové a polymorfismus nalezený v této studii spolu nejsou ve vazbě. V oblasti 14q21.1 se nachází *PAX9* a *MIPOL1*. U myši je *Pax9* důležitý pro vývoj lebky (Peters et al. 1998). U pacientů s translokacemi mezi 4. a 14. chromosomem pozorujeme abnormální facies, například holoprosencefalii. Touto translokací je ovlivněn i gen *MIPOL1* (Kamnasaran et al. 2003), je tak možné, že bude hrát roli i v normálním vývoji. V oblasti

krátkého raménka 1. chromosomu 1p13.3 je kandidátním genem *ALX3*. Kódovaný protein funguje jako regulátor během buněčné diferenciace a vývoje (“ALX3 Gene - GeneCards | ALX3 Protein | ALX3 Antibody”). Mutace v tomto genu způsobují frontonasální dysplázii (OMIM # 136760), která se projevuje hypertelorismem, rozšířeným kořenem nosu, možnými rozštěpy rtu či patra (Sedano et al. 1970). *HDAC8* je lokalizovaný na Xq13.2 a proteinem je histonová deacetyláza, která se podílí na regulaci transkripce, buněčném růstu a vývoji (“HDAC8 Gene - GeneCards | HDAC8 Protein | HDAC8 Antibody”). Cornelia de Langův syndrom je způsoben mutacemi této deacetylázy (OMIM # 300882). Jedinci s tímto syndromem často trpí růstovou retardací, mikrocefálií, ztrátou sluchu, potížení se srdcem, poruchami příjmu potravy a vyznačují se také atypickým obličejem – brachycefalie, klenuté nadočnicové oblouky, nízký kořen nosu, koutky úst stočeny dolů či mezerami mezi zuby (Kaiser et al. 2014). Ve své práci se Shaffer a jeho kolektiv na svém souboru vzorků také pokusili potvrdit či vyvrátit závěry z předchozích studií. Testovali nalezené asociace s délkou nosních křídel z Paternoster et al. 2012. Tento znak vykazoval nejvyšší asociaci s polymorfismem rs1982862 ležícím v intronu genu *CACNA2D3* (Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha2 delta 3). Pro SNP rs7559271 v genu *PAX3* zachytili vliv na pozici bodu nasion, ale nebyl signifikantní. Potvrdili také vliv rs4648379 v intronu genu *PRDM16* na šířce nosu a našli asociaci rs6555969 v blízkosti *C5orf50* a hloubkou obličej, která může být aproximována jako šířka obličej, s níž byl spojován rs6555969 ve studii Liu et al. Testovali taktéž vzdálenost oka a bodu nasion. Významný vliv na tento rozměr měl polymorfismus rs974448 genu *PAX3* a rs974448 u genu *C5orf50*.

**Tab. 1** - Faciální znaky ovlivněné konkrétními polymorfismy (převzato a upraveno z Shaffer et al. 2016)

Znak	SNP	Lokus
Šířka obličeje	rs17106852	14q21.1
	rs6129564	20q12
Vzdálenost očí	rs619686	1p13.3
	rs11093404	Xq13.2
Šířka nosu	rs2424399	20p11.22
Délka nosních křídel	rs8007643	14q11.2
Hloubka středního obličeje	rs12786942	11q22.1

Geny *FREMI* (FRAS1 Related Extracellular Matrix 1) a *PARK2* (Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase) budou nejspíše také přispívat k normální variabilitě lidského obličeje (Lee et al. 2017). Studie se zúčastnili jedinci ze Spojených Států Amerických s evropským původem. Identifikovali 3 regiony vykazující signifikanci – oblast 6q26 v intronu genu *PARK2*, který ovlivňuje výšku středního obličeje (zejména SNP rs9456748), oblast 9p22 s genem *FREMI* (SNP rs7271618) zasahující do rozměrů rtů a oblast Xq13 asociovaná se vzdáleností očí (rs11093404). Význam genu *PARK2* ve vývoji obličeje není znám, mutace v tomto genu způsobují Parkinsonovu chorobu juvenilního typu 2 (OMIM # 600116). S genem *FREMI* se pojí několik dysmorfických syndromů s atypickým facies, zejména s abnormalitami nosu (OMIM # 608980) (Al-Gazali et al. 2002) a očí (OMIM # 248450) (Slavotinek et al. 2011).

Výhodou celogenomových studií je, že mohou zachytit i minoritní alely s velmi malou frekvencí, zároveň to je i jejich nevýhoda, protože síla statistického tvrzení klesá s klesající frekvencí alel. Je tak nutné testovat pouze relativně běžné alely s frekvencí vyšší než 5–10 % (Roosenboom et al. 2016).

## 1.5 Výběr genetických markerů pro diplomovou práci

Výběr genetických markerů, tedy genů a konkrétních jednonukleotidových polymorfismů (SNP, single-nucleotide polymorphism), má pro tuto diplomovou práci zásadní význam.

Kritéria výběru genetických polymorfismů:

1. Již popsany významný vztah SNP-znak
2. Zastoupení znaků ovlivněných vybranými polymorfismy ve všech třetinách obličeje
3. Frekvence minoritní alely SNP v evropské populaci (vyřazeny byly takové SNP, u nichž by mohl být díky velikosti testovaného souboru problém zachytit minoritní alelu v dostatečné frekvenci pro adekvátní statistické analýzy)

Vybrány byly následující genetické markery (seřazeno topologicky dle lokalizace konkrétního znaku, na který se vliv vybraného polymorfismu předpokládá):

### Střední třetina obličeje

- oblast mezi body glabella a subnasale

#### • rs7559271

Vzdálenost mezi středem oka a bodu nasion je asociovaná s bodovým polymorfismem rs7559271 (Liu et al. 2012; Paternoster et al. 2012). Ten se nachází v intronu genu *PAX3*, který je lokalizovaný na 2q36.1.

*PAX3* patří k transkripčním faktorům. Tento gen hraje významnou úlohu při vývoji plodu, reguluje buněčnou proliferaci a apoptózu. Transkripční faktor se na DNA může vázat jako homodimer nebo heterodimer spolu s *PAX7* (Birrane et al. 2009). Aktivuje další geny a to *MYOD1*, *LEF1*, *PITX2* a *MYF5*, jejichž produkty jsou také transkripčními faktory a které ovlivňují další procesy v buňce včetně signálních drah Wnt, Hedgehog či Notch.

Mutace v *PAX3* způsobují například „Craniofacial-Deafness-Hand Syndrome“ (OMIM # 122880) nebo Waardenburgův syndrom typu 1 (OMIM # 193500) a typu 3 (OMIM # 148820) (“PAX3 Gene - GeneCards | PAX3 Protein | PAX3 Antibody”). U myší s nepřetržitou expresí *Pax3* během ontogenetického vývoje dojde ke vzniku rozštěpu patra (Wu et al. 2008).

• **rs1887276 a rs7965082**

Tyto dva SNP se podílejí na vzdálenosti očí (Liu et al. 2012). Leží v intronové oblasti genu *SLC17A8* (Solute Carrier Family 17 Member 8), který kóduje vezikulární transportér glutamátu. Glutamát je zdrojem pro syntézu glutathionu, který chrání buňku před oxidačním stresem, a pro syntézu kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné (GABA), která je důležitým neurotransmiterem. Gen se nachází v oblasti 12q23.1 (“SLC17A8 Gene - GeneCards | VGLU3 Protein | VGLU3 Antibody”). Polymorfismy jsou od sebe vzdálené 2708bp. Mutace v genu *SLC17A8* způsobují retinální arteriální okluzi a hluchotu (OMIM # 605583).

• **rs4648379 a rs1258763**

Šírku nosu ovlivňují rs4648379 ležící v intronové oblasti genu *PRDM16* (PR/SET Domain 16) na 1p36.32 (Liu et al. 2012) a rs1258763 genu *GREM1* (Gremlin 1, DAN Family BMP Antagonist) na 15q13.3 (Boehringer et al. 2011).

Gen *PRDM16* kóduje transkripční faktor s motivem zinkového prstu. Tento motiv umožňuje vazbu bílkovin na DNA. Reciproká translokace t(1;3) (p36;q21) se objevuje u pacientů trpících myelodysplastickým syndromem nebo akutní myeloidní leukémií. Tato translokace vede k nadměrné expresi tohoto proteinu, který je zkrácený o PR doménu (“PRDM16 Gene - GeneCards | PRD16 Protein | PRD16 Antibody”). Tento transkripční faktor se podílí i na diferenciaci hnědé tukové tkáně ve spolupráci s proteiny CEBP (CCAAT/enhancer binding protein), aktivuje gen *SKI*, který je protoonkogenem a potlačuje TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) signální dráhu v nádorových buňkách (Takahata et al. 2009). U myší byl protein *Prdm16/Mell* zařazen k tzv. SMAD proteinům, které přenášejí extracelulární signály ligandů růstových faktorů do jádra, kde se pak

aktivuje transkripce. Tento protein je esenciální pro vývoj orofaciální tkáně (Warner et al. 2007; Bjork et al. 2010).

Gen *GREM1* kóduje protein patřící k BMP antagonistům. Antagonistický účinek je zajištěn přímou vazbou proteinu na BMP. Hraje tak nejspíše roli v celé řadě dějů při regulaci organogeneze a diferenciaci tkání (Namkoong et al. 2006). U myši tento protein přenáší signál hedgehog dráhy (“GREM1 Gene - GeneCards | GREM1 Protein | GREM1 Antibody”). Bodové polymorfismy genu *GREM1* (rs16969681, rs16969816 a zde diskutovaný rs1258763) jsou asociovány s rizikem vzniku rozštěpů rtu a pater (Mostowska et al. 2015).

### **Dolní třetina obličeje**

- oblast mezi body subnasale a gnathion

#### **• rs642961**

Gen *IRF6* (Interferon Regulatory Factor 6) na 1q32.2 je často spojovaný s rozštěpy rtů a patra (Birnbaum et al. 2009; Krasone et al. 2014) a bylo zjištěno, že se účastní i morfologie normálního obličeje (Boehringer et al. 2011). Pro diplomovou práci byl vybrán SNP rs642961, který působí na oblast rtů a na jejich tvar, zejména pak u žen (Peng et al. 2013). Tento SNP leží v enhanceru genu *IRF6* (Kousa and Schutte 2016). Kódovaný protein je nejspíše transkripční aktivátor a ovlivňuje buněčnou proliferaci (Bailey et al. 2008). Mimo rozštěpů rtů vedou mutace v *IRF6* k Van der Woudovu syndromu (OMIM # 119300), který postihuje zejména morfologii obličeje (Schutte et al. 1993).

#### **• rs6569759**

Se šířkou dolní čelisti je asociovaný rs6569759 v genu *ENPPI* na 6q23.2 (Ermakov et al. 2010). Tento SNP se podílí také na vzdálenosti vnitřního i vnějšího koutku oka a středu horního rtu (Peng et al. 2013).

Kódovaný protein je transmembránový glykoprotein typu II, nalezneme jej v lysozomální (Schröder et al. 2007) i plazmatické membráně (Rutsch et al. 2001). Je složený ze dvou identických podjednotek spojených disulfidickými můstky. Protein

reguluje hladiny fosfátu Pi a pyrofosfátu PPi, kontroluje tím mineralizaci kostí hydrolyzou pyrofosfátu a inhibicí tvorby hydroxyapatitu (Harmey et al. 2004). Expres genu také koreluje s diferenciací osteoblastů (Johnson et al. 1999) i s počtem osteocytů a celkově se podílí na správné stavbě kosti (Hajjawi et al. 2014). Hajjawi a kol. prováděli experimenty na myších, které postrádaly právě gen *ENPPI*. Rozdíly se začaly objevovat u starších myší, kde pozorovali úbytek kompaktní kostní tkáně o 28 % u myší starých 22 týdnů a sníženou pórovitost kosti až o 60 %.

U pacientů s dento-faciálními deformacemi byly nalezeny varianty v genu *ENPPI*, které ovlivňují *processus condylaris* na dolní čelisti, a to zejména jeho výšku. Genotyp GG v polymorfismu rs9373000 se zdá být protektivním faktorem proti snížení výšky *processus condylaris* (Constant et al. 2017). Mutace v genu způsobují Colovu nemoc (OMIM # 615522), což je vzácné autosomálně dominantní onemocnění, které je charakteristické velmi světlou kůží, která je způsobena chybami v transportu melaninu díky nesprávné funkci proteinu. U některých lidí s touto nemocí se vyskytují i abnormální vápníkové depozity (Eytan et al. 2013). Gen *ENPPI* je mimo jiné spojovaný i s diabetes mellitus typu 2, konkrétně polymorfismus K121Q je asociovaný s vyšší hladinou glukózy, insulinu a tím i s vyšším rizikem vzniku insulinové rezistence (Busch and Hegele 2001).

#### • rs3213849

Bodový polymorfismus se nachází v genu *FGFR1* na 8p11.23, konkrétně v nepřekládaném 5' UTR regionu. Tato část genu, také nazývaná jako leader sekvence, je důležitá pro regulaci translace ("rs3213849 (SNP) - Ensembl Genome Browser 89"). Polymorfismus byl vybrán na základě zdokumentované souvislosti s poměrem mezi výškou a šířkou obličeje (Gómez-Valdés et al. 2013).

Fibroblastový receptor se skládá ze tří ligand-vazebných domén podobných imunoglobulinům, transmembránové domény a tyrosin-kinázové domény. Extracelulární část interaguje s fibroblastovými růstovými faktory a spouští celou kaskádu dějů končící proliferací a diferenciací buněk.

Fyziologicky je exprimován hlavně v mezenchymální a mozkové tkáni během embryonálního vývoje, u dospělého pak v mozku, kostech, kůži, plicích, v srdci a placentě (Hughes 1997). Podílí se na desmogenní osifikaci, která je typická pro ploché kosti,

zejména na lebce (Iseki et al. 1999). *FGFR1* je aktivovaný geny *FGF1*, *FGF5* a *PRKCE*. Geny *FGF1* a *FGF5* patří do skupiny fibroblastových růstových faktorů. Gen *PRKCE* kóduje kalcium independentní proteinkinázu C, která fosforyluje proteiny, což ovlivňuje například cytoskelet, buněčný cyklus, regulaci iontových kanálů i regulaci apoptózy. Inaktivace genu je pak díky genům *MAPK14*, *MAPK1* a *MAPK3*. Tyto geny patří do rodiny MAP kináz, které se účastní dějů v MAP kaskádách nezbytných pro růst, diferenciaci, proliferaci buněk, zánětlivé odpovědi a apoptóze (“FGFR1 Gene - GeneCards | FGFR1 Protein | FGFR1 Antibody”). Mutace *FGFR1* vedou k mnoha syndromům uvedených již v kapitole 1.4.4. Dalším onemocněním je například osteoglofonická dysplázie (OMIM #166250). Pacienti se vyznačují kraniosynostózami, prominentním nadočnicovým obloukem, hypertelorismem a níže položeným kořenem nosu. V závislosti na typu mutace mohou trpět dwarfismem (White et al. 2005). Mutace ve *FGFR1* mohou vést i k zubní agenezi (nevyvinutí) některých zubů či taurodontii (široké kořeny zubů).

#### • rs11726039

SNP se nachází v intronu genu *MSX1* (Msh Homeobox 1) na 4p16.2, patří k HOX genům. Kódovaný protein funguje jako transkripční represor v průběhu embryogeneze a hraje roli nejspíše i při kraniofaciálním vývoji. Tento SNP nebyl zatím spojován s normální variabilitou morfologie obličeje, nicméně je zapojený v patologii rozštěpů rtu a patra (Gurramkonda et al. 2015) a mohl by tak zasahovat i do normálního faciálního vývoje. Dalšími onemocněními jsou ektodermální dysplázie 3 označována také jako Witkopův syndrom (OMIM # 189500) a ageneze zubů (OMIM # 106600).

*MSX1* je také regulátorem proteinu p53. Tento protein řídí proces apoptózy buněk. Nadměrná exprese *MSX1* může potlačit růst nádorových buněk (Park et al. 2005). U myší byla pozorována exprese genu *MSX1* v osteoblastech nejen u mladých myší ale i u dospělých jedinců. *MSX1* se tedy účastní postnatální morfogeneze kostní tkáně, alespoň u zvířecího modelu (Nassif et al. 2014).



## 2 Hypotézy a cíle diplomové práce

V současné době je téma genetické podmíněnosti lidského obličeje velmi atraktivní. Celkový mechanismus vzniku velké variability obličeje není znám. Studií, které by byly založené na rodinném modelu, není mnoho. Tato diplomová práce vznikla jako jedna ze dvou pilotních prací společného projektu Laboratoře 3D zobrazovacích a analytických metod a Laboratoře molekulární antropologie, který se zabývá fenotypem, genotypem a dědičností morfologických znaků lidského obličeje. Předkládaná práce se zaměřuje především na genotyp a dědičnost kraniofaciálních znaků. Na základě dosavadních informací předpokládáme následovně:

- vybrané genetické markery ovlivňují morfologii obličeje,
- vliv genetických variant na morfologii obličeje se liší v závislosti na pohlaví,
- dědivost je u různých kraniofaciálních znaků odlišná.

Na základě předpokladů jsme definovali cíle diplomové práce:

- vytipovat genetické varianty, které by mohly mít vliv na morfologii obličeje dle dosavadních informací,
- genotypizovat 9 SNP v souboru vzorků pomocí metod RFLP a SNaPshot,
- provést populačně genetické analýzy,
- zjistit, zda vybrané polymorfismy skutečně ovlivňují morfologii obličeje ve studovaném souboru vzorků,
- sledovat vliv morfologie obličejů rodičů na kraniofaciální znaky dětí.

### 3 Materiál a metody

Výchozím materiálem pro genotypizaci byly sliny získané od všech členů rodiny účastnících se studie. Metody jsou založené na izolaci DNA a genotypizaci pomocí PCR, RFLP a fragmentační analýzy.

#### 3.1 Materiál

Studie se zúčastnily minimálně čtyřčlenné rodiny. Soubor čítá dohromady 29 čtyřčlenných rodin a 1 rodinu pětičlennou, dohromady 121 jedinců. Získali jsme 3D skeny obličejů, hodnoty BMI a sliny, jakožto biologický materiál, ze kterého se poté izolovala DNA. Všechny vzorky pak byly dále zpracovávány pod číselným kódem. Všichni účastníci byli seznámeni se studií a podepsali informovaný souhlas. V Tab. 2 jsou uvedeny charakteristiky souboru.

Pro zařazení do studie musela rodina splňovat následující kritéria:

- věk rodičů pod 60 let
- věk dětí nad 18 let
- členové rodiny se narodili a žijí v ČR

**Tab. 2** – Základní charakteristika souboru vzorků

Rodinný příslušník	Počet	Věk			
		Průměrný	Medián	Minimální	Maximální
Otec	30	51,88	51,43	45,42	60,47
Matka	30	49,38	49,58	43,23	55,60
Syn	24	25,49	26,38	18,14	31,92
Dcera	37	23,83	23,81	18,18	31,11

### 3.2 Odběr slin a izolace DNA

Sliny byly odebírány pomocí GeneFiX™ DNA Saliva Collector (Cell Projects Ltd – Isohelix). 30 minut před odběrem bylo nutné nic nejíst, nepít, nekouřit, nečistit si zuby či žvýkat žvýkačku. Odebírali jsme 1 ml slin. K izolaci DNA jsme používaly GeneFiX™ Saliva Mini Isolation Kit (Cell Projects Ltd – Isohelix).

#### Pracovní postup:

1. Vzorke slin jsme zvortexovali.
2. Přidali jsme 20  $\mu$ l roztoku Proteinasy K, zvortexovali a nechali inkubovat při teplotě 60 °C po 1 h.
3. Předehřáli jsme si EB pufr na 70 °C (100  $\mu$ l EB/vzorek).
4. Po inkubaci jsme ke vzorku přidali 2 ml 96% ethanolu a zvortexovali.
5. Na kolonku jsme pipetovali 700  $\mu$ l vzorku bez dotknutí se dna kolonky. Poté jsme centrifugovali při 14 000 rpm 1 minutu. Filtrát jsme vyhodili.
6. Opakovali jsme krok č. 5, dokud jsme na kolonku nenanesli veškerý objem vzorku.
7. Promyli jsme kolonku přidáním 750  $\mu$ l WB pufru. Centrifugovali při 14 000 rpm 1 minutu a vyhodili filtrát.
8. Opakovali jsme jednou krok č. 7.
9. Kolonku jsme umístili do čisté zkumavky a centrifugovali při 14 000 rpm 3 minuty pro odstranění zbytku ethanolu.
10. Kolonku jsme umístili do čisté 1,5ml zkumavky. Připipetovali jsme 100  $\mu$ l předehřátého EB pufru.
11. Kolonku jsme nechali stát 3minuty a poté centrifugovali při 14 000 rpm 1 minutu pro eluci DNA.
12. DNA jsme skladovali při -20 °C.

Koncentraci a čistotu DNA jsme zjišťovali na spektrofotometru.

### 3.3 Polymerázová řetězová reakce PCR

Pomocí PCR můžeme amplifikovat fragmenty o různé délce. Délky fragmentů DNA zahrnující konkrétní SNP jsou shrnuty v Tab. 3. Pro každý SNP bylo nutné navrhnout pár primerů. Pro samotný design primerů byl použit software Primer-BLAST (“Nucleotide BLAST: Search Nucleotide Databases Using a Nucleotide Query”), pro vizualizaci vlásenek, které by mohl primer tvořit, jsme využili softwaru OligoAnalyzer 3.1 (“OligoAnalyzer 3.1”). Takto navržený primer jsme kontrolovali v softwaru BLAST (“Nucleotide BLAST: Search Nucleotide Databases Using a Nucleotide Query”), který porovnává sekvenci primeru s genomem člověka a hledá komplementární sekvence.

**Tab. 3** - Délka PCR fragmentů

SNP	Délka fragmentu (bp)	SNP	Délka fragmentu (bp)
rs7559271	107	rs642961	244
rs1887276	105	rs6569759	138
rs7965082	170	rs3213849	415
rs4648379	158	rs11726039	190
rs1258763	157		

#### **Použité chemikálie:**

PCR reakční kit – Life Technologies, USA

- 5U/μl Taq DNA polymeráza
- 10x Taq pufr s (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 25mM MgCl<sub>2</sub>

dNTP (10mM) - Life Technologies, USA

Primery

Voda z MILLIPORE Gradient systému; Mili-Q

### **Pracovní postup:**

1. Příprava reakční směsi – master mixu – probíhala v laminárním boxu. Všechny reagensie kromě Taq polymerázy jsme nechali rozmraznout při pokojové teplotě.
2. Mastermix jsme připravili podle tabulek pro konkrétní SNP v kapitole 3.3.1 pro všechny vzorky a negativní kontrolu.
3. Před přidáním polymerázy se směs zvortexuje. Po přidání polymerázy se směs promíchá propipetováním. Mastermix je dále rozpipetován do zkumavek pro jednotlivé vzorky po 20  $\mu$ l.
4. Do zkumavek jsme mimo laminární box! přidali 0,5  $\mu$ l DNA (celkové množství DNA v reakci ideálně 20–50 ng), do negativní kontroly místo DNA voda.
5. V termocycleru (C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler, Biorad; Professional Thermocycler spol. Biometra, An Analytik Jena Company) proběhla PCR dle protokolu uvedeného v kapitole 3.3.1.
6. Vzorky jsme vložili do termocycleru až po předeřtání víka. Konečné PCR produkty jsou uchovávány při 4 °C, pro dlouhodobější uchovávání při -20 °C.
7. Výsledek PCR amplifikace jsme ověřili elektroforeticky.

### **3.3.1 PCR podmínky jednotlivých SNP**

#### **• rs7559271**

- primer F      5'CAACCAAGCCCTGACTATAAGC 3'
- primer R      5'CTCTCAGATTCCTGCCTTACTGG 3'

- reakční směs

Koncentrace v reakci	Komponenty	Objem (μl)
	Voda	15,4
2	mM MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6
	dNTP (10 mM každý)	0,4
0	%DMSO	0
500	nM forward primer	0,2
500	nM reverse primer	0,2
1x	10x pufr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
	Taq DNA polymeráza (5U/ul)	0,2
	Celkem	20

- PCR protokol

- 1. krok (úvodní denaturace)                      3 minuty při 94 °C
  - 2. krok (denaturace)                                25 vteřin při 94 °C
  - 3. krok (hybridizace)                              25 vteřin při 54 °C
  - 4. krok (extenze)                                    25 vteřin při 72 °C
  - 5. krok (konečná extenze)                        5 minut při 72 °C
- } opakování 30×

• rs1887276

- primer F      5'ACAGATACTGTCAGAAGTGACCAT 3'
- primer R      5'CATGGGAGATAAAGCACTTGGCA 3'
- reakční směs

Koncentrace v reakci	Komponenty	Objem (μl)
	Voda	15,32
2	mM MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6
	dNTP (10 mM každý)	0,4
0	%DMSO	0
600	nM forward primer	0,24
600	nM reverse primer	0,24
1x	10x pufr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
	Taq DNA polymeráza (5U/ul)	0,2
	Celkem	20

- PCR protokol

- 1. krok (úvodní denaturace) 3 minuty při 94 °C
  - 2. krok (denaturace) 25 vteřin při 94 °C
  - 3. krok (hybridizace) 25 vteřin při 58 °C
  - 4. krok (extenze) 25 vteřin při 72 °C
  - 5. krok (konečná extenze) 5 minut při 72 °C
- } opakování 30×

• rs7965082

- primer F 5'TGTGAGAATAGAAGGAAGGGGAGT 3'
- primer R 5'GAGATCATATCCATTCCGTGCTTT 3'
- reakční směs

Koncentrace v reakci	Komponenty	Objem (μl)
	Voda	15,32
2	mM MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6
	dNTP (10 mM každý)	0,4
0	%DMSO	0
600	nM forward primer	0,24
600	nM reverse primer	0,24
1x	10x pufr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
	Taq DNA polymeráza (5U/ul)	0,2
	Celkem	20

- PCR protokol

- 1. krok (úvodní denaturace) 3 minuty při 94 °C
  - 2. krok (denaturace) 25 vteřin při 94 °C
  - 3. krok (hybridizace) 25 vteřin při 58 °C
  - 4. krok (extenze) 25 vteřin při 72 °C
  - 5. krok (konečná extenze) 5 minut při 72 °C
- } opakování 30×

• rs4648379

- primer F      5' CAAGTGAAATCTCTGTGTAGCTCTTG 3'
- primer R      5' ATCTGTAAGTTGAGGGGAGAAACCAT 3'
- reakční směs

Koncentrace v reakci	Komponenty	Objem (μl)
	Voda	15,16
2	mM MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6
	dNTP (10 mM každý)	0,4
0	%DMSO	0
800	nM forward primer	0,32
800	nM reverse primer	0,32
1x	10x pufr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
	Taq DNA polymeráza (5U/ul)	0,2
	Celkem	20

- PCR protokol
    - 1. krok (úvodní denaturace)      3 minuty při 94 °C
    - 2. krok (denaturace)              25 vteřin při 94 °C
    - 3. krok (hybridizace)              25 vteřin při 56 °C
    - 4. krok (extenze)                    25 vteřin při 72 °C
    - 5. krok (konečná extenze)        5 minut při 72 °C
- } opakování 30×

• rs1258763

- primer F      5' TAGATCGTAAGGCAAGTCTCAACG 3'
- primer R      5' CCACTGGTCATTTAGAAGAACG 3'



- reakční směs

Koncentrace v reakci	Komponenty	Objem (μl)
	Voda	15,16
2	mM MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6
	dNTP (10 mM každý)	0,4
0	%DMSO	0
800	nM forward primer	0,32
800	nM reverse primer	0,32
1x	10x pufr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
	Taq DNA polymeráza (5U/ul)	0,2
	Celkem	20

- PCR protokol

- 1. krok (úvodní denaturace)                      3 minuty při 94 °C
  - 2. krok (denaturace)                                25 vteřin při 94 °C
  - 3. krok (hybridizace)                              25 vteřin při 53 °C
  - 4. krok (extenze)                                    25 vteřin při 72 °C
  - 5. krok (konečná extenze)                        5 minut při 72 °C
- } opakování 30×

• rs642961

- primer F      5'TGCCCGATCTGTCTGACTCC 3'
- primer R      5'ACATTGACGCAGGTAGAGAGG 3'
- reakční směs

Koncentrace v reakci	Komponenty	Objem (μl)
	Voda	15,16
2	mM MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6
	dNTP (10 mM každý)	0,4
0	%DMSO	0
800	nM forward primer	0,32
800	nM reverse primer	0,32
1x	10x pufr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
	Taq DNA polymeráza (5U/ul)	0,2
	Celkem	20

- PCR protokol

- 1. krok (úvodní denaturace) 3 minuty při 96 °C
  - 2. krok (denaturace) 20 vteřin při 96 °C
  - 3. krok (hybridizace) 20 vteřin při 56 °C
  - 4. krok (extenze) 20 vteřin při 72 °C
  - 5. krok (konečná extenze) 5 minut při 72 °C
- } opakování 30×

• rs6569759

- primer F 5'GATGTAAGTTTGTCCCACATTGCT 3'
- primer R 5'AATTGTTGCCTACCAATTCAGC 3'
- reakční směs

Koncentrace v reakci	Komponenty	Objem (μl)
	Voda	12,72
4	mM MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,2
	dNTP (10 mM každý)	0,4
5	%DMSO	1
600	nM forward primer	0,24
600	nM reverse primer	0,24
1x	10x pufr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
	Taq DNA polymeráza (5U/ul)	0,2
	Celkem	20

- PCR protokol

- 1. krok (úvodní denaturace) 3 minuty při 96 °C
  - 2. krok (denaturace) 25 vteřin při 96 °C
  - 3. krok (hybridizace) 25 vteřin při 55 °C
  - 4. krok (extenze) 25 vteřin při 72 °C
  - 5. krok (konečná extenze) 5 minut při 72 °C
- } opakování 35×

• rs3213849

- primer F      5'GGAGAAAAGTCCTTGGGTTCCG 3'
- primer R      5'GAGACCAGGCTGTAGGAAGAGAAG 3'
- reakční směs

Koncentrace v reakci	Komponenty	Objem (μl)
	Voda	13,4
2	mM MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6
	dNTP (10 mM každý)	0,4
10	% DMSO	2
500	nM forward primer	0,2
500	nM reverse primer	0,2
1x	10x pufr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
	Taq DNA polymeráza (5U/ul)	0,2
	Celkem	20

- PCR protokol

- 1. krok (úvodní denaturace)      3 minuty při 96 °C
  - 2. krok (denaturace)              30 vteřin při 96 °C
  - 3. krok (hybridizace)              30 vteřin při 52 °C
  - 4. krok (extenze)                    40 vteřin při 72 °C
  - 5. krok (konečná extenze)        5 minut při 72 °C
- } opakování 32×

• rs11726039

- primer F      5'CTGGAGTGAATGATAAAAACCTGGA 3'
- primer R      5'AAACTACAGAAAGCATGGGAAGGTG 3'

- reakční směs

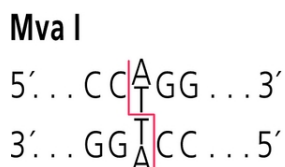
Koncentrace v reakci	Komponenty	Objem (μl)
	Voda	15,16
2	mM MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6
	dNTP (10 mM každý)	0,4
0	%DMSO	0
800	nM forward primer	0,32
800	nM reverse primer	0,32
1x	10x pufr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
	Taq DNA polymeráza (5U/ul)	0,2
	Celkem	20

- PCR protokol

- 1. krok (úvodní denaturace)                      3 minuty při 96 °C
  - 2. krok (denaturace)                                20 vteřin při 96 °C
  - 3. krok (hybridizace)                              20 vteřin při 56 °C
  - 4. krok (extenze)                                    20 vteřin při 72 °C
  - 5. krok (konečná extenze)                        5 minut při 72 °C
- } opakování 30×

### 3.4 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Produkty PCR rs642961, rs3213849, rs11726039 jsme dále štěpili pomocí restrikčního enzymu MvaI. Restrikční enzymy štěpí vlákno DNA pouze v přítomnosti určité sekvence. Enzym MvaI štěpí DNA v přítomnosti sekvence 5'...CC(A/T)GG...3' (Obr. 7). Pokud je v konkrétním místě cytosin nebo guanin, restrikční endonukleáza DNA nerozštěpí.



**Obr. 7** - Rozpoznávání sekvence a způsob štěpení enzymem MvaI

V případě rs642961 v přítomnosti alely G se amplicon o velikosti 244bp rozštěpí na fragmenty o velikosti 107 bp, 50 bp, 33 bp a 2x 27 bp, v případě alely A pak 140 bp, 50 bp a 2x 27 bp.

U polymorfismu rs3213849A se amplicon rozštěpí na fragmenty dlouhé 275 bp, 133 bp a 7 bp, u alely G pak výsledkem štěpení budou fragmenty o délce 408 bp a 7 bp.

U SNP rs11726039 se fragment o velikosti 190bp štěpí v případě alely C na fragmenty o velikost 77 bp, 53 bp, 39 bp a 21bp. V přítomnosti alely T pak štěpení proběhne za vzniku 3 fragmentů dlouhých 130bp, 39bp a 21 bp.

#### **Použité chemikálie:**

10U/μl MvaI – Thermo Fisher Scientific Inc.

10X pufr R – Thermo Fisher Scientific Inc.

25mM MgCl<sub>2</sub> – Life Technologies, USA

Voda z Millipore Gradient systému; Milli-Q

#### **Pracovní postup:**

Všechny reagenty kromě restrikčního enzymu jsme nechali rozmraznout na ledě. Podle Tab. 4 jsme si vytvořili reakční směs.

**Tab. 4** - Reakční směs pro štěpení enzymem MvaI

<b>Reagencie</b>	<b>Objem (μl)</b>
Voda	1,5
25mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
10x Pufr R	0,5
MvaI (1U/1μl)	0,5
Celkem	5

1. Směs jsme promíchali pipetováním a do každé zkumavky napipetovali 5  $\mu$ l.
2. Ke směsi jsme přidali 5  $\mu$ l PCR produktu a promíchali.
3. Štěpení probíhalo v termocyleru Professional Thermocycler (spol. Biometra, An Analytik Jena Company) při 37 °C po dobu 2,5 h.
4. Po skončení štěpení jsme stanovili genotypy vzorků pomocí elektroforetické separace.

### **3.5 Gelová elektroforéza**

Pomocí gelové elektroforézy jsme ověřili produkty PCR a stanovili genotyp vzorků u tří SNP: rs642961, rs3213849, rs11726039.

#### **Použité chemikálie:**

Agaróza – Sigma Aldrich, Česká republika

10x TBE pufr – obsahuje 500 ml vody, 108 g Tris, 55 g kyseliny borité a 40 ml EDTA.  
Doplněné do 1000 ml vodou.

- 890mM Tris base – Amresco, USA
- 890mM kyselina boritá – Serva Electrophoresis GmbH, Německo
- 20mM EDTA pH = 8 – Roth, Německo

Voda z MILLIPORE Gradient systému; Milli-Q

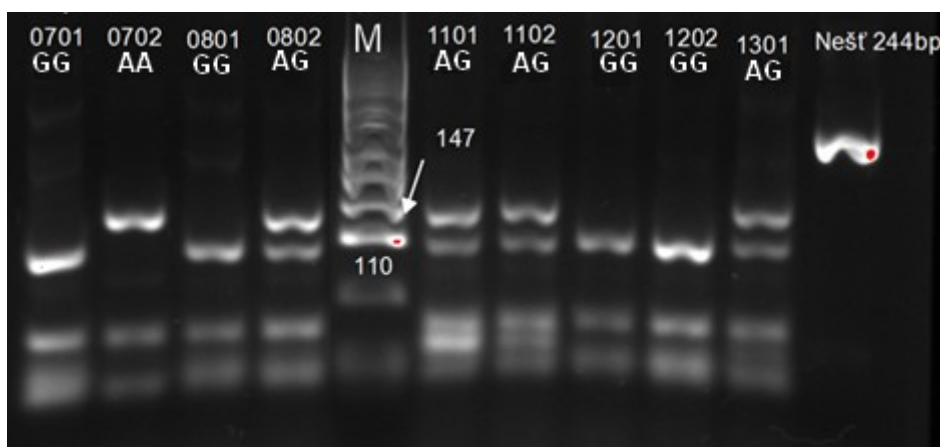
GelRed, 10 000x concentrated in water – C-Consulting, Slovenská republika

6x Loading Dye Solution – Life Technologies, USA

DNA Marker pUC19 DNA/MspI (HpaII) – Life Technologies, USA

### Pracovní postup:

1. V 100 ml 0,5x TBE pufru jsme rozpustili 2 g agarózy (pro ověření PCR produktů) nebo 3 g agarózy (pro stanovení genotypu).
2. Roztok agarózy jsme povařili v mikrovlnné troubě, poté přidali 2,5  $\mu$ l interkalačního barviva GelRed, promíchali a roztok po vychladnutí na 60 °C nalili do vaničky s hřebeny pro vytvoření jamek. Směs jsme nechali tuhnout asi 30 min.
3. Elektroforetickou vanu jsme naplnili 0,5x TBE pufrem tak, aby byl gel ponořený.
4. Do jamek jsme pipetovali 5  $\mu$ l PCR produktu nebo 10  $\mu$ l produktu štěpení spolu s 2  $\mu$ l nanášecí barvy. Do jedné jamky jsme napipetovali 0,75  $\mu$ l hmotnostního markeru spolu s 2  $\mu$ l nanášecí barvy.
5. Elektroforézu jsme nechali běžet 20-40 minut při jednosměrném napětí 110-200 V v závislosti na velikosti použité vany.
6. Výsledek PCR nebo RFLP byl vyfocen pomocí UV transiluminátoru GelDoc XR (Bio-Rad).



**Obr. 8** - Příklad výsledků genotypizace polymorfismu rs642961

M – pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker; Nešť – neštěpený produkt o velikosti 244bp; AA, AG, GG – označení genotypů

### 3.6 SNaPshot

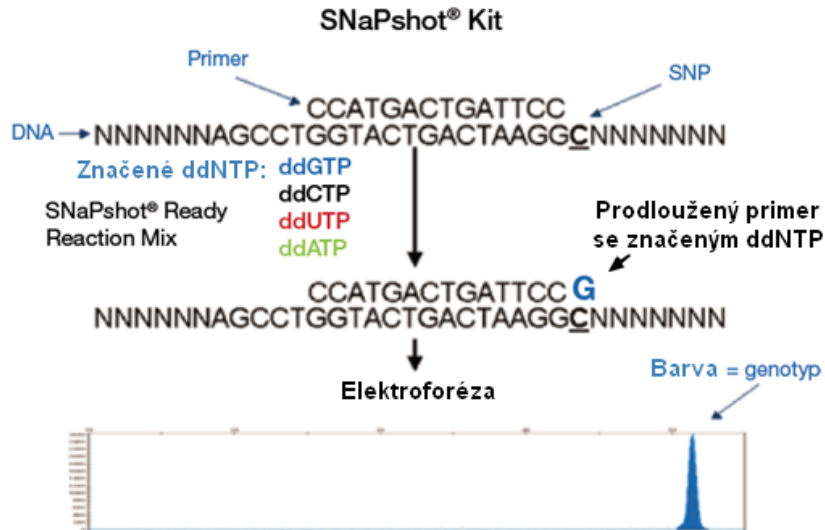
SNaPshot je jednonukleotidová multiplexová extenze, která nám umožňuje genotypizaci vzorku pomocí fluorescenčně značených dideoxynukleotidů – ddNTP. Na každý ddNTP je navázána jiná fluorescenční barva, která nám umožní stanovit genotyp, viz Tab. 5.

**Tab. 5** - Fluorescenční značení ddNTP

ddNTP	Označení barvy	Barva analyzovaných dat
A	dR6G	zelená
C	dTAMRA	černá
G	dR110	modrá
T	dROX	červená

Primer pro extenzní reakci je designovaný tak, že nasedá na vlákno DNA přesně před či za SNP našeho zájmu. Na místo bodové mutace se naváže na základě komplementarity bází příslušný fluorescenčně značený ddNTP. Po skončení jednonukleotidové extenze je nutné provést kapilární elektroforézu, která oddělí fragmenty podle velikosti a umožní detekci navázaného ddNTP. Různá velikost fragmentů se zajistí správným designem primerů. Za částí primeru, která nasedá na DNA, je poly(A), poly(T) či poly(GACT) konec, díky kterému sami určíme velikost primeru. Mezi délkami primerů se doporučuje rozdíl 4 - 8bp. Princip metody SNaPshot je znázorněn na Obr. 9.





**Obr. 9** - Princip jednonukleotidové extenze

(upraveno podle Applied Biosystems™, SNaPshot®)

V našem multiplexu bylo dohromady 6 SNP: rs6569759, rs7559271, rs7965082, rs1887276, rs4648379, rs1258763. V Tab. 6 jsou vypsány použité primery.

**Tab. 6** - Primery navržené pro extenzivní multiplexovou reakci

SNP	délka (bp)	Sekvence primeru
rs1887276	22	5'GATGACAGCCACCATTTCATGA 3'
rs6569759	34	5'13C-GCCTTGGAACCTCACTAAGTT 3'
rs1255863	40	5'18A-TAATTGCTTTGCTTTCACAGAA 3'
rs7559271	46	5'22A-CTATAAGCCCTCATGCTAACTGCA 3'
rs7965082	52	5'29A-CCCTAGAAAAACATCCCGATCCC3'
rs4648379	60	5'40A-CCCCTGAATTGCTCATGCAT3'

**Použité chemikálie:**

CleanSweep™ PCR Purification Reagent – Life Technologies, USA

ABI PRISM SNaPshot™ Multiplex Kit – Applied Biosystems™

GeneScan™-120 LIZ™ size standard – Applied Biosystems™

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)

Hi-Di™ formamide

Voda z MILLIPORE Gradient systému; Milli-Q

**Pracovní postup:**

Pracovní postup multiplexové jednonukleotidové extenze probíhá v několika krocích:

*Přečištění PCR produktů*

1. K 5  $\mu$ l PCR produktu jsme přidali 2  $\mu$ l CleanSweep reagencie. Po celou dobu přípravy pracujeme na ledu.
2. Poté jsme vzorky nechali inkubovat při teplotě 37 °C 15 min.
3. Inaktivace CleanSweep reagencie probíhala při 80 °C po dobu 15 min.

*SNaPshot multiplexová extenze*

Bylo nutné optimalizovat celý postup pro zajištění co nejlepších výsledků (vstupní množství přečištěných PCR produktů, koncentrace primerů, prodloužený čas hybridizace).

Postupovali jsme podle následujícího protokolu:

1. Pozitivní a negativní reakce byly připraveny podle tabulky 7.

**Tab. 7** – Reakční směs pro SNaPshot (pozitivní/negativní kontrola)

	<b>Pozitivní kontrola (μl)</b>	<b>Negativní kontrola (μl)</b>
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	5	5
SNaPshot Multiplex Control Template	2	0
SNaPshot Multiplex Control Primer Mix	1	1
Voda	2	4
<b>Celkem</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

2. Vlastní reakce byla připravena podle Tab. 8.

**Tab. 8** – Reakční směs pro SNaPshot (vzorek)

	<b>Objem (μl)</b>
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	5
Primer mix (1 μM pro každý primer)	1
Pool PCR produktů	3
Voda	1
<b>Celkem</b>	<b>10</b>

Po celou dobu přípravy reakcí pracujeme na ledu.

3. Reakce proběhla v termocycleru podle protokolu:

- 1. krok (denaturace) 10 vteřin při 96 °C
  - 2. krok (hybridizace) 10 vteřin při 50 °C
  - 3. krok (extenze) 30 vteřin při 60 °C
- } opakování 25×

### *Přečištění SNaPshot produktu*

K přečištění vzorku jsme použili enzym SAP, který rozštěpí zbylé dideoxynukleotidy a případné zbytky primerů.

1. Reagencie kromě samotného enzymu jsme nechali rozmraznout na ledu.
2. Připravili jsme reakční směs podle Tab. 9.

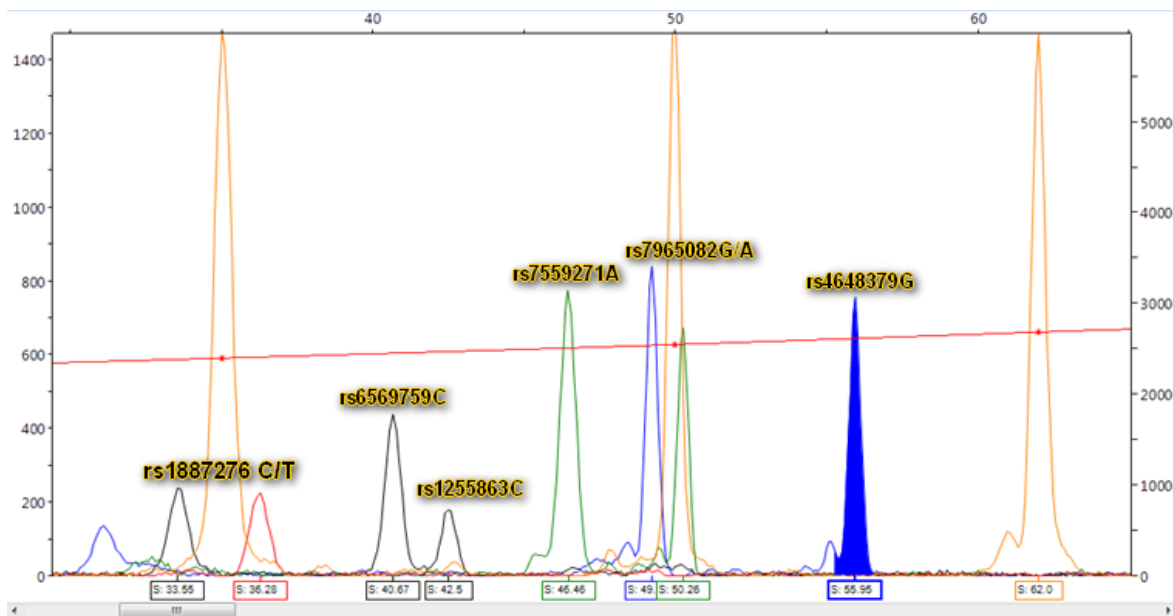
**Tab. 9** – Reakční směs pro přečištění produktů multiplexové extenze

Produkty SNaPshot reakce	10 $\mu$ l
10x SAP Reaction Buffer	2 $\mu$ l
Voda	7 $\mu$ l
SAP (1 jednotka/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

3. Inkubace reakční směsi při teplotě 37 °C po dobu 60 min.
4. Pro zastavení reakce je nutné zahřát reakci na 75 °C po 15 min.

### *Fragmentační analýza*

Před samotnou analýzou bylo nutné 0,5  $\mu$ l přečištěného produktu rozpustit v 9  $\mu$ l formamidu. K reakci jsme přidali 0,5  $\mu$ l standardu GeneScan-120 LIZ. Denaturace takto připravených vzorků proběhla při 95 °C po dobu 5 minut a následně byly vzorky okamžitě zchlazeny. Samotná fragmentační analýza byla provedena v Laboratoři sekvenace DNA na přístroji 3130xl Genetic Analyzer pro kapilární elektroforézu. Na Obr. 10 je znázorněna ukázka výsledků fragmentační analýzy.



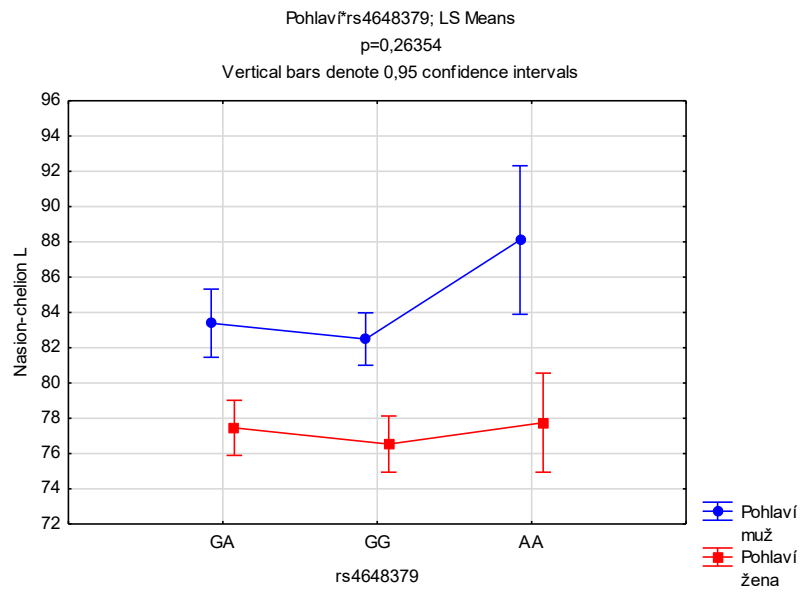
**Obr. 10** - Příklad výstupu z fragmentační analýzy s upravenými popisy SNP

### 3.7 Korekce dat

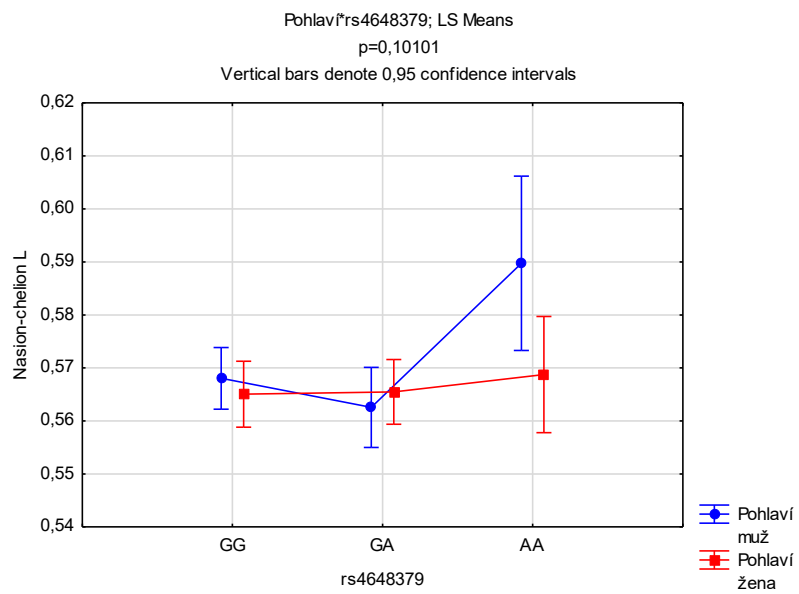
Při statistickém zpracování jsme pracovali s těmito typy dat:

- Raw data,
- CS data.

Raw data představují skutečné naměřené vzdálenosti vybraných rozměrů obličeje (Tab. 10). CS data jsou vzdálenosti ošetřené tzv. centroid size (CS). CS představuje velikost, která je vypočítaná z těžiště landmarků. Využitím centroid size a úpravou dat simulujeme tvar obličeje. Aplikací CS na získané vzdálenosti jsme získali hodnoty, které nejsou na celkové velikosti obličeje závislé. Pro analýzy byl využit celý populační soubor označovaný jako CS data. Z Obr. 11 je patrný rozdíl mezi výsledky ANOVY s Raw daty (graf A) a CS daty (graf B), který by v analýzách mohl vést k nesprávným výsledkům. V kapitole věnující se výsledkům jsou prezentovány pouze analýzy s využitím CS dat.



**A**



**B**

**Obr. 11** - Rozdíl mezi Raw daty a CS daty při použití ANOVA

### 3.8 Statistické zpracování

Ke zpracování genetických dat jsme využili program Arlequin v3.5.2 (Excoffier and Lischer 2010), především ke zjištění frekvence alel v souboru a pro testování vazebné nerovnováhy.

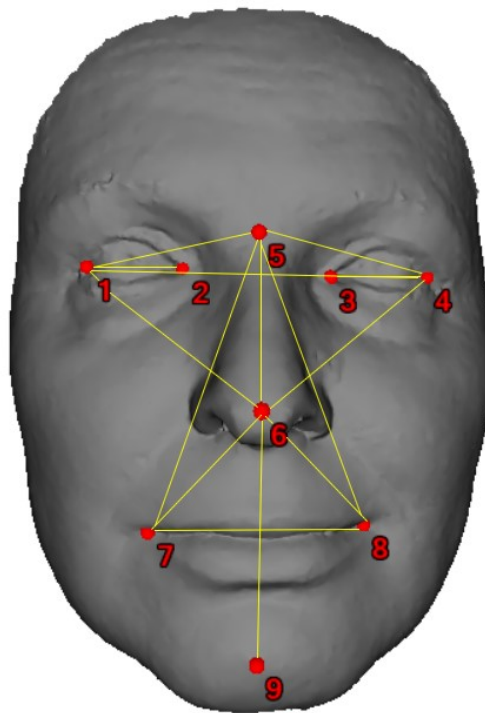
Získaná genetická data jsme vyhodnocovali spolu s morfologickými daty, které jsme získali v Laboratoři 3D zobrazovacích a analytických metod. Použité vzdálenosti rozměrů obličeje jsou uvedeny v Tab. 7 a graficky znázorněny na Obr. 12. U bilaterálních rozměrů je pravostranný parametr označen P, levostranný L. Pro zjištění, zda jednotlivé SNP ovlivňují rozměry obličeje, byl použit tento obecný postup:

- U dat jsme nejdříve ověřili normalitu dat p-p grafem a Shapiro-Wilkovým testem, přihlíželi jsme i k homoskedasticitě dat prověřované Leveneho testem.
- V případě normálního rozložení porovnávaných skupin dat jsme využili následující testy: nepárový t-test, two-way ANOVA a MANOVA.
- Pokud se u dat nepotvrdilo normální rozložení, využili jsme neparametrický test Mann-Whitney, případně v závislosti na typu dat test Kruskal-Wallis.
- Pro meziskupinové porovnání jsme použili modifikaci Tukeyova testu (Unequal N HSD), který je vhodný pro porovnávání skupin s rozdílným počtem vzorků.

K analýzám jsme využili program STATISTICA ver.13 (Dell Inc. 2016), k některým vizualizacím dat byl použit také program R Studio (RStudio Team 2015). Hladina statistické významnosti byla stanovena na 5 % ( $p < 0,05$ ).

**Tab. 10** - Použité vzdálenosti mezi landmarky

Šířka oka P	Pronasale-chelion P
Šířka oka L	Pronasale-chelion L
Exocanthion-nasion P	Nasion-chelion P
Exocanthion-nasion L	Nasion-chelion L
Exocanthion-pronasale P	Nasion-pogonion
Exocanthion-pronasale L	Pronasale-pogonion
Vzdálenost očí (Exocanthion L-P)	Nasion-pronasale
	Šířka úst (chelion L-P)



**Obr. 12** - Zobrazení landmarků a sledovaných vzdáleností

1 – exocanthion P, 2 – endocanthion P, 3 – endocanthion L, 4 – exocanthion L, 5 – nasion, 6 – pronasale, 7 – chelion P, 8 – chelion L, 9 – pogonion; žlutě vyznačeny sledované vzdálenosti



Vícenásobná lineární regrese byla využita pro sledování vlivu rozměrů rodičů na rozměr dítěte. Jejím výsledkem jsou normalizované rovnice závislosti ve tvaru:

$$D = a \times M + b \times O,$$

$$S = a \times M + b \times O,$$

kde D představuje parametr dcery, S – syna, M – matky, O – otce. Pro tyto výpočty jsme využili program R Studio (RStudio Team 2015).

Na určení míry korelace mezi rodiči a dětmi jsme využili Pearsonův korelační koeficient. Předpokladem použití tohoto testu je normální rozložení dat. V případě odchylky od normality jsme využili neparametrický Spearmanův korelační koeficient.

## 4 Výsledky

### 4.1 Populační analýza genetických dat

#### 4.1.1 Frekvence alel

Frekvence ve studovaném souboru byly počítány pouze ze zjištěných genotypů rodičů, kteří jsou individuálními jedinci. V Tab. 11 jsou vypsány zjištěné frekvence alel a frekvence alel evropské populace z 1000Genomes (“1000 Genomes | A Deep Catalog of Human Genetic Variation”). Frekvence genotypů našeho souboru vzorků jsou uvedeny v Tab. 12.

**Tab. 11** - Frekvence alel ve studovaném souboru a v Evropě

SNP	Studovaný soubor		Evropa	
rs1887276	C 0,4583	T 0,5417	C 0,5885	T 0,4115
rs6569759	C 0,5083	T 0,4917	C 0,4940	T 0,5060
rs1258763	C 0,3333	T 0,6667	C 0,3579	T 0,6421
rs7559271	A 0,7034	G 0,2966	A 0,6024	G 0,3976
rs7965082	A 0,4667	G 0,5333	A 0,5616	G 0,4384
rs4648379	A 0,3250	G 0,6750	A 0,3052	G 0,6948
rs642961	A 0,1917	G 0,8083	A 0,2127	G 0,7873
rs3213849	A 0,7083	G 0,2917	A 0,3807	G 0,6193
rs11726039	C 0,2542	T 0,7458	C 0,3410	T 0,6590

**Tab. 12** - Frekvence genotypů

SNP	Frekvence homozygota 1	Frekvence heterozygota	Frekvence heterozygota 2
rs1887276	CC 0,22	CT 0,49	TT 0,29
rs6569759	CC 0,22	CT 0,59	TT 0,19
rs1258763	CC 0,08	CT 0,51	TT 0,41
rs7559271	AA 0,53	GA 0,33	GG 0,14
rs7965082	AA 0,24	GA 0,47	GG 0,29
rs4648379	AA 0,14	GA 0,37	GG 0,49
rs642961	AA 0,03	GA 0,32	GG 0,64
rs3213849	AA 0,42	GA 0,58	GG 0
rs11726039	CC 0,05	CT 0,41	TT 0,54

#### 4.1.2 Hardy-Weinbergova rovnováha

Test HW rovnováhy testuje, zdali jsou pozorované frekvence genotypů výsledkem náhodného párování gamet. HW byla vypočítána pomocí programu Arlequin v3.5.2 z genotypů jednotlivých SNP. Jako vstupní data byly použity pouze genotypy rodičů. Pokud je  $p < 0,05$ , zamítáme nulovou hypotézu, tzn. vybraná populace je v souladu s Hargyho-Weinbergovou rovnováhou. Souhrn výsledků je uveden v Tab. 13. Pouze u rs3213849 nemůžeme potvrdit HW rovnováhu.

**Tab. 13** - Výsledky testu Hardy-Weinbergovy rovnováhy

SNP	#Genotyp	Obs.Het.	Exp.Het.	p-value	s.d.
rs1887276	59	0,49153	0,50196	1,00000	0,00000
rs6569759	58	0,60345	0,50420	0,18679	0,00038
rs1258763	59	0,50847	0,45198	0,39164	0,00048
rs7559271	58	0,32759	0,42504	0,11574	0,00031
rs7965082	59	0,49153	0,50369	1,00000	0,00000
rs4648379	59	0,37288	0,44039	0,24614	0,00042
rs642961	59	0,32203	0,31653	1,00000	0,00000
<b>rs3213849</b>	59	0,61017	0,42764	<b>0,00042</b>	0,00002
rs11726039	59	0,42373	0,39070	0,73581	0,00043

#Genotyp – počet genotypů; Obs.Het. – pozorovaná heterozygotita; Exp.Het – očekávaná heterozygotita; s.d. – směrodatná odchylka

#### 4.1.3 Vazebná nerovnováha

Vazebná nerovnováha (LD – Linkage Disequilibrium) byla vypočítána pomocí programu Arlequin v3.5.2 z genotypů jednotlivých SNP. Jako vstupní data byly použity pouze genotypy rodičů. Nulová hypotéza, tzn. že mezi 2 SNP není žádná vazba, byla zamítnuta u třech dvojic. V Příloze 1 jsou uvedeny konkrétní p-hodnoty a směrodatné odchylky.

Dvojice SNP ve vazbě jsou následující:

- rs1887276 a rs7559271 ( $p = 0,01564$ ),
- rs1887276 a rs7965082 ( $p < 0,00001$ ),
- rs7559271 a rs7965082 ( $p = 0,01075$ ).

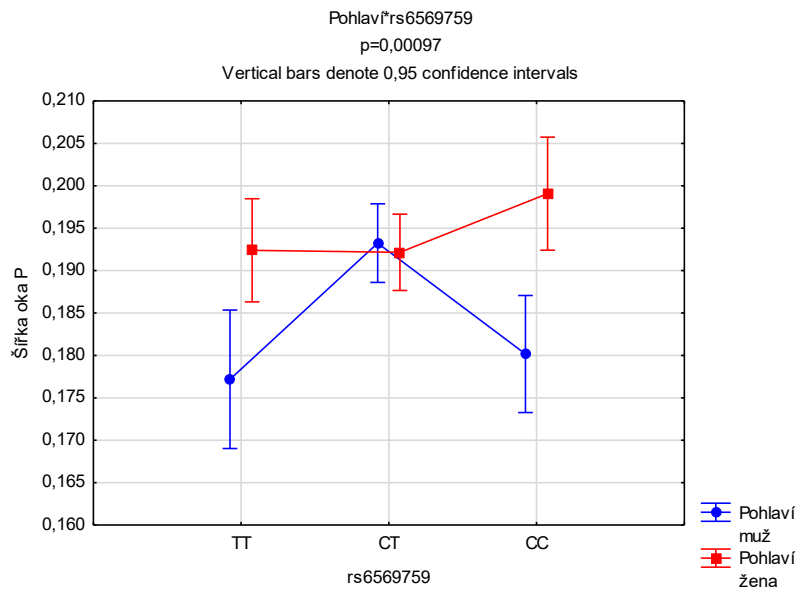
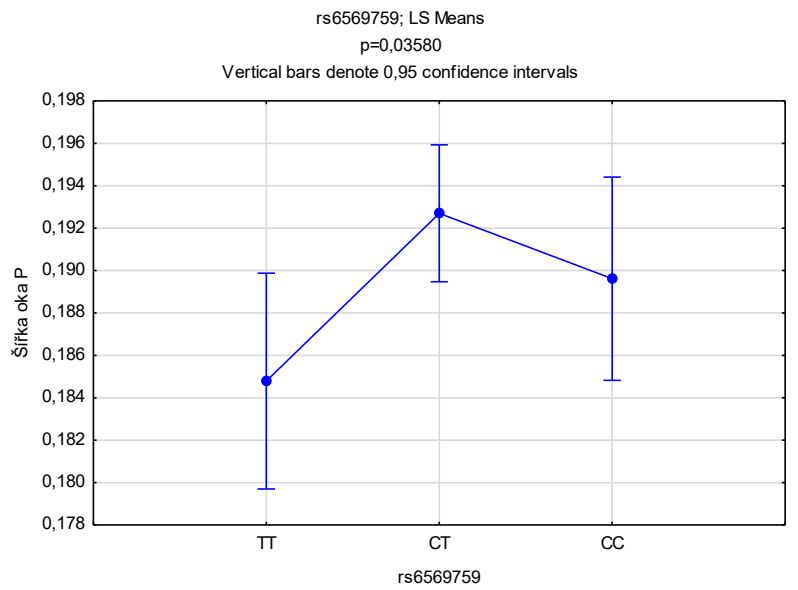
## 4.2 Asociace SNP a vybraných znaků obličeje

Při ověřování hypotéz, zdali vybraný polymorfismus ovlivňuje znak v morfologii obličeje, jsme využili vzdálenosti ošetřené tzv. centroid size (CS). U většiny polymorfismů byly hypotézy testovány analýzou rozptylu ANOVA a vícerozměrnou analýzou rozptylu MANOVA. Pokud nebyla potvrzena normalita dat, použili jsme neparametrický test Kruskal-Wallisův. Pouze u dvou SNP byly využity parametrické t-testy nebo neparametrický test Mann-Whitneyho. U SNP rs642961 byly detekovány 3 genotypy, nicméně genotyp AA byl nalezen pouze u dvou jedinců, ti byli z testů pro tento SNP vyloučeni. U polymorfismu rs3213849 jsme zachytili pouze dva genotypy – AA a GA. V Přílohách 2-10 jsou uvedeny p-hodnoty testu ANOVA pro všechny vzdálenosti a polymorfismy.

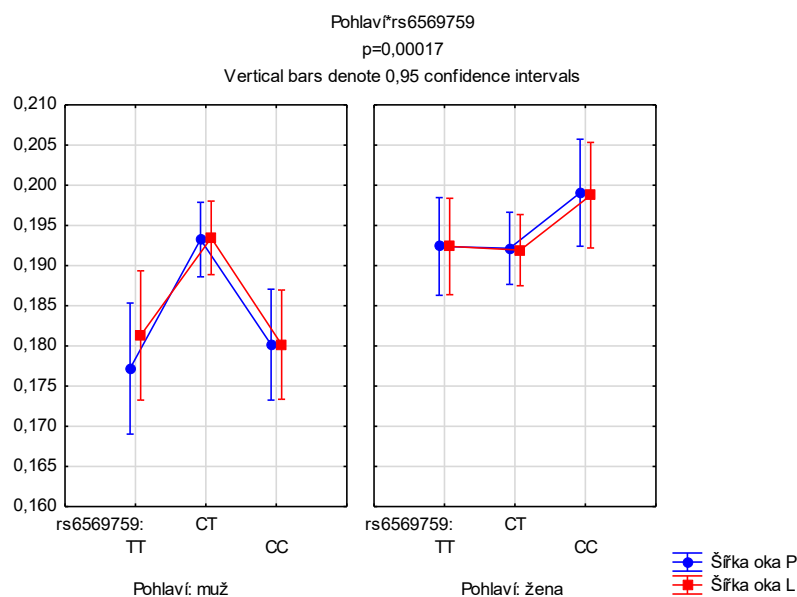
### 4.2.1 Šířka oka

Polymorfismus rs6569759 a jeho genotypy ovlivňují šířku oka odlišnými trendy u mužů a žen (šířka pravého oka  $p=0,00097$ ; šířka levého oka  $p=0,00173$ ). U žen způsobuje přítomnost alely T menší šířku oka, zatímco u mužů mají heterozygoti oči nejširší v porovnání s homozygoty (Obr. 13). Tento trend pozorujeme u šířky levého i pravého oka (Obr. 14).

Na Obr. 15 vidíme výsledky *post hoc* testu. Pozorujeme signifikantní rozdíly mezi ženami s genotypem CC a muži s genotypem TT ( $p=0,003713$ ) a mezi ženami s genotypem CC a muži s genotypem CC ( $p=0,002807$ ). U *post hoc* testu týkající se analýzy levého oka jsme došli ke stejným závěrům (ženy CC, muži TT  $p=0,034377$ ; ženy CC, muži CC  $p=0,002909$ ).



**Obr. 13** - Vliv polymorfismu rs6569759 a pohlaví na šířku pravého oka



**Obr. 14** - Vliv polymorfismu rs6569759 a pohlaví na šířku oka

Unequal N HSD; variable Šířka oka P (Spreadsheet in DP-data-centroid size)								
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = ,00017, df = 115,00								
Cell No.	Pohlaví	rs6569759	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
			,17719	,19325	,18016	,19239	,19216	,19907
1	muž	TT		0,072169	0,995729	0,103350	0,113383	0,003713
2	muž	CT	0,072169		0,092097	0,999962	0,999527	0,824406
3	muž	CC	0,995729	0,092097		0,137842	0,152794	0,002807
4	žena	TT	0,103350	0,999962	0,137842		1,000000	0,724191
5	žena	CT	0,113383	0,999527	0,152794	1,000000		0,694346
6	žena	CC	0,003713	0,824406	0,002807	0,724191	0,694346	

**Obr. 15** - Unequal N HSD *post hoc* test (polymorfismus rs6569759 a šířka oka P)

#### 4.2.2 Exocanthion-nasion

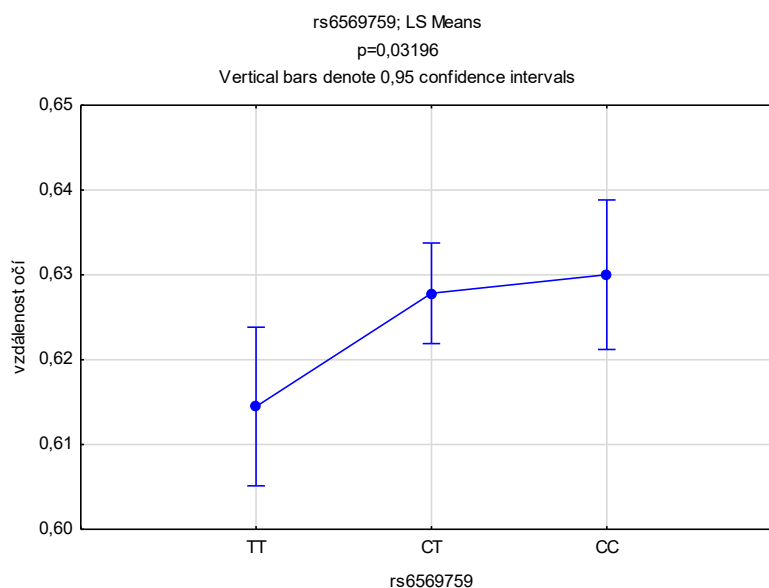
Nebyl nalezen žádný statisticky významný vztah mezi rozměrem exocanthion-nasion a sledovanými SNP. SNP rs6569759 by mohl mít vliv na tento rozměr (p=0,07242).

### 4.2.3 Exocanthion-pronasale

Nebyla nalezena žádná asociace polymorfismu a této vzdálenosti. SNP rs6569759 by mohl exocanthion-pronasale ovlivňovat ( $p = 0,08373$ ).

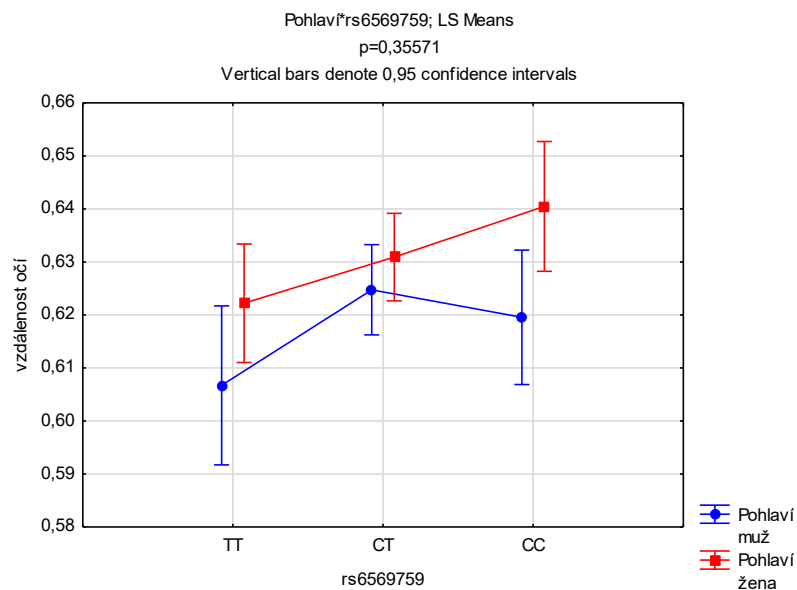
### 4.2.4 Vzdálenost očí

Polymorfismus rs6569759 ovlivňuje také vzdálenost očí ( $p = 0,03196$ ), jak lze vidět na Obr. 16. Obecně lze říci, že alela C způsobuje větší vzdálenost očí. U žen pozorujeme aditivní účinek alely C, která podmiňuje větší vzdálenost mezi očima. U mužů se jedná spíše o dominanci alely C, nepozorujeme velké rozdíly mezi rozměry u jedinců s genotypem CT a CC (Obr. 17). Na Obr. 18 vidíme výsledky *post hoc* testu pro jednotlivé skupiny – červené hodnoty poukazují na signifikanci mezi skupinami.



**Obr. 16** - Vliv polymorfismu rs6569759 na vzdálenost očí





**Obr. 17** - Vliv polymorfismu rs6569759 a pohlaví na vzdálenost očí

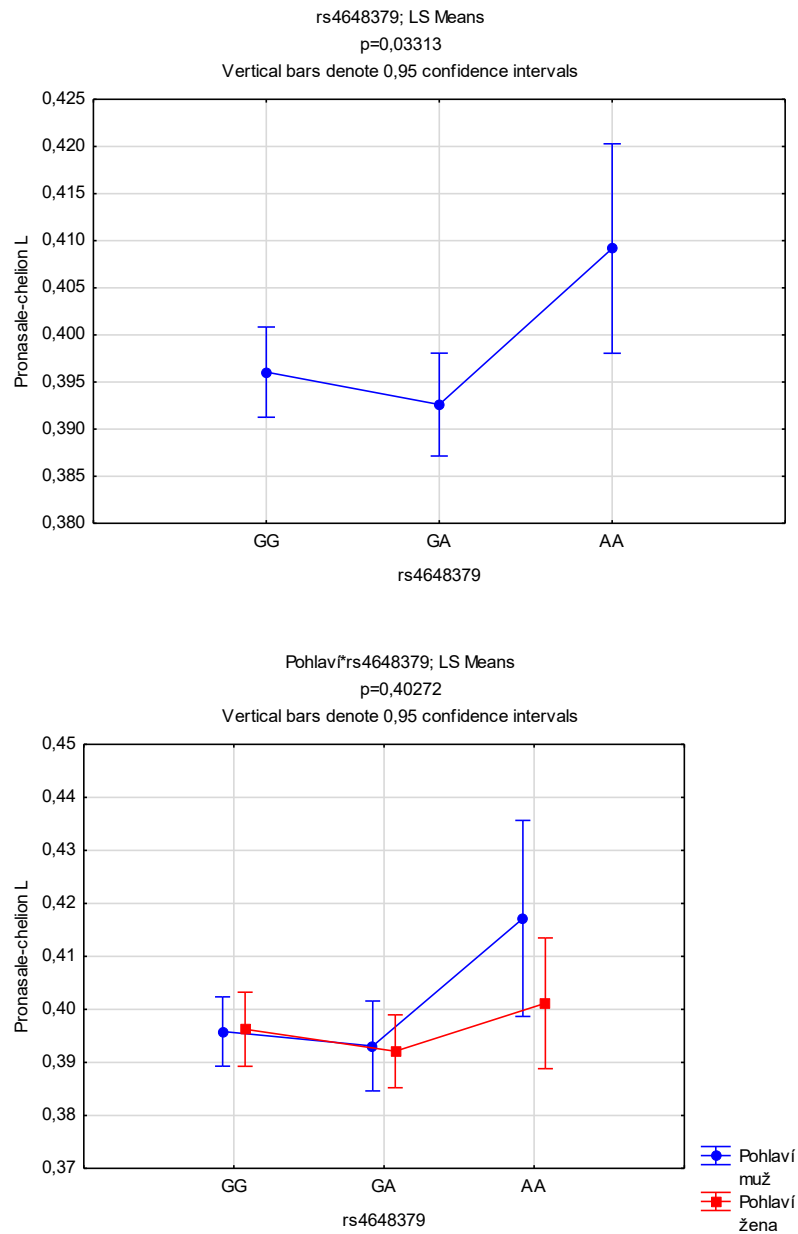
Unequal N HSD; variable vzdálenost očí (Spreadsheet in DP-data-centroid size) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00057, df = 115,00				
Cell No.	rs6569759	{1}	{2}	{3}
1	TT	,61669	0,188759	0,086286
2	CT	0,188759		0,919651
3	CC	0,086286	0,919651	

Unequal N HSD; variable vzdálenost očí (Spreadsheet in DP-data-centroid size) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00057, df = 115,00								
Cell No.	Pohlaví	rs6569759	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
1	muž	TT	,60673	0,545719	0,836522	0,698452	0,219498	0,024727
2	muž	CT	0,545719		0,992672	0,999611	0,912248	0,470272
3	muž	CC	0,836522	0,992672		0,999735	0,808754	0,198159
4	žena	TT	0,698452	0,999611	0,999735		0,884409	0,300463
5	žena	CT	0,219498	0,912248	0,808754	0,884409		0,883075
6	žena	CC	0,024727	0,470272	0,198159	0,300463	0,883075	

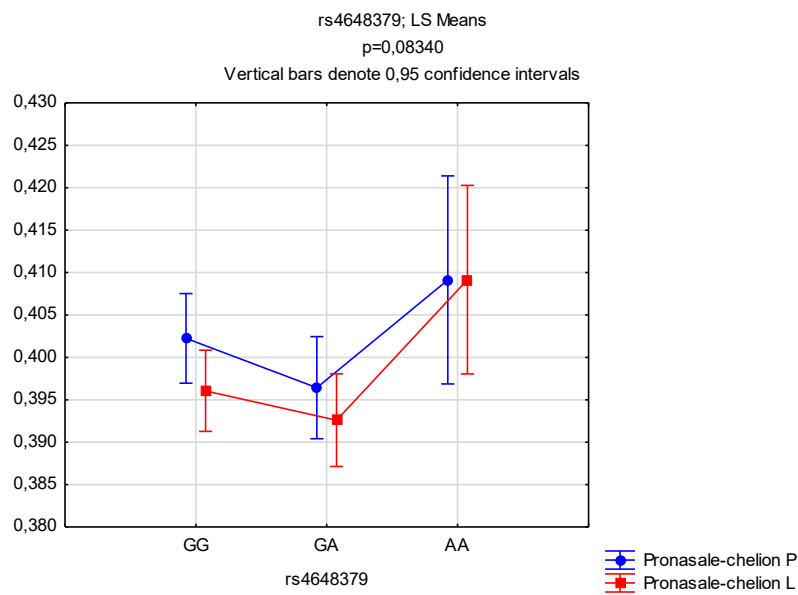
**Obr. 18** - Výsledky *post hoc* testu (rs6569759 a vzdálenost očí)

#### 4.2.5 Pronasale-chelion

Rozměr pronasale-chelion levé strany obličeje je významně ovlivňován polymorfismem rs4648379 ( $p = 0,03313$ ; Obr. 19). Významný vliv tohoto SNP na pravé straně se nepotvrdil ( $p = 0,12904$ ), nicméně z grafu na Obr. 20 je patrný obdobný trend u obou rozměrů. Výsledky *post hoc* testů neprokázaly signifikantní rozdíly mezi skupinami.



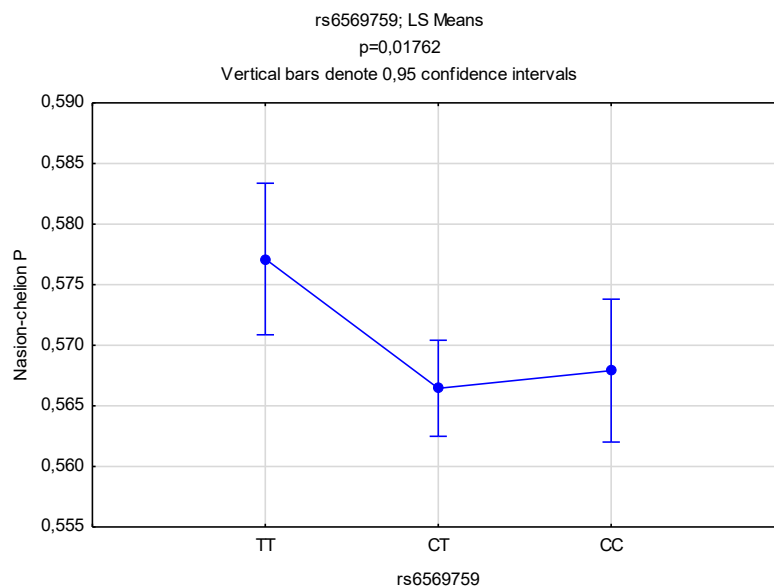
Obr. 19 - Vliv polymorfismu rs4648379 a pohlaví na rozměr Pronasale-chelion L



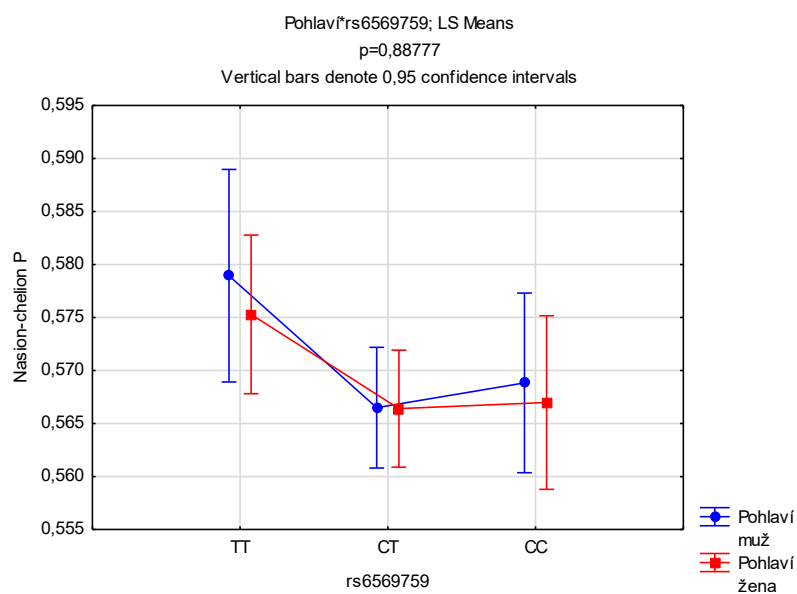
**Obr. 20** - Vliv polymorfismu rs4648379 na rozměry pronasale-chelion

#### 4.2.6 Nasion-chelion

Mimo oblast očí polymorfismus rs6569759 ovlivňuje také vzdálenost nasion-chelion ( $p = 0,01762$  – Obr. 21). U žen i mužů pozorujeme obdobný trend – alela C způsobuje menší vzdálenost těchto dvou bodů (Obr. 22). *Post hoc* test poukazuje na znatelný, ale nesignifikantní, rozdíl mezi genotypy TT a CT ( $p = 0,050313$ ).



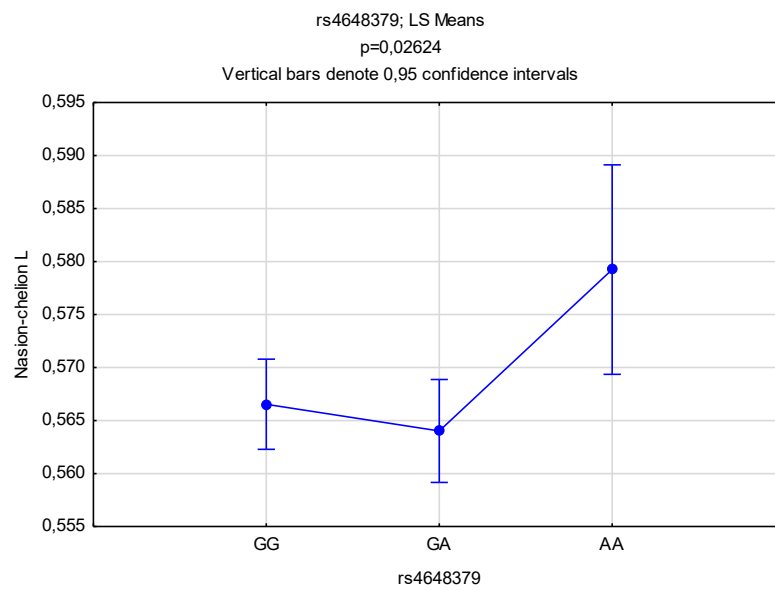
**Obr. 21** - Vliv polymorfismu rs6569759 na rozměr nasion-chelion P



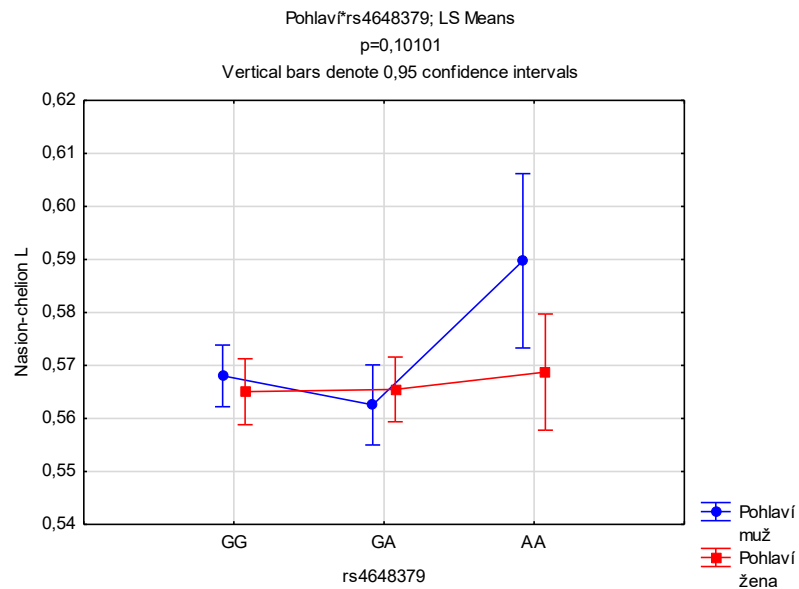
**Obr. 22** - Vliv polymorfismu rs6569759 a pohlaví na rozměr nasion-chelion P

Na vzdálenost mezi body nasion a chelion L se podílí taktěž SNP rs4648379, na kterou má signifikantní vliv ( $p = 0,02624$ ; Obr. 23). Z Obr. 24 je patrný odlišný vliv genotypu AA u mužů a žen. Pozorujeme recesivní vliv alely A, která v homozygotním stavu u mužů způsobuje nárůst rozměru (ne signifikantní). Obdobný trend je zřejmý i u

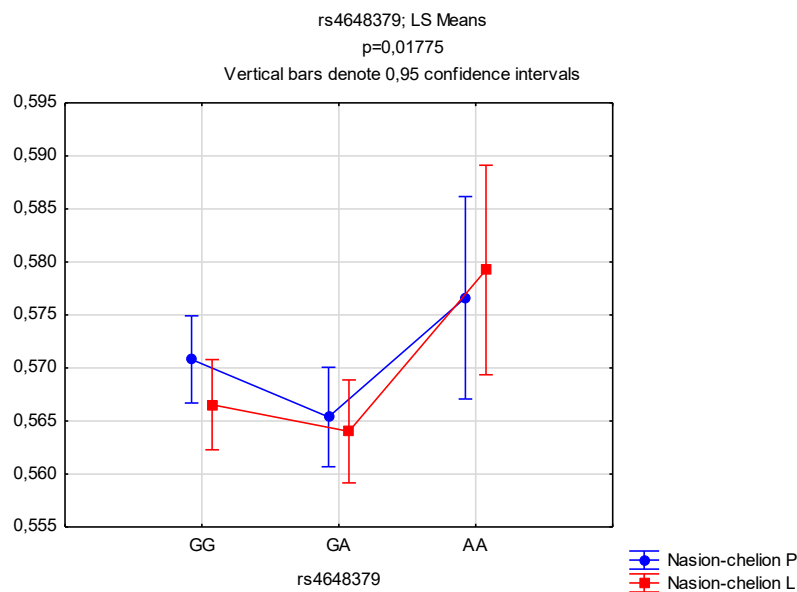
parametru nasion-chelion P (Obr. 25), ale asociace není signifikantní ( $p = 0,06572$ ). *Post hoc* test neprokázal žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami.



**Obr. 23** - Vliv polymorfismu rs4648379 na rozměr nasion-chelion L



**Obr. 24** - Vliv polymorfismu rs4648379 a pohlaví na rozměr nasion-chelion L



**Obr. 25** - Vliv polymorfismu rs4648379 na rozměry nasion-chelion

#### 4.2.7 Nasion-pogonion

U rozměru nasion-pogonion nebyly nalezeny asociace s žádným SNP. Polymorfismus rs6569759 by mohl ovlivňovat rozměr nasion-pogonion ( $p = 0,0738$ ).

#### 4.2.8 Pronasale-pogonion a nasion-pronasale

U těchto rozměrů jsme nenalezli žádné asociace se sledovanými polymorfismy.

#### 4.2.9 Šířka úst

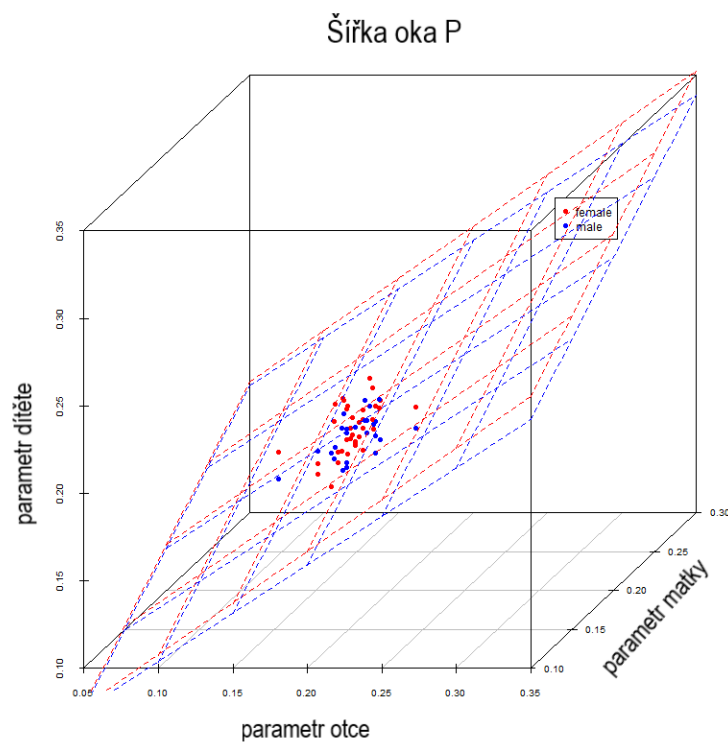
U šířky úst jsme nenalezli žádné signifikantní asociace s polymorfismy. SNP rs11726039 ( $p = 0,07$ ) by na šířku úst mohl mít vliv.

### 4.3 Dědičnost parametrů obličeje

Dědičnost jednotlivých parametrů obličeje byla zjišťována pomocí vícenásobné regresní analýzy. Všechny rovnice i se spolehlivostí koeficientů jsou uvedeny v Příloze 11. Většina závislostí je obdobná jako u šířky oka a příspěvek rodičů je víceméně vyrovnaný. Dále jsou popsány případy, kde můžeme pozorovat odlišnosti.

#### 4.3.1 Šířka oka

U dcer i synů pozorujeme vyrovnané příspěvky matky a otce, jak lze vidět na Obr. 26. Na ose X je vyznačena šířka pravého oka otce, na ose Z pak šířka pravého oka matky a na ose Y je šířka pravého oka dítěte. Modré body znázorňují syny, červené body dcery. Body jsou pak proloženy rovinou, díky které můžeme pozorovat jednotlivé příspěvky rodičů.



**Obr. 26** - Grafické znázornění vlivu šířky oka P rodičů na šířku oka dítěte

Modrá rovina – syn; červená rovina – dcera

Číselné vyjádření jednotlivých příspěvků je pomocí normalizovaných rovnic, spolu s p-hodnotami spolehlivosti jednotlivých koeficientů příspěvku matky a otce.

Šířka pravého oka:  $D = 0,55 \times O + 0,45 \times M$  (O:  $2,48 \times 10^{-7}$ ; M:  $4,94 \times 10^{-6}$ )

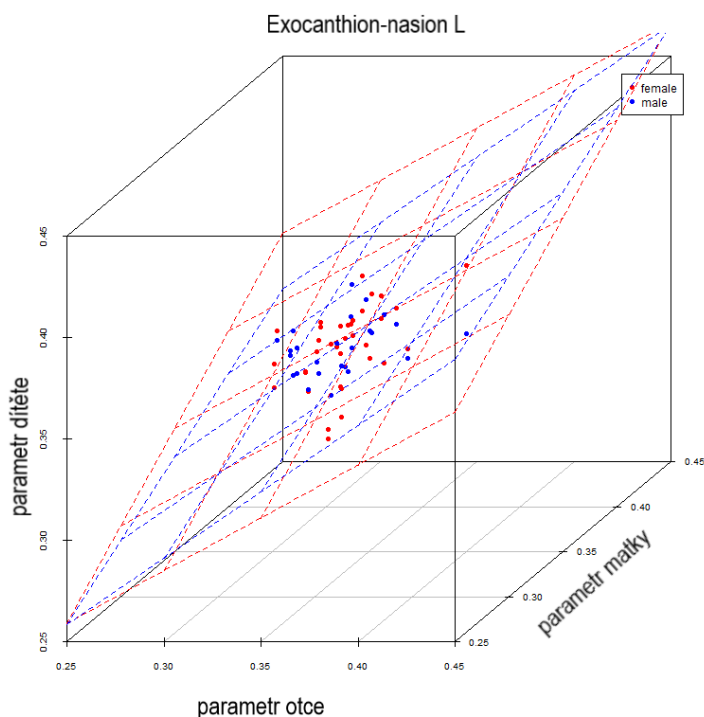
$$S = 0,53 \times O + 0,47 \times M \quad (\text{O: } 3,34 \times 10^{-5}; \text{M: } 0,00011)$$

Šířka levého oka:  $D = 0,6 \times O + 0,4 \times M$  (O:  $1,1 \times 10^{-7}$ ; M:  $8,31 \times 10^{-7}$ )

$$S = 0,57 \times O + 0,43 \times M \quad (\text{O: } 8,97 \times 10^{-7}; \text{M: } 0,0013)$$

### 4.3.2 Exocanthion-nasion

U vzdálenosti mezi vnějším koutkem oka a bodem nasion je příspěvek obou rodičů poměrně vyvážený (Obr. 27). U dcer je vzdálenost podmíněná 59 % na pravé straně, respektive 50 % na straně levé, ze strany otce ( $p < 0,001$ ). U synů je příspěvek ze strany otce o něco větší – pravá strana je ovlivněna otcem 58 %, levá pak z 63 %.



**Obr. 27** - Grafické znázornění vlivu rozměru exocanthion-nasion L rodičů na rozměr dítěte



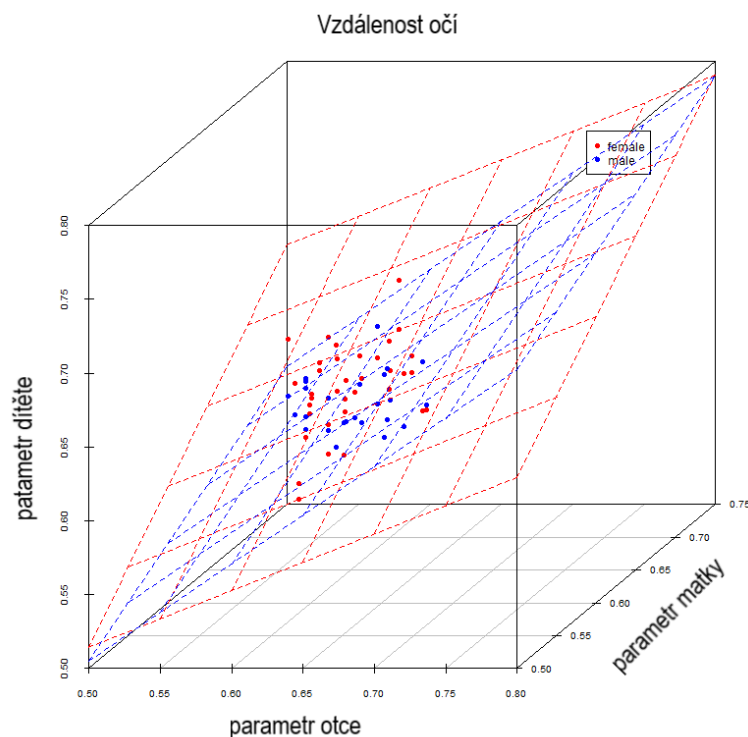
Modrá rovina – syn; červená rovina – dcera

### 4.3.3 Exocanthion-pronasale

Příspěvek rodičů k rozměru mezi vnějším koutkem oka a špičkou nosu je u dcer vyrovnaný (51 %, respektive 47 % ze strany otce;  $p < 0,003$ ). U chlapců pozorujeme vyšší vliv fenotypu matky na tento rozměr, a to 70 % u pravostranné vzdálenosti a 55 % na levé straně. Na výsledky u chlapců musíme pohlížet s opatrností, jelikož p-hodnota koeficientu otce u pravostranného rozměru má hodnotu 0,087.

### 4.3.4 Vzdálenost očí

Z Obr. 28 je patrný odlišný vliv vzdálenosti očí rodičů na rozměr u dítěte. U synů pozorujeme značný vliv od otce (65 %;  $p = 0,00058$ ), oproti tomu u dcer má větší vliv rozměr matky (63 %;  $p = 7,36 \times 10^{-7}$ ).



**Obr. 28** - Grafické znázornění vlivu vzdálenosti očí rodičů na vzdálenost očí dítěte

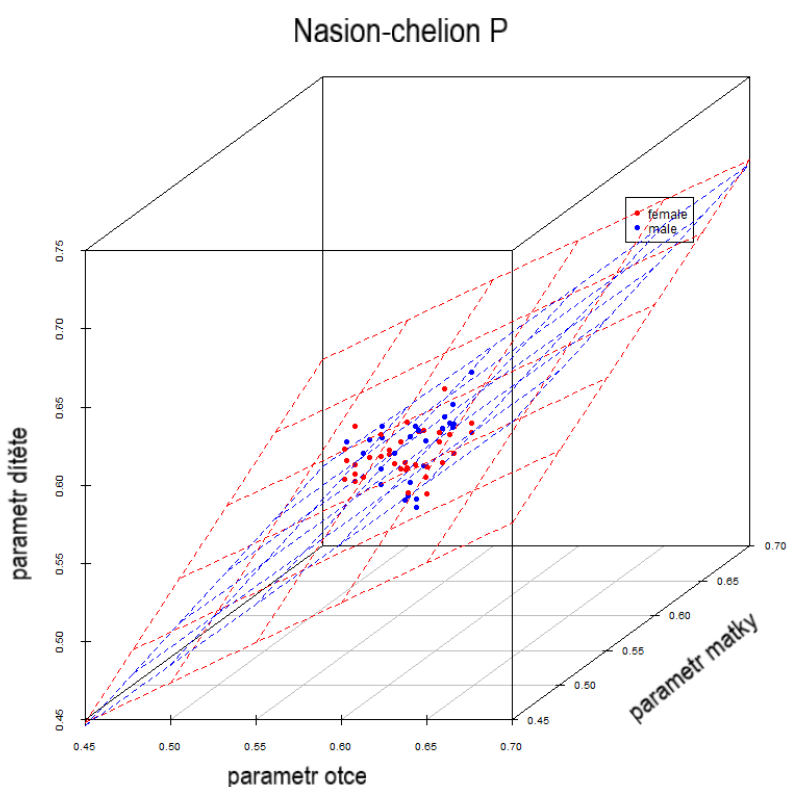
Modrá rovina – syn; červená rovina – dcera

### 4.3.5 Pronasale-chelion

Rožměr pravé strany této vzdálenosti je u synů ovlivněn z 63 % rožměrem matky ( $p = 0,0006$ ). Na levé straně je situace obdobná – vliv matky je 61 % ( $p = 0,0024$ ). U dívek nemůžeme provést spolehlivý závěr analýzy, hodnoty některých koeficientů nejsou signifikantní na hladině 5 %.

### 4.3.6 Nasion-chelion

Na Obr. 29 vidíme zřatelný roždíl mezi syny a dcerami co do přispěvku rodičů. U dcer je vliv otce i matky vyrovnaný. U synů je situace odlišná – zdá se, že velký vliv na tento parametr má otec. Hodnoty některých koeficientů nejsou signifikantní, a proto nemůžeme učinit spolehlivý závěr.

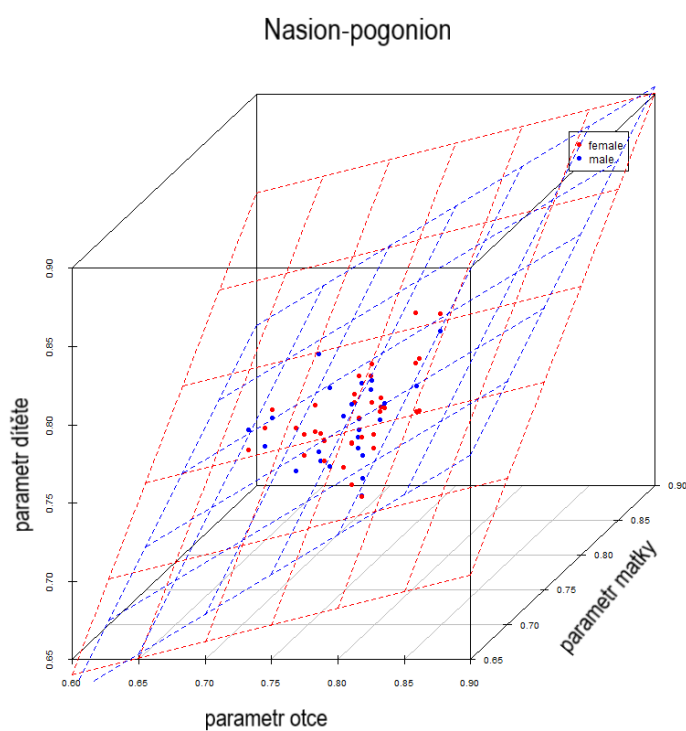


**Obr. 29** - Grafické znázornění vlivu rožměru nasion-chelion rodičů na parametr dítěte

Modrá rovina – syn; červená rovina – dcera

### 4.3.7 Nasion-pogonion

Vzdálenost mezi body nasion a pogonion je u dcer silně ovlivněna velikostí rozměru matky a to 79 % ( $p < 0,007$  u obou koeficientů). U synů pozorujeme rovnoměrné zastoupení příspěvku otce a matky ( $p < 0,002$ ). Závislosti jsou zobrazeny na Obr. 30.

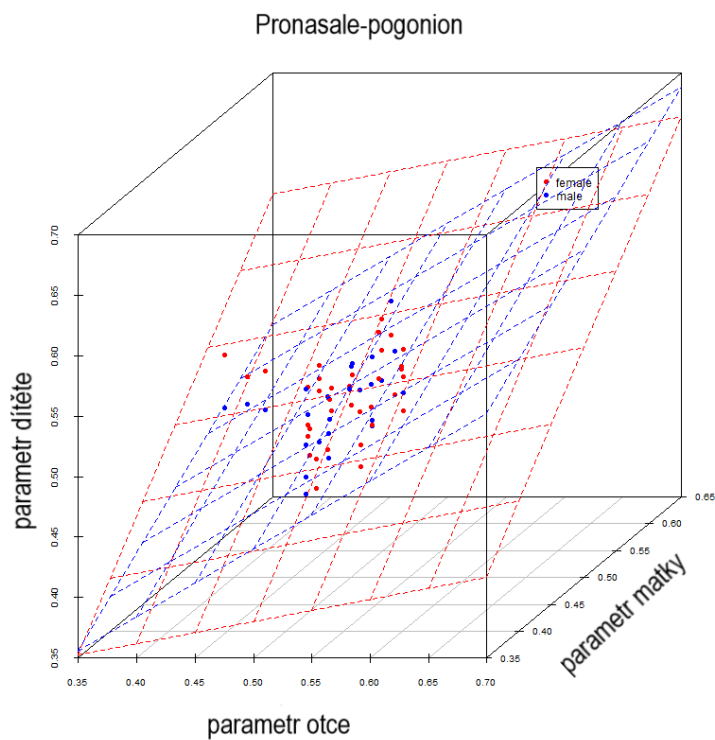


**Obr. 30** - Grafické znázornění vlivu rozměru nasion-pogonion rodičů na rozměr dítěte

Modrá rovina – syn; červená rovina – dcera

### 4.3.8 Pronasale-pogonion

Rozměr pronasale-pogonion kopíruje obdobný trend jako u rozměru nasion-pogonion (Obr. 31). Tento rozměr je u dcer ovlivněn z 82 % matkou ( $p = 2,4 \times 10^{-8}$ ). Rovnoměrný příspěvek rodičů pozorujeme u synů (55 % ze strany otce).

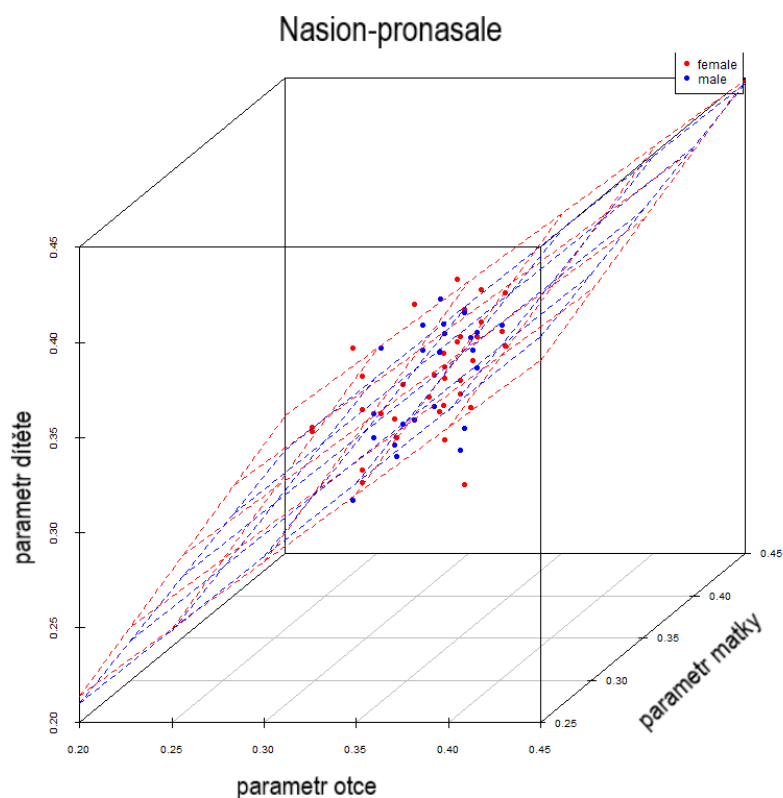


**Obr. 31** - Grafické znázornění vlivu rozměru pronasale-pogonion rodičů na parametr dítěte

Modrá rovina – syn; červená rovina – dcera

### 4.3.9 Nasion-pronasale

Délka nosu (nasion-pronasale) je ovlivněna u obou pohlaví stejně (Obr. 32). Výrazný vliv na tento rozměr má otec, který je zodpovědný za 71 % velikosti rozměru u dcer ( $p = 0,00031$ ), 78 % u synů ( $p = 8,59 \times 10^{-5}$ ). Koeficienty u rozměrů matky nejsou signifikantní ( $p = 0,1$  u dcer; respektive  $p = 0,17$  u synů).

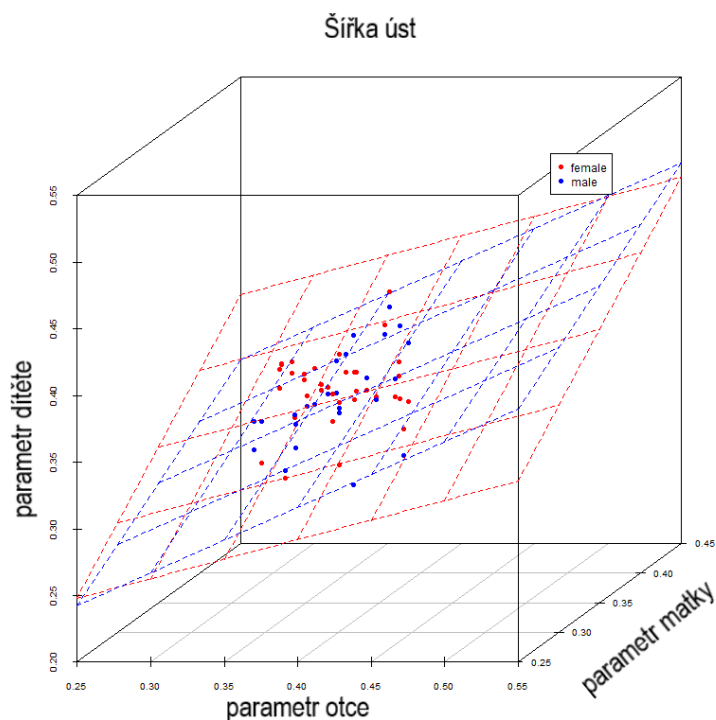


**Obr. 32** - Grafické znázornění vlivu rozměru nasion-pronasale rodičů na rozměr dítěte

Modrá rovina – syn; červená rovina – dcera

### 4.3.10 Šířka úst

Na šířku úst u dcer má významný vliv šířky rtů matky, a to až 70 % ( $p = 1,09 \times 10^{-7}$ ). U synů nepozorujeme výrazný příspěvek od žádného z rodičů (51 % u otce). Grafické znázornění vidíme na Obr. 33.



**Obr. 33** - Grafické znázornění vlivu šířky úst rodičů na rozměr dítěte

Modrá rovina – syn; červená rovina – dcera

### 4.3.11 Pearsonův korelační koeficient

Pro testování korelace rozměrů mezi dětmi a rodiči jsme vytvořili 4 dvojice: otec-dcera, otec-syn, matka-dcera, matka-syn. Korelační koeficient nabývá hodnot od -1 do 1, přičemž hodnoty blízké 0 odpovídají nulové korelaci mezi daty, hodnoty blíží se 1 odpovídají pozitivní korelaci a hodnoty -1 značí negativní vztah. Hodnota korelačního koeficientu poukazuje na sílu vztahu mezi znaky. Korelační koeficient 0-0,25 poukazuje na malou až žádnou korelaci, 0,25-0,5 značí nízký stupeň korelace, 0,5-0,75 signalizuje střední stupeň závislosti a hodnoty 0,75-1 odráží silný vztah mezi pozorovanou skupinou znaků. V Příloze 12 jsou uvedeny hodnoty korelačních koeficientů; tučným písmem jsou

pak zvýrazněny ty koeficienty, které jsou signifikantní na hladině významnosti 0,05. Podmínkou tohoto testu je normální rozložení, které bylo testováno Shapiro-Wilkovým testem. V případě zamítnutí normálního rozložení byl použit Spearmanův test, který je vhodný pro nenormální rozložení dat.

U dcer je pozitivní korelační vztah ve skupině dcera/matka u rozměru nasion-pogonion ( $r = 0,7280$ ;  $p < 0,0001$ ). Obdobně je tomu i u vzdálenosti mezi body pronasale a pogonion ( $r = 0,5487$ ;  $p = 0,009$ ). U dvojice otec/dcera pozorujeme pozitivní korelaci u rozměru exocanthion-pronasale L ( $r = 0,5229$ ;  $p = 0,001$ ).

Skupina syn/otec vykazuje více korelací oproti skupině syn/matka. S matkami sledujeme pouze jednu významnější korelaci, a to s rozměrem pronasale-chelion L ( $r = 0,5251$ ;  $p = 0,01$ ). U skupiny syn/otec pozorujeme střední stupeň závislosti u rozměrů pronasale-chelion L ( $r = 0,5270$ ;  $p = 0,01$ ), nasion-chelion L ( $r = 0,6084$ ;  $p = 0,002$ ), pronasale-pogonion ( $r = 0,5256$ ;  $p = 0,011$ ) a nasion-pronasale ( $r = 0,4999$ ;  $p = 0,016$ ).

Průměr koeficientů u skupiny dcera/matka je 0,2791; dcera/otec 0,2047. U skupiny syn/matka dosahuje průměr hodnoty 0,0827, oproti tomu u skupiny syn/otec je průměr 0,3693. Lze tedy usoudit, že synové mají více korelací se svými otci, kdež to u dcer jsou korelace mezi rodiči více vyrovnané.

#### **4.4 Dědičnost parametrů obličeje ve vztahu ke genotypu**

K předchozím analýzám jsme se pokusili zahrnout i genetickou informaci jak rodičů, tak i dětí. K tomu jsme využili tzv. „pattern“, který můžeme chápat jako složeninu genotypů. První dvě písmena jsou genotyp dítěte, další dvě genotyp otce, a nakonec genotyp matky. Využita byla vícenásobná regresní analýza. Zaměřili jsme se pouze na ty polymorfismy, které mají signifikantní vliv na konkrétní rozměry – rs6569759 a rs4648379. Do analýz byly zahrnuty pouze takové patterny, u kterých byl počet jedinců (nositelů daných genotypů) vyšší než 6.

#### 4.4.1 Šířka oka P

U polymorfismu rs6569759 jsou dva patterny – CCCCTT a CTCTCT. První pattern představuje kombinaci dítěte s genotypem CC, jeho otcem s genotypem taktéž CC a matkou s genotypem CT. U druhého patternu jsou všichni jedinci ze trojice heterozygoti. Na Obr. 34 vidíme, že mezi patterny a vlivem rodičů, není příliš rozdíl.

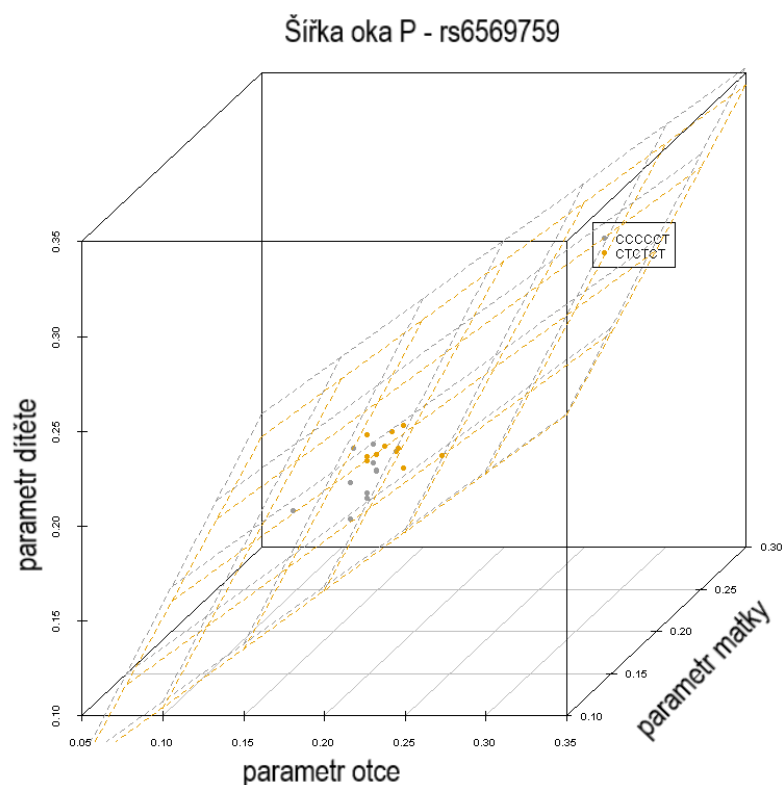
Rovnice u patternů vypadají následovně:

$$\text{CCCCTT: } \text{šířka oka dítěte} = 0,57 \times O + 0,43 \times M$$

$$\text{CTCTCT: } \text{šířka oka dítěte} = 0,59 \times O + 0,41 \times M$$

p-hodnoty koeficientů CCCCTT: 0,01375 (O), respektive 0,04526 (M)

p-hodnoty koeficientů CTCTCT: 0,02267 (O), respektive 0,08578(M)



**Obr. 34** - Grafické znázornění vlivu genotypu rs6569759 a šířky oka rodičů na šířku oka dítěte

Šedá barva roviny – pattern CCCCTT; oranžová barva roviny pattern CTCTCT



#### 4.4.2 Vzdálenost očí

U vzdálenosti očí opět hraje roli polymorfismus rs6569759. Na Obr. 35 můžeme vidět rozdíly mezi patterny. Rozdíly v genotypech jsou pouze u dítěte a otce.

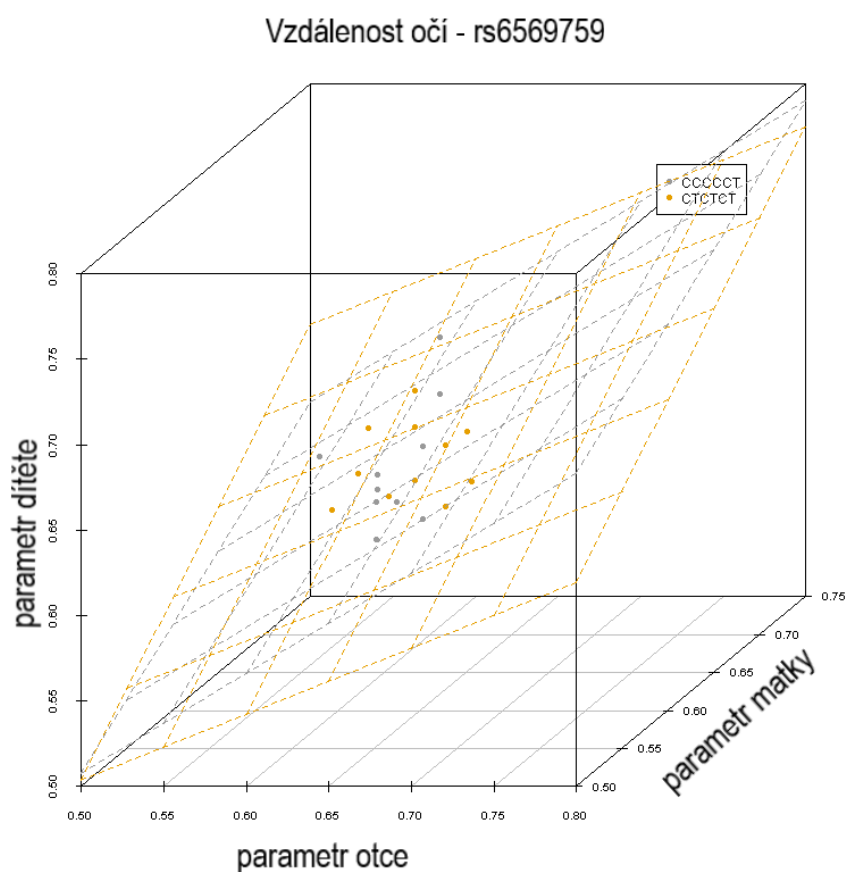
Rovnice patternů:

$$\text{CCCCCT: } \text{vzdálenost očí dítěte} = 0,58 \times O + 0,42 \times M$$

$$\text{CTCTCT: } \text{vzdálenost očí dítěte} = 0,38 \times O + 0,62 \times M$$

p-hodnoty koeficientů CCCCCT: 0,00718 (O); 0,03 (M)

p-hodnoty koeficientů CTCTCT: 0,05602 (O); 0,00636 (M)



**Obr. 35** - Grafické znázornění vlivu genotypu rs6569759 a vzdálenosti očí rodičů na rozměr dítěte

Šedá barva roviny – pattern CCCCCT; oranžová barva roviny pattern CTCTCT

#### 4.4.3 Pronasale-chelion P

Tento rozměr je ovlivňován polymorfismem rs4648379. Na Obr. 36 vidíme, že u tohoto polymorfismu jsou 3 patterny: GAGAGG, GGGGGA a GGGGGG. Opět první genotyp je genotyp dítěte, druhý otce a třetí matky. Mezi jednotlivými patterny jsou velké rozdíly.

Rovnice patternů:

$$\text{GAGAGG} \quad \text{dítě} = 0,3 \times O + 0,7 \times M$$

$$\text{GGGGGA} \quad \text{dítě} = 0,073 \times O + 0,93 \times M$$

$$\text{GGGGGG} \quad \text{dítě} = 0,91 \times O + 0,092 \times M$$

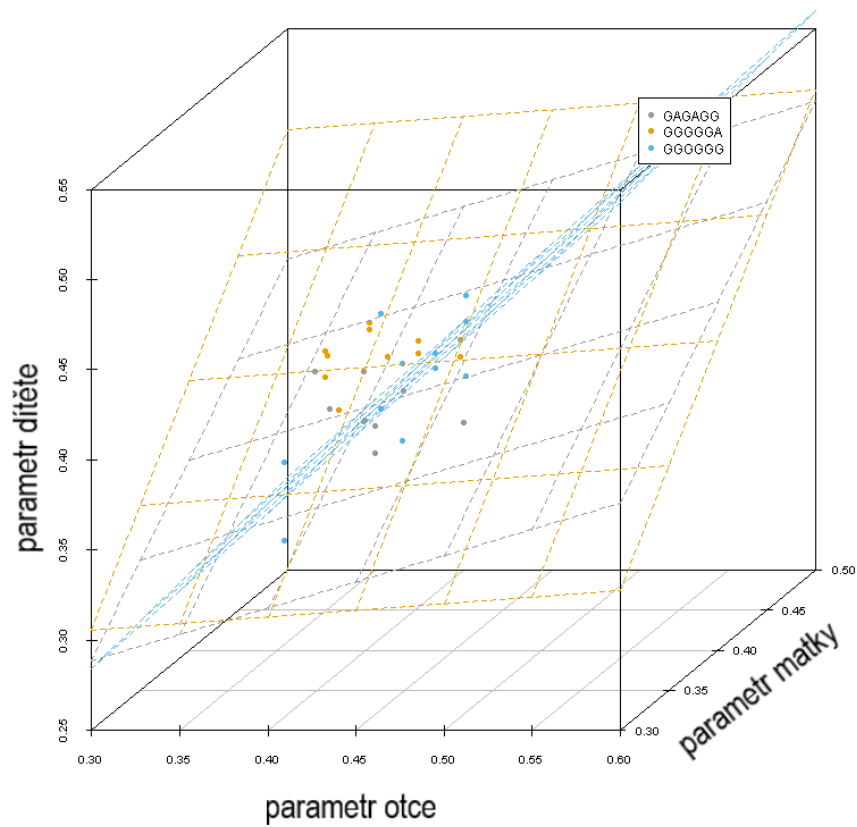
p-hodnoty koeficientů GAGAGG: 0,34 (O); 0,055 (M)

p-hodnoty koeficientů GGGGGA: 0,67 (O); 0,00032 (M)

p-hodnoty koeficientů GGGGGG: 0,26 (O); 0,91 (M)

Koeficienty jsou u tohoto rozměru nespolehlivé (dle p-hodnot) a rovnicím bychom neměli přikládat velký význam.

### Pronasale-chelion P - rs4648379



**Obr. 36** - Grafické znázornění vlivu genotypu rs4648379 a rozměru pronasale-chelion P na rozměr dítěte

Šedá barva roviny – pattern GAGAGG; oranžová – GGGGGA, modrá – GGGGGG

#### 4.4.4 Nasion-chelion

U toho rozměru jsme detekovali asociaci s rs6569759 i rs4648379, nicméně spolehlivosti koeficientů jsou u rovnic vyšší než 0,05.

## 5 Diskuze

Tato diplomová práce je pilotní studií projektu, který se zabývá fenotypem, genotypem a dědičností kraniofaciálních znaků. Úkolem práce bylo vyhledat takové polymorfismy, o kterých je známo či lze předpokládat, že ovlivňují morfologii obličeje, a sledovat dědičnost znaků obličeje na rodinném modelu.

Při výběru genetických markerů jsme stanovili několik kritérií: i) zjištěná asociace polymorfismu na morfologický znak obličeje (kromě rs11726039), ii) zastoupení znaků ovlivněných SNP by mělo pokrýt obličej rovnoměrně a iii) každý SNP musí mít frekvenci minoritní alely vyšší než 0,1. U osmi SNP byly při genotypizaci detekovány všechny genotypy, u rs3213849 jsme zachytili pouze dva genotypy. Tento SNP také nesplňuje Hardyho-Weinbergovu rovnováhu. Ta předpokládá, že sledovaná populace je dostatečně velká, nepozorujeme v ní selekce ani mutace, neprobíhá emigrace ani imigrace a v prostředí, které populace obývá, není žádná bariéra, která by znemožnila náhodné mísení mezi obyvatelstvem. Nemáme žádné informace, které by vysvětlovaly selekci toho polymorfismu. Možným vysvětlením je nedostatečná velikost souboru.

Tři dvojice polymorfismů (rs1887276 a rs7559271; rs1887276 a rs7965082; rs7559271 a rs7965082) jsou spolu ve vazbě. Vazbu můžeme pozorovat u lokusů ležících velmi blízko sebe (v řádu kilobasí), jedná se o tzv. úplnou vazbu. Oblasti na homologních chromosomech mohou být také ve vazbě (vazba neúplná) a to díky crossing-overu. Existuje také vazebná nerovnováha dlouhého rozsahu (LRLD – long range LD), která se může vyskytovat mezi lokusy velmi vzdálenými. Na taková místa genomu pak působí nějaká síla. Jednou z možností je mísení mezi populacemi, což může způsobit zvláštní vzory LRLD v populaci. Dále také může působit genetický drift či nějaké demografické změny populace. Strukturní změny chromosomů mohou být taktéž důvodem vzniku LRLD (Koch et al. 2013). Polymorfismy rs1887276 a rs7965082 leží ve stejné oblasti 12q23.1. U těchto SNP lze tedy očekávat, že mohou být ve vazbě. Polymorfismus rs7559271 leží na dlouhém raménku 2. chromosomu (2q35). V současné době nemáme žádné informace o tom, proč by měla být vazba mezi lokusy na 2. a 12. chromosomu. Je možné, že tato vazba nemá žádný biologický podklad a je pouze matematickým/statistickým výsledkem.

Na lidský obličej a jeho morfologii má vliv mnoho faktorů, nejvýrazněji pohlaví a věk. Muži mají delší obličej, výraznější nadočnicové oblouky a nos a celkově je obličej robustnější než u žen. U dětí se obličej neustále mění a vyvíjí. Během stárnutí na obličejí také pozorujeme změny – obličej se zakulacuje, snižuje se konvexita obličeje a zvýrazňují se vrásky, které jsou způsobeny postupnou ztrátou elasticity kůže (Koudelová et al. 2015; Mydlová et al. 2015). Z těchto důvodů jsme u potomků požadovali minimální věk 18 let, zatímco u rodičů maximálně 60 let. Pohlavní dimorfismus jsme zohlednili v analýzách.

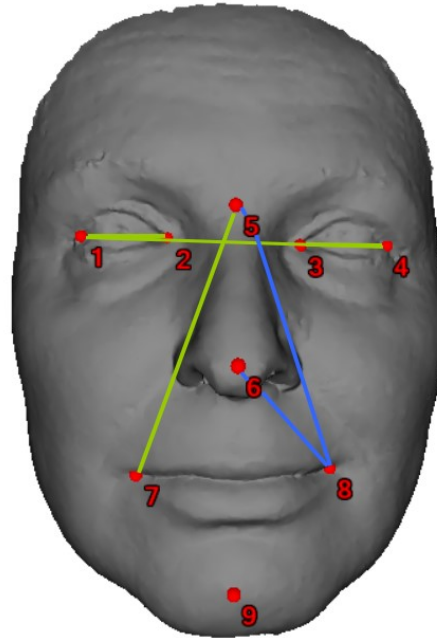
Nejvíce asociací pozorujeme u polymorfismu rs6569759, který je spojovaný se šířkou dolní čelisti (Ermakov et al. 2010). Na našich datech jsme tuto asociaci nemohli ověřit. Zjistili jsme, že tento SNP má signifikantní vliv na šířku oka (pravého), vzdálenost očí (od vnějších koutků) a na rozměr nasion-chelion. Tento SNP využil ve studii i Peng s kolektivem (2013), který odhalil jeho asociaci se vzdáleností koutku oka (vnějšího i vnitřního) a středem horního rtu. Tuto korelaci na našem souboru můžeme potvrdit, pokud nebudeme brát v potaz přesné umístění bodu na rtech, ve kterém se lišíme. Můžeme tedy usuzovat, že gen *ENPPI*, v němž je rs6569759 lokalizován, hraje v morfologii obličeje významnou roli.

Polymorfismus rs4648379 významně ovlivňuje rozměr pronasale-chelion levé strany a rozměr nasion-chelion levé strany. Tento SNP je ve studii Liu et al. (2012) a Shaffer et al. (2016) asociován se šířkou nosu, tento znak jsme však nemohli otestovat. Dle našich výsledků i tento SNP, který leží v genu *PRDMI6* ovlivňuje lidský obličej.

Některé polymorfismy by mohly ovlivňovat morfologii obličeje, nicméně na hladině významnosti 0,05 nemají signifikantní vliv. Jedná se o rs7559271 (*PAX3*) a pronasale-chelion P ( $p = 0,06747$ ), rs11726039 (*MSXI*) a šířka úst ( $p = 0,07020$ ). Náš předpoklad asociace polymorfismů a kraniofaciálních rozměrů se tedy potvrdil pouze v některých případech (Obr. 37). SNP rs11726039 je spojován s rozštěpy patra a rtu, z výsledků je možné usuzovat, že by tento polymorfismus mohl hrát roli i při normálním vývoji obličeje.

Oblast očí a nosu je dle mnoha studií silně geneticky podmíněna a hodnoty dědivosti dosahují hodnot až 0,8 (Johannsdottir et al. 2005; Djordjevic et al. 2016; Tsagkrasoulis et al. 2017). Fakt, že jsme nenašli mnoho asociací spojených se rty a

s oblastí brady, může být způsoben vyšším podílem jiných faktorů než genetických na vývoj této oblasti (Djordjevic et al. 2016) a také menším počtem landmarků pro tuto část obličeje.



**Obr. 37** - Nalezené asociace genetických variant a kraniofaciální morfologii

Čísly jsou znázorněny použité landmarky, zeleně jsou nalezené asociace rozměru s polymorfismem rs6569759, modře asociace znaku s polymorfismem rs4648379.

U asociačních studií, které se zabývají otázkou genotypu a fenotypu obličeje, je velkým nedostatkem nejednotnost získání morfologických dat. Existují studie, které využívají pouze fotografie, kde ztrácíme informaci o třetím rozměru (Ermakov et al. 2010; Boehringer et al. 2011; Liu et al. 2012), nebo používají skeny z magnetické rezonance (Boehringer et al. 2011; Liu et al. 2012) a mnoho dalších studií využívá 3D skeny obličejů (Paternoster et al. 2012; Peng et al. 2013). Mimo odlišnosti ve způsobu získání vzdáleností se liší také vybranými rozměry, které jsou zahrnovány do analýz, počtem landmarků i jejich způsobem zadávání, které může být manuální nebo s pomocí softwaru. Na celou práci má vliv i výběr polymorfismů jakožto genetických markerů a můžeme se domnívat, že se výsledky mohou lišit i mezi jednotlivými populacemi. Je proto velmi složité mezi sebou studie přímo porovnávat.

Oproti jiným studiím je nedostatkem naší práce bez pochyby velikost souboru, který tvoří 30 rodin (121 jedinců), a ta se tak nemůže rovnat celogenomovým studiím pracujících se stovkami až tisíci jedinci. Na druhou stranu dosavadní studie zabývající se touto tematikou mají ve svých souborech pouze nepříbuzné osoby. Jedinou studií, která se zabývá problematikou souvislosti genotypu a fenotypu lidského obličeje na rodinách, je dle našich informací pouze práce Ermakova (2010), a předkládaná práce je tak druhou prací, která se zabývá genotypem a fenotypem morfologie obličeje na rodinách. Obě práce jsou zároveň limitovány omezeným počtem studovaných polymorfismů.

U části výsledků, která se věnuje asociacím mezi genetickými markery a kraniofaciálními znaky, jsme nevyužili rodinných vztahů mezi jedinci. Výhodu rodinného modelu jsme využili při zjišťování míry korelace mezi rozměry obličeje dětí a rodičů. Pro zjištění přesné míry heritability jsou nejčastěji zkoumána dvojčata. U jednovaječných dvojčat, která jsou geneticky identická, můžeme odhadnout míru genetické podmíněnosti znaků. Míru dědivosti lze sledovat i na rodinách, kde můžeme zjistit vliv rodičů na potomky. Předpokládáme zde lineární závislost. Pearsonův korelační koeficient  $r$  dává informaci o síle korelace mezi skupinami. Nejsilnější korelace u dcer a matek vykazuje vzdálenost nasion-pogonion. Koeficient  $r$  dosahuje hodnoty 0,7280, což naznačuje výrazný vliv matky na tento rozměr. Pro porovnání ve dvojici dcera/otec má koeficient  $r$  hodnotu 0,2028. Ve dvojici dcera/otec má nejvyšší míru korelace rozměr exocanthion-pronasale L a šířka oka. U synů pozorujeme vyšší míru korelace s otci, a to u rozměrů: nasion-chelion L ( $r = 0,6084$ ), pronasale-chelion L, pronasale-pogonion, nasion-pronasale a šířka oka L ( $r = 0,4984$ ). Rozměr pronasale-chelion L vykazuje také vztah s rozměrem matky ( $r = 0,5251$ ). Zdá se, že oronasální oblast synů je více ovlivněna otci. U dcer koreluje výška obličeje (nasion-pogonion) s výškou obličeje matek.

Většina studií, které se zabývají těmito korelacemi nebo případně heritabilitou, jejíž hodnota se odráží od hodnot korelačního koeficientu, pracuje s kefalogramy (Johannsdottir et al. 2005; AlKhudhairi and AlKofide 2010), které nezohledňují měkké tkáně, a většina používaných vzdáleností souvisí s profilem lebky. Vzdálenosti použité v této práci jsou patrné při pohledu zepředu. Existují i takové práce zabývající se heritabilitou, které vychází z fotografií (Kim et al. 2013), případně z 3D skenů (Djordjevic et al. 2016; Tsagkrasoulis et al. 2017). Porovnání těchto studií je opět díky odlišným použitým

metodám problematické. Výsledky prezentované práce se částečně shodují s výstupy jiné studie (AlKhudhairi and AlKofide 2010). Korelační koeficient  $r$  u rozměrů ANS (anterior nasale spine) a menton v práci AlKhudhairi dosahuje hodnoty 0,744 u dvojice syn/otec, což se dá aproximovat na vzdálenost pronasale-pogonion studovanou v této práci. Shodujeme se také v tvrzení, že rozměry synů více korelují s charakteristikami otců, nicméně u rozměrů dcer jsou korelace s rozměry rodičů více vyrovnané (v souboru dat).

Dalším problémem ve srovnávání heritability, kromě zisku morfologických dat, je věk jedinců, hlavně tedy potomků. U dívek dochází k výrazným růstovým změnám v období 10-12 let, u chlapců pak v období 11-12 let (Tošovská 2016). I v období 12-15 let pozorujeme u dětí vlivem růstu změny v obličejí. U chlapců v tomto věku dochází ke zvýraznění nadočnicových oblouků, prominenci nosu, k posunu rtů dolů a také k oploštění tváří. U dívek se obličej rozšiřuje a pozorujeme změny v oblasti očí (Koudelová et al. 2015). V několika studiích zabývajících se heritabilitou kraniofaciálních znaků jsou děti ve věku, kdy ještě dochází k výrazným změnám v obličejí (Johannsdottir et al. 2005; Jelenkovic et al. 2010; Weinberg et al. 2013). Je pak otázkou, jak moc tyto změny ovlivní hodnoty heritability.

Tak jako je korelační koeficient odlišný u rodičů, i jejich příspěvky k výslednému fenotypu obličejí potomků nejsou u všech parametrů stejné. Rozměry související s pozicí a velikostí oka se co do příspěvku od matky či otce příliš neliší – jedná se o šířku oka, exocanthion-nasion a exocanthion-pronasale. Výjimkou je exocanthion-pronasale pravé strany u synů, nicméně spolehlivost koeficientu u otce je v tomto případě 0,087, což je nad hranicí 0,05 a nemůžeme tak této rovnici přikládat velký význam. U vzdálenosti očí pozorujeme opačné trendy u potomků – vzdálenost očí u dcer jsou ovlivněny hlavně vzdáleností očí matky, kdežto u synů otcem. U rozměru pronasale-chelion byly získány spolehlivé rovnice pouze u synů, kteří jsou u tohoto rozměru ovlivněni více rozměry matky nežli otcem. Naopak u rozměru nasion-chelion můžeme říci, že vliv rodičů na tento rozměr u dívek je vyrovnaný. U chlapců nemůžeme spolehlivě učinit žádný závěr. Rozměr nasion-pogonion je u dívek silně ovlivněn matkou, což naznačuje i Pearsonův korelační koeficient, který poukázal na vztah mezi dcerami a matkami u tohoto rozměru, jež můžeme označit také jako výšku obličejí. Příspěvek rodičů v případě synů je kolem 50 %.



Obdobně je tomu i u pronasale-pogonion. Šířka úst je v případě dcer ovlivněna matkami, u synů mají koeficienty hodnoty opět kolem 0,5.

Můžeme tedy tvrdit, že dítě není pouhým průměrem svých rodičů, ale u některých znaků vidíme odlišnosti co do příspěvku otce a matky. Nutno říci, že uvedené rovnice jsou normalizované, pro lepší představu příspěvku. Nesmíme opomenout fakt, že tyto hodnoty nejsou hodnotami heritability znaku a nelze tak říci, který ze znaků je více geneticky podmíněn a který je značně ovlivněn vnějším prostředím. K celkovému fenotypu dítěte kromě genetické informace rodičů přispívá velkou měrou také vnější prostředí, životní styl, společná domácnost a podobně.

K vícenásobným regresním analýzám byly také přidány informace o genotypu jedinců. Nevýhodou u těchto analýz je rozdělení souboru 30 rodin na dílčí části podle genotypu celé rodiny a nutnost vyřazení některých jedinců kvůli malému počtu subjektů ve skupinách (menší než 6). V předchozích analýzách jsme potvrdili, že pohlaví jedinců má významný vliv na projev určitého genotypu. Bohužel tento fakt jsme také nemohli do těchto analýz zahrnout kvůli malé četnosti ve skupině. Díky malému vzorku nebylo možné u těchto analýz dojít k výraznějším závěrům.

Je patrné, že problematika morfologie obličeje, jeho genetické podmíněnosti a dědivosti je velmi složitá a komplikovaná. V současné době se čím dál častěji publikují studie touto otázkou se zabývající, nicméně stále nemáme ucelenější představu o mechanismu vzniku takové variability, kterou pozorujeme u lidského obličeje. Jedním z problémů je vůbec samotné vytipování genů, které by mohly mít na morfologii obličeje vliv. GWAS často nacházejí polymorfismy, které jsou v blízkosti genů, jejichž funkce není známa nebo nemáme informace, které by vysvětlovaly důvod vlivu tohoto genu. Oproti tomu často geny, u kterých bychom naopak vliv na morfologii obličeje očekávali, nejeví žádný vztah, takovým příkladem je gen *SHH*. Jeho vliv na vývoj kraniofaciálních struktur je prokázáný (Pan et al. 2013; Kurosaka 2015), ale v žádné z celogenomových studií, dle našich informací, nebyl potvrzen. Nemáme představu o všech dějích, které nastávají během vývoje obličeje, ani o interakcích mezi molekulami. Zmiňovali jsme, že můžeme předpokládat aditivní model dědičnosti, který je velmi častý u multifaktoriálních znaků. To

ale nemusí být případ u tak komplexní organizované struktury, jakou je obličej. Velkou roli budou jistě hrát i epistatické interakce (Hallgrimsson et al. 2014). Takovým příkladem může být methylace DNA. Její vzor se liší i u monozygotních dvojčat, která jsou geneticky identická, a liší se i mezi pohlavími, a to u genů na autozomech i gonosomech (Watanabe et al. 2016). Tyto epigenetické mechanismy, kam mimo metylaci DNA řadíme modifikaci histonů, různé proteinové komplexy, které se váží na chromatin, nebo siRNA (RNA interference), mají vliv na expresi genů. Genetická variabilita mezi jedinci vysvětluje pouze malé procento z celkové variability genové exprese. Vliv na tyto mechanismy má i věk jedince, jeho životní styl (výživa, stres, fyzická aktivita, pobyt na denním světle, vystavení toxinům, kouření a socio-ekonomické faktory). Tyto změny probíhají na mnoha úrovních od bodových polymorfismů až po prostorové změny nukleosomu. Otázkou zůstává, jak tyto změny ovlivňují výsledný fenotyp (Ecker et al. 2017).

## 6 Závěr

Tato diplomová práce vznikla jako jedna ze dvou pilotních studií společného projektu Laboratoře 3D zobrazovacích a analytických metod a Laboratoře molekulární antropologie Katedry antropologie a genetiky člověka. V rámci předkládané práce jsme určili pomocí metod SNaPshot a RFLP genotyp 9 jednonukleotidových polymorfismů u členů 30 rodin (121 jedinců). Vypočítali jsme frekvenci alel a genotypů, spočetli HW rovnováhu a vazebnou nerovnováhu. Jeden polymorfismus nesplnil podmínky HW rovnováhy a 3 dvojice polymorfismů jsou spolu ve vazbě. Genetická data spolu s morfologickými, která byla získána ve spolupráci s Laboratoří 3D zobrazovacích a analytických metod, jsme vyhodnotili a dospěli k následujícím závěrům:

- Polymorfismus rs6569759 ovlivňuje šířku oka ( $p = 0,00097$  pravé oko, respektive  $0,00173$  levé oko). Pozorujeme výrazné rozdíly v účinku genotypu mezi pohlavími. Genotyp CC je u žen odpovědný za širší oči, kdežto u mužů způsobuje oči užší.
- Polymorfismus rs6569759 ovlivňuje vzdálenost očí ( $p = 0,03196$ ). Rozdíl mezi muži a ženami nastává zejména u genotypu CC – u žen způsobuje větší vzdálenost, u mužů menší.
- Polymorfismus rs4648379 ovlivňuje rozměr pronasale-chelion levé strany ( $p = 0,03313$ ). Trendy účinku genotypů se shodují u obou pohlaví.
- Polymorfismus rs6569759 ovlivňuje rozměr nasion-chelion ( $p = 0,01762$ ). U žen i mužů pozorujeme obdobný trend vlivu genotypu.
- Polymorfismus rs4648379 ovlivňuje rozměr nasion-chelion ( $p = 0,02624$ ). V tomto případě pozorujeme odlišné trendy mezi pohlavími.
- Příspěvky rodičů k výslednému fenotypu dítěte se mohou lišit mezi syny a dcerami i mezi jednotlivými parametry. Například u šířky oka nepozorujeme rozdíly mezi pohlavími ani mezi příspěvky matky a otce, které se pohybují kolem 50 %. Oproti tomu vzdálenost očí synů je ovlivněna otcem (65 %), u dcer naopak výrazněji ovlivňují rozměr matky (63%).

- Na základě studia korelací mezi dvojicí potomek/rodič lze říct, že výška obličeje dcer významně koreluje s výškou obličeje matek ( $r = 0,7280$ ). Zjistili jsme, že obecně rozměry synů a otců korelují více než s rozměry matek. U dcer je situace vyrovnanější.
- Aplikace genetických variant studovaných v této práci nevedla k objasnění dědičnosti parametrů obličeje ve vztahu ke genotypu.

## 7 Seznam použitých zkratk

A	adenin
ALX	ALX Homeoboxové geny
BCL3	regulátor apoptózy 3; Apoptosis Regulator 3
BMI	body mass index
BMP (př. BMP2)	kostní morfogenetický protein; Bone Morphogenetic Protein
bp	páry bází
C	cytosin
C5orf50	Chromosome 5 open reading frame 50
CACNA2D3	Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha2 Delta 3
CCDC26	CCDC26 Long Non-Coding RNA
CEBP	CCAAT/enhancer binding protein
COL17A1	kolagen typu XVII, $\alpha 1$
CS	centroid size
Cyp26	rodina cytochromů P450; Cytochrome P450 Family 26
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
DHH	protein Desert Hedgehog
DCHS2	Dachshous Cadherin-Related 2
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotridfosfát
DZ	dizygotní (dvouvaječná) dvojčata
EDAR	Ectodysplasin A Receptor

EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ENPP1	Ectonucleotide Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase 1
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
FGF (př. FGF8)	fibroblastový růstový faktor; Fibroblast Growth Factor
FGFR (př. FGFR1)	receptor pro fibroblastový růstový faktor; Fibroblast Growth Factor Receptor
FNP	frontonasální výběžek
FREM1	FRAS1 Related Extracellular Matrix 1
G	guanin
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GHR	receptor růstového hormonu; Growth Hormone Receptor
GLI3	GLI (Glioma-Associated Oncogene) Family Zinc Finger 3
GREM1	Gremlin 1, DAN Family BMP Antagonist
GWAS	celogenomová asociační studie
H <sup>2</sup>	dědivost, heritability
HDAC8	Histone Deacetylase 8
HH	proteiny HedgeHog
HOX	homeoboxové geny
IHH	protein Indian Hedgehog
IRF6	interferon regulující faktor; Interferon Regulatory Factor
K	lysin nebo konkordance
L (př. šířka oka L)	levá strana (př. šířka levého oka)
LD	vazebná nerovnováha (Linkage Disequilibrium)
LEF1	Lymphoid Enhancer Binding Factor 1

LNP	laterální nasální výběžek
LRLN	vazebná nerovnováha mezi vzdálenými lokusy (Long Range Linkage Disequilibrium)
MAFB	MAF (Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma) BZIP Transcription Factor B
MAP	mitogenem aktivované proteinkinázy; Mitogen-Activated Protein
Md	mandibulární výběžek
MIPOL1	Mirror-Image Polydactyly 1
MNP	mediální nasální výběžek
MSX1	Msh Homeobox 1
Mx	maxilární výběžek
MYF5	Myogenic Factor 5
MyoD	myogenní regulační faktor; Myogenic Differentiation
MZ	monozygotní (jednovaječná) dvojčata
OMIM	databáze dědičných onemocnění člověka; Online Mendelian Inheritance in Man
P	fosfát
P (př. šířka oka P)	pravá strana (př. šířka pravého oka)
PARK2	Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase
PAX (př. PAX1)	pair box geny (př. Pair Box 1)
PCR	polymerázová řetězová reakce; Polymerase Chain Reaction
PITX2	Paired Like Homeodomain 2
PP	pyrofosfát
PRDM16	PR/SET Domain 16

PRKCE	Protein Kinase C Epsilon
Q	glutamin
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů; Restriction Fragment Length Polymorphism
RUNX2	Runt Related Transcription Factor 2
SAP	enzym Shrimp Alkaline Phosphatase
SFRP2	Secreted Frizzled Related Protein 2
SHH	protein Sonic Hedgehog
SKI	SKI Proto-Oncogene
SLC17A8	Solute Carrier Family 17 Member 8
SNP	jednonukleotidový/bodový polymorfismus; Single Nucleotide Polymorphism
SOX9	geny obsahující SRY box 9
SRY	pohlaví determinující region Y; Sex determining Region Y
T	thymin
TBE	tris-borátový pufr
TBX	T-box geny
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
TP63	nádorový protein 63; Tumor Protein 63
UV	ultrafialové záření
WNT	Wingless-Type MMTV (mouse mammary tumor virus) Integration Site Family



## 8 Seznam použité literatury

- “1000 Genomes | A Deep Catalog of Human Genetic Variation.” n.d. Accessed November 22, 2017. <http://www.internationalgenome.org/>.
- Adhikari, Kaustubh, Macarena Fuentes-Guajardo, Mirsha Quinto-Sánchez, Javier Mendoza-Revilla, Juan Camilo Chacón-Duque, Victor Acuña-Alonzo, Claudia Jaramillo, et al. 2016. “A Genome-Wide Association Scan Implicates DCHS2, RUNX2, GLI3, PAX1 and EDAR in Human Facial Variation.” *Nature Communications* 7 (May):11616. <https://doi.org/10.1038/ncomms11616>.
- Adhikari, Kaustubh, Guillermo Reales, Andrew J. P. Smith, Esra Konka, Jutta Palmén, Mirsha Quinto-Sánchez, Victor Acuña-Alonzo, et al. 2015. “A Genome-Wide Association Study Identifies Multiple Loci for Variation in Human Ear Morphology.” *Nature Communications* 6 (June):7500. <https://doi.org/10.1038/ncomms8500>.
- Al-Gazali, L. I., M. Bakir, O. A. Hamud, and S. Gerami. 2002. “An Autosomal Recessive Syndrome of Nasal Anomalies Associated with Renal and Anorectal Malformations.” *Clinical Dysmorphology* 11 (1):33–38.
- AlKhudhairi, Tina D., and Eman A. AlKofide. 2010. “Cephalometric Craniofacial Features in Saudi Parents and Their Offspring.” *The Angle Orthodontist* 80 (6):1010–1017.
- “ALX3 Gene - GeneCards | ALX3 Protein | ALX3 Antibody.” Accessed October 10, 2017. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ALX3&keywords=alx3>.
- Bailey, C. M., D. E. Abbott, N. V. Margaryan, Z. Khalkhali-Ellis, and M. J. C. Hendrix. 2008. “Interferon Regulatory Factor 6 Promotes Cell Cycle Arrest and Is Regulated by the Proteasome in a Cell Cycle-Dependent Manner.” *Molecular and Cellular Biology* 28 (7):2235–43. <https://doi.org/10.1128/MCB.01866-07>.
- Beleza, Sandra, Nicholas A. Johnson, Sophie I. Candille, Devin M. Absher, Marc A. Coram, Jailson Lopes, Joana Campos, et al. 2013. “Genetic Architecture of Skin and Eye Color in an African-European Admixed Population.” Edited by Richard A. Spritz. *PLoS Genetics* 9 (3):e1003372. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003372>.
- Bennett, J. H., P. Hunt, and P. Thorogood. 1995. “Bone Morphogenetic Protein-2 and -4 Expression during Murine Orofacial Development.” *Archives of Oral Biology* 40 (9):847–54.
- Birnbaum, Stefanie, Kerstin U. Ludwig, Heiko Reutter, Stefan Herms, Nilma A. De Assis, Amalia Diaz-Lacava, Sandra Barth, et al. 2009. “IRF6 Gene Variants in Central European Patients with Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate.” *European Journal of Oral Sciences* 117 (6):766–769.
- Birnbaum, Stefanie, Kerstin U. Ludwig, Heiko Reutter, Stefan Herms, Michael Steffens, and Michele Rubini. 2009. “Key Susceptibility Locus for Nonsyndromic Cleft Lip

- with or without Cleft Palate on Chromosome 8q24.” *Nature Genetics* 41 (4):473–77. <https://doi.org/10.1038/ng.333>.
- Birrane, Gabriel, Aditi Soni, and John A. A. Ladias. 2009. “Structural Basis for DNA Recognition by the Human PAX3 Homeodomain.” *Biochemistry* 48 (6):1148–55. <https://doi.org/10.1021/bi802052y>.
- Bjork, Bryan C., Annick Turbe-Doan, Mary Prysak, Bruce J. Herron, and David R. Beier. 2010. “Prdm16 Is Required for Normal Palatogenesis in Mice.” *Human Molecular Genetics* 19 (5):774–89. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp543>.
- Boehringer, Stefan, Fedde van der Lijn, Fan Liu, Manuel Günther, Stella Sinigerova, Stefanie Nowak, Kerstin U. Ludwig, et al. 2011. “Genetic Determination of Human Facial Morphology: Links between Cleft-Lips and Normal Variation.” *European Journal of Human Genetics* 19 (11):1192–1197.
- Boomsma, Dorret, Andreas Busjahn, and Leena Peltonen. 2002. “Classical Twin Studies and Beyond.” *Nature Reviews Genetics* 3 (11):872–82. <https://doi.org/10.1038/nrg932>.
- Brown, J. M., S. E. Wedden, G. H. Millburn, L. G. Robson, R. E. Hill, D. R. Davidson, and C. Tickle. 1993. “Experimental Analysis of the Control of Expression of the Homeobox-Gene Msx-1 in the Developing Limb and Face.” *Development* 119 (1):41–48.
- Busch, C. P., and R. A. Hegele. 2001. “Genetic Determinants of Type 2 Diabetes Mellitus.” *Clinical Genetics* 60 (4):243–254.
- Candille, Sophie I., Devin M. Absher, Sandra Beleza, Marc Bauchet, Brian McEvoy, Nanibaa’ A. Garrison, Jun Z. Li, et al. 2012. “Genome-Wide Association Studies of Quantitatively Measured Skin, Hair, and Eye Pigmentation in Four European Populations.” Edited by Nicholas John Timpson. *PLoS ONE* 7 (10):e48294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048294>.
- Carels, Carine, Nathalie Van Cauwenberghe, I. Savoye, Guy Willems, Ruth Loos, Cathérine Derom, and Robert Vlietinck. 2001. “A Quantitative Genetic Study of Cephalometric Variables in Twins.” *Clinical Orthodontics and Research* 4 (3):130–140.
- Čihák, Radomír. 1988. *Anatomie*. 3rd ed. Praha: Avicenum.
- Claes, Peter, Denise K. Liberton, Katleen Daniels, Kerri Matthes Rosana, Ellen E. Quillen, Laurel N. Pearson, Brian McEvoy, et al. 2014. “Modeling 3D Facial Shape from DNA.” *PLoS Genet* 10 (3):e1004224.
- Claes, Peter, and Mark D. Shriver. 2016. “New Entries in the Lottery of Facial GWAS Discovery.” Edited by Gregory S. Barsh. *PLOS Genetics* 12 (8):e1006250. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006250>.
- Cole, Joanne B., Mange Manyama, Jacinda R. Larson, Denise K. Liberton, Tracey M. Ferrara, Sheri L. Riccardi, Mao Li, et al. 2017. “Human Facial Shape and Size Heritability and Genetic Correlations.” *Genetics* 205 (2):967–78. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.193185>.

- Coleman, S., A. Saboeiro, and R. Sengelmann. 2009. "A Comparison of Lipoatrophy and Aging: Volume Deficits in the Face." *Aesthetic Plastic Surgery* 33 (1):14–21. <https://doi.org/10.1007/s00266-008-9258-z>.
- Constant, Marion, Romain Nicot, Alexandre R. Vieira, Gwenael Raoul, James J. Sciote, and Joel Ferri. 2017. "Condylar Geometry Variation Is Associated with ENPP1 Variant in a Population of Patients with Dento-Facial Deformities." *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 45 (6):826–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.02.020>.
- Coussens, Anna K., and Angela van Daal. 2005. "Linkage Disequilibrium Analysis Identifies an FGFR1 Haplotype-Tag SNP Associated with Normal Variation in Craniofacial Shape." *Genomics* 85 (5):563–73. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.02.002>.
- "DCHS2 Gene - GeneCards | PCD23 Protein | PCD23 Antibody." Accessed October 9, 2017. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DCHS2&keywords=DCHS2>.
- Dell Inc. 2016. Dell Statistica (data analysis software system), version 13. [software.dell.com](http://software.dell.com).
- Djordjevic, Jelena, Alexei I. Zhurov, Stephen Richmond, Visigen Consortium, and others. 2016. "Genetic and Environmental Contributions to Facial Morphological Variation: A 3D Population-Based Twin Study." *PloS One* 11 (9):e0162250.
- Donnelly, Peter. 2008. "Progress and Challenges in Genome-Wide Association Studies in Humans." *Nature* 456 (7223):728–31. <https://doi.org/10.1038/nature07631>.
- Ecker, Simone, Vera Pancaldi, Alfonso Valencia, Stephan Beck, and Dirk S. Paul. 2017. "Epigenetic and Transcriptional Variability Shape Phenotypic Plasticity." *BioEssays*, December, 1700148. <https://doi.org/10.1002/bies.201700148>.
- Ermakov, Sergey, Michael G. Rosenbaum, Ida Malkin, and Gregory Livshits. 2010. "Family-Based Study of Association between ENPP1 Genetic Variants and Craniofacial Morphology." *Annals of Human Biology* 37 (6):754–66. <https://doi.org/10.3109/03014461003639231>.
- Excoffier, Laurent, and Heidi E. L. Lischer. 2010. "Arlequin Suite Ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows." *Molecular Ecology Resources* 10 (3):564–67. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>.
- Eytan, Ori, Fanny Morice-Picard, Ofer Sarig, Khaled Ezzedine, Ofer Isakov, Qiaoli Li, Akemi Ishida-Yamamoto, et al. 2013. "Cole Disease Results from Mutations in ENPP1." *The American Journal of Human Genetics* 93 (4):752–57. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.08.007>.
- "FGFR1 Gene - GeneCards | FGFR1 Protein | FGFR1 Antibody." Accessed June 16, 2017. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FGFR1&keywords=C8orf86>.
- "GHR Gene - GeneCards | GHR Protein | GHR Antibody." Accessed November 13, 2017. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GHR&keywords=ghr>.

- Gómez-Valdés, Jorge A., Tábita Hünemeier, Verônica Contini, Victor Acuña-Alonzo, Gastón Macin, Mónica Ballesteros-Romero, Pau Corral, et al. 2013. “Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) Variants and Craniofacial Variation in Amerindians and Related Populations.” *American Journal of Human Biology* 25 (1):12–19.
- Graf, Daniel, Zeba Malik, Satoru Hayano, and Yuji Mishina. 2016. “Common Mechanisms in Development and Disease: BMP Signaling in Craniofacial Development.” *Cytokine & Growth Factor Reviews* 27 (February):129–39. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.11.004>.
- “GREM1 Gene - GeneCards | GREM1 Protein | GREM1 Antibody.” Accessed June 22, 2017. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GREM1&keywords=GREM1>.
- Guo, Jing, Jingze Tan, Yajun Yang, Hang Zhou, Sile Hu, Agu Hashan, Nurmamat Bahaxar, et al. 2014. “Variation and Signatures of Selection on the Human Face.” *Journal of Human Evolution* 75 (October):143–52. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.08.001>.
- Gurramkonda, Venkatesh Babu, Altaf Hussain Syed, Jyotsna Murthy, and Bhaskar V.K.S. Lakkakula. 2015. “Evidence of the Involvement of the Polymorphisms near MSX1 Gene in Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate.” *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 79 (7):1081–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2015.04.034>.
- Hajjawi, Mark O.R., Vicky E. MacRae, Carmen Huesa, Alan Boyde, José Luis Millán, Timothy R. Arnett, and Isabel R. Orriss. 2014. “Mineralisation of Collagen Rich Soft Tissues and Osteocyte Lacunae in Enpp1<sup>-/-</sup> Mice.” *Bone* 69 (December):139–47. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.09.016>.
- Hallgrímsson, Benedikt, Washington Mio, Ralph S. Marcucio, and Richard Spritz. 2014. “Let’s Face It—complex Traits Are Just Not That Simple.” *PLoS Genet* 10 (11):e1004724.
- Han, Jiali, Peter Kraft, Hongmei Nan, Qun Guo, Constance Chen, Abrar Qureshi, Susan E. Hankinson, et al. 2008. “A Genome-Wide Association Study Identifies Novel Alleles Associated with Hair Color and Skin Pigmentation.” *PLoS Genetics* 4 (5):e1000074. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000074>.
- Harmey, Dymrna, Lovisa Hessle, Sonoko Narisawa, Kristen A. Johnson, Robert Terkeltaub, and José Luis Millán. 2004. “Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank.” *The American Journal of Pathology* 164 (4):1199–1209.
- “HDAC8 Gene - GeneCards | HDAC8 Protein | HDAC8 Antibody.” Accessed October 10, 2017. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HDAC8&keywords=HDAC8>.
- He, Huiyu, Xue Mi, Jiayu Zhang, Qin Zhang, Yuan Yao, Xu Zhang, Feng Xiao, Chunping Zhao, and Shutao Zheng. 2017. “Correlation between Facial Morphology and Gene Polymorphisms in the Uygur Youth Population.” *Oncotarget* 8 (17):28750.

- Hu, Diane, Nathan M. Young, Xin Li, Yanhua Xu, Benedikt Hallgrímsson, and Ralph S. Marcucio. 2015. "A Dynamic Shh Expression Pattern, Regulated by SHH and BMP Signaling, Coordinates Fusion of Primordia in the Amniote Face." *Development (Cambridge, England)* 142 (3):567–74. <https://doi.org/10.1242/dev.114835>.
- Hu, Diane, Nathan M. Young, Qiuping Xu, Heather Jamniczky, Rebecca M. Green, Washington Mio, Ralph S. Marcucio, and Benedikt Hallgrímsson. 2015. "Signals from the Brain Induce Variation in Avian Facial Shape." *Developmental Dynamics* 244 (9):1133–1143.
- Hubbe, Mark, Tsunehiko Hanihara, and Katerina Harvati. 2009. "Climate Signatures in the Morphological Differentiation of Worldwide Modern Human Populations." *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 292 (11):1720–33. <https://doi.org/10.1002/ar.20976>.
- Hughes, S. E. 1997. "Differential Expression of the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Multigene Family in Normal Human Adult Tissues." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 45 (7):1005–19. <https://doi.org/10.1177/002215549704500710>.
- Iseki, S., A. O. Wilkie, and G. M. Morriss-Kay. 1999. "Fgfr1 and Fgfr2 Have Distinct Differentiation- and Proliferation-Related Roles in the Developing Mouse Skull Vault." *Development (Cambridge, England)* 126 (24):5611–20.
- Jelenkovic, Aline, Alaitz Poveda, Charles Susanne, and Esther Rebato. 2008. "Contribution of Genetics and Environment to Craniofacial Anthropometric Phenotypes in Belgian Nuclear Families." *Human Biology* 80 (6):637–54. <https://doi.org/10.3378/1534-6617-80.6.637>.
- . 2010. "Common Genetic and Environmental Factors among Craniofacial Traits in Belgian Nuclear Families: Comparing Skeletal and Soft-Tissue Related Phenotypes." *HOMO - Journal of Comparative Human Biology* 61 (3):191–203. <https://doi.org/10.1016/j.jchb.2009.10.003>.
- Johannsdottir, Berglind, Freyr Thorarínsson, Arni Thordarson, and Thordur Eydal Magnússon. 2005. "Heritability of Craniofacial Characteristics between Parents and Offspring Estimated from Lateral Cephalograms." *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 127 (2):200–207. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2004.07.033>.
- Johnson, Kristen, Allison Moffa, Ying Chen, Kenneth Pritzker, James Goding, and Robert Terkeltaub. 1999. "Matrix Vesicle Plasma Cell Membrane Glycoprotein-1 Regulates Mineralization by Murine Osteoblastic MC3T3 Cells." *Journal of Bone and Mineral Research* 14 (6):883–892.
- Jones, Kenneth Lyons, Marilyn Crandall Jones, and Miguel del Campo. 2013. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation*. 7th ed. Elsevier Saunders.
- Kaiser, Frank J., Morad Ansari, Diana Braunholz, María Concepción Gil-Rodríguez, Christophe Decroos, Jonathan J. Wilde, Christopher T. Fincher, et al. 2014. "Loss-of-Function HDAC8 Mutations Cause a Phenotypic Spectrum of Cornelia de Lange Syndrome-like Features, Ocular Hypertelorism, Large Fontanelle and X-Linked

- Inheritance.” *Human Molecular Genetics* 23 (11):2888–2900.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu002>.
- Kamnasaran, Deepak, Patricia C. O’Brien, Elaine H. Zackai, Maximilian Muenke, Malcolm A. Ferguson-Smith, and Diane W. Cox. 2003. “Rearrangement in the PITX2 and MIPOL1 Genes in a Patient with a t(4;14) Chromosome.” *European Journal of Human Genetics: EJHG* 11 (4):315–24.  
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200963>.
- Kim, Hyun-Jin, Sun-Wha Im, Ganchimeg Jargal, Siwoo Lee, Jae-Hyuk Yi, Jeong-Yeon Park, Joon Sung, et al. 2013. “Heritabilities of Facial Measurements and Their Latent Factors in Korean Families.” *Genomics & Informatics* 11 (2):83.  
<https://doi.org/10.5808/GI.2013.11.2.83>.
- Koch, Evan, Mickey Ristroph, and Mark Kirkpatrick. 2013. “Long Range Linkage Disequilibrium across the Human Genome.” *PLoS ONE* 8 (12).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080754>.
- Kohoutová, Milada. 2012. *Lékařská Biologie a Genetika (II. Díl)*. Karolinum.
- Koudelová, Jana, Ján Dupej, Jaroslav Brůžek, Petr Sedlak, and Jana Velemínská. 2015. “Modelling of Facial Growth in Czech Children Based on Longitudinal Data: Age Progression from 12 to 15 Years Using 3D Surface Models.” *Forensic Science International* 248 (March):33–40. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.12.005>.
- Kousa, Youssef A., and Brian C. Schutte. 2016. “Toward an Orofacial Gene Regulatory Network: Toward an Orofacial Gene Regulatory Network.” *Developmental Dynamics* 245 (3):220–32. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24341>.
- Krasone, Kristīne, Baiba Lāce, Ilze Akota, Rūta Care, Kathleen Deeley, Erika C. Kuchler, and Alexandre R. Vieira. 2014. “IRF6 AP-2a Binding Site Promoter Polymorphism Is Associated with Oral Clefts in Latvia.” *Stomatologija* 16 (4):132–6.
- Kudoh, Tetsuhiro, Miguel L. Concha, Corinne Houart, Igor B. Dawid, and Stephen W. Wilson. 2004. “Combinatorial Fgf and Bmp Signalling Patterns the Gastrula Ectoderm into Prospective Neural and Epidermal Domains.” *Development (Cambridge, England)* 131 (15):3581–92. <https://doi.org/10.1242/dev.01227>.
- Kurosaka, Hiroshi. 2015. “The Roles of Hedgehog Signaling in Upper Lip Formation.” *BioMed Research International* 2015:1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/901041>.
- Kurosaka, Hiroshi, Angelo Iulianella, Trevor Williams, and Paul A. Trainor. 2014. “Disrupting Hedgehog and WNT Signaling Interactions Promotes Cleft Lip Pathogenesis.” *Journal of Clinical Investigation* 124 (4):1660–71.  
<https://doi.org/10.1172/JCI72688>.
- Lace, Baiba, Inga Kempa, Janis Klovinis, Janis Stavusis, Astrida Krumina, Ilze Akota, Biruta Barkane, et al. 2012. “BCL3 Gene Role in Facial Morphology.” *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 94 (11):918–24.  
<https://doi.org/10.1002/bdra.23085>.
- Laue, Kathrin, Hans-Martin Pogoda, Philip B. Daniel, Arie van Haeringen, Yasemin Alanay, Simon von Ameln, Martin Rachwalski, et al. 2011. “Craniosynostosis and Multiple Skeletal Anomalies in Humans and Zebrafish Result from a Defect in the

- Localized Degradation of Retinoic Acid.” *The American Journal of Human Genetics* 89 (5):595–606. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.09.015>.
- Lee, Myoung Keun, John R. Shaffer, Elizabeth J. Leslie, Ekaterina Orlova, Jenna C. Carlson, Eleanor Feingold, Mary L. Marazita, and Seth M. Weinberg. 2017. “Genome-Wide Association Study of Facial Morphology Reveals Novel Associations with *FREM1* and *PARK2*.” Edited by Yun Li. *PLOS ONE* 12 (4):e0176566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176566>.
- Leoyklang, P., P. Siriwan, and V. Shotelersuk. 2006. “A Mutation of the *P63* Gene in Non-Syndromic Cleft Lip.” *Journal of Medical Genetics* 43 (6):e28. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.036442>.
- Liu, Fan, Fedde van der Lijn, Claudia Schurmann, Gu Zhu, M. Mallar Chakravarty, Pirro G. Hysi, Andreas Wollstein, et al. 2012. “A Genome-Wide Association Study Identifies Five Loci Influencing Facial Morphology in Europeans.” Edited by Greg Gibson. *PLoS Genetics* 8 (9):e1002932. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002932>.
- Liu, Fan, Mijke Visser, David L. Duffy, Pirro G. Hysi, Leonie C. Jacobs, Oscar Lao, Kaiyin Zhong, et al. 2015. “Genetics of Skin Color Variation in Europeans: Genome-Wide Association Studies with Functional Follow-Up.” *Human Genetics* 134 (8):823–35. <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1559-0>.
- “MAFB Gene - GeneCards | MAFB Protein | MAFB Antibody.” Accessed October 10, 2017. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAFB&keywords=mafb>.
- Martínez, Víctor G., Rosa Sacedón, Laura Hidalgo, Jaris Valencia, Lidia M. Fernández-Sevilla, Carmen Hernández-López, Angeles Vicente, and Alberto Varas. 2015. “The BMP Pathway Participates in Human Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Activation and Homeostasis.” Edited by Jon C.D. Houtman. *PLOS ONE* 10 (6):e0131453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131453>.
- Martínez-Abadías, Neus, Mireia Esparza, Torstein Sjøvold, Rolando González-José, Mauro Santos, and Miquel Hernández. 2009. “Heritability of Human Cranial Dimensions: Comparing the Evolvability of Different Cranial Regions.” *Journal of Anatomy* 214 (1):19–35. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.01015.x>.
- Miller, Steven F., Seth M. Weinberg, Nichole L. Nidey, David K. Defay, Mary L. Marazita, George L. Wehby, and Lina M. Moreno Uribe. 2014. “Exploratory Genotype-Phenotype Correlations of Facial Form and Asymmetry in Unaffected Relatives of Children with Non-Syndromic Cleft Lip and/or Palate.” *Journal of Anatomy* 224 (6):688–709. <https://doi.org/10.1111/joa.12182>.
- Mishina, Yuji, and Taylor Nicholas Snider. 2014. “Neural Crest Cell Signaling Pathways Critical to Cranial Bone Development and Pathology.” *Experimental Cell Research* 325 (2):138–47. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.019>.
- Moore, Keith L., T. V. N. Persaud, and Mark G. Torchia. 2016. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 10th edition. Philadelphia, PA: Elsevier.
- Morlon, Aurore, Arnold Munnich, and Asma Smahi. 2005. “TAB2, TRAF6 and TAK1 Are Involved in NF-KappaB Activation Induced by the TNF-Receptor, Edar and Its

- Adaptator Edaradd.” *Human Molecular Genetics* 14 (23):3751–57.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi405>.
- Mostowska, Adrianna, Kamil K. Hozyasz, Piotr Wojcicki, Barbara Biedziak, Patrycja Paradowska, and Pawel P. Jagodzinski. 2010. “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 Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 88 (7):538–45.  
<https://doi.org/10.1002/bdra.20687>.
- Mostowska, Adrianna, Kamil K. Hozyasz, Piotr Wójcicki, Kacper Żukowski, Anna Dąbrowska, Agnieszka Lasota, Małgorzata Zadurska, Agnieszka Radomska, Izabela Dunin-Wilczyńska, and Paweł P. Jagodziński. 2015. “Association between Polymorphisms at the GREM1 Locus and the Risk of Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in the Polish Population.” *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 103 (10):847–56.  
<https://doi.org/10.1002/bdra.23391>.
- Muenke, M., U. Schell, A. Hehr, N. H. Robin, H. W. Losken, A. Schinzel, L. J. Pulleyn, P. Rutland, W. Reardon, and S. Malcolm. 1994. “A Common Mutation in the Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene in Pfeiffer Syndrome.” *Nature Genetics* 8 (3):269–74. <https://doi.org/10.1038/ng1194-269>.
- Mydlová, Miriama, Ján Dupej, Jana Koudelová, and Jana Velemínská. 2015. “Sexual Dimorphism of Facial Appearance in Ageing Human Adults: A Cross-Sectional Study.” *Forensic Science International* 257 (December):519.e1-519.e9.  
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.09.008>.
- Nakajima, Hideaki, Miyuki Ito, Yoshihiro Morikawa, Tadasuke Komori, Yumi Fukuchi, Fumi Shibata, Shinichiro Okamoto, and Toshio Kitamura. 2009. “Wnt Modulators, SFRP-1, and SFRP-2 Are Expressed in Osteoblasts and Differentially Regulate Hematopoietic Stem Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390 (1):65–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.067>.
- Namkoong, Hong, Seung Min Shin, Hyun Kee Kim, Seon-Ah Ha, Goang Won Cho, Soo Young Hur, Tae Eung Kim, and Jin Woo Kim. 2006. “The Bone Morphogenetic Protein Antagonist Gremlin 1 Is Overexpressed in Human Cancers and Interacts with YWHAH Protein.” *BMC Cancer* 6 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-74>.
- Nassif, Ali, Ibtisam Senussi, Fleur Meary, Sophia Loiodice, Dominique Hotton, Benoît Robert, Morad Bensidhoum, Ariane Berdal, and Sylvie Babajko. 2014. “Msx1 Role in Craniofacial Bone Morphogenesis.” *Bone* 66 (September):96–104.  
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.003>.
- Norton, Heather L., Melissa Edwards, S. Krithika, Monique Johnson, Elizabeth A. Werren, and Esteban J. Parra. 2016. “Quantitative Assessment of Skin, Hair, and Iris Variation in a Diverse Sample of Individuals and Associated Genetic Variation.” *American Journal of Physical Anthropology* 160 (4):570–81.  
<https://doi.org/10.1002/ajpa.22861>.



- “Nucleotide BLAST: Search Nucleotide Databases Using a Nucleotide Query.” Accessed May 9, 2017.  
[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).
- Nussbaum, Robert L., Roderick R. McInnes, and Huntington F. Willard. 2004. *Klinická Genetika*. Praha: Triton.
- “OligoAnalyzer 3.1.” Integrated DNA Technologies. Accessed May 9, 2017.  
<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>.
- “OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man.” Accessed October 5, 2017.  
<https://www.omim.org/>.
- “OMIM Gene Map Statistics.” Accessed October 4, 2017.  
<https://www.omim.org/statistics/geneMap>.
- Ornitz, David M., and Pierre J. Marie. 2015. “Fibroblast Growth Factor Signaling in Skeletal Development and Disease.” *Genes & Development* 29 (14):1463–1486.
- Otová, Berta, Milada Kohoutová, and Aleš Panczak. 2008. *Lékařská Biologie a Genetika (I. Díl)*. Praha: Karolinum.
- Otová, Berta, Romana Mihalová, and Jiří Vymlátíl. 2006. *I. Základy Biologie a Genetiky, II. Vývoj a Růst Člověka*. Praha: Karolinum.
- Pan, Angel, Le Chang, Alan Nguyen, and Aaron W. James. 2013. “A Review of Hedgehog Signaling in Cranial Bone Development.” *Frontiers in Physiology* 4.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00061>.
- Park, Kyoungsook, Kwangbae Kim, Seung Bae Rho, Kyusam Choi, Dojin Kim, Sun-Hee Oh, Jinhee Park, Seung-Hoon Lee, and Je-Ho Lee. 2005. “Homeobox Msx1 Interacts with P53 Tumor Suppressor and Inhibits Tumor Growth by Inducing Apoptosis.” *Cancer Research* 65 (3):749–757.
- Passos-Bueno, M. R., W. R. Wilcox, E. W. Jabs, A. L. Sertie, L. G. Alonso, and H. Kitoh. 1999. “Clinical Spectrum of Fibroblast Growth Factor Receptor Mutations.” *Human Mutation* 14 (2):115.
- Paternoster, Lavinia, Alexei I. Zhurov, Arshed M. Toma, John P. Kemp, Beate St. Pourcain, Nicholas J. Timpson, George McMahon, et al. 2012. “Genome-Wide Association Study of Three-Dimensional Facial Morphology Identifies a Variant in PAX3 Associated with Nasion Position.” *The American Journal of Human Genetics* 90 (3):478–85. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.021>.
- “PAX3 Gene - GeneCards | PAX3 Protein | PAX3 Antibody.” Accessed June 16, 2017.  
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PAX3&keywords=PAX3>.
- Peng, Shouneng, Jingze Tan, Sile Hu, Hang Zhou, Jing Guo, Li Jin, and Kun Tang. 2013. “Detecting Genetic Association of Common Human Facial Morphological Variation Using High Density 3D Image Registration.” Edited by Rachel B. Brem. *PLoS Computational Biology* 9 (12):e1003375.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003375>.
- Peters, H., A. Neubüser, K. Kratochwil, and R. Balling. 1998. “Pax9-Deficient Mice Lack Pharyngeal Pouch Derivatives and Teeth and Exhibit Craniofacial and Limb Abnormalities.” *Genes & Development* 12 (17):2735–47.

- “PRDM16 Gene - GeneCards | PRD16 Protein | PRD16 Antibody.” Accessed June 22, 2017.  
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PRDM16&keywords=PRDM16>.
- Rice, David P. C., Elaine C. Connor, Jacqueline M. Veltmaat, Eva Lana-Elola, Lotta Veistinen, Yukiho Tanimoto, Saverio Bellusci, and Ritva Rice. 2010. “Gli3Xt-J/Xt-J Mice Exhibit Lambdoid Suture Craniosynostosis Which Results from Altered Osteoprogenitor Proliferation and Differentiation.” *Human Molecular Genetics* 19 (17):3457–67. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq258>.
- Rimkus, Tadas K., Richard L. Carpenter, Shadi Qasem, Michael Chan, and Hui-Wen Lo. 2016. “Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothened and GLI Inhibitors.” *Cancers* 8 (2). <https://doi.org/10.3390/cancers8020022>.
- Roosenboom, Jasmien, Greet Hens, Brooke C. Mattern, Mark D. Shriver, and Peter Claes. 2016. “Exploring the Underlying Genetics of Craniofacial Morphology through Various Sources of Knowledge.” *BioMed Research International* 2016:1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/3054578>.
- Roseman, Charles C. 2004. “Detecting Interregionally Diversifying Natural Selection on Modern Human Cranial Form by Using Matched Molecular and Morphometric Data.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (35):12824–12829.
- Rosypal, Stanislav. 2002. *Úvod Do Molekulární Biologie. Díl Druhý*. Brno: Stanislav Rosypal.
- “rs3213849 (SNP) - Explore This Variant - Homo Sapiens - Ensembl Genome Browser 89.” Accessed June 16, 2017.  
[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Explore?r=8:38468028-38469028;v=rs3213849;vdb=variation;vf=2416202](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=8:38468028-38469028;v=rs3213849;vdb=variation;vf=2416202).
- RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA  
 URL <http://www.rstudio.com/>.
- “RUNX2 Gene - GeneCards | RUNX2 Protein | RUNX2 Antibody.” Accessed October 9, 2017.  
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RUNX2&keywords=runx2>.
- Rutsch, Frank, Sucheta Vaingankar, Kristen Johnson, Ira Goldfine, Betty Maddux, Petra Schauerte, Hermann Kalhoff, et al. 2001. “PC-1 Nucleoside Triphosphate Pyrophosphohydrolase Deficiency in Idiopathic Infantile Arterial Calcification.” *The American Journal of Pathology* 158 (2):543–554.
- Sadier, Alexa, Laurent Viriot, Sophie Pantalacci, and Vincent Laudet. 2014. “The Ectodysplasin Pathway: From Diseases to Adaptations.” *Trends in Genetics: TIG* 30 (1):24–31. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.08.006>.
- Savoye, I., R. Loos, C. Carels, C. Derom, and R. Vlietinck. 1998. “A Genetic Study of Anteroposterior and Vertical Facial Proportions Using Model-Fitting.” *The Angle Orthodontist* 68 (5):467–70. [https://doi.org/10.1043/0003-3219\(1998\)068<0467:AGSOAA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-3219(1998)068<0467:AGSOAA>2.3.CO;2).

- Schröder, Bernd, Christian Wrocklage, Cuiping Pan, Ralf Jäger, Bernd Kösters, Helmut Schäfer, Hans-Peter Elsässer, Matthias Mann, and Andrej Hasilik. 2007. "Integral and Associated Lysosomal Membrane Proteins." *Traffic* 8 (12):1676–86. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00643.x>.
- Schutte, Brian C., Howard M. Saal, Steven Goudy, and Elizabeth Leslie. 1993. "IRF6-Related Disorders." In *GeneReviews*(®), edited by Roberta A. Pagon, Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Stephanie E. Wallace, Anne Amemiya, Lora JH Bean, Thomas D. Bird, et al. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1407/>.
- Sedano, H. O., M. M. Cohen, J. Jirasek, and R. J. Gorlin. 1970. "Frontonasal Dysplasia." *The Journal of Pediatrics* 76 (6):906–13.
- Shaffer, John R., Ekaterina Orlova, Myoung Keun Lee, Elizabeth J. Leslie, Zachary D. Raffensperger, Carrie L. Heike, Michael L. Cunningham, et al. 2016. "Genome-Wide Association Study Reveals Multiple Loci Influencing Normal Human Facial Morphology." *PLoS Genetics* 12 (8):e1006149.
- Sheehan, Michael J., and Michael W. Nachman. 2014. "Morphological and Population Genomic Evidence That Human Faces Have Evolved to Signal Individual Identity." *Nature Communications* 5 (September):4800. <https://doi.org/10.1038/ncomms5800>.
- Singh, Sunita, and et al. 2016. "The Molecular Basis of Craniofacial Placode Development: Molecular Basis of Craniofacial Placode Development." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 5 (3):363–76. <https://doi.org/10.1002/wdev.226>.
- Slavotinek, Anne M., Sergio E. Baranzini, Denny Schanze, Cassandre Labelle-Dumais, Kieran M. Short, Ryan Chao, Mani Yahyavi, et al. 2011. "Manitoba-Oculo-Trichio-Anal (MOTA) Syndrome Is Caused by Mutations in *FREM1*." *Journal of Medical Genetics* 48 (6):375–82. <https://doi.org/10.1136/jmg.2011.089631>.
- "SLC17A8 Gene - GeneCards | VGLU3 Protein | VGLU3 Antibody." Accessed June 16, 2017. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC17A8&keywords=SLC17A8>.
- Šmahel, Zbyněk. 2001. *Principy, teorie a metody auxologie*. Karolinum.
- Snustad, D. Peter, and Michael J. Simmons. 2009. *Genetika*. Edited by Jiřina Relichová. Brno: Masarykova Univerzita.
- Suri, Mohnish. 2005. "Craniofacial Syndromes." *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 10 (3):243–57. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2004.12.002>.
- Takahata, M., Y. Inoue, H. Tsuda, I. Imoto, D. Koinuma, M. Hayashi, T. Ichikura, et al. 2009. "SKI and MEL1 Cooperate to Inhibit Transforming Growth Factor- $\beta$  Signal in Gastric Cancer Cells." *Journal of Biological Chemistry* 284 (5):3334–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808989200>.
- Tošovská, H. (2016). *Vývoj obličeje u dětí ve věku od 6 do 12 let: longitudinální studie*. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha.

- Tsagkroulis, Dimosthenis, Pirro Hysi, Tim Spector, and Giovanni Montana. 2017. "Heritability Maps of Human Face Morphology through Large-Scale Automated Three-Dimensional Phenotyping." *Scientific Reports* 7 (April):45885. <https://doi.org/10.1038/srep45885>.
- Vieira, Alexandre R, Toby G McHenry, Sandra Daack-Hirsch, Jeffrey C Murray, and Mary L Marazita. 2008. "Candidate Gene/Loci Studies in Cleft Lip/Palate and Dental Anomalies Finds Novel Susceptibility Genes for Clefts." *Genetics in Medicine* 10 (9):668–74. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181833793>.
- Waardenburg, P. J. 1951. "A New Syndrome Combining Developmental Anomalies of the Eyelids, Eyebrows and Noseroot with Pigmentary Anomalies of the Iris and Head Hair and with Congenital Deafness; Dystopia Canthi Medialis et Punctorum Lacrimalium Lateroversa, Hyperplasia Supercilii Medialis et Radicis Nasi, Heterochromia Iridum Totaliis Sive Partialis, Albinismus Circumscriptus (Leucismus, Poliosis) et Surditas Congenita (Surdimutitas)." *American Journal of Human Genetics* 3 (3):195–253.
- Walsh, Susan, Lakshmi Chaitanya, Krystal Breslin, Charanya Muralidharan, Agnieszka Bronikowska, Ewelina Pospiech, Julia Koller, et al. 2017. "Global Skin Colour Prediction from DNA." *Human Genetics* 136 (7):847–63. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1808-5>.
- Walsh, Susan, Fan Liu, Andreas Wollstein, Leda Kovatsi, Arwin Ralf, Agnieszka Kosiniak-Kamysz, Wojciech Branicki, and Manfred Kayser. 2013. "The HIrisPlex System for Simultaneous Prediction of Hair and Eye Colour from DNA." *Forensic Science International. Genetics* 7 (1):98–115. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.07.005>.
- Walsh, Susan, Andreas Wollstein, Fan Liu, Usha Chakravarthy, Mati Rahu, Johan H. Seland, Gisele Soubrane, et al. 2012. "DNA-Based Eye Colour Prediction across Europe with the IrisPlex System." *Forensic Science International. Genetics* 6 (3):330–40. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.07.009>.
- Warner, Dennis R., Kristin H. Horn, Lisa Mudd, Cynthia L. Webb, Robert M. Greene, and M. Michele Pisano. 2007. "PRDM16/MEL1: A Novel Smad Binding Protein Expressed in Murine Embryonic Orofacial Tissue." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1773 (6):814–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.016>.
- Watanabe, Mikio, Chika Honda, Yoshinori Iwatani, Shiro Yorifuji, Hiroyasu Iso, Kei Kamide, Jun Hatazawa, et al. 2016. "Within-Pair Differences of DNA Methylation Levels between Monozygotic Twins Are Different between Male and Female Pairs." *BMC Medical Genomics* 9 (1). <https://doi.org/10.1186/s12920-016-0217-2>.
- Wattanawong, Kachin, Sasivimol Rattanasiri, Mark McEvoy, John Attia, and Ammarin Thakkinstian. 2016. "Association between IRF6 and 8q24 Polymorphisms and Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate: Systematic Review and Meta-Analysis: Association of IRF6 and 8Q24 GENES and NSCL/P." *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 106 (9):773–88. <https://doi.org/10.1002/bdra.23540>.

- Weinberg, Seth M., Trish E. Parsons, Mary L. Marazita, and Brion S. Maher. 2013. "Heritability of Face Shape in Twins: A Preliminary Study Using 3D Stereophotogrammetry and Geometric Morphometrics." *Dentistry 3000* 1 (1). <https://doi.org/10.5195/d3000.2013.14>.
- Welbury, Richard, Monty S. Duggal, and Marie Thérèse Hosey. 2012. *Paediatric Dentistry*. OUP Oxford.
- White, Kenneth E., Jose M. Cabral, Siobhan I. Davis, Tonya Fishburn, Wayne E. Evans, Shoji Ichikawa, Joanna Fields, et al. 2005. "Mutations That Cause Osteoglophonic Dysplasia Define Novel Roles for FGFR1 in Bone Elongation." *The American Journal of Human Genetics* 76 (2):361–367.
- White, A. D. Rogol, K. S. Brown, J. M. Lieblich, and S. W. Rosen. 1983. "The Syndrome of Anosmia with Hypogonadotropic Hypogonadism: A Genetic Study of 18 New Families and a Review." *American Journal of Medical Genetics* 15 (3):417–35. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320150307>.
- Wu, Meilin, Jun Li, Kurt A. Engleka, Bo Zhou, Min Min Lu, Joshua B. Plotkin, and Jonathan A. Epstein. 2008. "Persistent Expression of Pax3 in the Neural Crest Causes Cleft Palate and Defective Osteogenesis in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 118 (6):2076–87. <https://doi.org/10.1172/JCI33715>.

## 9 Přílohy

**Příloha 1 - Vazebná nerovnováha (p-hodnoty)**

Dvojice polymorfismů	p-hodnota ± s.d.
Pair (0, 1)	0,70088 ± 0,01122
Pair (0, 2)	0,17693 ± 0,01218
Pair (1, 2)	0,84555 ± 0,01055
<b>Pair (0, 3)</b>	<b>0,01564 ± 0,00340</b>
Pair (1, 3)	0,35386 ± 0,01306
Pair (2, 3)	0,17302 ± 0,01258
<b>Pair (0, 4)</b>	<b>0,00000 ± 0,00000</b>
Pair (1, 4)	0,70968 ± 0,01697
Pair (2, 4)	0,22483 ± 0,01551
<b>Pair (3, 4)</b>	<b>0,01075 ± 0,00265</b>
Pair (0, 5)	0,36168 ± 0,01184
Pair (1, 5)	0,95503 ± 0,00687
Pair (2, 5)	0,05963 ± 0,00723
Pair (3, 5)	0,31965 ± 0,01432
Pair (4, 5)	0,20137 ± 0,01093
Pair (0, 6)	0,46725 ± 0,01165
Pair (1, 6)	0,77615 ± 0,01086
Pair (2, 6)	0,39687 ± 0,01802
Pair (3, 6)	0,26686 ± 0,01373
Pair (4, 6)	0,70772 ± 0,01213
Pair (5, 6)	0,98534 ± 0,00340
Pair (0, 7)	0,94330 ± 0,00727
Pair (1, 7)	0,06158 ± 0,00666
Pair (2, 7)	0,76246 ± 0,01370
Pair (3, 7)	0,63343 ± 0,01516
Pair (4, 7)	0,93744 ± 0,00543
Pair (5, 7)	0,96579 ± 0,00540
Pair (6, 7)	0,21505 ± 0,01017
Pair (0, 8)	0,07722 ± 0,01031
Pair (1, 8)	0,42424 ± 0,01159
Pair (2, 8)	0,92962 ± 0,00824
Pair (3, 8)	0,58358 ± 0,01513
Pair (4, 8)	0,16325 +- 0,01254
Pair (5, 8)	0,29521 +- 0,01264
Pair (6, 8)	0,95894 +- 0,00605
Pair (7, 8)	0,29326 +- 0,01605

0 – rs1887276; 1 – rs6569759; 2 – rs1255863; 3 – rs7559271; 4 – rs7965082; 5 – rs4648379; 6 – rs642961; 7 – rs3213849; 8 – rs11726039

**Příloha 2** - Vliv polymorfismu rs1887276 na morfologii obličeje (p-hodnoty)

<b>rs1887276</b>	<b>RAW</b>	<b>RAW ♂♀</b>	<b>CS</b>	<b>CS ♂♀</b>
Šířka oka P	0,55786	0,14210	KW 0,6159	---
Šířka oka L	KW 0,6194	---	KW 0,6029	---
Exocanthion-nasion P	0,84644	0,16028	KW 0,8870	---
Exocanthion-nasion L	0,39129	0,58389	0,66141	0,20514
Exocanthion-pronasale P	0,49309	0,90516	0,90086	0,27856
Exocanthion-pronasale L	0,62866	0,29381	0,54599	<b>0,04246</b>
Vzdálenost očí	0,34838	0,71185	0,58940	0,16271
Pronasale-chelion P	0,28460	0,21760	0,63507	0,26630
Pronasale-chelion L	0,54636	0,43806	0,90243	0,73789
Nasion-chelion P	<b>0,07838</b>	0,39456	0,23442	0,59904
Nasion-chelion L	<b>0,04444</b>	0,26915	0,48335	0,16518
Nasion-pogonion	KW 0,4038	---	0,34006	0,91065
Pronasale-pogonion	0,44370	0,60902	KW 0,8036	---
Nasion-pronasale	0,20723	0,91430	0,64301	0,58436
Šířka úst	0,94935	0,20826	0,69968	0,46852

**RAW** – neupravená data, bez ohledu na pohlaví; **RAW ♂♀** – neupravená data, do analýz bylo zahrnuto pohlaví jedinců; **CS** – data upravená hodnotou centroid size, **CS ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz bylo zahrnuto také pohlaví jedinců; **CS rodiče** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, bez ohledu na pohlaví; **CS rodiče ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, v analýzách je brán ohled na pohlaví; **KW** – použit neparametrický Kruskal-Wallisův test

**Příloha 3** - Vliv polymorfismu rs6569759 na morfologii obličeje (p-hodnoty)

<b>rs656979</b>	<b>RAW</b>	<b>RAW ♂♀</b>	<b>CS</b>	<b>CS ♂♀</b>
Šířka oka P	<b>0,09449</b>	<b>0,00392</b>	<b>0,03580</b>	<b>0,00097</b>
Šířka oka L	0,55831	0,29626	0,13330	<b>0,00173</b>
Exocanthion-nasion P	0,75979	0,62151	<b>0,07453</b>	0,18452
Exocanthion-nasion L	0,69726	0,84313	KW 0,3941	---
Exocanthion-pronasale P	0,92111	0,99737	0,21142	0,37029
Exocanthion-pronasale L	0,88479	0,35652	<b>0,08373</b>	0,35898
Vzdálenost očí	0,67901	0,58604	<b>0,03196</b>	0,35571
Pronasale-chelion P	<b>0,08627</b>	0,11931	0,30206	0,20772
Pronasale-chelion L	0,25555	0,12852	0,81870	0,43217
Nasion-chelion P	<b>0,01980</b>	0,32244	<b>0,01762</b>	0,88777
Nasion-chelion L	<b>0,07237</b>	0,18749	KW 0,0778	---
Nasion-pogonion	KW 0,4362	---	<b>0,07382</b>	0,52147
Pronasale-pogonion	0,14287	0,23778	0,37600	0,26823
Nasion-pronasale	0,36340	0,14378	0,82793	0,23462
Šířka úst	0,25839	<b>0,04841</b>	0,78910	0,29845

**RAW** – neupravená data, bez ohledu na pohlaví; **RAW ♂♀** – neupravená data, do analýz bylo zahrnuto pohlaví jedinců; **CS** – data upravená hodnotou centroid size, **CS ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz bylo zahrnuto také pohlaví jedinců; **CS rodiče** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, bez ohledu na pohlaví; **CS rodiče ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, v analýzách je brán ohled na pohlaví; **KW** – použit neparametrický Kruskal-Wallisův test



**Příloha 4 - Vliv polymorfismu rs1255863 na morfologii obličeje (p-hodnoty)**

<b>rs1255863</b>	<b>RAW</b>	<b>RAW ♂♀</b>	<b>CS</b>	<b>CS ♂♀</b>
Šířka oka P	KW 0,7642	---	0,91861	0,47949
Šířka oka L	0,69470	0,98288	0,70673	0,58281
Exocanthion-nasion P	0,51577	0,89675	KW 0,5977	---
Exocanthion-nasion L	0,38822	0,94990	0,22571	0,63199
Exocanthion-pronasale P	0,55945	0,77310	0,67373	0,58924
Exocanthion-pronasale L	0,75221	0,68650	0,52868	0,46563
Vzdálenost očí	0,81800	0,91743	0,54924	0,56146
Pronasale-chelion P	0,36361	0,68744	0,37881	0,78169
Pronasale-chelion L	0,34815	0,98769	0,27143	0,58342
Nasion-chelion P	0,46300	0,69166	0,33788	0,29987
Nasion-chelion L	0,60861	0,84062	KW 0,5030	---
Nasion-pogonion	0,55607	0,36648	KW 0,7931	---
Pronasale-pogonion	0,75401	0,44768	0,81488	0,55485
Nasion-pronasale	0,69085	0,85966	0,85860	0,82509
Šířka úst	0,67601	0,86394	0,60095	0,56747

**RAW** – neupravená data, bez ohledu na pohlaví; **RAW ♂♀** – neupravená data, do analýz bylo zahrnuto pohlaví jedinců; **CS** – data upravená hodnotou centroid size, **CS ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz bylo zahrnuto také pohlaví jedinců; **CS rodiče** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, bez ohledu na pohlaví; **CS rodiče ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, v analýzách je brán ohled na pohlaví; **KW** – použit neparametrický Kruskal-Wallisův test

**Příloha 5** - Vliv polymorfismu rs7559271 na morfologii obličeje (p-hodnoty)

<b>rs7559271</b>	<b>RAW</b>	<b>RAW ♂♀</b>	<b>CS</b>	<b>CS ♂♀</b>
Šířka oka P	0,77525	0,82975	0,55148	0,95836
Šířka oka L	0,41364	0,90301	KW 0,7465	---
Exocanthion-nasion P	<b>0,03011</b>	0,97179	0,45200	0,53674
Exocanthion-nasion L	0,11105	0,94907	0,68459	0,42707
Exocanthion-pronasale P	0,19459	0,30253	0,75087	0,28890
Exocanthion-pronasale L	0,45277	0,98618	0,95849	0,45989
Vzdálenost očí	<b>0,05133</b>	0,99209	0,72997	0,32679
Pronasale-chelion P	<b>0,02278</b>	0,58187	<b>0,06747</b>	<b>0,06691</b>
Pronasale-chelion L	0,10988	0,65602	0,33553	0,17814
Nasion-chelion P	0,36453	0,86480	0,86499	0,58345
Nasion-chelion L	0,36700	0,67293	0,85037	0,74526
Nasion-pogonion	KW 0,9107	---	KW 0,2526	---
Pronasale-pogonion	0,26000	<b>0,06429</b>	KW 0,7139	---
Nasion-pronasale	0,98228	0,62022	0,77183	0,40306
Šířka úst	0,18148	0,43985	0,42280	0,11509

**RAW** – neupravená data, bez ohledu na pohlaví; **RAW ♂♀** – neupravená data, do analýz bylo zahrnuto pohlaví jedinců; **CS** – data upravená hodnotou centroid size, **CS ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz bylo zahrnuto také pohlaví jedinců; **CS rodiče** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, bez ohledu na pohlaví; **CS rodiče ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, v analýzách je brán ohled na pohlaví; **KW** – použit neparametrický Kruskal-Wallisův test

**Příloha 6** - Vliv polymorfismu rs7965082 na morfologii obličeje (p-hodnoty)

<b>rs7965082</b>	<b>RAW</b>	<b>RAW ♂♀</b>	<b>CS</b>	<b>CS ♂♀</b>
Šířka oka P	0,66469	<b>0,04598</b>	0,38667	<b>0,05374</b>
Šířka oka L	0,46904	<b>0,05743</b>	KW 0,6945	---
Exocanthion-nasion P	0,65082	0,17150	KW 0,7992	---
Exocanthion-nasion L	0,41059	0,40968	0,84580	0,19814
Exocanthion-pronasale P	0,31989	0,66298	KW 0,9248	---
Exocanthion-pronasale L	0,40966	0,14145	0,51351	<b>0,02604</b>
Vzdálenost očí	0,30772	0,53107	0,67091	0,16700
Pronasale-chelion P	0,34176	0,22016	0,88641	0,18987
Pronasale-chelion L	0,52661	0,45577	0,91433	0,65669
Nasion-chelion P	<b>0,05956</b>	0,46855	0,33488	0,49304
Nasion-chelion L	<b>0,02807</b>	0,34510	0,17669	0,40192
Nasion-pogonion	KW 0,3511	---	0,44300	0,86103
Pronasale-pogonion	0,39017	0,66880	KW 0,8437	---
Nasion-pronasale	0,14226	0,81955	0,54863	0,60844
Šířka úst	0,94375	0,21354	0,61374	0,42558

**RAW** – neupravená data, bez ohledu na pohlaví; **RAW ♂♀** – neupravená data, do analýz bylo zahrnuto pohlaví jedinců; **CS** – data upravená hodnotou centroid size, **CS ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz bylo zahrnuto také pohlaví jedinců; **CS rodiče** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, bez ohledu na pohlaví; **CS rodiče ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, v analýzách je brán ohled na pohlaví; **KW** – použit neparametrický Kruskal-Wallisův test

**Příloha 7 - Vliv polymorfismu rs4648379 na morfologii obličeje (p-hodnoty)**

<b>rs4648379</b>	<b>RAW</b>	<b>RAW ♂♀</b>	<b>CS</b>	<b>CS ♂♀</b>
Šířka oka P	0,17106	0,15280	0,30218	0,26417
Šířka oka L	0,40715	0,94210	0,44559	0,43157
Exocanthion-nasion P	0,32432	0,61884	KW 0,4860	---
Exocanthion-nasion L	0,12329	0,87621	KW 0,7274	---
Exocanthion-pronasale P	<b>0,01117</b>	0,51818	0,44558	<b>0,09347</b>
Exocanthion-pronasale L	0,10889	0,35779	0,83439	0,10653
Vzdálenost očí	0,17813	0,70297	0,65471	0,63905
Pronasale-chelion P	0,21064	0,23425	0,12904	0,30086
Pronasale-chelion L	<b>0,03413</b>	0,28434	<b>0,03313</b>	0,40272
Nasion-chelion P	0,22999	0,31724	<b>0,06572</b>	0,11163
Nasion-chelion L	<b>0,04779</b>	0,26354	<b>0,02624</b>	0,10101
Nasion-pogonion	KW 0,5880	---	0,99940	<b>0,02750</b>
Pronasale-pogonion	0,61917	<b>0,09236</b>	0,97207	<b>0,04793</b>
Nasion-pronasale	0,16647	0,95018	0,56460	0,89816
Šířka úst	KW 0,9838	---	KW 0,9782	---

**RAW** – neupravená data, bez ohledu na pohlaví; **RAW ♂♀** – neupravená data, do analýz bylo zahrnuto pohlaví jedinců; **CS** – data upravená hodnotou centroid size, **CS ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz bylo zahrnuto také pohlaví jedinců; **CS rodiče** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, bez ohledu na pohlaví; **CS rodiče ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, v analýzách je brán ohled na pohlaví; **KW** – použit neparametrický Kruskal-Wallisův test

**Příloha 8** - Vliv polymorfismu rs642961 na morfologii obličeje (p-hodnoty)

<b>rs642961</b>	<b>RAW</b>	<b>RAW ♂♀</b>	<b>CS</b>	<b>CS ♂♀</b>
Šířka oka P	MW 0,988779	---	0,83790	<b>0,00386</b>
Šířka oka L	MW 0,767738	---	MW 0,483699	<b>0,01443</b>
Exocanthion-nasion P	0,63262	<b>0,00030</b>	MW 0,885936	---
Exocanthion-nasion L	0,88313	<b>0,00628</b>	0,88520	---
Exocanthion-pronasale P	0,76803	<b>0,00110</b>	0,97531	<b>0,01320</b>
Exocanthion-pronasale L	0,85618	<b>0,06988</b>	0,56834	<b>0,06553</b>
Vzdálenost očí	0,55075	<b>0,00375</b>	0,76856	<b>0,02210</b>
Pronasale-chelion P	0,38573	0,47983	0,32172	0,57647
Pronasale-chelion L	MW 0,572623	---	0,57309	0,41876
Nasion-chelion P	MW 0,832923	---	0,38952	0,16183
Nasion-chelion L	MW 0,979804	---	0,86872	0,28955
Nasion-pogonion	MW 0,975317	---	0,68228	0,56604
Pronasale-pogonion	0,80066	0,33934	MW 0,568012	---
Nasion-pronasale	0,87195	<b>0,03584</b>	0,98261	<b>0,02648</b>
Šířka úst	0,30160	0,50203	0,31034	0,63721

**RAW** – neupravená data, bez ohledu na pohlaví; **RAW ♂♀** – neupravená data, do analýz bylo zahrnuto pohlaví jedinců; **CS** – data upravená hodnotou centroid size, **CS ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz bylo zahrnuto také pohlaví jedinců; **CS rodiče** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, bez ohledu na pohlaví; **CS rodiče ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, v analýzách je brán ohled na pohlaví; **MW** – použit neparametrický Mann-Whitneyův U test

**Příloha 9** - Vliv polymorfismu rs3213849 na morfologii obličeje (p-hodnoty)

<b>rs3213849</b>	<b>RAW</b>	<b>RAW ♂♀</b>	<b>CS</b>	<b>CS ♂♀</b>
Šířka oka P	0,99459	0,07080	0,85303	<b>0,03162</b>
Šířka oka L	MW 0,83703	---	MW 0,90612	---
Exocanthion-nasion P	0,80976	0,92922	MW 0,50163	---
Exocanthion-nasion L	0,81016	0,30115	0,58756	0,76693
Exocanthion-pronasale P	0,84737	0,83864	0,99044	0,28692
Exocanthion-pronasale L	0,82585	0,16040	0,51688	0,40123
Vzdálenost očí	0,42612	0,99646	0,21927	0,36345
Pronasale-chelion P	0,78345	0,88338	0,86433	0,59142
Pronasale-chelion L	0,55212	0,15425	0,53711	0,30640
Nasion-chelion P	0,75341	0,16648	0,22233	0,17755
Nasion-chelion L	0,85585	<b>0,04112</b>	0,89980	<b>0,01479</b>
Nasion-pogonion	MW 0,80716	---	MW 0,897435	---
Pronasale-pogonion	0,26343	0,73683	0,15491	0,81705
Nasion-pronasale	0,25822	0,13901	0,10142	0,21829
Šířka úst	0,62447	0,97168	0,47682	0,59964

**RAW** – neupravená data, bez ohledu na pohlaví; **RAW ♂♀** – neupravená data, do analýz bylo zahrnuto pohlaví jedinců; **CS** – data upravená hodnotou centroid size, **CS ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz bylo zahrnuto také pohlaví jedinců; **CS rodiče** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, bez ohledu na pohlaví; **CS rodiče ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, v analýzách je brán ohled na pohlaví; **MW** – použit neparametrický Mann-Whitneyův U test

**Příloha 10** - Vliv polymorfismu rs11726039 na morfologii obličeje (p-hodnoty)

<b>rs11726039</b>	<b>RAW</b>	<b>RAW ♂♀</b>	<b>CS</b>	<b>CS ♂♀</b>
Šířka oka P	KW 0,3912	---	KW 0,2946	---
Šířka oka L	KW 0,5890	---	KW 0,2496	---
Exocanthion-nasion P	0,14211	0,12147	KW 0,4151	---
Exocanthion-nasion L	0,53298	0,37118	KW 0,4151	---
Exocanthion-pronasale P	0,27123	0,35786	0,62241	0,45651
Exocanthion-pronasale L	0,24758	0,08398	0,42447	0,12877
Vzdálenost očí	0,62087	0,33219	0,94969	0,64105
Pronasale-chelion P	0,81657	0,79183	0,50203	0,93670
Pronasale-chelion L	0,80552	0,61591	0,20606	0,66655
Nasion-chelion P	0,48014	0,71753	0,62333	0,63180
Nasion-chelion L	0,43063	0,74277	0,25353	0,79002
Nasion-pogonion	KW 0,8831	---	0,71879	0,54552
Pronasale-pogonion	0,49624	0,73356	KW 0,2433	---
Nasion-pronasale	0,29075	0,27575	0,41093	0,32164
Šířka úst	0,27374	0,24462	0,07020	0,32125

**RAW** – neupravená data, bez ohledu na pohlaví; **RAW ♂♀** – neupravená data, do analýz bylo zahrnuto pohlaví jedinců; **CS** – data upravená hodnotou centroid size, **CS ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz bylo zahrnuto také pohlaví jedinců; **CS rodiče** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, bez ohledu na pohlaví; **CS rodiče ♂♀** – data upravená hodnotou centroid size, do analýz byly zahrnuti pouze rodiče, v analýzách je brán ohled na pohlaví; **KW** – použit neparametrický Kruskal-Wallisův test

**Příloha 11 - Příspěvky rodičů k výslednému fenotypu dětí (normalizované rovnice)**

Parametr obličeje	Normalizovaná rovnice	p-hodnoty koeficientů
Šířka oka P	$D = 0,55 \times O + 0,45 \times M$	O: $2,48 \times 10^{-7}$ ; M: $4,94 \times 10^{-6}$
	$S = 0,53 \times O + 0,47 \times M$	O: $3,43 \times 10^{-5}$ ; M: 0,00011
Šířka oka L	$D = 0,6 \times O + 0,4 \times M$	O: $1,10 \times 10^{-7}$ ; M: $8,31 \times 10^{-5}$
	$S = 0,57 \times O + 0,43 \times M$	O: $8,97 \times 10^{-5}$ ; M: 0,0013
Exocanthion-nasion P	$D = 0,59 \times O + 0,41 \times M$	O: $1,77 \times 10^{-7}$ ; M: $4,28 \times 10^{-5}$
	$S = 0,58 \times O + 0,42 \times M$	O: $2,27 \times 10^{-5}$ ; M: 0,00054
Exocanthion-nasion L	$D = 0,5 \times O + 0,5 \times M$	O: $5,41 \times 10^{-5}$ ; M: $5,25 \times 10^{-5}$
	$S = 0,63 \times O + 0,37 \times M$	O: 0,00059; M: 0,02584
Exocanthion-pronasale P	$D = 0,51 \times O + 0,49 \times M$	O: 0,00219; M: 0,00364
	$S = 0,3 \times O + 0,7 \times M$	<b>O: 0,08732</b> ; M: 0,00029
Exocanthion-pronasale L	$D = 0,47 \times O + 0,53 \times M$	O: 0,00075; M: 0,00015
	$S = 0,45 \times O + 0,55 \times M$	O: 0,01707; M: 0,00433
Vzdálenost očí	$D = 0,37 \times O + 0,63 \times M$	O: 0,00109; M: $7,36 \times 10^{-7}$
	$S = 0,65 \times O + 0,35 \times M$	O: 0,00058; M: 0,04131
Pronasale-chelion P	$D = 0,27 \times O + 0,73 \times M$	<b>O: 0,13930</b> ; M: 0,00031
	$S = 0,37 \times O + 0,63 \times M$	O: 0,02608; M: 0,00062
Pronasale-chelion L	$D = 0,67 \times O + 0,33 \times M$	O: 0,00739; <b>M: 0,16785</b>
	$S = 0,39 \times O + 0,61 \times M$	O: 0,03402; M: 0,00243
Nasion-chelion P	$D = 0,51 \times O + 0,49 \times M$	O: 0,00087; M: 0,00158
	$S = 0,78 \times O + 0,22 \times M$	O: 0,00034; <b>M: 0,25133</b>
Nasion-chelion L	$D = 0,59 \times O + 0,41 \times M$	O: 0,00085; M: 0,01834
	$S = 0,99 \times O + 0,011 \times M$	O: $3,84 \times 10^{-7}$ ; <b>M: 0,94013</b>
Nasion-pogonion	$D = 0,21 \times O + 0,79 \times M$	O: 0,00685; M: $1,97 \times 10^{-12}$
	$S = 0,51 \times O + 0,49 \times M$	O: 0,00165; M: 0,00189
Pronasale-pogonion	$D = 0,18 \times O + 0,82 \times M$	<b>O: 0,11994</b> ; M: $2,4 \times 10^{-8}$
	$S = 0,55 \times O + 0,45 \times M$	O: 0,00037; M: 0,00299
Nasion-pronasale	$D = 0,71 \times O + 0,29 \times M$	O: 0,00031; <b>M: 0,10227</b>
	$S = 0,78 \times O + 0,22 \times M$	O: $8,59 \times 10^{-5}$ ; <b>M: 0,16716</b>
Šířka úst	$D = 0,3 \times O + 0,7 \times M$	O: 0,00666; M: $1,09 \times 10^{-7}$
	$S = 0,51 \times O + 0,49 \times M$	O: 0,01382; M: 0,0196

D – dcera; S – syn; O – otec; M – matka



**Příloha 12** - Hodnoty Pearsonova (Spearmanova) korelačních koeficientů

<b>Dcera/matka</b>	<b>Korelační koeficient r</b>	<b>Dcera/otec</b>	<b>Korelační koeficient r</b>
Šířka oka P	0,1360	Šířka oka P	<b>0,4452 (SP)</b>
Šířka oka L	0,1148	<b>Šířka oka L</b>	<b>0,4910 (SP)</b>
Exocanthion-nasion P	<b>0,4869</b>	Exocanthion-nasion P	-0,0807
Exocanthion-nasion L	<b>0,3424</b>	Exocanthion-nasion L	0,1616
Exocanthion-pronasale P	0,2058 (SP)	Exocanthion-pronasale P	0,1608
Exocanthion-pronasale L	<b>0,4942</b>	<b>Exocanthion-pronasale L</b>	<b>0,5229 (SP)</b>
Vzdálenost očí	<b>0,4269</b>	Vzdálenost očí	0,0569
Pronasale-chelion P	0,2472	Pronasale-chelion P	0,2470
Pronasale-chelion L	0,2130 (SP)	Pronasale-chelion L	<b>0,4070</b>
Nasion-chelion P	-0,0511 (SP)	Nasion-chelion P	0,0089
Nasion-chelion L	-0,0154	Nasion-chelion L	0,0257
<b>Nasion-pogonion</b>	<b>0,7280</b>	Nasion-pogonion	0,2028 (SP)
<b>Pronasale-pogonion</b>	<b>0,5487 (SP)</b>	Pronasale-pogonion	0,0452 (SP)
Nasion-pronasale	0,1597	Nasion-pronasale	<b>0,3977 (SP)</b>
Šířka úst	0,1500	Šířka úst	-0,0215 (SP)

SP – použití Spearmanova testu (neparametrický test); tučně jsou zvýrazněny signifikantní koeficienty ( $p < 0,05$ )

Syn/matka	Korelační koeficient r	Syn/otec	Korelační koeficient r
Šířka oka P	0,2324 (SP)	Šířka oka P	0,3797 (SP)
Šířka oka L	0,2482 (SP)	Šířka oka L	<b>0,4984 (SP)</b>
Exocanthion-nasion P	-0,3842 (SP)	Exocanthion-nasion P	0,2349
Exocanthion-nasion L	-0,3452	Exocanthion-nasion L	0,2282
Exocanthion-pronasale P	<b>0,4554 (SP)</b>	Exocanthion-pronasale P	0,2806
Exocanthion-pronasale L	0,1827	Exocanthion-pronasale L	0,1864 (SP)
Vzdálenost očí	<b>-0,4252 (SP)</b>	Vzdálenost očí	0,1289
Pronasale-chelion P	0,3857 (SP)	Pronasale-chelion P	0,3778 (SP)
<b>Pronasale-chelion L</b>	<b>0,5251</b>	<b>Pronasale-chelion L</b>	<b>0,5270</b>
Nasion-chelion P	-0,0186	Nasion-chelion P	0,3288
Nasion-chelion L	-0,1473 (SP)	<b>Nasion-chelion L</b>	<b>0,6084</b>
Nasion-pogonion	-0,0338	Nasion-pogonion	0,2710 (SP)
Pronasale-pogonion	0,0483	<b>Pronasale-pogonion</b>	<b>0,5256 (SP)</b>
Nasion-pronasale	0,0766 (SP)	<b>Nasion-pronasale</b>	<b>0,4999 (SP)</b>
Šířka úst	<b>0,4405 (SP)</b>	Šířka úst	<b>0,4643 (SP)</b>

SP – použití Spearmanova testu (neparametrický test); tučně jsou zvýrazněny signifikantní koeficienty ( $p < 0,05$ )