

Latvijas Universitāte

Medicīnas fakultāte

Cilvēka 14.hromosomas proteasomu  
gēnu polimorfismu saistība ar  
metaboliskām un autoimūnām  
slimībām

PROMOCIJAS DARBS

**Darba autors: Ilva Trapiņa (dzimusi Poudžiunas)**

**stud. apl. Nr.: Dokt06004**

**Darba vadītājs: Dr.habil.biol, prof. Nikolajs Sjakste**

**Recenzenti: Dr.med. Gustavs Latkovskis**

**Dr. med. Rita Lugovska**

**Prof. Elza Husnutdinova**

RĪGA, 2010

# SATURS

KOPSAVILKUMS .....	6
SUMMARY .....	7
IEVADS .....	8
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	11
<b>1.1. 2.TIPA CUKURA DIABĒTS .....</b>	<b>11</b>
1.1.1. Slimības patoģenēze un izplatība .....	11
1.1.2. 2.tipa cukura diabēta molekulārā ģenētika .....	12
<b>1.2. JUVENĪLAIS IDIOPĀTISKAIS ARTRĪTS.....</b>	<b>16</b>
1.2.1. Slimības patoģenēze un izplatība .....	16
1.2.2. JIA molekulārā ģenētika: asociāciju meklējumi.....	18
<b>1.3. CILVĒKA GENOMA 14. HROMOSOMA .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4. PROTEASOMAS .....</b>	<b>25</b>
1.4.1. Proteasomu vispārīgais apraksts.....	25
1.4.2. Proteasomas aktivatori.....	29
1.4.3. Proteasomu neproteolītiskā darbība.....	33
1.4.4. Proteasomu saistība ar slimībām .....	34
1.4.5. Proteasomu proteīnu gēni cilvēka genomā.....	36
1.4.6. Proteasomu sistēmas proteīnu gēnu saistība ar slimībām.....	39
2. MATERIĀLI UN METODIKA .....	43
<b>2.1. DNS PARAUGU KOLEKCIJA.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2. DNS IZDALĪŠANA UN KONCENTRĀCIJAS NOTEIKŠANA .....</b>	<b>45</b>
<b>2.3. ANALIZĒTIE LOKUSI UN TO GENOTIPĒŠANAS METODEDES .....</b>	<b>46</b>
2.3.1. Mikrosatelītu analīze .....	47
2.3.2. SNP analīze .....	52
<b>2.4. MARĶIERU FUNKCIONALITĀTES BIOINFORMĀTISKĀ ANALĪZE .....</b>	<b>57</b>
2.4.1. Polimorfismu sekvenču izmaiņu ietekme uz DNS un RNS sekundārajām struktūrām.....	57
2.4.2. Polimorfismu saītu sekvenču izmaiņu ietekme uz DNS liekumiem.....	58
2.4.3. Polimorfismu saītu saistība ar transkripcijas faktoriem un to modifikācija atkarībā no sekvenču izmaiņām .....	58
2.4.4. Polimorfismu saītu sekvenču izmaiņu ietekme uz mikroRNS piesaisti un/vai veidošanos .....	59
2.4.5. Polimorfismu saītu sekvenču ietekme uz matricas RNS veidošanos.....	59

<b>2.5. DATU APSTRĀDE UN STATISTISKĀ ANALĪZE .....</b>	<b>59</b>
<b>3. REZULTĀTI .....</b>	<b>62</b>
<b>3.1. 14Q HROMOSOMAS POLIMORFISMI.....</b>	<b>62</b>
3.1.1. 14q13 reģiona mikrosatelītu izpēte.....	62
3.1.2. 14q proteasomu proteīnu gēnu SNP analīze un atlase.....	64
<b>3.2. 2. TIPA CUKURA DIABĒTA ASOCIĀCIJAS ANALĪZE .....</b>	<b>66</b>
3.2.1. Lokusa 14q13 HSMS marķieru asociācijas analīze ar T2DM .....	67
3.2.2. SNP asociācijas analīze ar T2DM .....	71
<b>3.3. JUVENĪLĀ IDIOPĀTISKĀ ARTRĪTA ASOCIĀCIJAS ANALĪZE.....</b>	<b>74</b>
3.3.1. Lokusa 14q13 HSMS marķieru asociācijas analīze ar JIA.....	74
3.3.2. SNP asociācijas analīze saistībā ar JIA .....	80
<b>3.4. IESPĒJAMO FUNKCIJU BIOINFORMĀTISKĀ ANALĪZE POLIMORFISMIEM SAISTĪTIEM AR JIA UN T2DM.....</b>	<b>84</b>
3.4.1. HSMS marķieri.....	84
3.4.2. Viena nukleotīda polimorfismi.....	88
<b>4. DISKUSIJA .....</b>	<b>92</b>
<b>4.1. 14Q HROMOSOMAS POLIMORFISMI.....</b>	<b>92</b>
4.1.1. 14q13 reģiona MS polimorfismi un to variabilitāte .....	92
4.1.2. 14q proteasomu proteīnu gēnu SNP .....	93
<b>4.2. 2.TIPA CUKURA DIABĒTA ASOCIĀCIJAS ANALĪZE .....</b>	<b>94</b>
4.2.1. Lokusa 14q13 saistība ar T2DM .....	94
4.2.2. 14q proteasomu proteīnu gēnu saistība ar T2DM .....	96
<b>4.3. JUVENĪLĀ IDIOPĀTISKĀ ARTRĪTA ASOCIĀCIJAS ANALĪZE.....</b>	<b>97</b>
4.3.1. Lokusa 14q13 saistība ar JIA.....	97
4.3.2. 14q proteasomu proteīnu gēnu saistība ar JIA .....	100
<b>4.4. AR SLIMĪBĀM ASOCIĒTO POLIMORFISMU IESPĒJAMĀ FUNKCIONĀLĀ NOZĪME.....</b>	<b>103</b>
4.4.1. HSMS marķieru iespējamā funkcionālā nozīme .....	103
4.4.2. SNP marķieru iespējamā funkcionālā nozīme.....	105
<b>4.5. REZULTĀTU KOPSAVILKUMS .....</b>	<b>107</b>
<b>SECINĀJUMI .....</b>	<b>108</b>
<b>IZMANTOTĀ LITERATŪRA .....</b>	<b>111</b>
<b>PUBLIKĀCIJAS UN PREZENTĀCIJAS .....</b>	<b>133</b>
<b>PATEICĪBA .....</b>	<b>138</b>
<b>PIELIKUMI.....</b>	<b>140</b>

## SAĪSINĀJUMI

14ch	– 14.hromosoma
14q	– 14.hromosomas garais plecs
3'UTR	– Gēna 3' netranslējamā daļa
5'UTR	– Gēna 5' netranslējamā daļa
95% CI	– Konfidences intervāls ( <i>confidence intervals</i> ) pie 95%
ANA	– Antinukleārās antivielas
ATF	– Adenozīntrifosfāts
BMC	– Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs
BMI	– Ķermeņa svara indekss ( <i>body mass index</i> )
bp	– Bāzu pāris
cDNS	– Kodējošā dezoksiribonukleīnskābe
del	– Delēcija
DNS	– Dezoksiribonukleīnskābe
HapMap	– Starptautisks projekts cilvēka genoma haplotipu kartes izveidošanai ( <a href="http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/">hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )
HLA	– Cilvēka leikocītu antigēns ( <i>Human leukocyte antigen</i> )
HSMS	– Mikrosatelītu nosaukums „Human Salaspils Microsatellites”
ins	– Insercija
JIA	– Juvenīlais idiopātiskais artrīts
JIoA	– Juvenīlais idiopātiskais oligoartrīts
JIpA	– Juvenīlais idiopātiskais poliartrīts
kDa	– Kilodaltons
LMP2	– Liela multifunkcionālā peptidāze 7 (apzīmēts arī ar PSMB8)
LMP7	– Liela multifunkcionālā peptidāze 2 (apzīmēts arī ar PSMB9)
MAF	– Retās alēles frekvence ( <i>minor allele frequency</i> )
MALDI-TOF MS	– Polimorfismu genotipēšanas metode ar MALDI-TOF masas spektrometru
MECL-1	– Multikatalītiskā endopeptidāzes kompleksa subvienība (apzīmēts arī ar PSMB10)
microRNS	– Mikro ribonukleīnskābe
mM	– Milimols
mRNS	– Matricas ribonukleīnskābe
MS	– Mikrosatelīts
NCBI	– Nacionālais Biotehnoloģijas informācijas centrs ( <i>National Center for Biotechnology Information, ASV</i> ; <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )
OR	– Starpību jeb izredžu attiecība

<i>P</i>	– Statistiskā ticamība
PCR	– Polimerāzes ķēdes reakcija
PSMA	– Proteasomu alfa tipa subvienība
PSMB	– Proteasomas beta tipa subvienība
PSMC	– Proteasomas 26S ATFāzes subvienība
PSME	– Proteasomas aktivizatora subvienība
RESP	– Restrikcijas enzīma saita polimorfisma jeb restrikcijas enzīma alēlspecifiskā saita metode
RF	– Reimatoīdais faktors
RR	– Relatīvais risks
SNP	– Viena nukleotīda polimorfisms ( <i>single nucleotide polymorphisms</i> )
SS	– Sekundārā struktūra
T2DM	– 2. tipa cukura diabēts (no slimības angliskā nosaukuma <i>2 type diabetes mellitus</i> )
TF	– Transkripcijas faktors
TFBS	– Transkripcijas faktoru piesaistes vieta ( <i>transcription factor binding site</i> )
Ub	– Ubikvitīns
μl	– Mikrolitrs

## KOPSAVILKUMS

Postgenoma ēras iestāšanās 21.gadsimtā izraisīja interesi par multifaktoriālo slimību ģenētiskajiem aspektiem, iespējamām saistībām starp kandidātģēnu alēļu variācijām un hroniskajām slimībām. Mēs savos pētījumos esam pievērsuši uzmanību 2.tipa cukura diabētam (T2DM) un juvenīlajam idiopātiskais artrītam (JIA). Asociācijas pētījumiem ar abām slimībām tika izvēlēti vairāki 14q hromosomu lokusi.

Cilvēka 14. hromosoma ir viena no piecām akrocentriskajām hromosomām, kurā ir lokalizēti astoņi proteasomu proteīnu gēni, tai skaitā, *PSMB5*, *PSMB11*, *PSME1* un *PSME2* lokusā 14q11.2, *PSMA6* lokusā 14q13.1, *PSMC6* lokusā 14q21.1, *PSMA3* lokusā 14q23 un *PSMC1* lokusā 14q32.11.

Darba mērķis bija raksturot saistību starp 14q polimorfismiem un JIA un T2DM Latvijas populācijā.

Piecus HSMS mikrosatelītu alēles un septiņus SNP (*PSMB5* gēna SNP c.70C>T, *PSMA6* gēna SNP c.-4543\_-4544insC, c.-110C>A un c.-8C>G, *PSMC6* gēna polimorfismu c.86-104A>G un c.86-46C>T un c.543+138G>A lokalizētu *PSMA3* gēnā) genotipējām divos gadījuma/kontroles pētījumos, attiecīgi ar T2DM un JIA.

Sekvenējot noteicām, ka Latvijas populācijā HSMS602 marķiera motīvā ir divas mainīgas daļas jeb (CAA)<sub>n</sub>(A)<sub>m</sub>, HSMS701 ir ar vienkāršu atkārtojumu (AC)<sub>n</sub>.

Konstatējām, ka Latvijas populācijā T2DM ir saistīts ar HSMS006 alēli (TG)<sub>22</sub>, HSMS801 alēli (AC)<sub>24</sub> un HSMS602 alēli (CAA)<sub>8</sub>, kā arī ar HSMS602 homozigoto genotipu (CAA)<sub>8/8</sub> un HSMS801 heterozigoto genotipu (CA)<sub>20/22</sub>. Analizējot proteasomu proteīnu gēnu SNP, pierādījām, ka *PSMA6* gēna c.-8C>G genotipu sadale ir saistīta ar T2DM Latvijas populācijā.

Ar JIA kopumā Latvijas populācijā ir saistītas HSMS006 alēles (TG)<sub>19</sub> un (TG)<sub>23</sub>, HSMS701 alēle (AC)<sub>20</sub> un HSMS801 alēle (AC)<sub>17</sub>, bet HSMS006 alēle (TG)<sub>20</sub>, HSMS702 alēles (TG)<sub>10</sub> un HSMS602 alēles ar 178 bp ir saistīta ar JIoA un HSMS702 marķiera alēle (TG)<sub>13</sub> - ar JIpA. Turklāt vairāki iepriekš minēto mikrosatelītu genotipi ir saistīti ar JIA Latvijas populācijā. SNP analīze uzrādīja, ka *PSMA6* gēna c.-4543\_-4544insC un c.-110C>A un *PSMC6* gēna c.86-104A>G alēļu sadale ir saistīta ar JIA un tā vieglāko formu - oligoartītu. Turklāt c.86-104A>G retā alēle ir riska alēle oligoartrīta attīstībā (OR = 2,43). SNP c.-110C>A un c.86-104A>G genotipu sadale ir saistīta ar JIA un JIoA, bet *PSMA3* gēna SNP c.543-138G>A genotipu sadale - ar JIA un JIpA.

# SUMMARY

## Association of Chromosome 14 proteasomal gene polymorphisms with metabolic and autoimmune diseases

Advent of the post-genome era in the 21<sup>st</sup> century switched interest of many researchers to study of genetic component of multifactorial diseases, possible association of allelic variants of candidate genes with different chronic diseases are intensively sought. We have focused our attention on type 2 diabetes mellitus (T2DM) and juvenile idiopathic arthritis (JIA). The single 14q chromosome locus was chosen for association studies with both diseases.

Human chromosome 14 is one of five acrocentric chromosomes, harbouring eight proteasomal genes, including, *PSMB5*, *PSMB11*, *PSME1* and *PSME2* in locus 14q11.2, *PSMA6* in locus 14q13.1, *PSMC6* in locus 14q21.1, *PSMA3* in locus 14q23 and *PSMC1* in locus 14q32.11.

Goal of the study was to characterize association of 14q polymorphisms with T2DM and JIA in the Latvian population.

Five HSMS markers and seven SNPs (c.70C>T of *PSMB5*, c.-4543\_-4544insC, c.110C>A and c.-8C>G of *PSMA6*, c.86-104A>G and c.86-46C>T of *PSMC6* and *PSMA3* SNP c.543+138G>A) were genotyped in two case/control studies with T2DM and JIA.

Direct sequencing revealed two variable components of the (CAA)<sub>n</sub>(A)<sub>m</sub> motif in HSMS602 marker and simple repeat motive (AC)<sub>n</sub> of the HSMS701 in Latvian population.

It was revealed that alleles (TG)<sub>22</sub> of HSMS006, (AC)<sub>24</sub> of HSMS801 and (CAA)<sub>8</sub> of HSMS602 and also homozygote genotype (CAA)<sub>8/8</sub> of HSMS602 and heterozygote genotype (CA)<sub>20/22</sub> are associated with T2DM in Latvian population. By analyzing SNP of proteasomal genes, we have proved that genotypes distribution of c.-8C>G of *PSMA6* gene is associated with T2DM in Latvian population.

Alleles (TG)<sub>19</sub> and (TG)<sub>23</sub> of HSMS006, (AC)<sub>20</sub> of HSMS701 and (AC)<sub>17</sub> of HSMS801 are associated with JIA in Latvian population, but alleles (TG)<sub>20</sub> of HSMS006, (TG)<sub>10</sub> of HSMS702 and 178bp of HSMS602 – with JIoA, and (TG)<sub>13</sub> of HSMS702 – with JIpA. Also several genotypes of all microsatellites are associated with JIA in Latvian population. In study of SNP were develop that distribution of alleles of c.-4543\_-4544insC and c.-110C>A of *PSMA6* and *PSMC6* SNP c.86-104A>G are relevant to JIA and JIoA, besides rear allele of c.86-104A>G is risk factor of JIoA (OR = 2.43). Genotype distribution of SNPs c.-110C>A and c.86-104A>G are associated with JIA and JIoA, but c.543-138G>A of *PSMA3* – with JIA and JIpA.

## IEVADS

Postgenoma ēras iestāšanās 21.gadsimtā izraisīja interesi pētīt multifaktoriālo slimību ģenētiskos aspektus, iespējamās saistībās starp kandidātģēnu alēļu variācijām un hroniskajām slimībām, tai skaitā metaboliskajām un autoimmūnajām patoloģijām. Mēs savos asociāciju pētījumos esam pievērsuši uzmanību pēdējām divām minētajām slimību grupām. Šīs slimības ir juvenīlais idiopātiskais artrīts (JIA), kas izpaužas bērnībā, un 2. tipa cukura diabēts (T2DM; *type 2 diabetes mellitus*), kas skar pārsvarā pusmūža un vecākus cilvēkus. Asociācijas pētījumiem ar abām slimībām izvēlējamies vairākus 14.hromosomas garā pleca (14q) lokusus.

Bērnu mirstības un invaliditātes indikatori raksturo valsts labklājību. Bērnu mirstība Latvijā ir starp augstākajiem rādītājiem Eiropā un augstākais Baltijas valstīs. Attīstītās valstīs bērnu mirstību un invaliditāti lielā mērā nosaka iedzimtība. Bērnu hroniskās autoimūnās un imūnmediētās slimības, tai skaitā juvenīlais idiopātiskais artrīts, ir būtisks darba nespējas un invaliditātes cēlonis. Šīs slimības ir multifaktoriālas, tās attīstās uz ģenētiskās bāzes kā vides un slimnieka organisma mijiedarbības rezultāts (Rumba-Rozenfelde u.c., 2009a). Daudzās populācijas ir pierādīta, JIA uzņēmības gēni ir *HLA* lokuss un *PTPN22* gēns. Citi gēni, piemēram, *MIF*, *IL6*, *IL10*, *TNF* un *VTCN1*, arī uzrāda saistību ar JIA un/vai tā subtipiem dažādās populācijās. Tomēr, iepriekš minētie gēni ir atbildīgi tikai par nelielu ģenētisko faktoru devumu daļu, un ir jābūt citiem uzņēmības lokusiem jeb „JIA rika alēlēm”, kas ir iesaistīti dažādos metabolisma ceļos, ietekmējot slimības patoģenēzi un/vai jutību pret terapiju (Glass, Giannini, 1999; Hinks et al., 2009a). Tādējādi tādu marķieru meklējumi, kas būtu saistīti ar JIA augstu asociācijas pakāpi, joprojām ir aktuāla problēma.

2. tipa cukura diabēta un ar to saistītie vielmaiņas traucējumu (aptaukošanās, hipertensija utt.) sastopamība Latvijas populācijas ir salīdzinoši augsta. Tradicionālā augstu kaloriju diētas un iedzīvotāju paradumi veicina šo traucējumu attīstību. Tomēr T2DM attīstības ģenētiskā izcelsme ir nozīmīga. Tādējādi slimības ģenētiskās izcelsmes pētījumi piesaista daudzus pētniekus; ir veikti pētījumi, lai meklētu un noteiktu gēnus, kas ir iesaistīti patoloģijas attīstībā. Vairāku ogļhidrātu, lipīdu un insulīna regulācijas metabolismā un/vai to darbības ceļos iesaistīto hormonu, receptoru un enzīmu gēnu mutācijas vai alēļu variācijas ir pārbaudītas saistībā ar T2DM un/vai aptaukošanos. Šo pētījumu rezultātus bieži ir grūti interpretēt. Pozitīva korelācija vienā populācijā netiek atkārtota citā.

Pēdējo gadu sasniegumi šūnu bioloģijā skaidri parāda, ka efektīva un pareiza biopolimēru noārdīšana ir svarīga šūnas funkcionēšanai, tik pat cik pareiza olbaltumvielu



biosintēze. Ubikvitīna – proteasomu sistēma veic proteīnu degradāciju lielā apjomā. Vairāku slimību attīstība ir saistīta ar nepareizu transkripcijas faktoru, onkogēnu produktu un/vai enzīmu degradāciju, kam par iemeslu ir traucējumi ubikvitīna – proteasomu sistēmā (Ciechanover et al., 2000). Proteasomas ir iesaistītas insulīna darbības mehānismā, tādejādi iespējams cukura diabēta attīstībā. Gan *in vitro*, gan *in vivo* pētījumos ir pierādīts, ka insulīns ietekmē proteasomu aktivitāti (Fawcett et al., 2001). Cukura diabēta indukcija izraisa proteasomu subtipu pārkārtošanos (Merforth et al., 2003). Nozīmīga proteasomu proteīnu gēnu *PSMA6* un *PSMA3* mRNS ekspresijas izmaiņas ir konstatētas cilvēka skeleta muskuļos pēc insulīna ievadīšanas (Rome et al., 2003). Turklāt proteasomu aktivitātes nomākšana samazina diabēta izpaušanos (Petrovic et al., 2004). Mūsdienās ir izteikts viedoklis, ka proteasomas varētu būt iesaistītas 2.tipa cukura diabēta patoģenēzē. Šis pieņēmums ir veidots, balstoties uz to, ka ubikvitīna – proteasomu sistēma ir iesaistīta insulīna receptoru darbībā, kontrolējot insulīna receptora 1. un 2. substrāta daudzumu, un insulīna degradācijā. Ubikvitinēšana regulē transkripcijas faktoros un kodola receptorus, kas nodrošina insulīna atkarīgo gēnu ekspresiju (Rome et al., 2004). Tātad ģenētiskās variācijas gēnos, kas kodē proteasomu proteīnus, varētu būt nozīmīgas 2.tipa cukura diabēta patoģenēzē.

Līdzīgi, proteasomas ir iesaistītas autoimūno slimību patoģenēzē, jo tās piedalās antigēnu veidošanās procesā. Ir zināms, ka proteasomu proteīna LMP2 gēna polimorfisms ietekmē uzņēmību pret juvenīlo idiopātisko artrītu un ietekmē HLA-B27 saistītā JIA smaguma pakāpi (Pryhuber et al., 1996). Citu ubikvitīna – proteasomu sistēmas proteīnu gēnu alēļu variācijas varētu veicināt autoimūno slimību attīstību, kontrolējot IgE veidošanos un kontrolējot „imūn”-proteasomu kompleksa efektivitāti imunitātes atbildes metabolisma kaskādē.

Meklējot perspektīvus lokusus asociācijas pētījumiem ar T2DM un JIA, mūsu grupa pievērsa uzmanību iespējamai saistībai starp cilvēka 14. hromosomu un autoimūnām un/vai metaboliskām slimībām. 14. hromosomas garā pleca lokusi izrādījās īpaši perspektīvi tieši autoimūno slimību izpētei. Lokusus atrodas vairāki proteasomu gēni, tai skaitā, lokusā 14q11.2 proteasomas beta tipa 5. un 11. subvienība (attiecīgi *PSMB5* un *PSMB11*) un proteasomas aktivatora 1. un 2. subvienība (attiecīgi *PSME1 (PA28α)* un *PSME2 (PA28β)*), lokusā 14q13.1 proteasomas alfa tipa 6. subvienība (*PSMA6*), kas ir viskonservatīvākais no proteasomu proteīnu alfa saimes gēniem (Bey et al., 1993) proteasomas 26S ATFāzes 6. subvienība (*PSMC6* jeb *Rpt4*) lokusā 14q21.1, alfa tipa 3. subvienība (*PSMA3*) lokusā 14q23 un proteasomas 26S ATFāzes 1.subvienība (*PSMC1* jeb *Rpt2*) lokusā 14q32.11, kam ir

pierādīta saistība gan ar 1. tipa (Mein et al., 1998), gan 2. tipa cukura diabētu (Permuntt et al., 2001).

Visbeidzot ir jāpiemin, ka vairums asociācijas pētījumu rezultāti saistībā ar multifaktoriālajām slimībām dod negatīvu rezultātu vai neatkārtojas vairākās populācijās. Mēs iesakām, ka vairāku polimorfismu pētījumi ar tūkstošs paraugiem būtu jāaizstāj ar pētījumiem, kuros katram perspektīvajam polimorfismam veiktu rūpīgu funkciju analīzi. Mēs šī pētījuma sākuma daļu veicām ar domu: izvērtēt polimorfismu sekvenču iespējamo funkcionālo nozīmi, analizējot *in silico* transkripcijas faktoru piesaistes vietu un sekundāro struktūru izmaiņas atkarībā no mikrosatelītu atkārtojumu skaita vai nukleotīdu maiņas. Tika veikta arī DNS liekumu un procesingā iesaistīto proteīnu piesaistes vietas prognozēšana *in silico* katra polimorfiska reģionam.

**Pētījuma mērķis:** Raksturot saistību starp 14q proteasomu proteīnu gēnu un to rajonu polimorfismiem un juvenīlo idiopātisko artrītu un/vai 2.tipa cukura diabētu Latvijas populācijā.

**Pētījuma uzdevumi:**

1. Noteikt 14.hromosomas garā pleca proteasomu proteīnu gēnu un to rajonu polimorfismus un izvēlēties perspektīvus polimorfismus asociācijas pētījumiem.
2. Izstrādāt molekulāros marķierus, kuri būtu piemēroti 14.hromosomas garā pleca proteasomu gēnu polimorfismu raksturošanai.
3. Noteikt precīzu HSMS mikrosatelītu reģionu motīvus un mainīgās daļas Latvijas populācijā.
4. Veikt atlasīto polimorfismu (mikrosatelītu un viena nukleotīda polimorfismu) pirmējo raksturošanu Latvijas populācijā.
5. Izpētīt saistību starp 2.tipa cukura diabēta un 14.hromosomas garā pleca lokusa 14q13 HSMS mikrosatelītiem un izvēlētajiem viena nukleotīda polimorfismiem.
6. Izpētīt saistību starp juvenīlo idiopātisko artrītu un 14.hromosomas garā pleca lokusa 14q13 HSMS mikrosatelītiem un izvēlētajiem viena nukleotīda polimorfismiem.
7. Veikt *in silico* analīzi statistiski nozīmīgajiem 14.hromosomas garā pleca proteasomu proteīnu gēnu polimorfismiem.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. 2.tipa cukura diabēts

### 1.1.1. SLIMĪBAS PATOĢENĒZE UN IZPLATĪBA

2. tipa cukura diabēts (T2DM; *type 2 diabetes mellitus*), agrāk saukts arī par insulīna neatkarīgo cukura diabētu, ir metaboliska slimība, kuras patoģenēzes mehānisma pamatā ir gan ārējo (aptaukošanās, fiziskās aktivitātes trūkums un sēdošais dzīvesveids), gan iekšējo (iedzimtība) faktoru ietekme. Otrā tipa cukura diabēts ir endokrinoloģiska slimība, kurai raksturīga nozīmīgas izmaiņas aizkuņģa dziedzera, aknu un muskuļšķiedru galvenajos metabolisma procesos. Pacientiem ir izmainīta taukaudu jutība pret insulīnu, tādējādi veidojas insulīna rezistence (Karim et al., 2006; Kato et al., 2006; Marchetti et al., 2006; Tokuyama et al., 2006; Jin, Patti, 2009; Lin, Sun, 2010). Otrā tipa cukura diabēta pacientiem ir novērojami dažādas pakāpes insulīna sintēze un/vai tā metabolisma izmaiņas, robežās no insulīna rezistences ar relatīvu insulīna deficītu līdz insulīna sekrēcijas defektam (Genuth et al., 2003; Lin, Sun, 2010).

Otrā tipa diabēta gadījumā organismā veidojas hiperglikēmija, kas ir vairāku metabolisma procesu izmaiņu rezultāts, tai skaitā, aizkuņģa dziedzera saliņās  $\beta$  šūnās pasliktinās insulīna sekrēcija un palielinās  $\beta$  šūnu veidošanās, glikoneoģenēzes intensifikācijas rezultātā aknās palielinās glikozes produkcija (Petersen, Shulman, 2006; Lin, Sun, 2010).

2003. gadā ar T2DM slimoja ap 194 miljoni pasaules iedzīvotāju, bet tika prognozēts, ka tuvākajos 20 gados šis skaitlis palielināsies vidēji par 70%, tas ir no 20% Eiropā līdz 111% Āfrikā (Karim et al., 2006; Petersen, Shulman, 2006; Jin, Patti, 2009). Prognozē, ka līdz 2025. gadam T2D slimnieku skaits būs sasniedzis 333 miljonus (Petersen, Shulman, 2006), bet jau 2030.gadā – 366 miljonus (Schinner et al., 2005; Karim et al., 2006; Lin, Sun, 2010). Tādējādi šī slimība ir viena no izplatītākajām, turklāt aptuveni 5 līdz 10% no daudzu valsts veselības budžetiem tiek tērēts tikai šīs slimības pacientu aprūpei (Lin, Sun, 2010).

Otrā tipa cukura diabēts izraisa pacientiem dzīves ilguma saīsināšanos, kā arī ir izmaina tās kvalitāti. Pacientiem palielinās risks saslimt ar dažādām sirds un nieru slimībām, kā arī ir palielināts akluma, amputāciju, īpaši apakšējo ekstremitāšu, un triekas risks. Šīs slimības pacientiem 75% gadījumos nāves iemesls ir koronārā sirds slimība. Koronāro nepietiekamības risks T2DM pacientiem ir 2 līdz 5 reizes lielāks nekā veseliem indivīdiem (Freeman, Cox, 2006; Prokopenko et al., 2008).

Liela nozīme slimības etioloģijā ir dzīves stilam jeb ārējiem vides faktoriem, starp kuriem var minēt aptaukošanos jeb korpulenci, fizisko treniņu trūkumu un sēdošu dzīvesveidu, kas

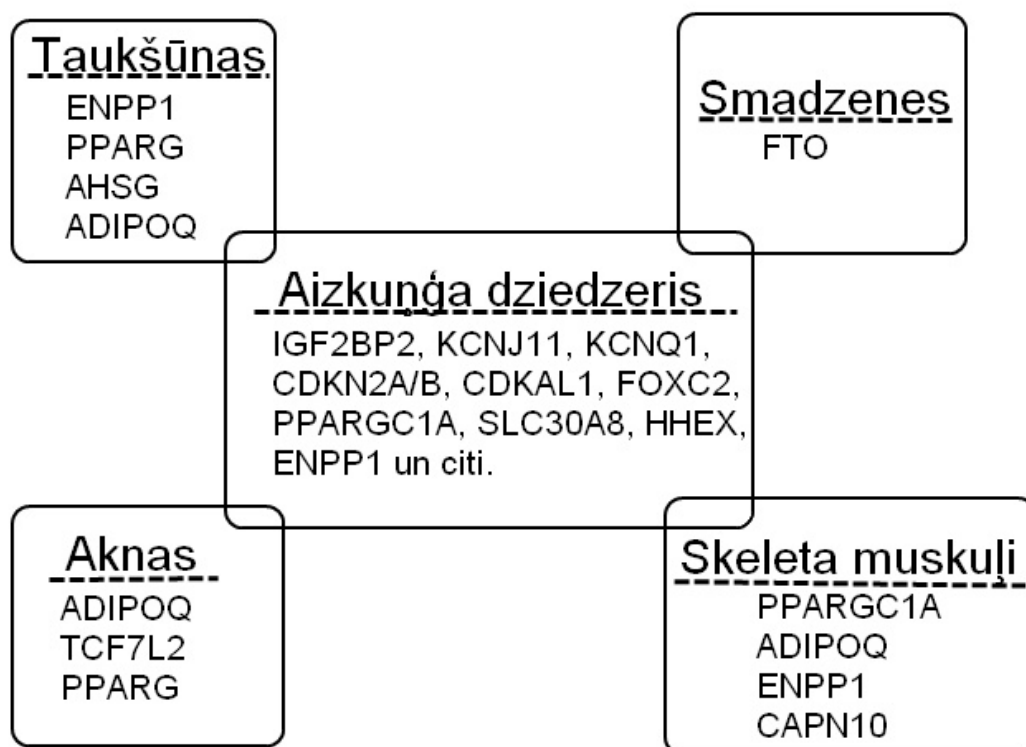
bieži ir veicinošais faktors insulīna rezistences attīstībai. Tas nozīmē, ka organisma šūnas nespēj atbildēt uz insulīna signāliem (Goldstein, 2002; Lin, Sun, 2010). Ir pierādīts, ka daudziem T2DM pacientiem ķermeņa svara indekss (BMI; *body mass index*) ir palielināts, tas ir virs 25, kas ir normāla svara indeksa augšējā robeža (Petersen, Shulman, 2006).

Otrā tipa cukura diabēts ir saistīts ar novecošanu jeb slimība izpaužas vairāk cilvēkiem pēc 40 gadiem. Salīdzinot ar gados jaunākiem cilvēkiem, vecāka gadu gājuma personām ir nosliece uz insulīna rezistenci, kā arī uz samazinātu insulīna stimulēto glikozes metabolismu muskuļos un uz palielinātu tauku uzkrāšanos muskuļos un aknās (Petersen, Shulman, 2006). Vairākās populācijas līdz 20% iedzīvotāju virs 65 gadiem ir T2DM slimnieki (Lin, Sun, 2010). Zinātnieki prognozē, ka tuvākajos gados šis skaitlis strauji augs, saistībā ar daudzu populāciju iedzīvotāju aptaukošanos (Jin, Patti, 2009).

Slimības attīstībā svarīgs ir arī iedzimtības faktors, ko pierāda vairāki fakti, piemēram, monozigotiskiem dvīņiem 70 līdz 80% gadījumos slimība izpaužas abiem, bet dizigotiskiem dvīņiem konkordance sastopama 10 – 30% gadījumos (Goldstein, 2002; Ridderstråle, Groop, 2009). Ģimenēs, kurās kāds no vecākiem slimo ar T2DM, risks saslimt pēcnācējam ir 40% (Ridderstråle, Groop, 2009). Savukārt, ja slimo abi vecāki, šī iespējamība sasniedz pat 70% (Morino et al., 2005; Ridderstråle, Groop, 2009; Lin, Sun, 2010). Salīdzinot ar 2.tipa cukura diabēta saslimšanas risku populācijā, pirmās pakāpes radniekiem tas palielinās līdz pat trim reizēm (Ridderstråle, Groop, 2009; Lin, Sun, 2010).

### **1.1.2. 2.TIPA CUKURA DIABĒTA MOLEKULĀRĀ ĢENĒTIKA**

Pēdējos gados 2.tipa cukura diabēta risks ir pētīts, ne tikai analizējot metaboliskos procesus, bet arī meklējot saistību ar konkrētu proteīnu kodējošiem gēniem. Molekulārās ģenētikas nozares attīstība ir ļāvusi pētīt ne tikai atsevišķu lokusus, bet meklēt gēnu kandidātus uzreiz visā cilvēka genomā (*genome-wide association study*). Kopš 2007.gada visa genoma pētījumiem (Scott et al., 2007; Sladek et al., 2007; Salonen et al., 2009) ir pierādīta statistiski ticama saistība ( $P < 0,05$  – atsevišķu lokusu pētījumos, vai  $< 5 \times 10^{-8}$  – visa genoma saistību pētījumos; McCarthy, Zeggini, 2009) starp T2DM un 85 jauniem vai iepriekš pētītiem gēniem vai lokusiem, tie ir tauksūnu proteīnu gēni, piemēram, plazmas šūnu membrānas glikoproteīns 1 (ENPP1; Bouhaha et al., 2008; Gaulton et al., 2008), un aizkuņģa dziedzerā šūnu proteīnu gēni, piemēram, ciklīna atkarīgās kināzes inhibitors 2a jeb CDKN2A (Duesing et al., 2008b). 1.1.attēlā ir redzams biežāk pētīto gēnu sintezēto proteīnu audu un orgānu specifiskums. Kā redzams visbiežāk ir pētīti gēni, kas kodē aizkuņģa dziedzerā šūnās esošos proteīnus, kas ir izskaidrojams ar to, ka T2DM pamatā ir beta šūnu funkciju izmaiņas (Jin, Patti, 2009).



**1.1.attēls** Ar 2.tipa cukura diabētu saistīto ( $P < 0,05$ ) gēnu sintezēto proteīnu audu un orgānu specifiskums.

1.1.tabula apkopo ar 2. tipa cukura diabētu saistīto gēnu lokalizāciju cilvēka 23 hromosomās. Ir redzams, ka visvairāk ar slimību saistītie gēni ir atrasti 1., 3. un 17.hromosomā. Līdz šim ar T2DM saistītie gēni nav atrasti tikai trīs hromosomās, tai skaitā abās dzimuma hromosomās.

Ir pierādīts, ka T2DM slimībai ir ģenētiska saistība ne tikai ar gēniem, kas kodē insulīna atkarīgajos metabolisma ceļos iesaistītus proteīnus, bet arī ar gēniem, kas regulē insulīna atkarīgo metabolisma ceļu proteīnu gēnu ekspresiju, jeb ar transkripcijas faktoru gēniem, piemēram, augšup izvietotais transkripcijas faktors 1 jeb USF1 (*upstream transcription factor 1*; Meex et al., 2009). Kā arī ir konstatēts, ka 2. tipa cukura diabēts ir saistīts ar ubikvitīna – proteasomu degradācijas ceļu, piemēram, ar ubikvitīna ligāzes E3 komponentu 1 jeb UBR1 (Yamaguchi et al., 2008).

Viens no pirmajiem gēniem, kura mutācijas tika saistītas ar T2DM, bet produkts ir iesaistīts proteīnu degradācijā, ir kalpaīns-10 (*CAPN10*, *calpain-10*; Baier et al., 2000; Horikawa et al., 2000), kas ir nelizosomas cisteīna proteāze ekspresēta dažādos audos, tai skaitā, sirdī, skeleta muskuļos, aknās un aizkuņģa dziedzerī (Baier et al., 2000; Horikawa et al., 2000; Tsuchiya et al., 2006; Ling et al., 2009). Tsuchija (*Tsuchiya*) ar kolēģiem 2006.gadā apkopēja vairāku zinātnieku dažādu populāciju pētījumus, kuros analizējas *CAPN10* mutāciju saistība ar T2DM. Kopējais secinājums bija, ka šīs mutācijas ir ļoti nozīmīgas, bet ir svarīgi

kādā kombinācijā tās ir sastopamas genomā. Dažas kombinācijas saslimšanas risku palielina līdz pat 168%, bet citas šo risku samazina līdz 15% (Tsuchiya et al., 2006).

**1.1. tabula** Ar T2DM statistiski ticami ( $P < 0,05$ ) saistīto gēnu vai lokusu izvietojums cilvēka hromosomās (dati apkopoti no 2007.gada visa genoma pētījumu publikācijām un no publikācijām sākot ar 2008.gadu\*).

Hromosoma	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Gēnu vai lokusu skaits	12	3	10	4	2	5	4	2
Piezīme	8 ģisajā plecā un 4 garajā plecā		3 ģisajā plecā un 7 garajā plecā					
Hromosoma	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.
Gēnu vai lokusu skaits	4	4	7	2	1	1	4	3
Piezīme	Pa diviem gēniem lokusus p21 un q34.2		5 ģisajā plecā					
Hromosoma	17.	18.	19.	20.	21.	22.	X	Y
Gēnu vai lokusu skaits	9	-	1	2	3	2	-	-
Piezīme	Četri gēni ģisā pleca lokusā p13, pārējie garajā plecā			Abi lokusā q13				

\*Izmantotās publikācijas: Scott et al., 2007; Sladek et al., 2007; Andersen et al., 2008; Bouhaha et al., 2008; Duesing et al., 2008a; Duesing et al., 2008b; Galanakis et al., 2008; Gaulton et al., 2008; Hertel et al., 2008; Qu et al., 2008a; Qu et al., 2008b; Ramachandran et al., 2008; Sanghera et al., 2008; Xiang et al., 2008; Baroudi et al., 2009; Bossé et al., 2009; Choquet et al., 2009; Ezzidi et al., 2009; Jonsson et al., 2009; Meex et al., 2009; Prokopenko et al., 2009; Rees et al., 2009; Salonen et al., 2009; Sanghera et al., 2009; Song et al., 2009; Szopa et al., 2009; Tabara et al., 2009; Yajnik et al., 2009; Iordanidou et al., 2010; Jing et al., 2010; Perry et al., 2010; Sanghera et al., 2010; Tan et al., 2010.

Pēdējos gados lielu nozīmi vērš gēnu ekspresijas analīzei saistībā ar analizējamām slimībām. Linga ar kolēģiem (Ling et al., 2009) analizēja kalpaīna-10 ekspresiju tieši aizkuņģa dziedzera  $\beta$  šūnas pacientiem ar T2DM un salīdzināja ar veseliem donoriem. Viņi konstatēja, ka ir statistiska atšķirība starp *CAPN10* gēna ekspresiju T2DM pacientiem un veseliem cilvēkiem.

Daudzi gēni ir pētīti tikai vienreizējos pētījumos, tai skaitā arī analizējot visu genomu, tādejādi to rezultāti ir attiecināmi tikai uz konkrētu populāciju. Citiem gēniem asociācija ar T2DM ir pierādīta vairākos neatkarīgos pētījumos (1.2.tabula):

**1.2. tabula** Gēni, kuriem konstatēta asociācija ar 2.tipa cukura diabētu neatkarīgos pētījumos.

Gēns	Kodētais proteīns	Lokalizācija genomā	Saistība ar T2DM*	Avoti
<i>PPARG</i> ( <i>PPARG2</i> )	Periksomu proliferācijas aktivizācijas receptors gamma	3p25	Klīniska vai neliela saistība	Scott et al., 2007 Sanghera et al., 2008 Gaulton et al., 2008 Sanghera et al., 2010
<i>ADIPOQ</i>	Adiponektīns	3q27	Klīniska vai neliela saistība	Szopa et al., 2009 Sanghera et al., 2010
<i>IGF2BP2</i>	Pie insulīnam līdzīga augšanas faktora 2 mRNS saistošais proteīns 2	3q27.2	Neliela saistība	Scott et al., 2007 Sanghera et al., 2008 Tabara et al., 2009
<i>ENPPI (PC-1)</i>	Ektoenzīma kodola fosforilēta fosfodiesterāze 1 (plazmas šūnu membrānas glikoproteīns 1)	6q22-q23	Vidēja vai neliela saistība	Bouhaha et al., 2008 Gaulton et al., 2008
<i>CDKAL1</i>	CDK5 regulācijas subvienības saistītajam proteīnam 1 līdzīgais proteīns 1	6p22.3	Neliela saistība	Scott et al., 2007 Tabara et al., 2009 Tan et al., 2010
<i>SLC30A8</i>	Cinka transporta proteīnu elements 8	8q24.11	Vidēja vai neliela saistība	Scott et al., 2007 Sladek et al., 2007 Hertel et al., 2008 Xiang et al., 2008 Bossé et al., 2009 Jing et al., 2010 Tan et al., 2010
<i>CDKN2B</i>	Ciklīna atkarīgās kināzes inhibitors 2B (p15, inhibē CDK4)	9p21	Neliela saistība	Scott et al., 2007 Duesing et al., 2008 Hertel et al., 2008 Tan et al., 2010
<i>TCF7L2</i>	Transkripcijas faktoram 7 līdzīgais proteīns 2	10q25.3	Klīniska, vidējai vai	Scott et al., 2007 Sladek et al., 2007

	(specifisks T šūnām)			neliela saistība	Bossé et al., 2009 Ezzidi et al., 2009 Salonen et al., 2009 Sanghera et al., 2009 Tabara et al., 2009
<i>HHEX</i>	Hematopoēzes ekspresētais homeobokss	laikā	10q23.33	Neliela saistība	Scott et al., 2007 Sladek et al., 2007 Bossé et al., 2009 Tabara et al., 2009 Tan et al., 2010
<i>LOC387761</i>			11p12	Neliela saistība	Sladek et al., 2007 Bossé et al., 2009
<i>KCNJ11</i>	ATF atkarīgais kālija kanāla, apakšsaimes J, elements 11		11p15.1	Neliela saistība	Scott et al., 2007 Gaulton et al., 2008
<i>KCNQ1</i>	Kālija sprieguma jona kanāla, KQT līdzīgās apakšsaimes elements 1		11p15.5	Neliela saistība	Jonsson et al., 2009 Tan et al., 2010
<i>FTO</i>	Tauku masas aptaukošanās saistītais gēns		16q12.2	Neliela saistība	Scott et al., 2007 Hertel et al., 2008 Sanghera et al., 2008 Yajnik et al., 2009
<i>SLC2A4</i>	Izšķīdušo vielu transporta saimes 2 (glikozes transporta veicinātājs) elements 4		17p13	Vidēja vai neliela saistība	Gaulton et al., 2008 Yamaguchi et al., 2008
<i>ACE</i>	Angiotensīna konvertējošais enzīms		17q23	Klīniska saistība	Ramachandran et al., 2008 Baroudi et al., 2009

\* Saistība ar slimību pēc relatīvās starpības (OR; *Odds ratio*):  $\geq 2$  vai  $\leq 0,5$  - klīniska nozīme jeb augsta saistība ar slimību,  $\geq 1,5$  vai  $\leq 0,66$  - vidēja saistība ar slimību, bet ne klīniska nozīme;  $\leq 1,5$  vai  $\geq 0,66$  - neliela saistība ar slimību (Schlesselman, Stolley, 1982; Daly, Bourke, 2000; Uthoff et al., 2002; Motulsky, 2010).

## 1.2. Juvenīlais idiopātiskais artrīts

### 1.2.1. SLIMĪBAS PATOĢENĒZE UN IZPLATĪBA

Juvenīlais idiopātiskais artrīts (JIA), agrāk saukts par juvenīlo reimatoīdālo artrītu, ir autoimūna slimība, kuras izcelsmes pamatā ir multifaktoriāls mehānisms, proti, gan ārējie faktori (infekcija, traumas, stress, fizikālie faktori, smēķēšana ģimenē), gan iekšējie (iedzimība). Imūnsistēmas disfunkcijas ierosinātāji, iespējams, ir infekcija (vīrusu vai



vīrusbaktēriju), neliela trauma (sasitums), fizikāla ietekme (Rumba-Rozenfelde u.c., 2009b; Berkun, Padeh, 2010).

Pirmie dati par juvenīlo idiopātisko artrītu tika publicēti 19. gadsimtā. Šī slimība ir viena no izplatītākajām hroniskām reimatiskām autoimūnām bērnu slimībām (Phelan et al., 2006; Ravelli, Martini, 2007; Gabriel, Michaud, 2009; Woo, Colbert, 2009). 1993. gadā Dr. Finks (Fink) definēja, ka juvenīlais hroniskais jeb idiopātiskais artrīts ir artrīts, kas sākas līdz 16 gadu vecumam (Ansell, 1999; Ringold et al., 2005) ar vienas vai vairāku locītavu iekaisumu un ilgst vismaz sešas nedēļas (Petty et al., 1998). JIA izplatība aptuveni ir 1 līdz 2 bērni no 1000, precīzāk, jauni slimības gadījumi tiek konstatēti vidēji 10 līdz 14 bērniem no 100'000 (Ilowite, 2002; Prahalad et al., 2002, Ravelli, Martini, 2007), lai gan dažās valstīs izplatība ir pat līdz 150 (Gabriel, Michaud, 2009) un 440 (Berkun, Padeh, 2010) bērniem no 100'000.

Juvenīlajam idiopātiskajam artrītam pēc 2001.gada Starptautiskās reimatodologu asociācijas līgas klasifikācijas izšķir septiņus apakštipus (Petty et al., 2004):

- sistemātiskais artrīts;
- oligoartrīts – persistējošs vai ekstendējošs (vienoti JIoA);
- poliartrīts ar negatīvu reimatoīdo faktoru (vienoti JIpA);
- poliartrīts ar pozitīvu reimatoīdo faktoru (vienoti JIpA);
- psoriātiskais artrīts;
- artrīts kopā ar entezītu;
- nediferencēts artrīts.

Pacienta slimības apakštipu nosaka atkarībā no slimības izpausmes pirmajā pusgadā (Rumba-Rozenfelde u.c., 2009b; Woo, Colbert, 2009), novērtējot gan klīnisko ainu (iekaisušo locītavu skaits un sākuma uzliesmojuma ilgums), gan seroloģisko raksturojumu (reimatoīdā faktora (RF) pozitivitāte, antinukleārās antivielas (ANA), cilvēka leikocītu antigēns B27 (HLA-B27)).

Visbiežāk sastopamā forma, pat līdz 56% no visiem gadījumiem, ir JIoA, kurš daudz biežāk ir sastopams meitenēm. Otra biežāk sastopamā forma ir JIpA ar negatīvu RF – līdz pat 28% un biežāk sastopams meitenēm (Ringold et al., 2005; Ravelli, Martini, 2007; Woo, Colbert, 2009). Vienīgais subtips, kurā dzimumu sadale ir līdzvērtīga ir sistemātiskais artrīts, kurš ir sastopams līdz pat 17% no visiem gadījumiem (Ravelli, Martini, 2007).

Pēdējo gadu pētījumos ir konstatēts, ka aptuveni 40 līdz 60% pacientiem slimība 5 gadu laikā pāriet tik pat strauji, kā tā ir izpaudusies, bet aptuveni 10% attīstās ļoti augsta funkcionalitātes nespēja (III vai IV klase pēc Steinbrokera (*Steinbrocker*) funkcionalitātes

iedalījuma). Pacientiem ar JIoA slimība norit visvieglāk – konstatēts, ka slimības remisija 6. līdz 10. gadam notiek līdz pat 47% pacientiem (Ravelli, Martini, 2007).

Juvenīlā idiopātiskā artrīta slimniekiem dzīves ilgums ir saīsināts (Rumba-Rozenfelde u.c., 2009b; Gabriel, Michaud, 2009) jeb mirstība JIA gadījumā ir 0,27 līdz 0,29%, kas ir gandrīz 4 reizes vairāk nekā vidēji populācijā (Gabriel, Michaud, 2009). Nāves cēloņi ir dažādi autoimūni traucējumi, tai skaitā, amiloidoze, makrofāgu aktivācijas sindroms (Rumba-Rozenfelde u.c., 2009b; Gabriel, Michaud, 2009).

Iedzimtības nozīmi juvenīlā idiopātiskā artrīta attīstībā apliecina augsta konkordance starp sibsū pāriem, kas dažādām slimības formām sastāda 70 – 80% (Pralhad et al., 2002). Slimības sastopamība starp sibiem palielinās no 15 līdz 30 reizēm atkarībā no populācijas. Kā arī sibi mēdz saslimt vienā vecumā, daudz biežāk nekā vienā kalendārajā gadā, kas izslēdz psiholoģisko ietekmi (Pralhad, Glass, 2008; Woo, Colbert, 2009). Dvīņu pētījumi ir parādījuši, ka monozigoto dvīņu konkordance attiecībā uz JIA ir starp 25% un 40%, kā arī palielinās saslimšanas risks. No visiem reģistrētajiem JIA dvīņu gadījumiem 80% ir monozigotiski (Pralhad, Glass, 2008; Woo, Colbert, 2009).

### 1.2.2. JIA MOLEKULĀRĀ ĢENĒTIKA: ASOCIĀCIJU MEKLĒJUMI

Visvairāk tiek pētīta JIA saistība ar cilvēka leikocītu antigēnu (HLA - *Human leukocyte antigen*) lokusu, kurš ir lokalizēti 6.hromosomas garā pleca lokusā 6q21. Šajā lokusā ir atrodams arī galvenā audu saderības kompleksa (*Major histocompatibility complex*) lokuss ar vairāk nekā 200 gēniem (Pralhad, Glass, 2008; Woo, Colbert, 2009). Prahalads un Glass (Pralhad, Glass, 2008) savā rakstā par JIA ir apkopojis pētījumu rezultātus par HLA lokusiem līdz 2008. gadam (1.3.tabula ).

1.3. tabula Cilvēka leikocītu antigēnu (HLA) lokusu saistība ar JIA subtipiem.

HLA lokuss	HLA klase I			HLA klase II			
	A	B	C	DR	DP	DQ	
Fenotips				B1	B1	A1	B1
Oligoartrīts	*2	-	-	*01, *04, *07, *08, *11, *13	*02	*03, *04	*04
Poliartrīts ar RF-	-	-	-	*04	-	*03	*03
Poliartrīts ar RF+	*2	-	-	*08	-	*04	*03
Psoriātiskais artrīts	-	-	-	*01	-	*0101	
Artrīts kopā ar entezītu	-	*27	-	*01, *04	-	*0101, *03	*05
Sistēmātiskais artrīts	-	-	-	*04, *11,	-	*05	

Dati no Prahalad, Glass, 2008; \*n – lokusa alēles, kas atšķiras pēc mutācijām, „treknrakstā” iezīmētas alēles ar aizsargājošu efektu.

2010. gadā Tomsons ar kolēģiem (Thomson et al., 2010) pierādīja HLA klases II lokusa DRB1 vairāku alēļu saistību ar juvenīlo oligoartrīta persistējošo formu Austrijā. Trim alēlēm \*1103, \*1104 un \*0801 tika konstatēts saslimšanas riska palielinošs efekts, bet alēlēm \*0101, \*0404, \*0401, \*0701 un \*1501 – riska samazinošs efekts.

Paralēli HLA lokusa pētījumiem ir analizēti ar šo lokusu nesaistītu gēnu loma JIA attīstībā. No visiem pētītajiem 54 gēni vai lokusi uzrādīja statistiski ticamu saistību ( $P < 0,05$ ) ar slimību, tai skaitā arī interleikīnu saimes proteīnu gēni (McDowell et al., 1995; Donn et al., 2001; Hinks et al., 2010; Ogilvie et al., 2003; Cinek et al., 2004; Fife et al., 2006; Sugiura et al., 2006; Cimaz et al., 2007; Stock et al., 2008; Hinks et al., 2009; Prahalad et al., 2009; Hinks et al., 2010). 1.4. tabula apkopo analizēto vietu lokalizāciju cilvēka hromosomās. Redzams, ka visvairāk ir pētītas 1., 2. un 6. hromosomas. To var izskaidrot ar to, ka 1. hromosomā ir lokalizēts *PTPN22* gēns, kas bija viens no pirmajiem, kam pierādīja saistību ar JIA, kā arī vairāki interleikīnu gēni. 2. hromosomā ir lokalizēti IL-1 proteīnu saimes gēni, bet 6. hromosomā ir lokalizēts HLA lokuss, kas izraisa īpašu pētnieku interesi. Līdz šim ar JIA saistītie gēni nav atrasti tikai piecās hromosomās (8., 14., 19., 20. un Y), neskatoties uz to, ka, piemēram, 14. hromosomas garajā plecā ir lokalizēti vairāki kandidātģēni asociācijai ar autoimūnām slimībām, tai skaitā kodola faktora kappa B inhibitora (NFκBI) proteīna gēns lokusā 14q13 (le Beau et al., 1992) un imūnglobulīna smagās ķēdes proteīna gēns lokusā 14q23.33 (Kamnasaram, Cox, 2002).

Ja apskata gēnu kodēto proteīnu darbību organisma metabolisma ceļos, tad var secināt, ka lielākā daļa (70% no visiem gēniem) ir saistīti ar imūnsistēmas funkcijām. Asociāciju atrod arī ar gēniem, kuru produkti ir iesaistīti asinsritē, renīna – angiotenzīna sistēmā, transkripcijas faktoru darbībā, aminoskābju sintēzē, dzelzs metabolisma ceļos, transkripcijas regulācijā (augšanas faktori), kā arī proteīnu degradācijas procesos.

Juvenīlajam idiopātisko artrītam ir saistība ar *LMP2* gēna kodējošā reģiona CfoI polimorfismu. Proteasomas subvienības *LMP2* B alēles homozigotā forma palielina uzņēmību pret JIA un ietekmē slimības fenotipu (Pryhuber et al., 1996; Thomson, 2002).

**1.4. tabula** Ar JIA statistiski ticami ( $P < 0,05$ ) saistīto gēnu vai lokusu (neskaitot HLA lokusus) izvietojums cilvēka hromosomās (dati apkopoti no publikācijām sākot ar 1995.gadu\*).

Hromosoma	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Gēnu vai lokusu skaits	9	6	2	4	5	9	2	-
Piezīme	3 gēni lokalizēti lokusā 1p13	Visi lokusi garajā plecā	Abi īsajā plecā	Visi lokusi garajā plecā	Četri gēni lokusā 5q31	7 gēni lokalizēti lokusā 6q21		
Hromosoma	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.
Gēnu vai lokusu skaits	1	3	1	2	1	-	1	3
Piezīme								
Hromosoma	17.	18.	19.	20.	21.	22.	X	Y
Gēnu vai lokusu skaits	3	1	-	-	1	2	1	-
Piezīme						Abi gēni atrodas 22q11.23		

\*Izmantotās publikācijas: McDowell et al., 1995; Pryhuber et al., 1996; Date et al., 1999; Sanjeevi et al., 2000; Donn et al., 2001; Donn et al., 2002; Ozen et al., 2002; Alsaeid et al., 2003; Ogilvie et al., 2003; Cinek et al., 2004; Donn et al., 2004; Mitterski et al., 2004; Runstadler et al., 2004; Smerdel et al., 2004; Bukulmez et al., 2005; Hinks et al., 2005; Lamb et al., 2005; Runstadler et al., 2005; Viken et al., 2005; Fife et al., 2006; Marciano et al., 2006; Prahalad et al., 2006; Schmeling et al., 2006; Sugiura et al., 2006; Cimaz et al., 2007; Cinek et al., 2007; Eastell et al., 2007; Eike et al., 2007; Lamb et al., 2007; Lindner et al., 2007; Ozyürek et al., 2007; Behrens et al., 2008; Day et al., 2008; Prahalad, Glass, 2008; Prahalad et al., 2008; Rohr et al., 2008; Scheibel et al., 2008; Stock et al., 2008; Albers et al., 2009; Gergely et al., 2009; Hinks et al., 2009a, b, c; Jiménez-Morales et al., 2009; Prahalad et al., 2009; Yao et al., 2009; Zeng et al., 2009; Hinks et al., 2010.

Daudzi gēni ir pētīti tikai vienreizējos pētījumos, tādejādi to rezultāti ir attiecināmi tikai uz konkrētu populāciju. Citiem gēniem asociācija ar JIA ir pierādīta vairākos neatkarīgos pētījumos (1.5.tabula):

**1.5. tabula** Gēni, kuriem konstatēta asociācija ar juvenīlo idiopātisko artrītu neatkarīgos pētījumos.

Gēns	Kodētais proteīns	Lokalizācija genomā	Saistība ar JIA*	Avots
<i>CCR5</i>	Hemokīna receptors ar C-C motīvu 5	3p21.31	Nav aprēķināta	Scheibel et al., 2008 Lindner et al., 2007 Pralhad et al., 2006
<i>CTLA4</i>	Citotoksīna T-limfocīta antigēns 4	2q33	Vidēja vai neliela saistība	Hinks et al., 2010 Pralhad et al., 2008 Milterski et al., 2004
<i>IL10</i>	Interleikīns-10	1q31-q32	Neliela saistība	Fife et al., 2006 Donn et al., 2001
<i>IL-1α</i>	Interleikīns-1 alfa	2q14	Augsta vai vidēja saistība	Stock et al., 2008 Donn et al., 2001 McDowell et al., 1995
<i>IL2RA</i>	Interleikīna-2 receptors alfa	10p15-p14	Vidēja vai neliela saistība	Hinks et al., 2009 Pralhad et al., 2009
<i>MIF</i>	Makrofāga migrācijas inhibīcijas faktors	22q11.23	Vidēja saistība vai nav aprēķināta	Donn et al., 2004 Milterski et al., 2004 Donn et al., 2001
<i>PTPN22</i>	Proteīnu tirozīna fosfatāze N22	1p13.3-p13.1	Augsta vai vidēja saistība	Cinek et al., 2007 Hinks et al., 2005 Viken et al., 2005
<i>STAT4</i>	Signāla transdukcijas un transkripcijas aktivators 4	2q32.2-q32.3	Vidēja vai neliela saistība	Hinks et al., 2009 Pralhad et al., 2009
<i>TNFAIP3</i>	Tumora nekrozes faktora inducētais proteīns 3	6q23	Neliela saistība	Hinks et al., 2009 Pralhad et al., 2009
<i>TNFA</i>	Tumora nekrozes faktors alfa	6p21.3	Augsta vai vidēja saistība	Jiménez et al., 2009 Schmeling et al., 2006 Milterski et al., 2004 Ozen et al., 2002 Date et al., 1999
<i>TRAF1</i>	Tumora nekrozes faktora receptora saistītais faktors 1	9q33-q34	Neliela saistība	Hinks et al., 2009 Pralhad et al., 2009 Behrens et al., 2008

\* Saistība ar slimību pēc relatīvās starpības (OR; *Odds ratio*):  $\geq 2$  vai  $\leq 0,5$  - klīniska nozīme jeb augsta saistība ar slimību,  $\geq 1,5$  vai  $\leq 0,66$  - vidēja saistība ar slimību, bet ne klīniska nozīme;  $\leq 1,5$  vai  $\geq 0,66$  - neliela saistība ar slimību (Schlesselman, Stolley, 1982; Daly, Bourke, 2000; Uthoff et al., 2002; Motulsky, 2010). Nav aprēķināts, ja pētījumā OR nav norādīts.

### 1.3. Cilvēka genoma 14. hromosoma

Cilvēka 14. hromosoma (14ch; *Chromosome 14*) ir viena no piecām akrocentriskajām hromosomām, kurām ir raksturīgs heterohromatisks īsais plecs (14p) un eihromatisks garais plecs (14q), kurā iespējams ir lokalizēti visi hromosomā esošie gēni (Heilig et al., 2003). 14ch satur apmēram 3,0 – 3,5 % no visas šūnas DNS ([ghr.nlm.nih.gov/chromosome=14](http://ghr.nlm.nih.gov/chromosome=14)).

Hromosomas garums ir ap 107 Mbp. 2003. gadā, kad tika paziņots par 14. hromosomas sekvencēšanu, tika secināts, ka visa kodējošā sekvence jeb eihromatiskā daļa satur 87'410'661 bāzu pārus (bp) jeb 87 Mbp (Heilig et al., 2003). Hromosomas garais plecs ir apmēram 93 Mb garš, aprēķinot tam vajadzētu saturēt 1800 gēnus, ja katrs gēns vidēji genomā ir lokalizēts ik pēc 30 – 50 kb garas sekvences (Kamnasaram, Cox, 2002). Apskatot 14ch sekvences nukleotīdu sadalījumu, var teikt, ka guanīna un citozīna līmenis ir atbilstošs vidējam cilvēka genomā, jeb precīzāk 40,86% (Heilig et al., 2003).

Visi 14.hromosomā atrastie gēni ir lokalizēti tikai garajā plecā, kā to varētu paredzēt. Līdz 2003.gadam bija atrasti 1443 gēni vai gēniem līdzīgi rajoni. Pēc šiem datiem gēni pārklāj 38,07Mb no visas sekvences, kas ir 43,6% (Heilig et al., 2003). Šobrīd pēc GeneCard (<http://www.genecards.org/>) datiem 14.hromosomā ir 2127 gēni vai gēniem līdzīgi rajoni. Pēc NCBI datu bāzes datiem 14. hromosomas sekvencē ar numuru NT\_026437.12 ir 1453 gēni, kuriem ir precīzi noteikts DNS apgabals, mRNS sekvence un daļai arī proteīnu funkcija.

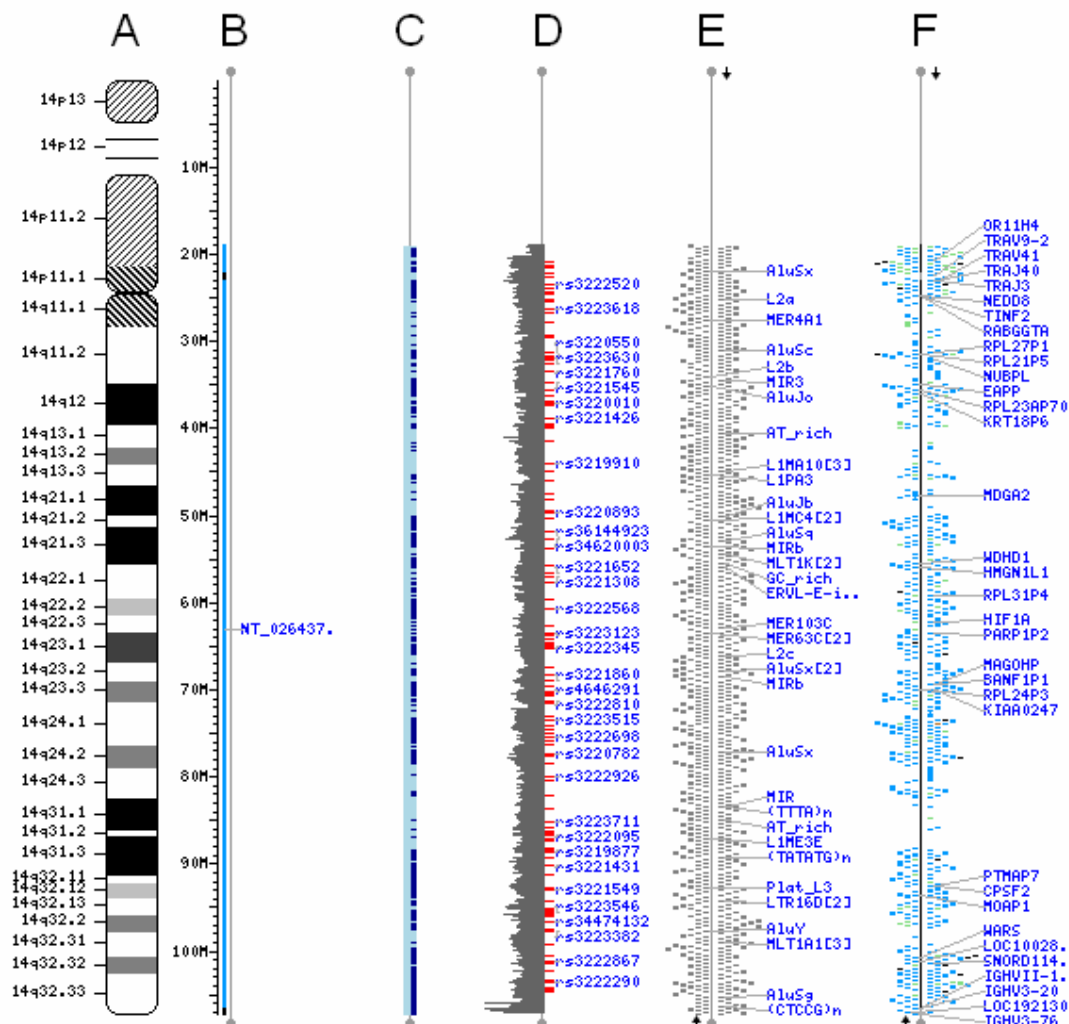
Gēnu izvietojums hromosomā ir diezgan neparasts, salīdzinot ar citām cilvēka hromosomām. Gēni pārsvarā ir izvietoti īpaši blīvi. Lielākie gēnu sablīvējumi ir no 2 Mb līdz 6 Mb gari. Turpretī lielākais gēnu „tuksnesis” (vieta, kur nav sastopami gēni) ir 1,11 Mb liels (vidēji genomā tikai 43,5 kb jeb 0,043 Mb). Šajā „tuksnesī” nav sastopami ne tikai gēni, bet arī CpG saliņas. Šādi gēnu „tuksneši” aizņem 11,7 Mb no visas 14. hromosomas, kas ir 13,4% no visas sekvences (Heilig et al., 2003). Apskatot gēnu sablīvējumu un gēnu „tuksnešu” (1.2.attēlā F) jaunākos datus no NCBI datu bāzes, var secināt, ka nav lielas atšķirības ar 2003. gada datiem.

Cilvēka 14. hromosoma ir ar augstu konservātismu. Tās homologā peļu genomā hromosoma (12. hr.) ir ļoti līdzīga pēc gēnu un CpG saliņu izvietojuma (Heilig et al., 2003).

2003. gadā bija noteikts, ka visā 14.hromosomā ir atrodams līdz pat 1768 CpG saliņām, no kurām 530 ir ļoti tuvu gēnu 5' galiem. Liels CpG saliņu sablīvējums ir pie subcentromēras un subtromēras rajoniem, kuros tās ir sastopamas ik pēc 9 kb (vidējais genomā ir viena CpG saliņa ik pēc 50 kb; Heilig et al., 2003). Šobrīd NCBI datu bāzē 14ch sekvencē ar numuru NT\_026437.12 ir jau zināmas 9803 CpG saliņas. Neskatoties uz to, ka ir palielinājies šo saliņu skaits, nav izteikti mainījies to sablīvējuma izvietojums pie subcentromēras un

subtelomēras (1.2. attēls C). CpG saliņas aizņem 4,04% no hromosomas sekvenču. Garākā no tām ir 4557 bp gara, bet īsākā 201 bp. Vidējais CpG saliņu garums ir aptuveni 442 bāzu pāri.

## 14.hromosoma



**1.2.attēls** 14.hromosomas uzbūve (A), kodējošās sekvenču NT\_026437.12 (B), CpG saliņu (C), polimorfismu jeb variāciju (D), atkārtojumu un lielu inserciju (E) un gēnu (F) izvietojums hromosomā ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Pēc 14. hromosomas pilnīgas atkodēšanas, secināja, ka dažādu veida atkārtojumi aizņem 40,37 Mb. Īsie un garie izkaisītie nukleotīdu elementi (SINE un LINE; *short interspersed nucleotide elements un large interspersed nucleotide elements*) atradās 11,62 un 17,33 Mb lielā daļā no hromosomas sekvenču. Uz 2003. gadu bija konstatēti vismaz 14 lieli inserciju/delēciju rajoni, kas ir vismaz 100 bāzu pāru lieli. Astoņi no tiem bija Alu tipa insercijas (Heilig et al., 2003). Šobrīd pēc NCBI datu bāzes datiem 14. hromosomas sekvenču ir atrasti 161 018 atkārtojumi un specifiskas insercijas (dažāda veida transpozoni). No tiem

36 638 un 44 018 attiecīgi ir SINE un LINE. No SINE 36 444 ir Alu tipa. Visā apskatītajā hromosomā ir lokalizēti nedaudz vairāk kā 12 tūkstoši dažādu veidu un garuma atkārtojumu, tai skaitā arī viena nukleotīda atkārtojumi. Atkārtojumu un specifisku inserciju izvietojums (1.2.attēls E) kopumā ir neatkarīgs no gēnu izvietojuma.

Apskatot informāciju par vienkāršām sekvenču variācijām jeb polimorfismiem, kas sevī ietver viena nukleotīda nomaiņu, mazu bāzu pāru skaitu insercijas/delēcijas, 14ch sekvenču šobrīd ir zināmas 520 272 variācijas, kas vienmērīgi ir izkārtotas pa visu garo plecu (1.2.attēls D). Līdz 2006. gadā bija zināmi gandrīz uz pusi mazāk polimorfismi – 259 435.

Hromosomā ir divi 1 MB gari reģioni, kas ir saistīti ar imūnsistēmu – T šūnas alfa un delta receptoru lokusi, kas atrodas netālu no centromēras, un imūnglobulīna smagās ķēdes lokusi blakus telomērai (Heilig et al., 2003).

Vairāki svarīgi kandidātģēni saistībai ar autoimūnām slimībām ir lokalizēti 14ch garajā plecā. Šādi ģēni ir kodola faktora kappa B inhibitora (NFκBI) proteīna ģēns lokusā 14q13 (le Beau et al., 1992), transkripcijas faktors FOS un TGF-beta ģēns lokusā 14q23, imūnglobulīna smagās ķēdes proteīna ģēns lokusā 14q23.33 (Kamnasaram, Cox, 2002), presenilīna 1 (*PSENI*) ģēns lokusā 14q24.3 (Kamnasaram, Cox, 2002) un vairāki proteasomu ģēni. Proteasomu proteīnu ģēni veido specifisku gēnu klasteri no astoņiem ģēniem, tai skaitā, proteasomas beta tipa 5. un 11. subvienība (attiecīgi *PSMB5* un *PSMB11*) un proteasomas PA28 aktivatora 1. un 2. subvienība (attiecīgi *PSME1* (*PA28α*) un *PSME2* (*PA28β*)) lokusā 14q11.2, proteasomas alfa tipa 6. subvienība (*PSMA6*) lokusā 14q13.1, proteasomas 26S ATFāzes 6. subvienība (*PSMC6* jeb *Rpt4*) lokusā 14q21.1, alfa tipa 3. subvienība (*PSMA3*) lokusā 14q23 un proteasomas 26S ATFāzes 1. subvienība (*PSMC1* jeb *Rpt2*) lokusā 14q32.11.

14. hromosomas garajā plecā ir konstatēti ģēni kandidāti vairākām slimībām, piemēram, Alzheimeras slimībai, muskuļu distrofijai, 1. tipa cukura diabētam. Šīm dažādajām slimībām ir saistība ar konkrētu 14ch gēnu vai arī ar noteiktu 14q lokusu (Kamnasaram, Cox, 2002). Ir zināmi aptuveni 60 ģēni, kas ir saistīti ar tādām slimībām kā Nimana-Pika slimība, agrīnā Alzheimeras slimība un Ušera sindroms un tā formas (Heilig et al., 2003).

14. hromosomas garajā plecā lokalizēto 14 mikrosatelītu marķieru atklāšanas un izpētes rezultātā tika konstatēta IgE fenotipu ģenētiskā saistība ar lokusiem 14q11.2 un 14q13 (Mansur et al., 1999, citēts - Sjakste et al., 2004). Vairākiem 14ch molekulārajiem marķieriem dažādos lokusos ir arī asociācija ar dažādām vēža formām (Kamnasaram, Cox, 2002).

Pēdējos gados, analizējot pacientus ar iedzimtām anomālijām, ir atklāti hromosomu rajoni, kuriem ir raksturīgi delēcijas, inversijas vai duplikācijas. Piemēram, analizējot genomu



pacientam ar iedzimtu kroplību, tika konstatēta lokusa 14q32.1 duplikācija. Pacienta mātei tika konstatēts lokusa 14p11.2q32.1 inversija (Sliuzas et al., 2008). Analizējot genomu četrus gadus vecam pacientam ar iedzimtām anomālijām (dismorfisms un attīstības traucējumi), bez īpašas slimību vēstures ģimenē, tika atklāta lokusa 14q21q23 inversija (Jiang et al., 2008).

Hromosomas centromēras galā ir segments, kam ir dublikāts ar augstu konservatīvu 22.hromosomas garajā plecā, aptuveni tajā pašā vietā kā 14. hromosomā. Bez tā ir zināms, ka 1,6% no 14.hromosomas sekvenču sastāvā no starphromosomāliem duplikācijas fragmentiem jeb fragmentiem, kam ir 90% homologs atkārtojums kādā citā cilvēka hromosomā. Šie fragmenti ir vismaz 1kb lieli. Lielākais šāds fragments ir iepriekš aprakstītais segments 22. hromosomā. Tomēr 14.hromosoma ir ar vismazāko starphromosomālo dublicēto fragmentu daudzumu (Heilig et al., 2003).

Duplicējošie fragmenti, kas atrodas 14ch, sastāda 1,1% sekvenču un veido 4 segmentus. Lielākais no tiem ir 800 kb garš un atrodas tuvu centromērai, kā arī ir daļa no 22. hromosomā esošā dublikāta (Heilig et al., 2003).

Hromosomā līdz 2003. gadam bija atrasti 20 transportRNS (tRNS) gēni, no kuriem 14 veido 75 kb lielu klāsteru segmentu. Šis tRNS gēnu klāsteris ir visblīvākais visā genomā. Hromosomas garajā plecā ir atrodamas arī nepilnīgas ribosomālās RNS kodējošo gēnu kopijas (Heilig et al., 2003). Analizējot specifisku mikroRNS jeb miRNS (*microRNA*) lokalizāciju genomā, 2009. gadā tika atklāts, ka 14. hromosomā ir aptuveni 200kb liels apgabals, kas satur 48 miRNS un 41 mazā kodola RNS (*small nucleolar RNA*) sekvenču. Šis reģions ir lokalizēts hromosomas telomērā, aptuveni lokusā 14q32.31, un pagaidām nav saistīts ne ar vienu gēnu (Quach et al., 2009).

## **1.4. Proteasomas**

### ***1.4.1. PROTEASOMU VISPĀRĪGAIS APRAKSTS***

Lai nodrošinātu vienmērīgu dzīves procesu šūnā, ir nepieciešams uzturēt stablu proteīnu līmeni. Šūnā nepārtraukti dažādu faktoru ietekmē notiek proteīnu sintēze, tātad ir jābūt arī nepārtrauktai nevajadzīgo, nolietoto un bojāto proteīnu degradācijai. Šī procesa nodrošināšanai šūnā eksistē vairāki proteāžu kompleksi, tai skaitā, proteasomu sistēma, lizosomu un to enzīmu komplekss, kodola proteāzes, kalpaīns, kā arī kaspāzes (Ciechanover, 2005; Gomes et al., 2006). Lielāko daļu no šūnas proteīniem (līdz pat 80%) atpazīst un degradē tieši proteasomu sistēma, kas, atšķirībā no pārējiem kompleksiem, ir lokalizēta gan citoplazmā, gan kodolā (Gomes et al., 2006). Turklāt proteasomu sistēma degradē proteīnus,

kas piedalās visos šūnas procesos, tai skaitā šūnas cikla regulācijā, apoptozē, gēnu transkripcijā un citos procesos (Konstantinova et al., 2008).

Pirmā informācija par proteasomām parādījās 20. gadsimta 70. gadu beigās, kad vairākas enzimologu grupas, kas pētīja olbaltumvielu katabolismu, atklāja proteināzi ar lielu molekulāro masu, kas sasniedza 700 kDa, bet olbaltumu kompleksa sedimentācijas koeficients līdzinājās 20S. Enzīmam nebija izteikta specifiska substrāta kā citām proteināzēm, tādēļ to nosauca par multikatalītisku proteināžu kompleksu (*multicatalytic proteinase complexes*). Rentgena struktūranalīze pierādīja, ka kompleksam ir cilindriska forma, un izrādījās, ka šie veidojumi ir Klausa Šerera (*Klauss Sherrer*) 1970. gadā atklātās prosomas. Tagad lieto tikai terminu „proteasomas” (Scherrer, 1990; Scherrer, Bey, 1994; Wolf, Hilt, 2004).

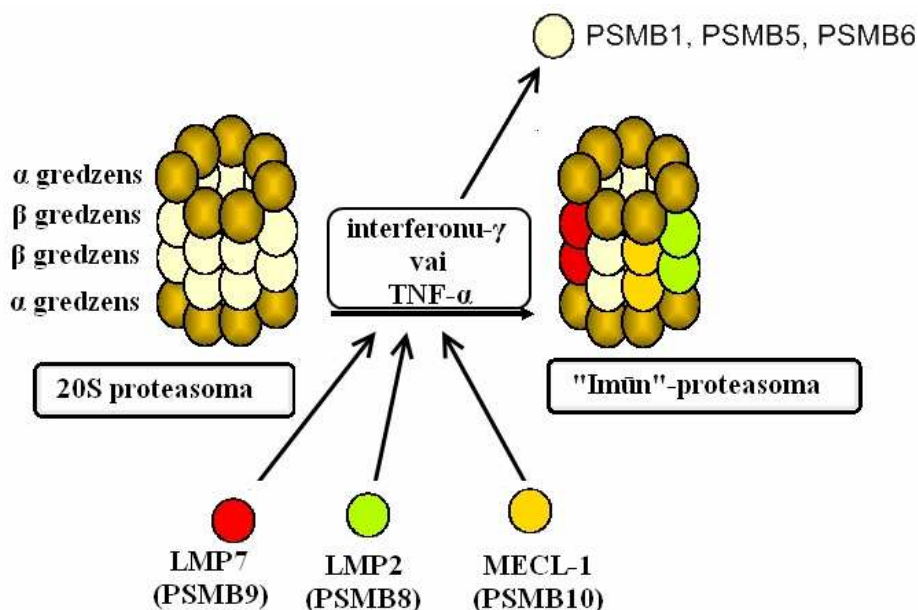
Veicot pētījumu cilvēka asins šūnās, Zoēģers ar kolēģiem (Zoeger et al., 2006) pierādīja, ka visas proteasomas var iedalīt divās lielās grupās – standarta proteasomas un “imūn”-proteasomas, lai gan var veidoties arī proteasomas, kas pēc uzbūves daļēji pieder gan vienai, gan otrai grupai. Bet katrai lielajai grupai ir iespējams izdalīt vēl 6 apakštipus (Glickman, Raveh, 2005; Rechsteiner, Hill, 2005; Gomes et al., 2006):

1. bez aktivatora;
2. ar vienu aktivatoru 19S;
3. ar diviem aktivatoriem 19S;
4. ar aktivatoriem 19S un PA28 $\alpha\beta$ ;
5. ar aktivatoriem 19S un PA28 $\gamma$ ;
6. ar aktivatoriem 19S un PA200.

Ir pierādīts, ka proteasomas ir atrodamas gan kodolā, gan citoplazmā, tomēr to koncentrācija dažādās šūnas daļās ir atšķirīga. Citoplazmā proteasomas savienojas ar centrosomām, citoskeletu un gludā endoplazmatiskā tīkla ārējo pusi, bet kodolā tās ir sastopamas uz kodola matrkisa, kodoliņā to nav (Scherrer, 1990; Wojcik, DeMartino, 2003; Glickman, Raveh, 2005). Vairākiem proteasomu proteīniem ir arī kodola lokalizācijas signāls, kas apliecina proteasomu piederību kodolam (Bey et al., 1993; Tanaka, 1995). Citoplazmā šie proteīni koncentrējas galvenokārt brīvās netranslējamās mRNS frakcijās (Sjakste et al., 2001).

Apskatot, kādos audos jeb šūnu tipos ir atrodamas proteasomas, ir jāsaprot, ka tās ir sastopamas visās šūnās (Scherrer, 1990; Wojcik et al., 2000; Krüger et al., 2001), kā arī starpšūnu telpā, piemēram, plazmā vai alveolu šķīdumā (Zoeger et al., 2006; Sixt, Dahlmann, 2008).

Proteasomu pamatstruktūra ir 20S proteasoma (1.3.attēls), kas ir kompleksa galvenā daļa jeb serde, kas pēc izskata atgādina 15x10 nm cilindru un kuras molmasa ir aptuveni 700kDa (Scherrer, Bey, 1994; Tanaka, 1995; Coux et al., 1996; Wojcik et al., 2000; Wolf, Hilt, 2004). To veido četri gredzeni, no kuriem katru veido septiņas attiecīgas subvienības, kuru molekulmasas ir no 20 līdz 36 kDa (Scherrer, Bey, 1994; Tanaka, 1995; Coux et al., 1996; Wolf, Hilt, 2004). Ārējie gredzeni ir veidoti no dažādām  $\alpha$  subvienībām, bet iekšējie – no  $\beta$  subvienībām (Adams, 2003; Groll et al., 2003; Wolf, Hilt, 2004; Gomes et al., 2006).

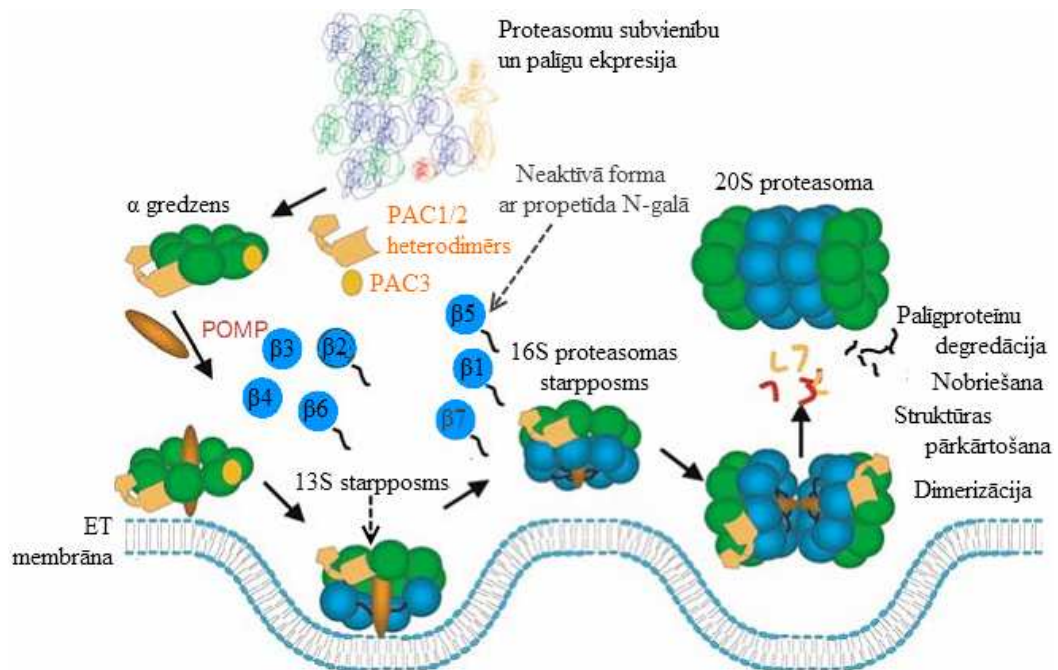


**1.3.attēls** Proteasomu pamatstruktūra jeb 20S proteasoma un „imūn”-proteasoma.

Proteasomas savā vienkāršākajā formā, kādas tās ir arheobaktērijās, satur tikai viena tipa  $\alpha$  un viena tipa  $\beta$  subvienības. Zīdītāju šūnas satur septiņus dažādus  $\alpha$  subvienību gēnus un 11 dažādus  $\beta$  subvienību gēnus (Wolf, Hilt, 2004; Groettrup et al., 2010). Zīdītāju organismos, tai skaitā arī cilvēka,  $\alpha$  subvienības savstarpēji ir ar vidēji 30% identiskām sekvencēm (Gomes et al., 2006).

Proteasomu veidošanās procesā (1.4.attēls) pirmais solis ir visu subvienību sintēze līdzīgos daudzumos, kas liek domāt par vienotu transkripcijas mehānismu. Ir zināms, ka tieši stresa laikā visu proteasomu proteīnu sintēze strauji palielinās. Pētot augošās raugu šūnas, ir pierādīts, ka vienotais transkripcijas faktors, kas nodrošina visu proteasomu kodolu proteīnu gēnu sintēzi, ir proteīns Rpn4. Šis proteīns ir proteasomu aktivatora subvienība, kā arī tas atpazīst proteasomu aktivizācijas kontroles elementu (PACE; *proteasome activation control element*) visu subvienību gēnu promoteros (Glickman, Raveh, 2005). Visas beta subvienības, izņemot  $\beta 3$  un  $\beta 4$ , sintezējas neaktīvā formā ar propetīdu N-galā, kas tiek atšķelts, saistoties ar aktīvo subvienību, veidojoties gredzenam (Meiners et al., 2003).

Nākošais posms (1.4.attēls) ir specifisku kompleksu izveidošanās citoplazmā (Meiners et al., 2003; Glickman, Raveh, 2005; Hirano et al., 2008), jeb precīzāk, pie endoplazmatiskā tīkla (Fricke et al., 2007). Visātrāk zīdītāju šūnās izveidojas  $\alpha$  subvienības gredzens ar visiem septiņiem proteīniem. Iesākumā pie šī gredzena piesaistās PAC1/PAC2 heterodimērs un PAC3/PAC4 komplekss (Hirano et al., 2008). Alfa gredzena pilnīga izveidošanās, ir signāls, lai sāktos beta subvienību pievienošanās. Pirmā pievienojas  $\beta 2$  subvienība, kam seko  $\beta 3$  un  $\beta 4$  (šī brīža sedimentācijas koeficients proteasomu veidojumam ir 13S), bet pēdējā piesaistās  $\beta 7$  subvienība. Pievienojoties  $\beta 4$ , pie proteasomas pievienojas arī Ump1 jeb POMP proteīns (Wolf, Hilt, 2004; Fricke et al., 2007; Hirano et al., 2008). Gala procesā izveidojas „pus”-proteasomas ar sedimentācijas koeficientu 16S. Tad notiek dimerizācijas process jeb divu 16S kompleksu savienošanās, tam seko beta subvienību N-terminālo galu atdalīšanās un Ump1 proteīna degradācija (Meiners et al., 2003; Wolf, Hilt, 2004; Glickman, Raveh, 2005; Fricke et al., 2007; Hirano et al., 2008).



**1.4.attēls** Proteasomu veidošanās šūnā endoplazmatiskā tīkla (ET) membrānas tuvumā (Fricke et al., 2007).

Esot „pus”-proteasomu stāvoklī, notiek kompleksa transportēšana caur kodola membrānu, kur tai piesaistās heterodimērs Nob1 un Pno1/Dim2, rezultātā tiek aktivizēta  $\beta$  subvienību proteāžu darbība kodolā, dimerizācija un proteīna Ump1 degradācija (Glickman, Raveh, 2005).

Pārējie piesaistītie proteīni un to kompleksi tiek vai nu degradēti, vai tie atdalās (Hirano et al., 2008).

Proteasomas pēc proteolītiskās aktivitātes ir N-terminālā nukleofīla hidrolāzes ar treonīnu kā N-termināla aktīvo nukleofīlu (Wolf, Hilt, 2004; Rechsteiner, Hill, 2005; Konstantinova et al., 2008). Proteasomām piemīt vismaz piecas dažādas proteolītiskās aktivitātes, kas ir atkarīgas no  $\beta$  subvienību kombinācijas. Brīvā N-terminālā treonīna atlikumi, trijās no septiņām  $\beta$  tipa subvienībām, darbojas kā nukleofīli un ir svarīgi katalīzes mehānismā. Salīdzinot ar zemākiem eikariotiem, zīdītāju genomā ir kodētas septiņas  $\beta$  subvienības ar proteāžu aktivitāti, lai gan katrā proteasomā atrodamas tikai trīs. Šīs subvienības var mainīties pēc īpašas stimulācijas (Wolf, Hilt, 2004; Glickman, Raveh, 2005; Rechsteiner, Hill, 2005; Groettrup et al., 2010). Sadarbojoties abu iekšējo gredzenu trim beta subvienībām ar proteolītisko aktivitāti, tās kopīgi tiek galā gandrīz ar visām peptīdsaitēm, vienīgi ne ar saitēm, kas seko pēc glicīna un prolīna (Meiners et al., 2003; Rechsteiner, Hill, 2005; Kapeta et al., 2010).

Proteīni pēc degradācijas proteasomās tiek sadalīti 4 – 25 peptīdu garos fragmentos (Gomes et al., 2006). Dažos gadījumos degradācija notiek tikai līdz noteiktam līmenim, piemēram, lai aktivētu proteīnu. Kā piemēru var minēt NF $\kappa$ B, kad no neaktīva proteīna p105 tiek atšķelt daļa, lai izveidotos aktīvā proteīna subvienība p50 (Gomes et al., 2006).

Ļoti līdzīgas 20S proteasomām ir tā saucamā „imūn”-proteasomas (1.3. attēls). Abas proteasomas savā starpā atšķiras ar trim  $\beta$  subvienības proteīniem. Subvienību nomaiņu izraisa šūnas indukcija ar iekaisuma citokīniem, piemēram, interferonu- $\gamma$  vai tumoru nekrozes faktors  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Standarta proteasomām  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 un  $\beta$ 5 subvienības tiek aizvietotas ar LMP2 jeb  $\beta$ 1i (saukt arī par PSMB9), LMP7 jeb  $\beta$ 5i (PSMB8) un MECL-1 jeb  $\beta$ 2i (PSMB10, LMP10), kas ir proteīni ar zemu molekulmasu un ko mēdz arī saukt par proteasomu „imūn”-subvienībām (Brooks et al., 2000; Mishto et al., 2003; Konstantinova et al., 2008; Scheffler et al., 2008; Groettrup et al., 2010). „Imūn”-proteasomas tiek saistīta ar I klases galvenā audu saderības kompleksa proteīnu veidošanos jeb aktivizāciju (Mishto et al., 2003).

Tīmusa garozas šūnās ir sastopamas īpašas formas „imūn”-proteasomas, kas no parastās atšķiras ar LMP7 jeb  $\beta$ 5i. Tās vietā ir specifiska  $\beta$ 5t (saukta arī par PSMB11) molekula, kas ir sastopama tikai tīmusa garozas šūnās. Šī proteīna sintēze un nomaiņa nav atkarīga no interferonu- $\gamma$  indukcijas (Murata et al., 2007; Tomaru et al., 2009; Groettrup et al., 2010).

#### **1.4.2. PROTEASOMAS AKTIVATORI**

Degradējamais proteīns 20S proteasomā iekļūst caur alfa subvienību gredzenu, kas parasti ir slēgtā veidā un veido ļoti šauru kanālu, jo traucē alfa subvienību savstarpēji saistītie N-termināli (Tanaka, 1995; Coux et al., 1996; Wojcik et al., 2000). Tāpēc 20S proteasomas proteolītiskā darbība ir zema. Lai tiktu degradētas lielas olbaltumvielas, pie 20S proteasomas

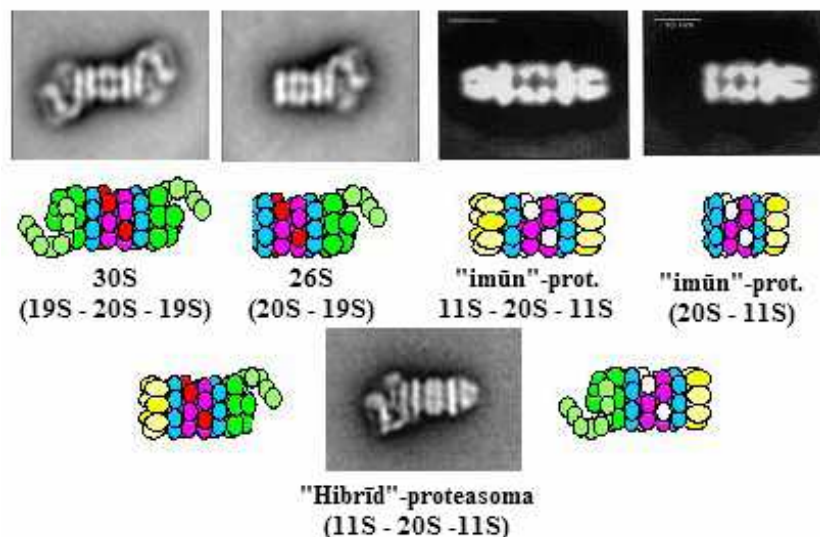
ir jāpievienojas aktivatoriem jeb regulatorajiem kompleksiem, kas atvieglo pieeju aktīvajam proteasomu centriem. Tieši aktivatori, saistoties ar  $\alpha$  subvienību brīvajiem galiem, atver proteasomu kanālu proteīnu degradācijai (Tanaka, 1995; Coux et al., 1996; Rechsteiner, Hill, 2005).

Šobrīd ir zināmi trīs aktivatori: 19S jeb PA700, 11S jeb PA28 un PA200.

19S aktivators ir ATFāzes komplekss (~800 – 1300 kDa), kas ir V-tipa termināls ar vairākām subvienībām, kuru molekulmasa ir no 25 līdz 110 kDa (Tanaka, 1995; Tanaka, Tsurumi, 1997; Glickman, Raveh, 2005). Zīdītājiem 19S komplekss sastāv no 16 līdz 20 subvienībām (Konstantinova et al., 2008). Visas subvienības var iedalīt divās grupās. Vienā grupā ietilpst vismaz sešas subvienības, kuras veido unikālu multigēnu homoloģisku polipeptīdu saimi, un otra grupa – apmēram 15 ATFāzi nesaturošas subvienības, vairums no kurām pēc uzbūves nav savstarpēji saistītas (Glickman, Raveh, 2005). Piemēram, sirds muskuļa šūnās esošais 19S regulatorais komplekss satur 6 ATFāzes subvienības (Rpt1 - 6), kas veido pamata daļu, un 11 ne ATFatkarīgās subvienības (Rpn), no kurām 3 atrodas pamata daļā, bet pārējās veido „vāka” (*lid*) daļu (Plempner, Hammond, 2002; Glickman, Raveh, 2005; Gomes et al., 2006; Konstantinova et al., 2008), kas ir saistīta ar COP9 signālmolekulu (Collins, Tansey, 2006). 19S komplekss ir ļoti konservatīvs: tas maz atšķiras raugu un pat zīdītāju organismos (Rechsteiner, Hill, 2005).

19S aktivatori var pievienoties 20S proteasomām vienā vai abos galos (1.5. attēls), atkarībā no kā veidojas proteasomas ar sedimentācijas koeficientu attiecīgi 26S vai 30S (~1500 – 2000 kDa). Tomēr literatūrā abas šīs proteasomas apzīmē ar vienu nosaukumu – 26S proteasoma (Wojcik et al., 2000; Wolf, Hilt, 2004; Collins, Tansey, 2006; Gomes et al., 2006). Šis komplekss ir ļoti stabils un izturīgs pret deterģentu un sāļu iedarbību (Scherrer, Bey, 1994; Coux et al., 1996), lai gan 26S proteasomas ir daudz jūtīgākas pret oksidatīvo stresu, nekā 20S proteasomas. Tas liek domāt, ka tieši vienkāršā proteasomas forma piedalās šūnas izdzīvošanas procesos, piemēram, pie oksidācijas stresa (Gomes et al., 2006).

Apmēram 80 – 90% no visiem iekššūnu proteīniem tiek degradēti 26S proteasomā (Zolk et al., 2006). Visi no šiem proteīniem pirms degradācijas tiek „iezīmēti” jeb tiem tiek pievienota poliubikvitīna ķēde ar vismaz trim līdz četrām molekulām (Coux et al., 1996; Wojcik et al., 2003; Wolf, Hilt, 2004).



**1.5.attēls** Proteasomu serdes (20S) un aktivatoru (19S un 11S) iespējamo kombināciju mikroskopiskie un grafiskie attēli (<http://www.servlab.co.kr/biomol/focus0802.htm>).

Ubikvitīns (Ub) ir 76 aminoskābju gara polipeptīdu ķēde, kas ir atrodama visos eikariotos. Izopeptīda saite veidojas starp substrāta lizīna (Lys) atlikumu un ubikvitīna glicīna (Gly) C-terminālu ar enzīmu kaskādes palīdzību (Wojcik et al., 2003; Yang, Yu, 2003). Ubikvitīna pievienošanas process ir ATF atkarīgs un sākas ar ubikvitīna aktivizācijas enzīmu E1, kas saistās ar Ub molekulu un nodrošina šīs molekulas transportu un saistīšanos pie ubikvitīna saistīšanās proteīna E2. Trešā proteīnu grupa E3 jeb ubikvitīna-proteīna ligāzes, saistoties ar proteīnu, veido signālu E2 proteīnam, un notiek E2 un E3 savstarpēja saistīšanās. Šī procesa laikā Ub pievienojas pie degradējamā proteīna. E3 proteīniem ir divi specifiski domēni, no kuriem viens atpazīst degradējamos proteīnus un saistās ar tiem, bet otrs saistās ar E2 molekulu. Pie katra degradējamā proteīna piesaistās vismaz vēl divas Ub molekulas, kas nozīmē, ka E1-E2-E3 kaskāde tiek atkārtota vairākkārtīgi. Otra iespēja piesaistīt papildus vēl divas Ub molekulas ir notiekot reakcijai starp monoubikvitinēto proteīnu un poliubikvitīna ķēdes/elongācijas faktora (E4) kompleksu. Bet tas var notikt tikai pēc pirmās Ub molekulas piesaistīšanās (Wolf, Hilt, 2004; Ciechanover, 2005; Martinez-Vicente et al., 2005).

Ubikvitinētais substrāts savienojas ar 19S regulatorā kompleksa „vāka” subvienībām un ar ATFāzes palīdzību tiek ievirzīts 26S proteasomās. Pirms substrāts nokļūst proteasomu serdes dobumā, 19S aktivatora pamata daļa atdala ubikvitīna molekulas (Wolf, Hilt, 2004; Collins, Tansey, 2006; Zolk et al., 2006; Konstantinova et al., 2008).

Atšķirībā no 20S proteasomas, 26S proteasomas spēj degradēt arī poliadenilētu mRNS (Konstantinova et al., 2008).

Divi citi evolucionāri konservatīvi aktivatori ir PA28 jeb 11S un PA200. Visbiežāk šie divi aktivatori veido tā saucamās „hibrīd”-proteasomas, kurām vienā galā ir 19S komplekss, bet otrā 11S vai PA200 (1.5.attēls; Kloetzel, 2004; Rechsteiner, Hill, 2005).

PA200 ir vienas ķēdes proteīns ar aptuveni 200 kDa lielu molekulmasu, kas ir sastopams organismos, sākot ar raugu un beidzot ar cilvēku (Ustrell et al., 2002; Rechsteiner, Hill, 2005).

PA200 aktivators ir visvēlāk atklātais. Par tā lomu šūnā ir izteikta hipotēze, ka tas ir saistīts ar DNS reparāciju. Tiešu pierādījumu tam nav, bet par labu šai hipotēzei ir vairāki fakti. Kā pirmo faktu ir jāmin, ka aktivators ir daudz vairāk sastopams kodolā nekā citoplazmā (Ustrell et al., 2002). Otrkārt, PA200 proteīns ir izteikti ekspresēts sēkliniekos, kur mejozes laikā palielinās DNS dubultpārāvumi. (Ustrell et al., 2002; Rechsteiner, Hill, 2005). Tomēr pilnīga skaidrība par PA200 lomu šūnā vēl nav.

PA28 aktivators ir sastopams augstākajos eikariotiskajos organismos, bet ne raugā. Aktivators sastāv no septiņiem 28 kDa lieliem proteīniem (Kloetzel, 2004; Rechsteiner, Hill, 2005). Ir sastopamas trīs PA28 subvienības:  $\alpha$ ,  $\beta$  un  $\gamma$ . Alfa un beta subvienības veido heteroheptomēru, bet gamma subvienība – homoheptomēru. 11S aktivators, pievienojoties 20S proteasomai, veido papildus gredzenu (Rechsteiner, Hill, 2005).

Analizējot visu subvienību sekvences, ir pierādīts, ka dublicējoties gēnam, kas kodē  $\gamma$  subvienību, veidojas gēns, kas kodē  $\alpha$  subvienību. Turpretī dublicējoties  $\alpha$  subvienības gēnam, veidojas  $\beta$  subvienības kodējošais gēns (Rechsteiner, Hill, 2005).

Ir zināms, ka  $\alpha$  un  $\beta$  subvienības ir sastopamas gandrīz visos audos, tai skaitā arī imūnsistēmas šūnās, bet nav sastopamas smadzeņu šūnās. Turklāt  $\gamma$  subvienībā līmenis smadzeņu šūnās ir ļoti augsts, salīdzinot ar zemo līmeni pārējos audos (Kloetzel, 2004; Rechsteiner, Hill, 2005). Atšķiras arī PA28 $\alpha\beta$  un PA28 $\gamma$  izvietojums šūnā: PA28 $\alpha\beta$  ir galvenokārt sastopams citoplazmā, bet PA28 $\gamma$  – kodolā (Rechsteiner, Hill, 2005).

PA28 $\alpha\beta$  veidošanos stimulē interferons gamma un dažādas infekcijas, turpretim PA28 $\gamma$  sintēzi interferons neietekmē un infekcijas laikā tā samazinās (Rechsteiner, Hill, 2005). Tādejādi var secināt, ka PA28 $\alpha\beta$  aktivatoram ir nozīme imūnsistēmas darbībā.

Zinot šo faktu rodas jautājums, vai PA28 $\alpha\beta$  aktivatoram nav saistība ar „imūn”-proteasomām, kas ir izteikti sintezētas tieši imūnšūnās (Kloetzel, 2004; Rechsteiner, Hill, 2005).

Veicot pētījumus, ir pierādīta „imūn”-proteasomas un PA28 $\alpha\beta$  aktivatora iespējamā saistība. Izolējot pelēm PA28 $\beta$  gēnu, neveidojas PA28 $\alpha\beta$  aktivators un „imūn”-proteasomas līmenis izteikti samazinās, salīdzinot ar pelēm, kurām šis gēns ekspresējas (Rechsteiner, Hill,



2005 – citēts Preckel et al., 1999). Pretēji Preckela (*Preckel*) un kolēģa rezultātiem Murata (*Murata*) ar kolēģiem (Rechsteiner, Hill, 2005 – citēts Murata et al., 2001) konstatēja, ka visticamāk PA28 $\alpha\beta$  neiesaistās tieši „imūn”-proteasomas sintēzē, bet drīzāk imūnšūnās nodrošina melanomas antigēna TRP-2 specifiska epitopa veidošanos. Tāpēc ir izteikta varbūtība, ka PA28 $\alpha\beta$  aktivators palīdz specifisku epitopu veidošanās procesā (Kloetzel, 2004; Glickman, Raveh, 2005).

PA28 $\alpha\beta$  darbojas arī citā šūnās. Piemēram, hroniski stimulējot truša skeleta muskuļus, tajos trīskārtīgi palielinās 20S proteasomas sintēze un 70-kārtīgi tieši PA28 $\alpha\beta$  aktivatora sintēze (Rechsteiner, Hill, 2005).

Par PA28 $\gamma$  lomu organisma šūnās vēl pilnīgas skaidrības nav. Ir konstatēts, ka pelēm bez PA28 $\gamma$  subvienības gēna ir lielāki embrionālie fibrioblasti un ir novērota lielāka G1 šūnu proporcija un blīvums, kas liek domāt par iespējamo PA28 $\gamma$  lomu šūnas ciklā (Rechsteiner, Hill, 2005 – citēts Murata et al., 1999).

### **1.4.3. PROTEASOMU NEPROTEOLĪTISKĀ DARBĪBA**

Proteasomu loma organisma šūnās galvenokārt tiek saistīta ar tās proteolītiskajām īpašībām, tomēr pēdējos gados ir parādījušies pētījumi, kas pierāda, ka proteasomu darbība var būt nesaistīta ar proteīnu degradāciju (Collins, Tansey, 2006; Malik et al., 2009).

Proteasomu sistēmas neproteolītiskā darbība ir saistīta gan ar 20S proteasomu (Malik et al., 2009), gan ar tās 19S un 11S aktivatoru kompleksiem (Collins, Tansey, 2006; Konstantinova et al., 2008; Kim et al., 2009; Malik et al., 2009).

Pētījumos ar rauga genomu ir atklāts, ka vairāki simti gēnu ir saistīti ar 20S proteasomu un/vai 19S kompleksu neatkarīgi no proteīnu degradācijas procesa (Malik et al., 2009)

Ir pierādīts, ka 19S komplekss ir iesaistīts vairāku stresa atbildes reakcijas proteīnu gēnu transkripcijā. Turklāt šī funkcija ir neatkarīga no tā dalības proteolīzē (Collins, Tansey, 2006; Malik et al., 2009). Viens no gēniem, kura transkripcijā piedalās 19S pamata subvienības, ir p53, turklāt šī regulācija ir negatīva (Kim et al., 2009). 19S aktivators veido transkripcijas kompleksu gēna promoterī RNS sintēzes procesa uzsākšanai. Liela nozīme šajā procesā ir aktivatora pamata subvienībām un to ATFāžu aktivitātei (Collins, Tansey, 2006; Konstantinova et al., 2008; Malik et al., 2009). Turpretim ribosomālo proteīnu gēnu ekspresija ir atkarīga tieši no 20S proteasomas (Malik et al., 2009).

Kā vēl vienu 19S kompleksa funkciju var minēt histonu metilēšanu. Pamata daļas proteīni Rpt4 un Rpt6 ir nepieciešami histona H3 metilēšanai pie lizīna 4. un 79. atlikuma, kas ir signāls aktīvās vietas transkripcijai (Konstantinova et al., 2008).

Šie fakti atbalsta sākotnējo K. Šerera (C.Scherrer) hipotēzi par to, ka proteasomas ir proteīnu ekspresijas regulētājas (Scherrer, Bey, 1994)

#### 1.4.4. PROTEASOMU SAISTĪBA AR SLIMĪBĀM

Šūnas homeostāze ir atkarīga no proteīnu degradācijas intensitātes, tās izmaiņas var izraisīt patoloģiju attīstību (Gomes et al., 2006). Ja kāds proteīns netiek laicīgi degradēts, tad sekas var būt sākot ar neiroloģiskām slimībām (piemēram, Parkinsona, Hantingtona slimības) un beidzot ar dažādiem jaunveidojumiem (Plempner, Hammond, 2002; Wolf, Hilt, 2004). 1.6. tabulā ir apkopoti dati par dažādu patoloģiju saistību ar proteasomu sistēmu (pēc Plempner, Hammond, 2002).

**1.6. tabula** Dažas proteasomu sistēmas saistības ar dažādām patoloģijām atkarībā no degradējamā proteīna (dati no publikācijas Plempner, Hammond, 2002).

Slimību grupa	Slimība	Ietekmētie proteīni
Neurodeģeneratīvās	Alcheimera slimība	Ubikvitīns B Presenilīns 1 un 2
	Parkinsona slimība	Parkins UCH-L1 A-sinuklēins
	Hantingtona slimība	Hantingtīns
	Spinocerebellarā trieka	Ataksīns 1
	Angelmaņa sindroms	E6-AP
	Audzēji	Papilomas vīrusa izraisītais dzemdes kakliņa vēzis
Kolorektālā un krūts karcinoma		p27
Von Hippel Lindau sindroms		Von Hippel Lindau proteīns
Metaboliskās	Cistiskā fibroze	CFTR
	Vilsona slimība	Vilsona proteīns
	Lidleja sindroms	ENaC
	A tipa insulīna rezistences sindroms	Insulīna proreceptors
	Bērnu aknu slimība, $\alpha_1$ -AT emfizēma	$\alpha_1$ -antitripsīns
Infekcijas vai vīrusu izraisītās	MHC negatīva regulācija Epšteina Barra vīrusa ietekmē	EBNA-1
	MHC negatīva regulācija citomegalovīrusa ietekmē	MHC klase I
	CD4 negatīva regulācija HIV ietekmē	CD4

Vairāki pētījumi pierāda, ka ubikvitīna – proteasomu sistēma ir nozīmīga ļaundabīgo audzēju attīstībā, regulējot šūnas cikla gaitu, apoptozes inhibīciju vai palaišanu, kā arī transkripcijas faktoru darbību. Ubikvitīna – proteasomu sistēma ir iesaistīta dažādu audzēju attīstībā, degradējot transkripcijas faktoros, piemēram, p53, c-Jun, Nf- $\kappa$ B, tādējādi kontrolējot gēnu ekspresiju. Turklāt ubikvitīna – proteasomu sistēma regulē audzēju supresoru (piemēram, retinoblastomas, VHL proteīns), kā arī protoonkogēnu (piemēram, Raf, Abl) un šūnas ciklu regulējošo proteīnu (piemēram, ciklīns, ciklīnatkarīgā kināze) un to inhibītoru degradāciju (Golab et al., 2004).

Cukura diabēta iespējamā saistība ar proteasomām ir caur insulīna receptora 1. un 2. substrāta (IRS-1 un IRS-2) proteīnu ubikvitinēšanu un degradēšanu proteasomās. Šiem proteīniem ir liela nozīme insulīna signāla kaskādē šūnā (Golab et al., 2004; Rome et al., 2004; Rhodes, 2005). Aizkuņģa dziedzera  $\beta$ -šūnu skaits, kas zināmā mērā nosaka 2. tipa cukura diabēta patoģenēzes gaitu, ir atkarīgs no IRS-2 proteīna daudzuma šūnās. Ja IRS-2 proteīna daudzums  $\beta$  šūnās ir samazināts, pastiprinās  $\beta$  šūnu apoptoze, kā sekas var attīstīties cukura diabēts (Rhodes, 2005). Ir izteikta hipotēze, ka pazemināts IRS-1 proteīna līmenis šūnā varētu būt iesaistīts insulīna rezistences mehānismā (Golab et al., 2004).

Proteasomu aktivitātes izmaiņas arī ietekmē dažādu patoloģiju attīstību (1.7. tabula). Proteasomas aktivitātes izmaiņas ir saistītas ar šūnas novecošanu, kurai seko proteasomu aktivitātes krišana (Mishto et al., 2003; Martinez-Vicente et al., 2005; Dahlmann, 2007). Citos gadījumos proteasomu proteolītisko darbību inhibē anomālais substrāts, piemēram, Parkinsona slimības gadījumā mutētais  $\alpha$ -sinuklēins (Martinez-Vicente et al., 2005). Trešais iespējamais iemesls proteasomu aktivitātes izmaiņai varētu būt proteasomu skaita palielināšanās dažādu iemeslu dēļ. Piemēram, 20-kārtīgs proteasomu koncentrācijas palielinājums serumā tika novērots pacientiem ar sistemātiskām un orgānu specifiskām autoimūnām slimībām (Sixt, Dahlmann, 2008). Alzheimer slimības viena no biežāk sastopamām formām tiek raksturota ar progresējošu deģenerāciju un smadzeņu garozas un neironu zudumu, kam seko ekstracelulāru  $\beta$  amiloīda peptīdu nogulsnešanās senilā plaknē. Beta amiloīds selektīvi inhibē 26S proteasomu peptidāzes aktivitāti, proteasomu inhibēšana izraisa palielinātu  $\beta$  amiloīda un tā priekšteča produkciju (Lee, Yu, 2005; Martinez-Vicente et al., 2005; Schmitt, 2006).

Ir arī atklāts, ka samazinot proteasomas aktivitāti aizkuņģa dziedzera beta šūnās, izteikti samazinās insulīna sekrēcija (Kawaguchi et al., 2006).

**1.7. tabula** Proteasomu aktivitātes patoloģisma izmaiņas ( pēc Dahlmann, 2007).

Slimību grupa	Slimība	Aktivizācijas izmaiņa	Proteasomu forma
Sirds slimības	Pārejoša išēmija	Samazināta	26S proteasomas
	Spiediena palielināšanās	Samazināta	26S proteasomas
Neirodeģeneratīvās	Alcheimera slimība	Samazināta	20S un 26S proteasomas
	Parkinsona slimība	Samazināta	20S un 26S proteasomas
	Amiotrofiskā laterālā skleroze	Samazināta	20S un 26S proteasomas
	Hontingtona slimība	Samazināta	20S un 26S proteasomas
Infekcijas vai vīrusu izraisītās	HIV/adenovīrus	Nomākta	26S proteasomas; imūnproteasomas
	Hepatīts B	Nomākta	20S un 26S proteasomas
	HTLV	Aktivēta	Kodola proteasomas
Kaheksijas	Sepse	Palielināta	20S un 26S proteasomas;
	Metaboliskā acidoze	Palielināta	20S un 26S proteasomas;

Kā pēdējo saikne starp proteasomas sistēmu un dažādām patoloģijām var minēt proteasomu sistēmā iesaistīto gēnu mutācijām un/vai attiecīgi gēnu ekspresiju dažādās slimībās (Martinez-Vicente et al., 2005). Sīkāk šo tēmu apskatījām apakšnodaļā „Proteasomu gēnu pētniecība saistībā ar dažādām slimībām”.

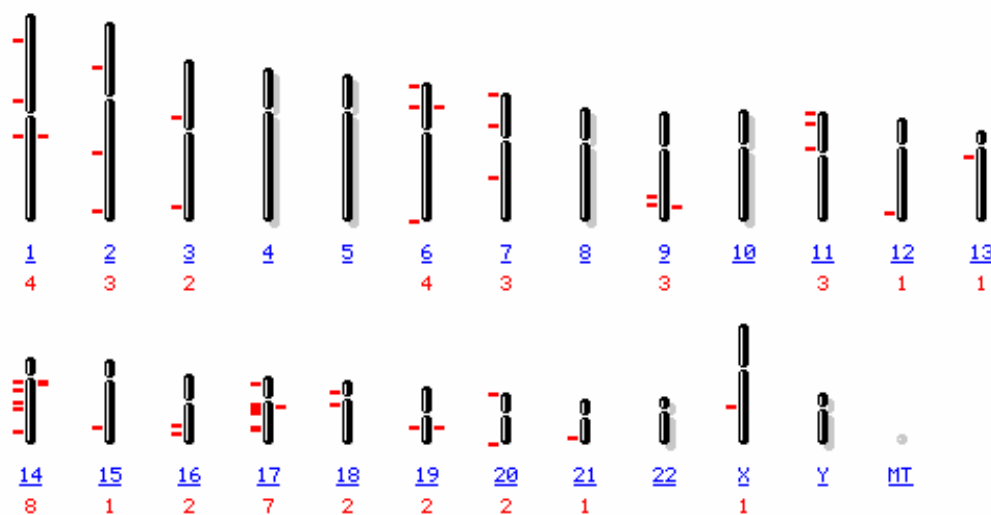
#### **1.4.5. PROTEASOMU PROTEĪNU GĒNI CILVĒKA GENOMĀ**

Arheobaktēriju proteasomu  $\alpha$  un  $\beta$  subvienību cDNS ir ļoti līdzīga eikariotu proteasomu subvienību cDNS, kas nozīmē, ka abu proteasomu gēni pieder vienai saimei. Tāpēc visas eikariotu proteasomu subvienības iedala divās grupās – arheobaktēriju proteasomu  $\alpha$  un  $\beta$  subvienībām līdzīgās grupās (Scherrer, Bey, 1994).

Cilvēka proteasomu proteīnu gēni visi ir cēlušies no alfa vai beta arheobaktēriju proteasomu olbaltumiem. Visiem proteasomu proteīniem raksturīgs īpašs konsensa motīvs, kas lokalizējas ķēdes sākumā un ir labāk izteikts  $\alpha$  grupā (Scherrer, Bey, 1994; Sjakste, Sjakste, 2001). Proteasomu gēnu un aminoskābju sekvences ir atšķirīgas, bet ar izteiktu homoloģiju starp sugām (DeMartino et al., 1991).

Cilvēka proteasomu un to aktivatoru subvienību gēnu nomenklatūrā tiek lietots saīsinājums, kas ir veidots no trim daļām. Pirmo daļu veido burti PSM (*Proteasome Subunit Macropain*), ko papildina ar attiecīgo subvienību grupu apzīmējumu: A – 20S proteasomu  $\alpha$  tipa subvienība, B – 20S proteasomu  $\beta$  tipa subvienība, C un D – attiecīgi proteasomu ATFāžu un neATFāžu subvienība, E – PA28 kompleksa subvienība, F – proteasomu

inhibitors, G – proteasomu veidošanās kompleksa subvienības. Pie burtu savienojuma klāt tiek pievienots skaitlis, kas apzīmē subvienības numuru. Visu apkopojot, izveidojas noteiktas subvienības gēna apzīmējums, piemēram, *PSMA3* (20S proteasomu alfa tipa 3. subvienība) vai *PSMB4* (20S proteasomu beta tipa 4. subvienība) (James et al., 2006; pēc NCBI datu bāzes).



**1.6.attēls** Proteasomu proteīnu gēnu izvietojums cilvēka genomā. Ar zilu un pasvītrotu skaitli apzīmēts hromosomas numurs (MT – mitohondriālais genoms), ar sarkanu ciparu apzīmēts gēnu skaits hromosomā (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>).

Cilvēka genomā, tai skaitā arī mitohondriānajā, ir izvietoti 50 proteasomu proteīnu gēni (1.6. attēls). Proteasomu gēni nav sastopami 4., 5., 8., 10., 22. un Y hromosomās. Visvairāk proteasomu gēni ir sastopami 14. un 17. hromosomā, kur attiecīgi ir astoņi un septiņi gēni, veidojot specifisku proteasomu proteīnu gēnu klāsteri. Turklāt 14.hromosomā visi gēni ir lokalizēti garajā plecā.

Vislielāko proteasomu proteīnu gēnu klāsteri 14q veido gēni, kas kodē proteasomu beta tipa 5. un 11. subvienību (attiecīgi *PSMB5* un *PSMB11*) un proteasomu PA28 aktivatora 1. un 2. subvienību (attiecīgi *PSME1* (*PA28α*) un *PSME2* (*PA28β*),) lokusā 14q11.2, proteasomu alfa tipa 6. subvienību (*PSMA6*) lokusā 14q13.1, proteasomu 26S ATFāzes 6. subvienību (*PSMC6* jeb *Rpt4*) lokusā 14q21.1, alfa tipa 3. subvienību (*PSMA3*) lokusā 14q23 un proteasomu 26S ATFāzes 1. subvienību (*PSMC1* jeb *Rpt2*) lokusā 14q32.11 (Sjakste et al., 2004). Informācija par šiem gēniem apkopota 1.8.tabulā.

**1.8. tabula** 14.hromosomas proteasomu proteīnu gēnu raksturojums.

Gēns	Pozīcija hromosomā	Gēna/proteīna garums			SNP / STR <sup>a</sup>	Blakus izvietotie gēni <sup>b</sup>	Mijiedarbības proteīni <sup>c</sup>
		Promoteris + mRNA, bp	Eksonu/ intronu skaits	cDNS, aminoskābes skaits			
<i>PSMB5</i>	14q11.2	1110 + 9295	2/1	263	19/0	<i>C14orf93</i> un <i>PSMB11</i>	<u>PSME1</u> , <u>PSME2</u> , PLK1, PSME3, SKP1
		880 + 9370	3/2	160			
		1110 + 9295	4/3	203			
<i>PSMB11</i>	14q11.2	501 + 1894	1/0	300	13/0	<i>PSMB5</i> un <i>CDH24</i>	-
<i>PSME1</i>	14q11.2	531 + 2799	10/9	249	24/0	<i>FITM1</i> un <i>FAM158A</i>	<u>PSME2</u> , <u>PSMB5</u> , PSMB10, PSMB2, PSMB3
			11/10	250			
<i>PSME2</i>	14q11.2	564 + 3282	11/10	239	12/0	<i>FAM158A</i> un <i>RNF31</i>	<u>PSME1</u> , <u>PSMB5</u> , PSMB10, PSMB2, PSMB3
<i>PSMA6</i>	14q13.1	582 + 25107	7/6	246	88/13	<i>KIAA0391</i> un <i>NFKBIA</i>	PSMA7, <u>PSMA3</u> , PSMA4, PSMA2, PSMA1
<i>PSMC6</i>	14q21.1	513 + 20821	13/12	403	49/3	<i>ERO1L</i> un <i>STYX</i>	PSMD6, PSMD4, PSMC5, PSMD9, PSMD2
<i>PSMA3</i>	14q23	640 + 27134	10/9	255	67/11	<i>TRNAK-CUU</i> un <i>HMGB1L14</i>	PSMA7, <u>PSMA6</u> , PSMA4, PSMA1, PSMA2
			10/9	248			
<i>PSMCI</i>	14q32.11	501 + 17015	11/10	440	119/3	<i>KCNK13</i> un <i>C14orf102</i>	PSMD5, <u>PSME1</u> , PSMB10, PSMD14, SKP1

<sup>a</sup> – viena nukleotīda polimorfismi / vienkārši tandēmiski atkārtojumi - informācija no datu bāzēm GeneCards ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)) un NCBI; <sup>b</sup> – Informācija no NCBI datu bāzes, pirmais gēns minēts 5' galā, bet otrs 3' galā; <sup>c</sup> – informācija no GeneCards datu bāzes, pasvītroti proteīni, kuru gēni atrodas 14ch.

Bez proteasomu un tās aktivatoru subvienību gēniem, cilvēka genomā ir atrodami vēl 124 gēni, kas ir iesaistīti proteasomu sistēmā. Galvenokārt tie ir proteīni, kas ir saistīt ar ubikvitīnu un šīs molekulas pievienošanu pie degradējamā proteīna (NCBI datu bāze).

#### **1.4.6. PROTEASOMU SISTĒMAS PROTEĪNU GĒNU SAISTĪBA AR SLIMĪBĀM**

Analizējot proteasomu proteīnu gēnu saistību ar dažādām slimībām, uzmanība ir jāpievērš ne tikai pašu proteasomu proteīnu gēniem, bet arī ubikvitinēšanas procesā iesaistīto proteīnu gēniem. Otrkārt, ir jāizdala divi pētniecības virzieni, viens ir saistīts ar paša gēna sekvenču variācijām (viena nukleotīda nomaiņa, insercijas un delēcijas, vienkārši atkārtojumi jeb mikrosatelīti utt.), bet otrs virziens – ar gēna ekspresiju slimībā iesaistītajās šūnās, salīdzinot ar veselām šūnām.

Proteīnu degradācijas procesā proteasomu sistēmā ir iesaistīti aptuveni 170 proteīni, tāpēc sīkāk apskatīsim tos gēnus, kuriem ir atrasta saistība ar autoimūnām un/vai metaboliskām slimībām, konkrētāk, ar 2.tipa cukura diabētu, un gēnus, kas atrodas cilvēka 14.hromosomā.

Ir pierādīts, ka T2DM ir saistīts ar ubikvitīna - proteasomu degradācijas ceļu, piemēram, ar ubikvitīna ligāzes E3 komponentu 1 jeb UBR1. Pētījumā analizēja 15.hromosomas lokusu 15q14 – 22.1 un tur lokalizēto gēnu polimorfismus Japānas populācijā. No 21 pētītajiem SNP, tikai *UBR1* gēna SNP rs2412747 uzrādīja saistību ar 2.tipa cukura diabētu divos neatkarīgos pētījumos. Turklāt ir zināms, ka pelēm bez šī gēna pastiprināti samazinās ķermeņa svars uz tauku šūnu skaita rēķina un veidojas aizkuņģa dziedzera darbības nepietiekamība (Yamaguchi et al., 2008).

Turpretim Itālijas populācijā tika sekvenčēts viss *PSMD9* gēns, lai meklētu saistību ar T2DM. Pētnieki atklāja trīs variācijas, kas bija sastopamas gadījuma grupā, bet ne kontroles paraugos, un ir izteikuši pieņēmumu, ka tieši šie polimorfismi veicina 2.tipa cukura diabēta vēlnu attīstību itāliešiem (Gragnoli, Cronsell, 2007).

Ar 1. tipa cukura diabētu, kas ir autoimūna slimība, ir saistīti „imūn”-proteasomas proteīnu gēnu *LMP2* (*PSMB9*) un *LMP7* (*PSMB8*) polimorfismi (Deng et al., 1995). *LMP2* un *LMP7* atrodas II klases galvenā audu saderības lokusā un ir lokalizēti transporta proteīnu gēnu *TAP1* un *TAP2* tuvumā (Kloetzel, 2004). *LMP7* gēna variācijas retās alēles homozigotiskā forma bija ar zemāku frekvenci gadījuma grupā nekā kontrolē, turklāt pēc relatīvā riskā šis genotips darbojas kā slimības aizsargājošais faktors. *LMP2* gēna asociāciju ar 1. tipa cukura diabētu uzrādīja kodējošā reģiona polimorfisms, kas izraisa aminoskābes arginīna nomaiņu pret histidīnu 60. pozīcijā. Šī variācija bija ar vāju saistību, analizējot paraugus kopumā, bet uzrādīja augstu asociāciju starp gadījuma paraugiem ar specifisku DR4-DQB1\*0302 haplotipu (Deng et al., 1995). Iepriekš minētā pētījumā iegūtos rezultātus apstiprina arī 2005.gadā publicētā analīze (Sia, Weinem, 2005).

*LMP2* gēna kodējošā reģiona polimorfisms ir bieži pētīts saistībā ar autoimūnām slimībām. Piemēram, reimatoīdālā artrīta juvenilās formas gadījumā *LMP2* gēna polimorfisms ietekmē HLA-B27 jutīgumu (Pryhuber et al., 1996; Thomson, 2002). Kā arī šī polimorfisma asociācijas analīzē ar JIA ir konstatēts, ka B alēle un BB genotips ir izteiktāks pacientiem ar pauciartrīta formu, bet, salīdzinot ar kontroli, BB genotips bija biežāk pacientiem ar poliartrīta formu. Maksimoviča (Maksymowych) (1995) grupā tika secināts, ka proteasomu subvienības *LMP2* B alēles homozigota forma palielina jutīgumu pret noteiktām JIA formām un ietekmē slimības fenotipu (Maksymowych et al., 1995a,b; 1997).

Analizējot citas autoimūnas slimības – psoriāzi (Krämer et al., 2007) un Greivs slimību (Heward et al., 1999), statistiski ticami rezultāti tika atklāti saistībā ar *LMP2* gēna iepriekš minēto kodējošā reģiona polimorfismu, bet ne ar *LMP7* gēna polimorfismu. Turklāt psoriāzi asociācijas pētījumā izteiktāka saistība *LMP2* gēnam tika konstatēta starp vīriešu dzimuma paraugiem ar slimības artropātisko formu (Krämer et al., 2007).

Pētot Šegrēna sindromu, divas zinātnieku grupas analizēja *LMP7* (Egerer et al., 2006; Krause et al., 2006) un *LMP2*, *MECL1*, *PA28alfa* (*PSME1*), *PA28beta* (*PSME2*), *PSMA2*, kā arī *PSMA4* (Krause et al., 2006) gēnu ekspresiju. Egerers (Egerer et al., 2006) ar kolēģiem pierādīja, ka *LMP7* gēna ekspresija ir statistiski nozīmīgi palielināta siekalu dziedzerā šūnās pacientiem ar primāro vai sekundāro Šegrēna sindromu, salīdzinot ar Sika (Sicca) sindromu. Turpretim Krause (et al., 2006) ar kolēģiem konstatēja *LMP2*, *MECL1* un *PSME1* gēnu ekspresijas palielināšanos, turklāt Šegrēna sindroma pacientiem tika konstatēta *LMP2* proteīna līmeņa izteikta palielināšanās.

Kopsummā var secināt, ka no visiem ubikvitīna – proteasomu sistēmas gēniem, kas nav lokalizēti 14.hromosomā, visvairāk saistībā ar autoimūnām slimībām ir pētītas tieši „imūn”-proteasomu subvienības *LMP2* jeb *PSMB9* un *LMP7* jeb *PSMB8*.

Šobrīd nav publikāciju tikai par trim 14.hromosomā lokalizētiem proteasomu proteīnu gēniem, tie ir *PSMB11*, *PSMC6* un *PSMC1*.

*PSME1* un *PSME2* gēni pārsvarā ir pētīti kopā ar *LMP2* un *LMP7* gēniem (Miyagi et al., 2003; Krause et al., 2006) un statistiski ticami rezultāti visbiežāk tiek novēroti „imūn”-proteasomu subvienībām.

*PSMB5* gēns ir pētīts proteīna līmenī saistībā ar tādu farmakoloģisku vielu kā bortezomibs, nevis saistībā ar slimībām (Lü et al., 2008; Oerlemans et al., 2008; Wang et al., 2008; Lü et al., 2009).

No 14.hromosomā lokalizētajiem proteasomu proteīnu gēniem visvairāk pētīts ir *PSMA6*. Sākot ar 2003.gadu ir publicēti vismaz 19 pētījumi, kuros ir analizēti *PSMA6* gēna



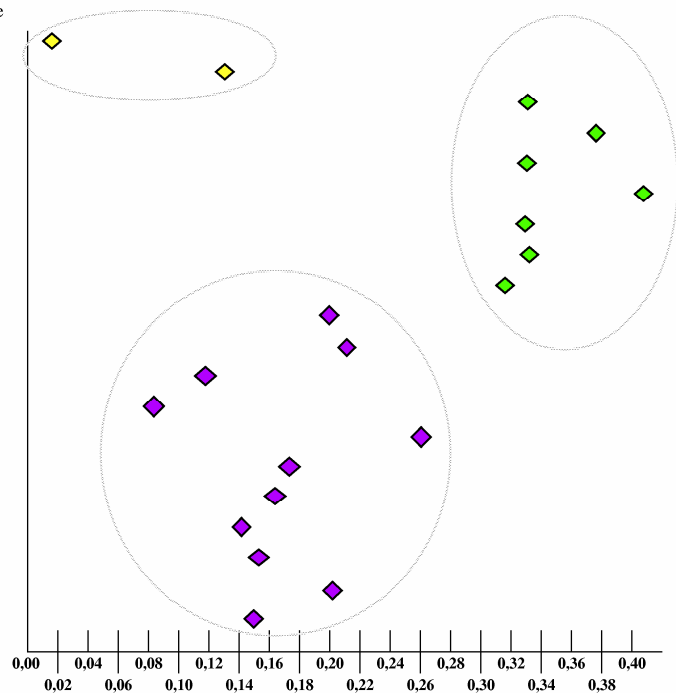
polimorfismi saistībā ar dažādām slimībām (Kalis et al., 2003; Sjakste et al., 2004; Ozaki et al., 2006; Sjakste et al., 2007a, b; Takashima et al., 2007; Barbieri et al., 2008; Banerjee et al., 2008; Bennett et al., 2008; Alsmadi et al., 2009; Banerjee et al., 2009; Freilinger et al., 2009; Hinohara et al., 2009; Honcharov et al., 2009; Lui et al., 2009; Trapina et al., 2009; Bachmann et al., 2010; Sjakste et al., 2010). Pirms tam vai paralēli vēl ir publicēti vismaz četri darbi, kuros apskata *PSMA6* gēna uzbūvi vai funkciju (Sjakste et al., 2001; Sjakste et al., 2002; Sjakste et al., 2003; Tang et al., 2007; Sjakste et al., 2008).

Pētot polimorfismu saistību ar dažādām slimībām ir analizēti *PSMA6* gēna 6. introna dinukleotīdu atkārtojums (TG)<sub>n</sub> (Kalis et al., 2003; Sjakste et al., 2004; Sjakste et al., 2007a; Sjakste et al., 2010) un vairāki SNP, no kuriem visvairāk pētīts ir 5'UTR reģiona variācija c.-8C>G (Ozaki et al., 2006; Sjakste et al., 2007b; Takashima et al., 2007; Barbieri et al., 2008; Banerjee et al., 2008; Bennett et al., 2008; Alsmadi et al., 2009; Banerjee et al., 2009; Freilinger et al., 2009; Hinohara et al., 2009; Honcharov et al., 2009; Lui et al., 2009; Trapina et al., 2009; Bachmann et al., 2010).

Dinukleotīdu atkārtojums ir lokalizēts *PSMA6* gēna 6.intronā un tam ir piešķirts nosaukums HSMS006 (Sjakste et al., 2003). Šis mikrosatelīts ir pētīts saistībā ar autoimūno Greivsa slimību Latvijas populācijā (Sjakste et al., 2004) un ar metabolisko slimību – 2.tipa cukura diabētu - Botnijas (Somija) populācijā (Kalis et al., 2003; Sjakste et al., 2007a). Analizējot (TG)<sub>n</sub> atkārtojumu Greivsa slimībā, tika pierādīta četru alēļu saistība ar slimību, turklāt trīs no alēlēm bija ar aizsargājošu efektu, bet viena alēle uzrādīja rika alēles pazīmes (OR = 4,18; Sjakste et al., 2004). Pētījumā Botnijas populācijā par saistību ar T2DM statistiski ticama atšķirība tika konstatēta vienai alēlei, un tā bija ar riska alēles pazīmēm (OR = 1,99; Kalis et al., 2003; Sjakste et al., 2007a).

Izmantojot vairākus modeļus, Ozaki ar kolēģiem konstatēja, ka c.-8C>G SNP retā alēle G palielina gēna ekspresiju par 1,5 līdz 1,8 reizes, salīdzinot ar biežāk sastopamo alēli. Tam par iemeslu varētu būt specifiska nezināma kodola faktora saistīšanās pie DNS alēles G (Ozaki et al., 2006; Bachmann et al., 2010). Tas varētu būt par iemeslu konkrētā SNP pētīšanai tik dažādās populācijās (dati par G alēles frekvences sadali dažādās populācijas attēloti 1.7.attēlā). Kā redzams 1.7.attēlā, G alēles frekvences sadalījumā var izdalīt trīs populācijas – Āfrika (1.7. attēlā dzeltenī rombi), Austumāzija (1.7 attēlā zaļi rombi) un Eiropa un Rietumāzija ((1.7. attēlā violeti rombi). Starp šīm zonām ir novērojama atšķirības tieši alēles sadalē.

Pētījums	Populācija	G alēle
HAPMAP	Sahāras āfrikāņi	0.017
CCR	Āfrikas amerikāņi	0.130
CCR	Ķīna	0.333
HAPMAP	Ķīna	0.378
Lui et al., 2009	Ķīna	0.32
HAPMAP	Tokija, Japāna	0.409
JBIC-allele	Japāna	0.330
Ozaki et al., 2006	Japāna	0.333
Takashima et al., 2007	Japāna	0.317
Banerjee et al., 2008	Indija	0.200
Banerjee et al., 2009	Indija	0.213
HAPMAP	Eiropa	0.117
CCR	Eiropa	0.083
CEPH	Eiropa	0.260
Sjakste et al., 2004	Lielbritānija	0.173
Benett et al., 2008	Lielbritānija	0.163
Freilinger et al., 2009	Lielbritānija	0.144
Freilinger et al., 2009	Vācija	0.154
Bachmann et al., 2010	Vācija	0.203
Barbieri et al., 2008	Itālija	0.149



**1.7.attēls** *PSMA6* gēna SNP c.8C>G retās alēles frekvenču apkopojums. HAPMAP - HapMap datu bāzē ([hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/)); CCR – pētījums „Coriel Cell Repository” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>); CEPH – franču pētījums „Centre d'Etude du Polymorphisme Humain”; JBIC-allele – pētījums, kurā piedalījās brīvprātīgie Japānā. Dzeltenie rombi – Āfrikas populācija, zaļie rombi - Austumāzija populācija; violetie rombi - Eiropa un Rietumāzija populācija.

Asociācijas dati par c.-8C>G saistību ar dažādām slimībām ir variabli. Kā piemēru var minēt pētījumus par miokarda infarktu. Japānas populācijā saistība ar slimību tika konstatēta ar augstu statistisko ticamību (Ozaki et al., 2006), kā arī statistiski ticama saistība tika pierādīta Saūda Arābijas (Alsmadi et al., 2009) un Ķīnas (Lui et al., 2009) populācijā, bet Lielbritānijas (Sjakste et al., 2007b; Bennett et al., 2008) un Japānas (Takashima et al., 2007) populācijās saistība ar šo slimību netika konstatēta.

Citas sirds un asinsvadu slimības, kam ir pierādīta saistība ar *PSMA6* gēna SNP c.-8C>G, ir Konoārā nepietiekamība Japānas, Korejas (Hinohara et al., 2009) un Indijas (Banerjee et al., 2009) populācijās un arteriālā hipertensija pusaudžiem Ukrainas populācijā (Honcharov et al., 2009). Galvas smadzeņu insults tika pētīta Itālijas (Banerjee et al., 2008) un Vācijas (Freilinger et al., 2009) populācijās, un netika konstatēta statistiski ticama atšķirība starp kontroles un gadījuma grupām.

Multiplās mielomas gadījumā Vācijas populācijā alēle G tika saistīta ar dzīves ilguma palielināšanos, salīdzinot ar pacientiem ar C alēli (Bachmann et al., 2010).

## 2. MATERIĀLI UN METODIKA

### 2.1. DNS paraugu kolekcija

Analizējot iespējamo 14.hromosmas proteasomu proteīnu gēnu saistību ar metabolisko un autoimūno slimību, izmantojām gadījuma/kontroles pētījuma shēmu. Kopā analizējām četru kolekciju DNS paraugus. Divas no kolekcijām bija gadījuma grupas, kuras veidoja DNS paraugi no pacientiem ar 2. tipa cukura diabētu vai juvenīlo idiopātisko artrītu, bet pārējās divas bija attiecīgi pacientu DNS bez šīm slimībām. Sīkāks kolekciju raksturojums sniegts turpmākajā tekstā.

**2.1. tabula** Juvenīlā idiopātiskā artrīta un kontroles 1 grupas DNS kolekcijas apraksts (ANA – antinukleārās antivielas; RF – reimatoīdais faktors; HLB B27 – cilvēka leikocītu antigēns B27).

Pazīmes	Kolekcija	JIA		Kontrole 1
	Kopā	JIoA	JIpA	
Paraugu skaits	180	103	56	238
Vidējais vecums, gadi	14,45	14,65	14,49	-
Vidējais saslimšanas vecums, gadi	11,6	12,45	10,07	-
Sievietes, %	62,92	60,40	67,86	58,43
RF „-”, %	83,82	91,67	74,55	-
ANA „-”, %	83,87	91,84	75,00	-
HLA B27 „+”, %	73,63	66,67	85,71	-

Juvenīlā idiopātiskā artrīta kolekciju (2.1.tabula) veidojām sadarbībā ar profesori Ingrīdu Rumbu-Rozenfeldu. No viņas grupas saņēmām Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas „Gaiļezers” un P. Stradiņa universitātes slimnīcas JIA pacientu asins paraugus. DNS kolekcija veidojām, sākot ar 2003. gadu. Saņemtos paraugus dalījām pēc slimības apakštipiem, cenšoties veidot katram apakštipam atsevišķu apakšgrupu. Gala rezultātā izveidojām divas apakšgrupas – oligoartrīta grupu (turpmāk JIoA), kurā iekļāvām gan persistējošo, gan ekstendējošo oligoartrīta formu, un poliartrīta grupu (JIpA), kurā ietvērām poliartrīta formas gan ar negatīvu, gan ar pozitīvu reimatodologu faktoru. Pārējiem subtipiem bija pārāk maz paraugu atsevišķas grupas veidošanai. JIoA un JIpA grupas sadale pēc dzimuma (2.1. tabula) ir atbilstoša literatūrā esošajiem datiem (Ravelli, Martini, 2007). Kā kontroles grupu (turpmāk Kontrole 1) šajā pētījumā izmantojām atsevišķu Latvijas populācijas DNS paraugu kolekciju, ko veidojām no anonīmu (zināms tikai dzimums un tas,

ka pacientam nav autoimūna slimība) SIA "Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīcas" klīnika "Biķernieki" pacientu asins paraugiem. No slimnīcas saņēmām asins paraugus no pacientiem, kas griezās slimnīcā pēc medicīniskās palīdzības dažādu traumu iegūšanas gadījumos. Juvenilā idiopātiskā artrīta DNS gadījuma un kontroles 1 kolekciju apraksts ir redzams 2.1. tabulā.

2. tipa cukura diabēta asociācijas pētījuma DNS kolekcijas, gan gadījuma, gan kontroles, vadojām, sadarbojoties ar profesoru Valdi Pīrāgu. Gadījuma grupā bija iekļauti P. Stradiņa universitātes slimnīcas T2DM pacientu DNS paraugi, bet kontroles grupu veidoja DNS paraugi no šīs slimnīcas endokrinoloģiskās nodaļas pacientiem, kuriem nekonstatēja nevienu no cukura diabēta formām un kuru vecums un ar slimību nesaistītie parametri bija līdzvērtīgi gadījuma grupas pacientiem. 2.2. tabulā ir redzamas abu grupu raksturojums; gadījuma grupa turpmāk tiks apzīmēta kā T2DM (no slimības angliskā nosaukumu *type 2 diabetes mellitus*), bet kontroles grupa tiks apzīmēta kā Kontrole 2. Abu DNS paraugu kolekciju pacientiem noteicām rādītājus, kas var ietekmēt slimības izpausmi, smēķēšanu, ķermeņa masas indeksu (BMI), kā arī vairākus medicīniskus parametrus, tai skaitā, arteriālo hipertensiju, triglicerīdu daudzumu plazmā, holesterīna līmeni, glikozes līmeni.

Darbam ar DNS paraugu kolekcijām saņemta atļaujas sākotnēji no Latvijas Eksperimentālās un klīniskās medicīnas institūta Zinātniskās izpētes ētikas komisijas, bet vēlāk no Centrālās Ētikas komisijas.

**2.2. tabula** 2. tipa cukura diabēta pētījuma gadījuma un kontroles grupas DNS kolekcijas apraksts.

	T2DM	Kontrole 2
Paraugu skaits	104	123
Vidējais vecums	59,19 ± 9,58	53,78 ± 12,93
Sievietes, %	66,99	53,66
Vidējais BMI	35,41 ± 16,51	25,82 ± 8,03
Smēķēšana:		
Nav smēķējuši	73,68	75,00
Ir atmetuši	18,42	15,00
Smēķē	7,89	10,00
Laboratorijas rādītāji:		
Arteriālā hipertensija (%)	70,19	15,45
Dislipidēmija (%)	33,65	15,45
Triglicerīdi plazmā, ( mMol/l)	2,51	2,59
Kopējais holesterīns ( mMol/l)	5,64	5,59
ZBL holesterīns ( mMol/l)	3,32	3,59
ABL holesterīns ( mMol/l)	1,35	1,37
Glikēmija tukšā dūšā ( mMol/l)	9,39	5,09
Hemoglobīns (g/dl)	13,24	12,87
Eritrocītu skaits (milj/mkl)	4,44	4,35
Leikocītu skaits (tūkst./mkl)	7,80	7,72
Trombocītu skaits (tūkst./mkl)	246,45	265,26
Proteinūrija (g/l)	0,27	0,60
Kreatinīns (mg/%)	1,11	1,76

## 2.2. DNS izdalīšana un koncentrācijas noteikšana

DNS izdalīšanā no asinīm izmantojam divas metodes: izsālīšanas metodi (Juodka et al., 1995) un izdalīšanu ar reaģenta komplekta jeb kita palīdzību (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas, Lietuva).

### Izsālīšanas metodes protokols:

- ⇒ Asinīm pievienojām atdzesētu destilētu ūdeni (vismaz 4 reizes vairāk), maisījumu sakratījām un centrifugējām, lai nogulsnetu leikocītus.
- ⇒ Nogulsnēm pievienojām līzes buferi (10 mM Tris - HCl, 0,32M saharoze, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% TRITON X100, pH = 7,5), hemogonizējām, izmantojot kratītāju, 10 minūtes maisījumu paturējām uz ledus (-4 ° C) un centrifugējām, lai izgulsnetu šūnas kodolus.

⇒ Nogulsnēm pievienojām resuspensijas šķīdumu (120 mM NaCl, 15 mM EDTA, pH = 8,0), proteināzi K (Proteinase K), RNāzi un 10% SDS (nātrija dodecilsulfāts). Inkubējam divas stundas pie 56° C.

⇒ Pēc inkubācijas pievienojām 5 M NaCl šķīdumu, atstājām maisījumu pie -4° C pusstundu, pēc tam centrifugējām, lai atdalītu šķīdrajā fāzē DNS molekulas.

⇒ Supernatantam pievienojām 96% etilspirtu un atstājām pie -20° C līdz nākošajai dienai. Centrifugējām, lai izgulsnētu DNS molekulas.

⇒ Nogulsnēm pievienojām 70% etilspirtu. Centrifugējām un nogulsnes žāvējām.

⇒ Pievienojām 100 µl destilētu, autkolāvētu ūdeni, lai izšķīdinātu nogulsnes.

Izdalot DNA ar reaģenta komplektu, vadījāmies pēc pievienotā protokola.

Savstarpēji metodes atšķiras ar nepieciešamo asins daudzumu un procesa ilgumu.

Pēc DNS izdalīšanas, neatkarīgi no metodes, ir jāpārlicinās par parauga kvantitāti un kvalitāti. Kvalitātes noteikšanai izmantojām elektroforēzes metodi 1% agarozes gēlā. Elektroforēzes gēla attēlā analizējām, vai paraugā nav RNS un/vai proteīnu piemaisījums, kā arī vai genomiskā DNA nav fragmentējusies.

Paralēli kvalitātes analīzei noteicām arī parauga aptuveno koncentrāciju, izmantojot marķieri GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Lietuva), kura 500 bp fragments 1:3 šķaidījumā fluorescē UV gaismā kā 20 ng DNS. Noteicām katra DNS parauga aptuveno koncentrāciju vienā mikrolitrā, ko pārbaudījām ar spektrofotometra palīdzību, nosakot precīzu DNS koncentrāciju katrā paraugā. Pēc iegūtās koncentrācijas aprēķinājām cik reizes ir jāšķaidā paraugs, lai iegūtu darba koncentrāciju, kas ir no 10 līdz 20 ng/µl.

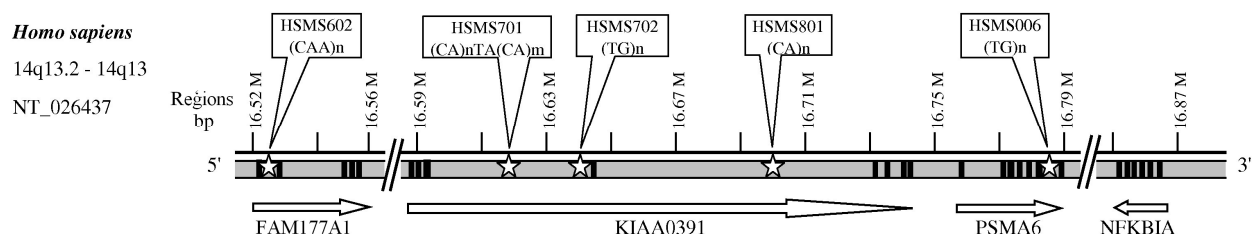
Elektroforēzei izmantojām 1% agarozes (Chempol, Čehija) gēlu un 1% TAE buferi (pH = 8,5, 40 mM Tris, 20 mM etiķskābe, 2 mM EDTA). Koncentrācijas noteikšanai izmantojām Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Vācija).

### **2.3. Analizētie lokusi un to genotipēšanas metodes**

Visu četru kolekciju paraugiem analizējām piecus mikrosatelītus (MS) un septiņas viena nukleotīda nomaiņas (SNP; *single nucleotide polymorphisms*) lokalizētus 14.hromosomas garā pleca proteasomas gēnu klāsterā rajonā no 14q11.2 līdz 14q23.

Visi pieci MS ir lokalizēti trīs gēnu intronos loksā 14q13.1 – q13.3 (2.1.attēls). HSMS006 marķieris ir lokalizēts proteasomas alfa 6. subvienības gēnā, bet pārējie augšup no šī gēna divos citos gēnos - *FAM177A1 (C14orf24)* un *KIAA0391*. *PSMA6* gēna sestajā intronā lokalizētais HSMS marķieris ir dinukleotīdu atkārtojuma jeb (TG)<sub>n</sub> mikrosatelīts. *KIAA0391* gēnā ir lokalizēti trīs mikrosatelīti: HSMS801, HSMS702, HSMS701, kas visi ir dinukleotīdu

atkārtojumi, precīzāk, attiecīgi  $(CA)_n$ ,  $(TG)_n$  un  $(AC)_mAT(AC)_n$ . Pēdējais un vistālāk no *PSMA6* gēna lokalizētais HSMS marķieris ir HSMS602, sākotnēji raksturots kā  $(CAA)_n$  atkārtojumu.



**2.1.attēls** HSMS marķieru izvietojums 14.hromosomas lokusā q13 – q13.2. Gēna eksoni iekrāsoti melni, bet introni – pelēki; mikrosatelīti atzīmēti ar piecstratu zvaigzni; ar bultām norādīts gēnu transkripcijas virziens.

Septiņus SNP (*PSMB5* gēna polimorfisms c.70C>T; *PSMA6* gēnā c.-4543\_-4544insC, c.110C>A un c.-8C>G; c.86-104A>G un c.86-46C>T lokalizēti *PSMC6* gēnā un *PSMA3* SNP c.543+138G>A) izvēlējamies pēc to variabilitātes 40 JIA un Kontroles 1 kolekcijas paraugos. Šajā pētījumā analizējam 14ch proteasomu gēnu 22 polimorfismus. Izvēlējamies SNP, kuru retās alēles frekvence bija lielāka par 0,05 jeb 5,00 %, kā arī kuru genotipēšanas bija pozitīva vismaz 95% paraugu.

## 2.3.1. MIKROSATELĪTU ANALĪZE

### 2.3.1.1. Mikrosatelītu rajonu amplifikācijas

Visu mikrosatelītu genotipēšanā izmantojam fragmentu garuma analīzes metodi, kuras pamatā ir MS reģiona amplifikācijas produkta garuma noteikšana. Visu marķieru reģionus amplificējam ar polimerāzes ķēdes reakciju (PCR; *polymerase chain reaction*), izmantojot praimeru pārus (2.3. tabulā), kuros tiešie praimeru satur fluorescējošo iezīmi. PCR praimeru sekvenču ir publicētas agrāk (Sjakste et al., 2004).

Pirms visu paraugu genotipēšanas veicām papildus PCR un sekvencēšanas optimizāciju, kurā noteicām gan labākos apstākļus amplifikācijai, gan amplificētā DNS optimālo koncentrāciju sekvencēšanas analīzei.

Katram paraugam veicām visu piecu mikrosatelītu rajonu amplifikāciju, PCR produktus sajaucām un maisījumu analizējam uz sekvenātorā ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Lielbritānija).

Sekvenātorā tiek izmantoti kapilāri ar gēlu, kurā notiek produktu sadalīšana, balstoties uz to migrācijas ātrumu atkarībā no DNS molekulas garuma jeb lieluma. Kapilāra vienu galu ievada paraugā un pievieno spriegumam. Izraisītā elektriskā lauku ietekmē fragments sāk

migrēt pa kapilārā esošo gēlu. Kapilāra otrā galā ir pievienots lāzers, kas izraisa fragmenta fluorescentās iezīmes spīdēšanu jeb fluorescenci, ko fiksē dators un pārveido analizējamās datus.

**2.3. tabula** HSMS genotipēšanā izmantotie praimeru, to sekvences un sagaidāmais fragmentu garums.

MS (nosaukums _atkārtojums)	Praimera virziens	Praimera sekvence	Sagaidā- mais PCR fragmenta garums, bp
HSMS602 (CAA) <sub>10</sub> (A) <sub>8</sub>	Tiešais	5'-6-FAM-GAGACTCCGTCTCAAAACAG -3'	177
	Atgriezeniskais	5'-ACAGTTTGGGGGAAATGTCTTA -3'	
HSMS701 (AC) <sub>5</sub> AT(AC) <sub>19</sub>	Tiešais	5'- HEX-TCCATAGCACTTATCTGACATGC -3'	136
	Atgriezeniskais	5'-AAAATCCCTACCCTTGTGGTG -3'	
HSMS702 (TG) <sub>12</sub>	Tiešais	5'-6-FAM-TGCATCCATTAGACTGGCTTT -3'	124
	Atgriezeniskais	5'-TGCAGTGACCTTTATTATTGTTTTG -3'	
HSMS801 (CA) <sub>20</sub>	Tiešais	5'- NED-ATGCAGTATGCCACCAACTGT -3'	147
	Atgriezeniskais	5'-CCGAGAGGCAACCAGTATTATC -3'	
HSMS006 (TG) <sub>18</sub>	Tiešais	5'- HEX-AGGCCAATACAAATTCAATTCC -3'	182
	Atgriezeniskais	5'-CAGCCCTGTGAGGCAGTT -3'	

PCR metodika visiem lokusiem:

PCR amplifikācijā izmantojām 5x NH<sub>4</sub> PCR buferi (gala koncentrācija 1x) (Fermentas, Lietuva), MgCl<sub>2</sub> šķīdumu (1 – 1,5 mM) (Fermentas, Lietuva), *Taq* DNA polimerāzi (koncentrācija 5u/μl) (Fermentas, Lietuva), dNTP (200 μM) (Fermentas, Lietuva) un konkrētā MS genotipēšanai paredzētos praimerus (10 pM) (Applied Biosystems, Lielbritānija un Metabion International AG, Vācija). Kopīgais tilpums maisījumam, kur notika PCR process, bija 15 μl.

MgCl<sub>2</sub> šķīduma koncentrācija katra MS PCR izvēlējamies pēc iepriekš veiktas optimizācijas, kurā pārbaudījām 1 mM, 1,5 mM, 2,0 mM un 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> koncentrācijas.

Programma: 5 minūtes pie 94 °C; 35 cikli 30 sekundēs pie 94 °C, 30 sekundes pie 55 °C, 30 sekundes pie 72 °C; 10 minūtes pie 72 °C; 4 °C (GeneAmp PCR System 9700, *Perkin Elmer*).

Fragmenta garuma noteikšanas metode:

Izmantojām 1 μl no PCR produktu maisījuma, kam pievienojām reaģentu ROX 400 HD un HiDi (Applied Biosystems, Lielbritānija) maisījumu ar gala tilpumu 10 μl 2.tipa cukura



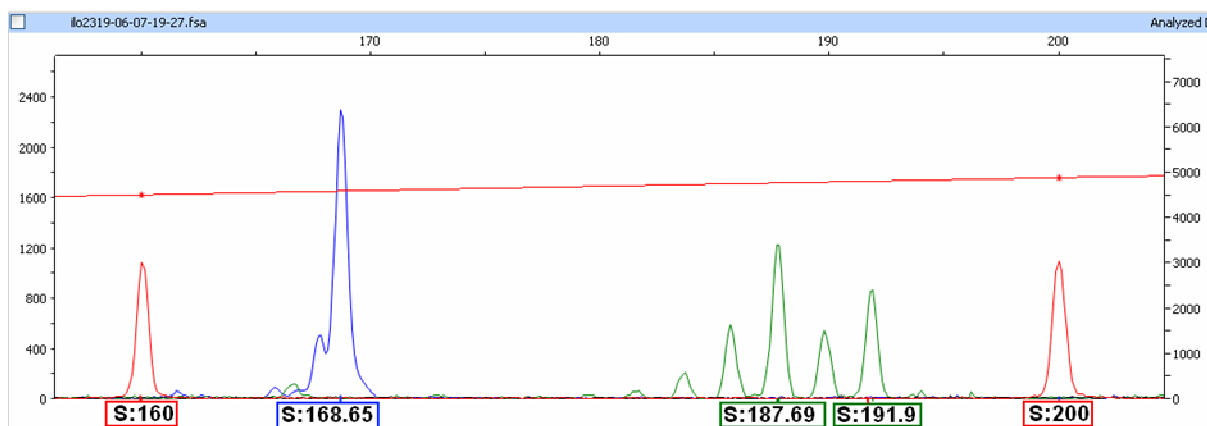
diabēta gadījuma un kontroles 2 paraugiem un 21 µl JIA gadījuma un kontroles 1 grupās paraugiem.

Iegūto maisījumu denaturējām 5 minūtes pie 95 °C, pēc tam turējām 5 minūtes uz ledu. Pēc tam maisījumu ievietojām sekvenātorā ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Lielbritānija) fragmenta garuma noteikšanai.

### 2.3.1.2. Mikrosatelītu sekvencēšana un genotipēšana

Pēc MS amplificēšanas un sekvencēšanas paraugus analizējām ar datorprogrammām ABI Prism Genotyper (v. 3.7, Applied Biosystems) vai Peak Scanner (v.1.0, Applied Biosystems), ar kuru palīdzību var noteikt amplificētā un nosekvencētā fragmenta garumu.

Datorprogramma, izmantojot sekvencēšanās reakcijā pievienoto marķieri un informāciju par tā fragmenta garumiem, veic katra parauga visu amplificēto fragmentu analīzi. Katram PCR produktam tiek noteikts precīzs fragmenta garums bāzu pāros, izmantojot programmas algoritmu.



**2.2.attēls** Mikrosatelīta HSMS602 (zilais pīķis) un HSMS006 (zaļie pīķi) sekvencēšanas rezultāta attēlojums; HSMS602 gadījumā viens „pīķis” jeb homozigota, bet HSMS006 gadījumā divi maksimālie „pīķi” jeb heterozigota. Sarkanie „pīķi” – garuma marķieris.

Apskatot katra parauga rezultātu (piemērs 2.2.attēlā), ir iespējams noteikt visu piecu marķieru abas alēles. Zinot katra marķiera praimeriem pievienoto iezīmi, ir iespējams noteikt tā krāsu sekvencēšanas apstrādes programmā atkarībā no analizē izmantotā gaismas filtra. Mūsu gadījumā 6-FAM būs redzams kā zilā krāsa, HEX – kā zaļā, bet NED – kā melna. Otrkārt, zinot sagaidāmo fragmenta garumu, ir iespējams vienlaicīgi analizēt vairākus mikrosatelītus jeb datorprogrammas radītajā attēlā esošos „pīķus” jeb maksimuma punktus, kas apzīmē alēles. Ja ir redzami divi „pīķi”, tad ir heterozigota pēc mikrosatelīta, bet, ja ir tikai viens izteikts „pīķis”, tad ir homozigota. 2.2. attēlā ir redzams viena parauga HSMS602

un HSMS006 marķiera analīzes rezultāts. Šis paraugs pēc HSMS602 ir homozigots pēc alēles ar garumu 169 bāzes pāri un pēc mikrosatelīta HSMS006 heterozigots ar alēlēm 188 un 192 bp.

### 2.3.1.3. Mikrosatelītu motīvu noteikšana

Lai noteiktu precīzu katra MS atkārtojumu katram paraugam, ir jāveic marķieru motīvu precizēšana. Šim nolūkam izmantojām sekvencēšanas metodi, nosakot amplificētā HSMS rajona fragmenta nukleotīdu secību.

PCR reakcijā izmantojām 2.4. tabulā sniegtos praimerus. Amplifikāciju veicām paraugiem, kuri bija homozigoti pēc konkrētā mikrosatelīta un kuriem zinājām šī marķiera precīzu genotipēšanā iegūto fragmentu garumu.

**2.4. tabula** HSMS marķieru sekvencēšanā izmantotie praimeri, to sekvenču un sagaidāmais sekvencējamais fragments.

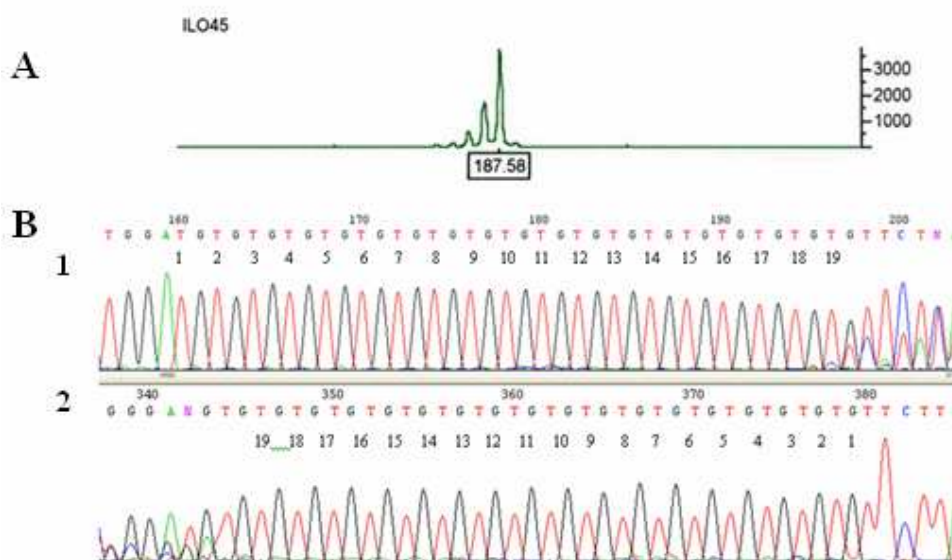
STR nosaukums	Praimera virziens	Praimera sekvenču	Sagaidāmais fragments, bp
HSMS602 (CAA) <sub>10</sub> (A) <sub>8</sub>	Tiešais	5'- CCTGGGTGCATTTTACACG -3'	801
	Atgriezeniskais	5'- TGAAAATGACGTGGCTTCCT -3'	
HSMS701 (AC) <sub>5</sub> AT(AC) <sub>19</sub>	Tiešais	5'- GCATCATTTGGCTTGGAAC -3'	1103
	Atgriezeniskais	5'- TCATCACCCTCCCTAATCTCA -3'	
HSMS702 (TG) <sub>12</sub>	Tiešais	5'- TGCATCCATTAGACTGGCTTT -3'	124
	Atgriezeniskais	5'- TGCAGTGACCTTTATTATTGTTTTG -3'	
HSMS801 (CA) <sub>20</sub>	Tiešais	5'- GCTGGGTAGGTATCCTGCAT -3'	1013
	Atgriezeniskais	5'- GTCCATTTGCATTGCTCAGA -3'	
HSMS006 (TG) <sub>18</sub>	Tiešais	5'- CCCAGCACCTGAGATCTGTT -3'	925
	Atgriezeniskais	5'- GTTGAAAGCTGTAGTGCAGCA -3'	

Katra parauga PCR produkts, kas tika paredzēts sekvencēšanai, tika attīrīts. Attīrīšanas procesā atbrīvojāties no amplifikācijā neizmantotajiem reaģentiem, kas var traucēt kvalitatīvas sekvenču motīva iegūšanai. Attīrīšanai izmantojām divas metodes: vienā PCR produktu attīrījām, izgriežot no 1% agarozes gēla. Šajā gadījumā izmantojām DNS ekstrakcijas kitu (DNA Extraction kit, Fermentas, Lietuva). Otrā metodē attīrījām pašu PCR produktu, izmantojot DNS attīrīšanas kitu (Wizard DNA Clean-Up System, Promega, ASV).

Izmantojot abas metodes, attīrīto produktu pārbaudījām 1% agarozes gēlā, ar kura palīdzību arī noteicām aptuveno produkta koncentrāciju, ko norādījām Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra (BMC) Genoma centra zinātniekiem, kas veica sekvencēšanas procedūru.

Pēc PCR produkta attīrīšanas, tam tika veikta atkārtots PCR, kurā arī tika izmantoti 2.4.tabulā redzamie praimerī. Atšķirībā no iepriekšējā PCR šajā tika papildus pievienoti didezoksinukleotīdi ar dažādām fluorescētām iezīmēm. Šis PCR produkts tika analizēts ar sekvenatora Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Lielbritānija) palīdzību.

Pēc sekvencēšanas iegūtos rezultātus apstrādājām ar datorprogrammu ChromasLite vers.2.01 (Technelysium Pty Ltd, Austrālija). Iegūtajā attēlā (piemērs 2.3. attēlā) noteicām konkrētā marķiera atkārtojuma skaitu, ko pielīdzinājām zināmajam genotipēšanas fragmenta garumam. Piemēram, 2.3.attēlā redzamajam paraugam HSMS006 mikrosatelīta lokusa genotipēšanā iegūtais fragmenta garums ir 188 bāzu pāri (2.3.attēls A), bet pēc sekvences motīvs ir (TG)<sub>19</sub> (2.3.attēls B). Tātad citiem paraugiem ar tādu pašu fragmenta garumu būs tāds pats atkārtojums, bet paraugiem ar fragmenta garumu, piemēram, 184 bp, atkārtojuma skaits būs par četriem nukleoīdiem īsāks jeb (TG)<sub>17</sub>. Līdzīga analīze tika veikta arī pārējiem četriem mikrosatelīta lokusiem.



**2.3.attēls** Mikrosatelīta HSMS006 motīva noteikšanas rezultāta attēlojums; A – marķiera genotipēšanas rezultāts ar redzamu 188 bp garu alēles homozigotu; B – marķiera motīva sekvencēšanas rezultāts ar redzamu (TG)<sub>19</sub> atkārtojumu: 1. attēlā tiešā praimera sekvencēšanas rezultāts; 2. attēlā atgriezeniskā praimera sekvencēšanas rezultāts.

## 2.3.2. SNP ANALĪZE

### 2.3.2.1. SNP un to amplifikācijas

Ar NCBI un Genomatix (<http://www.genomatix.de>) datu bāzu palīdzību veicām bioinformātisko analīzi *PSMB5*, *PSME1*, *PSME2*, *PSMA6*, *PSMC6* un *PSME3* gēniem, lai noskaidrotu ar šiem gēniem saistītos SNP. Iegūtos rezultātus analizējām ar HapMap datu bāzē ([hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/)) pieejamo datorprogrammu Haploview vers.4.01 (Barrett et al., 2005), lai noteiktu tagSNP.

No iegūtās informācijas izvēlējāmies četrus SNP lokalizētus *PSMA6* gēna intronos, divus SNP – *PSMC6* un vienu SNP – *PSMA3* gēnos. *PSMB5*, *PSME1* un *PSME2* gēniem nav zināms neviens tagSNP, tāpēc šo gēnu analīzei izvēlējāmies divus polimorfismus, kas ir lokalizēti kodējošajā daļā. 2.4. attēlā ir redzami izvēlētie SNP.

*PSMA6* gēnu analizējām padziļināti, jo tajā ir lokalizēts viens no HSMS marķieriem. Šim gēnam, izmantojot PupaSNP (<http://pupasnp.bioinfo.ochoa.fib.es/>) datu bāzi, noteicām SNP, kas ir lokalizēti gēna 5' galā, promoterī un 10000 bāzu pāru reģionā no pirmā gēna metionīna. No analizētā rajona izvēlējāmies četrus polimorfismus, lokalizētus pirms promotera, tai skaitā vienu inserciju/delēciju (c.-4543\_-4544insC). Papildus nolēmām sekvencēt gēna promoteri un 5'UTR galu, kas sevī ietver mūsu grupas iepriekš analizētos SNP – c.-110C>A un c.-8C>G.

Kopā genotipējām 14. hromosomas sešos proteasomas gēnos lokalizētus 22 SNP, no kuriem septiņus izvēlējāmies asociācijas analīzei saistībā ar 2. tipa cukura diabētu un juvenīlo idiopātisko artrītu (2.4. attēls). Izvēli veicām pēc 40 juvenīlā idiopātiskā artrīta un 40 kontroles 1 grupas paraugu genotipēšanas. SNP atlasē vadījāmies pēc diviem principiem: pirmkārt, pozitīvo paraugu procentualitātes (vismaz 95% gan kontroles, gan gadījuma grupā). Otrkārt, pēc retās alēles frekvences abās grupās (vismaz 0,05 jeb 5% vienā no grupām).

Darba metodes plānošanā izmantojām bioinformātikas analīzi. Interneta programmā RestrictionMapper ([www.restrictionmapper.org](http://www.restrictionmapper.org)) SNP reģioniem pārbaudījām iespējamās restrikcijas saitus. Šādu analīzi veicām, lai noteiktu, vai mums interesējošos viena nukleotīda polimorfismus varam analizēt ar restrikcijas enzīma saita polimorfismu (RESP) jeb restrikcijas enzīma alēlspecifiskā saita metodi, ja nē, tad izvēlējāmies alēlspecifisko polimerāzes ķēdes reakciju vai genotipēšanu ar MALDI-TOF MS.

1. pielikumā ir redzams visu analizēto viena nukleotīda polimorfismu izvēlētais metode un tām paredzētos praimerus. Septiņus SNP analizējām, izmantojot restrikcijas enzīma saita polimorfismu, trīs polimorfismus analizējām sekvencējot, divu variāciju gadījumā

izvēlējāmos alēļspecifisko polimerāzes ķēdes reakciju un vienas SNP gadījumā izmantojām ar nesakritības (*mismatch*) praimeru PCR izveidotu RESP, bet deviņus polimorfismus analizējām, izmantojot MALDI-TOF MS metodi.

Reģions	Gēns	Pozīcija <sup>a</sup>	Gēna modelis		Markiera raksturojums	
			Izoforma <sup>b</sup>	ID	Funkcija	Motīvs
14q11.2	<i>PSMB5</i>	4495060		rs11543947*	1.eksons	c.70C>T
		4504429		rs12043	3.eksons	c.616C>A
	<i>PSME1</i>	5605378		rs11548692	6.eksons	c.312G>A
		5608176		rs14930	11.eksons	c.731C>A
	<i>PSME2</i>	5612547		rs1136581	4.eksons	c.181C>G
		5615855		rs7146672	6.eksons	c.266A>C
14q13.2	<i>PSMA6</i>	16761574 16786680		rs5807825*	starp gēniem	c.-4543_-4544insC
				rs9322944	starp gēniem	c.-2486A>G
				rs7493194	starp gēniem	c.-1910C>T
				rs71640264^	starp gēniem	c.-632A>C
				rs71640265^	promoters	c.-128A>G
				rs2277460*	promoters	c.-110C>A
				rs2277459	5'UTR	c.-91G>A
				rs11547365	5'UTR	c.-43T>G
				rs1048990*	5'UTR	c.-8C>G
				rs8017676	1.introns	c.76+908G>A
rs6571711	4.introns	c.409+380T>G				
rs17597267	4.introns	c.410-183T>C				
rs9322946	6.introns	c.684-822A>G				
14q21.1	<i>PSMC6</i>	34173896 34194716		rs2295826*	1.introns	c.86-104A>G
				rs2295827*	1.introns	c.86-46C>T
14q23	<i>PSMA3</i>	39711593 39738726		rs2348071*	int 7	c.543+138G>A

**2.4.attēls** Analizēto SNP lokalizācija 14.hromosomas proteasomu proteīnu gēnos. <sup>a</sup> – gēna pozīcijas hromosomā pēc sekvenču NT\_026437.12; <sup>b</sup> – gēnu izoformu numerācija; MA – retā alēle; MAF – retās alēles frekvence gadījuma (Gad.) un kontrole (Kontr.) grupās; SG – polimorfisma lokalizācija starp gēniem, Pr – polimorfisma lokalizācija gēna promoterī; ^ – polimorfismi, kuri nebija NCBI datu bāzē pirms pētījuma; # – polimorfismi, kuru pozitīvi genotipēto paraugu skaits bija mazāks par 95%; !!! – asociācijas pētījumos analizētie SNP. Polimorfismu numerācija izmantojot sekvenču NM\_002797.3 priekš *PSMB5*, NM\_006263.2 – *PSME1*, NM\_002818.2 – *PSME2*, NM\_002791.1 – *PSMA6*, NM\_002806.2 – *PSMC6* un NM\_002788.2 priekš *PSMA3*.

Visām metodēm, izņemot MALDI-TOF MS, izstrādājām jaunus praimerus, izmantojot Primer3 interneta programmu (Rozen, Skaletsky, 2000). Visus praimerus pārbaudījām, izmantojot NCBI piedāvāto programmu BLAST, lai pārlicinātos par to, ka polimerāzes ķēdes reakcijā neamplificēsies nespecifiski fragmenti. Praimerus pasūtījām firmā „Metabion International AG” (Vācija).

Sekvencēšanas metodikā izmantojām ABI Prism<sup>R</sup> Genetic Analyzer. Šo procedūru uzticējām BMC Genoma centra zinātniekiem. Mēs veicām fragmenta amplifikāciju, aptuveno koncentrācijas noteikšanu un produkta attīrīšanu. Sekvencētais rajons ietvēra *PSMA6* gēna apgabalu pirms promotera, promoteri, 5' galu un nelielu daļu no 1. eksona.

Veicot analīzi ar MALDI-TOF MS metodiku, izmantojām BMC Genoma centra piedāvāto pakalpojumu. Šīs metodikas pamatā ir Bruker genoSNIP metode, kas ir balstīta uz samazināta garuma praimeru ekstenzijas produktu (size reduced primer extension – PEX – products) masas novērtēšanu MALDI-TOF masas spektrometrā. Ekstenzijas produkti veidojas, pievienojoties PEX praimerim dNTP un ddNTP (didezoksīnukleotīdi), tādējādi veidojot dažāda garuma fragmentus, kas atbilst dažādām SNP alēlēm. PEX praimeri ir biotinilēti (saistīti ar biotīnu), un to sekvencē iekļauj nenukleotīdu saiti, ko šķeļ UV gaisma. Tas nodrošina ekstenzijas reakcijā biotinilēto praimeru ekstenzijas produktu saistīšanos pie plates virsmas, kas ir pārklāta ar streptavidīnu. PEX produkti, kuru garums jānosaka MALDI-TOF MS, tiek nošķelti no praimeriem UV apstarošanas laikā un noskaloti. Vēlāk tos novērtē MALDI-TOF masas spektrometrā. Lai veiktu šo procesu, Genoma centrā tika pasūtīti praimeri gan PCR, gan sekvencēšanai.

Viena polimorfisma analīzei izmantojām metodi, kurā ar neprecīzu (*mismatch*) praimera PCR veidojām restrikcijas enzīma *PscI* (A↓CATGT) saiti. Šai metodei ir trīs posmi: pirmajā amplificējam lielāku DNS fragmentu, kurā ir ietverti neprecīzā PCR praimeri. Otrais posms ir PCR ar neprecīzajiem praimeriem, bet pēdējais posms ir restrikcijas enzīma saita polimorfisma metode. Šajā gadījumā ar restrikcijas enzīmu *PscI*, kas atpazīst sekvenci A↓CATGT.

Restrikcijas enzīma saita polimorfisma metodē vispirms veicām PCR katra SNP reģionam, lai amplificētu DNS fragmentu, kuram veikt “griešanu” ar restrikcijas enzīmu. Katram SNP izmantojām dažādus restrikcijas enzīmus, kas ir norādīti 1. pielikumā.

PCR amplifikācijas metodi izmantojām arī analizējot c.-110C>A un c.-8C>G SNP. Šajos eksperimentos izmantojām alēļspecifisko PCR, kurā katram paraugam veicām divas amplifikācijas. Savstarpēji reakcijas atšķiras ar tiešo praimeri jeb precīzāk ar tā 3' gala pēdējo

nukleotīdu. Atkarībā no paraugā esošā nukleotīda polimorfisma pozīcijā, pozitīvs rezultāts ir vai nu vienā, vai abās amplifikācijās.

PCR amplifikācijā izmantojām 10x PCR buferi (gala koncentrācija 1x) (Fermentas, Lietuva),  $MgCl_2$  šķīdumu (1,5 – 3 mM) (Fermentas, Lietuva), *Taq* vai *DreamTaq* DNA polimerāzi (koncentrācija 5u/ $\mu$ l) (Fermentas, Lietuva), dNTP (200  $\mu$ M) (Fermentas, Lietuva) un konkrētā SNP genotipēšanai paredzētos praimerus (10pM) (Metabion International AG, Vācija). Kopīgais maisījuma tilpums: 30  $\mu$ l.

$MgCl_2$  šķīduma koncentrāciju katra SNP genotipēšanas metodes PCR izvēlējamies pēc iepriekš veiktas optimizācijas, kurā tika pārbaudītas 1,5 mM, 2,0 mM un 3 mM  $MgCl_2$  koncentrācijas.

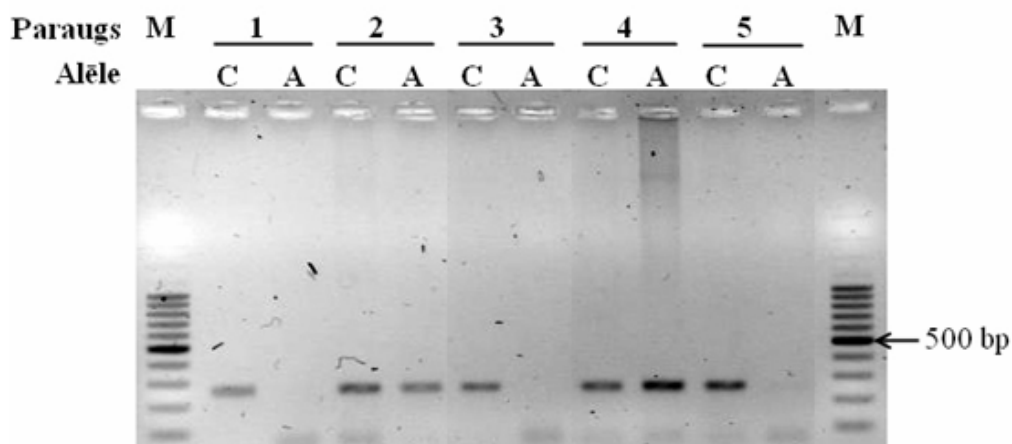
#### PCR programma:

3 minūtes pie 94 °C; 35 cikli 30 sekundēs pie 94 °C, 30 sekundes pie 55 - 61 °C, 30 līdz 60 sekundes pie 72 °C; 7 minūtes pie 72 °C; 4 °C (GeneAmp PCR System 9600, *Perkin Elmer* un GeneAmp PCR System 2400, *Perkin Elmer*).

RESP metodēs izmantojām vairākus enzīmus ar dažādiem atpazīšanas saitēm (norādīti 1. pielikumā). Katram enzīmam ir noteikta aktivitāte konkrētā buferī, kas ir norādīts restikcijas enzīma informācijas bukletā. Šajā pētījumā izmantojām Fermentas (Lietuva) buferus, kuros restikcijas enzīmiem ir 100% aktivitāte. Tie bija buferis R (10 mM Tris-HCl (pH 8.5 at 37°C), 10 mM  $MgCl_2$ , 100 mM KCl, 0.1mg/ml BSA), buferis B (10 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37°C), 10 mM  $MgCl_2$  un 0,1 mg/ml BSA), buferis Tango (33 mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37°C), 10 mM Mg-acetate, 66 mM K-acetate un 0.1 mg/ml BSA). Kā arī katram restikcijas enzīmam ir noteikta temperatūra un darbības ilgums, kurā tā darbība ir optimāla, tas ir, DNS produkts tiek sašķelts pilnībā.

#### **2.3.2.2.SNP genotipa noteikšana**

Pēc katra PCR, izmantojot 1 – 1,5% agarozes (Chempol, Čehija) gēlu un 1% TAE buferi, veicām elektroforēzi, lai noskaidrotu PCR amplifikācijas pozitivitāti un/vai PCR produkta koncentrāciju.



Secinājums:

Nr.p.k	1	2	3	4	5
Paraugs	JA104	JA107	JA105	JA116	JA106
C	+	+	+	+	+
A	-	+	-	+	-
Genotips	CC	CA	CC	CA	CC

**2.5.attēls** Elektroforēzes attēls SNP c.-110C>A genotipēšanai pēc PCR amplifikācijas.

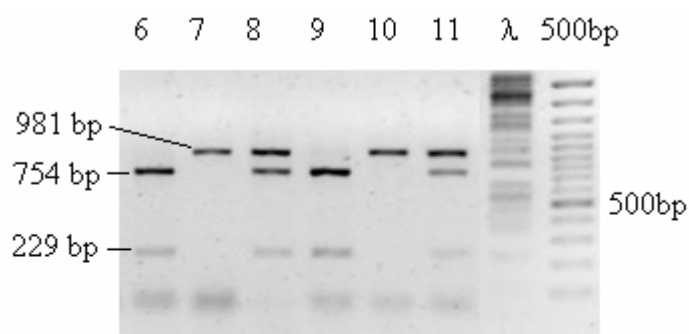
Paraugiem JA104, 105, 106 ir homozigotiski ar genotipu CC, bet JA107 un JA116 – heterozigotiski ar genotipu CA.

Genotipēšanā izmantojot alelspecifiskā PCR, veicām divas elektroforēzes, lai noteiktu katra parauga genotipu. Katram paraugam veicām divas polimerāzes ķēdes reakcijas, tātad arī divas elektroforēzes, kuru attēlos pēc PCR produkta esamības vai iztrūkuma secinājam par SNP alēlēm. Piemēram, c.-110C>A genotipa noteikšanā, ja bija amplifikācijas produkts pēc PCR, izmantojot tiešo praimeru ar pēdējo 3' gala nukleotīdu C (citozīns) vai A (adenīns), varēja secināt, ka parauga DNS konkrētajā pozīcijā ir alēle ar attiecīgi citozīnu vai adenīnu. Ja produkta nebija, tad attiecīgā alēle nav sastopama pētāmajā DNS paraugā. Ja bija PCR produkti pēc abām amplifikācijām, tad DNS paraugs ir heterozigots pēc pētāmās pozīcijas (2.5. attēls).

RESP metodē arī veicām divas elektroforēzes: pirmo pēc restikcējamā produkta amplifikācijas, lai noteiktu amplificētā fragmenta koncentrāciju, bet otro – pēc fragmenta apstrādes ar restrikcijas enzīmu, lai noteiktu genotipu.

Pirmajā elektroforēzē, izmantojot GeneRuler<sup>TM</sup> 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Lietuva) marķieri, noteicām PCR produkta aptuveno koncentrāciju, lai pēc tam veiktajā restrikcijā varētu izmantot optimālo produkta daudzumu, kas ir 1 vienība enzīma uz 1µg DNS amplificētajā produktā.





**Secinājumi:**

Nr. p.k.	6	7	8	9	10	11
<b>Fragments/ Paraugs</b>	JA86	JA87	JA88	JA89	JA90	JA91
<b>981 bp</b>	-	+	+	-	+	+
<b>754 bp</b>	+	-	+	+	-	+
<b>229bp</b>	+	-	+	+	-	+

**2.6.attēls** Elektroforēzes attēls pēc SNP c.-4543\_-4544insC genotipēšanas ar RESP. PCR produkts 981 bp, RESP gala produkts pie šķelšanas 754 un 229 bp gari fragmenti. Attēlā redzams, ka JA88 un JA91 paraugs ir heterozigots pēc mutācijas, bet pārējiem paraugiem homozigoti.

Otru elektroforēzi veicām, lai analizētu rezultātu pēc PCR produkta apstrādāšanas ar restrikcijas enzīmu. SNP pozīcijas genotipu noteicām pēc tā, cik daudz PCR produkts bija sašķelts restrikcijā. Ja produkts bija sagriezts pilnībā, tas ir, redzami divi īsāki produkti nekā pirms restrikcijas, tad pētāmajā paraugā ir alēle, kas satur nukleotīdu, kas ir restrikcijas enzīma saitā. Bet, ja pēc apstrādes ar restrikcijas enzīmu elektroforēzē bija redzams nemainīgi garš produkts, tāpat kā pirms restrikcijas, tad DNS paraugs ir homozigots pēc alēles, kas nerada restrikcijas saitu. Ja elektroforēzes attēlā redzējām gan šķeltos, gan nesķelto fragmentu, tad DNS paraugs ir heterozigots pēc genotipētā SNP (2.6. attēls).

## **2.4. Marķieru funkcionalitātes bioinformātikā analīze**

Nosakot molekulāro marķieru saistību ar kādu konkrētu slimību, ir nepieciešamas saprast MS vai SNP funkcionālo nozīmi slimības patoģenēzē. Polimorfismu funkcionalitāte var būt dažāda, tāpēc pirms analīzes *in vitro* ir nepieciešama bioinformātikā analīze jeb analīze *in silico*.

### **2.4.1. POLIMORFISMU SEKVENCES IZMAIŅU IETEKME UZ DNS UN RNS SEKUNDĀRAJĀM STRUKTŪRĀM**

DNS sekvences izmaiņas atkarībā no MS garuma vai SNP nomaiņas varētu būt DNS un/vai RNS sekundārās struktūras (SS) izmaiņas. Sekundārās struktūras modeļus veidojām,

izmantojot interneta datorprogrammu MFOLDROOT (Zuker, 2003; <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>). Šajā datorprogrammā ir iespējams mainīt SS ietekmējošos parametrus, piemēram, Na<sup>+</sup> un Mg<sup>+</sup> jonu koncentrācijas un temperatūru. Izmantojot publicētās (Alberts et al., 2002) šūnas komponentu Na<sup>+</sup> un Mg<sup>+</sup> jonu koncentrācijas analīzes, izvēlējamies Na<sup>+</sup> jona koncentrāciju 140 mM, bet Mg<sup>2+</sup> – 0,8 mM. Izvēlēta temperatūra bija 37° C, kas ir cilvēka ķermeņa optimālā temperatūra.

#### ***2.4.2. POLIMORFISMU SAITU SEKVENCES IZMAIŅU IETEKME UZ DNS LIEKUMIEM***

DNS struktūras liekumi ir lokāli molekulas mikropolimorfismu konformācijas, kurās B-DNS struktūra ir stipri izmainīta, bet nav plašas modifikācijas. Lokāli struktūras polimorfismi ir nepieciešami, lai veicinātu specifiskus bioloģiskos procesus: gēnu regulāciju, DNS iepakojums, piemēram, caur specifisku proteīnu pievienošanu. DNS segments, kas ir iesaistīts proteīnu izraisītos un/vai iedzimtos DNS liekumos, ir 10 līdz 50 bāzu pāru garš, kas ir garāks nekā segments, ko var vienkārši izlocīt ar laboratorijas metodēm (Vlahovicek et al., 1999).

Iespējamo molekulāro marķieru ietekmi uz DNS molekulas izliekšanos prognozējām, izmantojot bend.it ([hydra.icgeb.trieste.it/dna/bend\\_it.html](http://hydra.icgeb.trieste.it/dna/bend_it.html); Munteanu et al., 1998) servera piedāvātās iespējas. Šajā gadījumā apskatījām pašas molekulas iespējamo izliekuma leņķa lielumu un attiecīgi molekulas liekšanās spēju. Pie mazāka DNS molekulas liekuma leņķa ir nepieciešams lielāka liekšanās spēja, un otrādi.

#### ***2.4.3. POLIMORFISMU SAITU SAISTĪBA AR TRANSKRIPCIJAS FAKTORIEM UN TO MODIFIKĀCIJA ATKARĪBĀ NO SEKVENCES IZMAIŅĀM***

Daudzi no analizētajiem marķieriem atrodas gēna netranslējamās daļās (starpģēnu reģionā, promoterī, 5'UTR un intronos), kas nozīmē, ka netieši neietekmē proteīna sintēzi. Bet netiešā ietekme varētu būt, ja DNS sekvencē, kur atrodas molekulārie marķieri, ir transkripcijas faktora piesaistes vieta (TFBS; *transcription factor binding site*). Tāpēc mēs izveidojām transkripcijas faktoru piesaistes vietas modeļus visu molekulāro marķieru DNS sekvencēm. TFBS modeļi tika veidoti, izmantojot datorprogrammu MatInspector, Release 7.4 datu bāzē Genomatix (Cartharius et al., 2005; <http://www.genomatix.de>), kurā ir pieejama informācija par transkripcijas faktoru piesaistes vietu sekvencēm. Ticamai modeļu izveidei izmantojām nosacījumus, ka TF serdes (*core*) sekvencei ir jābūt ar 1,00 jeb 100% atbilstību, bet faktora matricas sekvencei ar  $\geq 0,90$  jeb 90%.

#### **2.4.4. POLIMORFISMU SAITU SEKVENCES IZMAIŅU IETEKME UZ mikroRNS PIESAISTI UN/VAI VEIDOŠANOS**

Pēdējos gados liela uzmanība ir pievērsta specifiskas RNS molekulas lomai proteīnu veidošanās procesā. Šī molekula ir mikroRNS (*microRNA*).

MikroRNS loma šūnā iespējams ir translācijas intensitātes kontrole (John et al., 2004). MikroRNS ir līdz 20 - 24 bp gara, bet serdes (*core*) jeb galvenā sekvenca, kas saistas pie DNS molekulas, ir 5 – 7 nukleotīdi (John et al., 2004; Flynt, Lai, 2008). Attiecīgi, ja kāds no šiem nukleotīdiem DNS sekvencē ir mainīgs, saistīšanās nenotiek.

Otra iespējamā saistība ar mikroRNS molekulu ir tādad, ka netranslējamā genoma daļa tiek izmantota mikroRNS sintēzei. Introna izgriešanas procesā RNS molekula paliek šūnā, un tā varētu tikt izmantota citas RNS molekulas veidošanā (Flynt, Lai, 2008).

Molekulāro marķieru ietekmi uz mikroRNS spēju saistīties ar DNS vai iespējamo izmantošanu tās veidošanā noteicām, izmantojot miRBase programmu (Griffiths-Jones et al., 2008; <http://microrna.sanger.ac.uk/>).

#### **2.4.5. POLIMORFISMU SAITU SEKVENCES IETEKME UZ MATRICAS RNS VEIDOŠANOS**

Tā kā analizētie polimorfismi atrodas gan intronos, gan eksonos, tad iespējamā to loma šūnā varētu būt saistīta ar intronu izgriešanu un eksonu sašūšanu jeb matricas RNS (mRNS) veidošanos. Gan eksonos, gan intronos specifiskās vietās piesaistās procesinga un splaisinga elementi, kas nodrošina pilnīgu un precīzu intronu izgriešanu un eksonu savienojumu. Ja šajās piesaistes vietās ir variācijas, tad var nenotikt piesaiste un attiecīgi procesings vai splaisings. Otra iespēja ir, ka piesaistes vieta polimorfisma ietekmē veidojas citā introna vai eksona rajonā, attiecīgi var notiek alternatīvs splainings.

Lai noteiktu iespējamās procesinga un splaisinga elementu piesaistes vietas un to maiņas atkarībā no variāciju alēlēm, analīzei izmantojām programmu Human Splicing Finder Version 2.4 ([www.umd.be/HSF](http://www.umd.be/HSF); Desmet et al., 2009).

### **2.5. Datu apstrāde un statistiskā analīze**

Viena nukleotīda polimorfismu statistiskās analīzes aprēķinos izmantojām paraugus, kuriem bija noteikts genotips visos septiņos genotipētajos lokusus. Mikrosatelītu gadījumā analīzē iekļāvām visus paraugus ar pozitīvu rezultātu.

Pirms SNP atlases un polimorfismu statistiskās analīzes visās grupās, noteicām polimorfismu esamību līdzsvarā pēc Hārdija – Veinberga vienādojumu. To noteicām,

izmantojot sagaidāmo un iegūto heterozigotātes indeksu, kas rāda, cik liela daļa no populācijas genotipiem ir heterozigotā stāvoklī. Noteikšanai izmantojām formulu:  $h = (1 - \sum p_i^2)$ . Abus heterozigotātes indeksus salīdzinājām, izmantojot hī kvadrāta ( $\chi^2$ ) kritērija metodi.

No iegūtajiem rezultātiem katram lokusam aprēķinājām alēļu un genotipu frekvences gadījuma un kontroles grupās katrai slimībai. Aprēķinos izmantotajiem paraugiem, izmantojot datorprogrammu DNASP 4.50.3 (Rozas et al., 2003), izveidojām septiņu SNP haplotipu kombinācijas un noteicām to frekvences gadījuma un kontroles grupās.

Asociācijas analīzē izslēdzām retās alēles un genotipus MS un retos haplotipus (frekvence vienāda vai mazāka par 0,05 kontroles un gadījuma grupās) SNP. Katra polimorfisma saistību ar T2DM vai JIA noteicām, analizējot alēļu un genotipu, kā arī SNP haplotipu frekvenču statistiski ticamībās atšķirības starp gadījuma un kontroles grupām, izmantojot adaptīvo modeli hī kvadrāta ( $\chi^2$ ) kritērija metodē ar dažādām brīvības pakāpēm. Par svarīgu atšķirību uzskatījām, ja statistikā ticamība ( $P_a$ ) un tā koriģētais lielums ( $P_b$ ), kas tiek aprēķināts kā 10'000 reižu permutāciju analīžu vidējais lielums, bija mazāks par 0,05 (Liepa, 1974). Šos aprēķinus veicām ar statistikas programmu PAST (PALaentological Statistics, ver. 1.63; Hammer et al., 2001).

$P$  vērtību aprēķinājām, pirmkārt, katram lokusam atsevišķi pēc alēļu un genotipu sadales gadījuma un kontroles grupās un, otrkārt, katrai alēlei, genotipam un haplotipam atsevišķi, izmantojot to iegūto un sagaidāmo frekvenču lielumu gadījuma un kontroles grupās (Wright un Hastie, 2007).

2. tipa cukura diabēta slimības izpausmē lielu lomu spēlē dažādi faktori (piemēram, ķermeņa masas indekss), tāpēc visiem polimorfismiem pirms asociācijas analīzes veicām loģistisko regresijas analīzi saistībā ar slimības faktoriem. Šī analīze ir nepieciešama, lai pārliecinātos, ka alēļu sadale nav saistīta ar kādu no faktoriem. HSMS marķieriem šo analīzi veicām izmantojot NCSS/PASS/GESS, bet SNP gadījumā – PLINK 2.050.

Lai noskaidrotu pazīmes (polimorfisma) ietekmi uz saslimšanas iespējamību, noteicām starpību jeb izredžu attiecību (*odds ratio*; OR), relatīvo risku (RR) un abu indeksu konfidences intervālu (*confidence intervāls*; CI) 95% gadījumos.

OR rāda, cik reižu konkrētais rādītājs (alēle, genotips, haplotips) palielina vai samazina iespējamību saslimt ar pētāmo slimību. To aprēķinājām ar datorprogrammu, kura izmanto

formulu:  $OR = \frac{ad}{bc}$ , kas ir iegūta no 2x2 kontingences tabulas:

	$X^-$	$X^+$	
$Y^-$	$a$	$b$	$a+b$
$Y^+$	$c$	$d$	$c+d$
	$a+c$	$b+d$	$n=a+b+c+d$

Izredžu attiecību aprēķinos izmantojām adaptīvo modeli, kurā kā references lielumu izmantojām biežāko alēli, genotipu vai haplotipu, ko noteicām izvērtējot iegūtās un sagaidāmās frekvences gadījuma un kontroles grupās.

Ja  $OR = 1$ , tad konkrētā lokusa riska alēle (genotips, haplotips) nepalielina iespējamību saslimt ar konkrēto slimību pētītās populācijas pārstāvjiem. Ja šis rādītājs ir lielāks par 1, tad populācijas pārstāvim ar pētīto pazīmi palielinās iespējamība saslimt, bet ja rādītājs ir mazāks par 1, tad iespējamība samazinās. Ja rādītājs ir lielāks par 2, tad iespējamība saslimt ir klīniski nozīmīga jeb saslimšanas risks ir ļoti augsts (Uthoff et al., 2002).

RR rāda, cik liels risks, ka pazīme parādīsies personai no analizētās populācijas. Tā aprēķināšanā arī izmantojām datorprogrammu, kurā matemātiskās funkcijas formula  $RR = \frac{a/(a+b)}{c/(c+d)}$  tiek veidota pēc jau iepriekš minētās 2x2 tabulas. Ja RR ir vienāds ar 1, tad pazīme parādīsies vienlīdz bieži gadījuma un kontroles grupās. Ja šis rādītājs ir lielāks par 1, tad palielinās ticamība, ka pētāmā pazīme būs biežāk izplatīta slimības riska grupas personām. Ja rādītājs RR ir mazāks par 1, tad šis risks samazinās (Ardlie et al., 2002; Uthoff et al., 2002).

Lai aprēķinātu OR, RR un to CI pie 95% izmantojām MedCalc 3000 datorprogrammu (<http://medcalc3000.com/OddsRatio.htm>).

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. 14q hromosomas polimorfismi

##### 3.1.1. 14Q13 REĢIONA MIKROSATELĪTU IZPĒTE

HSMS (Human Salaspils Microsatellites) marķieru nosaukumu proponēja T. Sjakste, izpildot pirmo pētījumu par to asociāciju ar Greivsa slimību (Sjakste et al., 2004). Bez šī pētījuma vairāk pētīts ir tikai HSMS701 marķieris (3.1. tabula).

**3.1. tabula** HSMS marķieru sekvenču motīvi un polimorfisma ID un iepriekš publicētie dati par lokusa polimorfismu un/vai saistību ar slimībām.

MS marķieris	Sekvenču motīvs, polimorfisma ID numuri <sup>a</sup> un nomenklatūra pēc HGVS <sup>b</sup>	Iepriekš publicētie dati par lokusu			
		Slimība	Aso- ciācija	Pētījums	Atsauce
<i>HSMS602</i>	G <sup>16519463</sup> (CAA) <sub>10</sub> (A) <sub>8</sub> C <sup>16519502</sup> rs63749745, rs35134468, rs71717758, rs67535644, rs66704652, rs56397960, rs58108395 c.164+1128CAA(7_10)A(5_8)	Greivsa slimība	Jā	Latvijas populācija	Sjakste et al., 2004
<i>HSMS701</i>	A <sup>16620590</sup> (AC) <sub>5</sub> AT(AC) <sub>19</sub> G <sup>16620641</sup> D14S1014, rs3223236, rs12147502, rs12147993, rs71928782, rs71862757, rs55940352, rs57727346, rs35123864 c.1167+24018AC(14_22)	- Fāra slimība Dismorfiskais sindroms Greivsa slimība	- Nē Nē Nē	Eiropas populācija Ģimenes Ģimenes Latvijas populācija	Dib et al., 1996 Geschwind et al., 1999 Boyadjiev et al., 2003 Sjakste et al., 2004
<i>HSMS702</i>	C <sup>16649488</sup> (TG) <sub>12</sub> T <sup>16649513</sup> rs5807818, rs35228370, rs66471614, rs3058430 c.1168-143TG(10_25)	Greivsa slimība	Nē	Latvijas populācija	Sjakste et al., 2004
<i>HSMS801</i>	A <sup>16699900</sup> (AC) <sub>21</sub> C <sup>16699942</sup> rs71444202, rs68081862, rs10647945, rs71820751, rs72196957, rs60270535 c.1276-35788AC(12_28)	Greivsa slimība	Jā	Latvijas populācija	Sjakste et al., 2004
<i>HSMS006</i>	A <sup>16783905</sup> (TG) <sub>18</sub> T <sup>16783942</sup> rs34580276, rs36054664 c.683+497TG(18_25)	Greivsa slimība	Jā	Latvijas populācija	Sjakste et al., 2004

<sup>a</sup> - pēc NCBI datu bāzes ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) sekvenču NT\_026437; <sup>b</sup> - pēc Cilvēka genoma variācijas savienība (Human Genome Variation Society; HGVS; <http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/>) nomenklatūras;

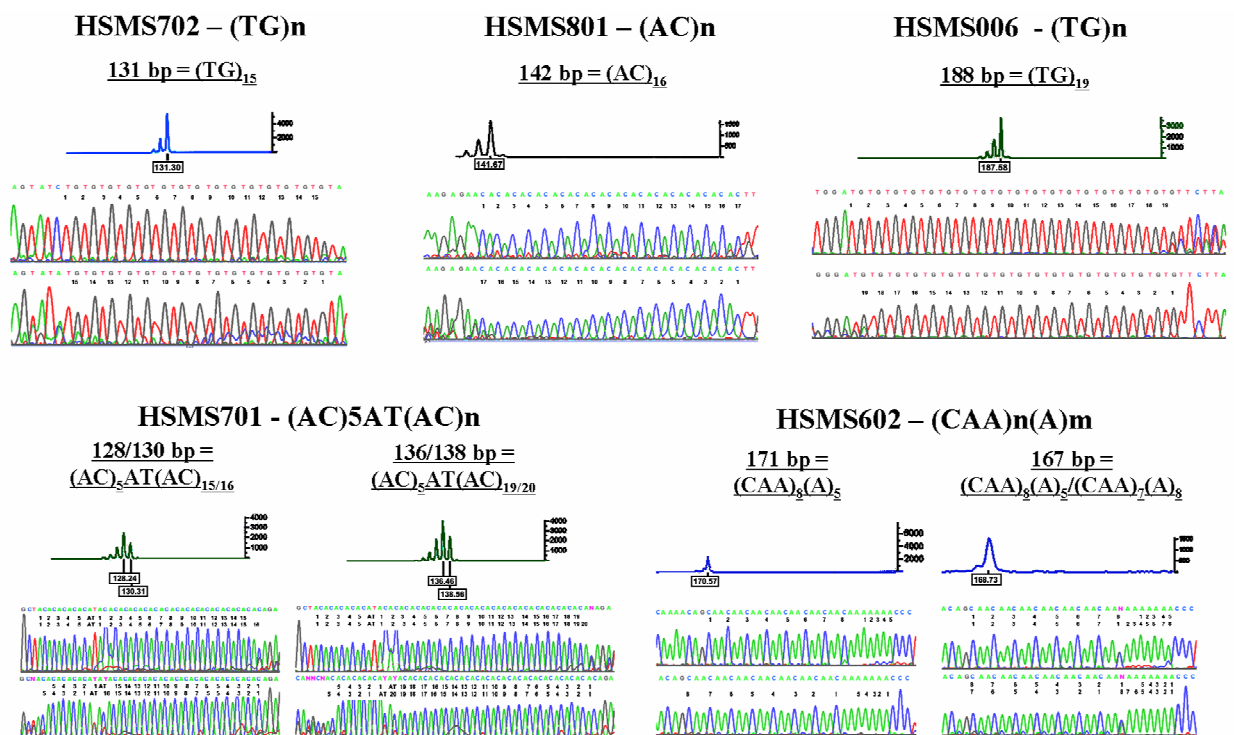
Pieci HSMS mikrosatelīti atrodas lokusā 14q13.2 – q13: HSMS006 marķieris ir lokalizēts *PSMA6* gēna sestajā intronā, bet pārējie augšup no šī gēna divos citos gēnos. *KIAA0391* gēnā

ir lokalizēti trīs mikrosatelīti: HSMS801, HSMS702, HSMS701. Pēdējais un vistālāk no *PSMA6* gēna lokalizētais HSMS marķieris ir HSMS602, kas atrodas *FAM177A1 (C14orf24)* gēnā.

Lai varētu pareizi interpretēt fragmentu analīzes datus, bija nepieciešams precizēt mikrosatelītu motīvus.

Pēc datu bāzēs pieejamās informācijas HSMS006, HSMS801, HSMS702, HSMS701 ir dinukleotīdu atkārtojumi attiecīgi  $(TG)_n$ ,  $(CA)_n$ ,  $(TG)_n$  un  $(AC)_mAT(AC)_n$ , bet HSMS602 ir trinukleotīdu atkārtojums -  $(CAA)_n$ .

Veicot katra marķiera atkārtojuma reģiona sekvencēšanu, secinājām (3.1. attēls), ka HSMS006, HSMS801, HSMS702 mikrosatelītu motīvi ir vienkārši dinukleotīdu atkārtojumi kā tas ir dots NCBI datu bāzē. HSMS006 un HSMS701 ir ar  $(TG)_n$  atkārtojumu, bet HSMS801 – ar  $(AC)_n$ .



3.1.attēls 14q13 reģiona HSMS marķieru motīvs.

HSMS701 gadījumā Latvijas populācijā motīvā  $(AC)_mAT(AC)_n$  mainīgā daļa ir tikai 3'gala atkārtojums  $(AC)_n$ . Tas nozīmē, ka arī šo mikrosatelītu varam uzskatīt par vienkāršu dinukleotīdu atkārtojumu ar motīvu  $(AC)_n$ .

Pēdējā mikrosatelīta HSMS602 motīvs iepriekš (Sjakste et al., 2004) tika uzskatīts par  $(CAA)_n$  atkārtojumu. Pēc 16 paraugu sekvencēšanas, secinājām, ka šī marķiera motīvs ir  $(CAA)_m(A)_n$ . Turklāt konstatējām, ka Latvijas populācijā ir sastopami vismaz 8 motīvi:  $(CAA)_7(A)_7$ ,  $(CAA)_7(A)_8$ ,  $(CAA)_8(A)_5$ ,  $(CAA)_8(A)_6$ ,  $(CAA)_8(A)_7$ ,  $(CAA)_{10}(A)_7$ ,  $(CAA)_{10}(A)_8$ ,  $(CAA)_{11}(A)_5$ , ar mainīgām abām motīva daļām. Datu analīzes rezultātā

atklājām, ka vairāki motīvi atbilst vienam genotipēšanā iegūtajam fragmenta garumam, piemēram, motīvi (CAA)<sub>7</sub>(A)<sub>8</sub> un (CAA)<sub>8</sub>(A)<sub>5</sub> atbilst 167 bp garajai alēlei. Tas nozīmē, ka nav iespējams attiecināt vienu motīvu vienam konkrētam fragmenta garumam. Tāpēc šī marķiera alēļu un genotipu analīzē atstājām genotipēšanā iegūtos fragmenta garumus (bāzes pāros) nevis precizējām katra parauga marķiera motīvu.

### ***3.1.2. 14Q PROTEASOMU PROTEĪNU GĒNU SNP ANALĪZE UN ATLASE***

Izmantojot vairākas ģenētikas datu bāzes, veicām bioinformātisko analīzi sešiem no astoņiem 14.hromosomas proteasomas proteīnu PSMB5, PSME1, PSME2, PSMA6, PSMC6 un PSME3 gēniem, lai noskaidrotu ar šo gēnu SNP.

No visiem SNP izvēlējamies četrus tagSNP lokalizētus *PSMA6* gēna intronos, divus un vienu tagSNP – attiecīgi *PSMC6* un *PSMA3* gēnos. *PSMB5*, *PSME1* un *PSME2* gēnos nav zināms neviens tagSNP, tāpēc šo gēnu analīzei izvēlējamies pa diviem polimorfismiem lokalizētiem kodējošajā gēna daļā.

*PSMA6* gēnu analizējām padziļināti, jo tajā ir lokalizēts viens no HSMS marķieriem. No datu bāzes iegūtajiem datiem izvēlējamies trīs SNP lokalizētus pirms *PSMA6* gēna un papildus nolēmām sekvencēt gēna promoteri un 5'UTR galu, kas sevī ietver mūsu grupas iepriekš analizētos SNP - c.-110C>A un c.-8C>G (Sjakste et al., 2007a). Pēc sekvencēšanas konstatējām divus viena nukleotīda polimorfismus, par kuriem nebijām ieguvuši informāciju bioinformātiskajā analīzē. Šo SNP iesniedzām NCBI datu bāzē kā jaunatklājumu.

Kopā genotipēšanai atlasījām 22 viena nukleotīda polimorfismus (2.4.attēls Materiālos un metodēs). Lai no atlasītajiem SNP atlasītu perspektīvus marķierus asociācijas analīzēm ar izvēlētajām slimībām, ir jāpārbauda SNP izplatība populācijā. Nav nozīmes analizēt saistības analīzē SNP, kuru retās alēles frekvence (MAF; *minor allele frequency*) ir mazāka par 0,05 jeb 5%. Turklāt, lai veiktu pilnīgu gadījumu un kontroles paraugu analīzi, ir jāatlasa lokusi, kuriem genotipēšana ir veiksmīga vismaz 95% no visiem paraugiem. Tas dos iespēju noteikt ne tikai alēļu un genotipu frekvenču sadali analizētajās grupās, bet arī izveidot haplotipus.

Tā kā mēs plānojam veikt asociācijas analīzi, bija svarīgi arī apskatīt MAF gadījuma grupā. Balstoties tikai uz populācijas retās alēles frekvenci, var neievērot perspektīvu molekulāro marķieri saistībā ar slimību.

Tāpēc nolēmām pirmējo genotipēšanu veikt 40 nejauši izvēlētiem JIA paraugiem un 40 nejauši izvēlētiem kontroles 1 paraugiem. Nejaušo paraugu izvēli veicām ar datorprogrammu „Random Number Generator Program” (<http://www.acsu.buffalo.edu/~rauln/random.html>).



Starp nejauši izvēlētajiem JIA paraugiem 23 bija ar oligoartrīta formu, 11 – ar poliartrīta formu un seši – ar kādu no citām JIA formām.

SNP, kurus analizējām sekvenējot (1. pielikums), retās alēles frekvences noteicām pēc 22 JIA un 25 kontroles 1 paraugu genotipēšanas.

Papildus salīdzinājām mūsu iegūtos rezultātus ar HapMap datu bāzē esošo informāciju par SNP alēļu sadali Eiropas populācijā.

Visu iegūtos datus apkopojām 3.2.tabulā.

**3.2. tabula** 22 viena nukleotīda polimorfisma analīze pirms asociāciju pētījumiem 40 gadījuma un kontroles 1 paraugos

Gēns	ID numurs	Motīvs	Retā alēle	MAF		
				Pētījums		HapMap
				Gadījuma	Kontrole	
PSMB5	rs11543947*	c.70C>T	T	0,07	0,09	0,10
	rs12043	c.616C>A	A	0,00	0,00	0,00
PSME1	rs11548692	c.312G>A	A	0,00	0,02	Nav dati
	rs14930	c.731C>A	A	0,00	0,00	0,00
PSME2	rs1136581	c.181C>G	G	0,00	0,00	Nav dati
	rs7146672	c.266A>C	C	0,01	0,01	0,02
PSMA6	rs5807825*	c.-4543_-4544insC	delC	0,46	0,46	Nav dati
	rs9322944	c.-2486A>G	G	0,01	0,03	0,03
	rs7493194	c.-1910C>T	T	0,00	0,00	0,00
	rs71640264 <sup>^</sup>	c.-632A>C	C	0,03	0,01	Nav dati
	rs71640265 <sup>^</sup> <sup>§</sup>	c.-128A>G	G	0,00	0,02	Nav dati
	rs2277460*	c.-110C>A	A	0,11	0,05	0,11
	rs2277459 <sup>§</sup>	c.-91G>A	A	0,00	0,03	0,02
	rs11547365 <sup>§</sup>	c.-43T>G	G	0,03	0,00	Nav dati
	rs1048990*	c.-8C>G	G	0,14	0,08	0,12
	rs8017676 <sup>#</sup>	c.76+908G>A	A	0,10	0,06	0,09
	rs6571711	c.409+380T>G	G	0,03	0,04	0,07
	rs17597267 <sup>#</sup>	c.410-183T>C	C	0,11	0,12	0,09
	rs9322946	c.684-822A>G	G	0,00	0,00	0,03
PSMC6	rs2295826*	c.86-104A>G	G	0,20	0,09	0,09
	rs2295827*	c.86-46C>T	T	0,20	0,18	0,09
PSMA3	rs2348071*	c.543+138G>A	A	0,34	0,21	0,27

<sup>^</sup> - SNP par kuriem nebija informācijas datu bāzē, bet, ko atklājām sekvenējot; <sup>§</sup> - SNP, kas tika analizēti, sekvenējot 22 JIA un 25 kontroles 1 paraugos; <sup>#</sup> - SNP, kuru genotipēšanā veiksmīgo analīžu skaits bija mazāks par 95%; \* - asociācijas pētījumiem izvēlētie SNP.

Pieci SNP Latvijas populācijā bija monomorfiski jeb bija sastopama tikai viena alēle. Šos lokus neiekļāvām asociācijas analīzē. Astoņu variāciju retās alēles frekvence bija mazāka par 0,05 gan gadījuma paraugos, gan kontroles 1 paraugos, tāpēc arī šie lokusi tika izslēgti no turpmākajiem pētījumiem.

Divu SNP c.76+908G>A un c.410-183T>C genotipēšanā retās alēles frekvence bija virs 5%, bet veiksmīgo analīžu skaits bija mazāks par 95% no visiem paraugiem. Tāpēc arī šos polimorfismus no tālākā pētījuma izslēdzām.

Gala rezultātā atlasījām septiņu SNP lokalizētus četros gēnos: *PSMB5* gēna SNP c.70C>T, *PSMA6* gēna SNP c.-4543\_-4544insC, c.-110C>A un c.-8C>G, *PSMC6* gēna polimorfismi c.86-104A>G un c.86-46C>T un c.543+138G>A lokalizētu *PSMA3* gēnā. Visus šos lokusus analizējām saistībā ar juvenīlo idiopātisko artrītu un tā subformām un ar 2. tipa cukura diabētu.

### **3.1.2.1. SNP sadales salīdzināšana kontroles grupās**

Katrā asociācijas analīzē izmantojām speciāli veidotu kontroles grupu – T2DM gadījumā tie bija P. Stradiņa Universitātes slimnīcas endokrinoloģijas nodaļas pacienti bez cukura diabēta, bet JIA gadījumā - SIA "Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīcas" klīnika "Biķernieki" nejauši izvēlēti pacienti bez autoimmūnām slimībām. Tāpēc nolēmām salīdzināt arī pašas kontroles grupas, lai pārbaudītu atšķirības.

2.pielikumā ir tabula, kurā var redzēt datus un statistisko analīzi kontroles 1 un kontrole 2 grupām. Šajā salīdzinājumā nenoteicām OR un RR, jo netiek meklēta asociācija ar slimību.

Kā varam redzēt, tad abas grupas statistiski neatšķiras tikai pēc diviem SNP: *PSMB5* gēna c.70C>T un *PSMA6* gēna c.-110C>A. No šiem abiem polimorfisiem tieši c.70C>T gadījumā nekonstatējām saistību ar kādu no analizētajām slimībām.

Polimorfisma c.-110C>A gadījumā nevienā no kontroles grupām, kā arī gadījuma grupās, neatradām retās alēles homozigoto formu. Šis genotips nav konstatēts nevienā no pētījumiem, kur būtu analizēts *PSMA6* gēna SNP c.-110C>A. Šādi dati tiek uzrādīti arī NCBI datu bāzē pie SNP apraksta ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2277460](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2277460)).

Pārējo lokusu iegūtie dati ir statistiski atšķirīgi pēc viena no analizētajiem parametriem – vai alēļu vai genotipu sadales lokusā, vai pat pēc retās alēles frekvencēm.

## **3.2. 2. tipa cukura diabēta asociācijas analīze**

### **3.2.1. LOKUSA 14Q13 HSMS MARĶIERU ASOCIĀCIJAS ANALĪZE AR T2DM**

HSMS mikrosatelītus genotipējām 104 2.tipa cukura diabēta un 123 kontroles 2 paraugos. Pozitīvo paraugu skaits norādīts 3. pielikumā pie MS nosaukuma.

No iegūtajiem mikrosatelītu genotipēšanas rezultātiem noteicām genotipu (3. pielikums) un alēļu (4. pielikums) sadali 2. tipa cukura diabēta gadījuma un kontroles 2 grupās.

Veicot asociācijas analīzi saistībā ar T2DM, vēl nebija veikta precīzu motīvu noteikšana marķierim HSMS602, tāpēc alēļu analīzē izmantojām motīvu (CAA)<sub>n</sub>, ņemot vērā, ka atkārtojumam (CAA)<sub>10</sub> pēc sekvenču atbilsts fragmenta garums ar 177 bāzu pāriem.

No alēļu frekvenču rezultātiem katram MS noteicām sagaidāmo heterozigotātes indeksu abās grupās, bet no genotipu sadales aprēķinājām iegūto heterozigotātes lielumu, tādejādi noteicām, vai gadījuma un kontroles grupas atbilst Hārdija – Veinberga vienādojumam (4. pielikums). Konstatējām, ka neskatoties uz nelielajām atšķirībām, pēc  $\chi^2$  kritērija metodes visu pieci lokusu genotipu sadale abās grupās atbilst Hārdija – Veinberga vienādojumam.

Lai izslēgtu aptaukošanās nozīmi asociācijas analīzē, iesākumā veicām loģistiskās regresijas analīzi, lai pārlicinātos, ka HSMS marķieri nav saistīti ar aptaukošanos. Nevienam no marķieriem netika konstatēta saistība ( $P > 0,05$ ) ar aptaukošanos.

#### **3.2.1.1. Genotipu frekvenču sadale un asociācijas analīze**

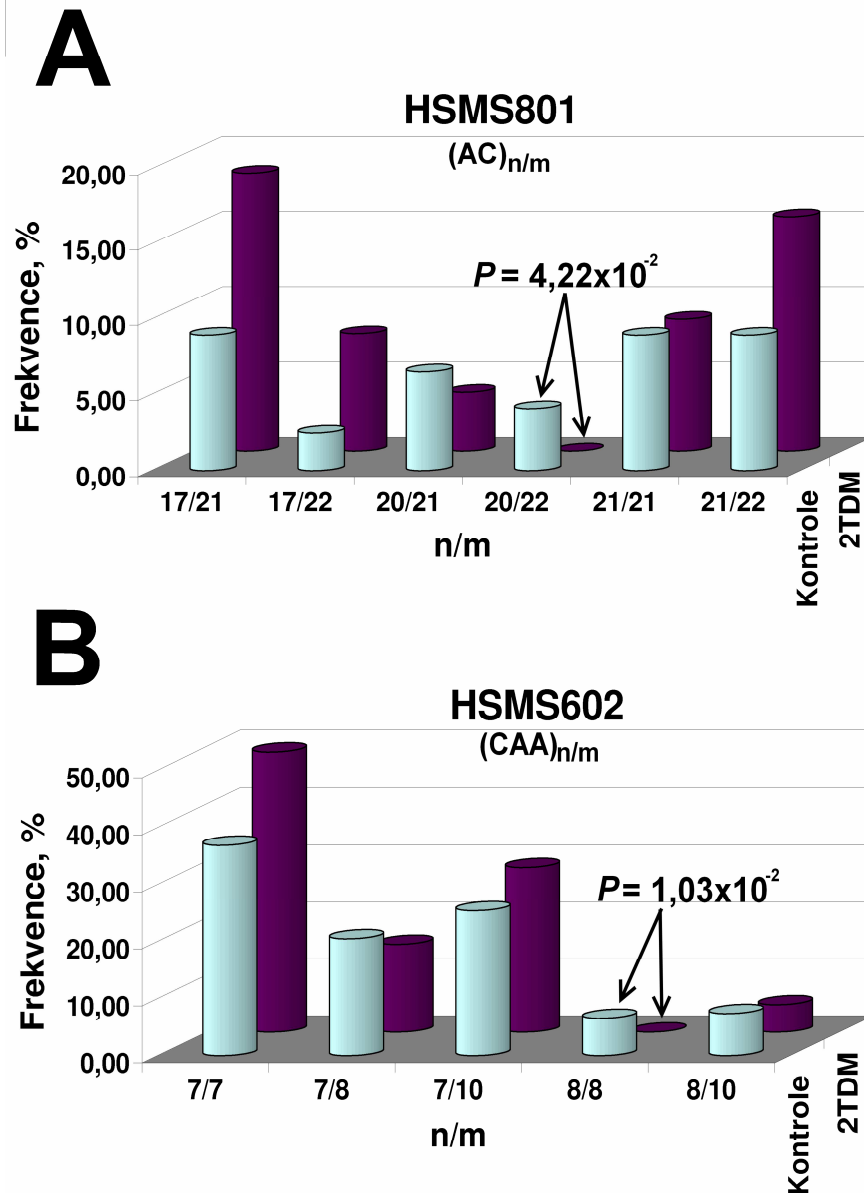
Molekulārajam marķierim HSMS601 konstatējām visu sešus iespējamus genotipus, pārējiem mikrosatelītiem konstatējām mazāk genotipu, salīdzinot ar iespējamo skaitu, ko aprēķinājām no alēļu skaita. HSMS701 un HSMS006 marķieriem – attiecīgi 22 un 27 genotipi no iespējamiem 36, HSMS702 – 23 genotipi no 91, bet visvairāk genotipu novērojām molekulārajam marķierim HSMS801 – attiecīgi 43 genotipi no 105 genotipiem.

Ne visi iegūtie genotipi bija sastopami vismaz 5% paraugu vismaz vienā no grupām. HSMS602 gadījumā no asociācijas analīzes izslēdzām vienu genotipu, HSMS701 un HSMS802 gadījumā no visiem genotipiem saistības analīzē iekļāvām 8 genotipus, bet HSMS702 marķierim bieži sastopami bija trīs genotipi. Visvairāk genotipi asociācijas analīzē bija ietverti marķierim HSMS006 – deviņi.

Apskatot marķieru HSMS genotipu frekvenču atšķirības 2. tipa cukura diabēta gadījuma un kontroles 2 grupās, statistiski ticamu atšķirību novērojām divu mikrosatelītu genotipu frekvencēm.

Statistiski ticamu atšķirību nenovērojām marķieriem HSMS701, HSMS702 un HSMS006.

HSMS602 molekulārajam marķierim konstatējam visus sešus iespējamus genotipus, no kuriem abās grupās biežāk tika konstatēts genotips ar homozigotu pēc īsākās alēles, tas ir, pēc alēles ar atkārtojumu  $(CAA)_7$  (3.2. attēls B). Statistiski ticamu atšķirību novērojām homozigotam genotipam pēc alēles ar atkārtojumu  $(CAA)_8$ . Šis genotips netika konstatēts pacientu grupā ( $P_a = 1,03 \times 10^{-2}$ ).



**3.2.attēls** HSMS801 (A) un HSMS602 (B) marķieru biežāk sastopamo genotipu frekvenču sadale starp kontroli un 2. tipa cukura diabētu (T2DM). Abscisa – genotipu alēļu atkārojuma skaits, ar \* atzīmētas genotipi ar statistiski ticamu saistību ar 2. tipa cukura diabēti ( $P_b > 0,05$ ).

Otrs MS, kam konstatējam statistiski ticamu atšķirību genotipa frekvencēs ir HSMS801 (3.2.attēls A). Statistiski ticamu atšķirību pierādījām vienam no genotipiem –  $(AC)_{20/22}$ , kura  $P_a$  vērtība ir  $4,22 \times 10^{-2}$ . Šo genotipu nenovērojām 2. tipa cukura diabēta pacientiem.

Abus genotipus, kuriem uzrādījās statistiska saistība ar 2. tipa cukura diabētu varētu izmantot, lai noteiktu saslimšanas risku. Šie genotipi ir ar aizsargājošu efektu attiecībā pret slimību.

### 3.2.1.2. Alēļu frekvenču sadale un asociācijas analīze

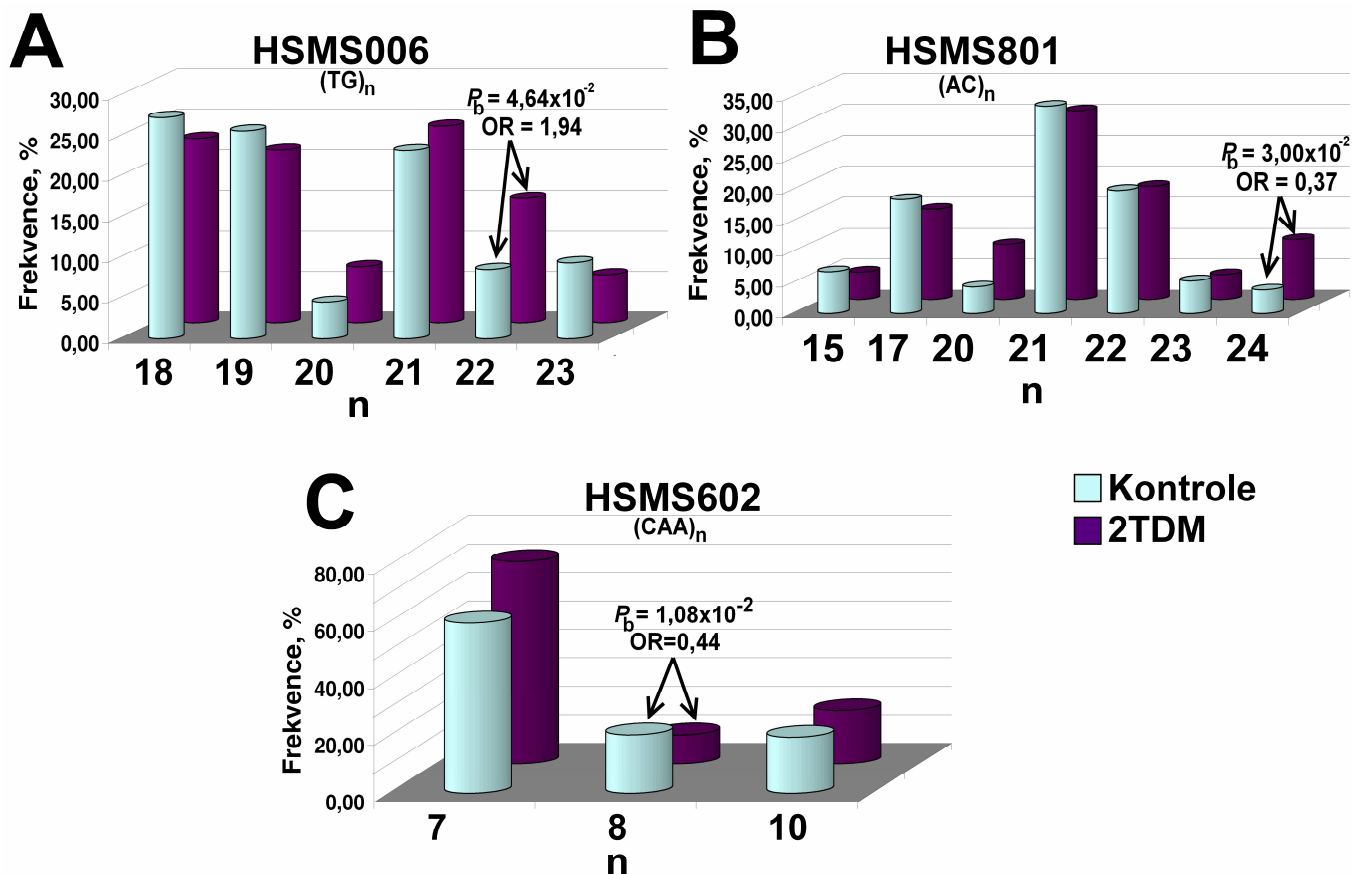
No katra parauga genotipa rezultāta noteicām mikrosatelītu alēles un aprēķinājām to frekvenču sadali gadījuma un kontroles 2 grupās.

HSMS602 molekulārajam marķierim, analizējot 2. tipa cukura diabēta gadījuma un kontroles grupas, atradām trīs alēles ((CAA)<sub>7, 8, 10</sub>), no kurām biežāk sastopamā bija alēle ar atkārtojumu (CAA)<sub>7</sub>. Visas trīs alēles gadījuma un kontroles 2 grupā bija sastopamas vismaz 5% paraugos. HSMS701 mikrosatelītam konstatējām astoņas alēles ((AC)<sub>15 – 22</sub>), no kurām piecas iekļāvām asociācijas analīzē, bet visbiežāk sastopamā bija alēle (AC)<sub>19</sub>. HSMS702 gadījumā bija sastopamas 13 alēles ((TG)<sub>12 – 16</sub> un (TG)<sub>18 – 25</sub>), no kurām divas vismaz vienā no grupām pārsniedza 5% sastopamības robežu. Vislielāko frekvenci novērojām alēlei (TG)<sub>12</sub>. HSMS801 marķierim abās grupās kopā atradām 14 alēles ((AC)<sub>13</sub> un (AC)<sub>15 – 27</sub>), no kurām septiņas iekļāvām asociācijas analīzē ar 2. tipa cukura diabētu, bet vislielākā sastopamības frekvence bija alēlei (AC)<sub>21</sub>. HSMS006 marķierim bija astoņas alēles ((TG)<sub>17 – 24</sub>), no kurām sešas bija sastopamas biežāk par 5%. Šis mikrosatelīts bija vienīgais, kuram atšķirās biežāk sastopamā alēle gadījuma un kontroles 2 grupā – attiecīgi (TG)<sub>21</sub> un (TG)<sub>18</sub>.

Veicot statistisko analīzi HSMS701 un HSMS702 mikrosatelītiem pēc alēļu frekvencēm, nekonstatējam statistiski nozīmīgas atšķirības ( $P < 0,05$ ) starp grupām.

HSMS602 molekulārajam marķierim konstatējām, ka alēlei ar atkārtojumu (CAA)<sub>8</sub> ir statistiski ticama atšķirība ar koriģēto  $P$  vērtību  $1,08 \times 10^{-2}$  (3.3. attēls C). Šīs alēles izredžu attiecība jeb OR ir 0,44, kas norāda, ka alēle varētu samazināt saslimšanas iespējamību tās nēsātājam līdz 44% attiecībā pret sastopamību populācijā.

Analizējot HSMS801 marķieri gadījuma un kontroles 2 grupās (3.3. attēls B), konstatējām, ka ir atšķirība ne tikai alēļu frekvencēs, bet arī alēļu skaitā. Otrā tipa cukura diabēta gadījuma grupā konstatējām 12 alēles, bet kontroles grupā 13. Mikrosatelītam HSMS801 konstatējām bimodālu sadalījumu, apskatot visu alēļu frekvences.



**3.3.attēls** HSMS006 (A), HSMS801 (B) un HSMS602 (C) marķieru biežāk sastopamo alēļu frekvenču sadale starp kontroli un 2.tipa cukura diabētu (T2DM). Abscisa – alēļu atkārojuma skaits, statistiski nozīmīgā  $P_b$  vērtība norādīta pie alēles.

Alēli (AC)<sub>24</sub> statistiski ticami retāk novērojām kontroles 2 grupā (3.3. attēls B). Statistiskās analīzes radītāji šai alēlei ir  $P_b = 3,00 \times 10^{-2}$ , OR = 0,37. Pēc izredžu attiecības koeficienta var secināt, ka alēle ar šādu atkārojumu samazina saslimšanas izredzes uz 37% jeb gandrīz 3 reizes.

Pēdējais MS, kam pierādījām statistiski ticamu atšķirību alēļu frekvencēs ir *PSMA6* gēnā lokalizētajam marķierim HSMS006. Šim molekulāro marķieri arī konstatējam bimodiālu sadalījumu, apskatot visu alēļu frekvences.

Statistiski ticamu atšķirību ar koriģēto  $P$  vērtību  $4,64 \times 10^{-2}$  konstatējam alēlei ar atkārojumu (TG)<sub>22</sub>. Šo alēli gandrīz divas reizes biežāk novērojama slimnieku grupā, bet izredžu attiecības indekss bija 1,94 jeb saslimšanas iespējamību alēle palielina gandrīz 2 reizes (3.3. attēls A).

Šo trīs MS alēles varētu izmantot slimības prognozēšanā, jo HSMS602 alēle (CAA)<sub>8</sub> un HSMS006 alēle (TG)<sub>22</sub> ir ar slimības riska palielinošu efektu, bet HSMS801 alēle tieši pretēji – ar aizsargājošu.

### 3.2.2. SNP ASOCIĀCIJAS ANALĪZE AR T2DM

14. hromosomas proteasomu proteīnu gēnu septiņu SNP genotipēšanas rezultāti pozitīvi bija 103 2. tipa cukura diabēta pacientu un 121 kontroles 2 grupas DNS paraugos. Pa diviem paraugiem no katras grupas izslēdzām no asociācijas analīzes sakarā ar negatīvu rezultātu vienā vai vairākos lokusus.

Lai izslēgtu aptaukošanās nozīmi asociācijas analīzē, visiem paraugiem kopīgi veicām loģistikā regresijas analīzi, lai pārliecinātos, ka SNP nav saistīti ar aptaukošanos. Nevienam no SNP nekonstatējām saistību ar aptaukošanos ( $P > 0,05$ ).

#### 3.2.2.1. Alēļu un genotipu frekvenču sadale un asociācijas analīze

Analizējot SNP alēļu frekvenču sadali gadījuma un kontroles 2 grupās, konstatējām, ka statistiski ticamu saistību ar T2DM neuzrāda neviens no septiņiem lokusiem (3.3. tabula).

**3.3. tabula** 14. hromosomas proteasomu proteīnu gēnu viena nukleotīda polimorfismu alēļu un genotipu frekvenču sadale 2. tipa cukura diabēta un kontroles 2 grupās.

Gēns ID numurs Motīvs		PSMB5		PSMA6		PSMC6		PSMA3	
		rs11543947 c.70C>T	rs5807825 c.-4543_-4544insC	rs2277460 c.-110C>A	rs1048990 c.-8C>G	rs2295826 c.86-104A>G	rs2295827 c.86-46C>T	rs2348071 c.543+138G>A	
MAF	Kontrole 2	11,16	26,03	4,96	8,68	17,77	20,25	35,12	
	2TDM	6,80	33,01	7,77	14,56	22,82	25,73	34,47	
Lokusa statistiskā analīze pēc alēļu sadales	$P_a$	0,11	0,11	0,22	0,05	0,18	0,17	0,88	
	$P_b$	0,14	0,11	0,24	0,06	0,16	0,18	0,92	
Statistiskā analīze pēc retās alēles	$P_a$	0,26	0,32	0,42	0,17	0,37	0,40	0,91	
	$P_b$	0,37	0,27	0,29	0,24	0,30	0,33	1,00	
	OR (95%)	0,58	1,40	1,61	1,79	1,37	1,36	0,97	
		(0,30 - 1,14)	(0,93 - 2,11)	(0,74 - 3,49)	(0,99 - 3,23)	(0,86 - 2,18)	(0,87 - 2,12)	(0,66 - 1,43)	
	RR (95%)	0,61	1,27	1,57	1,68	1,28	1,27	0,98	
	(0,33 - 1,13)	(0,95 - 1,69)	(0,76 - 3,24)	(0,99 - 2,84)	(0,88 - 1,85)	(0,90 - 1,79)	(0,76 - 1,26)		
Genotipu frekvence	Heterozigota	Kontrole 2	22,31	10,74	9,92	17,36	20,66	23,97	53,72
		2TDM	13,59	13,59	15,53	29,13	20,39	26,21	51,46
	Retās alēles homozigota	Kontrole 2	0,00	30,58	0,00	0,00	7,44	8,26	8,26
		2TDM	0,00	38,83	0,00	0,00	12,62	12,62	8,74
Lokusa statistiskā analīze pēc genotipu sadales	$P_a$	0,09	0,25	0,21	$3,63 \times 10^{-2}$ *	0,42	0,47	0,94	
	$P_b$	0,12	0,25	0,16	$3,81 \times 10^{-2}$ *	0,44	0,48	0,96	

MAF – retās alēles (trekntekstā; c,-4543\_-4544insC gadījumā alēle bez insercijas) frekvence  $P_a$  - statistisko ticamība pēc  $\chi^2$  kritērija metodi;  $P_b$  – koriģēta statistiskā ticamība, aprēķināta kā vidējais lielums pēc 10'000 reižu permutāciju analīžu; OR un RR – starpību attiecība un relatīvo risks; CI 95% - konfidences intervālu pie 95%; \* —  $P < 0,05$  starp analizētajām grupām

PSMA6 gēna SNP c.-8C>G gadījumā konstatējām, ka statistiski ticamā saistība ar 2. tipa cukura diabētu ir uz robežas ( $P \sim 0,05$ ). Šīs variācijas reto alēli G novērojām pusotru reizi biežāk gadījuma (14,56%) nekā kontroles 2 (8,68%) grupā.

Apskatot rezultātus par genotipu sadali T2DM un kontroles 2 grupās (3.3. tabula), statistiski ticamu saistību ar 2. tipa cukura diabētu pierādījām iepriekš minētais SNP c.-8C>G ( $P_b = 3,81 \times 10^{-2}$ ). Šī polimorfisma genotipu sadalē nebija sastopamas retās alēles homozigotā forma ne gadījuma, ne kontroles 2 grupā. Turpretim heterozigotais genotips

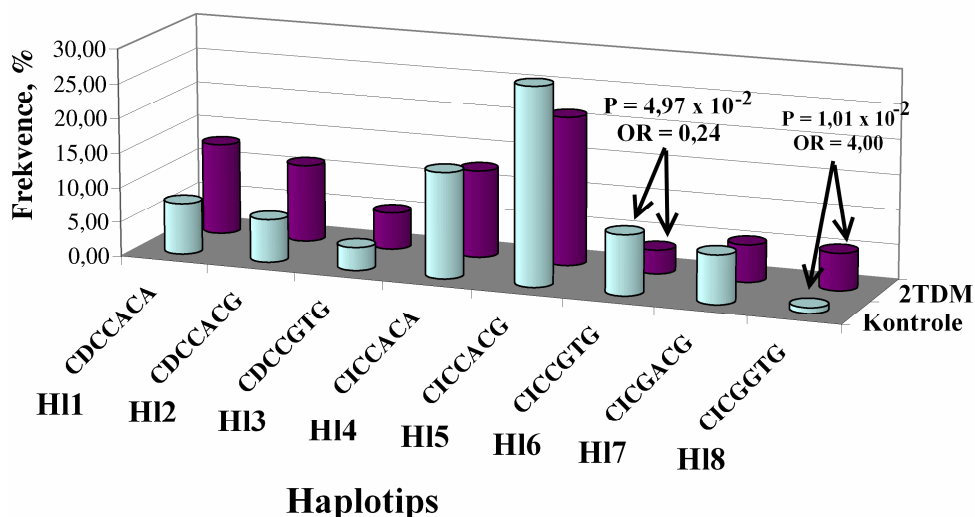
T2DM grupā bija sastopams par 10% mazāk paraugos nekā kontroles paraugos, bet bez statistiski ticama atšķirības pēc konkrētā genotipa.

Pēc genotipu sadales trīs SNP (*PSMB5* gēna SNP c.70C>T, *PSMA6* gēna SNP c.-110C>A un c.-8C>G) gadījumos ne kontroles, ne T2DM grupās nekonstatējām retās alēles homozigoto formu.

### 3.2.2.2. Haplotipu frekvenču sadale un asociācijas analīze

Alēļu un genotipu frekvenču sadalē saistību ar 2. tipa cukura diabētu pierādījām vienam SNP, kas ir lokalizēts *PSMA6* gēnā. Tāpēc haplotipu analīzē izvēlējāmies, pirmkārt, izskatīt haplotipus, ko veido visi analizētie SNP (3.4. attēls un 5. pielikums A), un, otrkārt, izskatīt haplotipus, ko veido visi 20S proteasomu proteīnu gēnu SNP (3.5. attēls un 5. pielikums B).

3.4. attēlā ir apkopoti dati un statistiskās analīzes rezultāti par biežāk sastopamajiem visu septiņu SNP veidotajiem haplotipiem. Pavisam kopā izveidojām 28 haplotipus, no kuriem astoņiem frekvence vismaz vienā grupā bija lielāka par 5%.



#### 3.4.attēls Septiņu SNP lokusu biežāk sastopamo haplotipu sadale un statistiskā analīze

T2DM un kontroles 2 grupās. SNP secība haplotipu kombinācijās: *PSMB5* variācija c.70C>T; *PSMA6* gēna SNP c.-4543\_-4544insC (2.; D/I), c.-110C>A (3.) un c.-8C>G (4.), *PSMC6* gēnā lokalizētie c.86-104A>G (5.) un c.86-46C>T (6.) un *PSMA3* SNP c.543+138G>A (7.).

Visbiežāk sastopamais haplotips bija HI5, kuru veido visu SNP biežāk sastopamās alēles. Haplotips ar visu lokusu retajām alēlēm nenovērojām nevienam paraugam no abām analizētajām grupām.

No astoņiem haplotipiem divi (HI6 un HI8) pēc statistiskās analīzes uzrādīja ticamu saistību ar 2. tipa cukura diabētu. Haplotips HI6 bija pret slimību aizsargājošs haplotips, bet

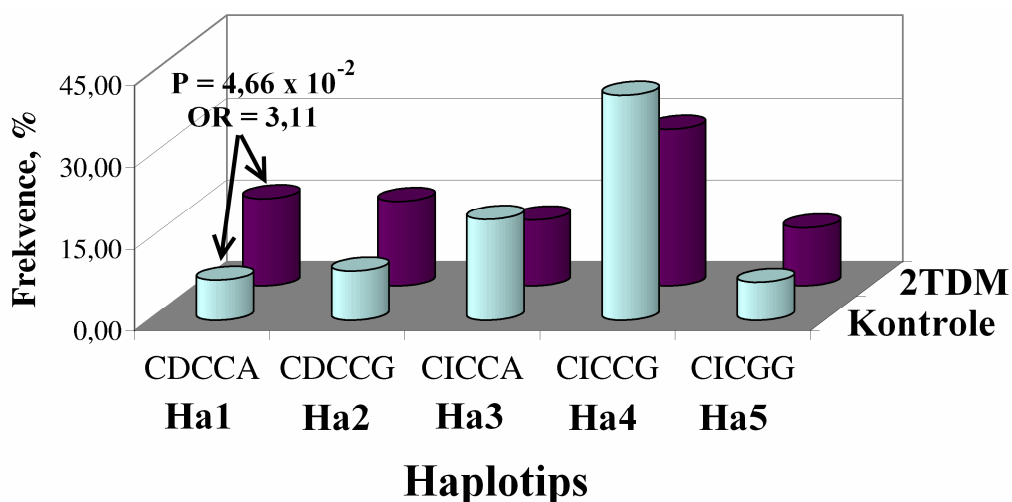


HI8 tieši pretēji – riska haplotips. Pirmais no minētajiem haplotipiem samazina nēsātājam saslimšanas izredzes vairāk kā 4 reizes, bet otrs haplotips tieši otrādi 4 reizes palielina saslimšanas iespējamību, salīdzinot ar saslimšanas risku Latvijas populācijā.

Apskatot šo haplotipu sekvenču, secinājām, ka vienīgais lokuss, kas ir mainīgs ir c.-8C>G – HI6 gadījumā alēle C, bet HI8 gadījumā alēle G. Tas apliecina šī SNP lomu saistībā 2. tipa cukura diabētu, ko secinājām asociācijas analīzēs pēc alēļu un genotipu frekvencēm.

Turklāt šos abus aprakstītos haplotipus var izmantot kā molekulāros marķierus T2DM prognozēšanā, jo pārējo haplotipu saistība ar analizēto slimību ir ļoti neizteikta (OR ~ 1,00).

3.5. attēlā ir apkopoti dati un statistiskās analīzes rezultāti par biežāk sastopamajiem 20S proteasomas proteīnu gēnu (*PSMB5*, *PSMA6* un *PSMA3*) SNP veidotajiem haplotipiem. Pavisam kopā izveidojām 17 haplotipus, no kuriem piecus iekļāvām asociācijas analīzē.



**3.5.attēls** 20S proteasomas proteīnu gēnu SNP lokusu biežāk sastopamo haplotipu sadale un statistiskā analīze T2DM un kontroles 2 grupās. SNP secība haplotipu kombinācijās: *PSMB5* variācija c.70C>T; *PSMA6* gēna SNP c.-4543\_-4544insC (2.; D/I), c.-110C>A (3.) un c.-8C>G (4.), un *PSMA3* SNP c.543+138G>A (5.).

Visbiežāk sastopamais genotips šajā gadījumā abās grupās bija Ha4, kuru veido visu SNP biežāk sastopamās alēles.

Haplotipu ar visu piecu SNP retajām alēlēm, līdzīgi kā analizējot septiņu SNP haplotipus, nekonstatējām nevienam kontroles 2 vai T2DM paraugam. Tas apstiprina, ka reto alēļu kombinācijas ir reti vai vispār nav sastopamas Latvijas populācijā.

No šo haplotipu kombinācijām vienai (Ha1) pierādījām saistību ar 2.tipa cukura diabētu pēc  $P_a$  vērtības. Pēc koriģētās  $P$  vērtības šī saistība mazinās, bet saglabājas uz robežas ( $P_b \sim 0,07$ ). Izredžu attiecība haplotipam Ha1 ir 3,10, kas nozīmē, ka saslimšanas iespējamība šī haplotipa nēsātājam palielinās nedaudz vairāk kā 3 reizes.

Apskatot haplotipu Ha1 veidojošās alēles, secinājām, ka divu SNP (*PSMA6* gēna SNP c.-4543\_-4544insC un *PSMA3* SNP c.543+138G>A) lokusus ir retās alēles, bet pārējos lokusus – biežāk sastopamās alēles. Izmainot haplotipā Ha1 kaut vienu no divām retajām alēlēm (SNP c.-4543\_-4544insC gadījumā veidojas Ha2, bet SNP c.543+138G>A gadījumā – Ha3), samazinās haplotipa sastopamība kontroles grupā, bet palielinās T2DM grupā. Gala rezultātā abu grupu frekvences kļūst līdzīgas. Turklāt OR Ha2 un Ha3 gadījumos ir mazāka, tātad haplotipi ir aizsargājošāki pret slimību nekā Ha1 haplotips.

### **3.3. Juvenīlā idiopātiskā artrīta asociācijas analīze**

#### **3.3.1. LOKUSA 14Q13 HSMS MARĶIERU ASOCIĀCIJAS ANALĪZE AR JIA**

HSMS mikrosatelītus genotipējām 170 juvenīlā idiopātiskā artrīta un 230 kontroles 1 paraugos. JIA grupā 97 paraugi bija ar oligoartrīta formu, bet 50 – ar poliartrīta formu. Pozitīvi genotipēto paraugu skaits norādīts 6. pielikumā pie MS nosaukuma.

No iegūtajiem mikrosatelītu genotipēšanas rezultātiem noteicām genotipu (6. pielikums) un alēļu (7. pielikums) sadali juvenīlā idiopātiskā artrīta un tā subformu (oligoartrīta (JIoA) un poliartrīta (JIpA)) gadījumu un kontroles grupās.

No alēļu frekvenču rezultātiem katram mikrosatelītam noteicām sagaidāmo heterozigotātes indeksu abās grupās, bet no genotipu sadales aprēķinājām iegūto heterozigotātes lielumu, tādejādi noteicām, vai gadījuma un kontroles grupas atbilst Hārdija – Veinberga vienādojumam (7. pielikums). Konstatējām, ka, neskatoties uz nelielajām atšķirībām, pēc  $\chi^2$  kritērija metodes visu lokusu alēļu sadale atbilst Hārdija – Veinberga vienādojumam.

##### **3.3.1.1. Genotipu frekvenču sadale un asociācijas analīze**

Visiem mikrosatelītiem bija sastopami mazāk genotipi nekā būtu sagaidāms pēc alēļu skaita: HSMS601 marķierim konstatējām 19 no iespējamiem 28 genotipiem, HSMS701 un HSMS006 – 28 un 31 genotipi no iespējamiem 45, HSMS702 – 27 genotipi no 78, bet visvairāk genotipu novērojām molekulārajam marķierim HSMS801 – attiecīgi 59 genotipi no 136 genotipiem

Ne visi iegūtie genotipi bija sastopami ar vismaz 5% frekvenci vismaz vienā no grupām. HSMS602 gadījumā asociācijas analīzē ietvērām septiņus genotipus, HSMS801 un HSMS006 gadījumā no visiem genotipiem saistības analīzē iekļāvām attiecīgi astoņus un

deviņus genotipus, bet HSMS702 marķierim bieži sastopami bija pieci genotipi. Visvairāk genotipi asociācijas analīzē bija marķierim HSMS702 – 12.

Veicot statistisko analīzi genotipu frekvencēm, konstatējām, ka ar JIA ir saistīti visi HSMS mikrosatelīti. Daži no MS genotipiem ir saistīti izteiktāk vai tikai ar JIoA un/vai JIpA apakšgrupām (3.4. tabula).

Divi 169 un 170 bp alēļu homozigotie HSMS602 mikrosatelīta genotipi uzrādīja saistību tikai ar juvenīlo idiopātisko artrītu, bet, dalot kopējo grupu apakštipos,  $P$  vērtība bija lielāka nekā 0,05. Genotipam 170/170 bp konstatējām izteiktu riska genotipa izredžu starpību, kas bija 3,25 jeb genotips saslimšanas izredzes palielina 3,25 reizes, salīdzinot ar populāciju. Tātad šo marķiera genotipu varētu izmantot JIA prognozēšanā.

Marķiera HSMS006 gadījumā pierādījām trīs genotipu saistību ar JIA un/vai tā formām. Apskatot slimības grupu kopumā, konstatējām divus genotipus, no kuriem viens (TG)<sub>19/19</sub> bija ar aizsargājošu efektu (OR = 0,12), bet otrs (TG)<sub>20/23</sub> – ar klīniski nozīmīgu riska efektu (OR = 9,75). Analizējot atsevišķi JIoA un JIpA grupas, secinājām, ka genotips (TG)<sub>20/23</sub> ir kā riska genotips abām JIA formām, bet izredžu attiecība, salīdzinot ar kopējo grupu, palielinās JIpA gadījumā. Juvenīlā idiopātiskā oligoartrīta gadījumā statistiski ticamu atšķirību novērojām arī genotipam (TG)<sub>19/19</sub>. Turklāt šajā apakšgrupā konstatējām genotipu, kurš nebija asociēts ar JIA kopējo grupu - (TG)<sub>18/18</sub>. Abi homozigotie genotipi JIoA grupā ir ar aizsargājošu efektu (3.4. tabula). Tātad JIpA prognozēšanai varētu izmantot genotipu (TG)<sub>20/23</sub>, bet abas homozigotās formas tieši JIoA prognozēšanai.

Otrs MS, kuram pierādījām saistību ar visām gadījuma grupām, bija HSMS701. Kopējā JIA grupā pēc  $P_a$  vērtības saistību konstatējām sešiem genotipiem, bet, koriģējot  $P$  vērtību, diviem genotipiem nebija statistiski ticama saistība. No atlikušajiem četriem genotipiem divi ((AC)<sub>16/16</sub> un (AC)<sub>17/17</sub>) uzrādīja aizsargājošu efektu, bet divi ((AC)<sub>16/19</sub> un (AC)<sub>17/19</sub>) – palielinātu riska efektu. Apskatot katru apakštipu atsevišķi, secinājām, ka JIoA gadījumā ir divi genotipi, kuriem ir saistība ar slimību pēc  $P_a$  vērtības, bet ne pēc  $P_b$ . JIpA gadījumā statistiski ticamu saistību pēc  $P_a$  arī novērojām diviem genotipiem, bet vienam genotipam tā saglabājās arī pēc  $P$  vērtības koriģēšanas. Šis genotips (AC)<sub>16/18</sub> palielina saslimšanas iespēju par 89% un gadījuma grupā ir sastopams četras reizes biežāk. Genotips (AC)<sub>17/19</sub> neuzrādīja saistību ar konkrētu apakštipu, bet tikai ar JIA kopumā (3.4. tabula).

**3.4. tabula** Ar juvenīlo idiopātisko artrītu un/vai tā formām saistīto HSMS marķieru genotipu statistiskās analīzes rezultāti.

JIA grupa	HSMS marķieris	Genotips	Gadījuma grupa <sup>a</sup>	$P_a$	$P_b$	OR (CI 95%)	RR (CI 95%)	
JIoA	701	(AC) <sub>16/19</sub>	↑	$4,04 \times 10^{-2}$	$6,76 \times 10^{-2}$	R	2,47 (1,41 – 4,33)	
		(AC) <sub>17/17</sub>	↓	$2,97 \times 10^{-2}$	$9,70 \times 10^{-2}$	-	-	
	702	(TG) <sub>10/10</sub>	↑	$1,43 \times 10^{-2}$	$5,83 \times 10^{-2}$	-	-	
	801	(AC) <sub>20/21</sub>	↑	$4,54 \times 10^{-2}$	$3,10 \times 10^{-2}$	R	2,72 (1,48 – 5,00)	
		(AC) <sub>22/23</sub>	↑	$2,70 \times 10^{-3}$	$8,40 \times 10^{-3}$	-	-	
		006	(TG) <sub>18/18</sub>	↓	$3,48 \times 10^{-2}$	$9,50 \times 10^{-3}$	0,16 (0,03 – 0,74)	0,19 (0,05 – 0,79)
			(TG) <sub>19/19</sub>	↓	$1,85 \times 10^{-3}$	$1,70 \times 10^{-3}$	0,06 (0,01 – 0,47)	0,07 (0,01 – 0,50)
		(TG) <sub>20/23</sub>	↑	$6,42 \times 10^{-3}$	$3,30 \times 10^{-3}$	7,62 (1,93 – 30,02)	9,32 (2,69 – 32,29)	
JIpA	701	(AC) <sub>16/16</sub>	↓	$3,71 \times 10^{-2}$	$1,13 \times 10^{-1}$	-	-	
		(AC) <sub>16/18</sub>	↑	$3,63 \times 10^{-2}$	$7,90 \times 10^{-2}$	1,89 (0,58 – 6,11)	4,15 (1,78 – 9,67)	
	006	(TG) <sub>20/23</sub>	↑	$1,02 \times 10^{-2}$	$1,60 \times 10^{-3}$	15,24 (3,23 – 71,87)	12,05 (3,31 – 43,82)	
JIA	602	169/169	↑	$1,93 \times 10^{-2}$	$2,53 \times 10^{-2}$	R	1,78 (1,34 – 2,36)	
		170/170	↑	$1,46 \times 10^{-2}$	$6,50 \times 10^{-3}$	1,82 (0,81 – 4,11)	3,25 (1,60 – 6,61)	
	701	(AC) <sub>16/16</sub>	↓	$6,61 \times 10^{-3}$	$1,30 \times 10^{-2}$	0,07 (0,02 – 0,26)	0,17 (0,05 – 0,55)	
		(AC) <sub>16/18</sub>	↑	$3,84 \times 10^{-2}$	$7,41 \times 10^{-2}$	1,14 (0,45 – 2,89)	2,86 (1,38 – 5,94)	
		(AC) <sub>16/19</sub>	↑	$1,56 \times 10^{-2}$	$1,03 \times 10^{-2}$	R	2,52 (1,54 – 4,14)	
		(AC) <sub>17/17</sub>	↓	$1,28 \times 10^{-2}$	$3,76 \times 10^{-2}$	-	-	
		(AC) <sub>17/19</sub>	↑	$1,80 \times 10^{-2}$	$3,98 \times 10^{-2}$	1,99 (0,58 – 6,83)	5,01 (1,68 – 14,94)	
		(AC) <sub>18/21</sub>	↑	$2,53 \times 10^{-2}$	$5,83 \times 10^{-2}$	2,27 (0,57 – 8,97)	5,72 (1,64 – 19,94)	
	702	(TG) <sub>10/10</sub>	↑	$1,80 \times 10^{-2}$	$7,15 \times 10^{-2}$	-	-	
		(TG) <sub>11/12</sub>	↓	$2,91 \times 10^{-2}$	$1,91 \times 10^{-2}$	R	0,58 (0,43 – 0,78)	
	801	(AC) <sub>20/21</sub>	↑	$3,87 \times 10^{-2}$	$2,20 \times 10^{-2}$	R	2,40 (1,37 – 4,20)	
		(AC) <sub>22/23</sub>	↑	$1,67 \times 10^{-3}$	$4,60 \times 10^{-3}$	-	-	
	006	(TG) <sub>19/19</sub>	↓	$5,41 \times 10^{-4}$	$8,00 \times 10^{-4}$	0,10 (0,03 – 0,35)	0,12 (0,04 – 0,38)	
		(TG) <sub>20/23</sub>	↑	$1,02 \times 10^{-3}$	$1,80 \times 10^{-3}$	8,38 (2,31 – 30,41)	9,75 (2,97 – 32,04)	

$P_a$  - statistiskā ticamība pēc  $\chi^2$  kritērija metodes;  $P_b$  – koriģētā statistiskā ticamība, aprēķināta kā vidējais lielums pēc 10'000 reižu permutāciju analīžu; OR un RR – starpību attiecība un relatīvais risks; CI 95% - konfidences intervāls pie 95%; <sup>a</sup> - ar bultiņām norādīts genotipa frekvences palielināšanās (↑) vai samazināšanās (↓) attiecībā pret kontroles grupu.

Atlikušie divi MS (HSMS801 un HSMS702) neuzrādīja saistību ar juvenīlo idiopātisko poliartrītu. Abos gadījumos kopējā grupā atklājām divus genotipus ar statistiski ticamu saistību.

HSMS801 genotipi (AC)<sub>20/21</sub> un (AC)<sub>22/23</sub> uzrādīja asociāciju gan ar JIA kopumā, gan atsevišķi ar oligoartrīta formu. Turklāt genotips (AC)<sub>20/21</sub> palielina saslimšanas iespējamību par 140%, bet genotips (AC)<sub>22/23</sub> netika konstatēts kontroles 1 grupā. Iespējams, ka šis genotips arī ir slimību veicinošs.

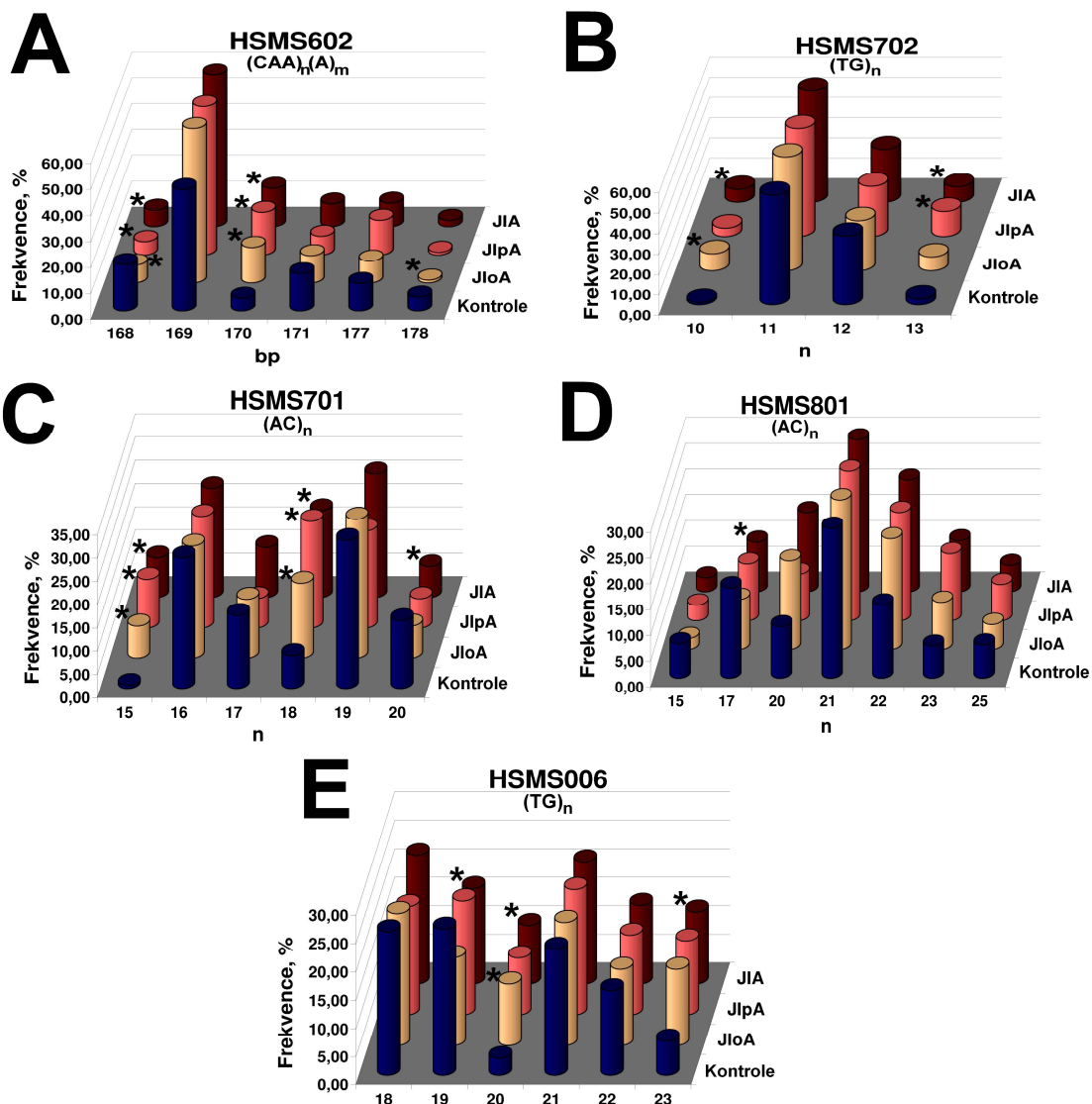
HSMS702 gadījumā ar JIA saistību konstatējām genotipiem (TG)<sub>10/10</sub> un (TG)<sub>11/12</sub>, bet ar JIoA – genotipam (TG)<sub>10/10</sub>. Turklāt genotips (TG)<sub>10/10</sub> netika konstatēts veselīgiem indivīdiem.

Apskatot visus genotipu sadales rezultātus kopumā, var secināt, ka ar JIA asociētos genotipus var izmantot slimības prognozēšanā, nosakot saslimšanas iespējamības pakāpi.

### **3.3.1.2. Alēļu frekvenču sadale un asociācijas analīze**

No katra parauga genotipa rezultāta noteicām mikrosatelītu alēles un aprēķinājām to frekvenču sadali gadījuma un kontroles 1 grupās.

HSMS602 molekulārajam marķierim, analizējot JIA gadījuma un kontroles 1 grupas, konstatējām septiņas alēles (167 – 171 bp un 177 – 178 bp), no kurām biežāk sastopamā bija alēle ar 169 bāzu pāriem. No visām alēlēm gadījuma un kontroles 1 grupās sešas bija sastopamas vismaz 5% paraugu (3.6. attēlā). HSMS701 mikrosatelītam konstatējām deviņas alēles ((AC)<sub>14 – 22</sub>), no kurām sešas iekļāvām asociācijas analīzē (3.6. attēlā), bet visbiežāk sastopamā alēle bija (AC)<sub>19</sub>. HSMS702 gadījumā bija sastopamas 12 alēles ((TG)<sub>10 – 14, 17-18, 20 – 25</sub>), no kurām četras vismaz vienā no grupām pārsniedza 5% sastopamības robežu (3.6. attēlā). Visbiežāk sastopamā alēle abās grupās bija alēle (TG)<sub>11</sub>. HSMS801 marķierim abās grupās kopā atradām 16 alēles ((AC)<sub>12</sub> un (AC)<sub>14-28</sub>), no kurām septiņas iekļāvām asociācijas analīzē ar JIA (3.6. attēlā), bet ar vislielāko sastopamības frekvenci bija alēle (AC)<sub>21</sub>. HSMS006 marķierim bija deviņas alēles ((TG)<sub>16</sub> un (TG)<sub>18-25</sub>), no kurām sešas bija sastopamas biežāk par 5% (3.6. attēlā). Šis MS bija vienīgais, kuram atšķīrās biežāk sastopamā alēle starp grupā – JIA un JIoA grupā tā bija alēle (TG)<sub>18</sub>, JIpA grupā – (TG)<sub>21</sub> un kontroles 1 grupā – alēle (TG)<sub>19</sub>.



**3.6.attēls** HSMS602 (A), HSMS702 (B), HSMS701 (C), HSMS801 (D) un HSMS006 (E) marķieru biežāk sastopamo alēļu sadale kontroles 1 un Juvenīlā idiopātiskā artrīta grupās. Abscisa - alēles apzīmētas ar fragmenta garumu (bp) HSMS602 un ar atkārtojumu skaitu (n) pārējiem marķieriem; ar \* atzīmētas alēles ar statistiski ticamu saistību ar JIA un/vai JIoA un JIpA formām ( $P_b < 0,05$ ).

Veicot asociācijas analīzi, mēs secinājām (3.5. tabula), ka ar juvenīlo idiopātisko artrītu un/vai tā subformām ir saistīta vismaz viena alēle no katra HSMS mikrosatelīta.

HSMS801 marķiera alēle (AC)<sub>17</sub> ir saistīta tikai ar JIA kopumā un ir ar nelielu aizsargājošu efektu, samazinot saslimšanas iespēju par 45%, salīdzinot ar populāciju.

HSMS006 mikrosatelīta alēles (TG)<sub>19</sub>, (TG)<sub>20</sub> un (TG)<sub>23</sub> ir saistītas ar analizēto slimību kopumā. Alēles (TG)<sub>20</sub> gadījumā statistiski ticamu saistību konstatējām, arī apskatot JIoA apakšgrupu atsevišķi. Turklāt (TG)<sub>20</sub> palielina tās nēsātājam iespēju saslimt ar juvenīlo idiopātisko oligoartrīta formu vismaz 3,83 reizes, salīdzinot ar šo rādītāju Latvijas populācijā.

**3.5. tabula** Ar juvenīlo idiopātisko artrītu un/vai tā formām saistīto HSMS marķieru alēļu statistiskā analīzes rezultāti.

JIA grupa	HSMS marķieris	Alēle	Gadījuma grupa <sup>a</sup>	$P_a$	$P_b$	OR (CI 95%)	RR (CI 95%)	
JIoA	602	168 bp	↓	$8,07 \times 10^{-3}$	$1,28 \times 10^{-2}$	0,30 (0,16 – 0,56)	0,38 (0,22 – 0,67)	
		170 bp	↑	$1,30 \times 10^{-2}$	$5,90 \times 10^{-2}$	2,21 (1,20 – 4,08)	2,81 (1,63 – 4,83)	
		178 bp	↓	$3,48 \times 10^{-2}$	$1,06 \times 10^{-2}$	0,16 (0,04 – 0,69)	0,20 (0,05 – 0,84)	
	701	(AC) <sub>15</sub>	↑	$3,41 \times 10^{-3}$	$9,70 \times 10^{-3}$	11,08 (3,01 – 40,43)	10,39 (2,97 – 36,37)	
		(AC) <sub>18</sub>	↑	$3,81 \times 10^{-2}$	$4,99 \times 10^{-2}$	2,42 (1,33 – 4,40)	2,27 (1,41 – 3,65)	
	702	(TG) <sub>10</sub>	↑	$2,00 \times 10^{-3}$	$3,00 \times 10^{-4}$	7,39 (2,64 – 20,69)	7,67 (2,85 – 20,64)	
	006	(TG) <sub>20</sub>	↑	$1,64 \times 10^{-2}$	$2,93 \times 10^{-2}$	3,83 (1,79 – 8,18)	3,49 (1,812 – 6,72)	
	JIpA	602	168 bp	↓	$1,74 \times 10^{-2}$	$3,23 \times 10^{-2}$	0,23 (0,09 – 0,59)	0,28 (0,12 – 0,67)
			170 bp	↑	$2,46 \times 10^{-2}$	$4,15 \times 10^{-2}$	2,74 (1,35 – 5,56)	3,35 (1,83 – 6,14)
		701	(AC) <sub>15</sub>	↑	$1,64 \times 10^{-3}$	$4,70 \times 10^{-3}$	24,00 (6,08 – 94,97)	15,69 (4,40 – 55,94)
(AC) <sub>18</sub>			↑	$9,72 \times 10^{-3}$	$5,70 \times 10^{-3}$	4,95 (2,42 – 10,13)	3,24 (1,97 – 5,32)	
702		(TG) <sub>13</sub>	↑	$1,53 \times 10^{-2}$	$3,12 \times 10^{-2}$	4,38 (1,89 – 10,14)	4,33 (2,04 – 9,20)	
JIA		602	168 bp	↓	$9,02 \times 10^{-4}$	$3,00 \times 10^{-4}$	0,28 (0,17 – 0,47)	0,35 (0,22 – 0,55)
	170 bp		↑	$1,33 \times 10^{-3}$	$2,30 \times 10^{-3}$	2,40 (1,40 – 4,12)	3,01 (1,86 – 4,88)	
	701	(AC) <sub>15</sub>	↑	$4,91 \times 10^{-5}$	<0,0001	15,43 (4,54 – 52,41)	12,87 (3,94 – 42,06)	
		(AC) <sub>18</sub>	↑	$1,09 \times 10^{-3}$	$6,00 \times 10^{-4}$	3,16 (1,90 – 5,25)	2,64 (1,76 – 3,96)	
		(AC) <sub>20</sub>	↓	$1,54 \times 10^{-2}$	$1,09 \times 10^{-2}$	0,55 (0,31 – 0,96)	0,46 (0,29 – 0,74)	
	702	(TG) <sub>10</sub>	↑	$4,37 \times 10^{-3}$	$1,30 \times 10^{-3}$	5,64 (2,09 – 15,25)	5,75 (2,19 – 15,09)	
		(TG) <sub>13</sub>	↑	$3,83 \times 10^{-2}$	$1,92 \times 10^{-2}$	2,58 (1,29 – 5,18)	2,63 (1,37 – 5,06)	
	801	(AC) <sub>17</sub>	↓	$3,55 \times 10^{-2}$	$2,37 \times 10^{-2}$	0,54 (0,33 – 0,88)	0,55 (0,37 – 0,81)	
	006	(TG) <sub>19</sub>	↓	$4,67 \times 10^{-2}$	$3,39 \times 10^{-2}$	0,73 (0,48 – 1,12)	0,65 (0,49 – 0,86)	
		(TG) <sub>20</sub>	↑	$4,27 \times 10^{-3}$	$1,70 \times 10^{-3}$	3,73 (1,88 – 7,39)	3,32 (1,82 – 6,07)	
		(TG) <sub>23</sub>	↑	$2,91 \times 10^{-2}$	$4,26 \times 10^{-2}$	2,29 (1,31 – 4,00)	2,04 (1,29 – 3,21)	

$P_a$  - statistiskā ticamība pēc  $\chi^2$  kritērija metodes;  $P_b$  – koriģētā statistiskā ticamība, aprēķināta kā vidējais lielums pēc 10'000 reižu permutāciju analīžu; OR un RR – starpību attiecība un relatīvais risks; CI 95% - konfidences intervāls pie 95%; <sup>a</sup> - ar bultiņām norādīts alēļu frekvences palielināšanās (↑) vai samazināšanās (↓) attiecībā pret kontroles grupu.

Divām HSMS602 alēlēm (168 un 170 bp) pierādījām saistību ar juvenīlo idiopātisko artrītu un ar abām analizētajām slimības formām atsevišķi. Turklāt alēle ar 168 bp ir ar aizsargājošu efektu, bet alēle 170 bp ir kā riska alēle attiecībā pret slimību vai tās formām. Analizējot JIoA grupu atsevišķi, papildus saistību ar slimību uzrādīja vēl viena alēle – ar 178 bp. Turklāt šīs alēles OR attiecībā pret slimību ir 0,16, kas nozīmē, ka alēles nēsātāja iespējamība saslimt samazinās no 100% līdz 16%, salīdzinot ar populācijas saslimšanas koeficientu.

Marķierim HSMS701 bija divas alēles ((AC)<sub>15</sub> un (AC)<sub>18</sub>), kurām konstatējām asociāciju ar juvenīlo idiopātisko artrītu un ar abām analizētajām slimības formām. Šīs abas alēles ir ar augstu riska pakāpi attiecībā pret slimību. Alēle (AC)<sub>15</sub> iespējams palielina tās nēsātājam risku saslimt līdz pat 15 reizēm, atkarībā no prognozētās slimības formas. HSMS701 mikrosatelīta gadījumā ir vēl viena alēle, kurai bija saistība ar JIA kopumā, bet ne ar kādu subformu atsevišķi. Tā ir alēle (AC)<sub>20</sub>.

HSMS702 alēļu sadalē konstatējām divas alēles, kurām bija saistība ar JIA kopumā, bet, apskatot katru analizēto formu atsevišķi, secinājām, ka katru no alēlēm varētu izmantot kā molekulāro marķieri pie atšķirīgām JIA formām. Alēle (TG)<sub>10</sub> uzrādīja augstu izredžu saistību ar oligoartrīta formu (OR = 7,67), bet alēle (TG)<sub>13</sub> – ar poliartrīta formu (OR = 4,33).

Apskatot kopumā iegūtos alēļu sadales rezultātu, secinājām, ka HSMS mikrosatelītus alēles varētu izmantot kā molekulāros marķierus, prognozējot saslimšanas iespējamību saistībā ar juvenīlo idiopātisko artrītu un/vai tā subtipiem.

### **3.3.2. SNP ASOCIĀCIJAS ANALĪZE SAISTĪBĀ AR JIA**

Vairākos JIA un kontroles 1 kolekcijas paraugos pēc HSMS mikrosatelītu analīzes DNS bija palicis maz vai bija beidzies. Tāpēc atlasījām 139 gadījuma un 175 kontroles paraugus, kuriem analizējām 14. hromosomas proteasomu proteīnu gēnu SNP. No visiem JIA paraugiem 84 bija ar oligoartrīta formu, bet 42 – ar poliartrīta formu.

#### **3.3.2.1. Alēļu frekvenču sadale un asociācijas analīze**

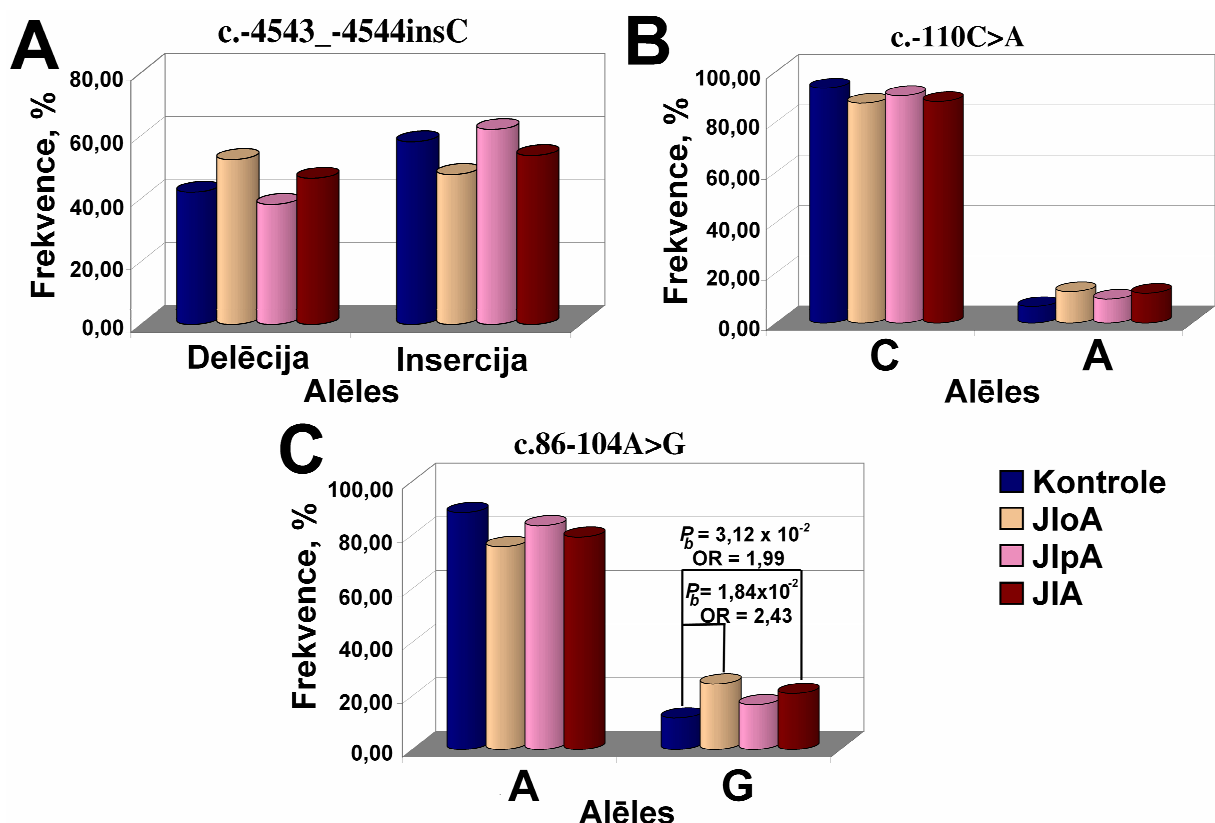
Analizējot SNP alēļu frekvenču sadali JIA, JIoA un JIpA pret frekvenču sadali kontroles grupā (8. pielikums), konstatējām, ka statistiski ticamu saistība ar slimību ir trim lokusiem (3.7. attēls).

*PSMA6* gēnam piesaistītais polimorfisms jeb precīzāk insercija/delēcija c.-4543\_-4544insC uzrādīja statistisku ticamu saistību ( $P_b = 2,36 \times 10^{-2}$ ) kopējā alēļu sadalē ar juvenīlo idiopātisko oligoartrītu (3.7. attēls A), bet saistība ar kopējo JIA grupu nebija statistiski ticama ( $P_b = 0,25$ ). Apskatot katras alēles frekvences atšķirības starp grupām atsevišķi,



neatradām statistiski ticamu saistību ar slimību. Tas nozīmē, ka šis polimorfisms ir saistīts ar JIoA pēc alēļu sadales nevis kādas konkrētas alēles.

Līdzīgu ainu novērojām *PSMA6* gēna promoterī lokalizētajam SNP c.-110C>A (3.7. attēls B). Šī polimorfisma gadījumā statistiski ticamu saistību konstatējām gan ar juvenīlo idiopātisko artrītu kopumā ( $P_b = 2,39 \times 10^{-2}$ ), gan oligoartrīta formu ( $P_b = 2,56 \times 10^{-2}$ ). Tātad varam domāt, ka arī šis SNP ir saistīts tieši ar oligoartrīta formu. Analizējot katras alēles frekvences atsevišķi, nenovērojām statistiski ticamu saistību, tātad arī šis polimorfisms uzrādījās saistību pēc alēļu vispārīgās sadales.



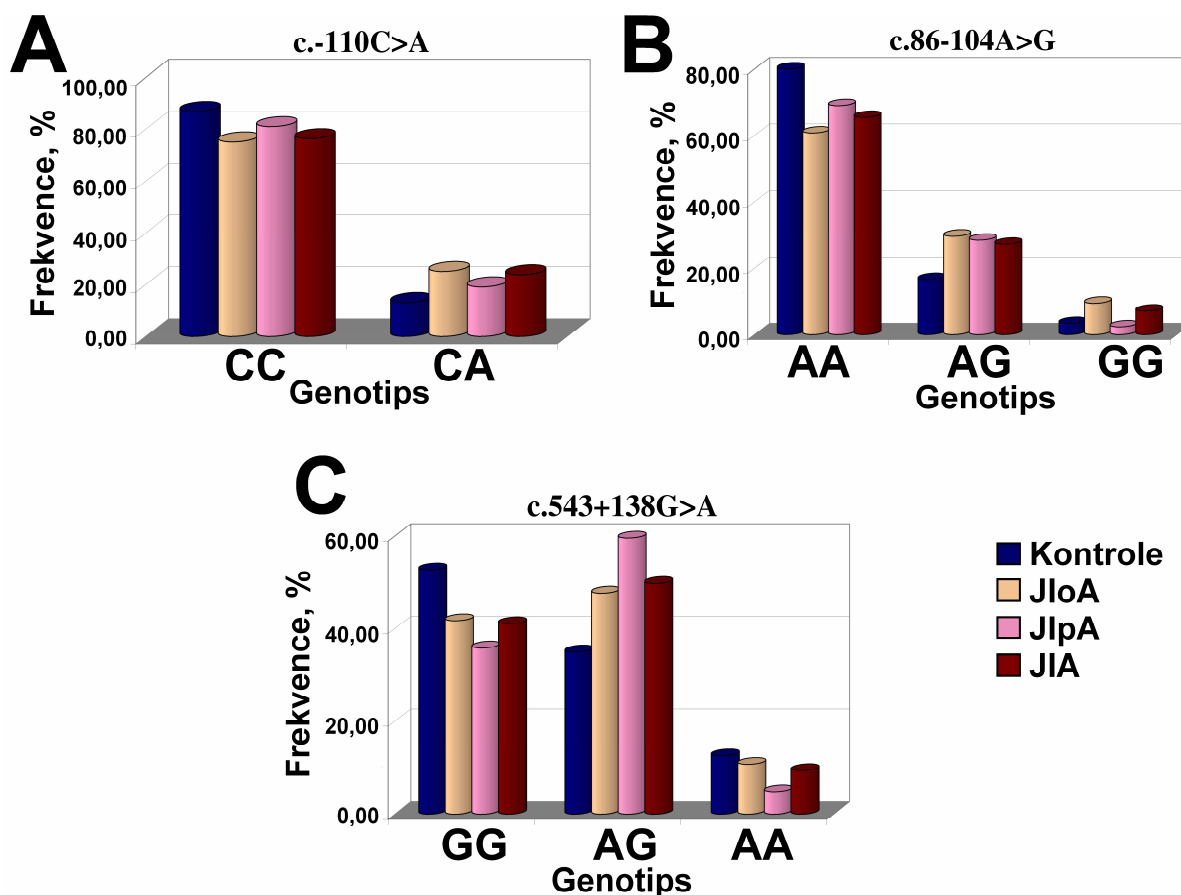
**3.7.attēls** *PSMA6* gēna polimorfisma c.-4543\_-4544insC (A) un c.-110C>A (B) un *PSMC6* gēna c.86-104A>G (C) alēļu frekvenču sadale starp kontroles 1 un Juvenīlā idiopātiskā artrīta grupās.

Trešais polimorfisms, kuram pierādījām statistiski ticamu atšķirību starp analizētajām grupām, ir *PSMC6* gēna 1. intronā lokalizētais SNP c.86-104A>G (3.7. attēls C). Šīs variācijas gadījumā, pirmkārt, atklājām saistību gan ar juvenīlo idiopātisko artrītu kopumā ( $P_b = 1,00 \times 10^{-3}$ ), gan oligoartrīta formu ( $P_b = 1,00 \times 10^{-4}$ ) alēļu sadalē. Otrkārt, retās alēles sadale bija statistiski ticama atšķirība starp JIA un kontroli 1 ( $P_b = 3,13 \times 10^{-2}$ ), kā arī starp JIoA un kontroli 1 ( $P_b = 1,84 \times 10^{-2}$ ). Apskatot SNP G alēles saistību ar slimību, noteicām izredžu attiecību. Secinājām, ka šīs alēles nēsātājam palielinās iespējamība saslimt ar JIoA 2,43 reizes, salīdzinot ar populāciju kopumā.

### 3.3.2.2. Genotipu frekvenču sadale un asociācijas analīze

Apskatot genotipu sadali visas grupās, izveidojām kopēju tabulu (9. pielikums), kurā par katru SNP un katru slimības grupu var redzēt, pirmkārt, heterozigotā un retās alēles homozigotā genotipa frekvences, otrkārt, statistiski ticamo saistību analīzē starp lokusu un slimību, apskatot genotipu sadali, un treškārt, heterozigotā un retās alēles homozigotā genotipa frekvenču statistisko analīzi.

No rezultātiem secinājām, ka *PSMA6* gēna SNP c.-110C>A un *PSMC6* gēna SNP c.86-104A>G (3.8. attēls A un B) ir saistīti ar juvenīlo idiopātisko artrītu un tā oligoartrīta formu arī pēc genotipu sadalē. Nevienam no šiem diviem polimorfismiem, analizējot atsevišķi katra genotipa frekvences, neradām statistiski ticamu saistību ar JIA kopuma un/vai tās subformām.



**3.8.attēls** *PSMA6* gēna polimorfisma c.-110C>A (A), *PSMC6* gēna c.86-104A>G (B) un *PSMA3* gēna c.543+138G>A (C) genotipu frekvenču sadale kontroles 1 un Juvenīlā idiopātiskā artrīta (JIA, JIoA, JIpA) grupās.

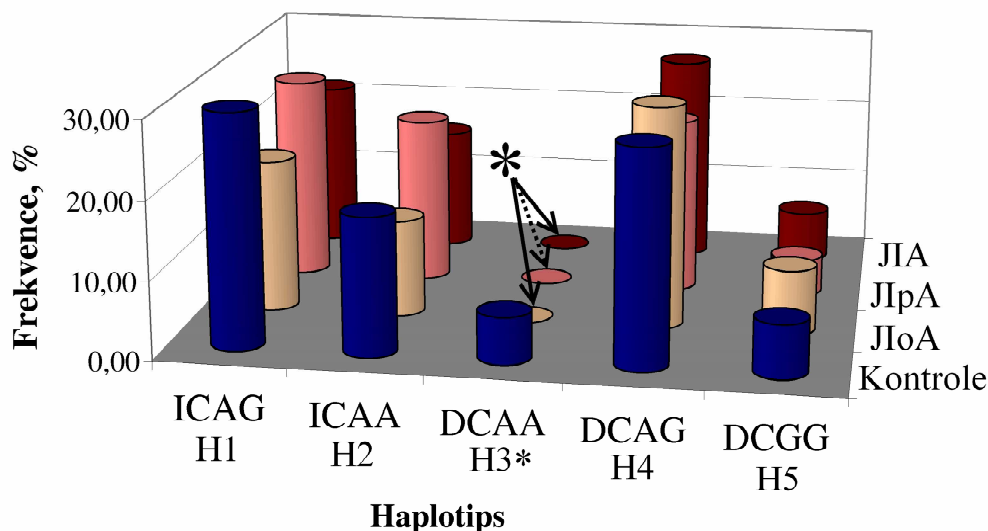
Trešā variācija, kuras genotipiem konstatējām asociāciju ar slimību, bija *PSMA3* gēna SNP c.543+138G>A (3.8. attēls C). Šis polimorfisms bija vienīgais, kuram konstatējām

saistību ne tikai ar JIA kopumā, bet arī ar poliartrīta formu ( $P_b = 9,60 \times 10^{-3}$ ). Arī šī SNP gadījumā asociāciju nenovērojām, analizējot katru genotipu atsevišķi.

### 3.3.2.3. Haplotipu frekvenču sadale un asociācijas analīze

Tā kā visus SNP genotipējām vienādā paraugu skaitā, tad nolēmām izveidot katra parauga haplotipus un aprēķināt to frekvenci gadījuma un kontroles 1 grupās. No iepriekš aprakstītajiem rezultātiem haplotipu izveidei izvēlējāmies tos SNP, kuriem konstatējām statistiski ticamu saistību ar JIA: *PSMA6* gēna SNP c.-4543\_-4544insC un c.-110C>A, *PSMC6* gēna polimorfisms c.86-104A>G un *PSMA3* gēna variācija c.543+138G>A (10. pielikums).

3.9.attēlā ir apkopoti haplotipi, kuru frekvence JIA un/vai kontroles 1 grupā bija ar sastopamību vismaz 0,05 jeb 5%. Pavisam kopā JIA un kontroles 1 grupā bija 14 haplotipi, bet piecus no tiem iekļāvām asociācijas pētījumā.



**3.9.attēls** Četru SNP lokusu biežāk sastopamo haplotipu sadale un statistiskā analīze JIA, JIoA, JIpA un kontroles 1 grupās. SNP secība haplotipu kombinācijās: *PSMA6* SNP c.-4543\_-4544insC (1.; D/I) un c.110C>A (2.), *PSMC6* SNP c.86-104A>G (3.) un *PSMA3* SNP c.543+138G>A (4.). \* atzīmētas alēles ar statistiski ticamu saistību ar JIA vai subformu ( $P < 0,05$ ). Ar raustītu līniju, ja  $P_a < 0,05$  un  $P_b > 0,05$ , ar nepārtrauktu līniju, ja  $P_a < 0,05$  un  $P_b < 0,05$ .

Visbiežāk sastopamais haplotips atšķirās starp grupām. Kontroles 1 un JIpA grupās tas bija haplotips H1, bet JIA un JIoA grupās – H4.

Haplotipam H3 asociācijas analīzē pierādījām saistību ar JIA un abām analizētajām formām pirms  $P$  vērtības korekcijas. Pēc permutācijas analīzes  $P$  vērtība saistība ar poliartrītu palielinājās virs 0,05 jeb  $5,00 \times 10^{-2}$ . Šo haplotipu nekonstatējām gadījuma grupā, tāpēc

iespējams pie lielākas JIpA grupas novērotu statistiski ticamu asociācija arī pēc koriģētās *P* vērtības. Kontroles grupā haplotips bija sastopams 6% paraugu.

Haplotips H3 sastāv no divām (c.-4543\_-4544insC un c.543+138G>A) retajām alēlēm un divām biežāk sastopamām alēlēm (c.-110C>A un c.86-104A>G).

Haplotipu ar visu četru lokusu retajām alēlēm konstatējām vienam JIA, precīzāk, JIoA, paraugam. Turklāt šis paraugs bija homozigots pēc retās alēles trijos no četriem haplotipa lokusiem, izņēmums bija SNP c.-110C>A.

### **3.4. Iespējamo funkciju bioinformātiskā analīze polimorfismiem saistītiem ar JIA un T2DM**

Asociācijas analīzē pierādījām, ka visiem pieciem HSMS mikrosatelītiem, visiem trim *PSMA6* gēna SNP, *PSMC6* polimorfismam c.86-104A>G un *PSMA3* gēna variācijai c.543+138G>A ir saistība ar 2.tipa cukura diabētu un/vai juvenīlo idiopātisko artrītu. Tāpēc visiem šiem polimorfismiem, veicām iespējamo funkciju analīzi, *in silico* apskatot polimorfismu ietekmi uz DNS un RNS sekundārajām struktūrām, ietekmi uz DNS liekumiem un uz transkripcijas faktoru, mikroRNS un/vai intronu izgriešanā un eksonu savienošānā jeb procesingā un splaisingā iesaistīto faktoru piesaistes vietām.

Analizējot RNS sekundārās struktūras, procesingā un splaisingā iesaistīto faktoru piesaistes vietu izmaiņas atkarībā no polimorfisma, ņemām vērā, vai polimorfisms atrodas reģionā, kas piedalās šajos procesos.

Visiem polimorfismiem neatradām saistību ar mikroRNS, tas nozīmē, ka polimorfismi neatrodas iespējamo mikroRNS piesaistes vietās vai reģionos, ko izmanto molekulas sintēzē.

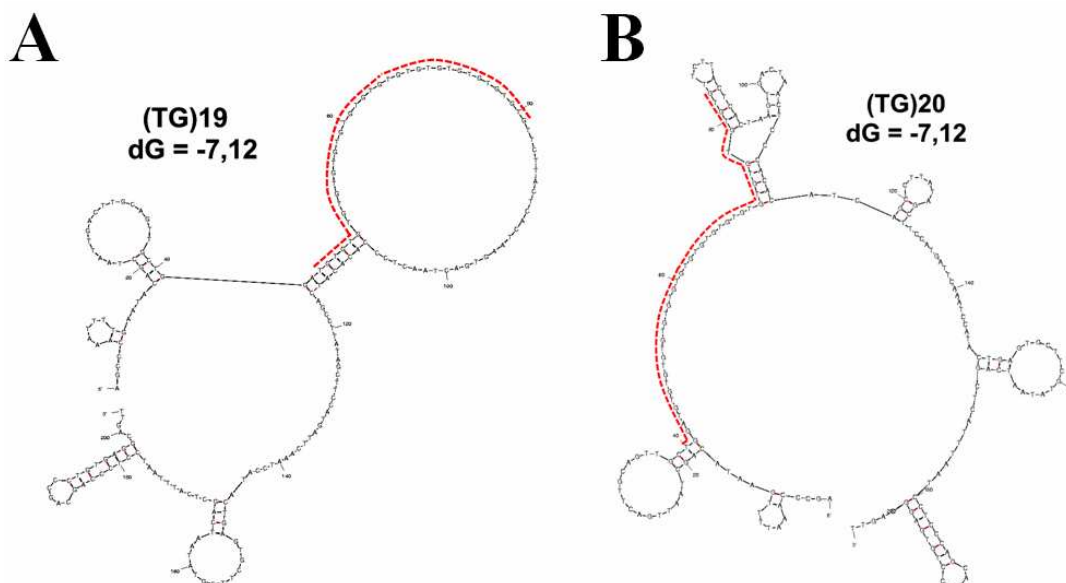
13. pielikumā ir sniegta informācija par transkripcijas faktoriem, kuriem polimorfismu ietekmē iespējams mainās piesaistes vieta DNS molekulā.

#### **3.4.1. HSMS MARĶIERI**

HSMS602 mikrosatelītam bioinformātisko analīzi veicām, vispirms mainot motīva pirmo daļu, bet otro daļu nemainot, attiecīgi – (CAA)<sub>7</sub>(A)<sub>8</sub>, (CAA)<sub>8</sub>(A)<sub>8</sub>, (CAA)<sub>10</sub>(A)<sub>8</sub>, (CAA)<sub>11</sub>(A)<sub>8</sub>. Otrā analīzē mainījām atkārtojuma otro daļu – (CAA)<sub>7</sub>(A)<sub>5-8</sub>.

Rezultāti par HSMS mikrosatelītu iespējamo funkcionālo nozīmi ir apkopoti 11. pielikuma A un B tabulās.

Analizējot HSMS marķieru ietekmi uz DNS un/vai RNS sekundārās struktūras izmaiņām, secinājām, ka SS izmaiņā ir iesaistīti trīs MS. HSMS602 marķieris, analizējot motīva (CAA)<sub>n</sub> daļu, izraisa DNS struktūras izmaiņas, kas veidojas palielinoties atkārtojuma skaitam no 8 uz 10 (alēle ar atkārtojumu (CAA)<sub>9</sub> netika izmantot analīzē, jo nekonstatējām populācijā).

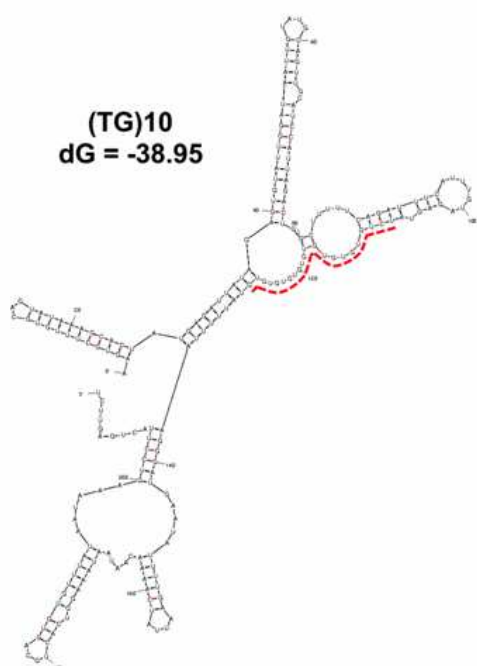
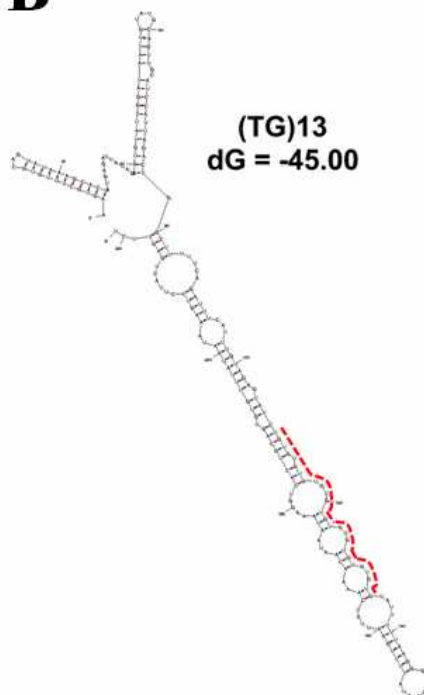


**3.10.attēls** Iespējamā HSMS006 marķiera sekvences DNS sekundārā struktūra atkarībā no atkārtojuma skaita. A – alēle ar atkārtojumu (TG)<sub>19</sub>, B – alēle ar atkārtojumu (TG)<sub>20</sub>. Ar sarkanu atzīmēts mikrosatelīts. dG – brīvā enerģija.

Otrs mikrosatelīts, kas izraisa DNS sekundārās struktūras izmaiņas ir HSMS006 (3.10. attēls). Šajā gadījumā struktūru izmaiņas novērojām, palielinot atkārtojuma skaitu no (TG)<sub>19</sub> uz (TG)<sub>20</sub>.

RNS sekundārās struktūras izmaiņās izraisa divu MS atkārtojumu palielināšana. Viens no marķieriem ir HSMS702 (3.11. attēls). Izteiktas struktūras izmaiņas notiek, ja atkārtojuma skaits tiek palielināts no (TG)<sub>11</sub> uz (TG)<sub>12</sub>. 3.11. attēlā ir attēlotas alēles (TG)<sub>10</sub> un (TG)<sub>13</sub>, kurām pierādījām saistību ar juvenilā idiopātiskā artrīta dažādām formām.

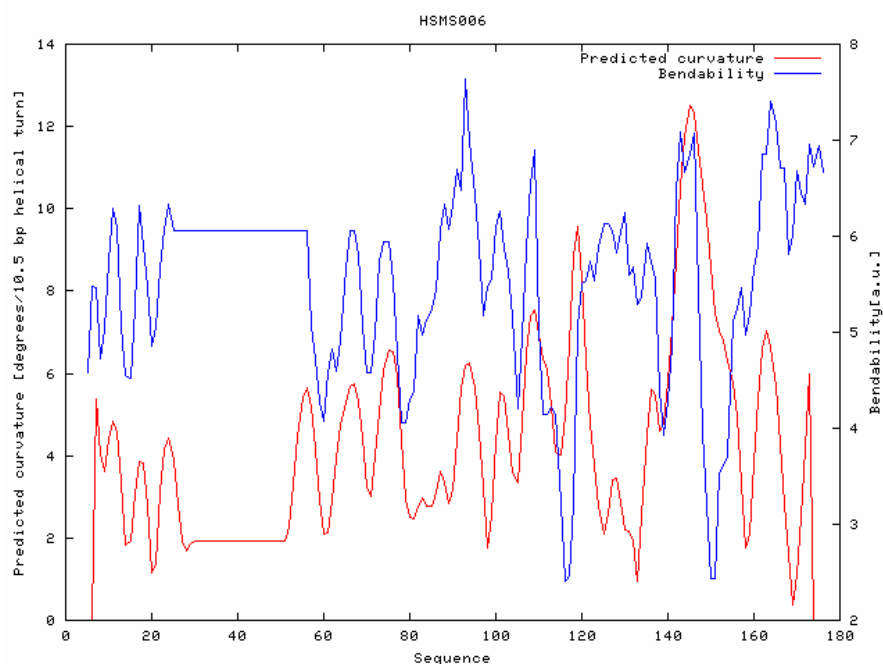
Otrs marķieris ir HSMS006, kuru atkārtojumu variācija izraisa ne tikai DNS SS maiņu, bet arī RNS struktūras. Atšķirībā no DNS, RNS gadījumā struktūras izmaiņas notiek pie garāku atkārtojuma skaita - palielinoties no (TG)<sub>21</sub> uz (TG)<sub>22</sub>.

**A****B**

**3.11.attēls** Iespējamā HSMS702 marķiera sekvenču RNS sekundārā struktūra atkarībā no atkārojamības skaita. A – alēle ar atkārojamību (TG)<sub>10</sub>. B – alēle ar atkārojamību (TG)<sub>13</sub>. Ar sarkanu atzīmēts mikrosatelīts. dG – brīvā enerģija.

Pārējos HSMS marķieru DNS un RNS sekundāro struktūru gadījumā, palielinoties atkārojamības skaitam, palielinājās konkrētas matadatas jeb cilpas diametrs.

Veicot visu HSMS marķieru iespējamo DNS liekumu analīzi, secinājām, ka, palielinot atkārojamības skaitu, palielinās sekvenču apgabals ar nemainīgu DNS molekulas leņķi. Piemērs parādīts 3.12. attēlā, kurā ir attēlots HSMS006 marķiera (atkārojamība no 24. līdz 59. pozīcijai) reģiona iespējamā DNS liekumu struktūras grafiskais attēlojums. Ar sarkano līniju ir norādīts katras sekvenču pozīcijas liekuma iespējamais leņķis. Kā var redzēt attēlā, HSMS006 marķiera pozīcijā no 24. līdz 59. liekuma leņķis paliek nemainīgs.



**3.12.attēls** Iespējamā HSMS006 marķiera reģiona DNS liekumu struktūra. Ar zilo līniju attēlots pozīcijas liekšanās spējas pakāpe, bet ar sarkano līniju – iespējamā liekuma leņķis konkrētā pozīcijā. HSMS006 mikrosatelīta pozīcija no 24. līdz 59.

Analizējot HSMS marķieru atkārtojuma skaitu ietekmi uz dažādu proteīnu piesaistes vietu maiņu (11.Pielikums B), konstatējām vairākas lietas.

Transkripcijas faktori piesaistās tikai HSMS602 mikrosatelīta atkārtojuma sekvencē. Konkrētāk palielinoties vai samazinoties (CAA) atkārtojuma skaitam mainās transkripcijas faktora FAC1.01 piesaistes vietu skaits. Atkārtojuma (CAA)<sub>10</sub> gadījumā veidojas astoņu faktoru FAC1.01 piesaistes vietas.

Pārējo marķieru gadījumā transkripcijas faktori piesaistās tikai flankējošajos galos. Palielinot atkārtojuma skaitu, palielinās attālums starp šiem faktoriem, kas var būt nozīmīgi, ja TF savstarpēji ietekmē viens otra darbību.

Tā kā visi HSMS mikrosatelīti atrodas intronos, tad tie var ietekmēt mRNS veidošanos no pre-RNS. Bioinformātikajā analizē konstatējām, ka HSMS702 un HSMS006 sekvencē veidojas alternatīva introna donora pozīcijas, bet HSMS701 un HSMS801 sekvencē – alternatīva atzarošanās punkta vietas. Turklāt, palielinot atkārtojuma skaitu minētajos marķieros, palielinās alternatīvā introna donora vai alternatīvā atzarošanās punkta vietu skaits.

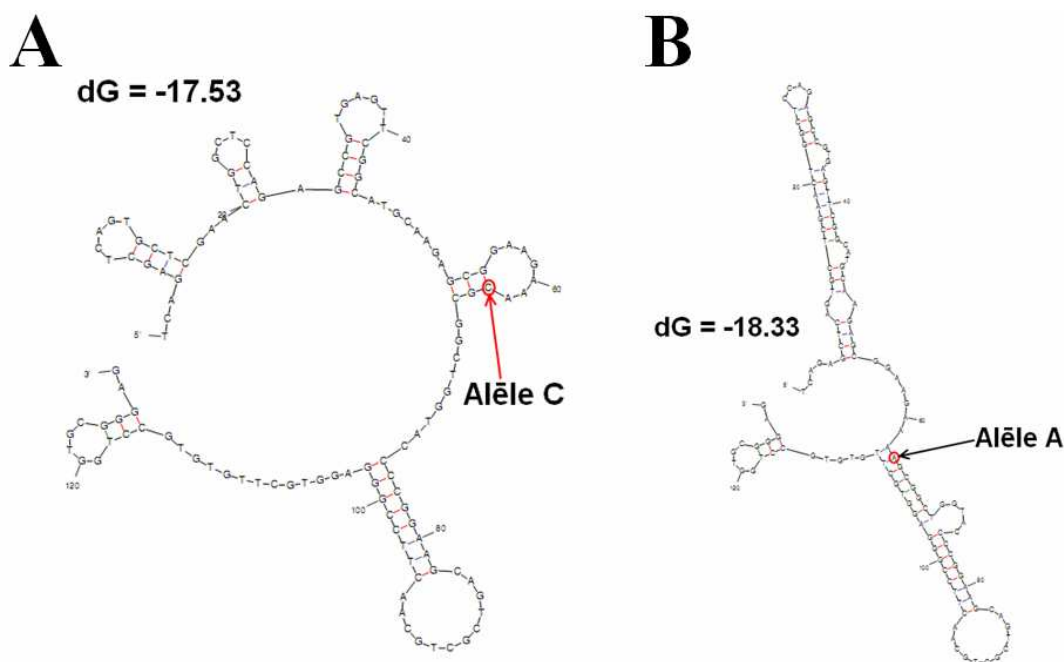
Visu MS motīvu sekvenču ir labvēlīgas dažādu cis-aktivizācijas elementu piesaistei, kuru skaits mainās atkarībā no atkārtojuma skaita.

Kopumā varam secināt, ka HSMS mikrosatelītu nozīme šūnā var būt dažāda, bet ikviena no tām būtu vēlama pārbaudīt *in vitro*.

### 3.4.2. VIENA NUKLEOTĪDA POLIMORFISMI

Rezultāti par iespējamo funkcionālo nozīmi viena nukleotīda polimorfismiem, kuriem pierādījām statistiski ticamu saistību ar kādu no analizētajām slimībām, ir apkopoti 12. pielikumā A un B tabulā.

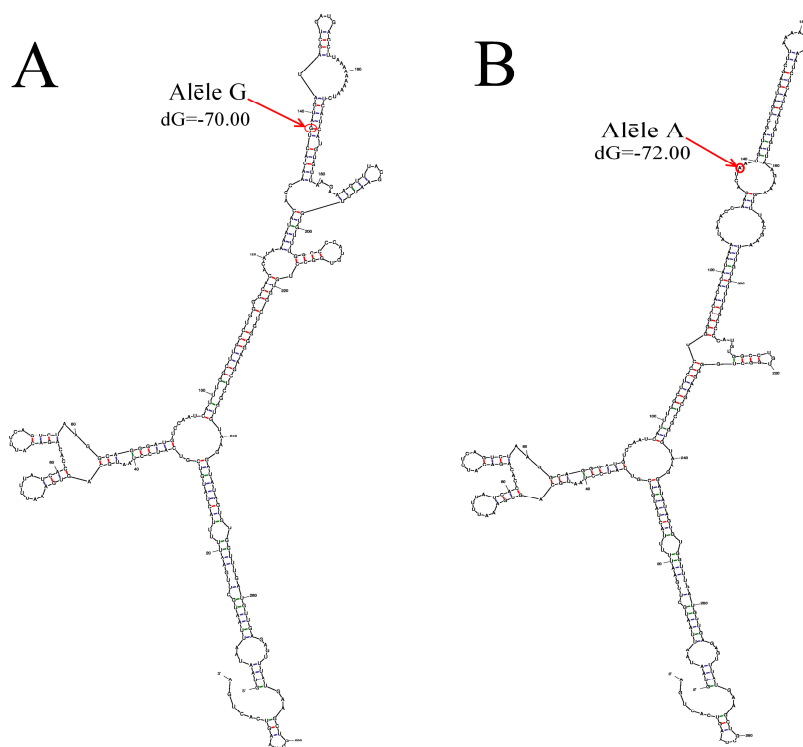
Analizējot SNP marķieru ietekmi uz DNS un/vai RNS sekundāro struktūru, secinājām, ka SS izmaiņu izraisa trīs polimorfismi, no kuriem divi ietekmē DNS struktūru, bet viens – RNS. DNS molekulas pārstrukturēšanos izraisa *PSMA6* gēna insercija/delēcija jeb c.-4543\_-4544insC un SNP lokalizēts -1 pozīcijā attiecībā pret gēna 5'UTR galu jeb c.-110C>A. Otrā SNP rajona DNS sekundārās struktūras atkarībā no alēles ir redzama 3.13. attēlā.



**3.13.attēls** DNS sekundāra struktūra atkarībā no SNP c.-110C>A alēlēm. A – SNP alēle C, B – SNP alēle A. dG – brīvā enerģija.

RNS sekundārās struktūras izmaiņas izraisa *PSMA3* gēna SNP c.543+138G>A (3.14.attēls). SNP atrodas gēna 7. introna 138. pozīcijā, tāpēc 3.14. attēlā ir parādīts introna 5'UTR līdz 298. nukleotīdam. Polimorfisma ietekmē RNS struktūra izmainās no 109. pozīcijas līdz 222. pozīcijai.



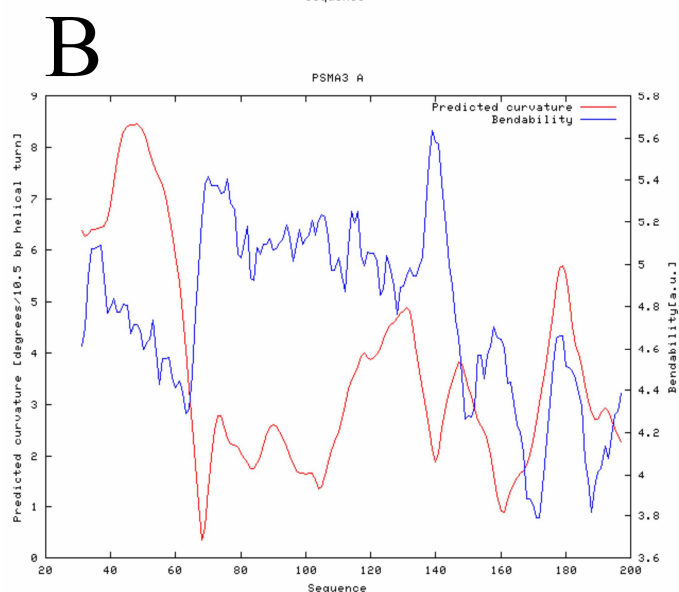
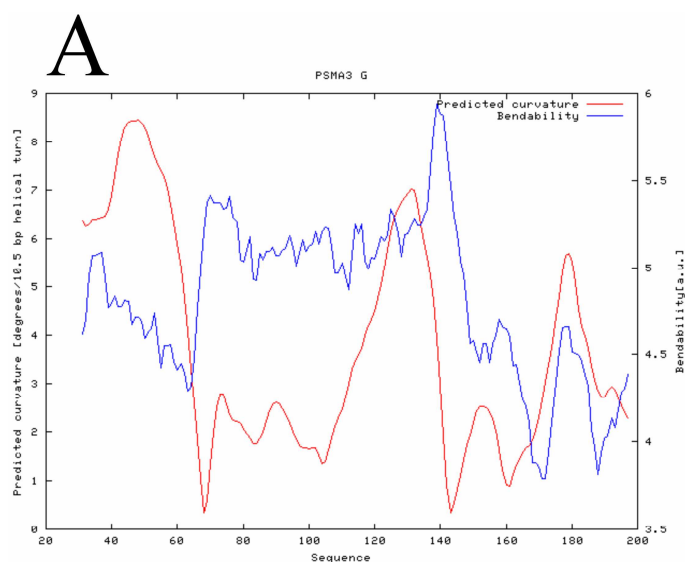


**3.14.attēls** RNS sekundāra struktūra atkarībā no SNP c.543+138G>A alēlēm. Attēlota *PSMA3* gēna 7. introna pirmie 292 nukleotīdi. A – SNP alēle G, B – SNP alēle A. dG – brīvā enerģija.

Otra iespējamā polimorfismu funkcija DNS molekulas līmenī ir DNS liekumu veidošana. Mēs konstatējam, ka DNS liekumu izmaiņā varētu būt iesaistīti divi SNP: c.-110C>A un c.543+138G>A. Otra SNP reģiona iespējamā DNS liekumu struktūras grafiskais attēlojums ir redzams 3.15. attēlā. Ar sarkano līniju ir norādīts katras sekvences pozīcijas liekuma iespējamais leņķis, bet ar zilo līniju molekulas liešanas spēja. Attēlā ir parādīts *PSMA3* gēna 7. introna sākums līdz 200. nukleotīdam, SNP ir lokalizēts 138. pozīcijā.

Pēc attēla ir redzams, ka SNP alēles G nomaina uz alēli A, izraisa reģiona iespējamā liekuma (sarkanā līnija) leņķa samazināšanos no aptuveni 7,0° uz 4,8°, kā arī liešanās spēja (zilā līnija) samazinās no aptuveni 5,1 uz 4,8 vienībām.

Polimorfisma c.-110C>A gadījumā palielinās iespējamā liekuma leņķis no aptuveni 5,8° uz aptuveni 7,0°, bet molekulas liešanās spēja samazinās no aptuveni 5,1 uz 4,9 vienībām.

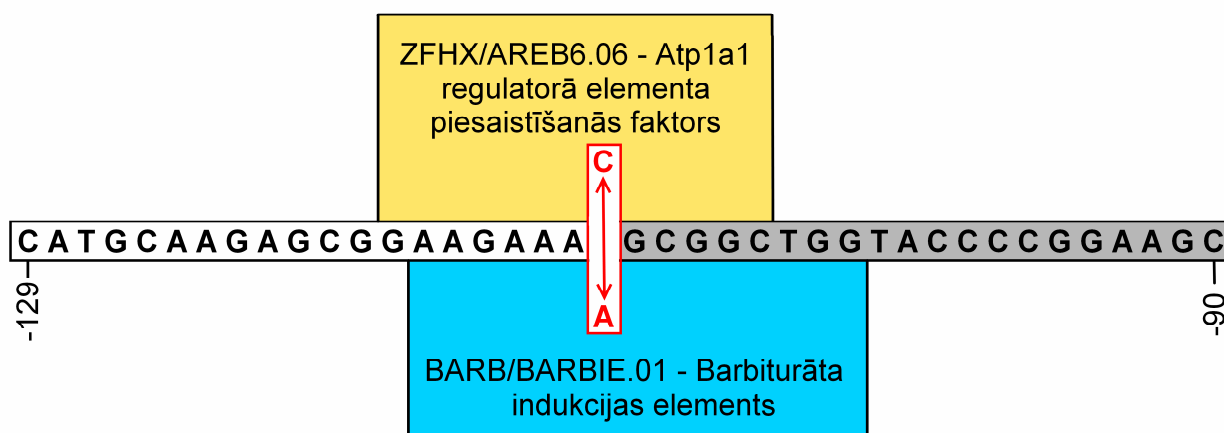


**3.15.attēls** Iespējamā DNS liekuma izmaiņa atkarībā no SNP c.543+138G>A alēlēm. A – alēle G, B – alēle A. Ar zilo līniju attēlots pozīcijas liekšanās spējas pakāpe, bet ar sarkano līniju – iespējamā liekuma leņķis konkrētā pozīcijā, SNP pozīcija analizētajā sekvencē 138.

Bioinformātiski analizējot transkripcijas faktoru un/vai alternatīvā proteīna veidošanās elementu piesaistes vietas SNP lokusu reģionos (12. pielikums B), secinājām, ka TFBS izmaiņas notiek četru polimorfismu ietekmē. *PSMA6* gēna variācijas c.-110C>A gadījumā (3.16. attēls), ja ir alēle ar nukleotīdu C, pie sekvences piesaistās ATp1a1 regulatorā elementa piesaistīšanās faktors (ZFHX/AREB6.04). Polimorfisma gadījumā šī faktora piesaistes vieta zūd, bet veidojas cita faktora (Barbiturāta indukcijas elementu bokss) piesaistes vieta.

*PSMA6* gēna polimorfisma c.-4543\_-4544insC (delC>insC) gadījumā alēļu maiņas rezultātā zūd trīs TF piesaistes vietas (LEFF/LEF1.02, CHRF/CHR.01 un HOXF/NANOG.01). *PSMC6* SNP c.86-104A>G retās alēles gadījumā veidojas NKXH/TTF1.01 piesaistes vieta. Biežās G alēles nomaiņa pret reto A alēli *PSMA3*

polimorfisma c.543+138G>A gadījumā izraisa divu TF (HOMF/BARX2.01 un HBOX/GSH2.01) piesaistes vietas zušanu un EVI1/MEL1.02 piesaistes sekvenču veidošanos.



**3.16.attēls** Iespējamā *PSMA6* gēna SNP c.-110C>A funkcionālā nozīme. Transkripcijas faktori ZFHX/AREB6.04 un BARB/BARBIE.01 piesaistās attiecīgi no -113. līdz -98. un no -116. līdz -102. pozīcijai. SNP c.-110C>A ir ierāmēts; alēļu varianti ir atzīmēti ar abpusēju bultiņu; gēna 5'UTR ir iekrāsots pelēks. Numerācija ir dota no gēna pirmā nukleotīda jeb ATG.

Saistībā ar introna izgriešanas procesā iesaistīto proteīnu piesaistes vietu maiņu analizējam *PSMC6* gēna 1.intronā lokalizēto SNP c.86-104A>G un *PSMA3* gēna 7. intronā lokalizēto c.543+138G>A polimorfismu. Pārējos neiekļāvām analizē, jo tie ir lokalizēti ārpus introniem.

Abu analizēto variāciju gadījumā zūd eksona identifikācijas elementu piesaistes vieta un veidojas vairāku intronu splaisinga enhanceru un silenceru piesaistes vietas. SNP c.86-104A>G variācijas ietekmē zūd iespējamais alternatīvā procesinga akceptora jeb introna 5'UTR atpazīšanas vieta. Kā arī alēles A gadījumā lokuss var kalpot kā alternatīvā procesinga atzarojuma vieta.

Otrais SNP c.543+138G>A atrodas alternatīva procesinga atzarošanas vietā. Variācijas gadījumā palielinās intensitāte un ticamība, ka šai vietai piesaistīsies atbilstošais proteīns.

Kopumā varam secināt, ka proteasomu gēnu viena nukleotīda polimorfismu nozīme šūnā var būt dažāda, bet ikviena no tām būtu vēlams pārbaudīt *in vitro*.

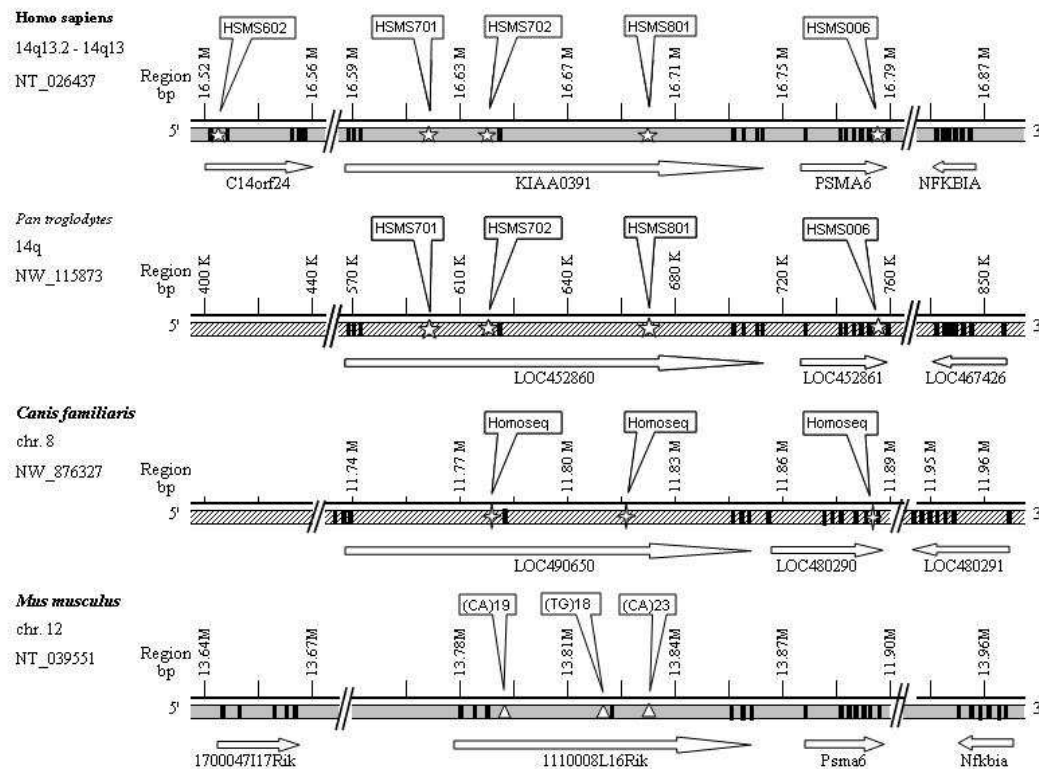
## 4. DISKUSIJA

### 4.1. 14q hromosomas polimorfismi

#### 4.1.1. 14Q13 REĢIONA MS POLIMORFISMI UN TO VARIABILITĀTE

Savā pētījumā izmantojām, iepriekš aprakstītos, lokusā 14q13 esošos piecus HSMS mikrosatelītus. HSMS006 marķieris ir lokalizēts proteasomas alfa 6.subvienības gēna sestajā intronā, bet pārējie augšup no šī gēna divos citos gēnos. *KIAA0391* gēnā ir lokalizēti trīs mikrosatelīti: HSMS801, HSMS702, HSMS701, bet pēdējais un vistālāk no *PSMA6* gēna lokalizētais HSMS marķieris ir HSMS602, kas atrodas *FAM177A1 (C14orf24)* gēna 1.intronā (Sjakste et al., 2004).

Šie mikrosatelīti atrodas reģionā ar augstu konservātismu, piemēram, 4.1.attēlā ir redzams cilvēka, šimpanzes, suņa un peles genomu attiecīgo reģionu salīdzinājums.



4.1.attēls 14q13 reģiona filoģenētiskā analīze (Sjakste et al., 2007b).

Cilvēka *PSMA6* gēnam ir sastopami gēna homologi daudzos zīdītāju organismos, piemēram, peles genomā (4.1. attēls). Šī gēna homologi ir pārsteidzoši līdzīgi ne tikai pēc funkcijas, bet arī pēc intronu un eksonu skaita, kā arī pēc sekvenču. Arī šī reģiona citiem gēniem ir homologiski gēni citos organismos. Tādejādi izveidojās konkrēta gēnu secība, kas nav ļoti mainījies evolūcijas laikā. Tas nozīmē, ka izmaiņas lokusa 14q13 jebkāda

polimorfisma veidā var būt saistīti ar fenotipiskām izmaiņām, ko arī savā darbā centāties pierādīt.

Apskatot līdz 2007. gadam veiktos populāciju asociācijas pētījumus starp HSMS marķieriem un dažādām slimībām, konstatējām, ka tāds ir tikai viens saistībā ar Greivsa slimība (Sjakste et al., 2004). Šajā pētījumā bija pierādīts, ka HSMS602, HSMS801 un HSMS006 mikrosatelītu alēles ir saistītas ar Greivsa slimību. Turklāt izredžu attiecību koeficients statistiski nozīmīgajām alēlēm bija augsts. Tas saskan ar mūsu iegūtajiem rezultātiem saistība ar citu autoimūno slimību – juvenīlo idiopātisko artrītu.

Šajā asociācijas pētījumā (Sjakste et al., 2004) netika noteikti HSMS marķieru precīzi motīvi, ko mēs izdarījām mūsu pētījumā pirmo reizi. Secinājām, ka ar NCBI datu bāzē esošo informāciju sakrīt trīs lokusu motīvi: HSMS006 un HSMS701 ir ar  $(TG)_n$  atkārtojumu, bet HSMS801 – ar  $(AC)_n$ .

Bet marķierim HSMS701 ar motīvu  $(AC)_mAT(AC)_n$  Latvijas populācijā variablā daļa ir tikai 3'gala atkārtojums jeb ir ar motīvu  $(AC)_5AT(AC)_n$ . Tātad šo MS var uzskatīt par vienkāršu dinukleotīdu atkārtojumu  $(AC)_n$ . HSMS602, iepriekš (Sjakste et al., 2004) uzskatīts par vienkāršu trinukleotīdu atkārtojumu jeb  $(CAA)_n$ , Latvijas populācijā ir ar saliktu motīvu  $(CAA)_m(A)_n$ . Būtu interesanti noskaidrot, vai HSMS701 un HSMS602 motīvi ir līdzīgi citās populācijās.

#### **4.1.2. 14Q PROTEASOMU PROTEĪNU GĒNU SNP**

Vēl viens no pētījumā sākumā uzstādītajiem uzdevumiem bija veikt pirmējo viena nukleotīda polimorfismu raksturošanu Latvijas populācijā. Šī uzdevuma ietvaros mēs analizējām 22 viena nukleotīda polimorfismus lokalizētus sešos no astoņiem 14.hromosomas proteasomu proteīnu gēniem.

Divus SNP (*PSMA6* gēna promoterī lokalizētie c.-632A>C un c.-128A>G), sekvencējot 47 Latvijas populācijas paraugus, konstatējām un analizējām pirmo reizi. Tāpēc informāciju par tiem iesniedzām Nacionālajam Biotehnoloģijas informācijas centram (NCBI, ASV), ko izmantot daudzu valstu zinātnieki. Tas nozīmē, ka esam devuši paliekošu ieguldījumu cilvēka genoma sekvencēšanā.

Pēc mūsu iegūtajiem datiem pieci polimorfismi (*PSMB5* SNP c.616C>A, *PSME1* - c.731C>A, *PSME2* polimorfisms c.181C>G, *PSMA6* SNP c.-1910C>T un c.684-822A>G) Latvijas populācijā ir monomorfiski, kas nozīmē, ka ir sastopama tikai viena no alēlēm. Apskatot informāciju par šiem pieciem lokusiem HapMap datu bāzē, secinājām, ka divi SNP ir monomorfiski arī Eiropas populācijā, bet divi SNP nav analizēti šī pētījuma ietvaros.

*PSMA6* gēna variācija c.684-822A>G ir sastopama Eiropas populācijā ar zemu frekvenci jeb 0,03. Tātad mūsu iegūtie dati apliecina šo SNP reto sastopamību Eiropas populācijā.

Astoņu variāciju (*PSME1* SNP c.312G>A, *PSME2* polimorfisms c.266A>C, *PSMA6* gēna lokalizētie c.-2486A>G, c.-632A>C, c.-128A>G, c.-91G>A un c.-43T>G, c.409+380T>G) retās alēles frekvence kontroles 1 un gadījuma grupā Latvijas populācijā bija mazāka par 0,05. Tas nozīmē, ka ticamu rezultātu iegūšanai ar šiem polimorfismiem būtu nepieciešama lielākas kolekcijas. Salīdzinot mūsu iegūtos datus par šiem SNP ar HapMap pētījuma datiem, secinājām, ka līdzīgi dati ir par visiem, izņemot *PSMA6* gēna SNP c.409+380T>G, polimorfismiem Eiropas populācijā. *PSMA6* gēna SNP c.409+380T>G pēc HapMap datiem Eiropas populācijā ir sastopams 7% gadījumos, bet pēc mūsu datiem 3 - 4% paraugos atkarībā no kolekcijas. To varētu izskaidrot ar pētījumu atšķirīgajiem paraugiem, jo HapMap pētījumā analizētajā kolekcijā ir ietverti gan Ziemeļeiropas, gan Rietumeiropas populācijas paraugi. Tātad ir aptverta vairāku valstu teritoriju populācijas, bet mūsu pētījumā ir paraugi no vienas valsts teritorijas populācijas.

Divu lokusu *PSMA6* gēna lokusu c.76+908G>A un c.410-183T>C retās alēles frekvence bija lielāka nekā 5%, bet pozitīvi genotipēto paraugu skaits bija mazāks nekā 95%. To varētu izskaidrot ar nezināma polimorfisma lokalizāciju izmantotajos praimeros, kas dažos paraugos traucē veikt veiksmīgu genotipēšanu. To varētu pārbaudīt nākotnē, sekvencējot šo SNP rajonus paraugos ar negatīvu rezultātu. Praimeru sekvencēs, pēc NCBI datu bāzē esošās informācijas, nav sastopami polimorfismi.

## **4.2. 2.tipa cukura diabēta asociācijas analīze**

Viens no pētījuma uzdevumiem bija izpētīt 14ch garā pleca lokusa 14q13 MS un proteasomu proteīnu gēnu SNP saistību ar 2.tipa cukura diabētu Latvijas populācijā. No iegūtajiem rezultātiem mēs varam secināt, ka T2DM ir statistiski ticami saistīts ar trim HSMS marķieriem Latvijas populācijā.

### **4.2.1. LOKUSA 14Q13 SAISTĪBA AR T2DM**

*PSMA6* gēnā lokalizētā mikrosatelīta HSMS006 alēli (TG)<sub>22</sub> konstatējām gandrīz divas reizes biežāk gadījuma grupā nekā kontroles 2 paraugiem (attiecīgi 15,35% un 8,54%). Turklāt indivīdam ar šādu alēles palielina saslimšanas risks par 94% (jeb OR = 1,94), salīdzinot ar vidējo slimības izplatību populācijā.

Līdzīgā pētījumā, ko veica T. Sjakstes grupa sadarbībā ar Lundas Universitātes zinātnieka Leifa Groopa grupu (Lund University, Leif Groop) Botnijas (Somijas) populācijā, arī tika atrasta T2DM saistība ar HSMS006 lokusa alēli (TG)<sub>22</sub>, kas līdzīgi kā Latvijas populācijā

biežāk bija sastopama tieši pacientu grupā. Abu pētījumu rezultāti norāda uz to, ka HSMS006 mikrosatelīts, precīzāk tā alēle (TG)<sub>22</sub>, ir saistīts ar 2. tipa cukura diabētu dažādās Eiropas populācijās. To apstiprina arī konkrētās alēles izredžu saistības koeficients, kas abās populācijās bija līdzīgs – Botnijas populācija 1,99, bet Latvijas – 1,94. Tātad šobrīd varam izteikt pieņēmumu, ka HSMS006 marķiera (TG)<sub>22</sub> alēle ir T2DM riska alēle Eiropas populācijā.

Otrs MS, kurš pēc mūsu rezultātiem ir saistīts ar 2. tipa cukura diabētu Latvijas populācijā, ir HSMS801. Šis marķieris ir lokalizēts *KIAA0391* (zināms arī kā *MRPP3* jeb mitohondrionālās RNāzes P 3. proteīna gēns (Walker, Engelke, et al., 2008)) gēna 4. intronā. HSMS801 ir visvariablākais mikrosatelīts no visiem HSMS marķieriem. Pēc mūsu rezultātiem Latvijas populācijā ir 17 alēles diapazonā no (AC)<sub>12</sub> līdz (AC)<sub>28</sub>.

Ar T2DM ir saistīta alēle (AC)<sub>24</sub> un heterozigotais genotips (AC)<sub>20/22</sub>. Alēli konstatējām divarpus reizes retāk gadījuma grupā (attiecīgi 3,88 un 9,76), bet genotipus nekonstatējām nevienam gadījuma grupas paraugam (frekvence kontroles 2 grupā 4,07%). Tātad abas formas var uzskatīt par slimību aizsargājošām. Alēle (AC)<sub>24</sub> samazina tās nēsātājam saslimšanas izredzes par 64% (jeb OR = 0,37), salīdzinot ar saslimšanas izredzēm populācijā.

Pēdējais HSMS marķieris, kurš pēc mūsu rezultātiem ir saistīts ar 2. tipa cukura diabētu Latvijas populācijā, ir HSMS602, jeb precīzāk tā alēle ar atkārojumu (CAA)<sub>8</sub> un šis alēles homozigotais genotips. Šis MS ir lokalizēts gēnā *FAM177A1*, kura funkcija nav precīzi zināma.

Alēli (CAA)<sub>8</sub> gadījuma un kontroles 2 grupā konstatējām attiecīgi ar frekvencēm 10,10% un 20,49%, bet homozigoto genotipu neatradām gadījuma grupā, lai gan kontroles 2 grupā tas bija 6,56% paraugiem. Tātad arī šīs abas formas var uzskatīt par slimību aizsargājošām. Alēles (CAA)<sub>8</sub> nēsātājam samazinās saslimšanas izredzes līdz 44% (jeb OR = 0,44), salīdzinot ar saslimšanas izredzēm populācijā. Ja personai ir divas šādas alēles, tad pēc mūsu datiem saslimšanas iespējamība ir minimāla.

Dati par pēdējiem divi MS bija atšķirīgi starp Latvijas un Botnijas populācijām (Sjakste et al., 2007b). Pirmkārt ir jāmin, ka Botnijas populācijā netika konstatēta saistība ar T2DM nevienai no HSMS801 vai HSMS602 marķieru alēlei vai genotipam. Otrkārt, HSMS801 marķiera alēle (AC)<sub>24</sub> Botnijas populācijas arī tika novērota biežāk kontroles grupā, bet ne tik izteikti kā Latvijas populācijā. Attiecīgi Botnijas populācijās T2DM grupā ar frekvenci 5,49% un kontroles grupā – 8,70%. Genotips (AC)<sub>20/22</sub> Botnijas populācijā tika konstatēts abās grupās un trīs reizes retāk tieši T2DM grupā. Treškārt, HSMS602 alēles (CAA)<sub>8</sub> rezultāti ir izteikti atšķirīgi starp populācijām. Botnijas populācijā alēle ir nedaudz biežāk

sastopama tieši gadījuma grupā (attiecīgi 11,54% un 9,89%), tomēr genotips (CAA)<sub>8</sub>/(CAA)<sub>8</sub> netika konstatēts gadījumā grupā līdzīgi kā Latvijas populācijā. Tas liek domāt, ka šis homozigotais genotips nav sastopams T2DM pacientiem, iespējams visā Eiropas populācijā.

Tātad HSMS801 un HSMS602 marķieru saistību ar 2. tipa cukura diabētu būtu jāpārbauda citās Eiropas populācijās, lai varētu runāt par to izmantošanu slimības prognozēšanā. Šobrīd noteikti varam pieņemt, ka HSMS801 un HSMS602 marķieru alēles (AC)<sub>24</sub> un (CAA)<sub>8</sub> un genotipi (AC)<sub>20/22</sub> un (CAA)<sub>8/8</sub> ir attiecīgi T2DM aizsargājošās alēles un genotipi Latvijas populācijā.

#### **4.2.2. 14Q PROTEASOMU PROTEĪNU GĒNU SAISTĪBA AR T2DM**

Asociācijas analīzē saistībā ar 2. tipa cukura diabētu iekļāvām septiņus 14. hromosomas proteasomu proteīnu gēnu polimorfismus, no kuriem visnozīmīgākos rezultātus ieguvām *PSMA6* gēna 5'UTR lokalizētajam SNP c.-8C>G. Šis polimorfisms ir lokalizēts -8 pozīcijā no gēna 1. eksona jeb pirmā ATG.

Kā riska alēli saistībā ar T2DM var uzskatīt variācijas reto alēli jeb alēli ar G nukleotīdu. Šādu secinājumu var izdarīt, pirmkārt, jo pēc alēles sadales SNP lokusa saistība ar slimību ir uz robežas ( $P \sim 0,05$ ), otrkārt, jo pēc genotipu sadales šis SNP lokuss ir saistīts ar T2DM ( $P_b = 3,81 \times 10^{-2}$ ). Alēli G novērojām gandrīz divas reizes biežāk gadījuma grupā, bet heterozigoto genotipa formu – pusotreiz biežāk tieši pacientiem. Turpretim retās alēles homozigoto formu nekonstatējām ne T2DM, ne kontroles 2 grupā. Citos Eiropas populācijas pētījumos GG genotipa frekvence ir no 0,017 (HapMap pētījumā) līdz 0,042 („*Coriel Cell Repository*” pētījumā).

Kā papildus pierādījums SNP c.-8C>G nozīmei T2DM slimības attīstībā ir septiņu SNP lokusu haplotipu analīze, kurā konstatējām divu haplotipu (H16 un H18) saistību ar 2. tipa cukura diabētu. Šie haplotipi savstarpēji atšķirās tikai ar nukleotīdu c.-8C>G SNP lokusā. Turklāt haplotips H18 ar šī SNP reto alēli G uzrādīja augstu izredžu attiecības koeficientu (OR = 4,00), kas norāda, ka šāda haplotipa nēsātāja saslimšanas iespēja palielinās četras reizes, salīdzinot ar populācijas saslimšanas biežumu.

*PSMA6* gēna polimorfisms c.-8C>G ir bieži analizēts gan populācijas pētījumos, gan saistībā ar dažādām slimībām (Ozaki et al., 2006; Sjakste et al., 2007a; Takashima et al., 2007; Barbieri et al., 2008; Banerjee et al., 2008; Bennett et al., 2008; Alsmadi et al., 2009; Banerjee et al., 2009; Freilinger et al., 2009; Hinohara et al., 2009; Honcharov et al., 2009; Lui et al., 2009; Trapina et al., 2009; Bachmann et al., 2010).

Asociācijas dati saistībā ar dažādām slimībām ir atšķirīgi. Kā piemēru var minēt pētījumus ar miokarda infarktu. Japānas populācijā saistība tika konstatēta ar augstu



statistisko ticamību (Ozaki et al., 2006), līdzīgi rezultāti tika iegūti arī Ķīnas (Lui et al., 2009) populācijā. Analizējot piecu *KIAA0391* un *PSMA6* gēnu SNP, tai skaitā c.-8C>G, haplotipu frekvences, statistiski ticama saistība ar miokarda infarktu tika pierādīta Saūda Arābijas (Alsmadi et al., 2009). Turpretim, analizējot Eiropas populāciju, precīzāk Lielbritānijas (Sjakste et al., 2007a; Bennett et al., 2008), un citu Japānas (Takashima et al., 2007) populāciju, saistība ar šo slimību netika konstatēta.

Starp starptautiski citējamiem rakstiem ir atrodams viens pētījums, kurā ir analizēta *PSMA6* gēna SNP c.-8C>G saistība ar 2. tipa cukura diabētu (Barbieri et al., 2008). Šajā pētījumā tika pierādīts, ka šis SNP ir saistīts ar miokarda infarkta attīstības palielināšanos T2DM pacientiem. Turklāt tika konstatēts, ka tieši retā alēle G palielina ubikvitīna un 20S proteasomas koncentrācijas līmeni miokarda muskuļa šūnās.

Rezultāti par šo SNP ir ļoti dažādi, īpaši analizējot dažādas populācijas (1.7.attēls; Literatūras apskata 1.4.6. apakšnodaļā), tomēr tas tiek uzskatīt par vērtīgu molekulāro marķieri, kuru iesaka pētīt saistībā ar dažādām slimībām. To varētu izskaidrot ar faktu, ka Ozaki ar kolēģiem jau pirmajā šī SNP analizē pierādīja, ka tas ir nozīmīgs tieši gēnu ekspresijā jeb precīzāk retā alēle G palielina gēna ekspresiju par 1,5 līdz 1,8 reizes, salīdzinot ar biežāk sastopamo alēli (Ozaki et al., 2006). Tādejādi SNP variācija iespējams palielina *PSMA6* proteīna sintēzi un automātiski šūnā tiek palielināts citu 20S proteasomu proteīnu sintēze (Barbieri et al., 2008; Bachmann et al., 2010).

Mūsu pētījums apliecina *PSMA6* gēna SNP c.-8C>G lomu 2.tipa cukura diabēta pataloģijā Latvijas populācijā. Turklāt šo SNP varētu nākotnē izmantot kā molekulāro marķieri šīs slimības prognozēšanā Latvijas populācijā.

### **4.3. Juvenīlā idiopātiskā artrīta asociācijas analīze**

#### **4.3.1. LOKUSA 14Q13 SAISTĪBA AR JIA**

Nākošais mūsu pētījuma uzdevums bija izpētīt saistību starp 14q mikrosatelītiem un juvenīlo idiopātisko artrītu Latvijas populācijā. Mūsu rezultāti liecina par to, ka visu piecu HSMS marķieru alēles vai genotipi ir saistīti ar JIA vai tā oligo- vai poliarttrīta formu.

Apskatot alēles un genotipus, kam pierādījām statistiski ticamu saistību ar JIA, JIoA un/vai JIpA, ir jāizdala četras grupas.

Pirmkārt, alēles un/vai genotipi, kuriem pierādījām saistību ar JIA kopumā un, sadalot paraugus pēc slimības smaguma pakāpēm (attiecīgi JIoA un JIpA grupās), arī ar abām subformām. Šajā gadījumā alēles un/vai genotipus Latvijas populācijā var izmantot, pirmkārt,

prognozējot indivīda saslimšanas iespējamību ar slimību kopumā; otrkārt, var noteikt ar kādu ticamību būs oligo- vai poliartrīta forma, bet nenosakot kura no formām tieši būs.

Otra grupa ir alēles un/vai genotipi ar statistiski ticamu saistību ar JIA kopumā, bet ne ar vienu no slimības subformām. Šīs formas var izmantot prognozējot indivīda saslimšanas iespējamību ar slimību kopumā Latvijas populācijā, bet nevar precizēt kura no septiņām slimības subformām būs indivīdam.

Trešajā un ceturtajā grupā var izdalīt alēles un/vai genotipus, kurus var izmantot, prognozējot indivīda saslimšanas iespējamību ar konkrētu slimības subformu (oligo- vai poliartrīta subformu) Latvijas populācijā. Precīzāk šīm alēlēm un genotipiem ir vai nav saistība ar JIA kopumā, bet ir statistiski ticama saistība tikai ar vienu no JIoA vai JIpA subformām.

HSMS801 gadījumā par JIA slimības aizsargājošo alēli var uzskatīt alēli ar atkārtojumu (AC)<sub>17</sub>, bet par JIoA subformas riska genotipiem var uzskatīt divus heterozigotos genotipus – (AC)<sub>20/21</sub> un (AC)<sub>22/23</sub>. Turklāt genotipu (AC)<sub>22/23</sub> nekonstatējām nevienam JIoA grupas paraugam, kā arī nevienam no pārējiem JIA paraugiem.

HSMS701 marķiera alēles ar (AC) atkārtojumu 15 un 18 reizes ir JIA riska alēles (attiecīgi OR = 15,43 un 3,16), bet alēle ar (AC) atkārtojumu 20 reizes – pret slimību aizsargājoša alēle. Alēles (AC)<sub>15</sub> un (AC)<sub>18</sub> ir arī abu subformu riska alēles, turklāt indivīdam ar kaut vienu no šīm alēlēm ir palielināta iespējamība saslimt ar poliartrīta formu nekā ar oligoartrīta formu. HSMS701 mikrosatelīta divi heterozigotie genotipi ((AC)<sub>16/19</sub> un (AC)<sub>17/19</sub>) ir juvenilā idiopātiskā artrīta riska formas, bet divi homozigotie genotipi ((AC)<sub>17/17</sub> un (AC)<sub>16/16</sub>) ir attiecīgi pret JIA un JIoA aizsargājošie genotipi.

HSMS602 mikrosatelīta alēles ar 168 un 170 bp ir attiecīgi JIA slimību aizsargājošā un riska alēle (attiecīgi OR = 0,28 un 2,40), bet alēle ar 178 bāzu pāriem ir pret JIoA aizsargājoša alēle. Saslimšanas gadījumā indivīdam gan ar 168 bp garu alēli, gan ar 170 bp garu alēli palielinās iespējamība, ka būs poliartrīta forma, nevis oligoartrīta forma. Pēc šī MS diviem homozigotajiem genotipiem (169/169 bp un 170/170 bp) varētu prognozēt JIA kopumā, bet nevarētu noteikt, kura no subformām būs.

HSMS006 marķiera gadījumā JIA slimības aizsargājošā un riska alēle ir attiecīgi (TG)<sub>19</sub> (OR = 0,73) un (TG)<sub>23</sub> (OR = 2,29), bet alēle (TG)<sub>20</sub> ir JIoA subformas riska alēle (OR = 3,83). Alēle (TG)<sub>23</sub> kopā ar alēli (TG)<sub>20</sub> veido heterozigoto genotipu, kas tā nēsātājam palielina iespējamību saslimt juvenilā idiopātisko artrītu 8,38 reizes, salīdzinot ar populāciju kopumā. Turklāt indivīdam ar šādu genotipu ticamāk būs poliartrīta (OR = 15,24) forma nekā oligoartrīta (OR = 7,62). Turpretī, ja indivīdam ir divas alēles (TG)<sub>19</sub> jeb alēles homozigotais

genotips, tad iespējamība saslimt ar oligoartrīta formu samazinās līdz 6%. Asociācijas analizē pēc genotipu sadales, konstatējām arī alēles (TG)<sub>18</sub> homozigotās formas saistību ar JIoA. Šī alēli bija vienlīdz bieži izplatīta gadījuma un kontroles 1 grupās.

Īpaši interesanti izrādījās dati par HSMS702 marķieri, ko varētu izmantot gan JIoA, gan JIpA prognozēšanā. Mēs pierādījām divu alēļu (TG)<sub>10</sub> un (TG)<sub>13</sub> saistību attiecīgi ar JIoA un JIpA. Alēle (TG)<sub>10</sub> palielina saslimšanas iespējamību ar oligoartrīta formu vairāk kā 7,5 reizes (OR = 7,67), bet alēle (TG)<sub>13</sub> palielina saslimšanas iespējamību ar poliartrīta formu vairāk nekā četras reizes (OR = 4,33). Ja indivīdam ir divas alēles (TG)<sub>10</sub> jeb alēles homozigotā formā, tad saslimšanas iespējamība ar oligoartrīta formu izteikti palielinās, jo veseliem indivīdiem šādas formas Latvijas populācijā nav.

Starptautiski citējamo literatūru arhīvā ir viens pētījums, kurā būtu analizēta HSMS marķieru saistība ar kādu no autoimūnām slimībām. Šajā pētījumā tika pierādīta HSMS602, HSM801 un HSMS006 marķieru saistība ar Greivsa slimību Latvijas populācijā (Sjakste et al., 2004).

Pirms salīdzinām mūsu pētījumā iegūtos rezultātus ar Greivsa slimības asociācijas pētījuma rezultātiem, ir nepieciešams pārveidot jeb vienādot abu pētījuma alēļu nosaukumus. Katrs pētījums ir veikts ar atšķirīgām genotipēšanas metodēm, tāpēc nav iespējams salīdzināt alēles ar vienādiem bāzu pāru garumiem. Bet tā, kā abi pētījumi ir veikti vienā populācijā, tad, salīdzinot kontroles grupu sadales, ir iespējams atrast alēles ar atbilstošiem garumiem.

Gan mūsu pētījumā, gan Greivsa slimības pētījumā statistiski ticam saistība ar slimību tika pierādīta HSMS006 alēlēm (TG)<sub>19</sub> un (TG)<sub>23</sub>. Vienīgi JIA gadījumā šīs alēles bija attiecīgi pret slimību aizsargājoša un slimības riska alēle, bet Greivsa slimības gadījumā otrādi. Alēle (TG)<sub>20</sub> abos pētījumos biežāk bija sastopama gadījuma grupā nekā kontroles, vienīgi mūsu pētījumā šī atšķirība bija statistiski ticama, bet Greivsa slimības gadījumā *P* vērtība bija uz robežas (0,07). Turklāt abu slimību asociācijas pētījumos šī alēle bija pret slimību aizsargājoša. Tātad abu pētījumu rezultāti liecina, ka HSMS006 marķieris ir saistīts ar autoimūno slimību attīstību Latvijas populācijā.

Otrs lokuss, kas uzrādīja statistiski ticamu saistību ar abām autoimūnajām slimībām, ir HSMS801. Šajā gadījumā Greivsa slimības pētījumā tika konstatētas divas riska alēles (AC)<sub>15</sub> un (AC)<sub>20</sub>, bet mūsu pētījumā saistībā ar JIA viena pret slimību aizsargājoša alēle – (AC)<sub>17</sub>. Alēle (AC)<sub>17</sub> Greivsa slimības pētījumā, līdzīgi kā mūsu pētījumā, biežāk bija sastopama kontroles grupā, kas liek domāt, ka šī alēle varētu būt ar aizsargājošu efektu arī citās autoimūnās slimībās.

Asociācijas pētījumā ar Greivsa slimību HSMS602 alēļu sadalē T.Sjakste grupa iespējams ir izveidojusi četras dažāda garuma alēļu grupas, kas atbilstu  $(CAA)_n$  motīvam. Neskatoties uz to, Greivsa slimības pētījuma gadījuma grupā ir konstatētas alēles, kas varētu atbilst 173, 174 un 175 bāzu pāriem (iespējams apvienotas zem grupas ar 174 bp) (Sjakste et al., 2004). Mēs savā pētījumā šīs alēles nekonstatējām ne gadījuma, ne kontroles grupā. Tas varētu nozīmēt, pirmkārt, ka šī alēle ir ļoti reti sastopama un, otrkārt, ka tā ir Greivsa slimības riska alēle Latvijas populācijā.

Salīdzinot Greivsa slimību asociācijas analīzes alēļu datus ar mūsu pētījuma rezultātiem par JIA kopumā, varam secināt, ka katra slimībai ir savas riska alēles, neskatoties uz kopīgajām. Bet apvienojot abu pētījumā iegūtos datus, varam apstiprināt 14q reģiona nozīmi saistībā ar autoimūnām slimībām, kas ir iepriekš postulēta (John, Worthington, 2001).

Turklāt izvērtējot mūsu pētījumā iegūtos rezultātus, HSMS mikrosatelītus varētu izmantot, lai prognozētu JIA slimības saslimšanas iespējamību bērniem Latvijas populācijā. Tas dotu iespēju ne tikai laicīgāk veikt dažādus profilaktiskos pasākumus, bet arī laicīgāk diagnosticēti slimību.

Turklāt šie marķieri ir perspektīvi pētījumos ar dažādām autoimūnām slimībām, tātad arī to prognozēšanā.

#### **4.3.2. 14Q PROTEASOMU PROTEĪNU GĒNU SAISTĪBA AR JIA**

Septiņu 14. hromosomas proteasomu proteīnu gēnu viena nukleotīda polimorfismu asociācijas pētījumā ar juvenīlo idiopātisko artrītu konstatējām, ka četri SNP (*PSMA6* gēnā lokalizētie c.-4543\_-4544insC un c.-110C>A, *PSMC6* gēna SNP c.86-104A>G un *PSMA3* gēna polimorfisms c.543+138G>A), ir saistīti ar juvenīlo idiopātisko artrītu un/vai tā oligoartrīta vai poliartrīta formām.

Analizējot iegūtos datus saistībā ar JIA, ir jāņem vērā, ja SNP ir statistiski ticami saistīts ar slimību kopumā un ar tikai vienu no tās apakštipiem, tad var uzskatīt, ka šis lokusu ir saistīts ar konkrēto slimības subformu (oligo- vai poliartrīta subformu) Latvijas populācijā, nevis ar slimību kopumā.

Tādejādi mūsu dati liecina, ka *PSMA6* gēna insercija/delēcija c.-4543\_-4544insC un SNP c.-110C>A, kā arī *PSMC6* gēna 1. intronā lokalizētais SNP c.86-104A>G ir saistīti ar juvenīlo idiopātisko oligoartrītu, bet *PSMA3* gēna 7.introna SNP c.543+138G>A – ar juvenīlo idiopātisko poliartrītu.

*PSMA6* gēna polimorfismu c.-4543\_-4544insC un c.-110C>A saistību ar JIA pierādījām, analizējot lokusu pēc alēļu un/vai pēc genotipa sadales. Insercijas/delēcijas gadījumā saistību ar kopējo slimības grupu nekonstatējām, bet pēc genotipu sadales lokusa

saistība ar JIoA ir uz robežas. Kā arī asociācijas analīzē neuzrādījās saistība starp kādu no konkrētajām alēlēm vai genotipiem un JIoA, tomēr par riska alēli var uzskatīt alēli bez insercijas jeb ar delēciju. To var pamatot ar faktu, ka tikai JIoA grupā alēle ar delēciju bija biežāk sastopamā alēle atšķirībā no pārējām trim grupām (kontrolē1, JIA kopumā un JIpA). Kā arī šīs alēles homozigoto formu JIoA grupā sastapām pusotriem biežāk nekā kontroles grupā.

SNP c.-110C>A gadījumā statistiski ticamu saistību konstatējām arī ar JIA kopumā. Arī šī polimorfisma gadījumā asociācijas analīzē neuzrādījās saistība starp kādu no konkrētajām alēlēm vai genotipiem un JIoA. Tomēr apskatot iegūtos datus, varam secināt, ka riska alēle ir retāk sastopamā alēle ar nukleotīdu A. Juvenīlā idiopātiskā oligoartrīta grupā šo alēli un heterozigoto genotipu konstatējām gandrīz divas reizes biežāk nekā kontroles 1 grupā, bet retās alēles homozigotais genotips nebija nevienam paraugam abās grupās.

Trešais polimorfisms, kuram pierādījām statistiski ticamu saistību ar oligoartrīta formu, ir *PSMC6* gēna 1. intronā lokalizētais SNP c.86-104A>G. Šīs variācijas gadījumā, pirmkārt, saistību pierādījām arī ar juvenīlo idiopātisko artrītu kopumā. Otrkārt, analizējot atsevišķi katras alēles saistību ar slimību, konstatējām, ka riska alēle ir retā alēle ar nukleotīdu G. Šīs alēles nēsātājam palielinās iespējamība saslimt ar juvenīlo idiopātisko oligoartrītu 2,43 reizes, salīdzinot ar populāciju kopumā. Kā papildus pierādījums alēles nozīmei ir fakts, ka tās homozigotais genotips JIoA grupā ir gandrīz trīs reizes biežāk sastopams nekā kontroles 1 grupā.

Ceturtās variācijas (*PSMA3* gēna SNP c.543+138G>A) gadījumā statistiski ticamu saistību konstatējām ar poliartrīta subformu, analizējot genotipu sadali lokusā. Salīdzinot ar iepriekš trim aprakstītajiem SNP, šis polimorfisms ir pret slimību aizsargājošs. Kā aizsargājošo alēlei var izdalīt reto alēli ar nukleotīdu A. Precīzāk par aizsargājošo faktoru būtu jāuzskata gan heterozigotais, gan retās alēles homozigotais genotips. Heterozigotā formā JIpA grupā bija sastopama 1,7 reizes retāk nekā kontroles grupā, bet retās alēles homozigotā forma – 2,64 reizes retāk.

Apskatot pieejamās publikācijas, secinājām, ka no visiem četriem SNP iepriekš analizēti ir tikai *PSMA6* gēna polimorfisms c.-110C>A. Šis SNP ir pētīts saistībā ar miokarda infarktu Lielbritānijas populācijā (Sjakste et al., 2007a). Pārējās variācijas saistībā ar dažādām slimībām nav analizēti, tāpēc nolēmām salīdzināt mūsu iegūtos datus par visiem četriem SNP Latvijas populācijā un HapMap pētījuma datus Ziemeļ- un Rietumeiropas populācijas 60 paraugos.

Pirmkārt, secinājām, ka insercija/delēcija c.-4543\_-4544insC nav pētīta ne tikai HapMap paraugos. Kā arī NCBI datu bāzē pie šī SNP apraksta ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=5807825](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=5807825)) nav informācija par variācijas analīzi citos pētījumos.

*PSMA3* gēna SNP gadījumā mūsu dati bija līdzīgi ar HapMap datiem pēc alēļu sadales, bet pēc genotipa frekvencēm novērojām atšķirības. Kontroles 1 grupā atšķīrās retās alēles homozigotās un heterozigotās formas frekvences, salīdzinot ar HapMap datiem, bet gadījuma grupā atšķīrās biežās alēles homozigotā un heterozigotā genotipa frekvences. Tas norāda, ka pēc alēļu sadales mūsu populācija ir līdzīga ar Ziemeļ- un Rietumeiropas populācijai, bet genotipu sadale Latvijas populācijā ir atšķirīga.

Interesantus rezultātus ieguvām, salīdzinot *PSMC6* gēna polimorfismu. Iesākumā ir jāsaprot, ka pēc HapMap datiem SNP c.86-104A>G un c.86-46C>T savstarpēji ir saistīti pēc nelīdzsvaroto saistības (*linkage disequilibrium* jeb LD) ar koeficientu  $r^2 = 1,00$ . Latvijas populācijā šis koeficients bija 0,74 (kontrolai 1) un no 0,83 JIpA grupā līdz 0,93 JIoA grupā gadījuma kolekcijai. Domājams, ka šo atšķirību varētu izskaidrot ar dažādo paraugu skaitu: HapMap pētījumā šie lokusi bija analizēti 60 paraugos, bet mūsu pētījumā gandrīz trīs reizes vairāk kontroles grupā un vairāk nekā divas reizes vairāk gadījuma kolekcijā.

Lokusā c.86-104A>G Latvijas populācijas paraugos (kontroles 1 grupā) konstatējām vairāk paraugus ar reto alēli, salīdzinot ar HapMap datiem (0,009), un vairāk heterozigoto paraugu gadījuma grupā.

Visvairāk dažādos pētījumos analizēts ir *PSMA6* gēna variācija c.-110C>A. Apskatot dažādu pētījumu datus (HapMap un “*Coriell Cell Repository*” pētījumi; NCBI datu bāze) konstatējām, ka tajos, tāpat kā mūsu asociācijas pētījumā ar JIA, nav atrasts paraugs ar reto alēļu homozigoto formu. Šo genotipu neatradām arī mūsu pētījumā saistībā ar 2. tipa cukura diabētu. Abos iepriekšminētajos ārzemju pētījumos, kas ir veikti Eiropas populācijās, c.-110C>A retās alēles frekvence ir salīdzinoši zemāka nekā mūsu kontroles 1 grupā.

Mūsu pētījums apliecina lielo nozīmi analizēt dažādus molekulāros marķierus dažādās populācijās, jo katrai populācijai ir savas īpatnības. Turklāt analizēt jauktas populācijas rezultāti var būt neviennozīmīgi.

Otrkārt, līdzīgi kā pēc MS pētījumā, varam atkārtoti apstiprināt iepriekš postulēto 14q nozīmi saistībā ar autoimūnām slimībām (John, Worthington, 2001).

Turklāt, apvienojot abus JIA asociācijas pētījumus, varam secināt, ka lokuss 14q ir saistīts ar konkrēto slimību, uz ko norāda augstā saistība ar HSMS mikrosatelītiem ( $P < 0,01$  un  $OR > 2,00$  vai  $< 0,05$ ). Turklāt izvēlētie un analizētie SNP daļēji apstiprina šo secinājumu.

Iespējams ir nepieciešams papildus citu viena nukleotīda polimorfismu analīze vai visu proteasomu proteīnu gēnu vairāku polimorfismu haplotipu analīze

#### **4.4. Ar slimībām asociēto polimorfismu iespējamā funkcionālā nozīme**

Kā pēdējo mūsu pētījuma uzdevumu, mēs izvirzījām veikt *in silico* analīzi statistiski nozīmīgajiem 14.hromosomas garā pleca polimorfismiem. Šo uzdevumu sev uzstādījām, jo uzskatām, ka vairāku polimorfismu pētījumi ar tūkstošs paraugiem būtu jāaizstāj ar pētījumiem, kuros katram perspektīvajam polimorfismam veiktu rūpīgu funkciju analīzi.

Mūsdienas liela loma tiek pievērsta tieši molekulāro marķieru nozīmei šūnā. Tāpēc pirms dažādiem pētījumiem *in vitro* ir jāveic bioinformātiskā jeb *in silico* analīze, lai noteiktu kāda varētu būt polimorfisma loma organismā, iespējams arī gēna ekspresijā.

Pētījumā izvērtējam polimorfismu sekvenču iespējamo funkcionālo nozīmi, analizējot *in silico* transkripcijas faktoru piesaistes vietu un sekundāro struktūru izmaiņas atkarībā no mikrosatelītu atkārtojumu skaita vai nukleotīdu nomaiņas. Veicām arī DNS liekumu un procesingā un splaisingā iesaistīto proteīnu piesaistes vietu prognozēšanu *in silico* katra polimorfiska reģionam.

Analizējot RNS sekundārā struktūras un procesinga iesaistīto faktoru piesaistes vietu izmaiņas atkarībā no polimorfisma, ņemām vērā, vai polimorfisms atrodas reģionā, kas piedalās šajos procesos.

Šajā pētījuma daļā iekļāvām polimorfismus, kuriem asociācijas analīzēs pierādījām saistību ar kādu no pataloģijām, precīzāk *in silico* analizējām visus piecus HSMS mikrosatelītu, visu trīs *PSMA6* gēna SNP, *PSMC6* polimorfismu c.86-104A>G un *PSMA3* gēna variāciju c.543+138G>A.

##### **4.4.1. HSMS MARĶIERU IESPĒJAMĀ FUNKCIONĀLĀ NOZĪME**

Iespējamais HSMS marķieru ietekme uz 2. tipa cukura diabēta un/vai juvenīlo idiopātisko artrītu varētu būt dažādi, tai skaitā ietekme uz konkrēto gēnu ekspresiju.

Šobrīd varam skaidri runāt tikai par *PSMA6* gēnā lokalizēto HSMS marķieri, jo pilnīgi skaidri ir zināma tikai šī gēna darbība. Par *KIAA0391* gēnu ir zināms, ka tas sintezē mitohondrionālo RNāzes P 3.proteīnu, bet nav zināms pilnīga šī proteīna darbība cilvēka mitohondrijā (Walker, Engelke, et al., 2008). Bet par *FAM177A1 (C14orf24)* gēna darbību pagaidām informācijas nav.

Ir pierādīts, ka MS var ietekmēt gēnu ekspresijas līmeni, ietekmējot sailenseru vai enhanseru elementu piesaisti vai aktivitāti (Bassuny et al., 2003), izraisot vai ietekmējot

alternatīvo procesingu un tā regulāciju (Horikawa et al., 2000; Hui et al., 2005), kā arī mikrosatelīti intronos var ietekmēt multifaktoriālo slimību etioloģiju un patoģenēzi (Sjakste et al., 2004). Tāpat ir pierādīts, ka MS var ietekmēt gēna ekspresiju caur kodola matriksa asociācijām (Boulikas, 1993) vai mRNS stabilitātes regulāciju (Lee et al., 2004). MS ir arī svarīgi insulatoru (Filippova et al., 2001), sailenseru (Rothenburg et al., 2001a, b) un enhanseru (Bassuny et al., 2003) komponenti.

Ir zināms, ka daži mikrosatelīti veido piesaistes vietas kodola matriksam (Boulikas, 1993), bet citos gadījumos veido audu specifiskas piesaistes vietas matriksam (Lenartowski, Goc, 2002). Vienkārši MS atkārtojumi var kļūt par pamatu sarežģītām DNS telpiskām struktūrām ar lielu funkcionālu nozīmi (Tolstonog et al., 2000; 2005; Li et al., 2003; Rothenburg et al., 2001a,b). MS arī ir iesaistīti rekombinācijā un atjaunošanā (Wang, Vasquez, 2007; Chin et al., 2007).

Tātad iespējams, ka HSMS006 ietekmē izmainās *PSMA6* gēna ekspresija un tātad var mainīties proteasomu darbības intensitātes šūnā. *PSMA6* proteīns ir viens no proteasomas proteīniem, kas atbild par degradējamo substrātu atpazīšanas pirms degradācijas.

Piemēram, T2DM gadījumā IRS-1 un IRS-2 proteīnu, kas ir nozīmīgi insulīna rezistences mehānismā (Golab et al., 2004) un cukura diabēta attīstībā (Rhodes, 2005), daudzumu šūnā regulē tieši proteasomas, kas nodrošina šo proteīnu degradāciju (Rome et al., 2004; Rhodes, 2005). Tādejādi, izmainoties proteasomas darbībai gan uz aktīvāku degradāciju, gan tieši otrādi uz pasīvāku, var mainīties IRS-1 un IRS-2 proteīni degradācija intensitāte, un sekas var būt cukura diabēta attīstība.

JIA gadījumā HSMS marķierus izvēlējamies, balstoties uz hipotētisku defektīvo proteasomālo proteīnu degradācijas nozīmi slimības patoģenēzē. Ir pierādīta vairāku autoimūno slimību asociācija ar "imūno"-proteasomu proteīnu LMP2 un LMP7 gēniem. Dažos pētījumos ir informācija par šo gēnu polimorfismu asociāciju ar 1. tipa diabētu (Deng et al., 1995), pieaugušo reimatoīdo artrītu (Maksymowych et al., 1995), juvenīlo idiopātisko artrītu (Pryhuber et al., 1996) un Greivsa slimību (Heward et al., 1999). Uzskata, ka ar patoloģiju asociētās alēles noved līdz LMP proteīnu nepietiekamai produkcijai un proteasomu funkcijas traucējumiem, kuri, piemēram, izpaužas kā transkripcijas faktora NFκB veidošanās samazinājums, un šūnu uzņēmības palielināšanās pret audzēju nekrozes faktoru alfa (Hayashi, Faustman, 2001). Ja šī hipotēze ir pareiza, mēs varam proponēt hipotēzes par to, ka jebkāda proteasomu proteīna nepietiekama ekspresija varētu izraisīt tādu pašu efektu.

Runājot par konkrētu HSMS marķieru lomu šūnā, mēs *in silico* pierādījām, ka visi pieci HSMS marķieri ir iesaistīti procesinga elementu piesaistē. Tai skaitā, HSMS702 un HSMS006



mikrosatelītu atkārtojuma sekvencē veidojas alternatīva introna donora pozīcijas, bet HSMS701 un HSMS801 sekvencē – alternatīva atzarošanās punkta vietas. Tātad iespējams, ka tieši šo MS ietekmē veidojas izmainīti proteīni.

Papildus šai funkcijai HSMS006 marķiera atkārtojumu skaita maiņa ietekmē DNS un RNS sekundāro struktūru izmaiņas, bet HSMS602 un HSMS702 mikrosatelīti – attiecīgi DNS un RNS SS.

No visu piecu HSMS marķieru atkārtojumu sekvencēm, tieši HSMS602 reģions ir atbilstošs specifisku transkripcijas faktora (FAC1.01) piesaistei. Šī TF funkcija vēl nav pilnīgi skaidra, bet ir zināms, ka tas palielina kaspāzes-3 proteīna aktivitāti (Strachan et al., 2005).

Šie bioinformātiskās analīzes rezultāti apstiprina izteiktās hipotēzes par mikrosatelītu nozīmi tieši gēnu ekspresijā.

#### **4.4.2. SNP MARĶIERU IESPĒJAMĀ FUNKCIONĀLĀ NOZĪME**

Bioinformātiski analizējot trīs *PSMA6* gēna SNP, *PSMC6* polimorfismu c.86-104A>G un *PSMA3* gēna variāciju c.543+138G>A, mēs ieguvām dažādus rezultātus. Mēs konstatējām, ka SNP var būt iesaistīti gan DNS vai RNS sekundārās struktūras izmaiņās, gan saistīti ar dažādu proteīnu piesaistu vietu maiņu.

*In silico* analīzē mēs neatradām informāciju par šo variāciju lomu tieši mikroRNS piesaistē. Ko varētu izskaidrota ar to, ka visi mūsu analizētie polimorfismi ir lokalizēti intronos vai gēna 5'UTR galā, bet pēc izteiktajām hipotēzēm mikroRNS piesaistās gēna 3'UTR galam (Furer et al., 2010).

Pēc mūsu domām starp gēniem vai intronos lokalizētie SNP varētu spēlēti lielu lomu tieši gēnu ekspresijā (Villard, 2004; Kurmangaliyev, Gelfand, 2008; Tazi et al., 2009), līdzīgi kā tas ir ar intronos lokalizētajiem mikrosatelītiem. Protams, ka ir nepieciešams papildu padziļināta analīzes, tai skaitā *in vitro*, par SNP iespējamo nozīmi gēnu ekspresijā.

To pierāda literatūras dati par *PSMA6* gēnā lokalizēto polimorfismu c.-8C>G. Neskatoties uz to, ka bioinformātiskajā analīzē nekonstatējām šī SNP iespējamo funkcionālo nozīmi, tai skaitā ietekmi uz transkripcijas faktoru piesaistes vietas maiņu, Ozaki ar kolēģiem, izmantojot vairākus modeļus, ir konstatējis, ka c.-8C>G SNP retā alēle G palielina gēna ekspresiju par 1,5 līdz 1,8 reizes, salīdzinot ar biežāk sastopamo alēli. Tam par iemeslu varētu būt specifiska nezinām kodola faktora saistīšanās pie DNS alēles G gadījumā (Ozaki et al., 2006; Bachmann et al., 2010).

Pārējie divi *PSMA6* gēna SNP (c.-4543\_-4544insC un c.-110C>A) ir lokalizēti pirms gēna sākuma un abi ir saistīti tieši ar JI<sub>o</sub>A. Turklāt abu polimorfismu rezultātā var mainīties DNS sekundārās struktūras un vairāku TF piesaistes vietas.

Par c.-4543\_-4544insC tiešo ietekmi uz gēnu ekspresiju vēl ir jāveic papildus analīzes, bet *PSMA6* gēna SNP c.-110C>A ir lokalizēts -1 pozīcijā no gēna 5'UTR gala, tātad no transkripcijas sākuma punkta. Tāpēc varam teikt, ka šis SNP ir lokalizēts reģionā, pie kura piesaistās pamata transkripcijas faktori gēna ekspresijas sākumā. To apliecina arī fakts, ka neatkarīgi no polimorfisma alēļu nomaiņas šajā pozīcijā veidojas modulis ETSF\_SP1F\_2, kura funkcija ir regulēts gēna ekspresiju, sadarbojoties faktoram SP1 un limfu/meloīdu faktoram PU.1.

Bioinformātiskā analīze atklāja, ka pie c.-110C>A reģiona piesaistās divu atbalsta cinka pirkstu homedomēna transkripcijas faktora saimes *Atp1a1* regulatorā elementa piesaistīšanās faktors (*ZFHX/AREB6.04*), ja ir alēle ar nukleotīdu C. Šis TF pie sekvences GTTT[C/G] saistās ar N-termināla cinka pirkstu klasteri, nodrošinot augstāku piesaisti pie DNS, un tad darbojas kā silencers gēna transkripcijas procesā (Ikeda, Kawakami, 1995). Retās alēles gadījumā veidojas barbiturāta veicinoša elementa transkripcijas faktors, kas arī parasti darbojas negatīvi uz proteīna ekspresiju (Liang et al., 1995). Šo transkripciju faktoru nomaiņa varētu izraisīt dažādas saiknes ar citiem transkripcijas faktoriem, kas ir lokalizēti šajā rajonā.

Turklāt c.-110C>A ietekmē iespējams mainās arī DNS specifisko liekumu veidošanās. Retās alēles gadījumā palielinās iespējamā liekuma leņķis un samazinās molekulas spēja liekties, kas var ietekmēt gan DNS SS veidošanos, gan dažādu proteīnu, piemēram, TF, piesaisti.

*In silico* analīze uzrādīja, ka *PSMC6* gēnā lokalizētā SNP c.86-104A>G retās alēles gadījumā veidojas vairogdziedzera transkripcijas faktora-1 (TTF-1) piesaistes vieta. Šī faktora kodējošais gēns atrodas 14. hromosomā (Boggaram, 2009) un paša faktora piesaiste DNS ir atkarīga no proteasomu inhibitora (Das, Boggaram, 2007). Ir zināms, ka žurku parafolikulārās C šūnās palielināts TTF-1 proteīna līmenis, ko izraisa samazināts  $Ca^{2+}$  līmenis, samazina  $Ca^{2+}$  jutīgā receptora gēna ekspresijas līmenī (Suzuki et al., 1998) un aktivizēt kalcitonīna gēna transkripcija vairogdziedzera C šūnas (Suzuki et al., 2007).

*PSMA3* gēna SNP c c.543+138G>A bioinformātiskās analīzes rezultātā konstatējām, ka šis variācijas ietekmē mainās ne tikai RNS sekundārā struktūra, bet arī mainās aktivitāte ar kādu proteīns piesaistītos introna atzarošanās punktam. Šīs izmaiņas varētu būt viens no cēloņiem proteīna divām izoformām, kas savstarpēji atšķiras ar septiņām aminoskābēm lokalizētām tuvāk 3'UTR galam.

Šie bioinformātiskās analīzes rezultāti apstiprina izteiktās hipotēzes par polimorfismu iespējamo lomu tieši gēnu ekspresijā, kā arī paver jaunu un vēl neizpētītu zinātnes jomu, kas raisa daudzu jaunus, interesantus jautājumus.

## 4.5. Rezultātu kopsavilkums

Apkopojot mūsu rezultātus un pārskatot kopējo projekta shēmu, mēs varam izdalīt galvenos darba posmus. 1. 14. Hromosomas garais plecs tika izvēlēts asociācijas analīzei, ņemot vērā proteasomu un attiecīgi proteasomu proteīnu gēnu iespējamo lomu interesējošo patoloģiju patoģenēzē. 2. Asociācijas analīzei atbilstoši polimorfismi tika izvēlēti un analizēti. 3. Balstoties uz mikrosatelītu analīzi, mēs konstatējām lokusa 14q augstu saistību ar JIA un mazāk nozīmīgu, bet tomēr statistiski ticamu saistību ar T2DM. Iespējams, mikrosatelīti paši par sevi nav saistīti ar patoloģiju, tomēr rezultāti skaidri parāda lokusa saistību ar analizētajām slimībām. 4. Dati par SNP saistību ar izvēlētajām patoloģijām apstiprina saistības ar slimībām, lai gan saistība ir mazāka salīdzinot ar mikrosatelītu analīzi. Iespējams, ka mēs neesam izvēlējusies izšķirošos SNP. 5. ņemot vērā, ka proteasomas sastāv no vairākām subvienībām, tās funkcijas izteiktāka modifikācija drīzāk varētu notikt, ja ir izmainīta struktūra vai ekspresija vairākām subvienībām vienlaicīgi. Tas norāda uz haplotipu analīzes nozīmīgumu, lai precīzi raksturotu atrastās asociācijas. Tāpēc būtu vēlams visa genoma proteasomu proteīnu gēnu polimorfismu kombināciju analīze. 14q hromosomas polimorfismu haplotipu analīzē nekonstatējām izteiktu asociāciju, lai gan mūsu rezultāti norāda uz to, ka šāds pētījums ir perspektīvs. Tāpēc uzskatam, ka ir jāturpina proteasomu proteīnu gēnu polimorfismu asociācijas analīzes ar dažādām patoloģijām.

## SECINĀJUMI

1. 14.hromosomas garajā plecā ir lokalizēti astoņi proteasomu proteīnu gēni (*PSMB5*, *PSMB11*, *PSME1*, *PSME2*, *PSMA6*, *PSMC6*, *PSMA4* un *PSMC1*) un ar tiem saistīti 391 viena nukleotīda polimorfismi un vismaz 30 mikrosatelīti. Genotipēšanai izvēlēti 22 SNP un piecus MS lokalizētus sešos proteasomu proteīnu gēnos vai to rajonos.
2. HSMS602, HSMS701, HSMS702, HSMS801 un HSMS006 mikrosatelīti, kā arī *PSMB5* gēna SNP c.70C>T, *PSMA6* gēna SNP c.-4543\_-4544insC, c.-110C>A un c.-8C>G, *PSMC6* gēna polimorfisms c.86-104A>G un c.86-46C>T un c.543+138G>A lokalizēts *PSMA3* gēnā ir piemēroti asociācijas pētījumiem Latvijas populācijā.
3. Mūsu rezultāti apstiprina HSMS702, HSMS801 un HSMS006 marķieru motīvus: attiecīgi (TG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> un (TG)<sub>n</sub>. Pirmo reizi ir precīzi noteikti MS HSMS701 un HSMS602 motīvi. Marķierim HSMS701 ir nevis salikts motīvs (AC)<sub>5</sub>AT(AC)<sub>n</sub>, bet vienkāršs - (AC)<sub>n</sub>, bet HSMS602 ir ar saliktu motīvu (CAA)<sub>m</sub>(A)<sub>n</sub>, nevis vienkāršu (CAA)<sub>n</sub>.
4. Ir veikta atlasīto molekulāro marķieru (lokusa 14q13 piecu HSMS mikrosatelītu un 22 14q hromosomas proteasomu proteīnu gēnu SNP) alēļu sadales Latvijas populācijā.  
HSMS602 molekulārajam marķierim Latvijas populācijā ir sastopamas vismaz astoņas dažādu motīvu alēles ar kopējo motīvu (CAA)<sub>7-8;10-11</sub>(A)<sub>5-8</sub>, HSMS701 marķierim – deviņas alēles diapozonā (AC)<sub>14-22</sub>, HSMS006 marķieriem – desmit alēles (TG)<sub>16-25</sub>, bet HSMS702 un HSMS801 – attiecīgi 16 un 17 ((TG)<sub>10-25</sub> un (AC)<sub>12-28</sub>).  
No atlasītajiem 22 viena nukleotīda polimorfismiem pieci SNP Latvijas populācijā bija monomorfiski, astoņu variāciju retās alēles frekvence bija reti sastopamas (mazāka par 0.05), bet divu genotipēšana nebija veiksmīga vismaz 95% paraugu. Septiņi 14.hromosomas proteasomu proteīnu gēnu viena nukleotīda polimorfismus: *PSMB5* gēna SNP c.70C>T, *PSMA6* gēna SNP c.-4543\_-4544insC, c.-110C>A un c.-8C>G, *PSMC6* gēna polimorfisms c.86-104A>G un c.86-46C>T un c.543+138G>A lokalizēts *PSMA3* gēnā, pēc pirmējās genotipēšanas atzinām par perspektīviem asociācijas analīzei (frekvence >0,05 un genotipēšana pozitīva vismaz 95% paraugos) ar 2.tipa cukura diabētu un juvenīlo idiopātisko artrītu.
5. Mūsu rezultāti pierāda, ka ar 2.tipa cukura diabētu Latvijas populācijā ir saistīta ar *PSMA6* gēna SNP c.-8C>G un HSMS602, HSMS801 un HSMS006 mikrosatelītiem, ko

varētu izmanto kā molekulāros marķierus 2.tipa cukura diabēta prognozēšanā Latvijas populācijā.

HSMS006 alēle (TG)<sub>22</sub> ir saistīta ar 2.tipa cukura diabētu. HSMS602 alēle (CAA)<sub>8</sub> un HSMS801 alēle (AC)<sub>24</sub> ir pret T2DM aizsargājošas alēles (attiecīgi  $P_b = 1,08 \times 10^{-2}$ , OR = 0,44 un  $P_a = 3,00 \times 10^{-2}$ , OR = 0,37). Kā arī ir identificēta saistība starp HSMS602 genotipu (CAA)<sub>8</sub>/(CAA)<sub>8</sub> un HSMS801 genotipu (CA)<sub>20</sub>/(CA)<sub>22</sub> un T2DM.

Proteasomas proteīna *PSMA6* gēna viena nukleotīda polimorfisma c.-8C>G alēļu sadale ir saistīts ar T2DM Latvijas populācijā uz statistikas ticamības robežas un slimības riska alēle iespējams ir ar nukleotīdu G.

6. Ir identificēts jauns JIA uzņēmības lokuss genoma reģionā 14q13.2, ietverot *KIAA0391* un *PSMA6* gēnus, kā arī ir pierādīts, ka 14.hromosomas proteasomu proteīnu gēnu SNP un lokusā 14q13.2 esošos HSMS mikrosatelītus varētu izmantot kā molekulāros marķierus juvenīlā idiopātiskā artrīta un tā oligoartrīta vai poliartrīta formu prognozēšanā Latvijas populācijā.

Ar JIA kopumā Latvijas populācijā ir saistītas HSMS006 alēles (TG)<sub>19</sub> un (TG)<sub>23</sub>, HSMS701 alēles (AC)<sub>15</sub>, (AC)<sub>18</sub> un (AC)<sub>20</sub>, HSMS602 alēles ar 168 un 170 bp un HSMS801 alēle (AC)<sub>17</sub>, kā arī HSMS006 genotips (TG)<sub>20/23</sub>, HSMS701 genotipi (AC)<sub>16/19</sub>, (AC)<sub>17/19</sub> un (AC)<sub>17/17</sub> un HSMS602 169 un 170 bp alēļu homozigotie genotipi.

HSMS006 alēle (TG)<sub>20</sub> un homozigotie genotipi (TG)<sub>18/18</sub> un (TG)<sub>19/19</sub>, HSMS702 alēle (TG)<sub>10</sub> un tās homozigotais genotips, HSMS701 homozigotais (AC)<sub>16/16</sub> genotips un HSMS801 divi heterozigotie genotipi (AC)<sub>20/21</sub> un (AC)<sub>22/23</sub> ir saistīta ar JIoA, bet ne poliartrītu. Turpretim HSMS702 marķiera alēle (TG)<sub>13</sub> ir saistīta ar JIpA, bet ne oligoartrītu.

*PSMA6* gēna SNPc.-4543\_-4544insC un c.-110C>A alēļu un genotipu sadale ir saistīta ar JIoA, bet *PSMA3* gēna SNP c.543-138G>A genotipu sadale - ar JIpA.

*PSMC6* gēna 1. introna SNP c.86-104A>G alēļu sadale ir saistīta gan ar JIA kopumā gan ar tā subtipu oligoartrītu (attiecīgi  $P_b = 1,00 \times 10^{-3}$  un  $P_b = 1,00 \times 10^{-4}$ ). Retās alēles frekvence ir augstāka gan JIA, gan JIoA grupās, salīdzinot ar kontroli, un tā ir oligoartrīta attīstības riska alēle (OR = 2,43).

7. *In silico* analīze rezultāti pierāda, ka gan lokusa 14q13.2 mikrosatelītu, gan 14q proteasomas proteīnu SNP, asociētiem ar JIA un/vai T2DM, sekvenču izmaiņas iespējams ietekmē transkripcijas faktoru piesaistes vietu un/vai DNS vai transkripta

sekundārās struktūras modifikācijas, kā arī iespējams ietekmē DNS liekšanās spējas un/vai procesingā un splaisingā iesaistīto proteīnu piesaistes vietu maiņu.

Visu piecu HSMS marķieru sekvences ir piemērotas procesinga cis-elementu piesaistei, kā arī HSMS702 un HSMS006 atkārtojuma sekvencē veidojas alternatīva introna donora pozīcijas, bet HSMS701 un HSMS801 sekvencē – alternatīva atzarošanās punkta vietas. HSMS006 marķiera atkārtojumu skaita maiņa ietekmē DNS un RNS sekundāro struktūru izmaiņā, bet HSMS602 un HSMS702 mikrosatelīti – attiecīgi DNS un RNS SS. HSMS602 reģions ir atbilstošs specifisku transkripciju faktora (FAC1.01) piesaistei.

Divu *PSMA6* gēna SNP (c.-4543\_-4544insC un c.-110C>A) alēļu nomaina ietekmē transkripcijas faktoru piesaistes vietu un DNS sekundārās struktūras izmaiņas, kā arī c.-110C>A ietekmē DNS molekulas liekumu. Pie *PSMC6* polimorfisma c.86-104A>G reģiona sekvences retā alēle gadījumā piesaistītas TF, vairāki procesinga cis-aktivizācijas elementi un zūd introna atzarošanas proteīna piesaistes vieta. *PSMA3* gēna SNP c.543+138G>A reģions sekvenca ir atbilstoša vairāku transkripcijas faktoru, introna atzarošanas proteīna un procesinga cis-aktivizācijas elementi piesaistei atkarībā no alēles, kā arī polimorfismu ietekmē samazinās DNS liekuma leņķis.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cance Treat Rev.* 2003; 39(s1): 3 - 9.
2. Albers HM, Kurreeman FA, Stoeken - Rijsbergen G, Brinkman DM, Kamphuis SS, van Rossum MA, Girschick HJ, Wouters C, Saurenmann RK, Hoppenreijns E, Slagboom P, Houwing - Duistermaat JJ, Verduijn W, Huizinga TW, Ten Cate R, Toes RE, Schilham MW. Association of the autoimmunity locus 4q27 with juvenile idiopathic arthritis, *Arthritis Rheum.* 2009; 60(3): 901 - 904.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition, New York: Garland Science, 2002; 615 - 659 pp.
4. Alsaeid K, Haider MZ, Ayoub EM. Angiotensin converting enzyme gene insertion - deletion polymorphism is associated with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2003; 30(12): 2705 - 2709.
5. Alsmadi O, Muiya P, Khalak H, Al - Saud H, Meyer BF, Al - Mohanna F, Alshahid M, Dzimiri N Haplotypes encompassing the KIAA0391 and PSMA6 gene cluster confer a genetic link for myocardial infarction and coronary artery disease. *Ann Hum Genet.* 2009; 73(Pt 5): 475 - 483.
6. Andersen G, Burgdorf KS, Sparsø T, Borch - Johnsen K, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O AHSB tag single nucleotide polymorphisms associate with type 2 diabetes and dyslipidemia: studies of metabolic traits in 7,683 white Danish subjects. *Diabetes.* 2008; 57(5): 1427 - 1432.
7. Ansell BM. Prognosis in juvenile arthritis. *Adv Exp Med Biol.* 1999; 455: 27 - 33.
8. Ardlie KG, Lunetta KL, Seislstad M. Testing for population subdivision and association in four case - control studies. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 304 - 311.
9. Bachmann HS, Novotny J, Sixt S, Liebisch P, Frey UH, Dührsen U, Siffert W, Nüchel H. The G Allele of the PSMA6 -8C>G polymorphism is associated with poor outcome in multiple myeloma independently of circulating proteasome serum levels. *Eur J Haematol.* 2010; In press.
10. Baier LJ, Permana PA, Yang X, Pratley RE, Hanson RL, Shen GQ, Mott D, Knowler WC, Cox NJ, Horikawa Y, Oda N, Bell GI, Bogardus C. A calpain - 10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000; 106(7): R69 - R73.
11. Banerjee I, Gupta V, Ahmed T, Faizaan M, Agarwal P, Ganesh S. Inflammatory system gene polymorphism and the risk of stroke: a case - control study in an Indian population. *Brain Res Bull.* 2008; 75(1): 158 - 165.
12. Banerjee I, Pandey U, Hasan OM, Parihar R, Tripathi V, Ganesh S. Association between inflammatory gene polymorphisms and coronary artery disease in an Indian population. *J Thromb Thrombolysis.* 2009; 27(1): 88 - 94.

13. Barbieri M, Marfella R, Rizzo MR, Boccardi V, Siniscalchi M, Schiattarella C, Siciliano S, Lemme P, Paolisso G. The -8 UTR C/G polymorphism of PSMA6 gene is associated with susceptibility to myocardial infarction in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2008; 201(1): 117 - 23.
14. Baroudi T, Bouhaha R, Moran-Moguel C, Sanchez-Corona J, Ben Maiz H, Kammoun Abid H, Benammar-Elgaaied A. Association of the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin - converting enzyme gene with type 2 diabetes in two ethnic groups of Jerba Island in Tunisia. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2009; 10(1): 35 - 40.
15. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21(2): 263 – 265.
16. Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, Kuromaru R, Kohno H, Matsuura N, Hara T. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics*. 2003; 55(3): 149 - 156.
17. le Beau MM, Ito C, Cogswell P, Espinosa R 3rd, Fernald AA, Baldwin AS JR. Chromosomal localization of the genes encoding the p50/p105 subunits of NF-kappaB (NFKB2) and the I kappa B/MAD-3 (NFKBI) inhibitor of NF-kappaB to 4q24 and 14q13, respectively. *Genomics*. 1992; 14(2): 529 - 531.
18. Behrens EM, Finkel TH, Bradfield JP, Kim CE, Linton L, Casalunovo T, Frackelton EC, Santa E, Otieno FG, Glessner JT, Chiavacci RM, Grant SFA, Hakonarson H, The Children's Hospital of Philadelphia Philadelphia. Association of the TRAF1–C5 locus on chromosome 9 with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008; 58(7): 2206 - 2207. .
19. Bennett DA, Xu P, Clarke R, Zondervan K, Parish S, Palmer A, Cardon L, Peto R, Lathrop M, Collins R; International Study of Infarct Survival Collaborators. The exon 1 - 8C/G SNP in the PSMA6 gene contributes only a small amount to the burden of myocardial infarction in 6946 cases and 2720 controls from a United Kingdom population. *Eur J Hum Genet*. 2008; 16(4): 480 - 486.
20. Berkun Y, Padeh S. Environmental factors and the geoepidemiology of juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev*. 2010, 9: A319 - A324.
21. Bey F, Silva Pereira I, Coux O, Viegas - Pequignot E, Recillas Targa F, Nothwang HG, Dutrillaux B, Scherrer K. The prosomal RNA - binding protein p27K is a member of the alpha - type human prosomal gene family. *Mol Gen Genet*. 1993; 237: 291 - 297.
22. Boggaram V. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TITF1) gene regulation in the lung. *Clin Sci*. 2009; 116: 27 - 35.
23. Bossé Y, Bacot F, Montpetit A, Rung J, Qu HQ, Engert JC, Polychronakos C, Hudson TJ, Froguel P, Sladek R, Desrosiers M. Identification of susceptibility genes for complex diseases using pooling - based genome - wide association scans. *Hum Genet*. 2009; 125(3): 305 - 318.



24. Bouhaha R, Meyre D, Kamoun HA, Ennafaa H, Vaillant E, Sassi R, Baroudi T, Vatin V, Froguel P, Elgaaied A, Vaxillaire M. Effect of ENPP1/PC-1 - K121Q and PPARgamma - Pro12Ala polymorphisms on the genetic susceptibility to T2D in the Tunisian population. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 81(3): 278 - 283.
25. Boulikas T. Nature of DNA sequences at the attachment regions of genes to the nuclear matrix. *J Cell Biochem.* 1993; 52: 14 - 22.
26. Brooks P, Murray RZ, Mason GGF, Hendil KB, Rivetta AJ. Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 2000; 352: 611 - 615.
27. Bukulmez H, Fife M, Tsoras M, Thompson SD, Twine NA, Woo P, Olson JM, Elston RC, Glass DN, Colbert RA. Tapasin gene polymorphism in systemic onset juvenile rheumatoid arthritis: a family - based case - control study. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7(2): R285 - R290.
28. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* 2005; 21: 2933 - 2942.
29. Chin JY, Schleifman EB, Glazer PM. Repair and recombination induced by triple helix DNA. *Front Biosci.* 2007; 12: 4288 - 4297.
30. Choquet H, Cavalcanti - Proença C, Lecoœur C, Dina C, Cauchi S, Vaxillaire M, Hadjadj S, Horber F, Potoczna N, Charpentier G, Ruiz J, Hercberg S, Maimaitiming S, Roussel R, Boehnke M, Jackson AU, Patsch W, Krempler F, Voight BF, Altshuler D, Groop L, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Stefansson K, Balkau B, Froguel P, Meyre D. The T -381C SNP in BNP gene may be modestly associated with type 2 diabetes: an updated meta-analysis in 49 279 subjects. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(13): 2495 - 2501.
31. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. The ubiquitin - mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem Suppl.* 2000; 34: 40 - 51.
32. Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(1): 79 - 87.
33. Cimaz R, Cazalis MA, Reynaud C, Gerloni V, Zulian F, Biggioggero M, Martini G, Pontikaki I, Fantini F, Mouglin B, Miossec P. *IL1* and *TNF* gene polymorphisms in patients with juvenile idiopathic arthritis treated with TNF inhibitors. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(7): 900 - 904. .
34. Cinek O, Hradsky O, Ahmedov G, Slavcev A, Kolouskova S, Kulich M, Sumnik Z. No independent role of the 1123 G>C and +2740 A>G variants in the association of *PTPN22* with type 1 diabetes and juvenile idiopathic arthritis in two Caucasian populations. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 76: 297 - 303.
35. Cinek O, Vavrincová P, Striz I, Drevínek P, Sedláková P, Vavrínek J, Slavcev A. Association of single nucleotide polymorphisms within cytokine genes with juvenile idiopathic arthritis in the Czech population. *J Rheumatol.* 2004; 31(6): 1206 - 1210.

36. Collins GA, Tansey WP. The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev.* 2006; 16(2): 197 - 202.
37. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann Rev Biochem.* 1996; 65: 801 - 847.
38. Dahlmann B Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem* 2007; 8 Suppl 1: S3.
39. Daly LE, Bourke GJ. Interpretation and uses of medical statistics Oxford: Blackwell Science: 2000; 166 - 173.
40. Das A, Boggaram V. Proteasome dysfunction inhibits surfactant protein gene expression in lung epithelial cells: mechanism of inhibition of SP - B gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 292: L74 - L84.
41. Date Y, Seki N, Kamizono S, Higuchi T, Hirata T, Miyata K, Ohkuni M, Tatsuzawa O, Yokota S, Joo K, Ueda K, Sasazuki T, Kimura A, Itoh K, Kato H. Identification of a genetic risk factor for systemic juvenile rheumatoid arthritis in the 5'-flanking region of the TNFalpha gene and *HLA* genes. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(12): 2577 - 2582.
42. Day TG, Ramanan AV, Hinks A, Lamb R, Packham J, Wise C, Punaro M, Donn RP. Autoinflammatory genes and susceptibility to psoriatic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(7): 2142 - 2146.
43. DeMartino GN, Orth K, McCullough ML, Lee LW, Munn TZ, Moomaw CR, Dawson PA, Slaughter CA. The primary structures of four subunits of the human, high molecular weight proteinase, macropain (proteasome), are distinct but homologous. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1079: 29 - 38.
44. Deng GY, Muir A, Maclaren NK, She JX. Association of *LMP2* and *LMP7* genes within the major histocompatibility complex with insulin - dependent diabetes mellitus: population and family studies. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(2): 528 - 534.
45. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(9): e67.
46. Donn R, Lunt M, Alourfi Z, Zeggini E, Lamb R, the British Paediatric Rheumatology Study Group, De Benedetti F, Thomson W, Jury F, Meazza C, Ray D. A Functional Promoter Haplotype of Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Linked and Associated With Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(5): 1604 - 1610.
47. Donn R, Zeggini E, Alourfi Z, Lunt M, De Benedetti F, Stevens A, Meazza C, Shelley E, the British Paediatric Rheumatology Study Group, Thomson W, Lamb R, Ollier WER, Ray D. Mutation Screening of the Macrophage Migration Inhibitory Factor Gene: Positive Association of a Functional Polymorphism of Macrophage Migration Inhibitory Factor With Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(9): 2402 - 2409.
48. Donn RP, Barrett JH, Ollier WER, Farhan A, Thomson W, Stopford A, Pepper L, Shelley E, Davies N, the British Paediatric Rheumatology Study Group. Cytokine Gene

- Polymorphisms and Susceptibility to Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(4): 802 - 810. .
49. Duesing K, Charpentier G, Marre M, Tichet J, Hercberg S, Balkau B, Froguel P, Gibson F. Evaluating the association of common PBX1 variants with type 2 diabetes. *BMC Med Genet.* 2008a; 9: 14.
  50. Duesing K, Fatemifar G, Charpentier G, Marre M, Tichet J, Hercberg S, Balkau B, Froguel P, Gibson F. Strong association of common variants in the CDKN2A/CDKN2B region with type 2 diabetes in French Europeans. *Diabetologia.* 2008b; 51(5): 821 - 826.
  51. Eastell T, BSPAR Study Group, Hinks A, Thomson W, SNPs in the FOXP3 gene region show no association with Juvenile Idiopathic Arthritis in a UK Caucasian population. *Rheumatology (Oxford).* 2007; 46(8): 1263 - 1265.
  52. Egerer T, Martinez - Gamboa L, Dankof A, Stuhlmüller B, Dörner T, Krenn V, Egerer K, Rudolph PE, Burmester GR, Feist E. Tissue - specific up-regulation of the proteasome subunit beta5i (LMP7) in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(5): 1501 - 1508.
  53. Eike MC, Nordang GB, Karlsen TH, Boberg KM, Vatn MH; IBSEN study group, Dahl-Jørgensen K, Rønningen KS, Joner G, Flatø B, Bergquist A, Thorsby E, Førre O, Kvien TK, Undlien DE, Lie BA. The FCRL3 -169T>C polymorphism is associated with rheumatoid arthritis and shows suggestive evidence of involvement with juvenile idiopathic arthritis in a Scandinavian panel of autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67(9): 1287 - 1291.
  54. Ezzidi I, Mtiraoui N, Cauchi S, Vaillant E, Dechaume A, Chaieb M, Kacem M, Almawi WY, Froguel P, Mahjoub T, Vaxillaire M. Contribution of type 2 diabetes associated loci in the Arabic population from Tunisia: a case - control study. *BMC Med Genet.* 2009; 10: 33.
  55. Fawcett J, Hamel FG, Bennett RG, Vajo Z, Duckworth WC. Insulin and analogue effects on protein degradation in different cell types Dissociation between binding and activity. *J Biol Chem.* 2001; 276: 11552 - 11558.
  56. Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, Stock CJW, Samuel JM, Thomson W, Mack LF, Lewis CM, Woo P. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8: R148.
  57. Filippova GN, Thienes CP, Penn BH, Cho DH, Hu YJ, Moore JM, Klesert TR, Lobanenko VV, Tapscott SJ. CTCF - binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation - sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Gen.* 2001; 28, 335 - 343.
  58. Flynt AS, Lai EC. Biological principles of microRNA - mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(11): 831 - 842.
  59. Freeman H, Cox RD. Type - 2 diabetes: a cocktail of genetic discovery. *Hum Mol Genet.* 2006; 15 (2): R202 – R209.
  60. Freilinger T, Bevan S, Ripke S, Gschwendtner A, Lichtner P, Müller - Myhsok B, Wichmann HE, Markus HS, Meitinger T, Dichgans M. Genetic variation in the

- lymphotoxin - alpha pathway and the risk of ischemic stroke in European populations. *Stroke*. 2009; 40(3): 970 - 972.
61. Fricke B, Heink S, Steffen J, Kloetzel PM, Krüger E. The proteasome maturation protein POMP facilitates major steps of 20S proteasome formation at the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 2007; 8(12): 1170 - 1175.
  62. Furer V, Greenberg JD, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 2010; In press.
  63. Gabriel SE, Michaud K Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11(3): 229.
  64. Galanakis E, Kofteridis D, Stratigi K, Petraki E, Vazgiourakis V, Fragouli E, Mamoulakis D, Boumpas DT, Goulielmos GN. Intron 4 a/b polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with both type 1 and type 2 diabetes in a genetically homogeneous population. *Hum Immunol*. 2008; 69(4 - 5): 279 - 283.
  65. Gaulton KJ, Willer CJ, Li Y, Scott LJ, Conneely KN, Jackson AU, Duren WL, Chines PS, Narisu N, Bonnycastle LL, Luo J, Tong M, Sprau AG, Pugh EW, Doheny KF, Valle TT, Abecasis GR, Tuomilehto J, Bergman RN, Collins FS, Boehnke M, Mohlke KL. Comprehensive association study of type 2 diabetes and related quantitative traits with 222 candidate genes. *Diabetes*. 2008; 57(11): 3136 - 3144. .
  66. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P, Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow - up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003; 26(11): 3160 - 3167.
  67. Gergely P Jr, Pazár B, Nagy ZB, Gombos T, Rajczy K, Balogh Z, Orbán I, Sevcic K, Poór G. Structural polymorphisms in the mannose - binding lectin gene are associated with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2009; 36(4): 843 - 847.
  68. Glass DN, Giannini EH. Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait. *Arthritis Rheum*. 1999; 42(11): 2261 - 2268.
  69. Glickman MH, Raveh D. Proteasome plasticity. *FEBS Lett*. 2005; 579(15): 3214 - 3223.
  70. Golab J, Bauer T M, Daniel V, Naujokat C. Role of the ubiquitin – proteasome pathway in the diagnosis of human diseases. *Clin Chim Acta*. 2005; 340: 27 - 40.
  71. Goldstein BJ. 2002. Insulin Resistance as the Core Defect in Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Cardiol*. 2002; 90: 3G - 10G.
  72. Gomes AV, Zong C, Ping P. Protein degradation by the 26S proteasome system in the normal and stressed myocardium. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8(9 - 10): 1677 - 1691.
  73. Gragnoli C, Cronsell J. PSMD9 gene variants within NIDDM2 may rarely contribute to type 2 diabetes. *J Cell Physiol*. 2007; 212(3): 568 - 571.

74. Griffiths - Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *NAR*. 2008; 36(Database Issue): D154 - D158.
75. Groettrup M, Kirk CJ, Basler M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(1): 73 - 78.
76. Groll M, Huber R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35(3): 606 - 616.
77. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001; 4(1): 9.
78. Hayashi T, Faustman DL. Selected Contribution: Association of gender - related LMP2 inactivation with autoimmune pathogenesis. *J Appl Physiol*. 2001; 91: 2804 - 2815.
79. Heilig R, Eckenberg R, Petit JL, Fonknechten N, Da Silva C, Cattolico L, Levy M, Barbe V, de Berardinis V, Ureta - Vidal A, Pelletier E., Vico V, Anthouard V, Rowen L, Madan A, Qin S, Sun H, Du H, Pepin K, Artiguenave F, Robert C, Cruaud C, Bruls T, Jaillon O, Friedlander L, Samson G, Brottier P, Cure S, Segurens B, Aniere F, Samain S, Crespeau H, Abbasi N, Aiach N, Boscus D, Dickhoff R, Dors M, Dubois I, Friedman C, Gouyvenoux M, James R, Madan A, Mairey - Estrada B, Mangenot S, Martins N, Menard M, Oztas S, Ratcliffe A, Shaffer T, Trask B, Vacherie B, Bellemere C, Belser C, Besnard - Gonnet M, Bartol - Mavel D, Boutard M, Briez - Silla S, Combette S, Dufosse - Laurent V, Ferron C, Lechaplais C, Louesse C, Muselet D, Magdelenat G, Pateau E., Petit E., Sirvain - Trukniewicz P, Trybou A, Vega - Czarny N, Bataille E., Bluet E., Bordelais I, Dubois M, Dumont C, GueriNT, Haffray S, Hammadi R, Muanga J, Pellouin V, Robert D, Wunderle E., Gauguet G, Roy A, Sainte - Marthe L, Verdier J, Verdier - Discala C, Hillier L, Fulton L, McPherson J, Matsuda F, Wilson R, Scarpelli C, Gyapay G, Wincker P, Saurin W, Quetier F, Waterston R, Hood L, Weissenbach J. The DNA sequence and analysis of human chromosome 14. *Nature*. 2003; 6923(421): 601 - 607.
80. Hertel JK, Johansson S, Raeder H, Midthjell K, Lyssenko V, Groop L, Molven A, Njølstad PR. Genetic analysis of recently identified type 2 diabetes loci in 1,638 unselected patients with type 2 diabetes and 1,858 control participants from a Norwegian population - based cohort (the HUNT study). *Diabetologia*. 2008; 51(6): 971 - 977.
81. Heward JM, Allahabadia A, Sheppard MC, Barnett AH, Franklyn JA, Gough SC. Association of the large multifunctional proteasome (LMP2) gene with Graves' disease is a result of linkage disequilibrium with the HLA haplotype DRB1\*0304 - DQB1\*02 - DQA1\*0501. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999; 51(1): 115 - 118.
82. Hinks A, Barton A, Shephard N, Eyre S, Bowes J, Cargill M, Wang E, Ke X, Kennedy GC, John S, Worthington J, Thomson W, British Society of Paediatric and Adolescent Rheumatology Study Group. Identification of a novel susceptibility locus for juvenile idiopathic arthritis by genome - wide association analysis. *Arthritis Rheum*. 2009c; 60(1): 258 - 263.

83. Hinks A, Barton S, John CE, Griffiths M, Silman A, Bruce I, Donn R, Hawkins C, Thomson W, Worthington J. Association Between the *PTPN22* Gene and Rheumatoid Arthritis and Juvenile Idiopathic Arthritis in a UK Population: Further Support That *PTPN22* Is an Autoimmunity Gene. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(6): 1694 - 1699.
84. Hinks A, Eyre S, Ke X, Barton A, Martin P, Flynn E, Packham J, Worthington J, Childhood Arthritis Prospective Study (CAPS), UKRAG Consortium, BSPAR Study Group, Thomson W. Association of the *AFF3* gene and *IL2/IL21* gene region with juvenile idiopathic arthritis. *Genes Immun.* 2010; 11(2): 194 - 198.
85. Hinks A, Eyre S, Ke X, Barton A, Martin P, Flynn E, Packham J; Childhood Arthritis Prospective Study (CAPS); UKRAG Consortium; BSPAR Study Group, Worthington J, Thomson W. Overlap of disease susceptibility loci for rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009a; 69(6): 1049 - 1053.
86. Hinks A, Ke X, Barton A, Eyre S, Bowes J, Worthington J, Thompson SD, Langefeld CD, Glass DN, Thomson W; UK Rheumatoid Arthritis Genetics Consortium; British Society of Paediatric and Adolescent Rheumatology Study Group. Association of the *IL2RA/CD25* gene with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009b; 60(1): 251 - 257.
87. Hinohara K, Nakajima T, Sasaoka T, Sawabe M, Lee BS, Ban J, Park JE, Izumi T, Kimura A. Replication studies for the association of *PSMA6* polymorphism with coronary artery disease in East Asian populations. *J Hum Genet.* 2009; 54(4): 248 - 251.
88. Hirano Y, Kaneko T, Okamoto K, Bai M, Yashiroda H, Furuyama K, Kato K, Tanaka K, Murata S. Dissecting beta - ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J.* 2008; 27(16): 2204 - 2213.
89. Honcharov SV, Dosenko VI, Khaïtovych MV, Moïbenko OO. [Allele polymorphism of genes coding proteasome subunits is associated with an enhanced risk for arterial hypertension in adolescents] *Fiziol ZH.* 2009; 55(2): 3 - 10.
90. Horikawa Y, Oda N, Coux N J, Li X, Orho - Melander M, Hara M, Hinokio Y, Linder T H, Mashima H, Schwartz P, del Bosque - Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polomsky K S, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier L J, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E., Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain - 10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet.* 200; 26: 63 - 175.
91. Hui J, Hung LH, Heiner M, Schreiner S, Neumüller N, Reither G, Haas SA, Bindereif A. Intronic CA - repeat and CA - rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *EMBO J.* 2005; 24(11): 1988 - 1998.
92. Ikeda K, Kawakami K. DNA binding through distinct domains of zinc - finger - homeodomain protein AREB6 has different effects on gene transcription. *Eur J Biochem.* 1995; 233(1): 73 - 82.
93. Ilowite NT. Current Treatment of Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Pediatrics.* 2002; 109: 109 - 115.

94. Iordanidou M, Tavridou A, Petridis I, Arvanitidis KI, Christakidis D, Vargemezis V, Manolopoulos VG. The serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) is associated with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta*. 2010; 411(3-4): 167 - 171.
95. James AB, Conway AM, Morris BJ Regulation of the neuronal proteasome by Zif268 (Egr1). *J Neurosci*. 2006; 26(5): 1624 - 1634.
96. Jiang YH, Martinez JE, Ou Z, Cooper ML, Kang SH, Pursley A, Cheung SW. De novo and complex imbalanced chromosomal rearrangements revealed by array CGH in a patient with an abnormal phenotype and apparently "balanced" paracentric inversion of 14(q21q23). *Am J Med Genet A*. 2008; 146A(15): 1986 - 1993.
97. Jiménez-Morales S, Velázquez-Cruz R, Ramírez-Bello J, Bonilla-González E, Romero-Hidalgo S, Escamilla-Guerrero G, Cuevas F, Espinosa-Rosales F, NE Martínez-Aguilar, Gómez - Vera J, Baca V, Orozco L. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Hum Immunol*. 2009; 70: 251 - 256.
98. Jin W, Patti ME. Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 116(2): 99 - 111.
99. Jing YL, Sun QM, Bi Y, Shen SM, Zhu DL. SLC30A8 polymorphism and type 2 diabetes risk: Evidence from 27 study groups. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010; In press.
100. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2004; 2(11): e363.
101. Jonsson A, Isomaa B, Tuomi T, Taneera J, Salehi A, Nilsson P, Groop L, Lyssenko V. A variant in the *KCNQ1* gene predicts future type 2 diabetes and mediates impaired insulin secretion. *Diabetes*. 2009; 58(10): 2409 - 13.
102. Juodka B, Spiess E, Angiolillo A, Joswig G, Rothbarth K, Werner D. High salt- and SDS- stable DNA binding protein complexes with ATPase and protein kinase activity retained in chromatin - depleted nuclei. *Nucleic Acids Res*. 1995; 23(8): 1359 - 1366.
103. Kalis M, Sjakste T, Sjakste N, Groop L. Association study between (TG) repeat polymorphism in PSMA6 gene and type II diabetes mellitus in Botnia. *Biologija*. 2003; 2: 12 - 14.
104. Kamnasaran D, Cox DW. Current status of human chromosome 14. *J Med Genet*. 2002; 29: 81 - 90.
105. Kapeta S, Chondrogianni N, Gonos ES. Nuclear erythroid factor 2 - mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem*. 2010; 285(11): 8171 - 8184.
106. Karim MA, Craig RL, Wang X, Hale TC, Elbein SC. Analysis of FOXO1A as a candidate gene for type 2 diabetes. *Mol Genet Metab*. 2006; 88(2): 171 - 177.
107. Kato H, Nomura K, Osabe D, Shinohara S, Mizumori O, Katashima R, Iwasaki S, Nishimura K, Yoshino M, Kobori M, Ichiishi E., Nakamura N, Yoshikawa T, Tanahashi T, Keshavarz P, Kunika K, Moritani M, Kudo E., Tsugawa K, Takata Y, Hamada D, Yasui N,

- Miyamoto T, Shiota H, Inoue H, Itakura M. Association of single - nucleotide polymorphisms in the suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) gene with type 2 diabetes in the Japanese. *Genomics*. 2006; 87: 446 - 458.
108. Kawaguchi M, Minami K, Nagashima K, Seino S. Essential role of ubiquitin - proteasome system in normal regulation of insulin secretion. *J Biol Chem*. 2006; 281(19): 13015 - 13020.
109. Kim YC, Wu SY, Lim HS, Chiang CM, Kodadek T. Non - proteolytic regulation of p53 - mediated transcription through destabilization of the activator-promoter complex by the proteasomal ATPases. *J Biol Chem*. 2009; 284(50): 34522 - 34530.
110. Kloetzel PM. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1695(1 - 3): 225 - 233.
111. Konstantinova IM, Tsimokha AS, Mittenberg AG. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2008; 267: 59 - 124.
112. Krämer U, Illig T, Grune T, Krutmann J, Esser C. Strong associations of psoriasis with antigen processing LMP and transport genes TAP differ by gender and phenotype. *Genes Immun*. 2007; 8(6): 513 - 517.
113. Krause S, Kuckelkorn U, Dörner T, Burmester GR, Feist E, Kloetzel PM. Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjogren's syndrome but not in other autoimmune disorders. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65(8): 1021 - 1027.
114. Krüger E, Kloetzel PM, Enenkel C. 20S proteasome biogenesis. *Biochimie*. 2001; 83(3 - 4): 289 - 293.
115. Kurmangaliyev YZ, Gelfand MS. Computational analysis of splicing errors and mutations in human transcripts. *BMC Genomics*. 2008 14; 9: 13.
116. Lamb R, Thomson W, British Society of Paediatric and Adolescent Rheumatology, Ogilvie EM, Donn R. Positive association of SLC26A2 gene polymorphisms with susceptibility to systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(4): 1286 - 1291.
117. Lamb R, Thomson W, Ogilvie E, Donn R, British Society of Paediatric and Adolescent Rheumatology. Wnt-1 - inducible signaling pathway protein 3 and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005; 52(11): 3548 - 3553.
118. Lee C, Yu MH. Protein Folding and Diseases. *J Biochem Mol Biol*, 2005; 38(3): 275 - 280.
119. Lee JH, Jeon MH, Seo YJ, Lee YJ, Ko JH, Tsujimoto Y, Lee JH. CA repeats in the 3'- untranslated region of bcl-2 mRNA mediate constitutive decay of bcl-2 mRNA. *J Biol Chem*. 2004; 279: 42758 - 42764.
120. Lenartowski R, Goc A. Tissue-specific association of the human tyrosine hydroxylase gene with the nuclear matrix. *Neurosci Lett*. 2002; 330: 151 - 154.
121. Li G, Tolstonog GV, Traub P. Interaction in vitro of type III intermediate filament proteins with Z-DNA and B-Z-DNA junctions. *DNA Cell Biol*. 2003; 22: 141 - 169.



122. Liang Q, He JS, Fulco AJ. The role of Barbie box sequences as cis-acting elements involved in the barbiturate - mediated induction of cytochromes P450BM-1 and P450BM-3 in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem*. 1995; 270: 4438 - 4450.
123. Liepa I. *Biometrija Rīga: Zvaigzne*. 1974; 336 lpp.
124. Lin Y, Sun Z. Current views on type 2 diabetes. *S J Endocrinol*. 2010; 204(1): 1 - 11.
125. Lindner E, Nordang GBN, Melum E, Flatø B, Selvaag AM, Thorsby E, Kvien TK, Førre ØT, Lie BA. Lack of association between the chemokine receptor 5 polymorphism CCR5delta32 in rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *BMC Med Gen*. 2007; 8: 33 – 38.
126. Ling C, Groop L, Guerra SD, Lupi R. Calpain - 10 expression is elevated in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *PLoS. One*. 2009; 4(8): e6558.
127. Liu X, Wang X, Shen Y, Wu L, Ruan X, Lindpaintner K, Yusuf S, Engert JC, Anand S, Tan X, Liu L The functional variant rs1048990 in PSMA6 is associated with susceptibility to myocardial infarction in a Chinese population. *Atherosclerosis*. 2009; 206(1): 199 - 203.
128. Lü S, Chen Z, Yang J, Chen L, Gong S, Zhou H, Guo L, Wang J. Overexpression of the PSMB5 gene contributes to bortezomib resistance in T - lymphoblastic lymphoma/leukemia cells derived from Jurkat line. *Exp Hematol*. 2008; 36(10): 1278 - 1284.
129. Lü S, Yang J, Chen Z, Gong S, Zhou H, Xu X, Wang J. Different mutants of PSMB5 confer varying bortezomib resistance in T lymphoblastic lymphoma/leukemia cells derived from the Jurkat cell line. *Exp Hematol*. 2009; 37(7): 831 - 837.
130. Maksymowych W P, Tao S, Luong M, Suarez - Almazor M, Nelson R, Pazderka F, Russell AS. Polymorphism in the LMP2 and LMP7 genes and adult rheumatoid arthritis: no relationship with disease susceptibility or outcome. *Tissue Antigens*. 1995a; 46(2): 136 - 139.
131. Maksymowych WP, Jhangri GS, Gorodezky C, Luong M, Wong C, Burgos-Vargas R, Morenot M, Sanchez-Corona J, Ramos-Remus C, Russell AS. The LMP2 polymorphism is associated with susceptibility to acute anterior uveitis in HLA-B27 positive juvenile and adult Mexican subjects with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 1997; 56(8): 488 - 492.
132. Maksymowych WP, Russel AS. Polymorphism in the LMP2 gene influences the relative risk for acute anterior uveitis in unselected patients with ankylosing spondylitis. *Clinical Investigation Medicine*. 1995; 18: 42 - 46.
133. Maksymowych WP, Suarez - Almazor M, Chou CT, Russell AS. Polymorphism in the LMP2 gene influences susceptibility to extraspinal disease in HLA - B27 positive individuals with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 1995b; 54(4): 321 - 324.
134. Malik S, Shukla A, Sen P, Bhaumik SR. The 19 s proteasome subcomplex establishes a specific protein interaction network at the promoter for stimulated transcriptional initiation *in vivo*. *J Biol Chem*. 2009; 284(51): 35714 - 35724.

135. Marchetti P, Del Prato S, Lupi R, Del Guerra S. The pancreatic beta - cell in human Type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006; 16: S3 - S6.
136. Marciano R, Giacomelli F, Divizia MT, Gattorno M, Felici E, Pistorio A, Martini A, Ravazzolo R, Picco P. Polymorphic variant inside the osteopontin gene shows association with disease course in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65(5): 662 - 665.
137. Martinez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM. Protein degradation and aging. *Exp Gerontol.* 2005; 40: 622 - 633.
138. McCarthy MI, Zeggini E. Genome - wide association studies in type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2009; 9(2): 164 - 171.
139. McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Førre O, Duff GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum.* 1995; 38(2): 221 - 228.
140. Meex SJ, van Vliet-Ostaptchouk JV, van der Kallen CJ, van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Feskens EJ, Blaak EE, Wijmenga C, Hofker MH, Stehouwer CD, de Bruin TW. Upstream transcription factor 1 (USF1) in risk of type 2 diabetes: association study in 2000 Dutch Caucasians. *Mol Genet Metab.* 2008; 94(3): 352 - 355.
141. Mein CA, Esposito L, Dunn MG, Johnson GC, Timms AE, Goy JV, Smith AN, Sebag-Montefiore L, Merriman ME., Wilson AJ, Pritchard LE, Cucca F, Barnett AH, Bain SC, Todd JA. A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nature Genet.* 1998; 19: 297 - 300.
142. Meiners S, Heyken D, Weller A, Ludwig A, Stangl K, Kloetzel P-K, Krüger E. Inhibition of Proteasome Activity Induces Concerted Expression of Proteasome Genes and de Novo Formation of Mammalian Proteasomes. *J Biol Chem.* 2003; 278 (24): 21517 - 21525.
143. Merforth, S, Kuehn L, Osmers A, Dahlmann B. Alteration of 20S proteasome subtypes and proteasome activator PA28 in skeletal muscle of rat after induction of *diabetes mellitus*. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35: 740 - 748.
144. Mishto M, Santoro A, Bellavista E., Bonafé M, Monti D, Franceschi C. Immunoproteasomes and immunosenescence. *Ageing Res Rev.* 2003; 2: 419 - 432.
145. Milterski B, Drynda S, Böschow G, Klein W, Oppermann J, Kekow J, Epplen JT. Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genet.* 2004, 5: 2 - 15.
146. Miyagi T, Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003; 18(1): 32 - 40.
147. Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI. Reduced mitochondrial density and increased

- IRS - 1 serine phosphorylation in muscle of insulin - resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest.* 2005; 115: 3587 - 3593.
148. Motulsky H. *Intuitive Biostatistics: A Nonmathematical Guide to Statistical Thinking*, Second edition, New York: Oxford University Press, Inc. 2010; 204 – 209.
149. Munteanu MG, Vlahovicek K, Parthasaraty S, Simon I, Pongor S. Rod models of DNA: sequence - dependent anisotropic elastic modelling of local bending phenomena. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23(9): 341 - 346.
150. Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, Tanaka K. Regulation of CD8+ T cell development by thymus - specific proteasomes. *Science.* 2007; 316(5829): 1349 - 1353.
151. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, Scheffer GL, Debipersad K, Vojtekova K, Lemos C, van der Heijden JW, Ylstra B, Peters GJ, Kaspers GL, Dijkmans BA, Scheper RJ, Jansen G. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood.* 2008; 112(6): 2489 - 2499.
152. Ogilvie EM, Fife MS, Thompson SD, Twine N, Tsoras M, Moroldo M, Fisher SA, Lewis CM, Prieur AM, Glass DN, Woo P. The -174G allele of the interleukin-6 gene confers susceptibility to systemic arthritis in children: a multicenter study using simplex and multiplex juvenile idiopathic arthritis families. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(11): 3202 - 3206.
153. Ozaki K, Sato H, Iida A, Mizuno H, Nakamura T, Miyamoto Y, Takahashi A, Tsunoda T, Ikegawa S, Kamatani N, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. A functional SNP in PSMA6 confers risk of myocardial infarction in the Japanese population. *Nat Genet.* 2006; 38(8): 921 - 925.
154. Ozen S, Alikasifoglu M, Bakkaloglu A, Duzova A, Jarosova K, Nemcova D, Besbas N, Vencovsky J, Tuncbilek E. Tumour necrosis factor  $\alpha$  G→A -238 and G→A -308 polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology.* 2002; 41: 223-227.
155. Ozyürek AR, Gürses D, Ulger Z, Levent E, Bakiler AR, Berdeli A. Allelic frequency of the MCP-1 promoter -2518 polymorphism in the Turkish population and in Turkish patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2007; 26(4): 546 - 550.
156. Permutt MA, Wasson JC, Suarez BK, Lin J, Thomas J, Meyer J, Lewitzky S, Rennich JS, Parker A, DuPrat L, Maruti S, Chayen S, Glaser B. A genome scan for type 2 diabetes susceptibility loci in a genetically isolated population. *Diabetes.* 2001; 50, 681 - 685.
157. Perry JR, Weedon MN, Langenberg C, Jackson AU, Lyssenko V, Sparsø T, Thorleifsson G, Grallert H, Ferrucci L, Maggio M, Paolisso G, Walker M, Palmer CN, Payne F, Young E, Herder C, Narisu N, Morken MA, Bonnycastle LL, Owen KR, Shields B, Knight B, Bennett A, Groves CJ, Ruukonen A, Jarvelin MR, Pearson E, Pascoe L, Ferrannini E, Bornstein SR, Stringham HM, Scott LJ, Kuusisto J, Nilsson P, Neptin M, Gjesing AP, Pisinger C, Lauritzen T, Sandbaek A, Sampson M, Zeggini ME, Lindgren CM,

- Steinthorsdottir V, Thorsteinsdottir U, Hansen T, Schwarz P, Illig T, Laakso M, Stefansson K, Morris AD, Groop L, Pedersen O, Boehnke M, Barroso I, Wareham NJ, Hattersley AT, McCarthy MI, Frayling TM. Genetic evidence that raised sex hormone binding globulin (SHBG) levels reduce the risk of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(3): 535 - 544.
158. Petersen KF, Shulman GI. Etiology of Insulin Resistance. *Am J Med.* 2006; 119(5A): 10S - 16S.
159. Petty RE, Southwood TR, Baum J, Bhattay E., Glass DN, Manners P, Maldonado-Cocco J, Suarez-Almazor M, Orozco-Alcala J, Prieur AM. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol.* 1998; 25(10): 1991 - 1994.
160. Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, Xiaohu H, Maldonado-Cocco J, Orozco-Alcala J, Prieur AM, Suarez-Almazor ME., Woo P. International League of Association for Rheumatology Classification of juvenile idiopathic arthritis: Second Revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol.* 2004; 31: 2 - 3.
161. Phelan JD, Thompson SD, Glass DN. Susceptibility to JRA/JIA: complementing general autoimmune and arthritis traits. *Genes and Immun.* 2006; 7: 1 - 10.
162. Plemper RK, Hammond AL. Protein degradation in human disease. *Prog Mol Subcell Biol.* 2002; 29: 61 - 84.
163. Prahalad S, Bohnsack JF, Jorde LB, Whiting A, Clifford B, Dunn D, Weiss R, Moroldo M, Thompson SD, Glass DN, Bamshad MJ. Association of two functional polymorphisms in the CCR5 gene with juvenile rheumatoid arthritis. *Genes and Immun.* 2006; 7: 468 - 475.
164. Prahalad S, Glass DN. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol.* 2008; 6: 11 - 27.
165. Prahalad S, Glass DN. Is Juvenile rheumatoid arthritis/juvenile idiopathic arthritis different from rheumatoid arthritis? *Arthritis Res.* 2002; 4(3): 3003 - 3010.
166. Prahalad S, Hansen S, McNally B, Whiting A, Zeff AS, Guthery SL, Bohnsack JF, Clifford B, Jorde LB. Variants in TNFAIP3, STAT4, and C12orf30 Loci Associated With Multiple Autoimmune Diseases Are Also Associated With Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(7): 2124 - 2130.
167. Prahalad S, Shear ES, Thompson SD, Giannini EH, Glass DN. Increased prevalence of familial autoimmunity in simplex and multiplex families with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(7): 1851 - 1856.
168. Prokopenko I, McCarthy MI, Lindgren CM. Type 2 diabetes: new genes, new understanding. *Trends Genet* 2008; 24(12): 613 - 621.
169. Prokopenko I, Zeggini E, Hanson RL, Mitchell BD, Rayner NW, Akan P, Baier L, Das SK, Elliott KS, Fu M, Frayling TM, Groves CJ, Gwilliam R, Scott LJ, Voight BF, Hattersley AT, Hu C, Morris AD, Ng M, Palmer CN, Tello - Ruiz M, Vaxillaire M, Wang CR, Stein L, Chan J, Jia W, Froguel P, Elbein SC, Deloukas P, Bogardus C, Shuldiner AR,

- McCarthy MI. International Type 2 Diabetes 1q Consortium Linkage disequilibrium mapping of the replicated type 2 diabetes linkage signal on chromosome 1q. *Diabetes*. 2009; 58(7): 1704 - 1709.
170. Pryhuber KG, Murray KJ, Donnelly P, Passo MH, Maksymowycz WP, Glass DN, Giannini EH, Colbert RA. Polymorphism in the LMP2 gene influences disease susceptibility and severity in HLA - B27 associated juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1996; 23: 747 - 752.
171. Qu Y, Yang Z, Jin F, Sun L, Feng J, Tang L, Zhang C, Zhu X, Shi X, Sun H, Wang B, Wang L. The haplotype identified in LEPR gene is associated with type 2 diabetes mellitus in Northern Chinese. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008a; 81(1): 33 - 37.
172. Qu Y, Yang Z, Jin F, Sun L, Zhang C, Ji L, Sun H, Wang B, Wang L. The Ser311Cys variation in the paraoxonase 2 gene increases the risk of type 2 diabetes in northern Chinese. *J Genet*. 2008b; 87(2): 165 - 169.
173. Quach H, Barreiro LB, Laval G, Zidane N, Patin E, Kidd KK, Kidd JR, Bouchier C, Veuille M, Antoniewski C, Quintana - Murci L. Signatures of purifying and local positive selection in human miRNAs. *Am J Hum Genet*. 2009; 84(3): 316 - 327.
174. Ramachandran V, Ismail P, Stanslas J, Shamsudin N, Moin S, Mohd Jas R. Association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin - converting enzyme gene with essential hypertension and type 2 diabetes mellitus in Malaysian subjects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2008; 9(4): 208 - 14.
175. Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2007; 369: 767 - 778.
176. Rechsteiner M, Hill CP. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological role of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol*, 2005; 15(1): 27 - 33.
177. Rees SD, Britten AC, Bellary S, O'Hare JP, Kumar S, Barnett AH, Kelly MA. The promoter polymorphism - 232C/G of the PCK1 gene is associated with type 2 diabetes in a UK - resident South Asian population. *BMC Med Genet*. 2009; 10: 83.
178. Rhodes CHJ. Type 2 Diabetes - a Matter of b - Cell Life and Death? *Science*. 2005; 37: 380 - 383.
179. Ridderstråle M, Groop L. Genetic dissection of type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 297(1 - 2): 10 - 17.
180. Ringold S, Burke A, Glass RM. Juvenile Idiopathic Arthritis. *JAMA*. 2005; 294(13): 1722 pp.
181. Rohr P, Veit TD, Scheibel I, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA, Kvitko K. GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008; 26(1): 151 - 155.
182. Rome S, Clement K, Rabasa - Lhoret R, Loizon E, Poitou C, Barsh GS, Riou JP, Laville M, Vidal H. Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates ~ 800 genes during an hyperinsulinemic clamp *J Biol Chem*. 2003; 278: 18063 - 18068.

183. Rome S, Meugnier E, Vidal H. The ubiquitin - proteasome pathway is a new partner for the control of insulin signaling. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004; 7: 249 - 254.
184. Rothenburg S, Koch - Nolte F, Haag F. DNA methylation and Z - DNA formation as mediators of quantitative differences in the expression of alleles. *Immunol Rev*. 2001a; 184: 286 - 298.
185. Rothenburg S, Koch - Nolte F, Rich A, Haag F. A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z - DNA and inhibits promoter activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001b; 98(16): 8985 - 8990.
186. Rozas J, Sánchez - DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003; 19(18): 2496 - 2497.
187. Rozen S, Skaletsky H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000; 132: 365 - 386.
188. Rumba - Rozenfelde I, Biķis E, Braclavska O, Daugule I, Ebele I, Folkmanis V, Karaševica J, Ņikitina - Zaķe L, Remberga S, Saulīte I, Sjakste T, Trapiņa I, Ventņš J, Bērnū slimību riska faktori. LU Akadēmiskais apgāds. 2009b; 183 lpp.
189. Rumba-Rozenfelde I, Ebele I, Remberga S, Daugule I, Trapiņa I, Saulīte I, Biķis E, Karaševica J, Sjakste T. Bērnū mirstību un invaliditāti ietekmējošo faktoru izpēte Grāmata: Latvijas iedzīvotāju dzīvildzi un dzīves kvalitāti apdraudošās slimības Zinātniskā analīze un galvenās rekomendācijas Autoru kolektīvs Valda Pīrāga redakcijā. Valsts pētījumu programma medicīnas zinātnē. Rīga, 2009a: 67 - 75.
190. Runstadler JA, Säilä H, Savolainen A, Leirisalo - Repo M, Aho K, Tuomilehto - Wolf E, Tuomilehto J, Seldin MF. HLA - DRB1, TAP2/TAP1, and HLA - DPB1 haplotypes in Finnish juvenile idiopathic arthritis: more complexity within the MHC. *Genes Immun*. 2004; 5(7): 562 - 571.
191. Salonen JT, Uimari P, Aalto JM, Pirskanen M, Kaikkonen J, Todorova B, Hyppönen J, Korhonen VP, Asikainen J, Devine C, Tuomainen TP, Luedemann J, Nauck M, Kerner W, Stephens RH, New JP, Ollier WE, Gibson JM, Payton A, Horan MA, Pendleton N, Mahoney W, Meyre D, Delplanque J, Froguel P, Luzzatto O, Yakir B, Darvasi A. Type 2 diabetes whole - genome association study in four populations: the DiaGen consortium. *Am J Hum Genet*. 2007; 81(2): 338 - 345.
192. Sanghera DK, Been L, Ortega L, Wander GS, Mehra NK, Aston CE, Mulvihill JJ, Ralhan S. Testing the association of novel meta-analysis - derived diabetes risk genes with type II diabetes and related metabolic traits in Asian Indian Sikhs. *J Hum Genet*. 2009; 54(3): 162 - 168.
193. Sanghera DK, Demirci FY, Been L, Ortega L, Ralhan S, Wander GS, Mehra NK, Singh J, Aston CE, Mulvihill JJ, Kamboh IM. *PPARG* and *ADIPOQ* gene polymorphisms increase type 2 diabetes mellitus risk in Asian Indian Sikhs: Pro12Ala still remains as the strongest predictor. *Metabolism*. 2010; 59(4): 492 - 501.

194. Sanghera DK, Ortega L, Han S, Singh J, Ralhan SK, Wander GS, Mehra NK, Mulvihill JJ, Ferrell RE, Nath SK, Kamboh MI. Impact of nine common type 2 diabetes risk polymorphisms in Asian Indian Sikhs: PPARG2 (Pro12Ala), IGF2BP2, TCF7L2 and FTO variants confer a significant risk. *BMC Med Genet.* 2008; 9: 59.
195. Sanjeevi CB, Miller EN, Dabadghao P, Rumba I, Shtauvere A, Denisova A, Clayton D, Blackwell JM. Polymorphism at NRAMP1 and D2S1471 loci associated with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(6): 1397 - 1404.
196. Scheffler S, Kuckelkorn U, Egerer K, Dörner T, Reiter K, Soza A, Burmester GR, Feist E. Autoimmune reactivity against the 20S-proteasome includes immunosubunits LMP2 (beta1i), MECL1 (beta2i) and LMP7 (beta5i). *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47(5): 622 - 626.
197. Scheibel I, Veit T, Neves AG, Souza L, Prezzi S, Machado S, Kohem C, Icarelli M, Xavier R, Brenol JC, Chies JA. Differential CCR5Delta32 allelic frequencies in juvenile idiopathic arthritis subtypes: evidence for different regulatory roles of CCR5 in rheumatological diseases. *Scand J Rheumatol.* 2008; 37(1): 13 - 17. .
198. Scherrer K, Bey F. The Prosomes (Mulicatalytic Proteinases; Proteasomes) and Their Relationship to the Untranslated Messenger Ribonucleoproteins, the Cytoskeleton, and Cell Differentiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1994; 49: 1 - 64.
199. Scherrer K. Prosomes, subcomplexes of untranslated mRNA. *P Mol Biol Rep.* 1990; 14(1): 1 - 9.
200. Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin rezistence. *Diabet Med.* 2005; 22: 674 - 682.
201. Schlesselman JJ, Stolley PD. Case - control studies: design, conduct, analysis. New York: Oxford University Press, Inc. 1982; 33 - 42.
202. Schmeling H, Wagner U, Peterson A, Horneff G. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2006; 24(1): 103 - 108.
203. Schmitt HP. Protein ubiquitination, degradation and the proteasome in neuro - degenerative disorders: No clear evidence for a significant pathogenetic role of proteasome failure in Alzheimer disease and related disorders. *Med Hypotheses.* 2006; 67(2): 311 - 317.
204. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina - Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. A genome - wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science.* 2007; 316(5829): 1341 - 1345.

205. Sia C, Weinem M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes in the intracellular pathway of antigen processing - a subject review and cross-study comparison. *Rev Diabet Stud.* 2005; 2(1): 40 - 52.
206. Sixt SU, Dahlmann B Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin - incidence and relevance. *Biochim Biophys ActA* 2008; 1782(12): 817 - 823.
207. Sjakste J, Sjakste T, Jurkēvičs S, Ļauberte L, Collan Y, Vikamnis U, Sjakste N. Loss of heterozygosity in an intron of pros - 27 K gene revealed by microsatellite analysis. *Biologija.* 2003; 1: 33 - 36.
208. Sjakste N, Sjakste T, Rumba I, Vikmanis U. Proteasomes in pathology. *Proc Latv Acad Sci Sect B.* 2002; 1/2: 7 - 16.
209. Sjakste N, Sjakste T. Kas ir proteasoma? *Latvijas ārstu žurnāls.* 2001; 4: 22 - 25.
210. Sjakste T, Eglite E, Sochnev A, Marga M, Pirags V, Collan Y, Sjakste N. Microsatellite genotyping of chromosome 14q13.2 - 14q13 in the area of proteasomal *PSMA6* gene on association with Graves' disease in the Latvian population. *Immunogenetics.* 2004; 56(4): 238 - 243.
211. Sjakste T, Kalis M, Poudziunas I, Pirags V, Lazdins M, Groop L, Sjakste N. Association of microsatellite polymorphisms of the human 14q13.2 region with type 2 diabetes mellitus in Latvian and Finnish populations. *Ann Hum Genet.* 2007b; 71(Pt 6): 772 - 776.
212. Sjakste T, Poudziunas I, Ninio E, Perret C, Pirags V, Nicaud V, Lazdins M, Evanss A, Morrison C, Cambien F, Sjakste N. SNPs of *PSMA6* gene - investigation of possible association with myocardial infarction and type 2 diabetes mellitus. *Genetika.* 2007a; 43(4): 553 - 559.
213. Sjakste T, Poudziunas I, Pirags V, Lazdins M, Sjakste N. Bioinformatic analysis of evolutionary conservatism and functional significance of microsatellite alleles of human 14q13.2 region associated with type 2 diabetes mellitus. *Proc Latv Acad Sci Sect B.* 2008; 62(3): 91 - 102.
214. Sjakste T, Sjakste N, Scherrer K Exon/intron organisation of human proteasome PROS - 27 K gene. *DNA Seq.* 2001; 12(4): 261 - 265.
215. Sjakste T, Trapina I, Rumba - Rozenfelde I, Lunin R, Sugoka O, Sjakste N. Identification of a Novel Candidate Locus for Juvenile Idiopathic Arthritis at 14q13.2 in the Latvian Population by Association Analysis with Microsatellite Markers. *DNA Cell Biol.* 2010, In press.
216. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome - wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 2007; 445(7130): 881 - 885.



217. Sliuzas V, Utkus A, Kucinskas V. Recombinant chromosome 14 due to maternal pericentric inversion. *J Appl Genet.* 2008; 49(2): 205 - 207.
218. Smerdel A, Dai KZ, Lorentzen AR, Flatø B, Maslinski S, Thorsby E, Førre Ø, Spurkland A. Genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and polymorphism in the SH2D2A gene. *Genes Immun.* 2004; 5(4): 310 - 312.
219. Song F, Li X, Zhang M, Yao P, Yang N, Sun X, Hu FB, Liu L. Association between heme oxygenase-1 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes in a Chinese population. *Am J Epidemiol.* 2009; 170(6): 747 - 756.
220. Stock CJW, Ogilvie EM, Samuel JM, Fife M, Lewis CM, Woo P. Comprehensive association study of genetic variants in the IL - 1 gene family in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Genes Immun.* 2008; 9: 349 - 357.
221. Strachan GD, Ostrow LA, Jordan-Sciutto KL. Expression of the fetal Alz-50 clone 1 protein induces apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 336(2): 490 - 495.
222. Sugiura T, Maeno N, Kawaguchi Y, Takei S, Imanaka H, Kawano Y, Terajima - Ichida H, Hara M, Kamatani N. A promoter haplotype of the interleukin - 18 gene is associated with juvenile idiopathic arthritis in the Japanese population. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(3): R60.
223. Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Okajima F, Kimura S, Katoh R, Kawaoi A, Kohn LD. Thyroid Transcription Factor 1 Is Calcium Modulated and Coordinately Regulates Genes Involved in Calcium Homeostasis in C Cells. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(12): 7410 - 7422.
224. Suzuki M, Katagiri N, Ueda M, Tanaka S. Functional analysis of Nkx2.1 and Pax9 for calcitonin gene transcription. *Gen Comp Endocrinol.* 2007; 152(2 - 3): 259 - 266.
225. Szopa M, Malczewska - Malec M, Kiec - Wilk B, Skupien J, Wolkow P, Malecki MT, Sieradzki J. Variants of the adiponectin gene and type 2 diabetes in a Polish population. *Acta Diabetol.* 2009; 46(4): 317 - 322.
226. Tabara Y, Osawa H, Kawamoto R, Onuma H, Shimizu I, Miki T, Kohara K, Makino H. Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome - wide screening. *Diabetes.* 2009; 58(2): 493 - 498.
227. Takashima N, Shioji K, Kokubo Y, Okayama A, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. Validation of the Association Between the Gene Encoding Proteasome Subunit  $\alpha$  Type 6 and Myocardial Infarction in a Japanese Population. *Circ J.* 2007; 71: 495 - 498.
228. Tan JT, Ng DP, Nurbaya S, Ye S, Lim XL, Leong H, Seet LT, Siew WF, Kon W, Wong TY, Saw SM, Aung T, Chia KS, Lee J, Chew SK, Seielstad M, Tai ES. Polymorphisms identified through genome - wide association studies and their associations with type 2 diabetes in Chinese, Malays, and Asian - Indians in Singapore. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(1): 390 - 397.
229. Tanaka K, Tsurumi C. The 26S proteasome: subunits and functions. *Mol Biol Rep.* 1997; 24(1 - 2): 3 - 11.

230. Tanaka K. Molecular biology of proteasomes. *Mol Biol Rep.* 1995; 21(1): 21 - 26.
231. Tang Y, Lin Y, Han S, Liang S. Yeast surface display of Human proteasome subunit alpha 6 and expression enhancement. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology.* 2007; 25(6): 1 - 6.
232. Tazi J, Bakkour N, Stamm S. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792(1): 14 - 26.
233. Thomson G, Marthandan N, Hollenbach JA, Mack SJ, Erlich HA, Single RM, Waller MJ, Marsh SG, Guidry PA, Karp DR, Scheuermann RH, Thompson SD, Glass DN, Helmsberg W. Sequence feature variant type (sfvt) analysis of the hla genetic association in juvenile idiopathic arthritis. *Pac Symp Biocomput.* 2010: 359 - 370.
234. Thomson W, Donn R. Juvenile idiopathic arthritis genetics - What's new? What's next? *Arthritis Res.* 2002; 4: 302 - 306.
235. Tokuyama Y, Matsui K, Ishizuka T, Egashira T, Kanatsuka A. The Arg121Trp variant in PAX4 gene is associated with beta - cell dysfunction in Japanese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism Clinical and Experimental.* 2006; 55: 213 - 216.
236. Tolstonog GV, Li G, Shoeman RL, Traub P. Interaction in vitro of type III intermediate filament proteins with higher order structures of single - stranded DNA, particularly with G - quadruplex DNA. *DNA Cell Biol.* 2005; 24(2): 85 - 110.
237. Tolstonog GV, Wang X, Shoeman R, Traub P. Intermediate filaments reconstituted from vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein selectively bind repetitive and mobile DNA sequences from a mixture of mouse genomic DNA fragments. *DNA Cell Biol.* 2000; 19(11): 647 - 677.
238. Tomaru U, Ishizu A, Murata S, Miyatake Y, Suzuki S, Takahashi S, Kazamaki T, Ohara J, Baba T, Iwasaki S, Fugo K, Otsuka N, Tanaka K, Kasahara M. Exclusive expression of proteasome subunit  $\beta 5t$  in the human thymic cortex. *Blood.* 2009; 113(21): 5186 - 5191.
239. Trapina I, Rumba-Rozenfelde I, Sjakste N, Sokolovska J, Sugoka O, Sjakste T. Association study of genetic variants in the 14q11 – 14q13 proteasomal genes cluster with juvenile idiopathic arthritis (JIA) in Latvian population. *Proc Latv Acad Sci Sect B.* 2009; 63(3/4): 20 - 30.
240. Tsuchiya T, Schwarz PE, Bosque - Plata LD, Geoffrey Hayes M, Dina C, Froguel P, Wayne Towers G, Fischer S, Temelkova - Kurktschiev T, Rietzsch H, Graessler J, Vcelák J, Palyzová D, Selisko T, Bendlová B, Schulze J, Julius U, Hanefeld M, Weedon MN, Evans JC, Frayling TM, Hattersley AT, Orho - Melander M, Groop L, Malecki MT, Hansen T, Pedersen O, Fingerlin TE, Boehnke M, Hanis CL, Cox NJ, Bell GI. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes in Europeans: results of pooled and meta – analyses. *Mol Genet Metab.* 2006; 89(1 - 2): 174 - 184. .
241. Ustrell V, Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBOJ* 2002; 21(13): 3516 - 3525.

242. Uthoff SMS, Hunt LE, Grant BS, Young V, Eichenberger MR, Cobbs GA, Galandiuk S. T-Cell Receptor  $\gamma$ : A Microsatellite Marker for Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2002; 9(1): 88 - 93.
243. Viken MK, Amundsen SS, Kvien TK, Boberg KM, Gilboe IM, Lilleby V, Sollid LM, Førre ØT, Thorsby E, Smerdel A, Lie BA. Association analysis of the 1858C4T polymorphism in the PTPN22 gene in juvenile idiopathic arthritis and other autoimmune diseases. *Genes Immun*. 2005; 6: 271 - 273.
244. Villard J. Transcription regulation and human diseases. *Swiss Med Wkly*. 2004; 134(39-40): 571 - 579.
245. Vlahovicek K, Munteanu MG, Pongor S. Sequence - dependent modelling of local DNA bending phenomena: curvature prediction and vibrational analysis. *Genetica*. 1999; 106(1 - 2): 63 - 73.
246. Walker SC, Engelke DR. A protein-only RNase P in human mitochondria. *Cell*. 2008; 135(3) :412 - 414.
247. Wang G, Vasquez KM. Z-DNA, an active element in the genome. *Front Biosci*. 2007; 12: 4424 - 4438.
248. Wang L, Kumar S, Fridley BL, Kalari KR, Moon I, Pellemounter LL, Hildebrandt MA, Batzler A, Eckloff BW, Wieben ED, Greipp PR. Proteasome beta subunit pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(11): 3503 - 3513.
249. Wojcik C, Benchaib M, Lornage J, Czyba JC, Guerin JF. Proteasomes in human spermatozoa. *Int J Androl*. 2003; 200(23): 169 - 177.
250. Wojcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35(5): 579 - 589.
251. Wolf DH, Hilt W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1695: 19 - 31.
252. Woo P, Colbert RA. An overview of genetics of paediatric rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009; 23: 589 - 597.
253. Wright AF, Hastie N. *Genes and common diseases*. Cambridge University Press. 2007; 69 - 72 pp.
254. Xiang J, Li XY, Xu M, Hong J, Huang Y, Tan JR, Lu X, Dai M, Yu B, Ning G. Zinc transporter-8 gene (*SLC30A8*) is associated with type 2 diabetes in Chinese. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(10): 4107 - 4112.
255. Yajnik CS, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Freathy RM, Prakash S, Mani KR, Weedon MN, Kale SD, Deshpande J, Krishnaveni GV, Veena SR, Fall CH, McCarthy MI, Frayling TM, Hattersley AT, Chandak GR. *FTO* gene variants are strongly associated with type 2 diabetes in South Asian Indians. *Diabetologia*. 2009; 52(2): 247 - 252.
256. Yamaguchi Y, Moritani M, Tanahashi T, Osabe D, Nomura K, Fujita Y, Keshavarz P, Kunika K, Nakamura N, Yoshikawa T, Ichiishi E, Shiota H, Yasui N, Inoue H, Itakura M.

- Lack of association of genetic variation in chromosome region 15q14-22.1 with type 2 diabetes in a Japanese population. *BMC Med Genet.* 2008; 9: 22.
257. Yao TC, Tsai YC, Huang JL. Association of RANTES promoter polymorphism with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(4): 1173 - 1178.
258. Zeng HS, Chen XY, Luo XP. The association with the -159C/T polymorphism in the promoter region of the *CD14* gene and juvenile idiopathic arthritis in a Chinese Han population. *J Rheumatol.* 2009; 36(9): 2025 - 2028.
259. Zoeger A, Blau M, Egerer K, Feist E, Dahlmann B. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clin Chem.* 2006; 52(11): 2079 - 2086.
260. Zolk O, Schenke C, Sarikas A, The ubiquitin - proteasome system: focus on the heart. *Cardiovasc Res.* 2006; 70(3): 410 - 421.
261. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13): 3406 - 3415.

# PUBLIKĀCIJAS UN PREZENTĀCIJAS

## Ar darbu saistīto rezultātu publicēšana un prezentēšana

### *Pilna teksta publikācijas*

#### Starptautiski citējamās žurnālos

1. T. Sjakste, I. Trapina, I. Rumba-Rozenfelde, R. Lunin, O. Sugoka, N. Sjakste, Identification of a novel candidate locus for juvenile idiopathic arthritis at 14q13.2 in the Latvian population by association analysis with microsatellite markers. ***DNA, Cell Biology***, 2010
2. T. Sjakste, I. Poudziunas, E. Ninio, C. Perret, V. Pirags, V. Nicaud, M. Lazdins, A. Evans, C. Morrison, F. Cambien, N. Sjakste, SNPs of PSMA6 gene – investigation of possible association with myocardial infarction, type 2 diabetes mellitus, ***Russian Journal of Genetics***, 2007, V.43, No 4, P. 442-448.
3. T. Sjakste, M.Kalis, I. Poudziunas, V. Pīrāgs, M. Lazdins, L. Groop, N. Sjakste, Association of microsatellite polymorphisms of the human 14q13.2 region with type 2 diabetes mellitus in Latvian, Finnish populations, ***Annals of Human Genetics***, 2007, Oct, V. 71, No. Pt6, pp. 772 -776.
4. N. Sjakste, L. Bagdoniene, A. Gutcaits, D. Labeikyte, K. Bielskiene, I. Trapina, I. Muižnieks, Y. Vassetzky, T. Sjakste, Tightly bound to DNA proteins: new data and old problems. ***Biochemistry (Moscow)***, in press

#### Latvijas zinātniskajos žurnālos

1. I. Trapina, I. Rumba-Rozenfelde, N.Sjakste, J. Sokolovska, O. Sugoka, T. Sjakste, Association study of genetic variants in the 14q11 – 14q13 proteasomal genes cluster with juvenile idiopathic arthritis (JIA) in Latvian population. ***Proceedings of the Latvian Academy of Science SectionB***, 2009, V.63, N3/4, pp. 20 – 30.
2. T.Sjakste, I.Poudziunas, V.Pirags, M.Lazdins, N.Sjakste, Bioinformatic analysis of evolutionary conservatism, functional significance of microsatellite alleles of humane 14q13.2 region associated with type 2 diabetes mellitus. ***Proceedings of the Latvian Academy of Science SectionB***, 2008, V.62, N3/4.

#### Monogrāfija, kurā ir publicēti rezultāti:

1. I. Rumba-Rozenfelde, E. Biķis, O. Braclavska, I. Daugule, I. Ebele, V. Folkmanis, J. Karaševica, L. Ņikitina-Zaķe, S. Remberga, I. Saulīte, T. Sjakste, I. Trapina, J. Ventiņš, Bērnu slimību riska faktori. LU Akadēmiskais apgāds, 2009, 183 lpp.
2. I. Rumba-Rozenfelde, I. Ebele, S. Remberga, I. Daugule, I. Trapina, I. Saulīte, E. Biķis, J. Karaškēvica, T. Sjakste, Bērnu mirstību un invaliditāti ietekmējošo faktoru izpēte. Grāmata: Latvijas iedzīvotāju dzīvildzi un dzīves kvalitāti apdraudošās slimības. Zinātniskā analīze un galvenās rekomendācijas. Autoru kolektīvs Valda Pīrāga redakcijā. Valsts pētījumu programma medicīnas zinātnē. Rīga, 2009: 67-75.

## ***Tēžu prezentēšana un publicēšana:***

### ***Starptautiskās zinātniskās konferencēs***

1. I. TRAPINA, I. Rumba-Rozenfelde, N. Sjakste, T. Sjakste Study of 14q13.2 region microsatellites, SNPs resulted in identification of novel candidate locus for association with JIA. Poster presentation. Disk of abstracts of the 7<sup>th</sup> Internationaal Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, May 5 -9, 2010.
2. I. TRAPINA, I. Rumba-Rozenfelde, N.Sjakste, T. Sjakste Case/control study on the association of SNP in proteasomal genes with juvenile idiopathic arthritis (JIA) in Latvian population. 11th International Meeting On Human Genome Variation, Complex Genome Analysis, Tallin, Estonia, 11th – 13<sup>th</sup> of September, 2009, Abstract book pp.117.
3. Rumba I., POUŽIUNAS I., Sugoka O., Sarnavska L., Sokolovska J., Sjakste T., Association of 14q 13.2 region microsatellite polymorphism with juvenile idiopathic arthritis in Latvian population. Ann. Rheum. Dis., July 2008, Vol.67, Suppl. II, 273.
4. I. POUŽIUNAS, I.Rumba, O.Sugoka, T. Sjakste, 14q13.2 region microsatellite polymorphism, risk of juvenile idiopathic arthritis: A case-control study in Latvian population, Poster presentation, International Congress of Genetics 2008, Berlin, Germany, July 12–17, 2008, Abstract book, pp. 148.
5. I. POUŽIUNAS, J.Sokolovska, I.Rumba, O.Sugoka, T. Sjakste, Investigation of association of SNP polymorphisms in proteasomal genes cluster on Chromosome 14 with juvenile idiopathic arthritis (JIA) in the Latvian population, Poster presentation, International Congress of Genetics 2008, Berlin, Germany, July 12–17, 2008, Abstract book, pp.265.
6. T. Sjakste, I. POUŽIUNAS, V. Pirags, M. Lazdins, J. Sokolovska, N. Sjakste, Association study of the 14q13.2 region microsatellite, SNP polymorphism with type 2 *diabetes mellitus* in Latvian population, Oral poster presentation, IV Baltic Genetical Congress, Daugavpils, Latvia, October 9–12, 2007, Abstract book, pp. 180.
7. I. POUŽIUNAS, T. Sjakste, M. Kālis, M. Lazdiņš, V. Pīrāgs, L. Groop, N. Sjakste, Genetic association of microsatellite markers in 14q13 region with type 2 diabetes mellitus in Latvian, Botnia populations, their potential functional significance, Oral poster presentation, Genomic Disorders 2007, Hinxton, Cambridge, Great Britain, March 21-24, 2007, Abstract book, pp. 74.
8. T. Sjakste, I. POUŽIUNAS, M. Kālis, L. Groop, N. Sjakste, Genetic association, eventual functional significance of 14q13 microsatellite polymorphisms in type 2 *diabetes mellitus*, Oral poster presentation, 2nd International Tandem Repeat Consortium Workshop on the Bioinformatics, Genomics, Functionality of Microsatellites, VNTRs, Budapest, Hungary, Abstrac book, September 8-11, 2006, pp 24.
9. I. POUŽIUNAS, T. Sjakste, M. Kālis, M. Lazdiņš, V. Pīrāgs, L. Groop, N. Sjakste, Microsatellite profile of the 14q13 in association with non-insulin dependent diabetes mellitus, Oral presentation, 1st Baltic Sea Region Students' Scientific Conference in Medical Sciences, Riga, Latvia, April 21, 2006, pp 13.

### Latvijas zinātniskās konferencēs

1. I. TRAPINA, T. Sjakste, I. Rumba-Rozenfelde, R. Luņins, O. Sugoka, N. Sjakste Jauns 14q13.2 asociācijas lokuss ar juvenīlo idiopātisko artrītu. Mutiskā prezentācija LU 68. zinātniskā konferencē Dabas zinātne, Medicīna, Rīga, Latvija, 2010. gada 5.februārī, Tēžu apkopojums, 29.lpp.
2. R. Luņins, I. TRAPINA, I. Rumba-Rozenfelde, T. Sjakste Gēna PSMC6 viena nukleoīda polimorfismu saistība ar juvenīlo idiopātisko artrītu Latvijas populācijā. Mutiskā prezentācija LU 68. zinātniskā konferencē Dabas zinātne, Medicīna, Rīga, Latvija, 2010. gada 5.februārī, Tēžu apkopojums, 24.lpp.
3. I. TRAPINA, I. Rumba, T. Sjakste *PSMA6* gene related microsatellite polymorphism, risk of juvenile idiopathic arthritis in Latvian population. Book of abstracts of the 51<sup>st</sup> The International Scientific Conference of Daugavpils University, Daugavpils, Latvia, 15. – 18. April, 2009, pp.35.
4. I. TRAPIŅA, I. Rumba, O. Sugoka, T. Sjakste, Jauni cilvēka 14. hromosomas polimorfismi, Mutiskā prezentācija LU 67. zinātniskā konferencē Dabas zinātne, Medicīna, Rīga, Latvija, 2009. gada 6.februārī.
5. I. Rumba, O. Sugoka, I. TRAPIŅA, I. Saulīte, I.Rinkuža, S.Remberga, J. Sokolovska, L. Sarnavska, T. Sjakste, Autoimūno slimību pediatriko slimnieku DNS paraugu kolekcijas izveide VPP programmas izpildes gaitā, Postera prezentācija LU 67. zinātniskā konferencē Dabas zinātne, Medicīna, Rīga, Latvija, 2009. gada 6.februārī.
6. R. Luņins, I. Rumba, I. TRAPIŅA, T. Sjakste, Cilvēka 14. hromosomas divu viena nukleoīda polimorfismu izpēte JIA slimniekiem, Postera prezentācija LU 67. zinātniskā konferencē Dabas zinātne, Medicīna, Rīga, Latvija, 2009. gada 6.februārī.

### **Ar darbu nesaistīto rezultātu publicēšana un prezentēšana**

#### ***Pilna teksta publikācijas***

#### Starptautiski citējamās žurnālos

N. Sjakste, L. Bagdoniene, A. Gutcaits, D. Labeikyte, K. Bielskiene, I. TRAPIŅA, I. Muižnieks, Y. Vassetzky, T. Sjakste, Tightly bound to DNA proteins: new data and old problems. *Biochemistry (Moscow)*, in press

#### Latvijas un citos valsts žurnālos

1. T. Sjakste, Z. Grislis, I. TRAPINA, N. Paramonova, O. Sugoka, Intra- and interhaplotype variability of the myostatin gene (*MSTN*) in *Latvian Blue* and *Latvian Brown* cattle breeds. *Proceedings of the International Scientific Conference “Implication of different production technologies on animal health and food products quality indices”*, 2008, December 4-5, Sigulda, Latvia, p.171-176.
2. T. Sjakste., A. Jemeljanovs, I. Zitare, N. Paramonova, I. TRAPINA, V. Sterna, L. Paura, Microsatellite and single nucleotide polymorphism of prolactin gene (*PRL*) *Latvian Brown* cattle breed. *Proceedings of the International Scientific Conference “Implication of different*

*production technologies on animal health and food products quality indices”* , 2008, December 4-5, Sigulda, Latvia, p.177-182.

3. J.Sokolovska, I.POUĐIUNAS, R.Paeglis, M.Dzintare, Individual Susceptibility to hypotensive action of Mildronate, *Latvijas ķīmijas žurnāls*, 2006, Nr. 4, 398.lpp.

### ***Tēžu prezentēšana un publicēšana:***

#### *Starptautiskās zinātniskās konferencēs*

1. Jemeljanovs A., I. Zitare, N. Paramonova, I. POUĐIUNAS, O. Sugoka, J. Miculis, T. Sjakste, Association study of the PRL gene polymorphisms with milk performance traits in Latvian Brown cattle breed. Book of abstracts of the 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production, EAAP 2008 Vilnius, Lithuania, August 24th – 27th, 2008, p. 24.

2. Grislis Z., I. POUĐIUNAS, O. Sugoka, N. Paramonova, T. Sjakste, Allele and haplotype polymorphism of the myostatin gene (*MSTN*) microsatellite containing region in Latvian Blue and Latvian Brown cattle breeds. Book of abstracts of the 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production, EAAP 2008 Vilnius, Lithuania, August 24th – 27th, 2008, p. 23.

3. Jemeljanovs A., I. Zitare, N. Paramonova, I. POUĐIUNAS, L. Paura, V. Sterne, T. Sjakste, Association study of the PRL and *MSTN* gene polymorphisms with milk performance traits in Latvian Brown cattle breed. Book of abstracts of the 10th World Conference on Animal Production, WCAP 2008, Cape Town, South Africa, 2008 November 23rd- 28th

4. Paramonova N., Jemeljanovs A., Zitare I., POUĐIUNAS I., Sugoka O., Miculis J., T. Sjakste, Genetic diversity of the PRL gene in Latvian Brown cattle breed. EADGENE 2008 „Animal Disease genomics: Opportunities and Applications”, Edinburgh, UK, 9th - 12th June 2008,. Poster abstracts, p.6.

5. Paramonova N., Grislis Z., POUĐIUNAS I., Sugoka O., T. Sjakste, Microsatellite and SNP polymorphism of the *MSTN* gene in Latvian cattle breeds. EADGENE 2008 „Animal Disease genomics: Opportunities and Applications”, Edinburgh, UK, 9th - 12th June 2008,. Poster abstracts, p.6.

6. I. POUĐIUNAS, Encouragement and obstacles starting a PhD project in Latvia, Oral presentation, Interfaces of Molecular Biology and Agriculture: Perspectives of Molecular Breeding in The Next Decade, in round table, March 14-15, 2007, Riga, Latvia.

#### *Latvijas zinātniskās konferencēs*

1. I. TRAPIŅA, Miostatīna gēna polimorfismu iespējamās funkcionālās nozīmes analīze ar bioinformātikas metodiku, Seminārs projekta „Miostatīna gēna polimorfismu izpēte Latvijas govju, aitu un zirgu vietējās šķirnēs” ietvaros, Jelgava, Latvija, 11.decembris 2008.gads.



2. I. POUŽIUNAS, T. Sjakste, N.Sjakste, *Miostatīna* (MSTN) gēna polimorfismu izpētes perspektīvas, Mutiskā prezentācija LU 66. zinātniskā konferencē Dabas zinātne, Medicīna, Rīga, Latvija, 2008. gada 1.februārī.
3. I. POUŽIUNAS, R.Paeglis, M.Dzintare, Individuālā uzņēmība pret Mildronāta hipotensīvo iedarbību, Postera prezentācija LU 65. zinātniskā konferencē Dabas zinātne, Medicīna, Rīga, Latvija, 2007. gada 1.februārī.
4. I. POUŽIUNAS, Mājdzīvnieku genoma projekti un to internetu datu bāzes, Referāts, projekta „Pārtikā izmantojamo dzīvnieku ģenētisko resursu un šķirņu kvalitātes izvērtējums un tālākās izmantošanas efektivitātes nodrošināšana.” seminārs, Jelgava, Latvija, 2006.gada 24.novembrī
5. I. POUŽIUNAS, 2nd International Tandem Repeat Consortium Workshop on the Bioinformatics, Genomics and Functionality of Microsatellites and VNTRs, Referāts LZP sadarbības projekta sēde, Rīga, Latvija, 2006.gada 7.novembrī

## PATEICĪBA

Lielu pateicību izsaku, pirmkārt, savam darba vadītājam Dr. habil. biol. prof. Nikolajam Sjakstem par darba vadīšanu, kā arī Dr. biol. Tatjanai Sjakstei par iespēju izstrādāt šo darbu viņas vadītajā Latvijas Universitātes aģentūras „LU Bioloģijas institūta” „Genomikas un bioinformātikas” grupas laboratorijā un par konsultācijām. Tāpat gribu pateikties profesorei Ingrīdai Rumbai – Rozenfeldei par asins paraugiem juvenīlā idiopātiskā artrīta pacientu DNS kolekcijas veidošanai un profesoram Valdim Pīrāgam un Mārim Lazdiņam par 2. tipa cukura diabēta gadījuma/kontroles DNS paraugiem, kā arī „Genomikas un bioinformātikas” grupas un Medicīniskās bioķīmijas docētāju grupas (Latvijas Universitāte, Medicīnas fakultāte) kolektīvam par palīdzību un atbalstu darba veikšanai.

Tāpat gribu pateikt lielu paldies Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra Genoma centra zinātniekiem par iespēju viņu laboratorijā veikt sekvencēšanu, MALDI-TOF masas spektrometriju un fragmenta garuma analīzi. Sirsnīgs paldies profesoram Leifam Grūpam (prof. Leif Groop) par iespēju veikt dažus pētījumus viņa laboratorijā Endokrinoloģijas nodaļa, Malmē slimnīcas universitāte (Zviedrija) un Dr. Mārtiņam Kālim, kas vadīja šos pētījumus. Stažēšanās Helsinku universitātē Augu genomu laboratorijā profesora Alana Šulmana (prof. Alan Schulman) un Dr. Ruslana Kalendara (Dr. Ruslan Kalendar) vadībā Ziemeļu Ministru padomes projekta „NeighbourPlus Program” ietvaros bija papildus ieguvums; par to liels paldies gan abiem zinātniekiem, gan Ziemeļu Ministru padomei.

Protams, liels paldies manam vīram Aigaram par atbalstu darba rakstīšanas laikā, dodot papildu stimulu un enerģiju. Un lielu paldies gribu izteikt arī saviem vecākiem par atbalstu veicot ne pārāk vieglo izglītības ceļu.

Nobeigumā arī gribētu pateikties Laurai Ritumai par teksta rediģēšanu latviešu valodā.

Šis darbs ir veikts Latvijas zinātnes padomes grantu Nr. 05.1399. „14. hromosomas molekulāro marķieru saistība ar cilvēka patoloģijām” un Nr. 09.1369. „Strukturālas izmaiņas mikrosatelītu saturošās nekodējošās sekvencēs un to funkcionāla nozīme” (abu projektu vadītāja Tatjana Sjakste) ietvaros, kā arī sadarbojoties „Latvijas populācijas genofonda pētījuma” apakšprojektā Nr. 05.0023.07.1. „Asinsspiedienu noteicošie ģenētiskie faktori Latvijas populācijā” un sadarbības projekta Nr. 10.0010 „Slimību etioloģijas, patoģenēzes un cilvēka novecošanas procesu ģenētiska izpēte Latvijas populācijā (apakšprojektā „Proteasomu gēnu polimorfismu genoma skrīnings un to saistība ar autoimūnām slimībām” (abu apakšprojektu vadītājs Nikolajs Sjakste). Daļēji šī darba izmaksas ir segtas no Valsts pētījuma

programmas Nr. 9. „Latvijas iedzīvotāju dzīvildzi un dzīves kvalitāti apdraudošo galveno patoloģiju zinātniskā izpēte ar multidisciplināra pētnieciskā konsorcijs palīdzību” apakšprojekta „Bērnu mirstību un invaliditāti ietekmējošo slimību mūsdienīgu agrīnās diagnostikas, profilakses un terapijas pasākumu izstrāde” (apakšprojekta vadītāja I.Rumba-Rozenfelde).

Darba autore ir saņēmusi Eiropas sociālā fonda projekta „Doktorantu un jauno zinātnieku pētniecības darba atbalsts Latvijas Universitātē” (2007. un 2008.gadā) un projektā „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē” (2009. un 2010. gadā) stipendiju, kas bija papildus finansiālais atbalsts.

# PIELIKUMI

**1. Pielikums** Viena nukleotīda polimorfisma genotipēšanas metožu apraksts, ietverot tiešo (F), atgriezenisko (R) un genotipējamo (G) praimeru sekvenču. F un R praimeru, kas tika izmantoti sekvenējot vai nesakritības (*mismatch*) polimerāzes ķēdes reakcijā apzīmēti ar Fs un Rs un Fm un Rm, attiecīgi. MALDI-TOF MS un restrikcijas enzīma saita polimorfismu metode apzīmēta ar genoSNIP un RESP. Restrikcijas enzīms, kas tika izmantots RESP metodē, ir uzrādīts slīprakstā. Restrikcijas enzīma atpazīstamais saits norādīts pēc enzīma nosaukuma, ar bultiņu norādīta šķelšanas vieta. Nukleotīds, kas tika analizēts izmantojot genoSNIP, nesakritības RESP vai alēļspecifisko PCR metodi ir norādīts praimerī to pasvītrot.

Polimorfisma ID	Metode	Praimeru sekvenču	Fragmenta garums, bp amplificētā / šķeltā
rs11543947	RESP <i>AasI</i> - GACNNNN↓NNGTC	F-5'-AAATGGTCTTTTCGCATCTGG-3' R-5'-CTCGGCCAAGATTCATTGTT-3'	691/457 + 234
rs12043	RESP <i>RseI</i> -CAYNN↓NNRTG	F-5'-GGCAACAAGAGCAAACTCC-3' R-5'-AGGTCAATGTGCCAGAGCTT-3'	546/316 + 230
rs11548692	genoSNIP	F-5'-CACACAGGCTCAATCATGT-3' R-5'-GACTTGAAGCCTGAGAGTTT-3' G-5'-TCCTCCCTG <u>L</u> GGCCCAGT-3' G-5'-TCCTCCCTG <u>L</u> GGCCCAGTG-3' G-5'-TCCTCCCTG <u>L</u> GGCCCAGTAACTG-3'	179
rs14930	genoSNIP	F-5'-ACGTTGGATGGCCCTGTAGGCTGTGTTAT-3' R-5'-ACGTTGGATGCCACTCCCTCTACCTCTTCT-3' G-5'-biotin-CAAGAAGC <u>L</u> AGGGGAGAAA-3'	264
rs1136581	genoSNIP	F-5'-AGGCATGAGCCTAGGTTG-3' R-5'-GAGGTTGAAGGGCTATCTT-3' G-5'-GGCTGACTTGACT <u>L</u> CCCTC-3' G-5'-GGCTGACTTGACT <u>L</u> CCCTCG-3' G-5'-GGCTGACTTGACT <u>L</u> CCCTCCG-3'	263

rs7146672	genoSNIP	F-5'-GGGTGATGGCACACTGAC-3' R-5'-AATGCATTTCTCTTTGAGAGT-3' G-5'-CAGGGAGAAL <u>T</u> CCACACTTA-3' G-5'-CAGGGAGAAL <u>T</u> CCACACTTAT-3' G-5'-CAGGGAGAAL <u>T</u> CCACACTTAGGGACT-3'	153
rs5807825	RESP <i>BseMI</i> - GCAATG↓	F-5'-GTCCTCAGGGAGGAAGCTCT-3' R-5'-AGCCTGAGGTAAGCACTCCA-3'	981/754 + 227
rs9322944	genoSNIP	F-5'-CAGAATAGCAGAGCAGGAAC-3' R-5'-GCCAATGGGATATTTTTTTCAC-3' G-5'-AGGGGGAGAL <u>G</u> TATTAAGAA-3' G-5'-AGGGGGAGAL <u>G</u> TATTAAGAAA-3' G-5'-AGGGGGAGAL <u>G</u> TATTAAGAAGTTA-3'	211
rs7493194	RESP <i>EcoNI</i> - CCTNN↓NNNAGG	F-5'-TCCAGAGAAGGGTCCAGCTA-3' R-5'-CAGGAGATCCAGGTTGCAGT-3'	920/ 405 + 515
rs71640264	Nesakritības RESP <i>PciI</i> - A↓CATGT	F-5'-GCCTCCCAAGTATATGGGACTAC-3' R-5'-CTAAGGGGGTGGTGGAGTGA-3' Fm-5'-6-FAM-GAGTTCGAGAGCTGCCTGAC-3' Rm-5'-AGCCCCGACAATTTTTAG <u>A</u> C <u>A</u> T-3'	958 252/230 + 22
rs71640265	Sekvencēšana	F-5'-CAGGAGAATCGCTTGA <sup>A</sup> CTCAG-3' R-5'-ACCATGACAGGGCAATTCAG-3'	876
rs2277460	Alēļspecifiskais PCR	F-5'-ATGCAAGAGCGGAAGAA <u>A</u> C-3' F-5'-ATGCAAGAGCGGAAGAAA <u>A</u> -3' R-5'-CTGAATTGCCCTGTCATGGTA3'	256
rs2277459	Sekvencēšana	F-5'-CAGGAGAATCGCTTGA <sup>A</sup> CTCAG-3'	876

rs11547365		R-5'-ACCATGACAGGGCAATTCAG-3'	
rs1048990	genoSNIP	F-5'-ACGTTGGATGCTCCAGATGAAAGCCTGA-3' R-5'-ACGTTGGATGGCCCTATCTTCCTTAACTCTC-3' G-5'-biotin-AGGGATTGTGTTT <u>L</u> AAGTAGTGCTT-3'	899
	Alēļspecifiskais PCR	F-5'-GGGATTGTGTTTAAAGTAGTGCTT <u>C</u> -3' F-5'-GGGATTGTGTTTAAAGTAGTGCTT <u>G</u> -3' R-5'-CTGAATTGCCCTGTCATGGTA-3'	159
rs8017676	genoSNIP	F-5'-ACGTTGGATGGATTATAAGCCAGACCCTTG-3' R-5'-ACGTTGGATGATGATTCCAAGCACAGATG-3' G-5'-biotin-GCCACTAAACTCATTCAA <u>A</u> LATAAAAC-3'	150
rs6571711	genoSNIP	F-5'-ACGTTGGATGAGTATGTCGGGCATTATCTTTA-3' R-5'-ACGTTGGATGAATCAGTAAATCTCATCCCTCTC-3' G-5' – biotin-GTTTGT <u>T</u> TGACCACCLTAAAGAAT – 3'	310
rs17597267	RESP <i>EcoRI</i> - G↓AATTC	F-5'-ACCAGGCAACATCTTGAAGG-3' R-5'-TCCACTGTCTGTTCAAATGTCC-3'	506/141 + 365
rs9322946	RESP <i>MaeII</i> - ACGT↓	F-5'-TAGCCAGATGTGGTGGTGGA-3' R-5'-CCCAGGTTCAAACGATTCTT-3'	556/189 + 368
rs2295826	RESP	F-5'-GCTTAAACAAGTATTGCCGATCA-3'	252/133 + 119
rs2295827	<i>DdeI</i> - C↓TNAG	R-5'-AATTGTTCCCTTACTGAAATAATACAA-3'	252/196 + 58
rs2348071	genoSNIP	F-5'-ACGTTGGATGATAGGGTTATTGGGGCTGT-3' R-5'-ACGTTGGATGCTCTCAACATCAAACCACACT-3' G-5'-biotin-CCACACATAAAAT <u>L</u> CACCAACACT-3'	338
	RESP <i>TscAI</i> - NNCASTGNN↓	F-5'-GTCTAAGGCAGGGATGTCCA-3' R-5'-ACCAGCTTCCCATTCAGTG-3'	232/153+66

**2. Pielikums** 14.hromosomas proteasomu proteīnu gēnu viena nukleotīda polimorfismu alēļu un genotipu frekvenču sadale kontroles 1 un kontroles 2 grupās.

Gēns		<i>PSMB5</i>		<i>PSMA6</i>		<i>PSMC6</i>		<i>PSMA3</i>	
ID numurs		rs11543947	rs5807825	rs2277460	rs1048990	rs2295826	rs2295827	rs2348071	
Motīvs		c.70C>T	c.-4543_-4544insC	c.-110C>A	c.-8C>G	c.86-104A>G	c.86-46C>T	c.543+138G>A	
MAF	Kontrole 1 (175)	9,14	42,00	6,57	16,25	11,71	19,14	30,00	
	Kontrole 2 (121)	11,16	26,03	4,96	8,68	17,77	20,25	35,12	
Lokusa statistiskā analīze pēc alēlēm	$P_a$	0,42	$6,55 \times 10^{-5*}$	0,41	$1,18 \times 10^{-2*}$	$3,80 \times 10^{-2*}$	0,74	0,19	
	$P_b$	0,40	<0,0001*	0,48	$1,14 \times 10^{-2*}$	$3,03 \times 10^{-2*}$	0,67	0,21	
Retās alēles statistiskā analīze	$P_a$	0,58	$1,90 \times 10^{-2*}$	0,62	0,10	0,16	0,79	0,47	
	$P_b$	0,47	$1,42 \times 10^{-2*}$	0,46	0,14	0,22	0,69	0,41	
Genotipu frekvence	Heterozigotā	Kontrole 1	16,00	52,00	13,14	27,50	16,57	29,14	34,86
		Kontrole 2	13,59	13,59	15,53	29,13	20,39	26,21	51,46
	Retās alēles homozigotā	Kontrole 1	1,14	16,00	0,00	2,50	3,43	4,57	12,57
		Kontrole 2	0,00	38,83	0,00	0,00	12,62	12,62	8,74
Lokusa statistiskā analīze pēc genotipiem	$P_a$	0,47	$3,34 \times 10^{-2*}$	0,58	0,27	$6,73 \times 10^{-3*}$	$4,92 \times 10^{-2*}$	$2,45 \times 10^{-2*}$	
	$P_b$	0,52	$3,68 \times 10^{-2*}$	0,48	0,32	$6,60 \times 10^{-3*}$	$4,88 \times 10^{-2*}$	$2,20 \times 10^{-2*}$	

MAF – retās alēles (izcelts; c,-4543\_-4544insC gadījumā alēle bez insercijas) frekvence  $P_a$  - statistiskā ticamība pēc  $\chi^2$  kritērija;  $P_b$  – koriģēta statistiskā ticamība, aprēķināta kā vidējais lielums pēc 10'000 permutāciju analīzēm; \* —  $P < 0,05$  starp analizētajām grupām



**3. Pielikums** Mikrosatelītu HSMS genotipu frekvenču sadalījumi starp 2. tipa cukura diabēta gadījuma un kontroles grupām

Mikrosatelīts (paraugu skaits gadījuma / kontroles grupās)		Genotipa frekvences, %					
Genotips		Kontrole 2	T2DM	$P_a$	$P_b$	OR	RR
HSMS602 (101/123)	(CAA) <sub>7/7</sub>	36,89	49,04	0,24	0,26	1,65	1,33
	(CAA) <sub>7/8</sub>	20,49	15,38	0,40	0,40	0,71	0,75
	(CAA) <sub>7/10</sub>	25,41	28,85	0,65	0,70	1,19	1,14
	(CAA) <sub>8/8</sub>	6,56	0,00	$1,03 \times 10^{-2*}$	$1,50 \times 10^{-2*}$		
	(CAA) <sub>8/10</sub>	7,38	4,81	0,45	0,70	0,63	0,65
	(CAA) <sub>10/10</sub>	3,28	1,92	-	-	-	-
HSMS701 (103/123)	(AC) <sub>15/16</sub>	2,44	1,94	-	-	-	-
	(AC) <sub>15/17</sub>	2,44	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>15/18</sub>	0,00	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>16/16</sub>	3,25	7,77	0,15	0,20	2,51	2,39
	(AC) <sub>16/17</sub>	12,20	11,65	0,91	0,98	0,95	0,96
	(AC) <sub>16/18</sub>	2,44	2,91	-	-	-	-
	(AC) <sub>16/19</sub>	11,38	19,42	0,14	0,12	1,88	1,71
	(AC) <sub>16/20</sub>	4,88	6,80	0,56	0,60	1,42	1,39
	(AC) <sub>17/17</sub>	3,25	1,94	-	-	-	-
	(AC) <sub>17/18</sub>	4,07	1,94	-	-	-	-
	(AC) <sub>17/19</sub>	8,94	5,83	0,41	0,50	0,63	0,65
	(AC) <sub>17/20</sub>	3,25	5,83	0,37	0,32	1,84	1,79
	(AC) <sub>17/21</sub>	0,00	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>17/22</sub>	0,00	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>18/18</sub>	0,00	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>18/19</sub>	2,44	4,85	-	-	-	-
	(AC) <sub>18/20</sub>	3,25	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>18/21</sub>	0,81	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>18/22</sub>	0,00	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>19/19</sub>	18,70	13,59	0,38	0,40	0,68	0,73
(AC) <sub>19/20</sub>	13,82	7,77	0,19	0,25	0,53	0,56	
(AC) <sub>20/20</sub>	2,44	0,97	-	-	-	-	
HSMS702 (104/121)	(TG) <sub>12/12</sub>	30,77	23,14	0,32	0,30	1,48	1,33
	(TG) <sub>12/13</sub>	36,54	42,15	0,57	0,57	0,79	0,87
	(TG) <sub>12/15</sub>	1,92	4,96	-	-	-	-
	(TG) <sub>12/16</sub>	0,96	0,00	-	-	-	-
	(TG) <sub>12/18</sub>	2,88	1,65	-	-	-	-
	(TG) <sub>12/20</sub>	0,00	0,83	-	-	-	-
	(TG) <sub>12/21</sub>	0,96	1,65	-	-	-	-
	(TG) <sub>12/22</sub>	0,96	0,00	-	-	-	-
	(TG) <sub>12/23</sub>	4,81	4,13	-	-	-	-
(TG) <sub>13/13</sub>	6,73	12,40	0,19	0,18	0,51	0,54	

	(TG) <sub>13/14</sub>	0,96	0,00	-	-	-	-
	(TG) <sub>13/15</sub>	1,92	0,83	-	-	-	-
	(TG) <sub>13/16</sub>	2,88	1,65	-	-	-	-
	(TG) <sub>13/22</sub>	1,92	0,83	-	-	-	-
	(TG) <sub>13/24</sub>	1,92	3,31	-	-	-	-
	(TG) <sub>14/22</sub>	0,96	0,00	-	-	-	-
	(TG) <sub>15/15</sub>	0,00	0,83	-	-	-	-
	(TG) <sub>15/18</sub>	0,00	0,83	-	-	-	-
	(TG) <sub>18/21</sub>	0,00	0,83	-	-	-	-
	(TG) <sub>18/22</sub>	0,96	0,00	-	-	-	-
	(TG) <sub>18/25</sub>	0,96	0,00	-	-	-	-
	(TG) <sub>19/25</sub>	0,96	0,00	-	-	-	-
HSMS801	(AC) <sub>13/17</sub>	0,00	0,97	-	-	-	-
(103/123)	(AC) <sub>15/17</sub>	1,63	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>15/21</sub>	3,25	5,83	0,37	0,37	1,84	1,79
	(AC) <sub>15/22</sub>	3,25	3,88	-	-	-	-
	(AC) <sub>15/23</sub>	0,00	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>15/24</sub>	0,81	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>15/25</sub>	0,00	1,94	-	-	-	-
	(AC) <sub>16/17</sub>	1,63	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>17/17</sub>	4,88	1,94	-	-	-	-
	(AC) <sub>17/19</sub>	0,81	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>17/20</sub>	1,63	2,91	-	-	-	-
	(AC) <sub>17/21</sub>	8,94	18,45	0,06	0,09	2,30	2,06
	(AC) <sub>17/22</sub>	2,44	7,77	0,07	0,15	3,37	3,18
	(AC) <sub>17/11</sub>	1,63	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>17/13</sub>	0,81	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>18/20</sub>	0,00	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>18/22</sub>	0,81	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>19/21</sub>	2,44	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>19/22</sub>	1,63	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>19/23</sub>	0,00	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>19/24</sub>	0,81	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>19/26</sub>	0,00	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>20/20</sub>	0,81	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>20/21</sub>	6,50	3,88	0,40	0,70	0,58	0,60
	(AC) <sub>20/22</sub>	4,07	0,00	4,22 x 10 <sup>-2*</sup>	4,99 x 10 <sup>-2*</sup>		
	(AC) <sub>20/23</sub>	2,44	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>20/25</sub>	1,63	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>21/21</sub>	8,94	8,74	0,96	1,00	0,97	0,98
	(AC) <sub>21/22</sub>	8,94	15,53	0,17	0,16	1,87	1,74
	(AC) <sub>21/23</sub>	1,63	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>21/24</sub>	7,32	2,91	0,16	0,25	0,38	0,40
	(AC) <sub>21/25</sub>	2,44	0,97	-	-	-	-

	(AC) <sub>21/26</sub>	0,81	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>21/27</sub>	0,81	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>22/22</sub>	4,07	2,91	-	-	-	-
	(AC) <sub>22/23</sub>	1,63	2,91	-	-	-	-
	(AC) <sub>22/24</sub>	2,44	1,94	-	-	-	-
	(AC) <sub>22/25</sub>	1,63	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>22/26</sub>	1,63	0,97	-	-	-	-
	(AC) <sub>23/24</sub>	2,44	1,94	-	-	-	-
	(AC) <sub>23/25</sub>	0,00	2,91	-	-	-	-
	(AC) <sub>24/24</sub>	1,63	0,00	-	-	-	-
	(AC) <sub>24/25</sub>	0,81	0,00	-	-	-	-
	(TG) <sub>17/18</sub>	0,00	0,99	-	-	-	-
	(TG) <sub>17/19</sub>	0,81	0,00	-	-	-	-
	(TG) <sub>18/18</sub>	6,50	5,94	0,87	0,99	0,91	0,91
	(TG) <sub>18/19</sub>	13,01	8,91	0,38	0,56	0,65	0,69
	(TG) <sub>18/20</sub>	3,25	2,97	-	-	-	-
	(TG) <sub>18/21</sub>	13,01	6,93	0,17	0,15	0,50	0,53
	(TG) <sub>18/22</sub>	6,50	9,90	0,39	0,50	1,58	1,52
	(TG) <sub>18/23</sub>	4,88	1,98	-	-	-	-
	(TG) <sub>18/24</sub>	0,81	1,98	-	-	-	-
	(TG) <sub>19/19</sub>	8,13	3,96	-	-	-	-
	(TG) <sub>19/20</sub>	1,63	0,99	-	-	-	-
	(TG) <sub>19/21</sub>	8,94	13,86	0,29	0,29	1,64	1,55
	(TG) <sub>19/22</sub>	4,07	7,92	0,24	0,24	2,03	1,95
	(TG) <sub>19/23</sub>	5,69	1,98	0,17	0,12	0,33	0,35
	(TG) <sub>19/24</sub>	0,81	0,99	-	-	-	-
	(TG) <sub>20/20</sub>	0,00	1,98	-	-	-	-
	(TG) <sub>20/21</sub>	1,63	3,96	-	-	-	-
	(TG) <sub>20/22</sub>	0,00	1,98	-	-	-	-
	(TG) <sub>20/23</sub>	2,44	0,00	-	-	-	-
	(TG) <sub>21/21</sub>	8,13	6,93	0,75	0,89	0,84	0,85
	(TG) <sub>21/22</sub>	4,88	6,93	0,53	0,55	1,45	1,42
	(TG) <sub>21/23</sub>	1,63	1,98	-	-	-	-
	(TG) <sub>21/24</sub>	0,00	0,99	-	-	-	-
	(TG) <sub>22/22</sub>	0,00	0,99	-	-	-	-
	(TG) <sub>22/23</sub>	1,63	1,98	-	-	-	-
	(TG) <sub>23/23</sub>	0,81	0,99	-	-	-	-
	(TG) <sub>23/25</sub>	0,81	1,98	-	-	-	-

$P_a$  - statistiskā ticamība pēc  $\chi^2$  kritērija;  $P_b$  – koriģētā statistiskā ticamība, aprēķināta kā vidējais lielums pēc 10'000 permutāciju analīzēm; OR un RR – starpību attiecība un relatīvais risks; CI 95% - konfidences intervāls pie 95%;

„-„ — genotips netika iekļauts asociācijas analīzē; \* —  $P < 0,05$  starp kontroles un T2DM grupām

**4. Pielikums** Mikrosatelītu HSMS alēļu frekvenču un heterozigotātes indeksu sadalījumi starp 2. tipa cukura diabēta gadījuma un kontroles grupām

Mikrosatelīts	Alēles	Alēļu frekvences (%)						Heterozigotātes indekss	
		Kontrole	T2DM	$P_a$	$P_b$	OR	RR	Kontrole	T2DM
HSMS602	(CAA) <sub>7</sub>	59,84	71,75	0,25	0,26	1,66	1,19	0,56	0,45
	(CAA) <sub>8</sub>	20,49	10,10	$9,70 \times 10^{-3*}$	$1,08 \times 10^{-2*}$	0,44	0,49	/	/
	(CAA) <sub>10</sub>	19,67	18,75	0,84	0,91	0,94	0,95	0,47	0,49
HSMS701	(CA) <sub>13</sub>	2,44	1,94	-	-	-	-		
	(CA) <sub>14</sub>	19,92	29,13	0,08	0,09	1,65	1,46		
	(CA) <sub>15</sub>	18,70	16,02	0,53	0,54	0,83	0,86	0,76	0,76
	(CA) <sub>16</sub>	6,50	7,28	0,76	0,72	1,13	1,12	/	/
	(CA) <sub>17</sub>	32,52	36,99	0,49	0,52	0,82	0,88	0,72	0,77
	(CA) <sub>18</sub>	15,04	11,65	0,36	0,34	0,74	0,77		
	(CA) <sub>19</sub>	0,41	0,49	-	-	-	-		
	(CA) <sub>20</sub>	0,00	0,97	-	-	-	-		
HSMS702	(TG) <sub>12</sub>	50,83	55,29	0,60	0,57	1,20	1,09		
	(TG) <sub>13</sub>	36,78	29,81	0,27	0,30	0,73	0,81		
	(TG) <sub>14</sub>	00,00	0,96	-	-	-	-		
	(TG) <sub>15</sub>	4,13	1,92	-	-	-	-		
	(TG) <sub>16</sub>	0,00	0,48	-	-	-	-		
	(TG) <sub>17</sub>	3,85	2,48	-	-	-	-	0,60	0,60
	(TG) <sub>18</sub>	00,00	0,48	-	-	-	-	/	/
	(TG) <sub>19</sub>	0,41	0,00	-	-	-	-	0,64	0,63
	(TG) <sub>20</sub>	0,41	0,00	-	-	-	-		
	(TG) <sub>21</sub>	1,24	2,40	-	-	-	-		
	(TG) <sub>22</sub>	0,00	0,96	-	-	-	-		
	(TG) <sub>23</sub>	3,72	3,37	-	-	-	-		
(TG) <sub>24</sub>	0,00	0,48	-	-	-	-			
HSMS801	(CA) <sub>13</sub>	0,00	0,49	-	-	-	-	0,83	0,80
	(CA) <sub>15</sub>	4,47	6,80	-	-	-	-	/	/
	(CA) <sub>16</sub>	0,81	0,0	-	-	-	-	0,80	0,86
	(CA) <sub>17</sub>	14,63	18,45	0,36	0,39	1,32	1,26		
	(CA) <sub>18</sub>	0,41	0,49	-	-	-	-		
	(CA) <sub>19</sub>	2,85	1,94	-	-	-	-		
	(CA) <sub>20</sub>	8,94	4,37	0,07	0,09	0,47	0,49		
	(CA) <sub>21</sub>	30,49	33,50	0,62	0,64	1,15	1,10		
	(CA) <sub>22</sub>	18,29	19,90	0,72	0,73	1,11	1,09		
	(CA) <sub>23</sub>	4,07	5,34	0,54	0,66	1,33	1,31		
	(CA) <sub>24</sub>	9,76	3,88	$2,34 \times 10^{-2*}$	$3,00 \times 10^{-2*}$	0,37	0,40		

	(CA) <sub>25</sub>	3,25	3,40	-	-	-	-		
	(CA) <sub>26</sub>	1,63	1,46	-	-	-	-		
	(CA) <sub>27</sub>	0,41	0,00	-	-	-	-		
	(TG) <sub>17</sub>	0,41	0,00	-	-	-	-		
HSMS006	(TG) <sub>18</sub>	27,24	22,77	0,40	0,46	0,79	0,84		
	(TG) <sub>19</sub>	25,61	21,29	0,40	0,39	0,79	0,83	0,79	0,81
	(TG) <sub>20</sub>	4,47	6,93	0,21	0,21	1,59	1,55	/	/
	(TG) <sub>21</sub>	23,17	24,26	0,83	0,83	1,06	1,05	0,76	0,80
	(TG) <sub>22</sub>	8,54	15,35	4,64 x 10 <sup>-2*</sup>	4,00 x 10 <sup>-2*</sup>	1,94	1,80		
	(TG) <sub>23</sub>	9,35	5,94	0,22	0,16	0,61	0,64		
	(TG) <sub>24</sub>	1,22	2,97	-	-	-	-		

$P_a$  - statistiskā ticamība pēc  $\chi^2$  kritērija;  $P_b$  – koriģētā statistiskā ticamība, aprēķināta kā vidējais lielums pēc 10'000 permutāciju analīzēm; OR un RR – starpību attiecība un relatīvais risks; CI 95% - konfidences intervāls pie 95%;

„-„ — alēle netika iekļauta asociācijas analīzē; \* —  $P < 0,05$  starp kontroles un T2DM grupām

**5. Pielikums A** Visu septiņu lokusu biežāk sastopamo haplotipu sadale un statistiskā analīze T2DM un kontroles 2 grupās.

Haplotips	Apzīmējums	H11	H12	H13	H14
	Sekvence	CDCCACA	CDCCACG	CDCCGTG	CICCACA
Frekvence	Kontrole	13,11	11,17	5,34	12,62
	T2DM	7,44	6,20	3,31	15,29
Statistiskā analīze	$P_a$	0,20	0,17	0,52	0,59
	$P_b$	0,29	0,26	0,33	0,47
	OR	1,09	1,12	1,00	0,51
	(95%)	(0,37 - 3,24)	(0,37 - 3,43)	(0,28 - 3,63)	(0,18 - 1,44)
	RR	1,76	1,8	1,62	0,83
	(95%)	(1,00 - 3,10)	(0,97 - 3,36)	(0,66 - 3,95)	(0,52 - 1,32)
Haplotips	Apzīmējums	H15	H16	H17	H18
	Sekvence	CICCACG	CICCGTG	CICGACG	CICGGTG
Frekvence	Kontrole	21,36	3,40	5,34	5,34
	T2DM	28,51	8,68	7,02	0,83
Statistiskā analīze	$P_a$	0,28	$9,43 \times 10^{-2}$	0,59	$3,93 \times 10^{-2*}$
	$P_b$	0,34	$4,97 \times 10^{-2*}$	0,79	$1,01 \times 10^{-2*}$
	OR	R	0,24	0,47	4,00
	(95%)		(0,07 - 0,84)	(0,14 - 1,54)	(0,69 - 23,26)
	RR	0,75	0,39	0,76	6,46
	(95%)	(0,54 - 1,04)	(0,17 - 0,90)	(0,36 - 1,59)	(1,45 - 28,81)

SNP secība haplotipu kombinācijās: *PSMB5* variācija c.70C>T; *PSMA6* gēna SNP c.-4543\_-4544insC (2.; I/D), c.-110C>A (3.) un c.-8C>G (4.), *PSMC6* gēnā lokalizētie c.86-104A>G (5.) un c.86-46C>T (6.) un *PSMA3* SNP c.543+138G>A (7.).

$P_a$  - statistiskā ticamība pēc  $\chi^2$  kritērija;  $P_b$  – koriģētā statistiskā ticamība, aprēķināta kā vidējais lielums pēc 10'000 permutāciju analīzēm; OR un RR – starpību attiecība un relatīvais risks; CI 95% - konfidences intervāls pie 95%; R – references haplotips OR aprēķinam; \* —  $P < 0,05$  starp analizētajām grupām.

**5. Pielikums B.** 20S proteasomu proteīnu gēnu analizēto SNP biežāk sastopamo haplotipu sadale un statistiskā analīze T2DM un kontroles 2 grupās.

Haplotips	Apzīmējums	Ha1	Ha2	Ha3	Ha4	Ha5
	Sekvence	CDCCA	CDCCG	CICCA	CICCG	CICGG
Frekvence	Kontrole	7,44	9,09	18,60	41,32	7,02
	T2DM	16,02	15,53	12,14	28,64	10,68
Statistiskā analīze	$P_a$	$4,66 \times 10^{-2*}$	0,18	0,23	0,11	0,36
	$P_b$	$7,14 \times 10^{-2}$	0,25	0,30	0,09	0,51
	OR	3,11	2,47	0,94		2,19
	(95%)	(1,61 - 6,01)	(1,31 - 4,64)	(0,52 - 1,69)	R	(1,08 - 4,45)
	RR	2,15	1,71	0,65	0,69	1,52
	(95%)	(1,25 - 3,70)	(1,03 - 2,85)	(0,41 - 1,02)	(0,53 - 0,90)	(0,83 - 2,78)

SNP secība haplotipu kombinācijās: *PSMB5* variācija c.70C>T; *PSMA6* gēna SNP c.-4543\_-4544insC (2.; I/D), c.-110C>A (3.) un c.-8C>G (4.), un *PSMA3* SNP c.543+138G>A (5.).

$P_a$  - statistiskā ticamība pēc  $\chi^2$  kritērija;  $P_b$  – koriģētā statistiskā ticamība, aprēķināta kā vidējais lielums pēc 10'000 permutāciju analīzēm; OR un RR – starpību attiecība un relatīvais risks; CI 95% - konfidences intervāls pie 95%; R – references haplotips OR aprēķinam; \* —  $P < 0,05$  starp analizētajām grupām.

**6. Pielikums** Mikrosatelītu HSMS genotipu frekvenču sadalījumi starp juvenīlā idiopātiskā artrīta un tā formu pacientiem un kontroles grupām

Mikrosatelīts	Genotips	Genotipa frekvences, %			
		Kontrole 1	JIA	JIoA	JIpA
HSMS602	167/168	0,44	0,00	0,00	0,00
	167/170	0,00	0,60	0,00	0,00
	168/168	7,08	1,80	1,05	2,04
	168/169	10,62	4,19	5,26	4,08
	168/171	4,87	1,80	3,16	0,00
	168/177	4,87	2,40	3,16	2,04
	168/178	0,44	0,60	0,00	0,00
	169/169	25,22	44,91	45,26	40,82
	169/170	0,44	0,00	0,00	0,00
	169/171	15,04	8,98	10,53	10,20
	169/177	9,73	11,98	11,58	16,33
	169/178	7,52	2,40	1,05	2,04
	170/170	4,42	14,37	13,68	16,33
	170/177	0,44	0,00	2,11	2,04
	171/171	1,77	2,40	0,00	0,00
	171/177	3,54	1,20	2,11	0,00
	171/178	1,77	0,60	1,05	0,00
	177/177	1,33	1,20	0,00	4,08
	178/178	0,44	0,60	0,00	0,00
	HSMS701	(AC) <sub>14/18</sub>	0,44	0,63	1,15
(AC) <sub>15/15</sub>		2,21	1,27	0,00	2,04
(AC) <sub>15/16</sub>		2,65	3,16	2,30	4,08
(AC) <sub>15/17</sub>		2,21	1,27	2,30	0,00
(AC) <sub>15/18</sub>		5,31	4,43	3,45	6,12
(AC) <sub>15/19</sub>		5,31	5,06	5,75	4,08
(AC) <sub>15/20</sub>		3,10	0,63	0,00	2,04
(AC) <sub>15/21</sub>		0,44	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>16/16</sub>		11,06	1,90	3,45	0,00
(AC) <sub>16/17</sub>		2,21	1,27	2,30	0,00
(AC) <sub>16/18</sub>		4,42	12,66	11,49	18,37
(AC) <sub>16/19</sub>		9,29	23,42	22,99	20,41
(AC) <sub>16/20</sub>		5,75	2,53	2,30	4,08
(AC) <sub>17/17</sub>		5,75	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>17/18</sub>		1,33	1,27	1,15	0,00
(AC) <sub>17/19</sub>		1,77	8,86	10,34	6,12
(AC) <sub>17/20</sub>		4,87	7,59	8,05	6,12
(AC) <sub>17/21</sub>		0,00	1,27	1,15	2,04
(AC) <sub>18/18</sub>		7,08	3,80	4,60	2,04
(AC) <sub>18/19</sub>		1,77	2,53	1,15	2,04
(AC) <sub>18/20</sub>	2,21	0,63	0,00	2,04	



	(AC) <sub>18/21</sub>	1,33	7,59	4,60	12,24
	(AC) <sub>19/19</sub>	10,62	5,06	8,05	2,04
	(AC) <sub>19/20</sub>	4,42	1,90	3,45	0,00
	(AC) <sub>19/21</sub>	0,44	0,63	0,00	2,04
	(AC) <sub>19/22</sub>	0,44	0,63	0,00	2,04
	(AC) <sub>20/20</sub>	2,65	0,00	0,00	0,00
	(AC) <sub>20/21</sub>	0,88	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>10/10</sub>	0,00	4,17	6,25	2,04
	(TG) <sub>10/11</sub>	2,17	3,57	4,17	4,08
	(TG) <sub>10/22</sub>	0,00	0,60	0,00	0,00
	(TG) <sub>11/11</sub>	24,35	36,90	36,46	32,65
	(TG) <sub>11/12</sub>	45,22	26,19	28,13	28,57
	(TG) <sub>11/13</sub>	1,30	0,60	1,04	0,00
	(TG) <sub>11/14</sub>	3,91	1,79	2,08	2,04
	(TG) <sub>11/17</sub>	0,43	2,38	1,04	6,12
	(TG) <sub>11/18</sub>	1,74	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>11/20</sub>	0,43	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>11/21</sub>	0,87	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>11/24</sub>	0,43	1,19	2,08	0,00
HSMS702	(TG) <sub>11/25</sub>	2,17	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>12/12</sub>	8,26	11,31	9,38	8,16
	(TG) <sub>12/13</sub>	0,43	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>12/14</sub>	0,87	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>12/18</sub>	0,43	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>12/22</sub>	0,87	0,60	0,00	2,04
	(TG) <sub>12/24</sub>	1,30	1,19	1,04	0,00
	(TG) <sub>12/25</sub>	1,74	1,19	1,04	2,04
	(TG) <sub>13/13</sub>	1,74	7,14	6,25	12,24
	(TG) <sub>13/14</sub>	0,43	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>14/14</sub>	0,00	0,60	0,00	0,00
	(TG) <sub>17/24</sub>	0,00	0,60	1,04	0,00
	(TG) <sub>18/18</sub>	0,43	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>21/24</sub>	0,43	0,00	0,00	0,00
HSMS801	(AC) <sub>11/15</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
	(AC) <sub>12/17</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
	(AC) <sub>12/21</sub>	0,00	0,60	1,08	0,00
	(AC) <sub>14/22</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
	(AC) <sub>15/15</sub>	1,33	0,00	0,00	0,00
	(AC) <sub>15/17</sub>	2,65	0,00	0,00	0,00
	(AC) <sub>15/19</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
	(AC) <sub>15/20</sub>	0,44	1,81	3,23	0,00
	(AC) <sub>15/21</sub>	3,10	1,20	0,00	2,00
	(AC) <sub>15/22</sub>	1,77	0,60	0,00	2,00
	(AC) <sub>15/23</sub>	0,88	0,60	0,00	2,00

(AC) <sub>15/25</sub>	0,88	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>15/26</sub>	0,00	1,20	1,08	0,00
(AC) <sub>15/27</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>16/17</sub>	0,88	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>16/20</sub>	1,77	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>16/22</sub>	0,00	0,60	0,00	2,00
(AC) <sub>17/17</sub>	4,87	1,20	1,08	2,00
(AC) <sub>17/19</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>17/20</sub>	1,77	0,60	0,00	2,00
(AC) <sub>17/21</sub>	8,85	4,22	4,30	6,00
(AC) <sub>17/22</sub>	3,54	6,02	5,38	6,00
(AC) <sub>17/23</sub>	3,54	1,20	1,08	2,00
(AC) <sub>17/25</sub>	2,65	2,41	3,23	0,00
(AC) <sub>17/26</sub>	0,44	0,60	0,00	2,00
(AC) <sub>17/27</sub>	0,00	1,81	3,23	0,00
(AC) <sub>18/21</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>18/24</sub>	0,00	0,60	0,00	2,00
(AC) <sub>19/21</sub>	0,88	1,20	1,08	2,00
(AC) <sub>19/22</sub>	1,33	0,60	0,00	2,00
(AC) <sub>19/23</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>19/27</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>20/20</sub>	0,88	0,60	0,00	0,00
(AC) <sub>20/21</sub>	7,52	18,07	20,43	12,00
(AC) <sub>20/22</sub>	1,77	6,02	6,45	2,00
(AC) <sub>20/23</sub>	0,88	1,20	1,08	2,00
(AC) <sub>20/24</sub>	0,88	0,60	1,08	0,00
(AC) <sub>20/25</sub>	1,33	1,20	2,15	0,00
(AC) <sub>20/26</sub>	1,77	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>21/21</sub>	10,18	4,82	3,23	6,00
(AC) <sub>21/22</sub>	6,64	14,46	12,90	16,00
(AC) <sub>21/23</sub>	2,65	3,61	4,30	2,00
(AC) <sub>21/24</sub>	0,88	2,41	4,30	0,00
(AC) <sub>21/25</sub>	3,98	3,61	3,23	6,00
(AC) <sub>21/26</sub>	1,33	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>21/27</sub>	0,88	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>21/28</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>22/22</sub>	5,75	2,41	3,23	0,00
(AC) <sub>22/23</sub>	0,00	7,23	9,68	6,00
(AC) <sub>22/24</sub>	0,00	0,60	1,08	0,00
(AC) <sub>22/25</sub>	0,88	1,81	1,08	4,00
(AC) <sub>22/27</sub>	0,44	0,60	0,00	2,00
(AC) <sub>23/23</sub>	1,33	3,01	1,08	6,00
(AC) <sub>23/25</sub>	0,88	0,00	0,00	0,00
(AC) <sub>23/26</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00

	(AC) <sub>24/24</sub>	0,88	0,00	0,00	0,00
	(AC) <sub>24/25</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
	(AC) <sub>25/25</sub>	0,88	0,60	0,00	2,00
	(AC) <sub>27/27</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>16/22</sub>	0,88	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>18/18</sub>	10,62	2,94	2,06	4,00
	(TG) <sub>18/19</sub>	5,75	7,06	5,15	12,00
	(TG) <sub>18/20</sub>	0,44	3,53	5,15	0,00
	(TG) <sub>18/21</sub>	17,70	20,59	21,65	14,00
	(TG) <sub>18/22</sub>	3,98	4,71	5,15	2,00
	(TG) <sub>18/23</sub>	1,77	1,76	3,09	0,00
	(TG) <sub>18/24</sub>	0,00	1,76	2,06	2,00
	(TG) <sub>19/19</sub>	15,04	1,76	1,03	2,00
	(TG) <sub>19/20</sub>	1,33	0,59	1,03	0,00
	(TG) <sub>19/21</sub>	7,52	7,65	8,25	8,00
	(TG) <sub>19/22</sub>	5,31	11,76	13,40	12,00
	(TG) <sub>19/23</sub>	1,33	2,94	1,03	4,00
	(TG) <sub>19/24</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>20/20</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
HSMS006	(TG) <sub>20/21</sub>	0,88	2,94	3,09	2,00
	(TG) <sub>20/22</sub>	0,88	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>20/23</sub>	1,33	12,94	12,37	16,00
	(TG) <sub>20/24</sub>	0,44	0,59	0,00	2,00
	(TG) <sub>21/21</sub>	5,31	2,35	2,06	4,00
	(TG) <sub>21/22</sub>	4,87	4,71	4,12	8,00
	(TG) <sub>21/23</sub>	2,21	2,35	2,06	4,00
	(TG) <sub>21/24</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>21/25</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>22/22</sub>	4,87	2,35	2,06	2,00
	(TG) <sub>22/23</sub>	3,98	0,59	0,00	2,00
	(TG) <sub>22/24</sub>	0,44	0,59	0,00	0,00
	(TG) <sub>22/25</sub>	0,00	0,59	0,00	0,00
	(TG) <sub>23/23</sub>	0,44	2,35	4,12	0,00
	(TG) <sub>23/24</sub>	0,88	0,00	0,00	0,00
	(TG) <sub>25/25</sub>	0,00	0,59	1,03	0,00

**7. Pielikums** Mikrosatelītu HSMS alēļu frekvenču un heterozigotātes indeksu sadalījums  
juvenīlā idiopātiskā artrīta un tā subformu pacientu un kontroles 1 grupās

Mikrosatelīts	Alēles	Alēļu frekvences (%)				Heterozigotātes indekss sagaidāmais / iegūtais			
		Kontrole 1	JIA	JIoA	JIpA	Kontrole	JIA	JIoA	JIpA
HSMS602	167	0,22	0,30	0,00	0,00				
	168	17,92	6,29	6,84	5,10				
	169	46,68	58,68	59,47	57,14				
	170	4,87	14,67	13,68	16,33	0,71 /	0,61 /	0,60 /	0,62 /
	171	14,38	8,68	10,53	7,14	0,60	0,45	0,45	0,46
	177	10,62	8,98	8,42	13,27				
	178	5,31	2,40	1,05	1,02				
HSMS701	(AC) <sub>14</sub>	0,22	0,32	0,57	0,00				
	(AC) <sub>15</sub>	0,66	8,54	6,90	10,42				
	(AC) <sub>16</sub>	28,10	23,42	24,14	23,96				
	(AC) <sub>17</sub>	15,71	10,76	12,64	6,25				
	(AC) <sub>18</sub>	7,08	18,67	16,09	22,92	0,77 /	0,81 /	0,80 /	0,82 /
	(AC) <sub>19</sub>	31,86	26,58	29,89	20,83	0,61	0,88	0,84	0,94
	(AC) <sub>20</sub>	14,60	6,65	6,90	6,25				
	(AC) <sub>21</sub>	1,55	4,75	2,87	8,33				
HSMS702	(AC) <sub>22</sub>	0,22	0,32	0,00	1,04				
	(TG) <sub>10</sub>	1,09	6,25	8,33	4,08				
	(TG) <sub>11</sub>	53,70	54,76	55,73	53,06				
	(TG) <sub>12</sub>	33,70	25,89	24,48	24,49				
	(TG) <sub>13</sub>	2,83	7,44	6,77	12,24				
	(TG) <sub>14</sub>	2,61	1,49	1,04	1,02				
	(TG) <sub>17</sub>	0,22	1,49	1,04	3,06	0,60 /	0,69 /	0,69 /	0,68 /
	(TG) <sub>18</sub>	1,52	0,00	0,00	0,00	0,65	0,50	0,50	0,50
	(TG) <sub>20</sub>	0,22	0,00	0,00	0,00				
	(TG) <sub>21</sub>	0,65	0,00	0,00	0,00				
	(TG) <sub>22</sub>	0,43	0,60	0,00	1,02				
	(TG) <sub>24</sub>	1,09	1,49	2,08	0,00				
(TG) <sub>25</sub>	1,96	0,60	0,52	1,02					
HSMS801	(AC) <sub>12</sub>	0,22	0,30	0,54	0,00	0,84 /	0,82 /	0,82 /	0,83 /
	(AC) <sub>14</sub>	0,22	0,00	0,00	0,00	0,73	0,87	0,91	0,84
	(AC) <sub>15</sub>	6,67	2,71	2,15	3,00				
	(AC) <sub>16</sub>	1,33	0,30	0,00	1,00				
	(AC) <sub>17</sub>	17,56	9,64	9,68	11,00				
	(AC) <sub>18</sub>	0,22	0,30	0,00	1,00				
	(AC) <sub>19</sub>	2,00	0,90	0,54	2,00				
	(AC) <sub>20</sub>	10,00	15,36	17,20	9,00				
(AC) <sub>21</sub>	29,11	29,52	29,03	29,00					

	(AC) <sub>22</sub>	14,22	21,69	21,51	21,00				
	(AC) <sub>23</sub>	6,22	9,94	9,14	13,00				
	(AC) <sub>24</sub>	2,00	2,11	3,23	1,00				
	(AC) <sub>25</sub>	6,44	5,12	4,84	7,00				
	(AC) <sub>26</sub>	2,00	0,90	0,54	1,00				
	(AC) <sub>27</sub>	1,56	1,20	1,61	1,00				
	(AC) <sub>28</sub>	0,22	0,00	0,00	0,00				
	(TG) <sub>16</sub>	0,44	0,00	0,00	0,00				
	(TG) <sub>18</sub>	25,44	22,65	23,20	19,00				
	(TG) <sub>19</sub>	25,88	16,76	15,46	20,00				
	(TG) <sub>20</sub>	3,10	10,29	10,82	10,00				
HSMS006	(TG) <sub>21</sub>	22,35	21,47	21,65	22,00	0,79 / 0,63	0,83 / 0,88	0,83 / 0,88	0,83 / 0,88
	(TG) <sub>22</sub>	15,04	13,82	13,40	14,00				
	(TG) <sub>23</sub>	6,19	12,65	13,40	13,00				
	(TG) <sub>24</sub>	1,33	1,47	1,03	2,00				
	(TG) <sub>25</sub>	0,22	0,88	1,03	0,00				

**8. Pielikums** 14. hromosomas proteasomu proteīnu gēnu viena nukleotīda polimorfismu alēļu frekvenču sadale juvenīlā idiopātiskā artrīta un kontroles grupās

Gēns		<i>PSMB5</i>		<i>PSMA6</i>		<i>PSMC6</i>		<i>PSMA3</i>	
ID numurs		rs11543947	rs5807825	rs2277460	rs1048990	rs2295826	rs2295827	rs2348071	
Motīvs		c.70C>T	c.-4543_-4544insC	c.-110C>A	c.-8C>G	c.86-104A>G	c.86-46C>T	c.543+138G>A	
MAF	Kontrole (175)	9,14	42,00	6,57	16,25	11,71	19,14	30,00	
	JIA (139)	7,55	46,40	11,87	12,50	20,86	21,58	34,17	
	JIoA (84)	5,36	52,38	12,50	12,70	24,40	24,40	34,52	
	JIpA (42)	9,52	38,10	9,52	12,07	16,67	17,86	34,52	
Lokusa statistiskā analīze	JIA	$P_a$	0,48	0,27	$2,06 \times 10^{-2*}$	0,27	$1,78 \times 10^{-3*}$	0,45	0,26
		$P_b$	0,57	0,25	$2,39 \times 10^{-2*}$	0,22	$1,00 \times 10^{-3*}$	0,43	0,30
	JIoA	$P_a$	0,14	$2,63 \times 10^{-2*}$	$2,35 \times 10^{-2*}$	0,37	$2,12 \times 10^{-4*}$	0,17	0,30
		$P_b$	0,15	$2,36 \times 10^{-2*}$	$2,56 \times 10^{-2*}$	0,44	$1,00 \times 10^{-4*}$	0,20	0,32
Kontrole pret	JIpA	$P_a$	0,91	0,51	0,35	0,59	0,22	0,79	0,42
		$P_b$	1,00	0,46	0,35	0,79	0,27	0,88	0,42
Retās alēles statistiskā analīze	JIA	$P_a$	0,69	0,59	0,13	0,47	$4,65 \times 10^{-2*}$	0,61	0,55
		$P_b$	0,85	0,64	0,18	0,59	$3,13 \times 10^{-2*}$	0,71	0,61
	OR	0,81	0,84	1,91	0,74	1,99	1,16	1,21	
	(95%)	(0,46 - 1,44)	(0,61 - 1,15)	(1,09 - 3,34)	(0,43 - 1,27)	(1,29 - 3,08)	(0,78 - 1,71)	(0,86 - 1,70)	
Kontrole pret.	RR		0,83	0,92	1,81	0,77	1,78	1,13	1,14
		(95%)	(0,49 - 1,41)	(0,80 - 1,06)	(1,09 - 3,01)	(0,48 - 1,23)	(1,23 - 2,57)	(0,83 - 1,54)	(0,91 - 1,43)
	JIoA	$P_a$	0,32	0,27	0,13	0,54	$2,65 \times 10^{-2*}$	0,39	0,56
		$P_b$	0,46	0,31	0,08	0,69	$1,84 \times 10^{-2*}$	0,47	0,49
OR	0,56	0,66	2,03	0,75	2,43	1,36	1,23		
(95%)	(0,26 - 1,20)	(0,46 - 0,96)	(1,09 - 3,78)	(0,40 - 1,40)	(1,50 - 3,93)	(0,87 - 2,11)	(0,83 - 1,82)		
RR	0,59	0,82	1,90	0,78	2,08	1,27	1,15		
(95%)	(0,29 - 1,21)	(0,68 - 0,98)	(1,08 - 3,33)	(0,45 - 1,34)	(1,41 - 3,08)	(0,90 - 1,79)	(0,88 - 1,50)		

JlpA	$P_a$	1,00	0,74	0,54	0,58	0,49	0,84	0,65
	$P_b$	1,00	0,83	0,76	0,79	0,64	0,69	0,76
	OR	1,05	1,18	1,5	0,71	1,51	0,92	1,23
	(95%)	(0,47 - 2,37)	(0,72 - 1,92)	(0,65 - 3,48)	(0,30 - 1,68)	(0,78 - 2,92)	(0,50 - 1,71)	(0,74 - 2,04)
	RR	1,04	1,07	1,45	0,74	1,42	0,93	1,15
	(95%)	(0,50 - 2,17)	(0,88 - 1,29)	(0,67 - 3,13)	(0,35 - 1,57)	(0,81 - 2,48)	(0,56 - 1,54)	(0,82 - 1,61)

MAF – retās alēles (trekntekstā; c.-4543\_-4544insC gadījumā alēle bez insercijas) frekvence  $P_a$  - statistiskā ticamība pēc  $\chi^2$  kritērija;  $P_b$  – koriģētā statistiskā ticamība, aprēķināta kā vidējais lielums pēc 10'000 permutāciju analīzēm; OR un RR – starpību attiecība un relatīvais risks; CI 95% - konfidences intervāls pie 95%; \* —  $P < 0,05$  starp analizētajām grupām.

**9. Pielikums** 14. hromosomas proteasomu proteīnu gēnu viena nukleotīda polimorfismu genotipu frekvenču sadale juvenīlā idiopātiskā artrīta un kontroles grupās

Gēns			<i>PSMB5</i>		<i>PSMA6</i>		<i>PSMC6</i>		<i>PSMA3</i>
ID numurs			rs11543947	rs5807825	rs2277460	rs1048990	rs2295826	rs2295827	rs2348071
Apraksts			c.70C>T	c.-4543_-4544insC	c.-110C>A	c.-8C>G	c.86-104A>G	c.86-46C>T	c.543+138G>A
Frekvence	Hetero- zigota	Kontrole	16,00	52,00	13,14	27,50	16,57	29,14	34,86
		JIA	12,23	55,40	23,74	22,77	27,34	28,78	49,64
		JIoA	10,71	54,76	25,00	22,22	29,76	29,76	47,62
		JIpA	19,05	57,14	19,05	24,14	28,57	30,95	59,52
	Retās alēles homo- zigota	Kontrole	1,14	16,00	0,00	2,50	3,43	4,57	12,57
		JIA	1,44	18,71	0,00	2,97	7,19	7,19	9,35
		JIoA	0,00	25,00	0,00	3,17	9,52	9,52	10,71
		JIpA	0,00	9,52	0,00	0,00	2,38	2,38	4,76
Lokusa statistiskā analīze	JIA	$P_a$	0,63	0,48	$1,48 \times 10^{-2*}$	0,72	$1,36 \times 10^{-2*}$	0,61	$3,03 \times 10^{-2*}$
		$P_b$	0,64	0,49	$1,85 \times 10^{-2*}$	0,73	$1,50 \times 10^{-2*}$	0,61	$3,14 \times 10^{-2*}$
Kontrole pret	JIoA	$P_a$	0,31	0,07	$1,74 \times 10^{-2*}$	0,73	$3,18 \times 10^{-3*}$	0,28	0,14
		$P_b$	0,27	0,07	$2,13 \times 10^{-2*}$	0,73	$2,40 \times 10^{-3*}$	0,30	0,14
	JIpA	$P_a$	0,71	0,56	0,33	0,63	0,20	0,81	$1,10 \times 10^{-2*}$
		$P_b$	0,88	0,56	0,33	0,71	0,18	0,82	$9,60 \times 10^{-3*}$

MAF – retās alēles (trekntekstā; c.-4543\_-4544insC gadījumā alēle bez insercijas) frekvence  $P_a$  - statistiskā ticamība pēc  $\chi^2$  kritērija;  $P_b$  – koriģētā statistiskā ticamība, aprēķināta kā vidējais lielums pēc 10'000 permutāciju analīzēm; \* —  $P < 0,05$  starp analizētajām grupām.



**10. Pielikums** Četru SNP lokusu biežāk sastopamo haplotipu sadale un statistiskā analīze  
JIA, JIoA, JIpA un kontroles 1 grupās.

Haplotips	Apzīmējums		H1	H2	H3	H4	H5	
	Sekvence		ICAG	ICAA	DCAA	DCAG	DCGG	
Frekvence (paraugu numurs)	Kontrole (175)		30,29	17,71	6,00	27,71	6,86	
	JIA (139)		21,58	15,83	0,00	26,98	6,47	
	JIoA (84)		19,64	12,50	0,00	28,57	8,33	
	JIpA (42)		26,19	21,43	0,00	22,62	4,76	
Statistiskā analīze; Kontrole pret	JIA	$P_a$	0,15	0,68	$7,13 \times 10^{-4*}$	0,91	0,83	
		$P_b$	0,12	0,79	$1,00 \times 10^{-3*}$	1,00	0,66	
	(95%)	OR	0,73	0,92	-	R	0,97	
			(0,47 - 1,13)	(0,56 - 1,50)	-		(0,49 - 1,92)	
		RR	0,71	0,89	-	0,97	0,94	
			(0,54 - 0,93)	(0,63 - 1,27)	-	(0,75 - 1,25)	(0,52 - 1,70)	
	JIoA	$P_a$	0,11	0,30	$3,75 \times 10^{-3*}$	0,90	0,63	
		$P_b$	0,14	0,39	$9,00 \times 10^{-3*}$	1,00	0,81	
		OR	0,63	0,68	-		1,18	
			(0,37 - 1,06)	(0,37 - 1,24)	-	R	(0,56 - 2,48)	
	(95%)	RR	0,65	0,71	-	1,03	1,22	
			(0,46 - 0,92)	(0,45 - 1,12)	-	(0,77 - 1,38)	(0,65 - 2,30)	
		JIpA	$P_a$	0,63	0,56	$3,55 \times 10^{-2*}$	0,61	0,72
			$P_b$	0,52	0,68	$1,03 \times 10^{-1}$	0,50	0,47
	(95%)	OR	1,06	1,48	-	R	0,85	
			(0,54 - 2,08)	(0,72 - 3,04)	-		(0,26 - 2,73)	
RR		0,86	1,21	-	0,82	0,69		
		(0,58 - 1,27)	(0,76 - 1,93)	-	(0,53 - 1,26)	(0,25 - 1,94)		

SNP secība haplotipu kombinācijās: PSMA6 SNP c.-4543\_-4544insC (1.; I/D) un c.110C>A (2.), PSMC6 SNP c.86-104A>G (3.) un PSMA3 SNP c.543+138G>A (4.).

$P_a$  - statistiskā ticamība pēc  $\chi^2$  kritērija;  $P_b$  – koriģētā statistiskā ticamība, aprēķināta kā vidējais lielums pēc 10'000 permutāciju analīzēm; OR un RR – starpību attiecība un relatīvais risks; CI 95% - konfidences intervāls pie 95%; R – references haplotips OR aprēķinam; \* —  $P < 0,05$  starp analizētajām grupām.

**11. Pielikums A.** HSMS marķieru iespējamā funkcionālā nozīme DNS sekvenču līmenī atkarībā no atkārtojumu skaita.

Gēns	Marķieris	Atkārtojumi		Lokalizācija	Iespējamā funkcija		DNS liekuma izmaiņa	
		No – līdz	Biežāk sastopamais		SS izmaiņa*		Iespējamā liekuma	Spēja liekties
					DNS	RNS		
FAM177A1 (C14orf24)	HSMS602	(CAA) <sub>7-8,10-11</sub> (A) <sub>8</sub>	(CAA) <sub>7</sub> (A) <sub>8</sub>	1.introns	Ch - (CAA) <sub>7</sub> (A) <sub>8</sub> uz (CAA) <sub>10</sub> (A) <sub>8</sub>	-	-	-
		(CAA) <sub>7</sub> (A) <sub>5-8</sub>	(CAA) <sub>7</sub> (A) <sub>8</sub>		-	-	-	-
KIAA0391	HSMS701	(AC) <sub>14-22</sub>	(AC) <sub>19</sub>	3.introns	-	-	-	-
	HSMS702	(TG) <sub>10-25</sub>	(TG) <sub>11 vai 12</sub>	3.introns	-	Ch - (TG) <sub>11</sub> uz (TG) <sub>12</sub>	-	-
	HSMS801	(AC) <sub>12-28</sub>	(AC) <sub>21</sub>	4.introns	-	-	-	-
PSMA6	HSMS006	(TG) <sub>16-25</sub>	(TG) <sub>18</sub>	6.introns	Ch - (TG) <sub>19</sub> uz (TG) <sub>20</sub>	Ch - (TG) <sub>21</sub> uz (TG) <sub>22</sub>	-	-

SS – sekundārā struktūra; Ch – izmaiņas; „-, -” – neieteikmē jeb nemainās atkarībā no atkārtojumu izmaiņas; NA – nav analizēts; ↓ un ↑ iespējamā liekuma leņķa un liekšanās spēju izmaiņas. \* - pie kāda atkārtojuma nomaiņas

**11. Pielikums B.** HSMS marķieru iespējamā funkcionālā nozīme saistībā ar proteīnu piesaisti atkarībā no atkārtojumu skaita.

Gēns	Marķieris	Atkārtojumi		Lokalizācija	Iespējamā funkcija				
		No – līdz	Biežāk sastopamais		TF piesaistes vietas		Iespējamie introna procesinga un eksonu splaisinga elementi		
					Funkcija Ģimene/Matrica (virziens -/+)	& Piesaistes sekvence (Lielie burti – kodola sekvence)	Donora vai/ akceptora (3'ss) piesaistes vieta	(5'ss) un punkts	“Branch” un Cis-aktivizācijas elements
FAM177A1 (C14orf24)	HSMS602	(CAA) <sub>7,8,10</sub> (A) <sub>8</sub>	(CAA) <sub>7</sub> (A) <sub>8</sub>	1.introns	G & BPTF/FAC1.01	acaacAACAac	-	-	L or G & ISS
		(CAA) <sub>7</sub> (A) <sub>5-8</sub>	(CAA) <sub>7</sub> (A) <sub>8</sub>		-	-	-	-	L or G & ISS
KIAA0391	HSMS701	(AC) <sub>14-22</sub>	(AC) <sub>19</sub>	3.introns	-	-	-	L or G	L or G & ISS
	HSMS702	(TG) <sub>10-25</sub>	(TG) <sub>11 vai 12</sub>	3.introns	-	-	L or G & 5'ss		L or G & EIE L or G & ISS
	HSMS801	(AC) <sub>12-28</sub>	(AC) <sub>21</sub>	4.introns	-	-		L or G	L or G & ISS
PSMA6	HSMS006	(TG) <sub>16-25</sub>	(TG) <sub>18</sub>	6.introns	-	-	L or G & 5'ss	-	L or G & ISS

TF – transkripcijas faktori; L – pazūd, G – veidojas, Ch – izmainās; „-, „-“, – neieteikmē jeb nemainās atkarībā no alēles nomaiņas; NA – nav analizēts, jo nevar būt saistīts; ↓ un ↑ molekulas piesaistes aktivitātes maiņa. Cis-aktivizācijas elementi apzīmēti kā EIE (eksona identifikācijas elements) un ISS (introna spaisinga silencers).

**12. Pielikums A.** Statistiski ticami ar slimībām saistīto SNP iespējamā funkcionālā nozīme DNS sekvences līmenī atkarībā no alēles nomaiņas.

Gēns	Polimorfisms	Lokalizācija	Iespējamā funkcija			
			SS izmaiņas		DNS liekumi	
			DNS	RNS	Iespējamais liekums	Spēja liekties
PSMA6	c.-4543_-4544insC (delC>insC)	Starp gēnu rajonā	Ch	Na	-	-
	c.-110C>A	Promoteris; -1 no 5'UTR	Ch	Na	↑	↓
	c.-8C>G	5'UTR	-	Na	-	-
PSMC6	c.86-104A>G	1.introns	-	-	-	-
PSMA3	c.543+138G>A	7.introns	-	Ch	↓	↓

SS – sekundārā struktūra; , Ch – izmaiņas; „-„ – neieteikmē jeb nemainās atkarībā no atkārtojumu izmaiņas; NA – nav analizēts; ↓ un ↑ iespējamā liekuma leņķa un liekšanās spēju izmaiņas.

**12. Pielikums B** Statistiski ticami ar slimībām saistīto SNP iespējamā funkcionālā nozīme saistībā ar proteīnu piesaisti atkarībā no alēles nomaiņas.

Gēns	Polimorfisms	Lokalizācija	Iespējamā funkcija				
			TF piesaistes vietas		Iespējamie introna procesinga un eksonu splaisinga elementi		
			Funkcija & Ģimene/Matrica (virziens -/+)	Piesaistes sekvence (Lielie burti – kodola sekvence)	Akceptora (5'ss) vai/ un donora (3'ss) piesaistes vieta	Atzarošanas (Branch) punkts	Cis-aktivizācijas elements
PSMA6	c.-4543_-4544insC (delC>insC)	Starp gēnu rajonā	L & LEFF/LEF1.02 (-) L & CHR/CHR.01 (+) L & HOXF/NANOG.01 (+)	ttcattC_AAAGggaaa ccctTTG_Aatgga ccctttg_AATGgaattggc	NA	NA	NA
	c.-110C>A	Promoteris; - 1 no 5'UTR	L & ZFH/AREB6.04 (-) G & BARB/BARBIE.01 (+)	gccgcGTTTcttc aagaAAAGcggtgg	NA	NA	NA
	c.-8C>G	5'UTR	-	-	NA	NA	NA
PSMC6	c.86-104A>G	1.introns	G & NKXH/TTF1.01 (-)	ttaccCAAGtttcacatcc	L & 5'ss	L	L & EIE G & ISS 2x G & ISE 4x
PSMA3	c.543+138G>A	7.introns	L & HOMF/BARX2.01 (+) L & HBOX/GSH2.01 (+) G & EVI1/MEL1.02 (+)	ccaacacTAATgatagctg caacacTAATgatagctga caacactGATGatagct	-	Ch↑	L & EIE G & ISS G & ISE 3x

TF – transkripcijas faktori; L – pazūd, G – veidojas, Ch – izmainās; „-”, „-” – neieteikmē jeb nemainās atkarībā no alēles nomaiņas; NA – nav analizēts, jo nevar būt saistīts; ↓ un ↑ molekulas piesaistes aktivitātes maiņa. „\_” - delēcijas pozīcija c.-4543\_-4544insC gadījumā. Cis-aktivizācijas elementi apzīmēti kā EIE (eksona identifikācijas elements), ISE (introna splaisinga enhancers) un ISS (introna splaisinga silencers).

**13. Pielikums.** Transkripcijas faktori, kuru piesaistes vietas zūd vai veidojas atkarībā no analizēto HSMS marķieru vai SNP sekvenču variācijām (Genomatix Matrix Family Library (Version 0.80))

Ģimene (saime)		Matrica	
Saīsinājums	Infromācija	Saīsinājums	Infromācija
BARB	Barbiturātu – inducējamo elementu sakopojums no pro+eikariotu gēniem	BARBIE.01	Barbiturāta indukcijas elementu bokss
BPTF	Bromodomēna un PHD domēna transkripcijas faktori	FAC1.01	Fetal Alz-50 klons 1 (FAC1)
CHRF	Šūnas cikla regulātors: šūnas cikla homologijas elementi	CHR.01	Šūnas cikla gēna homologijas rajons (CDE/CHR tandēmas elementi, kas regulē šūnas cikla atkarīgo apspiešanu)
EVI1	EVI1-mileoida transformācijas proteīns	MEL1.02	MEL1 (MDS1/EVI1-līdzīgais gēns 1) DNA saistīšanās domēns 1
HBOX	Homeobox transcription factors	GSH2.01	Homeodomēna transkripcijas faktors Gsh-2
HOMF	Homeodomēna transkripcijas faktors	BARX2.01	Barx2, Homeodomēna transkripcijas faktors, kas pirmkārt saistās pie dubulta TAAT motīva
HOXF	Paralogie hox gēni 1-8 no četru hox klāstera A, B, C, D	NANOG.01	Homeodomēna transkripcijas faktors Nanog
LEFF	LEF1/TCF	LEF1.02	TCF/LEF-1, iesaistīti WnT signālā transdukcijas ceļā
NKXH	NKX homeodomēna faktori	TTF1.01	Vairogdziedzeris transkripcijas faktors-1
ZFHX	Divu atbalsta cinka pirkstu homeodomēna transkripcijas faktora	AREB6.04	AREB6 (ATp1a1 regulatorā elementa piesaistīšanās faktors 6)