

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

“D VITAMĪNA RECEPTORA GĒNA POLIMORFISMU
SAISTĪBA AR BRONHIĀLO ASTMU LATVIJAS
POPULĀCIJĀ”

Bakalaura darbs

Autors: Samanta Pļaviņa

Stud. Apl. Nr. sp18045

Darba vadītājs: Dr. biol. Natalia Paramonova

RĪGA 2021

KOPSAVILKUMS

D vitamīna receptors (VDR) nodrošina D vitamīna funkciju izpildi organismā. To kodē *VDR* – plejotropisks gēns, kas tiek asociēts ar autoimunitāti, dažādām iekaisuma un alerģiskām slimībām, tai skaitā arī bronhiālo astmu (BA). Bronhiālā astma ir ģenētiski sarežģīta un heterogēna hroniska elpceļu iekaisuma slimība. *VDR* sekvenču varianti rs731236 un rs1544410 tiek pētīti kā potenciāli bronhiālas astmas risku ietekmējoši faktori.

Šī pētījuma mērķis bija analizēt *VDR* gēna viena nukleotīda polimorfismu (SNP; *single nucleotide polymorphism*) rs731236 A/G un rs1544410 C/T asociāciju ar bronhiālo astmu Latvijas populācijā. Lai noskaidrotu šo SNP potenciālo ietekmi uz saslimšanas iespējamību, pēc restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma metodes tika genotipēti 110 bronhiālās astmas slimnieku DNS paraugi un 253 kontroles grupas paraugi.

Statistiskās analīzes rezultātā konstatējām, ka lokusa rs1544410 retās alēles homozigotais genotips TT ir statistiski būtisks slimības risku palielinošs faktors ($p = 4,56 \times 10^{-3}$, $OR_M = 2,36$, CI 95% [1,31 – 4,28]). Starp abiem lokusiem noteikta vidēji stipra nelīdzsvarotības saistība (LD; *linkage disequilibrium*) pētījuma kontroles grupā ($p < 0,0001$; $D' = 0,84$; $r^2 = 0,59$). Haplotipu analīzes rezultātā A-C un G-T identificēti kā iespējami BA risku samazinoši faktori, un A-T, G-C noteikti kā slimības risku palielinošie. Arī divu lokusu genotipu analīzē identificētas statistiski ticamas asociācijas ar BA – slimības risku iespējami palielina AA-CT un GG-TC genotipi, kamēr kā aizsargājošās formas noteikti GG-TT un AA-CC genotipi.

Lai izprastu šo ģenētisko variāciju iespējamo funkcionālo nozīmi, tika veikta bioinformātiskā jeb *in silico* analīze. Tās rezultātā noskaidrots, ka rs731236 un rs1544410 lokusu alēļu nomaiņa spēj ietekmēt transkripcijas faktoru piesaisti, kā arī DNS liekšanās spēju un ka rs731236 alternatīvās alēles rada atšķirīgas DNS sekundārās struktūras.

Apkopojot minētos pētījuma rezultātus, tika atklāta *VDR* gēna polimorfismu rs1544410 un rs731236 iespējama ietekme uz bronhiālās astmas saslimstības risku, un secināts, ka tie varētu kļūt par potenciāliem bronhiālas astmas ģenētiskajiem marķieriem Latvijas populācijā.

Bakalaura darba pētījums tika izstrādāts Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta Genomikas un Bioinformātikas laboratorijā.

Atslēgas vārdi: bronhiālā astma, D vitamīns, VDR, RFLP, rs731236, rs1544410

SUMMARY

Vitamin D receptor (VDR) provides vitamin D functions in the body. It is encoded by *VDR*, a pleiotropic gene associated with autoimmunity, various inflammatory and allergic diseases, including bronchial asthma (BA). BA is a genetically complex and heterogeneous chronic inflammatory disease of the airways. *VDR* sequence variants rs731236 and rs1544410 are being studied as potential factors influencing the risk of bronchial asthma.

The aim of this study was to analyze the association of the single nucleotide polymorphisms rs731236 and rs1544410 of the *VDR* gene with bronchial asthma in the Latvian population. To determine the potential impact of this SNP on the likelihood of disease, DNA samples from 110 bronchial asthma patients and 253 healthy controls were genotyped by restriction fragment length polymorphism method.

As a result of statistical analysis, we found that the homozygous genotype TT of the rare allele of the locus rs1544410 is a statistically significant factor that increases the risk of the disease ($p = 4.56 \times 10^{-3}$, ORM = 2.36, CI 95% [1.31 - 4.28]). A moderate linkage disequilibrium (LD; linkage disequilibrium) was found between the two loci in the study control group ($p < 0.0001$; $D' = 0.84$; $r^2 = 0.59$). As a result of the haplotype analysis, A-C and G-T were identified as possible factors reducing the risk of BA, and A-T, G-C were identified as risk increasing factors. The analysis of two locus genotypes also identified statistically significant associations with BA – AA-CT and GG-TC genotypes possibly increase the risk of the disease, while GG-TT and AA-CC genotypes were identified as protective forms.

To understand the possible functional significance of these sequence variations, a bioinformatics *in silico* analysis was performed. As a result, alternative alleles of the rs731236 and rs1544410 locus has been shown to affect the binding of transcription factors as well as the ability of DNA to bend, and rs731236 allele variant change result in the formation of distinct DNA secondary structures.

Summarizing the mentioned results of the study, the possible influence of VDR gene polymorphisms rs1544410 and rs731236 on the risk of bronchial asthma was revealed, and it was concluded that these SNPs could become potential genetic markers of bronchial asthma in the Latvian population.

The research of the bachelor's thesis was developed in the Laboratory of Genomics and Bioinformatics of the Institute of Biology of the University of Latvia.

Key words: bronchial asthma, vitamin D, VDR, RFLP, rs731236, rs1544410

SATURS

Ievads.....	5
1. Literatūras apskats.....	6
1.1. D vitamīns.....	6
1.1.1. D vitamīna metabolisms.....	6
1.1.2. D vitamīna receptors (VDR).....	7
1.1.3. D vitamīna loma imūnsistēmas regulācijā un autoimūno slimību patoģenēzē.....	8
1.1.4. D vitamīna loma bronhiālās astmas patoģenēzē.....	9
1.2. D vitamīna receptora gēns un tā polimorfismi.....	10
1.2.1. <i>VDR</i> gēns.....	10
1.2.2. <i>VDR</i> gēna polimorfismi.....	11
1.2.3. <i>VDR</i> gēna polimorfismu asociācija ar autoimūnām slimībām dažādās populācijās.....	13
1.3. Bronhiālā astma.....	14
1.3.1. Bronhiālās astmas izplatība.....	14
1.3.2. Slimības molekulārā ģenētika.....	14
2. Materiāli un metodes.....	16
2.1. DNS kolekcija.....	16
2.2. Materiāli.....	16
2.2.1. Izmantotā aparatūra.....	16
2.2.2. Izmantotais aprīkojums.....	17
2.2.3. Ķīmiskie reaģenti.....	17
2.2.4. Oligonukleotīdi.....	18
2.3. Eksperimentālās metodes.....	18
2.3.1. DNS kvalitātes un kvantitātes analīze.....	18
2.3.2. DNS izdalīšana.....	20
2.3.3. Polimerāzes ķēdes reakcija.....	21
2.3.4. Restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma metode.....	23
2.4. SNP bioinformātiskā analīze.....	24
2.4.1. Sekvences variantu izmaiņu ietekme DNS un RNS sekundāro struktūru.....	25
2.4.2. Sekvences variantu izmaiņu ietekme uz DNS liekumiem un 3D struktūru.....	25
2.4.3. Polimorfismu sekvences variantu ietekme uz transkripcijas faktoru piesaisti.....	26
2.5. Datu apstrāde un statistiskā analīze.....	26
3. Rezultāti.....	29
3.1. <i>VDR</i> gēna SNP rs731236 un rs1544410 genotipēšanas rezultāti gadījuma un kontroles grupās.....	29
3.1.1. SNP rs731236 un rs1544410 alēļu un genotipu frekvenču sadalījuma statistiskā analīze.....	29
3.1.2. Pētīto <i>VDR</i> gēna ģenētisko variāciju meta-analīze.....	30
3.1.3. Haplotipu frekvenču sadales asociācijas analīze.....	32
3.2. <i>VDR</i> gēna SNP rs731236 un rs1544410 bioinformātiskā analīze.....	33
3.2.1. Polimorfismu sekvences izmaiņu ietekme uz DNS un RNS sekundārajām struktūrām.....	33
3.2.2. Polimorfismu sekvences izmaiņu ietekme uz DNS liekumiem un 3D struktūru.....	34
3.2.3. Polimorfismu saitība ar transkripcijas faktoriem un to modifikācija atkarībā no sekvences izmaiņām.....	36
4. Diskusija.....	38
5. Secinājumi.....	42
6. Pateicības.....	43
7. Literatūras saraksts.....	44
Pielikumi.....	52

IEVADS

D vitamīnam ir labi pazīstama loma kalcija un fosfātu homeostāzē, taču, papildus tā tradicionālajām funkcijām, D vitamīnam ir svarīga loma arī dažādu alerģisku un autoimūno slimību attīstībā. Pēdējos gados D vitamīna pētījumiem ir pievērsta pastiprināta uzmanība, sakarā ar D vitamīna deficītu, kas ir atzīta par globālu veselības problēmu, kā arī pārlicinošiem molekulārās bioloģijas un citu nozaru pētījumu rezultātiem, kas liecina, ka 1,25-dihidroksi-D₃ vitamīns jeb kalcitriols (1,25(OH)₂D₃), hormonāli aktīvā D vitamīna forma, nodrošina aizsardzību pret vairākām autoimūnām slimībām, tajā skaitā arī bronhiālo astmu.

Bronhiālā astma ir izteikti poligēna un multifaktoriāla slimība, kas nozīmē, ka vairāki ģenētiskie un vides faktori ietekmē tās attīstību. Kā viens no bronhiālās riska faktoriem, kas vēljojojām tiek aktīvi pētīts, ir zems D vitamīna līmenis. D vitamīna deficīts tiek saistīts ar mūsdienu dzīvesveida izmaiņām. Taču ir arī vairāki papildus faktori, kas var ietekmēt seruma 25(OH)D₃ līmeni. Pie tiem pieder arī viena nukleotīda polimorfismi (SNPs; *single nucleotide polymorphisms*) D vitamīna receptora (VDR; *vitamin D receptor*) gēnā.

VDR gēns ir lokalizēts cilvēka 12. hromosomā (12q.13.11; GRCh38:CM000674.2) un tas kodē VDR proteīnu – ligand-atkarīgu transkripcijas faktoru, kas saistoties ar 1,25(OH)₂D₃ spēj regulēt vairāk kā 900 gēnu ekspresiju, no kuriem daļa iesaistīta arī imūnsistēmas regulācijā. Tiek uzskatīts, ka plaši pētītās VDR gēna ģenētiskās variācijas rs731236 un rs1544410 spēj potenciāli ietekmēt VDR aktivitāti. Līdzšinējie pētījumi liecina, ka šiem SNP ir asociācija ar autoimūno un alerģisko slimību risku dažādās populācijās.

Mērķis: Šī pētījuma mērķis bija noskaidrot iespējamo asociāciju starp D vitamīna receptora gēna polimorfismiem rs731236 un rs1544410 un bronhiālo astmu Latvijas populācijā.

Uzdevumi:

1. Izdalīt DNS no BA slimnieku un veselu cilvēku asinīm, un genotipēt D vitamīna receptora gēna (VDR) polimorfismus rs731236 un rs1544410 atjaunotajā kolekcijā.
2. Raksturot Latvijas populācijā noteikto reto alēļu frekvenču (MAF) lielumu atbilstību starppopulāciju klasiskajam sadalījumam.
3. Veikt genotipēšanas rezultātu statistisko analīzi un identificēt BA aizsargājošās un riska alēles, genotipus, haplotipus un divu lokusu kombināciju genotipus.
4. Raksturot SNP funkcionālu nozīmi, izmantojot dažādas bioinformātikas metodes.
5. Noskaidrot VDR gēna polimorfismu rs731236 un rs1544410 asociāciju ar BA risku Latvijas populācijā, balstoties uz iegūtajiem rezultātiem.

1. LITERATŪRAS APSKATS

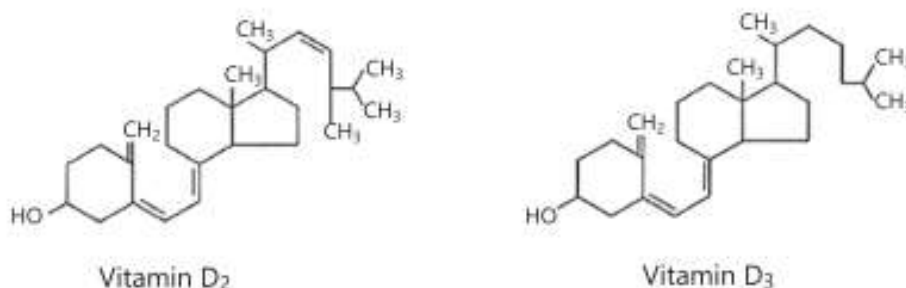
1.1. D vitamīns

D vitamīni ir taukos šķīstošu prohormonu grupa, kas pēc ķīmiskās uzbūves pieder pie sekosteroīdiem (Verstuyf et al. 2010). Tradicionālā D vitamīna bioloģiskā loma organismā tiek saistīta ar kalcija un fosfātu homeostāzes regulāciju. Kā viena no svarīgākajām D vitamīna funkcijām organismā tiek uzskatīta kaulu veselības uzturēšana. Taču pēdējo gadu pētījumos aktualizētas ir tādas netradicionālas D vitamīna funkcijas, kā, piemēram, imūnsistēmas darbības regulācija (Khammissa et al. 2018).

1.1.1. D vitamīna metabolisms

Dabā D vitamīns kā provitamīns pastāv divās formās: 1) D₃ vitamīns jeb holekalciferols un 2) D₂ jeb ergokalciferols (Umar et al. 2018). D₂ un D₃ atšķiras ar sānu ķēdes struktūru (1.1. attēls), taču abām šīm formām piemīt prohormona funkcija un to metabolisma ceļi ir līdzīgi, tomēr D₂ forma ir retāk sastopama, un tā ir ar zemāku bioloģisko efektivitāti (Gil et al. 2018; Shieh et al. 2016).

D₃, bioloģiski neaktīvā D vitamīna forma, tiek ražots ādas epidermā no 7-dehidroholesterola neenzimātiskā fotobiogēnēzes procesā (Holick 1995 cit. pēc Christakos et al. 2015; Gil et al. 2018). Ultravioletā starojuma (UVB, 290-315 nm) ietekmē notiek 7-dehidroholesterola fotolīze, kā rezultātā veidojas D₃ provitamīns, kas tiek pakļauts temperatūras jutīgai trīs dubulto saišu pārkārtošanai un izomerizējas par D₃ vitamīnu. D vitamīna sintēze ādā ir galvenais D vitamīna avots, un tā ir atkarīga no ādas pigmentācijas (melanīna) līmeņa un UVB intensitātes, kas ir atkarīga no sezonas (Holick et al. 1980; Webb et al. 1989 cit. pēc Bikle 2014; Christakos et al. 2015). D₃ vitamīns var tikt uzņemts organismā arī ar dzīvnieku izcelsmes pārtiku (Bikle 2014).



1.1. attēls. D₃ un D₂ vitamīna struktūra (Gil et al. 2018)

Figure 1.1. The structure of vitamin D₃ and D₂

Savukārt, D₂ vitamīns, kas ir otra galvenā bioloģiski neaktīvā D vitamīna forma, tiek sintezēts sēnēs un protozojos no D₂ provitamīna jeb ergosterola (Lips 2006).

Lai labāk izprastu veidu, kādā D vitamīna endokrīnās sistēmas traucējumi var ietekmēt cilvēka veselību, ir nepieciešams apskatīt metabolisma ceļus, kuri ir iesaistīti hormonāli aktīvās vitamīna formas 1,25(OH)₂D₃ ražošanas posmos (Henry 2011).

Sākotnēji D₃ vitamīns tiek transportēts asinsritē ar D vitamīnu saistošo proteīnu (DBP; *Vitamin D binding protein*), un tas tiek nogādāts aknās (Christakos et al. 2010). Aknās un nierēs notiek D vitamīna aktivācija divās secīgās enzimatiskās hidroksilēšanas reakcijās (Gil et al. 2018). Galvenie posmi šajā procesā: 1) D₃ 25-hidroksilēšana aknās, ko veic enzīms CYP2R1, kā rezultātā veidojas 25-hidroksivitamīns D₃(25(OH)D₃) jeb calcidiols (galvenā D vitamīna cirkulējošā forma – D vitamīna līmeņa biomarķieris), kas kompleksā ar DBP tiek transportēts uz nierēm; 2) 25(OH)D₃ 1 α -hidroksilēšana nierēs ar CYP27B1, kā rezultātā veidojas aktīvā forma 1,25(OH)₂D₃ (Khammissa et al. 2018). 1,25(OH)₂D₃ sintēze galvenokārt ir atkarīga no kalcija un fosfātu līmeņa asinīs, un tā tiek regulēta ar paratireoīdo hormonu (PTH; *parathyroid hormone*) un fibroblastu augšanas faktoru 23 (FGF-23; *fibroblast growth factor 23*) (Gil et al. 2018).

Pēc sintēzes 1,25(OH)₂D₃ un 25(OH)D₃ tiek metabolizēti par bioloģiski neaktīvu ūdenī šķīstošu skābi ar CYP24A1 palīdzību (Gil et al. 2018; Khammissa et al. 2018). Pieminētie enzīmi ir citohroma P450 (CYP; *cytochrome P450*) oksidāzes, kas ir lokalizētas endoplazmatiskajā tīklā (CYP2R1) vai arī mitohondrijos (CYP27B1 un CYP24A1) (Bikle 2014).

1.1.2. D vitamīna receptors (VDR)

Lai 1,25(OH)₂D₃ varētu veikt savu bioloģisko funkciju, tam ir jāiekļūst mērķšūnā un jāpiesaistās tās nukleārajam VDR receptoram. VDR jeb 1,25-dihidroksivitamīna D₃ receptors ir steroīdo hormonu receptors, kas pieder pie nukleāro receptoru saimes 1. subgroupas (Bizzaro et al. 2017; Wang et al. 2012). VDR regulē gēnu ekspresiju dažādos gēnos, kas saistīti ar kalcija homeostāzi, kaulu metabolismu, imūnsistēmu un kardiovaskulāro sistēmu (Khammissa et al. 2018). Nukleārie receptori spēj tieši piesaistīties pie kodola DNS, tādā veidā regulējot specifisku gēnu ekspresiju, tāpēc tie tiek klasificēti kā transkripcijas faktori. Gēnu ekspresijas regulācija ar VDR var notikt tikai tad, kad specifiskā liganda molekula, šajā gadījumā 1,25(OH)₂D₃, ir piesaistījies VDR un veikusi tā aktivāciju inducējot konformācijas izmaiņas. Tāpēc var teikt, ka VDR ir ligand-atkarīgs transkripcijas faktors (Dowd and MacDonald 2013; Tobergte et al. 2010). VDR konformācijas izmaiņas nodrošina tālāku tā heterodimerizāciju ar

retinoīda X receptoru (RXR; retinoid X receptor) un šis VDR-RXR heterodimērs var aktivēt vai represēt gēnu transkripciju piesaistoties pie konkrētām gēnu sekvencēm (Christakos et al. 2010).

Atklājums, ka VDR tiek ekspresēts gandrīz visos audu tipos, kā arī nesenākie pētījumi, kuros noskaidrotas tūkstošiem VDR piesaistes vietas (*binding sites*) visā genomā, tādā veidā kontrolējot simtiem gēnu, ir radījuši lielu interesi par D vitamīnu un tā ietekmi uz dažādiem bioloģiskajiem procesiem un saslimšanām (Bikle 2014; Wang et al. 2012).

VDR regulē vairāk kā 900 gēnu ekspresiju, kas iesaistīti visdažādākajos fizioloģiskajos procesos (Bizzaro et al. 2017). Gēni, kuru transkripcija tiek regulēta ar VDR, ir saistīti ar kaulu metabolismu, minerālvielu homeostāzes uzturēšanu, detoksifikāciju, šūnas dzīves cikla regulāciju (proliferāciju, diferenciaciju, migrāciju un nāvi) un imūnsistēmu (Hausler et al. 2011). Īpaši savarīgi ir tuvāk aplūkot gēnus, kas iesaistīti imūnsistēmas regulācijā un varētu būt saistīti ar autoimūnajām slimībām, tai skaitā arī bronhiālo astmu.

1.1.3. D vitamīna loma imūnsistēmas regulācijā un autoimūno slimību patoģenēzē

Vēsturiski D vitamīns tika asociēts galvenokārt ar kaulu metabolisma regulāciju, taču mūsdienās ir labi zināms, ka D vitamīnam ir svarīga loma gan specifiskās, gan nespecifiskās imūnās atbildes regulācijā. Uz D vitamīna iespējamo iesaisti imūnsistēmā sākotnēji norādīja atklājums, ka VDR tiek ekspresēts monocītos, dendrītiskajās šūnās un aktivētos T un B limfocītos, bet mūsdienās tiek uzskatīts, ka VDR tiek ekspresēts gandrīz visos imūnšūnu tipos (Bizzaro et al. 2017; Lagishetty et al. 2011; Yang et al. 2013).

Ir noskaidrots, ka vairākiem imūnšūnu tipiem ir spēja veikt seruma 25(OH)D₃ hidroksilēšanu, tādā veidā nodrošinot lokālu 1,25(OH)₂D₃ koncentrācijas regulāciju iekaisuma vietā, kas vēl padziļinātāk liecina par D vitamīna lomu imūnšūnu funkciju nodrošināšanā (Dankers et al. 2017).

Specifiskās imūnās atbildes reakcijas ietver T un B limfocītu spēju producēt citokīnus un imunoglobulīnus, lai specifiski apkarotu iekaisuma avotu, kura antigēnu tām prezentē kāda no antigēnu prezentējošām šūnām (piemēram, makrofāgi un dendrītiskās šūnās) (Tobergte and Curtis 2010). D vitamīnam ir nomācošs efekts uz šīm specifiskās imunitātes reakcijām. VDR spēj nomākt dažādu gēnu ekspresiju imūnšūnās, kā piemēram, citokīnu gēnu ekspresiju aktivētos T limfocītos (Lin 2016).

D vitamīna saistība ar bronhiālajai astmai raksturīgo otrā tipa T-līdzētājšūnu (Th2; *T helper type 2 cells*) imūnās atbildes regulāciju ir neskaidra un viedokļi dalās (Cantorna et al. 2015). *In vitro* pētījumos noskaidrots, ka D vitamīns inhibē iekaisumu veicinošu CD4⁺ Th1 šūnu

aktivitāti un to citokīnu produkciju (Sassi et al. 2018) un stimulē Th2 šūnu atbildes reakcijas, veicinot IL-4, IL-5 un IL-10 produkciju, tādā veidā novirzot imūno atbildi no Th1 šūnu iekaisumu veicinošās stadijas uz Th2 stadiju jeb veicot T limfocītu fenotipa maiņu un nodrošinot abu Th šūnu tipu balansu. Ir noskaidrots, ka tas palīdz limitēt potenciālus audu bojājumus, kas saistīti ar Th1 šūnu imūno atbildi (Yang et al. 2013). Šis būtu vairāk attiecināms vispārīgi uz autoimunitāti, kurai raksturīga Th1 pārprodukcija (Cantorna et al. 2008). Taču pastāv arī otrs viedoklis – astmai raksturīgā pārspīlētā Th2 imūnā atbilde D vitamīna regulatorās darbības rezultātā tiek nomākta samazinot IL-4 un IL-13 produkciju. Dažādi pētījumi norāda uz to, ka D vitamīns palielina regulatoro T šūnu aktivitāti un *supresē* jeb nomāc Th17 imūnās atbildes reakcijas, tādā veidā samazinot iekaisumu (Harrison et al. 2020). D vitamīns stimulē arī palielinātu dabīgo galētājšūnu (NK šūnu) attīstību. NK šūnas producē pretiekaisuma citokīnus (Cantorna et al. 2008).

D vitamīna loma imūnsistēmas regulācijā ir sarežģīta un vēl jāpētām nav līdz galam noskaidrota, taču, līdzšinējie pētījumi par D vitamīna ietekmi uz dažādiem imūnšūnu tipiem, norāda uz tā iespējamo svarīgo lomu autoimūno slimību patoģenēzē (Yang et al. 2013).

Tiek uzskatīts, ka dažādu imūnsistēmas stimulu ietekmē var tikt regulēta VDR ekspresija šūnās, kas varētu būt kā iespējams mehānisms, lai modulētu imūno atbildi ar šī nukleārā receptora palīdzību – aktivējot vai represējot gēnu transkripciju (Kongsbak et al. 2013). Nesenā Koivisto un kolēģu pētījumā (Koivisto et al. 2020) tika noskaidroti gēni, kuri iesaistīti imūnsistēmas funkciju nodrošināšanā, un kuru ekspresija tiek kontrolēta ar VDR. Kopumā tika identificēti 15 gēni, no kuriem pieci kodē proteīnus, kas saistīti ar autoimunitāti: *CD93*, *NINJI*, *ACVRL1*, *SRGN* un *CEBPB*.

1.1.4. D vitamīna loma bronhiālās astmas patoģenēzē

Līdzīgi kā ar D vitamīna lomu imūnsistēmas regulācijā, arī D vitamīna saistība ar astmas patoģenēzi nav līdz galam noskaidrota un pētījumi turpinās. Vairākos pētījumos ir apstiprinājies, ka zems D vitamīna līmenis, ir iespējams riska faktors astmas attīstībā un ietekmē slimības smaguma pakāpi (Litonjua 2012). GWAS rezultāti liecina, ka vairāk kā 65% no seruma D vitamīna līmeņa izmaiņām varētu tikt izskaidrotas ar ģenētiskā fona īpatnībām (Ruiz-Ballesteros et al. 2020).

Neskaitāmos pētījumos dažādu autoimūno saslimšanu risks tiek saistīts tieši ar D vitamīna deficītu (Dankers et al. 2017). Bronhiālā astma, tāpat kā citas bieži sastopamas autoimūnās saslimšanas, kurām raksturīga pārspīlētā imūnreakcija, ir saistītas ar hronisku iekaisumu. Šajās iekaisuma reakcijās ir iesaistīti dažādi imūnšūnu tipi – makrofāgi, dendrītiskās

šūnas, un T limfocīti, kuros D vitamīnam ir svarīgas gēnu regulatorās funkcijas (Wöbke et al. 2014). T regulatorās šūnām ir svarīga loma imūnās homeostāzes uzturēšanā, kas saistīta ar atbildes reakciju uz alergēniem (tāpat BA gadījumā), nomācot Th2 mediēto eozinofilo iekaisumu un mazinot gļotu sekrēciju elpceļos (Dankers et al. 2017).

VDR ir plaši ekspresēts visā epitēlija šūnu slānī plaušās un ietekmē vairāku šūnu tipu proliferāciju un diferenciaciju. Attiecībā uz astmu, D vitamīnam ir nomācoša ietekme uz elpceļu gludo muskuļu proliferāciju, un tas norāda uz D vitamīna iespējamo iesaisti BA elpceļu remodelācijas procesā (Hutchinson et al. 2018).

Līdzšinējie pētījumi liecina, ka D vitamīnam ir svarīga loma arī plaušu attīstībā embrionālajā attīstības periodā. Tāpat tiek uzskatīts, ka tam ir nozīme arī augļa agrīnās imūnsistēmas attīstībā. Šie atklājumi uzsver D vitamīna deficīta lomu BA attīstībā (Litonjua 2012).

1.2. D vitamīna receptora gēns un tā polimorfismi

1.2.1. *VDR* gēns

VDR proteīnu kodē *VDR* gēns, kas pēc nosaukuma zināms arī kā *NR111* vai *PPP1R163*, kas lokalizēts 12. hromosomā 12q.13.11 pozīcijā, tā koordinātes genomā ir GRCh38:CM000674.2. Šī gēna garums ir ap 100 kbp, taču tikai 4,6 kbp kodē VDR proteīnu. *VDR* gēns sastāv no 8 introniem un 9 eksoniem. Pirmais eksons ietver gēna promotera reģionu, un tam ir vismaz sešas izoformas. 2.-3. eksons kodē DNS piesaistes domēnu (DBD; *DNA-binding domain*) un 6.-9. eksons kodē liganda piesaistes domēnu (LBD, *ligand binding domain*). Detalizēta informācija par *VDR* gēnu ņemta no NCBI gēnu datubāzes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Pēc šīs datubāzes datiem, *VDR* gēnam līdz šim ir zināmi seši transkripti un to esamība ir pierādīta sekvences līmenī, taču vēl divi transkriptu varianti definēti kā iespējami, jo modelēti ar datorprogrammu palīdzību.

VDR gēna mutācijas var būtiski ietekmēt receptora funkcionalitāti. Mutācijas 2. un 3. eksonos izmaina DBD cinka pirkstu struktūru, tādā veidā radot nefunkcionālu VDR, pie kura nevar piesaistīties D vitamīns. Mutācijas 5' *VDR* promotera reģionā var izmainīt gēna ekspresiju un radīt mRNA līmeņa izmaiņas, kamēr mutācijas UTR 3' reģionā var ietekmēt RNS stabilitāti un translācijas efektivitāti (Imani et al. 2019; Uitterlinden et al. 2004).

VDR ir zināms kā plejotropisks gēns, kas tiek asociēts ar autoimunitāti, dažādām iekaisuma un alergiskām slimībām, tāpēc ir nozīmīgi veikt tā polimorfismu pētījumus dažādās slimību grupās un populācijās (Hutchinson et al. 2018).

1.2.2. *VDR* gēna polimorfismi

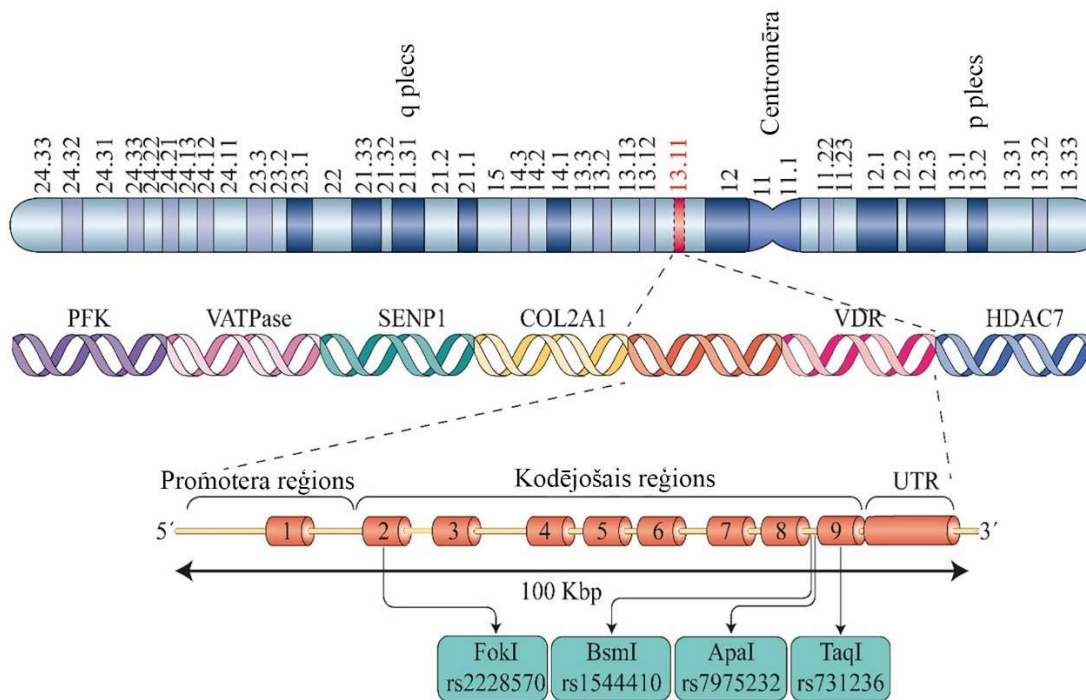
Jau pagājušā gadsimta beigās dažādos pētījumos tika noskaidrots, ka mutācijām *VDR* gēna kodējošā reģionā ir asociācija ar D vitamīna rezistentu rahītu. Šiem pacientiem klasiskā rahīta terapija ar D vitamīnu nebija efektīva, jo mutāciju rezultātā tika izmainīta *VDR* molekulārā struktūra. Šīs izmaiņas spēja ietekmēt liganda jeb $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ piesaisti *VDR*, ja punktveida mutācija atradās LBD kodējošās sekvenču reģionā, kā arī paša nukleārā receptora piesaisti DNS, ja SNP atradās cinka pirkstu kodējošā reģionā DBD. Šie pētījumi pastiprināti norādīja uz *VDR* nozīmi D vitamīna funkciju nodrošināšanā, kā arī aizsāka *VDR* polimorfismu pētījumus saistībā ar citām slimībām (Christakos et al. 2015; Hughes et al. 1987; Kemeny and Fisher 2019).

Starp pašiem noderīgākajiem ģenētiskajiem marķieriem, kuri tiek izmantoti, lai noskaidrotu gēnus, kas ir iesaistīti slimības izraisīšanā, ir viena bāzu pāra variācijas genomos. Viena bāzu pāra izmaiņa, kura ir atrodama vismaz 1% no populācijas, tiek saukta par SNP (Khlestkina et al. 2006). Pēc Ensembl datu bāzes (<https://www.ensembl.org>) datiem par SNP *VDR* gēnā, kopā ir identificēti 15174 SNPs, lielākoties gan aptverot gēna introniskos jeb nekodējošos reģionus (14426 SNPs). No kodējošajā gēna daļā identificētajiem polimorfismiem 180 ir sinonīmi (sSNPs; *synonymous single nucleotide polymorphisms*) un 365 ir nesinonīmi (nsSNPs; *non-synonymous single nucleotide polymorphisms*).

Pie visplašāk pētītajiem polimorfismiem pieder ApaI G/T (rs7975232), BsmI T/C (rs1544410), TaqI A/G (rs731236) un FokI C/T (rs10735810). Šie polimorfismi ir nosaukti pēc atbilstošajiem restrikcijas enzīmiem, kas izmantoti restrikcijas fragmentu garuma polimorfismu analizē (Hutchinson et al. 2018).

Šo polimorfismu loma *VDR* izmaiņās ir atkarīga no to lokalizācijas *VDR* gēnā. FokI atrodas DBD tuvu 5' reģionam (*VDR* 2. eksonā), TaqI atrodas 9. eksonā LBD reģionā, ApaI 9. eksonā un BsmI 8. intronā. *VDR* gēna struktūra un minēto SNPs lokalizācija tajā attēlota shēmā (1.2. attēls.). Polimorfismi ApaI, BsmI un TaqI neizraisa strukturālas izmaiņas *VDR* proteīnā, taču FokI izraisa strukturāli atšķirīgu proteīna variantu veidošanos, alternatīva transkripcijas starta kodona izveides dēļ (Yang et al. 2013; Yang et al. 2012). Lai gan BsmI un TaqI SNPs neveido šīs strukturālās izmaiņas, dažādos pētījumos citās populācijās, tiem ir konstatēta stripa nelīdzsvarotības saistība (*linkage disequilibrium*; LD), kas nozīmē, ka ģenētiskās variācijas vienā no lokusiem ir tieši atkarīgas no konkrētām alēlēm citos tās pašas hromosomas lokusos, un tas rada iespēju analizēt haplotipus (Takeuchi et al. 2005; Yang et al. 2013). Pēc Ensembl datu bāzes (<https://www.ensembl.org>) 1000 genomu 3. fāzes projekta datiem, Eiropas

populācijās ir noteikta stipra LD starp rs1544410 un rs731236, attiecīgi, D' rādītājs svārstās no 0,96 līdz 1,00 un r^2 no 0,94 līdz 0,96.



1.2. attēls. *VDR* gēna atrašanās vieta genomā, tā eksonu un intronu struktūra un pētītāko SNP atrašanās vieta gēnā. *VDR* gēns atrodas cilvēka 12. hromosomā, sastāv no deviņiem eksoniem un tajā iespējami vairāki SNPs, ieskaitot ApaI (G/T), BsmI (T/C), FokI (T/C) un TaqI (A/G) (Mohammadi et al. 2020 a).

Figure 1.2. Genomic region and exon-intron structure of the *VDR* gene and the location of the most studied SNPs in this gene. The *VDR* gene is placed on human chromosome 12, contains nine exons and encompasses various SNPs including ApaI (G/T), BsmI (T/C), FokI (T/C), and TaqI (A/G).

rs731236 ir *VDR* gēna sinonīma variācija (sSNP) aminoskābes interleikīna kodējošā reģionā (p.Ile352=). Biežā alēle ir A un retā G. rs731236 lokalizācija gēnā c.1056T>C un genomā NC_000012.11:g.48238757A>G. NCBI dsSNP datu bāzē ir ziņas par pieciem *VDR* gēna transkriptiem, no kuriem četros SNP variācija ir nemainīga (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). NCBI *ClinVar* datu bāzē norādīta rs731236 klīniskā nozīme saistībā ar D vitamīna rezistentu rahītu (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

rs1544410 ir *VDR* gēna introna variācija. Biežā alēle ir C un retā T. rs1544410 lokalizācija gēnā ir NG_008731.1:g.63980 G>A un genomā NC_000012.11:g.48239835C>T. NCBI dsSNP datu bāzē ir ziņas par pieciem *VDR* transkripta variantiem, un, līdzīgi kā iepriekš, četros no tiem SNP variācija ir nemainīga (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

Šo SNP pētījumu nozīmi uzsver tas, ka dažādi autori norādījuši, ka šie *VDR* polimorfismi varētu kļūt par nozīmīgākiem astmas biomarķieriem, nekā cirkulējošā 25(OH)D₃ līmenis, kas (Han et al. 2016; Jolliffe et al. 2016).

1.2.3. *VDR* gēna polimorfismu asociācija ar autoimūnām slimībām dažādās populācijās

Pazemināts D vitamīna līmenis, kā arī *VDR* polimorfismi, tiek uzskatīti par svarīgiem riska faktoriem tādu autoimūno slimību attīstībā kā Multiplā skleroze (MS), 1. Tipa cukura diabēts (T1DM), Reimatoīdais artrīts (AR), Greivsa slimība, Sistēmiskā sarkanā vilkēde (SLE) un Iekaisīgā zarnu slimība (Mohammadi et al. 2020 b).

VDR polimorfismi ApaI, BsmI, TaqI un FokI tiek potenciāli asociēti ar autoimūno saslimšanu risku. Starp dažādām slimībām un populācijām pastāv atšķirības tajā, vai tie ir aizsargājošie vai riska faktori (Dankers et al. 2017).

VDR gēna SNP ietekme uz *VDR* ekspresiju atšķiras starp dažādām populācijām. Piemēram, Zhou un kolēģu veiktajā meta-analīzē par *VDR* polimorfismu asociāciju ar Greivsa slimību, tika noskaidrots, ka BsmI, FokI un ApaI polimorfismiem ir iespējama asociācija ar šo slimību Āzijas populācijā, taču Kaukāziešu populācijā šādas asociācijas nav, tāpēc jāpiemin, ka nevienam no šiem SNP nav viennozīmīga asociācija ar kādu no slimībām – līdz šim iegūtie rezultāti ir neskaidri un jāveic papildus pētījumi (Xu et al. 2009; Yang et al. 2012).

VDR polimorfismu meta-analīzē noskaidrots, ka FokI C alēlei ir asociācija ar SLE Eiropas un Āzijas populācijās (OR= 1,047; 95% CI = 0,781–1,403; p = 0,758) (Bae et al. 2018).

Konkrēti šajā darbā pētītie polimorfismi TaqI un BsmI ir potenciāli asociēti ar dažādām autoimūnām saslimšanām. Vairākos pētījumos Kaukāziešu populācijā ir noskaidrota FokI un TaqI asociācija ar MS risku (Moosavi et al. 2021). TaqI GG genotipam (OR= 2,41; p<0,0001) un TT genotipam BsmI (OR= 2,52; p<0,0002) ir asociācija ar palielinātu MS risku Irānas populācijā, kamēr meta-analīzē, kurā iekļauti 30 pētījumu dati, noskaidrots, ka heterozigotajam TaqI genotipam ir statistiski būtiska asociācija ar MS risku visā pētītajā kohortā (OR = 1,27; 95%CI = 1,01–1,59; p<0,01), un BsmI recesīvajam genotipam ir asociācija ar MS tikai Aziātu populācijas subgrupā (Abdollahzadeh et al. 2016; Imani et al. 2019).

TaqI ir statistiski nozīmīga saistība ar T1DM Ēģiptes, Korejas un Irānas populācijās un AA noteikts kā aizsargājošais genotips (P = 0,003; OR = 0,51; 95% CI = 0,31-0,84) (Cheon et al. 2015; Kamel et al. 2014).

Wang un kolēģu meta-analīzē noskaidrots, ka TaqI A alēle (OR=1,40; 95% CI=1,08-1,82; P=0,01), un BsmI C alēle (OR=0,84; 95% CI=0,75-0,94; P=0.003) ir saistīta ar paaugstinātu RA risku Kaukāziešu, Āziešu un Afrikāņu populācijās (Wang et al. 2017). Tieši pretēji rezultāti

iegūti citā meta-analīzē – BsmI C un TaqI A alēlēm nav noteikta asociācija ar AR (OR=1,065; 95% CI =0,911–1,245; p=0,427; OR T alēle =1,065; 95% CI =0,834–1,361; p=0,613) (Song et al. 2016).

No šī varētu secināt, ka VDR polimorfismu saistība ar dažādām autoimūnajām saslimšanām vēljoņprojām tiek aktīvi pētīta un ir neskaidra.

1.3. Bronhiālā astma

1.3.1. Bronhiālās astmas izplatība

BA ir visbiežākā hroniskā respiratorā saslimšana visās vecuma grupās un ar to sirgst vairāk kā 350 miljoni iedzīvotāju visā pasaulē (GBD 2015). Pēc Globālās Iniciatīvas Astmas ārstēšanai (GINA; *Global Initiative for Asthma*) apkopotajiem datiem, bronhiālās astmas pacientu skaitam visā pasaulē vēljoņprojām ir tendence pieaugt, un šis pieaugums ir saistīts ne tikai ar slimības ģenētiskajiem aspektiem, bet arī ar neskaitāmu vides riska faktoru ietekmi (GINA 2014 cit. pēc Nunes et al. 2017). Lielākajai daļai populācijas dzīvojot pilsētvidēs, ir notikušas dzīvesveida un vides apstākļu izmaiņas, kas ir ietekmējušas saslimšanas gadījumu pieaugumu (Nunes et al. 2017).

Eiropas Savienībā ar BA slimo 8,2% pieaugušo un 9,4% bērnu (Selroos et al. 2015). Latvijā ar astmu slimo aptuveni 2-5% iedzīvotāju, bet aizvien vairāk slimo mazi bērni (Babjoniševa 2015). Astma tiek diagnosticēta bērniem pirms 7 gadu vecuma aptuveni 75% gadījumos, daudzi no šiem bērniem tālākajos dzīves gados piedzīvo astmas simptomu remisiju (Corbridge et al. 2010).

1.3.2. Slimības molekulārā ģenētika

BA ir poligēna, multifaktoriāla slimība, kas nozīmē, ka vairāki faktori ietekmē tās attīstību. Šie faktori ir gan ģenētiski gan saistīti ar vidi, respektīvi, dažādu gēnu savstarpējā mijiedarbība, gan to mijiedarbība ar vides faktoriem izraisa šo slimību (Thomsen 2015). Pašreizējie uzskati par BA norāda uz ļoti lielu ģenētisko variantu daudzveidību, kuru ir radījuši dažādi vides faktori caur epiģenētiskām un ar gēnu translāciju saistītām izmaiņām (Mims 2015).

Pilna genoma asociācijas pētījumu rezultātā (GWAS; *Genome-wide association studies*) ir apstiprināta ģenētisko faktoru ietekme uz astmas risku ar vairāk kā 140 identificētiem lokusiem (Han et al. 2020), ieskaitot: 1) Ar nespecifisko un specifisko imunitāti un imunoregulāciju saistītus gēnus (*CD14*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, un *TLR10*), citokīnu gēnus (*IL10*, *TGFβ1*) un HLA gēnus (*HLA-DRB1*, *-DQA1*, *-DQB*); 2) Ar Th2 diferenciāciju un efektorajām

funkcijām saistītus gēnus. Piemēram, *IL13*, kas ir viens no labāk izpētītajiem gēniem saistībā ar BA un ir ļoti svarīgs astmas patoģenēzē. Šis gēns kodē citokīnu, kas ir iesaistīts B šūnu diferenciācijā un nobriešanā. Tas ierosina B šūnu izotipa maiņu uz IgE; 3) Gēnus, kas tiek ekspresēti epitēlija šūnās un iesaistīti “gļotādas imunitātē”. Bieži pētīti CC – hemokīnu grupas gēni; 4) Gēnus, kas saistīti ar plaušu funkcijām, elpceļu remodelāciju un astmas smaguma pakāpi. Visvairāk pētītie lokusi: *ADRB2* un *TNF* (Mathias 2014).

Arvien vairāk pētījumi uzsver *VDR* gēna saistību ar astmu un citām alerģiskām slimībām. *VDR* ģenētiskie varianti tiek pētīti kā iespējami autoimūno slimību un alerģisko slimību ietekmējoši faktori, jo tie var ietekmēt *VDR* aktivitāti, kas var novest pie izmainītas gēnu ekspresijas. Starp pazīstamajiem *VDR* polimorfismiem visbiežāk sastopamie SNP, kas ietekmē *VDR* ekspresiju imūnsistēmā, ir, jau iepriekš minētie, BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232), TaqI (rs731236) un FokI (rs10735810) (Kamel et al. 2014), no kuriem BsmI, ApaI un TaqI ir spēcīgā LD (Morrison et al. 1992). Lai gan atsevišķa šo SNPs funkcionālā nozīme joprojām nav zināma, tiek uzskatīts, ka LD esošajiem SNPs *VDR* gēnā ir iespējama asociācija ar autoimūnām un alerģiskām slimībām (Hutchinson et al. 2018).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. DNS kolekcija

Šajā pētījumā izmantotās gadījuma/kontroles DNS kolekcijas sastāvēja no 110 BA pacientu DNS paraugiem un 253 kontroles grupas paraugiem. Visiem BA pacientiem tika diagnosticēta viegla vai vidēji smaga saslimšana ar astmu pēc GINA vadlīnijām. Kontroles grupas pacientiem netika noteikta neviena autoimūna vai hroniska saslimšana. Daļa no BA pacientu asins paraugiem tika iegūta Bērnu Klīniskās universitātes slimnīcā “Gaiļezers” un daļa Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas ambulatorajā daļā Latvijas–Lietuvas–Taivānas zinātniskās sadarbības (LLT) projekta (2011-2013) un Latvijas Nacionālo pētījumu programmu 2010.10.-4 / VPP4, ietvaros. Tā kā BA grupas paraugu kolekcija tika papildināta, otra daļa paraugu tika iegūta no Latvijas–Lietuvas–Taivānas zinātniskās sadarbības projekta “D vitamīna un tā receptoru gēnu polimorfismu salīdzinošais pētījums Lietuvas, Latvijas un Taivānas bērniem un pieaugušajiem ar bronhiālo astmu” (2020-2023) ietvaros no Rīgas 1. slimnīcas. Kontroles grupas paraugu iegūti no Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra, šī kontroles grupas daļa aprakstīta Paramonovas un kolēģu publikācijā (Paramonova et al. 2020).

Bakalaura darba ietvaros tika veikta DNS kolekcijas papildināšana un atjaunošana – DNS izdalīšana no jaunajiem BA asins paraugiem, kam sekoja DNS kvalitātes un kvantitātes analīze. Pēc kolekcijas atjaunošanas, tālākai *VDR* gēna SNP rs731236 un rs1544410 genotipēšanai tika izmantoti visi DNS kolekcijas BA paraugi (110) un kontroles grupas paraugi (253).

2.2. Materiāli

2.2.1. Izmantotā aparatūra

2.1. tabula
Darbā izmantotā aparatūra.
Table 2.1.
Facility used in this study.

Apraksts	Ražotājs	Valsts
Spektrofotometrs NanoPhotometer® NP80	Implen™	Vācija
Magnētiskais maisītājs MSH-300	BioSan	Latvija
Autoklāvs HiClave™ HV-50L	HMC	Vācija
Centrifūga Labnet Z366	Hermle	Vācija
Centrifūga 5415D	Eppendorf®	Vācija
pH metrs PH 510	Oakton®	ASV
Elektroniskie svāri EW 6200-2NM	KERN	Vācija
Mikroviļņu krāsns MD101	Whirlpool®	ASV
UV gaismas transluminators Essential V6	Uvitec	Lielbritānija
Centrifūga/Vortekss PCR planšetēm CVP-2	BioSan	Latvija

Elektroforēzes strāvas padeve ST907H	StarLab	Vācija
Ūdens vannas termostats THERMOLAB® 1008	GFL®	Vācija
Vortekss Microspin FV-2400	BioSan	Latvija
Gēla elektroforēzes iekārtas komplekts	StarLab	Vācija
PCR iekārta LabCycler Gradient	SensoQuest	Vācija

2.2.2. Izmantotais aprīkojums

2.2. tabula
Darbā izmantotais aprīkojums.

Table 2.2.
Equipment used in this study.

Materiāla nosaukums	Ražotājs	Valsts
1,5 ml mikromēģenes	Eppendorf®	Vācija
15 ml stobriņi	SARSTEDT	Vācija
3,5 ml Vienreizlietojamā pipete <i>Transfer pipette</i> Fisherbrand™	SARSTEDT	Vācija
1000 ml vārglāze	SARSTEDT	Vācija
500 ml koniskā kolba	SARSTEDT	Vācija
500 ml mērcilindrs	SARSTEDT	Vācija
Daudzkanālu pipete	Eppendorf®	Vācija
Automātisko pipešu komplekts (0,1 – 10 µl; 10 – 20 µl; 20 – 200 µl; 200 – 1000 µl)	Eppendorf®	Vācija
Vienreiz lietojamie pipešu uzgaļi (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	SARSTEDT	Vācija
Veidne gēla uzliešanai	StarLab	Vācija
96 bedrīšu plate	SARSTEDT	Vācija
Ledus plates	SARSTEDT	Vācija
PCR plašu līmlente	SARSTEDT	Vācija

2.2.3. Ķīmiskie reaģenti

2.3. tabula
Darbā izmantotie ķīmiskie reaģenti.

Table 2.3.
Reagents used in this study.

Reaģents	Ražotājs	Valsts
10x DreamTaq™ buferšķīdums	Thermo Scientific™	Lietuva
Dream Taq polimerāze	Thermo Scientific™	Lietuva
GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder Plus marķieris	Thermo Scientific™	Lietuva
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus marķieris	Thermo Scientific™	Lietuva
H ₂ O <i>Nuclease free water</i>	Ambion®	ASV
Restriktāzes <i>TaqI, BsmI</i> (10 U/µl)	Thermo Scientific™	Lietuva
Etanols	Enola	Latvija
Etīdija bromīds	Sigma Aldrich	Vācija
Agaroze	Sigma Aldrich	Vācija
dNTP Mix	Thermo Scientific™	Lietuva

MgCl ₂	Thermo Scientific™	Lietuva
NaCl	Enola	Latvija
Rnāze	Thermo Scientific™	Lietuva
SDS (nātrija dodecilsulfāts)	Sigma Aldrich	Vācija
Proteinase K Solution (20 mg/mL)	Thermo Scientific™	Lietuva
EDTA	Sigma Aldrich	Vācija
DNA Gel Loading Dye 6x Solution	Thermo Scientific™	Lietuva
Orange-G Loading Dye 6x Solution	Thermo Scientific™	Lietuva
TRITON X100 (1 %)	Sigma Aldrich	Vācija
10x Bufersķīdums R	Thermo Fisher Scientific™	Lietuva
10x TaqI bufersķīdums	Thermo Scientific™	Lietuva

2.2.4. Oligonukleotīdi

PCR metodē pielietoto praimeru dizaina izstrādei (2.4. tabula) tika izmantotas Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) un NCBI datu bāzes PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programma. Praimeru ražotājs ir Thermo Fisher Scientific™ (Lietuva).

2.4. tabula
Amplifikācijā izmantotie praimeri *VDR* gēna rs731236 un rs1544410 polimorfismu genotipēšanai.

Table 2.4.
Primers used in amplification for *VDR* gene rs731236 un rs1544410 polymorphism genotyping.

Praimeris	Praimera sekvenca (5' – 3')	Lokalizācija
Tiešais: rs731236_F	AGCAGAGCAGAGTTCCAAGC	<i>VDR</i> gēna 9. eksons
Atgriezeniskais: rs731236_R	AGCTTCATGCTGCACTCAGG	
Tiešais: rs1544410_F	TCTCACCTCTAACCAGCGGA	<i>VDR</i> gēna 8. introns
Atgriezeniskais: rs1544410_R	GGGGTTTGGCTCCAATCAGA	

2.3. Eksperimentālās metodes

2.3.1. DNS kvalitātes un kvantitātes analīze

Šī analīze ietvēra DNS koncentrācijas un piemaisījumu pārbaudi ar NanoPhotometer® NP80 spektrofotometru un kvalitātes pārbaudi, veicot agarozes gēla elektroforēzi.

DNS koncentrācijas mērīšana ar NanoPhotometer® NP80 spektrofotometru:

Iekārtā tika uzstādīts mērīšanas režīms dsDNS = 50 ng/μl, kā arī papildus iestatījumi koncentrācijas lasījumu precizitātes nodrošināšanai. Mērinstruments tika kalibrēts ar 1 μl ūdens bez nukleāzēm (Ambion®, ASV) tādā veidā iestādot DNS maisījuma šķīdumu kā fona lielumu.

Pēc kalibrācijas uz mērinstrumenta apakšējā pjedestāla uznesa 1 µl analizējamā DNS parauga un veica tā mērījumu.

Pēc iegūtajiem DNS koncentrācijas un kvalitātes datiem, tika izvērtēts, vai DNS koncentrācija un kvalitāte ir pietiekama tālākai paraugu apstrādei. PCR reakcijai nepieciešamā DNS koncentrācija bija 10 ng/µl, tāpēc nepieciešamajiem paraugiem tika veikti paraugu atšķaidījumi

DNS elektroforēze agarozes gēlā:

1. Tika pagatavots 50x TAE (EDTA 0,5 M, Tris 2 M, 1 M etiķskābe, pH 8,5) buferšķīdums un veikts tā atšķaidījums uz 1x TAE.
2. Agarozes gēla (1,2%) pagatavošana: 3,6 g agarozes iebēra koniskajā kolbā un uzpildīja to līdz 300 ml atzīmei ar 1x TAE buferšķīdumu. Maisījumu karsēja mikroviļņu krāsnī, starp karsēšanas etapiem veicot tā maisīšanu, līdz agaroze bija vienmērīgi izšķīdusi TAE buferšķīdumā. Pēc vienmērīgas agarozes šķīduma atdzesēšanas, tam pievienoja 4 µl etīdija bromīda (aptuvenā gala koncentrācijas 0.1-0.5 µg/mL), kas nepieciešams DNS vizualizācijai UV transiluminatorā. Agarozes šķīdumu iepildīja gēla sagatavošanas vanniņā un ievietoja tajā ķemmītes. Gatavo gēlu pārvietoja uz elektroforēzes iekārtu, kuru uzpildīja ar 1x TAE buferšķīdumu.
3. DNS (2 µl) pievienoja 1 µl elektroforēzes krāsas marķiera (*DNA Gel Loading Dye 6x solution*) un 3 µl H₂O. Sagatavotos DNS paraugus un 1000 bp marķieri (5 µl) ienesa bedrītēs uz agarozes gēla. Elektroforēzi veica ar 150 V 40 minūtes.
4. Agarozes gēlu izņēma no elektroforēzes iekārtas un ievietoja UV transiluminatorā un uzņēma gēla attēlu ar UVITEC FireReader V10 plus (*FireReader V10 Gel Documentation System and Analysis Software*) programmu, kurā varēja veikt arī attēla apstrādi.

Pēc uzņemtā attēla izdarīja secinājumus par DNS degradācijas pakāpi. Ja gēla attēlā bija redzamas skaidri izšķiramas DNS joslas, tad DNS tika uzskatīts par atbilstošas kvalitātes un ar to varēja turpināt strādāt. DNS joslas, kas bija vāji saskatāmas vai izteikti izplūdušas, liecināja par augstu DNS degradācijas pakāpi – tādi paraugi nebija piemēroti tālākai izmantošanai un DNS izdalīšana tika veikta atkārtoti.

2.3.2. DNS izdalīšana

Lai papildinātu jau esošās bronhiālas astmas un kontroles grupas DNS kolekcijas, tika izdalīts DNS no laboratorijas krājumos esošiem sasaldētiem asins paraugiem. Ekstrakcija veikta pēc DNS izsālīšanas metodes (Miller et al. 1988).

Veiktais DNS izdalīšanas process var tikt iedalīts divos posmos. Pirmajā posmā tika veikta ekstrakcijai nepieciešamo šķīdumu pagatavošana un otrajā – hemolīze un DNS izdalīšana.

1. Šķīdumu pagatavošana:

- 1.1. Līzes buferšķīdums: 0,605 g TRIS iebēra vārglāzē un uzpildīja to ar destilētu ūdeni līdz 400 ml atzīmei. Ja $\text{pH} > 7,5$ – pievienoja attiecīgo daudzumu HCl, bet, ja $\text{pH} < 7,5$ – mazās devās pievienoja NaOH. Ja $\text{pH} = 7,5$, pH bija optimāls, lai turpinātu līzes bufera pagatavošanu. Šķīdumam pievienoja 54,768 g saharozes, 0,238 g MgCl_2 un 5 g TRITON X100 (1 %). Pēc reaģentu pievienošanas, šķīdumu vienmērīgi maisīja ar magnētisko maisītāju, un visbeidzot tam pievienoja destilētu ūdeni līdz 500 ml atzīmei.
- 1.2. Resuspensijas buferšķīdums: 2,194 g NaCl un 3,507 g EDTA iebēra vārglāzē un uzpildīja to ar destilētu ūdeni līdz 500 ml atzīmei. Pievienotos reaģentus izšķīdināja, pakāpeniski pievienojot NaOH, līdz šķīduma bija $\text{pH} = 8,0$.
- 1.3. NaCl (5M) šķīdums: 58,44 g NaCl karsējot šķīdināja 200 ml destilētā ūdens.
- 1.4. Nātrija dodecilsulfāta šķīdums (10 %): 5 g SDS karsējot šķīdināja 50 ml destilētā ūdens.

2. Hemolīze un DNS izdalīšana:

- 2.1. Asinis (1-2 ml) pārnesa 15 ml stobriņā un pievienoja autoklāvētu ūdeni tā, lai asins un ūdens attiecība būtu 1:5. Šķīdumu 10 minūtes inkubēja istabas temperatūrā periodiski to vorteksējot. Pēc inkubācijas veica centrifugēšanu izmantojot programmu: 10 minūtes, 5500 rpm. Šķidro fāzi nolēja, atstājot tikai nogulsnes. Šo procesu, sākot ar vorteksēšanu, atkārtoja vēlreiz.
- 2.2. Nogulsnēm pievienoja 3 ml līzes bufera, vorteksēja un 10 min inkubēja $+4^{\circ}\text{C}$ uz ledus platēm. Veica centrifugāciju 30 minūtes ar 11000 rpm.
- 2.3. Šķidro fāzi nolēja un nogulsnēm pievienoja:
 - 1,5 ml resuspensijas buferšķīduma;
 - 40 μl proteināzi K (uz vienu paraugu 2 μl proteināzes uz 38 μl destilēta, dejonizēta ūdens);
 - 15 μl RNāzes;
 - 150 μl 10 % SDS.

2.4. Paraugus inkubēja ūdens vannas termostatā 2 h 56°C temperatūrā, un pēc inkubācijas šķīdumam pievienoja 0,5 ml 5 M NaCl šķīduma. Ja neizveidojās paliekošas baltas nogulsnes, pievienoja papildus 5 M NaCl. Šķīdumu 30 min inkubēja +4°C uz ledus platēm un centrifugēja 10 min ar 11000 rpm.

2.5. Supernatantu pārnesa jaunā 15 ml stobriņā un tam pievienoja atdzesētu 96% etanolu tā, lai supernatanta un etanola attiecība būtu 1:2. Šķīdumu uzmanīgi samaisīja, līdz izgulsnējās vienots baltu nogulšņu (DNS) kopums. Šķīdumu inkubēja saldētavā 15 – 16 h. Pēc inkubācijas centrifugēja 15 min ar 11000 rpm. Supernatantu nolēja, un nogulsnēm pievienoja 1 ml atdzesēta 70% etanola. Šķīdumu centrifugēja 10 min ar 13000 rpm. Šķīdro fāzi nolēja un nogulsnes žāvēja zem lampas.

2.6. Izzāvētas nogulsnes izšķīdināja 100 µl ūdens bez nukleāzēm (*Nuclease free water*).

Pēc DNS ekstrakcijas veica DNS kvalitātes un kvantitātes pārbaudi ar nanofotometru un agarozes gēla elektroforēzes metodi. Minētās metodes aprakstītas jau iepriekš.

2.3.3. Polimerāzes ķēdes reakcija

Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR; *polymerase chain reaction*) tika veikta izmantojot LabCycler Gradient (SensoQuest, Vācija) PCR iekārtu. Izmantotie oligonukleotīdu praimerī aprakstīti apakšnodaļā “2.2. Materiāli”.

Pirms PCR reakcijas veikšanas pētāmo paraugu grupai, PCR praimerī tika optimizēti. Tika veikta gradienta PCR izmantojot dažādas hibridizācijas fāzes temperatūras, attiecīgi 56 °C, 58 °C, 60 °C un 62°C. Rezultāti tika vizualizēti izmantojot gēla elektroforēzi (1,2% gēls). Analizējot amplikona daudzumu un tā specifiskumu pie dažādām temperatūrām, secināts, ka abu sekvenču variantu PCR piemērotākā hibridizācijas fāzes temperatūra ir 60 °C.

Amplificēti tika VDR gēna reģiona DNS fragmenti, kas ietvēra pētītos sekvenču variantus rs731236 un rs1544410. Amplificēto fragmentu garumi bija attiecīgi 565 bp rs731236 varianta gadījumā un 726 bp rs1544410 gadījumā.

Reaģentu maisījuma sastāvs viena parauga reakcijai (kopējais tilpums 18 µl):

- 2,5 µl 10x *DreamTaq*TM buferšķīdums (Thermo ScientificTM, Lietuva);
- 0,6 µl dNTP maisījums (Thermo ScientificTM, Lietuva);
- 1 µl tiešais praimeris;
- 1 µl atgriezeniskais praimeris;
- 12,75 µl H₂O
- 0,15 µl *DreamTaq*TM DNS polimerāze (Thermo ScientificTM, Lietuva).

Sagatavoto reaģentu maisījumu pievienoja 3 μ l DNS un veica PCR ar šādu programmu (2.5. tabula).

2.5. tabula

PCR apstākļi DNS fragmentu amplifikācijai.

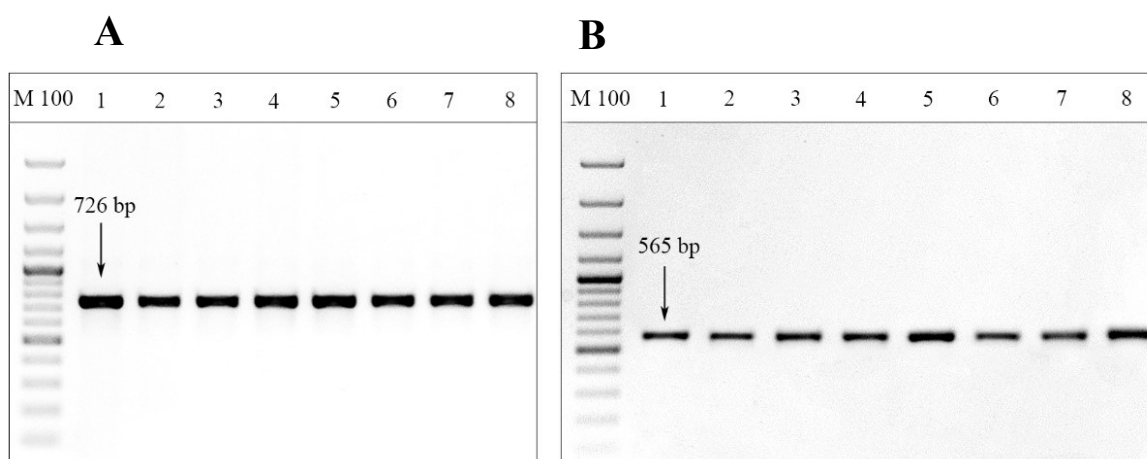
Table 2.5.

PCR conditions for DNA fragment amplification.

Temperatūra	PCR cikla fāze	Fāzes ilgums	} 40 cikli
95 °C	Inicializācijas fāze	5 min.	
95 °C	Denaturācijas fāze	30 sek.	
60 °C	Hibridizācijas fāze	30 sek.	
72°C	Elongācijas fāze	45 sek.	
72°C	Beigu elongācijas fāze	5 min.	
4 °C	Saglabāšanas fāze	∞	

2.3.3.1. PCR produktu analīze agarozes gēlā

Pēc amplifikācijas PCR produktu kvalitāte tika analizēta agarozes gēla elektroforēzē (2.1. attēls). Elektroforēzei izmantoja 1,2% gēlu, kuru pagatavoja pēc metodikas, kas aprakstīta iepriekš (skatīt sadaļu 2.3.1 DNS kvalitātes un kvantitātes analīze). Amplikonam (5 μ l) pievienoja 2 μ l elektroforēzes oranžās krāsas marķiera (Orange-G Loading Dye 6x Solution). Kā DNS garuma marķieris tika izmantots 5 μ l 100 bp GeneRuler™ DNA Ladder Plus (Thermo Scientific™, Lietuva).



2.1. attēls. PCR produktu vizualizācija agarozes gēlā. A: Amplikons ar rs1544410 sekvenču variantu. B: Amplikons ar rs731236 sekvenču variantu. M 100 – 100 bp DNS marķieris; 1-8 – analizēto DNS paraugu amplikonu numerācija; 726 bp un 565 bp – amplikonu garumi.

Figure 2.1. PCR product visualization in agarose gel. A: Amplicon with the rs731236 sequence variant. B: Amplicon with rs1544410 sequence variant. M 100 – 100 bp DNA marker; 1-8 – amplicon numbering of analyzed DNA samples; 726 bp and 565 bp - amplicon lengths.

Elektroforēzi veica ar 185 V spriegumu 40 minūtes, un tās rezultātā gēlā bija novērojami 565 bp un 726 bp gari fragmenti. Veiksmīgas PCR rezultātā paraugi tika izmantoti tālākai genotipēšanai.

2.3.4. Restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma metode

rs731236 un rs1544410 ģenētiskās variācijas katram paraugam noteica pēc restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma metodes (RFLP; *restriction fragment length polymorphism*).

Izmantotās restrikcijas endonukleāzes *TaqI* (10 U/μl, Thermo Scientific™, Lietuva) rs731236 genotipēšanas gadījumā un *BsmI* (10 U/μl, Thermo Scientific™, Lietuva) rs1544410 gadījumā DNS molekulā atpazīt un šķeļ specifiskas sekvenses. *TaqI* restrikcijas enzīms atpazīst sekvenci: 5' T↓CGA 3', *VDR* gēna reģionā – 5' T↓(C/T)GA 3'. Savukārt, *BsmI* atpazīst 5' GAATGCN↓ 3', un *VDR* gēna reģionā – 5' GAATG(C/T)N↓ 3'.

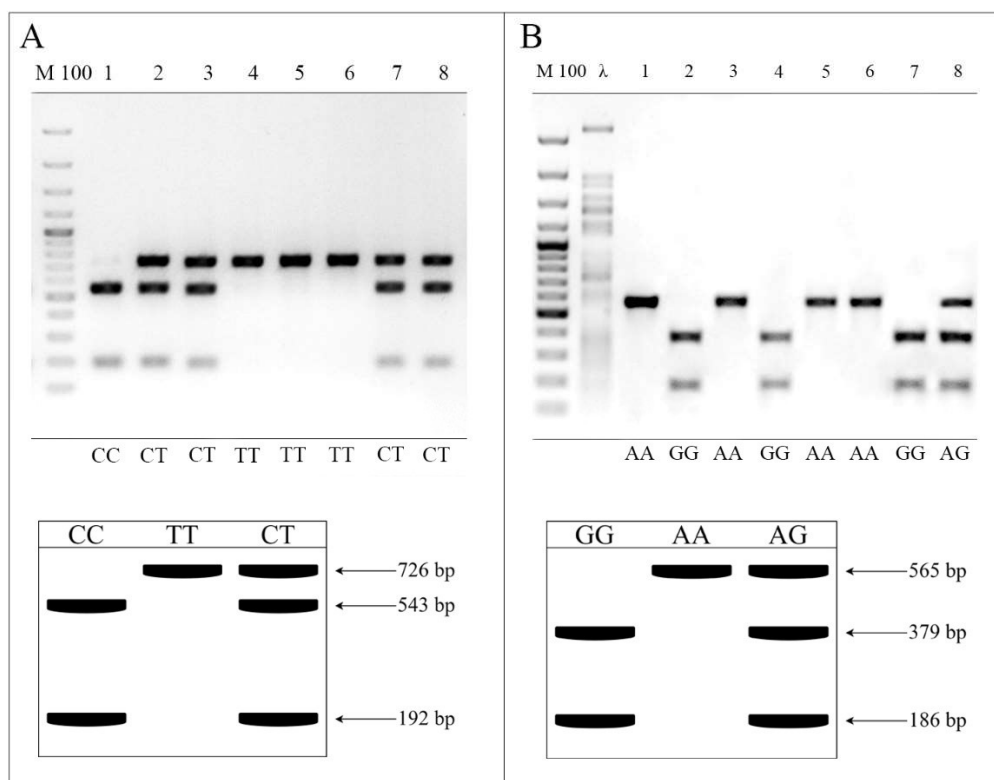
Reaģentu maisījumu vienas reakcijas sastāvs (tilpums: 12μl):

- I. rs731236 RFLP analīzei: 1,5 μl 10x *TaqI* buferšķīdums (Thermo Scientific™, Lietuva); 10,3 μl H₂O; 0,2 μl *TaqI* (10 U/μl, Thermo Scientific™, Lietuva).
- II. rs1544410 RFLP analīzei: 1,5 μl 10x buferšķīdums R (Thermo Scientific™, Lietuva); 10,3 μl H₂O; 0,2 μl *BsmI* (10 U/μl, Thermo Scientific™, Lietuva).

Reaģentu maisījums vienai reakcijai tika pievienots 3 μl PCR produkta. Kopējais maisījuma tilpums: 15 μl. Kā kontrole šai analīzei tika izmantota bakteriofāga λ DNS (2 μl; 0,1 μg/μL) ar zināmu sekvenci, kuru restriktāzes *TaqI* un *BsmI* šķeļ attiecīgi 121 un 46 fragmentos.

Paraugus inkubēja 16 h ūdens vannas termostatā. Jāatzīmē, ka šīm restriktāzēm ir atšķirīgas optimālās reakcijas temperatūras, tāpēc paraugu inkubācija tika veikta 65° C temperatūras apstākļos *TaqI* gadījumā un 37° C *BsmI* gadījumā. Pēc inkubācijas paraugus sagatavoja agarozes gēla elektroforēzei. Šim nolūkam izmantoja 1,2% agarozes gēlu, kura bedrītēs iepildīja restrikcijas produktu (10 μl) ar tam pievienoto 2 μl elektroforēzes oranžās krāsas marķieri (*Orange-G Loading Dye 6x Solution*). Elektroforēzi veica 60 minūtes ar 145 V spriegumu.

Restrikcijas enzīmu darbības rezultātā, atkarībā no nukleotīdiem pētīto polimorfismu pozīcijās, amplikoni tika sadalīti konkrēta garuma fragmentos. Gēlā novērotās fragmentu garumu atšķirības norādīja uz alternatīvām alēlēm un konkrētiem genotipiem. Fragmentu garumu shēma un pēc tiem noteiktie genotipi ir redzami attēlā (2.2. attēls).



2.2. attēls. RFLP rezultāti agarozes gēlā, fragmentu garumu shēmas un noteiktie genotipi. A: rs1544410 sekvenses varianta noteikšana; B: rs731236 sekvenses varianta noteikšana. M 100 – 100 bp DNS marķieris; λ - bakteriofāga λ DNS; CC, TT, CT - rs1544410 genotipi; GG, AA, AG - rs731236 genotipi.

Figure 2.2. RFLP results on agarose gel, fragment length patterns and genotypes determined. A: Determination of the rs1544410 sequence variant; B: Determination of the rs731236 sequence variant. M 100 - 100 bp DNA marker; λ - bacteriophage λ DNA; CC, TT, CT - rs1544410 genotypes; GG, AA, AG - rs731236 genotypes.

Iegūtos restrikcijas rezultātus BA un kontroles grupā analizēja – pēc gēlā redzamo DNS fragmentu garumiem noteica indivīda genotipu, un iegūtos datus apkopoja tabulā tālākai statistiskajai analīzei.

2.4. SNP bioinformātiskā analīze

Lai noteiktu SNP funkcionālo nozīmi slimības patoģenēzē, tika veikta bioinformātiskā analīze *in silico*. Tā ietvēra teorētisku sekvenses izmaiņu ietekmes izvērtējumu uz DNS un RNS sekundārajām struktūrām, DNS liekumiem un 3D struktūrām, kā arī transkripcijas faktoru (TF) piesaisti. Visā bioinformātiskajā analīzē tika izmantoti 101 bp gari *VDR* gēna fragmenti, kas 51. pozīcijā ietvēra attiecīgo sekvenses variantu rs731236 vai rs1544410.

2.4.1. Sekvences variantu izmaiņu ietekme DNS un RNS sekundāro struktūru

Polimorfismu rs731236 un rs1544410 sekvences variantu ietekme uz DNS un RNS sekundārajām struktūrām tika analizēta izmantojot bioinformātikas programmatūru Geneious Prime[®] 2021.0.3. Jāatzīmē, ka ietekme uz RNS SS tika analizēta tikai rs731236 SNP gadījumā, jo tas atrodas *VDR* gēna eksonā un tiek transkribēts par mRNS. Iespējamās SS tika noteiktas izmantojot Vienna RNAfold pakotnes (ViennaRNA Package 2.0) rīku (Lorenz et al. 2011). RNS SS noteikšanā izmantots Turner izstrādātais locīšanās jeb *foldinga* modelis, un Mathews modelis DNS SS gadījumā (Mathews et al. 2004). Abiem modeļiem tika mainīta temperatūra uz 37° C, kas atbilst apstākļiem cilvēka šūnās (Howard et al. 2019).

Pēc analīzes veikšanas tika iegūti sekundāro struktūru attēli katram alēles variantam abiem pētītajiem *VDR* gēna polimorfismiem, un tika kvalitatīvi salīdzināts, vai ir novērojamas atšķirības paredzētajās RNS un DNS SS atkarībā no sekvences varianta.

2.4.2. Sekvences variantu izmaiņu ietekme uz DNS liekumiem un 3D struktūru

Lai analizētu alēļu nomaiņas ietekmi uz DNS molekulas izliekšanās spēju, izmantots Bend.it serveris (http://pongor.itk.ppke.hu/dna/bend_it.html#/bendit_intro), kurā tika veikti iespējamā DNS izliekuma aprēķini, balstoties uz dinukleotīdu lenķu ģeometriskajām īpašībām (slīpuma un pagrieziena lenķiem). Tiek aprēķinātas vektoru summas, izmantojot Godsela un Dikersona BEND algoritmu (Munteanu et al. 1998), un tās izsaka grādos uz 10,5 bp spirālveida pagriezienu.

Šīs analīzes rezultātā tika iegūti divi galvenie rādītāji: 1) Paredzamais DNS izliekums (*predicted curvature*) un 2) DNS liekšanās spēja (*bendability*). Balstoties uz šo parametru lielumiem abu alēlisko variantu gadījumā, tika spriests par DNS izliekumu iespējamo ietekmi uz regulatoro proteīnu piesaisti. Ja paredzamais DNS izliekuma lenķis alēļu nomaiņas reģionā ir mazs, bet liekšanās spēja ir palielināta, tas norāda uz iespējami apgrūtinātu regulatoro proteīnu piesaisti. Ja abi parametri ir vienlīdzīgi palielināti vai samazināti, tad var teikt, ka sekvences izliekumi savstarpēji summējas un netiek radītas izmaiņas proteīnu piesaistē (Travers 2004).

Iepriekš iegūtos datus, par prognozēto DNS izliekšanos atkarībā no sekvences varianta alēles, ir iespējams novērot “praksē” jeb 3D molekulas modeļa veidā. *VDR* gēna DNS reģiona 3D struktūras modelis tika izstrādāts ar Model.it[®] servera palīdzību (http://pongor.itk.ppke.hu/dna/model_it.html#/modelit_intro), izmantojot dinukleotīdu magnētiskās rezonanses modeli (Ulyanov et al. 1995). Iegūtie rezultāti tika vizualizēti ar

molekulāro 3D struktūru modelēšanas programmu Jmol 14.31.36, kurā struktūras tika pozicionētas xyz koordinātu sistēmā.

2.4.3. Polimorfismu sekvenču variantu ietekme uz transkripcijas faktoru piesaisti

Lai paredzētu sekvenču variantu rs731236 un rs1544410 alēļu nomaiņu iespējamo ietekmi uz transkripcijas faktoru piesaisti, *in silico* analīzes rezultātā tika izveidoti TF piesaistes vietas modeļi. Respektīvi, ar modeļu palīdzību tika noskaidrots cik un kādi TF spēj piesaistīties katra sekvenču varianta gadījumā. Lai nodrošinātu augstu rezultātu ticamību, TF piesaistes modeļos tika iekļauti tikai tie TF, kas atbilda sekojošiem kritērijiem: TF matricas līdzības rādītājam (MSS, *matrix similarity score*), kas apzīmē pētāmās sekvenču un TF matricas sekvenču atbilstību, bija jābūt >0,80 jeb 80%. Un TF kodola sekvenču līdzības rādītājam (CSS; *core similarity score*), kas raksturo TF konservatīvās sekvenču daļas un pētāmās sekvenču atbilstību, bija jābūt 1,00 jeb ar 100% atbilstību.

Lai paplašinātu iegūstamās informācijas loku, modeļi tika veidoti izmantojot datus no trijām TF datubāzēm, kurās pieejama informācija par konkrētu gēnu TF, kā arī šo TF piesaistes vietu *consensus* sekvencēm.

Izmantotās datorprogrammas un datubāzes:

- TRANSFAC[®] datubāze (Wingender 2008) GeneExplaine[®] tiešsaistes rīkā (<https://genexplain.com/transfac/>);
- Genomatix datubāze (<https://www.genomatix.de/>), kuras datu apstrādē izmantots MatInspector rīks (Cartharius et al. 2005);
- Geneious Prime[®] 2021.0.3 datu apstrādē izmantots EMBOSS Nucleotide TFscan rīks (<https://www.geneious.com/plugins/emboss-nucleotide-analysis/>).

2.5. Datu apstrāde un statistiskā analīze

Pirms VDR gēna polimorfismu rs731236 A/G un rs1544410 C/T statistiskās analīzes, tika novērtēta šo polimorfismu esamība līdzsvarā pēc Hārdija – Veinberga vienādojuma, lai pārlicinātos par genotipēšanas metodes precizitāti (Weinberg 1908 cit. pēc Rohlf et al. 2008). Pēc RFLP metodes rezultātā iegūtajiem genotipēšanas datiem tika aprēķināta katras alēles frekvence un, ievietojot šīs vērtības Hārdija – Veinberga vienādojumā ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$, kur p un q apzīmē abu alēļu frekvences), tika aprēķināti genotipu iespējamie sagaidāmie lielumi. Pēc tam, izmantojot statistisko hī kvadrāta (χ^2) kritēriju, tika noskaidrots, vai iegūtais genotipu sadalījums ir statistiski atšķirīgs no iepriekš aprēķinātajiem sagaidāmajiem lielumiem. Visas statistiskās analīzes laikā par statistiski ticamu jeb nozīmīgu atšķirību starp salīdzinātajām

grupām tika uzskatīti tie rezultāti, kuru analīzes statistiskā ticamība (p) bija mazāka par būtiskuma līmeni $\alpha = 0,05$.

Polimorfismu saistība ar slimību tika noteikta, analizējot iepriekš aprēķinātās alēļu, genotipu (arī divu lokusu genotipu) un haplotipu frekvences kontroles un BA grupās dažādos modeļos izmantojot χ^2 testu. Šīs metodes pamatā ir kontingences tabula. Ja starp gadījuma un kontroles grupām tika noteikta statistiski ticama atšķirība, tad tika uzskatīts, ka polimorfisma alēle, genotips vai haplotips ir saistīts ar analizēto slimību (Ryman et al. 2001). Šīs statistiskās analīzes rezultāti sniedz informāciju par asociāciju, taču tas nenosaka, kāds ir šīs asociācijas efekts, respektīvi, vai tā palielina vai samazina saslimšanas risku. Tāpēc tika noteikti papildus rādītāji – starpību jeb izredžu attiecība (*odds ratio*; OR) un tās vidējais aritmētiskais 95% ticamības intervāls (*confidence interval*; CI). OR rāda, cik reižu konkrētais rādītājs (alēle, genotips vai haplotips) palielina vai samazina iespējamību saslimt ar pētāmo slimību salīdzinot ar vidējo rādītāju populācijā. Gan statistiskā ticamība, gan izredžu attiecība tika aprēķināta ar statistikas programmu PAST (PALaeontological STATistics ver. 3.31). OR aprēķinos izmantots gan adaptīvais modelis, gan multiplikatīvais modelis.

Pēc aprēķinātajām OR vērtībām tika noteikta sekvenču varianta ietekme uz saslimšanas iespējamību pēc šādiem kritērijiem:

- Ja $OR = 1$, tad alēle, genotips vai haplotips nepalielina iespējamību saslimt;
- Ja $OR > 1$, ir palielināta iespējamība saslimt;
- Ja $OR < 1$, ir samazināta iespējamība saslimt (Sedgwick et al. 2010).

Arī aprēķinot OR tika papildus noteikta p vērtība, kas norādīja uz iegūtā rezultāta nozīmīgumu.

Jāpiemin, ka divu lokusu genotipu statistiskajai analīzei tika sastādīti deviņi iespējamie genotipu varianti un aprēķinātas to frekvences. Genotipi, kuru no frekvences bija zemākas par 5% netika iekļauti šajā analīzē.

Nelīdzsvarotības saistības (LD; *linkage disequilibrium*) analīze:

Lai noteiktu iespējamo molekulāro marķieru rs731236 A/G un rs1544410 C/T alēļu kopīgu pārmantojamības iespēju, tika noteikta šo marķieru nelīdzsvarotības saistība. Nelīdzsvarotības saistība ir korelācija jeb saistība starp tuvumā esošām lokusu variācijām, piemēram, polimorfismu alēlēm (kas atrodas vienā hromosomā) kopējā populācijā (Ardlie et al. 2002). Lokusi ir nelīdzsvarotības saistībā, kad to asociācijas frekvence augstāka vai zemāka nekā tas būtu sagaidāms, ja lokusi iedzimst neatkarīgi un nav savstarpēji saistīti.

Lai noteiktu polimorfismu cik lielā LD ir pētītās alēles, tika veikti sekojošas darbības:

- Priekš analīzes tika sastādīti četri alēļu haplotipi divu pētīto lokusu kombinācijās, kuriem līdzīgi kā iepriekš tika aprēķinātas iegūtās un sagaidāmās frekvences gadījuma un

kontroles grupās. Pēc tam tiek aprēķināta frekvenču novirze D (*derivation*) pēc sekojošas formulas: $D = x_{11} - p_1q_1$, kur x_{11} – haplotipa frekvence; p_1, q_1 – lokusu alēļu frekvences. D ir atkarīgs no alēļu frekvencēm un tā vērtība svārstās no -0,25 līdz 0,25. Ja $D = 0$, tad populācija ir līdzsvarā, taču novirzes no nulles norāda uz haplotipu nelīdzsvarotību (Mueller 2004).

- Iegūtā D vērtība tiek normalizēta izmantojot maksimālās un minimālās D vērtības, jo šī metode ir jūtīga uz ekstrēmiem D lielumiem. Ja $D \geq 0$, tad $D' = \frac{D}{D_{max}}$, ja $D < 0$, tad $D' = \frac{D}{D_{min}}$. D' ir galējais LD rādītājs un tā vērtības svārstās no 0 līdz 1. Ja $D' = 0$ – starp lokusu alēlēm nav LD un lokusi iedzimst neatkarīgi. Ja D' vērtība ietilpst intervālā no 0,8 līdz 1, tad abu pētīto lokusu alēles ir spēcīgā LD (Mueller 2004).
- Noteikts arī papildus LD rādītājs r^2 kas ir ekvivalents Pīrsona korelācijas koeficientam un norāda uz LD korelāciju starp divām lokusu alēlēm. Šis lielums ir savā ziņā komplementārs LD, tāpēc līdzīgi kā ar D' vērtību, arī, r^2 ir amplitūdā no 0,8 līdz 1, tad korelācija jeb abu alēļu LD ir stiprā saistībā (Ardlie et al. 2002; Calabrese 2018).
- Iegūtajiem datiem par LD tika aprēķināta arī statistiskā ticamība p vērtības veidā.

VDR gēna ģenētisko variāciju meta-analīze:

Šī darba ietvaros tika veikta arī meta-analīze, kurā ģenētisko variācijām noteiktie MAF vērtību rezultāti tika salīdzināti starp citās populācijās noteiktajiem MAF lielumiem (Ensemble genomu datubāze, 1000 genomu 3. fāzes projekta dati, <https://www.ensembl.org/>), kā arī iegūtajiem līdzīgu gadījuma/kontroles pētījumu datiem (*case/control studies*) citās etniskajās grupās. Šai analīzei izmantota informācija no 13 publikācijām, kas publicētas laika periodā no 2009. līdz 2019. gadam (Einisman et al. 2015; Hou et al. 2018; Hutchinson et al. 2018; Iordanidou et al. 2014; Kilic et al. 2019; Maalmi et al. 2013; Munkhbayarlakh et al. 2019; Nasiri-Kalmarzi et al. 2019; Papadopoulou et al. 2015; Pillai et al. 2011; Raby et al. 2004; Saadi et al. 2009; Zhang et al. 2017).

3. REZULTĀTI

3.1. *VDR* gēna SNP rs731236 un rs1544410 genotipēšanas rezultāti gadījuma un kontroles grupās

Sekvences variantu rs1544410 un rs731236 alēļu un genotipu sadalījuma pētīšanas nolūkā, pēc RFLP metodes tika genotipēti 110 BA paraugi un 251 kontroles grupas paraugs (253 paraugi rs1544410 gadījumā).

Abi analizētie SNP ir lokalizēti *VDR* gēnā: rs731236 atrodas 9. eksonā LBD reģionā, bet rs1544410 reprezentē gēna nekodējošo daļu un atrodas 8. intronā. Pēc genotipēšanas rezultātā iegūtajiem datiem tika aprēķināts katra pētītā polimorfisma alēļu (rs1544410 C>T; rs731236 A>G) un attiecīgo genotipu frekvenču sadalījums (1. un 2. pielikums). Abu polimorfismu gadījumos, kontroles un gadījuma grupā bija reprezentēti visi iespējamie genotipi.

Pēc iegūtajām un sagaidāmajām genotipu frekvencēm, katram lokusam tika noteikta esamība līdzsvarā pēc Hārdija – Veinberga vienādojuma. Hī kvadrāta (χ^2) testa rezultātā noskaidrots, ka rs731236 kontroles grupas genotipi ($p = 0,92$) un gadījuma grupas ($p = 0,56$), kā arī otra pētītā SNP kontroles ($p = 0,57$) un BA slimnieku grupas ($p = 0,39$) genotipu frekvences ir HWE līdzsvarā, jo p vērtības atbilst būtiskuma līmeņa kritērijam $p > 0,05$.

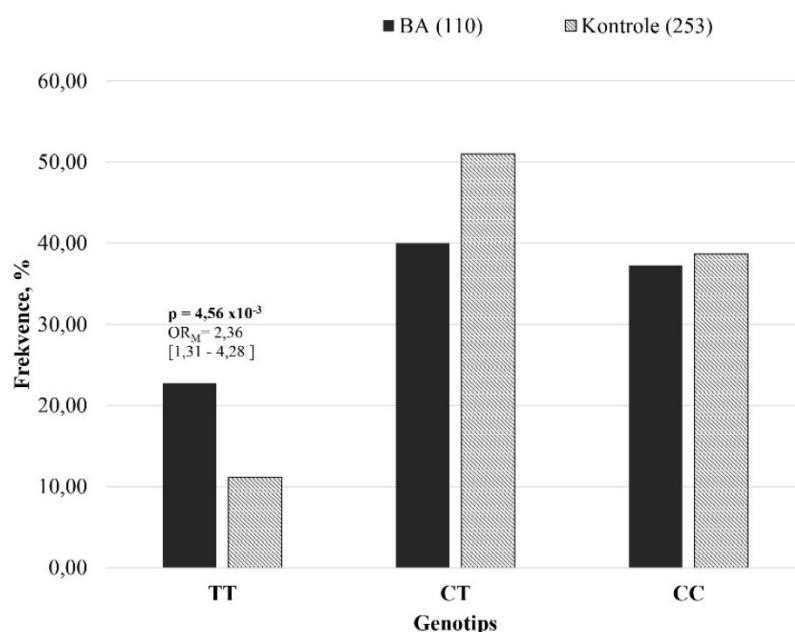
3.1.1. SNP rs731236 un rs1544410 alēļu un genotipu frekvenču sadalījuma statistiskā analīze

Rezultāti par genotipu un alēļu sadalījumu abās grupās un šo rezultātu statistiskie dati apkopoti tabulās (1. un 2. pielikums).

Lokusa rs731236 alēle A biežāk konstatēta kontroles grupā (67,33%), nekā slimības grupā (61,36%) un retās alēles G frekvence (MAF; *minor allele frequency*) starp BA pacientiem (38,64%) ir salīdzinoši augstāka nekā kontroles grupā (32,67%) (1. pielikums). Taču analizējot kodējošā rs731236 sekvences varianta alēļu un genotipu ietekmi uz slimības risku, netika noteikta neviena statistiski ticama asociācija ar BA. Jāpiemin, ka retās alēles homozigotais genotips GG, ar salīdzinoši tuvu statistiskās ticamības p vērtību 0,09, gan pēc aditīvā ($OR_A = 1,78$, CI 95% [0,92 – 3,46]), gan multiplikatīvā ($OR_M = 1,70$, CI 95% [0,91 – 3,16]) modeļa ar paaugstinātām OR vērtībām norādīja uz potenciālu slimības risku palielinošu efektu. Bet tā kā šim rezultātam nav statistiskās ticamības, tas nevar tikt ņemts vērā izdarot galējos secinājumus.

Lokusa rs1544410 noteiktās alēļu frekvences kontroles grupā ir: C – 64,4%; T – 36,65%, un BA slimnieku grupā: C – 57,27%; T – 42,73% (2. pielikums). Salīdzinot introniskā sekvences varianta alēļu sadalījumu BA un kontroles grupā, līdzīgi kā rs731236 gadījumā,

netika atrasta statistiski ticama alēļu frekvenču novirze starp abām grupām. Taču apskatot rezultātus genotipu sadalījuma līmenī, redzama cita aina. Retās alēles homozigotais genotips TT ir aptuveni divreiz biežāk sastopams gadījuma grupā, nekā kontroles grupā (3.1. attēls). Un statistiskās analīzes rezultātā noteikta šī genotipa statistiski ticama saistība ar BA klīnisko fenotipu gan pēc aditīvā ($p = 2,44 \times 10^{-2}$; $OR_A = 2,11$, CI 95% [1,10 – 4,05]), gan multiplikatīvā modeļa ($p = 4,56 \times 10^{-3}$, $OR_M = 2,36$, CI 95% [1,31 – 4,28]). Noteiktā $OR > 2$ vērtība norāda uz šī genotipa iespējamo slimības risku palielinošo ietekmi.



3.1. attēls. rs1544410 lokusa BA un kontroles grupas genotipu (CC, CT, TT) frekvenču salīdzinājums. OR – izredžu attiecība; CI – ticamības intervāls; p – p vērtība.

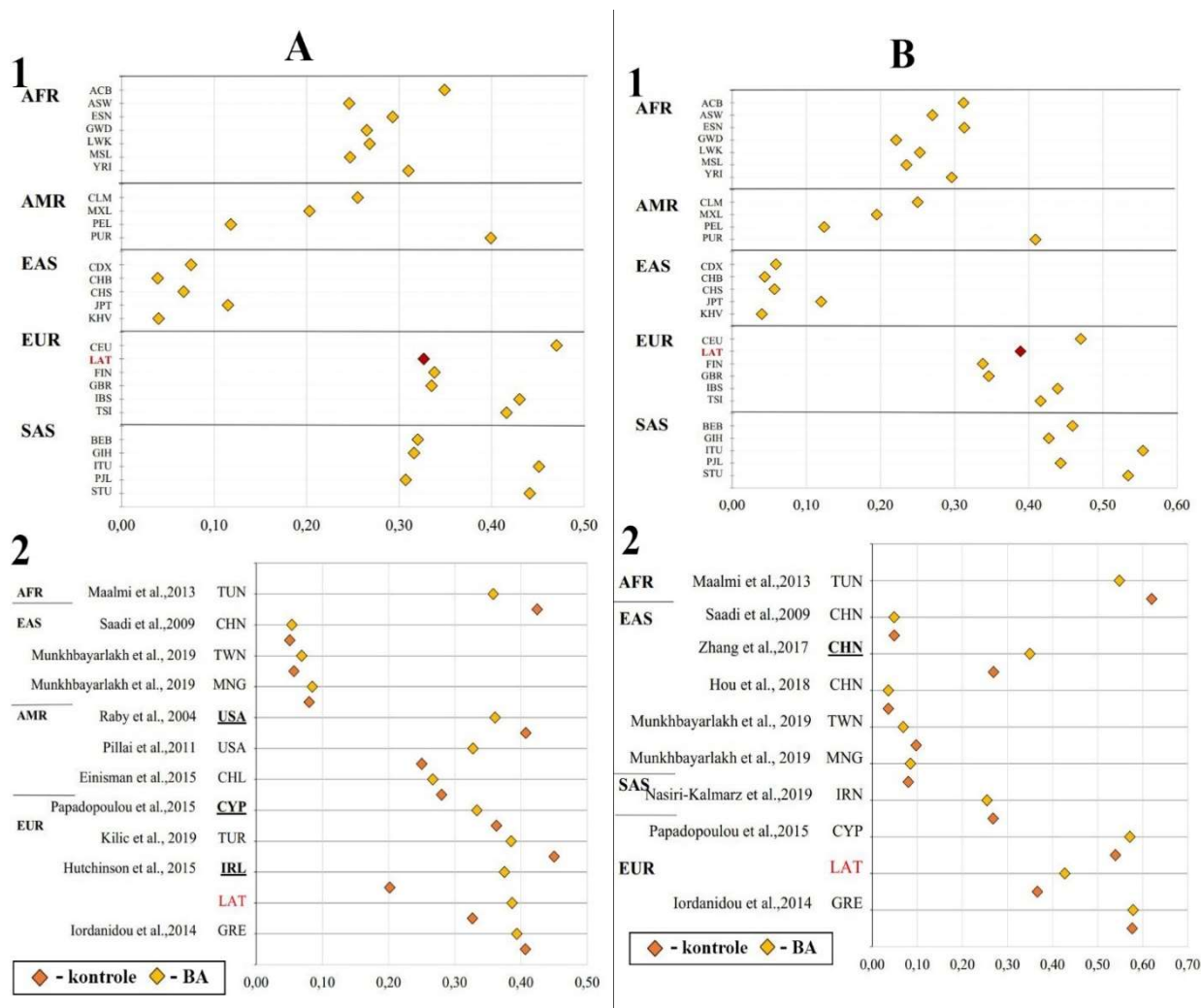
Figure 3.1. Comparison of frequencies of rs1544410 locus BA and control group genotypes (CC, CT, TT). OR – odds ratio, CI – confidence interval, p – p value.

Heterozigotā genotipa CT frekvenču sadalījumā abās grupās arī noteikta būtiska atšķirība (3.1. attēls), taču tā ir uz statistiskās ticamības robežas ($p = 6,34 \times 10^{-2}$). Statistiskie rezultāti liecina, ka CT genotips ir iespējams aizsargājošais genotips un samazina saslimstības iespējamību 1,54 reizes ($p = 6,34 \times 10^{-2}$; $OR_M = 0,65$, CI 95% [0,41 – 1,03]).

3.1.2. Pētīto VDR gēna ģenētisko variāciju meta-analīze

Iegūtie BA un kontroles grupas MAF rezultāti tika salīdzināti arī ar citās etniskajās grupās iegūtajiem līdzīgu gadījuma/kontroles pētījumu datiem (*case/control studies*). Šie dati iegūti veicot abu pētīto lokusu BA asociācijas pētījumu meta-analīzi, apkopojot pētījumu rezultātus no 13 publikācijām, kas publicētas laika periodā no 2002. līdz 2019. gadam. Tika konstruēti attiecīgie MAF grafiki abiem lokusiem, un tika veikts Latvijas populācijas MAF datu

salīdzinājums ar citām populācijām (3.2. attēls). Kā redzams, dati par Latvijas populācijas MAF abiem pētītajiem lokusiem ietilpst Eiropas virspopulācijas grupā.



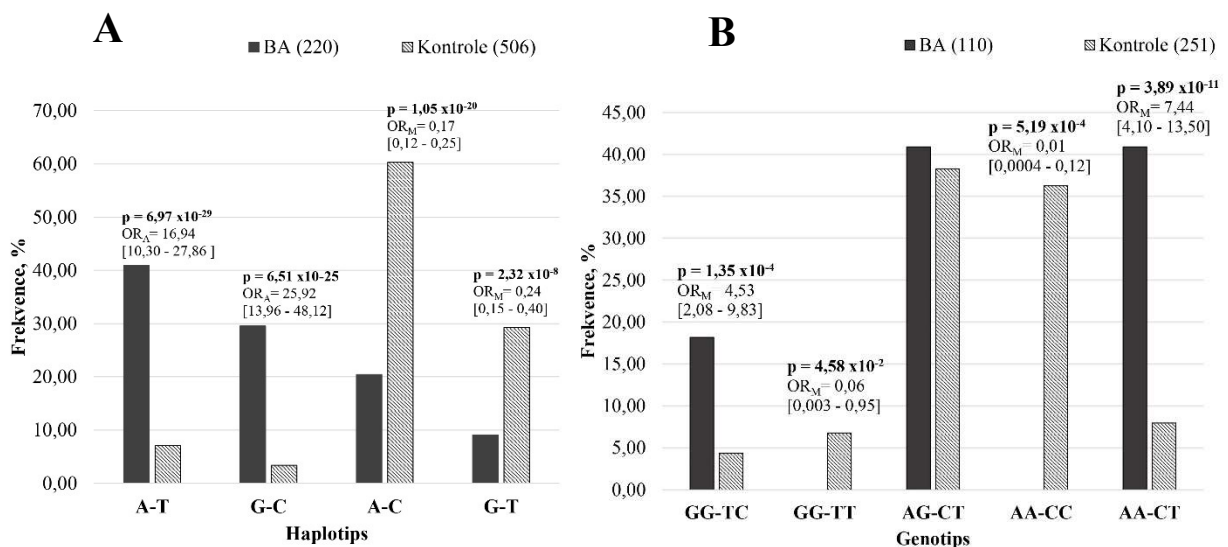
3.2. attēls. SNP rs1544410 un rs731236 MAF sadalījums dažādās populācijas un etniskajās grupās. A: rs731236 retās alēles G sadalījums. B: rs1544410 retās alēles T sadalījums. 1- MAF sadalījums dažādās populācijās pēc 1000 genomu 3. fāzes projekta datiem; 2- BA meta-analīzes MAF dati kontroles un gadījuma grupā. Treknrakstā – dati ar statistisko ticamību $p < 0,05$. LAT – Latvijas populācija, grafikā atzīmēta ar sarkanu. Pārējo populāciju kodu atšifrējumi pieejami pielikuma tabulā (5. pielikums).

Figure 3.2. Distribution of SNPs rs1544410 and rs731236 MAF in different populations and ethnic groups. A: Distribution of the rare allele G of rs731236. B: rs1544410 rare allele T distribution. 1- Distribution of MAF in different populations according to 1000 genomes Phase 3 project data; 2- BA meta-analysis MAF data in control and case group. In bold - data with statistical significance $p < 0.05$. LAT - Latvian population, marked in red in the graph. Abbreviations for other population codes are available in the table in the annex (Annex 5).

3.1.3. Haplotipu frekvenču sadales asociācijas analīze

Šai analīzei kopā tika konstruēti haplotipi divu pētāmo lokusu rs1544410 un rs731236 kombinācijās. Kopā sastādīti četri pētīto alēļu variantu haplotipi un attiecīgi arī divu lokusu genotipi visās lokusu alēļu kombinācijās, kopskaitā deviņi. Šiem haplotipiem un genotipiem, pēc iegūtajiem genotipēšanas rezultātiem, tika aprēķinātas frekvences abās grupās, un, balstoties uz iegūto frekvenču datiem, atlasīti pieci haplotipu genotipi tālākai statistiskajai analīzei (3. pielikums). Divu lokusu genotipi, kuru frekvence bija zemāka par 5% netika analizēti tālāk saistībā astmu.

Lai gan analizējot abu SNP alēles atsevišķi netika noteikta saistība ar slimību, haplotipu frekvenču sadalījumā starp kontroles (n = 506) un BA grupu (n = 220) bija novērojamas ievērojamas atšķirības ar augstu statistisko ticamību (3.3. attēls A).



3.3. attēls. Pētāmo lokusu rs1544410 un rs731236 haplotipu frekvenču analīzes rezultāti kontroles un gadījuma grupā. A: Haplotipu frekvenču sadalījums. B: Divu lokusu genotipu frekvenču sadalījums. OR – izredžu attiecība; p – p vērtība.

Figure 3.3. Results of haplotype frequency analysis of rs1544410 and rs731236 loci in control and case group. A: Frequency distribution of haplotypes. B: Frequency distribution of two locus genotypes. OR - odds ratio; p - p value.

Biežo alēļu haplotips A-C gandrīz trīs reizes biežāk noteikts kontroles grupā, nekā slimības grupā (20,45% un 60,28%, attiecīgi) (3. pielikums). Analīzes dati liecina par šī haplotipa statistiski nozīmīgo BA risku samazinošo jeb aizsargājošo, uz kuru norāda izteikti pazeminātā OR vērtība 0,17 ($p = 1,05 \times 10^{-20}$; $OR_M = 0,17$, CI 95% [0,12 – 0,25]). Reto alēļu haplotips G-T ir otrs biežāk sastopamais kontroles grupā. Arī šī haplotipa statistiskie rezultāti multiplikatīvajā

modelī norāda uz tā klīniski nozīmīgo aizsargājošo lomu saistībā ar BA ($p = 2,32 \times 10^{-8}$; $OR_M = 0,17$, CI 95% [0,12 – 0,25]). Savukārt visbiežākie haplotipi BA grupā (A-T un G-C) statistiski būtiski palielina saslimšanas iespējamību, un ir identificēti kā iespējami riska genotipi Latvijas populācijā, abos analīzes modeļos šo haplotipu gadījumā noteiktas izteikti augstas OR vērtības ar augstu statistisko ticamību, kas potenciāli norāda uz izteikti augstāku saslimšanas risku A-T haplotipa gadījumā ($p = 6,97 \times 10^{-29}$; $OR_A = 16,94$, CI 95% [10,30 – 27,86]) un G-C gadījumā ($p = 6,51 \times 10^{-25}$; $OR_A = 25,92$, CI 95% [13,96 – 48,12]).

Analizējot divu lokusu genotipus ir noteiktas frekvenču atšķirības starp BA ($n = 110$) un kontroles grupu ($n = 253$), kas norāda uz būtiskām iespējamām asociācijām ar slimību (3.pielikums). Kontroles grupā sastopami visi iespējamie genotipi, kamēr BA grupā noteikti tikai trīs no tiem. Statistiskās analīzes rezultātā reto alēļu genotips GG-TT identificēts kā iespējams aizsargājošais genotips ($p = 4,58 \times 10^{-2}$; $OR_M = 0,06$, CI 95% [0,003 – 0,95]). Kā ļoti nozīmīgs iespējams molekulārais marķieris, noteikts arī biežo alēļu genotips AA/CC, kas pēc izteikti zemās OR vērtības ievērojami samazina BA risku ($p = 5,19 \times 10^{-4}$; $OR_M = 0,01$, CI 95% [0,0004 – 0,12]). Vēl kā būtiski slimības risku palielinoši genotipi ar augstu statistisko ticamību noteikti AA-CT ($p = 3,89 \times 10^{-11}$; $OR_M = 7,44$, CI 95% [4,10 – 13,50 un GG-TC ($p = 1,35 \times 10^{-4}$; $OR_M = 4,53$, CI 95% [2,08 – 9,83])).

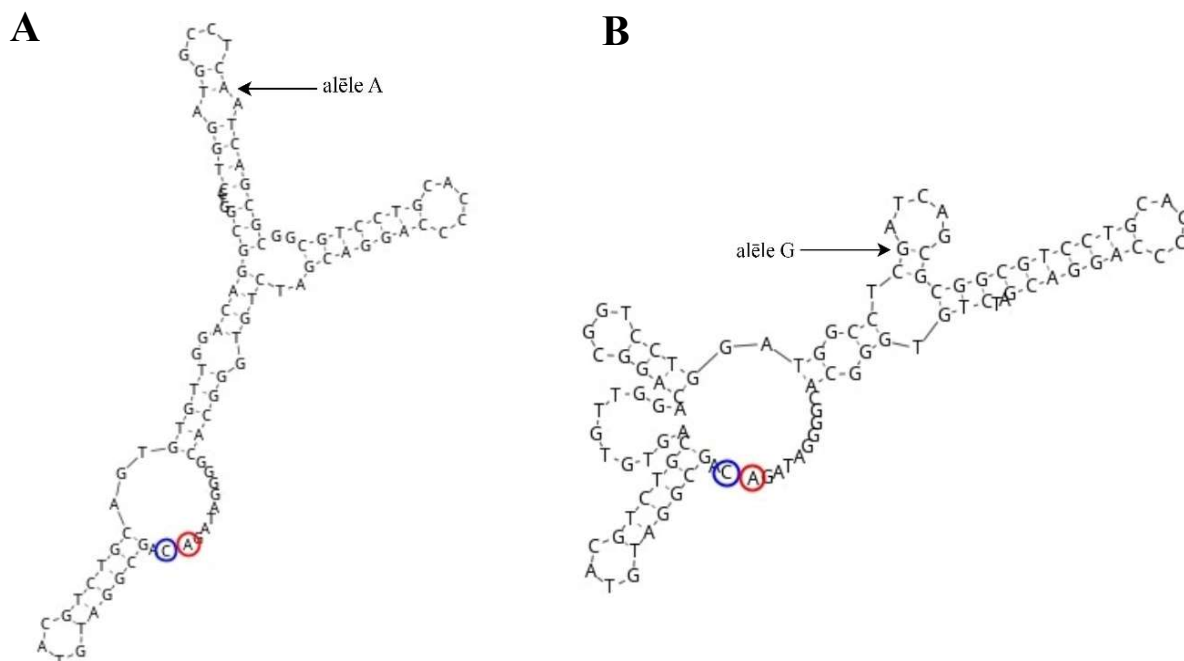
Lai noskaidrotu, vai starp rs1544410 un rs731236 lokusu alēlēm pastāv nelīdzsvarotības saistība Latvijas populācijā, tika analizētas LD raksturojošo lielumu vērtības: frekvenču novirzes rādītājs D' un LD korelācijas koeficients r^2 . Ar statistisku ticamību ($p < 0,0001$) noteikts, ka BA grupā starp lokusu alēlēm nav LD ($D' < 0,8$; $r^2 < 0,8$), taču kontroles grupā noteikta vidēji stipra LD ($D' = 0,84$; $r^2 = 0,59$).

3.2. VDR gēna SNP rs731236 un rs1544410 bioinformātiskā analīze

3.2.1. Polimorfismu sekvenču izmaiņu ietekme uz DNS un RNS sekundārajām struktūrām

Analīzes rezultātā noskaidrots, ka alēļu nomainīšana rs1544410 lokusā nerada ietekmi uz iespējamo DNS sekundāro struktūru, jo iegūtajos modeļos nav novērojamas izmaiņas abu alēļu variantos.

Polimorfisma rs731236 gadījumā, alēļu varianti G un A rada iespējamus alternatīvus DNS locīšanās jeb *foldinga* variantus, kas redzami iegūto sekundāro struktūru modeļos (3.4. attēls).



3.4. attēls. DNS sekundārās struktūras modeļi SNP rs731236 alēļu variantiem. A: SS modelis A alēles gadījumā. B: SS modelis G alēles gadījumā. Zilā un sarkanā krāsā atzīmētie nukleotīdi apzīmē analizētās sekvences sākuma un beigu punktus. Bultiņa norāda uz alēlēm.

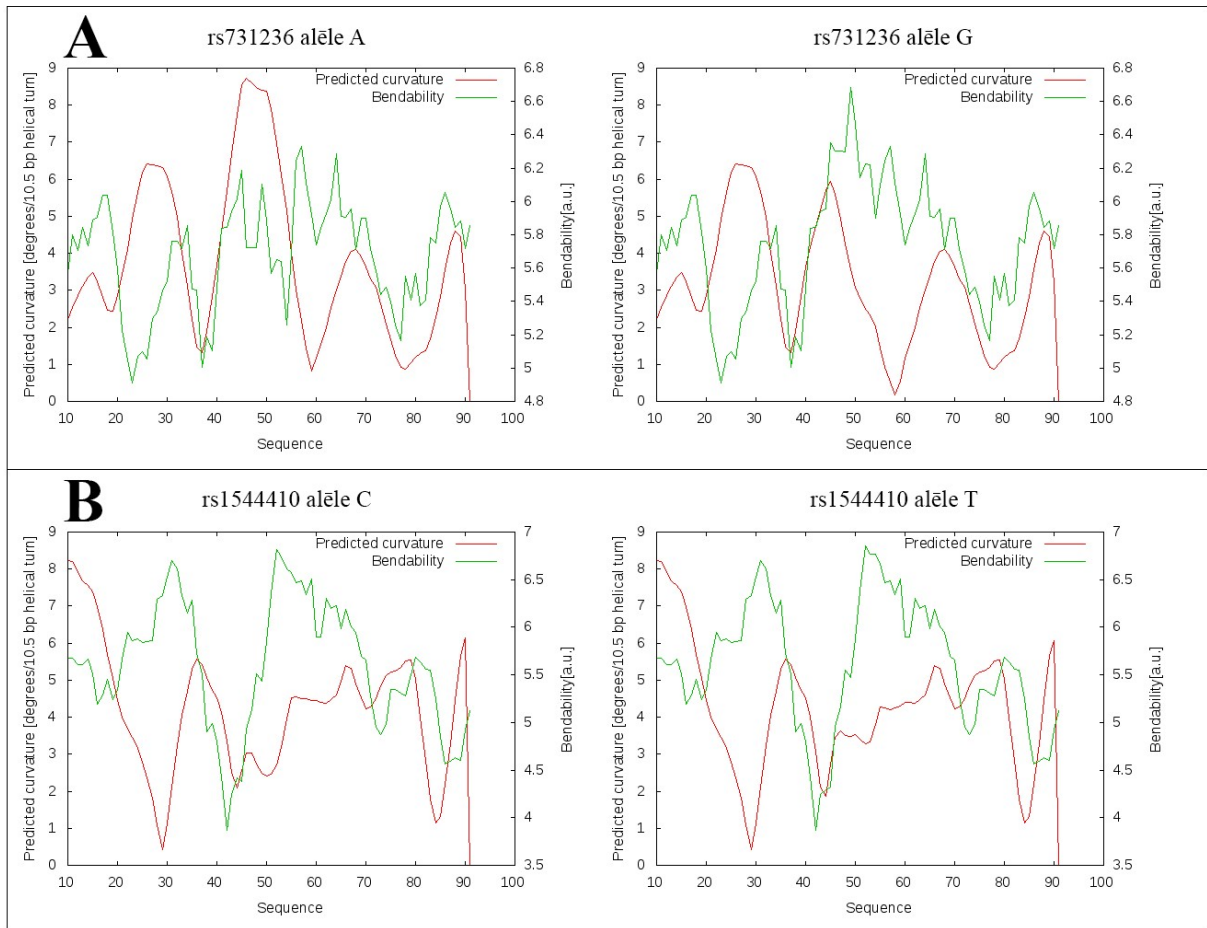
Figure 3.4. DNA secondary structure models for SNP rs731236 allelic variants. A: SS model in the case of the A allele. B: SS model for G allele. Nucleotides marked in blue and red indicate the start and end points of the analyzed sequence. The arrow points to alleles.

DNS sekundāro struktūru modeļos redzams, ka abas alēles veido matadatas cilpas struktūras noslēdzošos bāzu pārus (*hairpin loop closing base pairs*). Iegūto modeļu struktūras atšķirības norāda uz būtiskām izmaiņām DNS sekundārajā struktūrā, un liek domāt par alēļu nomaiņas iespējamo funkcionālo nozīmi DNS struktūru līmenī.

Analizējot rs731236 polimorfisma ietekmi uz RNS sekundāro struktūru, nebija novērojama alēļu atkarīga molekulas pārstrukturēšanās.

3.2.2. Polimorfismu sekvences izmaiņu ietekme uz DNS liekumiem un 3D struktūru

Lai gūtu iespaidu par to, vai polimorfismu alēļu nomaiņai ir iespējama ietekme uz DNS liekumiem un vispārējo sekvences fragmenta DNS struktūru, ar Bend.it un Model.it rīkiem tika sastādīti DNS liešanās spēju un liekuma leņķus raksturojoši grafiki (3.5. attēls), kā arī izveidotas DNS sekvences 3D modeļi.



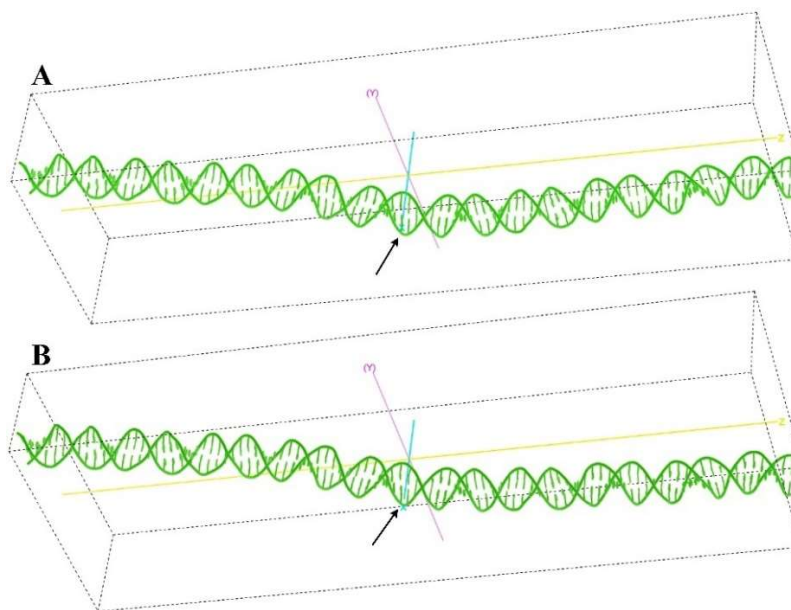
3.5. attēls. Iespējamās DNS liekumu izmaiņas atkarībā no sekvences variantu rs731236 un rs1544410 alēlēm. A: SNP rs731236 alēles. B: SNP rs1544410 alēles. Sarkanā līkne raksturo paredzamo DNS izliekumu (*predicted curvature*) grādos uz 10,5 bp spirālveida pagriezienu, un zaļā – liekšanās spēju (*bendability*). Abiem SNPs ir 51. pozīcija analizētajā sekvencē.

Figure 3.5. Possible changes in DNA curvature depending on the alleles of the sequence variants rs731236 and rs1544410. A: SNP rs731236 alleles. B: SNP rs1544410 alleles. The red curve represents the predicted curvature of the DNA in degrees per 10.5 bp helical turn, and the green the bendability. Both SNPs have position 51 in the analyzed sequence.

Analizējot grafikus noteikts, ka *VDR* gēna polimorfisma rs731236 nukleotīdu nomaiņas rezultātā (G uz A), ir novērojama DNS liekuma leņķa palielināšanās un liekšanās spējas samazināšanās. Šīs izmaiņas skar sekvences reģionu no 42. līdz 55. bp. Alēles A gadījumā noteiktais liekuma leņķis ir $8,4^\circ$ un alēles G gadījumā $2,7^\circ$ (3.5. attēls A).

SNP rs1544410 alternatīvās alēles nerada izmaiņas DNS sekvences liekšanās spējas pakāpē, taču konstatēts, ka C alēles gadījumā DNS liekuma leņķis samazinās par nepilnu grādu (3.5. attēls B).

Šīs konstatētās DNS liekumu izmaiņas iespējams novērot arī 3D makromolekulārās struktūras līmenī (3.6. attēls). Kā redzams konstruētajos rs731236 struktūras modeļos, alēļu nomainībai rs731236 SNP reģionā ir iespējama ietekme uz DNS molekulas liekumiem. Konkrēti A alēles gadījumā, DNS izliekums ir izteiktāks.



3.6. attēls. DNS struktūras modeļi trīsdimensionālajā telpā atkarībā no *VDR* gēna sekvenču varianta rs731236 alēles 51. sekvenču fragmenta pozīcijā. A: A alēles varianta modelis; B: G alēles varianta modelis. Modelī izmantota B-DNS dubultspirāles strukturālā forma. Bultas norāda uz SNP nukleotīdu variantiem. x,y,z – koordinātu asis.

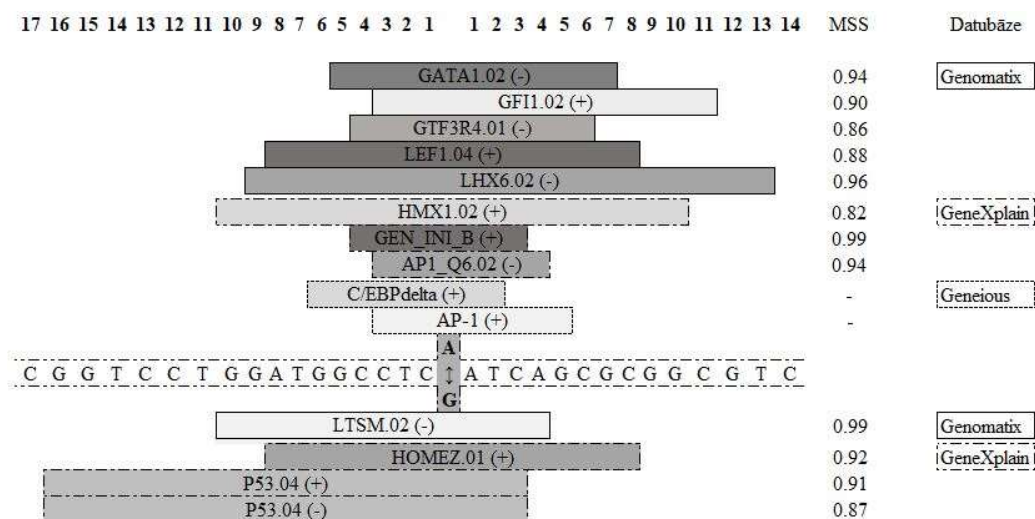
Figure 3.6. DNA structure models in three-dimensional space depending on *VDR* gene sequence variant rs731236 allele at position 51 of sequence fragment. A: A allele variant model; B: G allele variant model. The structural form of the B-DNA double helix is used in the model. Arrows indicate nucleotide variants of the SNP. x, y, z - coordinate axes.

3.2.3. Polimorfismu saistība ar transkripcijas faktoriem un to modifikācija atkarībā no sekvenču izmaiņām

Transkripcijas faktori (TF) tiek prognozēti analizējot *VDR* gēna sekvenču fragmenta homologiju ar jau iepriekš raksturotiem TF DNS saistošajiem domēniem. Lai noskaidrotu, vai alēļu nomainīšana ietekmē TF piesaisti pētītajos lokusus, tika sastādīti TF piesaistes modeļi katram no pētītajiem SNP, izmantojot datus no trīs dažādām TF datu bāzēm – Genomatix, GeneXplain un Geneious. Detalizētāki dati par identificētajiem TF, to matricas reģioniem un sekvenču ir apkopoti tabulā (4. pielikums).

Analīzes rezultāti abu sekvenču variantu gadījumā liecina, ka ir konstatējamas transkripcijas faktoru piesaistes izmaiņas atkarībā no konkrētajā pozīcijā esošās alēles.

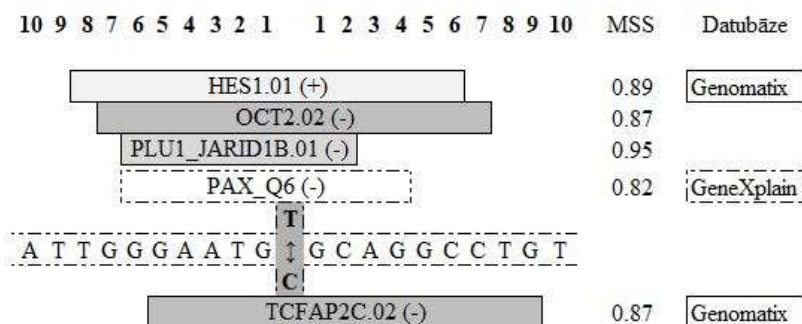
Jāatzīmē, ka modeļos iekļauti tikai tie TF kuru piesaiste ir izmainīta alēliskā varianta dēļ, tātad, netika apskatīti tie TF, kuru piesaistes spēja ir vienāda (nav atkarīga no alēļu nomaiņas). rs731236 lokusa nukleotīdu A/G nomaiņas gadījumā zūd 10 TF piesaistes vietas un rodas četras jaunas (3.7. attēls).



3.7. attēls. Transkripcijas faktoru piesaiste atkarībā no rs731236 lokusa alēlēm A/G. MMS - matricas sekvenču līdzības rādītājs; (-/+) - pavediena virziens.

Figure 3.7. Binding of transcription factors depending on the rs731236 locus alleles A/G. MMS - sequence similarity score; (-/+) – strand.

Salīdzinoši mazāks datu apjoms iegūts par rs1544410 lokusa transkripcijas faktoru piesaisti (3.8. attēls).



3.8. attēls. Transkripcijas faktoru piesaiste atkarībā no rs1544410 lokusa alēlēm A/G. MMS - matricas sekvenču līdzības rādītājs; (-/+) - pavediena virziens.

Figure 3.8. Binding of transcription factors depending on the rs1544410 locus alleles A/G. MMS – sequence similarity score; (-/+) – strand.

Analīzes rezultātā T alēles gadījumā konstatēta četru TF piesaiste (HES1.01, OCT2.02, PLU1_JARID1B.01, PAX_Q6) un C alēles gadījumā – tikai viena atšķirīga TF piesaiste (TCFAP2C.02).

4. DISKUSIJA

Bakalaura darba ietvaros tika analizēti divi D vitamīna receptora gēna viena nukleotīda polimorfismi, no kuriem rs1544410 (BsmI) ir lokalizēts *VDR* gēna 8. intronā, un rs731236 (TaqI) SNP lokalizēts gēna kodējošajā reģionā – 9. eksonā. Šis *VDR* gēna ģenētiskās variācijas rs1544410 un rs731236 ir vieni no zināmākajiem šī gēna polimorfismiem, kas potenciāli ietekmē *VDR* ekspresiju imūnsistēmā (Kamel et al. 2014). Literatūras dati liecina, ka šie polimorfismi varētu tikt saistīti ar pazeminātu seruma D vitamīna līmeni (Ruiz-Ballesteros et al. 2020; Sepulveda-Villegas et al. 2020) un palielinātu BA risku (Tizaoui et al. 2014), taču vēljoņām līdz galam nav noskaidrota konkrēta šo polimorfismu funkcionālā nozīme un ietekme uz bronhiālās astmas fenotipu (Kilic et al. 2019). Šo polimorfismu pētījumi mūsdienās vēljoņām ir aktuāli, un publikāciju skaits, kurās aprakstītas šo SNP asociācijas analīzes, tikai pieaug.

Analizējot bakalaura darba izstrādātajā pētījumā iegūtos genotipēšanas rezultātus kontroles un BA grupā Latvijas populācijā, tika noskaidrota rs731236 un rs1544410 polimorfismu potenciālā ietekme uz saslimšanas iespējamību, kā arī tika identificēti konkrēti aizsargājošie un riska genotipi (1. un 2. pielikums). Kā potenciāls slimības risku palielinošs noteikts rs1544410 retās alēles homozigotais genotips TT ($p = 4,56 \times 10^{-3}$, $OR_M = 2,36$, CI 95% [1,31 – 4,28]). Uz statistiskās ticamības robežas ($p=6,34 \times 10^{-2}$), kā aizsargājošais genotips, identificēts rs1544410 heterozigotais genotips CT ($OR_M = 0,65$, CI 95% [0,41 – 1,03]), kuru, saskaņā ar iegūtajiem datiem, nevaram uzskatīt par drošu rādītāju slimības riska samazināšanai, taču ir iespējams, ka šī potenciālā ģenētiskā marķiera statistiskā nozīmība varētu palielināties, ja analizētā bronhiālās astmas kohorta tiktu paplašināta. Savukārt, rs731236 netika noteikta statistiski ticama asociācija ar BA.

Šī pētījuma rezultātam līdzīgi dati iegūti arī Zhao un kolēģu (Zhao et al. 2017) veiktajā meta-analīzē, kurā analizēti dati no deviņiem BA un *VDR* polimorfismu gadījuma/kontroles (*case/control*) asociācijas pētījumiem. Šīs meta-analīzes rezultātā netika noteikta neviena statistiski ticama rs731236 asociācija ar astmu, kamēr rs1544410 gadījumā TT genotips identificēts kā iespējams slimības risku palielinošs genotips ($p = 0,042$, $OR = 1,181$, CI 95% [1,006–1.386]). Savukārt citā asociācijas analīzē noteikta sekvenses varianta rs731236 GG genotipa BA risku samazinošā ietekme ($p = 0,003$, $OR = 0,2$, CI 95% [0,07–0,5]) (Kilic et al. 2019). Ashok un kolēģu publikācijā, kurā apkopoti BA un *VDR* SNP asociācijas analīžu rezultāti, rs1544410 CT un TT identificēti kā statistiski ticami BA risku palielinoši genotipi ($OR = 1,35$; CI 95% [1,07 – 1,71] un $OR = 1,95$; CI 95% [1,59 – 2,39]) (Ashok et al. 2020).

Lai noskaidrotu vai esošā pētījuma rezultātā iegūtās reto alēļu frekvences (MAF) (rs1544410 T: 0,327 un rs731236 G: 0,389) atbilst starppopulāciju klasiskajam sadalījumam, Latvijas populācijas dati tika salīdzināti ar Ensemble genomu datubāzes (<https://www.ensembl.org/>), 1000 genomu 3. fāzes projekta MAF vērtībām dažādās populācijās (3.2 attēls). Apkopotajos datos iekļaujot Latvijas populācijā noteiktos MAF lielumus, varam secināt, ka šajā pētījumā iegūtais rezultāts atbilst Eiropas virspopulācijas grupai (EUR), kurā MAF lielumi rs1544410 gadījumā svārstās no 0,338 līdz 0,470 un rs731236 gadījumā – no 0,327 līdz 0,470. Nedaudz zemākas, bet tuvinātas Eiropas virspopulācijas reto alēļu frekvenču vērtībām ir Afrikāņu (AFR) virspopulācijas frekvences, kuras abu lokusu gadījumos ir amplitūdā no 0,23 līdz 0,35. Austrumāzijas virspopulācijas (EAS) MAF amplitūdas abu polimorfismu gadījumā ir viszemākās – T: 0,040 – 0,120; G: 0,040 – 0,115. Visaugstākās rs1544410 retās T alēles frekvences ir Dienvidāzijas populācijā (SAS), kamēr rs731236 G alēles gadījumā, Dienvidāzijas MAF atbilst Eiropas populācijā noteiktajām (3.2. attēls).

Literatūras avoti liecina, ka bieži vien šiem VDR polimorfismiem pētītiem atsevišķi nav nosakāma to funkcionālā nozīme un saistība ar slimību, un tiek uzskatīts, ka tie varētu būt iesaistīti sarežģītā “gēnu tīklā” (*gene network*) kopā ar citiem funkcionāliem polimorfismiem, tādējādi uzlabojot vai kavējot VDR mērķa gēnu ekspresiju, kas izskaidro novēroto saistību starp šo gēnu un autoimūnām (Ruiz-Ballesteros et al. 2020) un alergiskām slimībām (Zhang et al. 2020). Polimorfismu alēļu saistību raksturo nelīdzsvarotās saistības (LD) lielumi, kurus noteicām arī šajā pētījumā. Dažādi literatūras dati liecina par šo polimorfismu izteikti stipro LD dažādās Eiropas populācijās (Nejentsev et al. 2004). Latvijas populācijā noteikta vidēji stipra LD ($D' = 0,84$; $r^2 = 0,59$) un tā pilnīgi izzūd BA grupā ($D' = 0,53$; $r^2 = 0,18$).

Lai apstiprinātu atrastās asociācijas ar bronhiālo astmu, tika veikta pētīto ģenētisko variāciju haplotipu analīze. Haplotipi A-C un G-T noteikti kā statistiski būtiski aizsargājošie (attiecīgi, $p=1,05 \times 10^{-20}$; $OR_M=0,17$ un $p=2,32 \times 10^{-8}$; $OR_M = 0,17$), bet A-T ($p = 6,97 \times 10^{-29}$; $OR_A = 16,94$) un G-C ($p = 6,51 \times 10^{-25}$; $OR_A = 25,92$) tika identificēti kā slimības risku palielinoši (3. pielikums). Arī četriem divu lokusu genotipiem konstatēta saistība ar BA risku (3. pielikums) – slimības risku palielina AA-CT un GG-TC genotipi (attiecīgi: $p=3,89 \times 10^{-11}$; $OR_M=7,44$ un $p = 1,35 \times 10^{-4}$; $OR_M = 4,53$), kamēr kā aizsargājošās genotipu formas noteiktas GG-TT un AA-CC (attiecīgi: $p = 4,58 \times 10^{-2}$; $OR_M = 0,06$ un $p = 5,19 \times 10^{-4}$; $OR_M = 0,01$). Tādējādi no šiem datiem mēs varam secināt, ka lokusi rs1544410 un rs731236 var kalpot kā potenciālie bronhiālās astmas ģenētiskie marķieri Latvijas populācijā.

Mūsu pētījumā esam mēģinājuši novērtēt SNP ģenētisko variāciju iespējamo ietekmi uz gēnu transkripcijas regulāciju. Lai sasniegtu šo mērķi mēs, izmantojot bioinformātikas metodes, izveidojām un salīdzinājām alēlēm raksturīgos transkripcijas faktoru piesaistes (TFBS;

Transcription factor binding site) modeļus, DNS un RNS sekundārās struktūru modeļus, kā arī novērtējām alēļu nomaiņas ietekmi uz DNS liekumiem struktūrām

Tā kā viens no pētītajiem polimorfismiem atrodas VDR gēna intronā un tieši neietekmē proteīna sintēzi, ir svarīgi apskatīt, kā šī sekvenses izmaiņa ietekmē transkripcijas faktoru (TF) piesaisti, lai iegūtu plašāku priekšstatu par introniskās variācijas regulatoro ietekmi.

Iegūtie rezultāti liecina, ka rs1544410 un rs731236 alēļu variācijas ietekmē TF piesaisti – alternatīvas alēles rada jaunus TF piesaistes saitus. rs1544410 T alēle veicina četru jaunu TF piesaisti, kamēr rs731236 A alēle rada 10 jaunu TF piesaistes saitus. Šīs transkripcijas faktoru piesaistes izmaiņas potenciāli būtiski spēj modulēt VDR gēna transkripciju, kā arī atsevišķu slimību gadījumā ir tieši saistāmas ar slimības fenotipu (Nishizaki et al. 2020).

Sekvenses varianta rs731236 alēļu nomaiņas gadījumā konstatētas arī DNS sekundārās struktūras izmaiņas. DNS, kas satur dažādus bāzu pārus SNP saitos var veidot atšķirīgas alēliskās DNS sekundāro struktūru (SS) formas. ssDNS SS veidojas, kad DNS dubultspirāle atvijas replikācijas un transkripcijas laikā. Šīs konstatētās DNS sekundārās struktūras izmaiņas potenciāli var ietekmēt konkrētā sekvenses reģiona mijiedarbību ar dažādiem regulējošiem proteīniem (Lemaire et al. 2019). Līdz ar to šo struktūru izmaiņām ir loma tādos procesos kā DNS replikācija, transkripcija un DNS kļūdu labošana (Szlachta et al. 2018). Jāpiebilst, ka abu SNP gadījumā netika noteikta alēļu ietekme uz mRNS sekundārajām struktūrām.

Iegūtie rezultāti liecina, ka rs731236 alēliskie varianti A un G ietekmē arī DNS locīšanās spēju. Tiek uzskatīts, ka DNS spējai liekties ir liela nozīme tādos nozīmīgos procesos kā gēnu ekspresijas regulācija, DNS “iepakošana” un DNS replikācija, kas tieši saistīta ar regulatoro proteīnu piesaistes spēju (Gabrielian et al. 1996). Konkrēti noteikts, ka VDR gēna polimorfisma rs731236 nukleotīdu nomaiņas rezultātā (A uz G), ir novērojama DNS liekuma lenķa samazināšanās un liekšanās spējas palielināšanās, kas pēc literatūras datiem norāda uz apgrūtinātu sekvenses-specifisku regulatoro proteīnu piesaisti konkrētajā DNS reģionā (Ohyama 2005).

Lai gan bioinformātiskās jeb *in silico* analīzes rezultātā tika atklāta iespējamā sekvenses variantu alēļu nomaiņas ietekme uz dažādiem SNP funkcionālajiem aspektiem, šie dati ir tikai teorētiski un ir nepieciešama iegūto rezultātu validācija veicot *in vitro* pētījumus.

Diskusijas noslēgumā vēlētos pieminēt izstrādātā bakalaura darba pētījuma uzlabošanas iespējas un perspektīvus nākotnes pētījumus, kas varētu papildināt jau līdz šim iegūtos datus par VDR polimorfismu iespējamo nozīmi astmas patoģenēzē. Abi pētītie polimorfismi atrodas VDR gēna 3' galā, kas, kā zināms, ir iesaistīts gēnu ekspresijas regulācijā, regulējot mRNS stabilitāti un ekspresijas līmeni (Fang et al. 2005). Tāpēc, lai iegūtu plašāku priekšstatu par šo SNP funkcionālo nozīmi, šo pētījumu varētu papildināt ar VDR gēna ekspresijas pētījumiem.

Izmainīta gēnu ekspresija var būtiski ietekmēt slimības risku (Cooper et al. 2009), tāpēc, veicot polimorfismu asociācijas analīzi ar slimību, ir svarīgi pētījumā integrēt arī šāda tipa genomiskos datus. Piemēram, kādā līdzīgā pētījumā ar astmas slimniekiem Turcijā, kurā salīdzināti *VDR* mRNS ekspresijas līmeņi starp kontroles un BA grupu, secināts, ka *VDR* mRNS ekspresija ir samazināta TaqI AA un AG genotipu gadījumā ($p < 0,05$) (Kilic et al. 2019). Tas rada iespēju domāt, ka, lai gan Latvijas populācijā netika noteikta statistiski ticama rs731236 genotipu saistība ar slimību, iespējams tāda pastāv mRNS ekspresijas līmenī, tāpēc jāveic tālāki funkcionālie pētījumi.

Kā vēl viens perspektīvs šī pētījuma uzlabojums varētu būt *VDR* gēna polimorfismu analīze saistībā ar dažādiem astmas klīniskajiem datiem. Kā, piemēram, ar imunoglobulīna E (IgE) un seruma 25(OH)D₃ līmeni. Līdz šim jau ir veiktas dažādas asociācijas analīzes, kurās pētīta tieši D vitamīna līmeņa rādītāji saistībā ar BA un *VDR* polimorfismiem (Galvão et al. 2020), bet literatūras datos salīdzinoši nesen parādījusies informācija par *VDR* lomu IgE līmeņa regulācijā, kuras funkcionālie aspekti vēl nav skaidri (James et al. 2017).

Būtisks veiktā pētījuma uzlabojums būtu arī bronhiālās astmas grupas paplašināšana ar mērķi iegūt statistiski ticamākus pētīto polimorfismu asociācijas analīzes rezultātus, kas pārlicinošāk reprezentētu iespējamās BA ģenētiskos marķierus Latvijas populācijas apmērā.

5. SECINĀJUMI

1. Tika papildināta BA un kontroles grupas DNS kolekcija, un genotipēti 110 BA un 253 kontroles grupas paraugi.
2. *VDR* gēna polimorfismu rs1544410 un rs731236 MAF lielumi atbilst starppopulāciju klasiskajam sadalījumam un pieder pie Eiropas virs populācijas grupas.
3. Polimorfisma rs1544410 TT genotips noteikts kā iespējams BA riska faktors Latvijas populācijā un haplotipu analīzes rezultātā A-T un G-C konstatēti kā BA riska formas, kamēr A-C un G-T identificēti kā slimības risku samazinoši haplotipi. Divu lokusu kombināciju genotipiem AA-CT un GG-TC ir iespējama BA risku palielinoša ietekme, bet GG-TT un AA-CC noteikti kā aizsargājošie genotipi Latvijas populācijā.
4. Bioinformātiskās analīzes rezultātā konstatēts, ka rs1544410 un rs731236 lokusu alēļu variācijām ir iespējama funkcionāla ietekme uz TF piesaistes spēju, un rs731236 lokusa alēles rada alternatīvas DNS sekundārās struktūras, kas var izraisīt DNS liekumu izmaiņas.
5. Tika atklāta statistiski būtiska *VDR* gēna polimorfismu rs731236 un rs1544410 iespējama ietekme uz bronhiālās astmas saslimstības risku, un tādējādi tie varētu tikt izmantoti kā potenciāli BA ģenētiskie marķieri Latvijas populācijā.

6. PATEICĪBAS

Vēlos pateikties darba vadītājai Nataliai Paramonovai, par doto iespēju izstrādāt bakalaura darbu LU Bioloģijas institūta Genomikas un bioinformātikas laboratorijā, kā arī par dotajiem padomiem darba rakstīšanas laikā. Paldies arī LU Bioloģijas institūta Genomikas un bioinformātikas laboratorijas kolēģiem, kas palīdzēja ar praktisko darba izpildi un datu apstādi, kā arī motivēja un atbalstīja mani mana pirmā nozīmīgā zinātniskā darba tapšanā.

7. LITERATŪRAS SARAKSTS

- Abdollahzadeh R., Fard M.S., Rahmani F., Moloudi K., Kalani B.S., Azarnezhad A. 2016. Predisposing role of Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms in the development of multiple sclerosis: A case-control study. – *Journal of the Neurological Sciences*, 367 148–151.
- Ardlie K.G., Kruglyak L., Seielstad M. 2002. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. – *Nature Reviews Genetics*, 3(4): 299–309.
- Ashok N., Kirubakaran R., Saraswathy R. 2020. Association of vitamin D gene polymorphisms in children with asthma - A systematic review. – *Heliyon*, 6(9): 415-430.
- Babjoniševa, A. 2015. Astma. – *Medicus Bonus*, 20: 34–45.
- Bae S.C., Lee Y.H. 2018. Vitamin D receptor FokI, TaqI, and ApaI polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: an updated meta-analysis. – *Clinical Rheumatology*, 37(6): 1529–1537.
- Bikle D.D. 2014. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. – *Chemistry and Biology*, 21(3): 319–329.
- Bizzaro G., Antico A., Fortunato A., Bizzaro N. 2017. Vitamin D and autoimmune diseases: Is vitamin D receptor (VDR) polymorphism the culprit? – *Israel Medical Association Journal*, 19(7): 438–443.
- Calabrese B. 2018. Linkage disequilibrium. – *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 1–3(Ld): 763–765.
- Cantorna M.T., Yu S., Bruce D. 2008. The paradoxical effects of vitamin D on type 1 mediated immunity. – *Molecular Aspects of Medicine*, 29(6): 369–375.
- Cantorna M.T., Snyder L., Lin Y.D., Yang L. 2015. Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. – *Nutrients*, 7(4): 3011–3021.
- Cartharius K., Frech K., Grote K., Klocke B., Haltmeier M., Klingenhoff A., Frisch M., Bayerlein M., Werner T. 2005. MatInspector and beyond: Promoter analysis based on transcription factor binding sites. – *Bioinformatics*, 21(13): 2933–2942.
- Cheon C.K., Nam H.K., Lee K.H., Kim S.Y., Song J.S., Kim C. 2015. Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 1 diabetes mellitus in a Korean population. – *Pediatrics International*, 57(5): 870–874.
- Christakos S., Ajibade D. V., Dhawan P., Fechner A.J., Mady L.J. 2010. Vitamin D: Metabolism. – *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39(2): 243–253.

- Christakos S., Dhawan P., Verstuyf A., Verlinden L., Carmeliet G. 2015. Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. – *Physiological Reviews*, 96(1): 365–408.
- Cooper T.A., Wan L., Dreyfuss G. 2009. HHMI Author Manuscript RNA and Disease. – *Hhmi*, 136(4): 777–793.
- Corbridge S., Corbridge T.C. 2010. Asthma in adolescents and adults. – *American Journal of Nursing*, 110(5): 28–38.
- Dankers W., Colin E.M., van Hamburg J.P., Lubberts E. 2017. Vitamin D in autoimmunity: Molecular mechanisms and therapeutic potential. – *Frontiers in Immunology*, 7(1):1–15
- Dowd D.R., MacDonald P.N. 2013. Vitamin D Receptor. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* 2nd edn. Elsevier Inc., NY: Academic Press, 3232 pp.
- Einisman H., Reyes M.L., Angulo J., Cerda J., López-Lastra M., Castro-Rodriguez J.A. 2015. Vitamin D levels and vitamin D receptor gene polymorphisms in asthmatic children: A case-control study. – *Pediatric Allergy and Immunology*, 26(6): 545–550.
- Fang Y., Van Meurs J.B.J., D'Alesio A., Jhamai M., Zhao H., Rivadeneira F., Hofman A., Van Leeuwen J.P.T., Jehan F., Pols H.A.P., Uitterlinden A.G. 2005. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin D receptor gene predispose to osteoporotic fracture: The Rotterdam study. – *American Journal of Human Genetics*, 77(5): 807–823.
- Gabrielian A., Simoncsits A., Pongor S. 1996. Distribution of bending propensity in DNA sequences. – *FEBS Letters*, 393(1): 124–130.
- Galvão A.A., De Araújo Sena F., Andrade Belitardo E.M.M. De, De Santana M.B.R., Costa G.N.D.O., Cruz Á.A., Barreto M.L., Costa R.D.S., Alcantara-Neves N.M., Figueiredo C.A. 2020. Genetic polymorphisms in vitamin D pathway influence 25(OH)D levels and are associated with atopy and asthma. – *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 16(1): 1–13.
- GBD 2015 Disease Injury Incidence Prevalence Collaborators. "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015". – *Lancet*, 388 (10053): 1545–1602.
- Gil Á., Plaza-Diaz J., Mesa M.D. 2018. Vitamin D: Classic and Novel Actions. – *Annals of Nutrition and Metabolism*, 72(2): 87–95.
- Han J.C., Du J., Zhang Y.J., Qi G. Bin, Li H.B., Zhang Y.J., Yu X.L. 2016. Vitamin D receptor polymorphisms may contribute to asthma risk. – *Journal of Asthma*, 53(8): 790–800.
- Han Y., Jia Q., Jahani P.S., Hurrell B.P., Pan C., Huang P., Gukasyan J., Woodward N.C., Eskin E., Gilliland F.D., Akbari O., Hartiala J.A., Allayee H. 2020. Genome-wide analysis

- highlights contribution of immune system pathways to the genetic architecture of asthma. – *Nature Communications*, 11(1): 1–13.
- Harrison S.R., Li D., Jeffery L.E., Raza K., Hewison M. 2020. Vitamin D, Autoimmune Disease and Rheumatoid Arthritis. – *Calcified Tissue International*, 106(1): 58–75.
- Haussler M.R., Jurutka P.W., Mizwicki M., Norman A.W. 2011. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃: Genomic and non-genomic mechanisms. – *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25(4): 543–559.
- Henry H.L. 2011. Regulation of vitamin D metabolism. – *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25(4): 531–541.
- Hou C., Zhu X., Chang X. 2018. Correlation of vitamin D receptor with bronchial asthma in children. – *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(3): 2773–2776.
- Howard R., Scheiner A., Cunningham J., Gatenby R. 2019. Cytoplasmic convection currents and intracellular temperature gradients. – *PLoS Computational Biology*, 15(11): 1–17.
- Hughes M.R., Malloy P.J., Kieback D.G., Kesterson R.A., Pike J.W., Feldman D., Malley B.W.O. 1987. Associated with Hypocalcemic Rickets, 242(1986): 8–11.
- Hutchinson K., Kerley C.P., Faul J., Grealley P., Coghlan D., Louw M., Elnazir B., Rochev Y. 2018. Vitamin D receptor variants and uncontrolled asthma. – *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 50(3): 108–116.
- Imani D., Razi B., Motallebnezhad M., Rezaei R. 2019. Association between vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and the risk of multiple sclerosis (MS): An updated meta-analysis. – *BMC Neurology*, 19(1): 1–17.
- Iordanidou M., Paraskakis E., Giannakopoulou E., Tavridou A., Gentile G., Borro M., Simmaco M., Chatzimichael A., Bush A., Manolopoulos V.G. 2014. Vitamin D receptor ApaI allele is associated with better childhood asthma control and improvement in ability for daily activities. – *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 18(11): 673–681.
- James J., Weaver V., Cantorna M.T. 2017. Control of Circulating IgE by the Vitamin D Receptor In Vivo Involves B Cell Intrinsic and Extrinsic Mechanisms. – *The Journal of Immunology*, 198(3): 1164–1171.
- Jolliffe D.A., Walton R.T., Griffiths C.J., Martineau A.R. 2016. Single nucleotide polymorphisms in the vitamin D pathway associating with circulating concentrations of vitamin D metabolites and non-skeletal health outcomes: Review of genetic association studies. – *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 164: 18–29.
- Kamel M.M., Fouad S.A., Salaheldin O., El-Razek A.E.R.A.A., El-Fatah A.I.A. 2014. Impact of vitamin D receptor gene polymorphisms in pathogenesis of Type-1 diabetes mellitus. – *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(12): 5505–5510.

- Kemeny L. V., Fisher D.E. 2019. Chapter 23: Hormones and Hormone Precursors of the Skin. *Hormonal Signaling in Biology and Medicine: Comprehensive Modern Endocrinology*. Elsevier Inc., NY: Academic Press, 738 pp.
- Khammissa R.A.G., Fourie J., Motswaledi M.H., Ballyram R., Lemmer J., Feller L. 2018. The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health. – *BioMed Research International*, 2018.
- Khlestkina E.K., Salina E.A. 2006. SNP markers: Methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat. – *Russian Journal of Genetics*, 42(6): 585–594.
- Kilic M., Ecin S., Taskin E., Sen A., Kara M. 2019. The Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Asthmatic Children: A Case-Control Study. – *Pediatric, Allergy, Immunology, and Pulmonology*, 32(2): 63–69.
- Koivisto O., Hanel A. 2020. Key Vitamin D Target Genes with Functions in the Immune System. *Nutrients*, 12(4):1140.
- Kongsbak M., Levring T.B., Geisler C., von Essen M.R. 2013. The vitamin D receptor and T cell function. – *Frontiers in Immunology*, 4(6): 1–10.
- Lagishetty V., Liu N.Q., Hewison M. 2011. Vitamin D metabolism and innate immunity. – *Molecular and Cellular Endocrinology*, 347(1–2): 97–105.
- Lemaire S., Fontrodona N., Aubé F., Claude J.B., Polvèche H., Modolo L., Bourgeois C.F., Mortreux F., Auboeuf D. 2019. Characterizing the interplay between gene nucleotide composition bias and splicing. – *Genome Biology*, 20(1): 1–21.
- Lin R. 2016. Crosstalk between Vitamin D metabolism, VDR signalling, and innate immunity. – *BioMed Research International*, 49(1): 20–55 .
- Lips P. 2006. Vitamin D physiology. – *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1): 4–8.
- Litonjua A.A. 2012. Vitamin D deficiency as a risk factor for childhood allergic disease and asthma. – *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(2): 179–185.
- Lorenz R., Bernhart S.H., Höner zu Siederdisen C., Tafer H., Flamm C., Stadler P.F., Hofacker I.L. 2011. ViennaRNA Package 2.0. – *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1): 0–14.
- Maalmi H., Sassi F.H., Berraies A., Ammar J., Hamzaoui K., Hamzaoui A. 2013. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to asthma in Tunisian children: A case control study. – *Human Immunology*, 74(2): 234–240.
- Mathews D.H., Disney M.D., Childs J.L., Schroeder S.J., Zuker M., Turner D.H. 2004. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm

- for prediction of RNA secondary structure. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(19): 7287–7292.
- Mathias R. A. ed. Brasier A. R. 2014. Heterogeneity in Asthma. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 795. NY: Springer Science & Business Media, 354 pp.
- Miller S. A., Dykes D. D., & Polesky H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3), 1215.
- Mims J.W. 2015. Asthma: Definitions and pathophysiology. – *International Forum of Allergy and Rhinology*, 5(5): 2–6.
- Mohammadi A., Khanbabaei H., Nasiri-Kalmarzi R., Khademi F., Jafari M., Tajik N. 2020 a. Vitamin D receptor ApaI (rs7975232), BsmI (rs1544410), FokI (rs2228570), and TaqI (rs731236) gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis in an Iranian population: A systematic review and meta-analysis. – *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53(6): 827–835.
- Mohammadi A., Azarnezhad A., Khanbabaei H., Izadpanah E., Abdollahzadeh R., Barreto G.E., Sahebkar A. 2020 b. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and the risk of multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. – *Steroids*, 158(2): 108–615.
- Moosavi E., Rafiei A., Yazdani Y., Eslami M., Saeedi M. 2021. Association of serum levels and receptor genes BsmI, TaqI and FokI polymorphisms of vitamin D with the severity of multiple sclerosis. – *Journal of Clinical Neuroscience*, 84: 75–81.
- Mueller J.C. 2004. Linkage disequilibrium for different scales and applications. – *Briefings in bioinformatics*, 5(4): 355–364.
- Munkhbayarlakh S., Kao H.F., Hou Y.I., Tuvshintur N., Bayar-Ulzii B., Narantsetseg L., Wang J.Y., Hsin Wu L.S. 2019. Vitamin D plasma concentration and vitamin D receptor genetic variants confer risk of asthma: A comparison study of Taiwanese and Mongolian populations. – *World Allergy Organization Journal*, 12(11): 100–176.
- Munteanu M.G., Vlahovicek K., Parthasarathy S., Simon I., Pongor S. 1998. Rod models of DNA: Sequence-dependent anisotropic elastic modelling of local bending phenomena. – *Trends in Biochemical Sciences*, 23(9): 341–347.
- Nasiri-Kalmarzi R., Abdi M., Hosseini J., Tavana S., Mekarizadeh A., Rahbari R. 2019. Association of vitamin D genetic pathway with asthma susceptibility in the Kurdish population. – *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(1): 1–8.
- Nejentsev S., Godfrey L., Snook H., Rance H., Nutland S., Walker N.M., Lam A.C., Guja C., Ionescu-Tirgoviste C., Undlien D.E., Rønningen K.S., Tuomilehto-Wolf E., Tuomilehto J., Newport M.J., Clayton D.G., Todd J.A. 2004. Comparative high-resolution analysis

- of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. – *Human Molecular Genetics*, 13(15): 1633–1639.
- Nunes C., Pereira A.M., Morais-Almeida M. 2017. Asthma costs and social impact. – *Asthma Research and Practice*, 3(1): 1–11.
- Ohyama T. 2005. DNA Conformation and Transcription. – *DNA Conformation and Transcription*, (September 2014): 0–14.
- Papadopoulou A., Kouis P., Middleton N., Kolokotroni O., Karpathios T., Nicolaidou P., Yiallourous P.K. 2015. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and vitamin D levels with asthma and atopy in Cypriot adolescents: a case-control study. – *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 10(1):2–15.
- Paramonova N., Trapina I., Dokane K., Kalnina J., Sjakste T., Sjakste N. 2020. An intergenic rs9275596 polymorphism on chr. 6p21 is associated with multiple sclerosis in latvians. – *Medicina (Lithuania)*, 56(4): 1–11.
- Pillai D.K., Sabah Iqbal P.F., Benton A.S., Jennifer Lerner P., Andrew Wiles P., Matthew Foerster P., Tugba Ozedirne P., Holbrook H.P., Perry Payne P.W., Gordish-Dressman H., Stephen Teach P.J., Freishtat R.J. 2011. Associations Between Genetic Variants in Vitamin D Metabolism and Asthma Characteristics in Young African Americans: A Pilot Study Introduction: Low vitamin D levels have been associated with asthma, 59(6): 938–947.
- Raby B.A., Lazarus R., Silverman E.K., Lake S., Lange C., Wjst M., Weiss S.T. 2004. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma. – *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(10): 1057–1065.
- Rohlf's R. V., Weir B.S. 2008. Distributions of hardy-weinberg equilibrium test statistics. – *Genetics*, 180(3): 1609–1616.
- Ruiz-Ballesteros A.I., Meza-Meza M.R., Vizmanos-Lamotte B., Parra-Rojas I., de la Cruz-Mosso U. 2020. Association of vitamin D metabolism gene polymorphisms with autoimmunity: Evidence in population genetic studies. – *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24): 1–24.
- Ryman N., Jorde P.E. 2001. Statistical power when testing for genetic differentiation. – *Molecular Ecology*, 10(10): 2361–2373.
- Saadi A., Gao G., Li H., Wei C., Gong Y., Liu Q. 2009. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the chinese han population: A case-control study. – *BMC Medical Genetics*, 10 1–7.
- Sassi F., Tamone C., D'amelio P. 2018. Vitamin D: Nutrient, hormone, and immunomodulator. – *Nutrients*, 10(11): 1–14.

- Sedgwick P., Marston L. 2010. Statistical question: Odds ratios. – *BMJ (Online)*, 341(7769): 407–453.
- Selroos O., Kupczyk M., Kuna P., Łacwik P., Bousquet J., Brennan D., Palkonen S., Contreras J., FitzGerald M., Hedlin G., Johnston S.L., Louis R., Metcalf L., Walker S., Moreno-Galdó A., Papadopoulos N.G., Rosado-Pinto J., Powell P., Haahtela T. 2015. National and regional asthma programmes in Europe. – *European Respiratory Review*, 24(137): 474–483.
- Sepulveda-Villegas M., Elizondo-Montemayor L., Trevino V. 2020. Identification and analysis of 35 genes associated with vitamin D deficiency: A systematic review to identify genetic variants. – *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 196: 105–120.
- Shieh A., Chun R.F., Ma C., Witzel S., Meyer B., Rafison B., Swinkels L., Huijs T., Pepkowitz S., Holmquist B., Hewison M., Adams J.S. 2016. Effects of high-dose vitamin D2 versus D3 on total and free 25-hydroxyvitamin D and markers of calcium balance. – *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(8): 3070–3078.
- Song G.G., Bae S.C., Lee Y.H. 2016. FokI, BsmI und TaqI-Polymorphismus des Vitamin-D-Rezeptors und Anfälligkeit für rheumatoide Arthritis: Eine Metaanalyse. – *Zeitschrift für Rheumatologie*, 75(3): 322–329.
- Takeuchi F., Yanai K., Morii T., Ishinaga Y., Taniguchi-Yanai K., Nagano S., Kato N. 2005. Linkage disequilibrium grouping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) reflecting haplotype phylogeny for efficient selection of tag SNPs. – *Genetics*, 170(1): 291–304.
- Szlachta K., Thys R.G., Atkin N.D., Pierce L.C.T., Bekiranov S., Wang Y.H. 2018. Alternative DNA secondary structure formation affects RNA polymerase II promoter-proximal pausing in human. – *Genome Biology*, 19(1): 1–19.
- Thomsen S.F. 2015. Genetics of asthma: an introduction for the clinician. – *European Clinical Respiratory Journal*, 2(1): 24643–24654.
- Tizaoui K., Berraies A., Hamdi B., Kaabachi W., Hamzaoui K., Hamzaoui A. 2014. Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Asthma Risk: Systematic Review and Updated Meta-analysis of Case–Control Studies. – *Lung*, 192(6): 955–965.
- Tobergte D.R., Curtis S. 2010. vitamin D physiology, molecular biology. – *Journal of Chemical Information and Modeling*, 5(1): 41–57.
- Travers A.A. 2004. The structural basis of DNA flexibility. – *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 362(1820): 1423–1438.
- Uitterlinden A.G., Fang Y., Van Meurs J.B.J., Pols H.A.P., Van Leeuwen J.P.T.M. 2004. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. – *Gene*, 338(2): 143–156.

- Ulyanov N.B., James T.L. 1995. Statistical Analysis of DNA Duplex Structural Features. – *Methods*, 261(1993): 90–120.
- Umar M., Sastry K.S., Chouchane A.I. 2018. Role of vitamin D beyond the skeletal function: A review of the molecular and clinical studies. – *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6): 1–28.
- Verstuyf A., Carmeliet G., Bouillon R., Mathieu C. 2010. Vitamin D: A pleiotropic hormone. – *Kidney International*, 78(2): 140–145.
- Wang W., Wu A., Zhou Y., Wang Y., Cao K. 2017. Association between Vitamin D receptor polymorphisms and rheumatoid arthritis risk: A meta-analysis. – *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(2): 4221–4233.
- Wang Y., Zhu J., DeLuca H.F. 2012. Where is the vitamin D receptor? – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523(1): 123–133.
- Wingender E. 2008. The TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation. – *Briefings in Bioinformatics*, 9(4): 326–332.
- Wöbke T.K., Sorg B.L., Steinhilber D. 2014. Vitamin D in inflammatory diseases. – *Frontiers in Physiology*, 5 (7): 1–20.
- Xu C., Zhou H., Gu M. 2009. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and Graves' disease: A meta-analysis. – *Clinical Endocrinology*, 70(6): 938–945.
- Yang C.Y., Leung P.S.C., Adamopoulos I.E., Gershwin M.E. 2013. The implication of vitamin D and autoimmunity: A comprehensive review. – *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 45(2): 217–226.
- Yang L., Ma J., Zhang X., Fan Y., Wang L. 2012. Protective role of the vitamin D receptor. – *Cellular Immunology*, 279(2): 160–166.
- Zhang L., Zhang S., He C., Wang X. 2020. VDR Gene Polymorphisms and Allergic Diseases: Evidence from a Meta-analysis. – *Immunological Investigations*, 49(1–2): 166–177.
- Zhang Y., Wang Z., Ma T. 2017. Associations of Genetic Polymorphisms Relevant to Metabolic Pathway of Vitamin D3 with Development and Prognosis of Childhood Bronchial Asthma. – *DNA and Cell Biology*, 36(8): 682–692.
- Zhao D.D., Yu D.D., Ren Q.Q., Dong B., Zhao F., Sun Y.H. 2017. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to childhood asthma: A meta-analysis. – *Pediatric Pulmonology*, 52(4): 423–429.

Pielikumi

1. pielikums

Rezultāti par *VDR* gēna SNP rs731236 genotipu un alēļu sadalījumu BA un kontroles grupās

<i>VDR</i> gēna SNP ID	Alēle vai genotips	Alēļu un genotipu sadalījums								Statistiskie dati			
		BA pacienti (110)				Kontroles gr. (251)				Ģenētiskais modelis	P vērtība	OR [95% CI]	
		Reālais		Sagaidāmais		Reālais		Sagaidāmais					
		n	%	n	%	n	%	n	%				
rs731236	G	85	38,64	-	-	164	32,67	-	-	G pret A	0,12	1,30 [0,93 - 1,80]	
	A	135	61,36	-	-	338	67,33	-	-				
	AG		45	40,91	53	47,42	106	42,23	110	43,99	AG pret AA	0,72	1,09 [0,67 - 1,79]
											AG pret GG + AA	0,81	0,95 [0,60 - 1,49]
	GG		20	18,18	16	14,93	29	11,55	27	10,67	GG pret AA	0,09	1,78 [0,92 - 3,46]
											GG pret AA + AG	0,09	1,70 [0,91 - 3,16]
	AA	45	40,91	41	37,65	116	46,22	114	45,33	AA pret AG + GG	0,35	0,81 [0,51 - 1,27]	
	AG + GG	65	59,09	-	-	135	53,78	-	-	AG + GG pret AA	0,35	1,24 [0,79 - 1,95]	

Saīsinājumi: OR (*odds ratio*) – izredžu attiecība; CI (*confidence interval*) – ticamības intervāls; n – skaits.

2. pielikums

Rezultāti par *VDR* gēna SNP rs1544410 genotipu un alēļu sadalījumu BA un kontroles grupās

<i>VDR</i> gēna SNP ID	Alēle vai genotips	Alēļu un genotipu sadalījums								Statistiskie dati		
		BA pacienti (110)				Kontroles gr. (253)				Ģenētiskais modelis	P vērtība	OR [95% CI]
		Reālais		Sagaidāmais		Reālais		Sagaidāmais				
		n	%	n	%	n	%	n	%			
rs1544410	T	94	42,73	-	-	184	36,65	-	-	T pret C	0,11	1,31 [0,95 - 1,80]
	C	126	57,27	-	-	322	64,14	-	-			
	CT	44	40,00	54	48,94	128	51,00	118	47,02	CT pret CC	0,42	0,81 [0,49 - 1,34]
										CT pret TT + CC	0,85	0,96[0,60 – 1,52]
	TT	25	22,73	20	18,26	28	11,16	34	13,43	TT pret CC	2,44 · 10⁻²	2,11 [1,10 - 4,05]
										TT pret CC + CT	4,56 · 10⁻³	2,36 [1,31 - 4,28]
	CC	41	37,27	36	32,80	97	38,65	103	41,14	CC pret CT + TT	0,35	0,81 [0,51 - 1,27]
	CT + TT	69	62,73	-	-	156	62,16	-	-	CT + TT pret CC	0,85	1,05 [0,66 – 1,66]

Saīsinājumi: OR (*odds ratio*) – izredžu attiecība; CI (*confidence interval*) – ticamības intervāls; n – skaits. Statistiski ticamas p vērtības ir iezīmētas trenknrakstā.

3. pielikums

Rezultāti par alēļu haplotipu un divu lokusu (rs1544410 un rs731236) genotipu sadalījumu BA un kontroles grupās

Haplotips/genotips	Alēļu haplotipu un divu lokusu genotipu sadalījums				Statistiskie dati			
	BA pacienti		Kontroles gr.		Aditīvais modelis		Multiplikatīvais modelis	
	(110)		(253)		P vērtība	OR [95% CI]	P vērtība	OR [95% CI]
	n	%	n	%				
A-T	90	40,91	36	7,11	$6,97 \cdot 10^{-29}$	16,94[10,30 – 27,86]	$1,96 \cdot 10^{-23}$	9,04[5,86 – 13,93]
G-C	65	29,55	17	3,36	$6,51 \cdot 10^{-25}$	25,92[13,96 – 48,12]	$4,77 \cdot 10^{-18}$	12,06[6,86 – 21,20]
A-C	45	20,45	305	60,28	-	-	$1,05 \cdot 10^{-20}$	0,17[0,12 – 0,25]
G-T	20	9,09	148	29,25	0,76	0,92[0,52 – 1,61]	$2,32 \cdot 10^{-8}$	0,24[0,15 – 0,40]
AG-CT	45	40,91	96	38,25	-	-	0,99	1,00[0,63 – 1,59]
GG-TC	20	18,18	11	4,38	$1,14 \cdot 10^{-3}$	3,88[1,71 – 8,78]	$1,35 \cdot 10^{-4}$	4,53[2,08 – 9,83]
GG-TT	0	0	17	6,77	0,052	0,06[0,004 – 1,03]	$4,58 \cdot 10^{-2}$	0,06[0,003 – 0,95]
AA-CT	45	40,91	20	7,97	$1,40 \cdot 10^{-6}$	4,71[2,51 – 8,83]	$3,89 \cdot 10^{-11}$	7,44[4,10 – 13,50]
AA-CC	0	0	91	36,25	$1,82 \cdot 10^{-3}$	0,01[0,0007 – 0,19]	$5,19 \cdot 10^{-4}$	0,01[0,0004 – 0,12]

Saīsinājumi: OR (*odds ratio*) – izredžu attiecība; CI (*confidence interval*) – ticamības intervāls; n – skaits. Statistiski ticamas p vērtības ir iezīmētas trenknrakstā.

4. pielikums

Informācija par *VDR* gēna lokusu rs731236 un rs1544410 bioinformātiskās analīzes rezultātā identificētajiem transkripcijas faktoriem

<i>VDR</i> gēna SNP	TF saime	Matrica	Sekvence	Pavediena virziens (-/+)	MSS	CSS	
rs731236	Alēle A	GATA	V\$GATA1.02	cgctGATTgaggc	-	0,94	1
		GFI1	V\$GFI1.02	ctcAATCagcgcggc	+	0,90	1
		GUCE	V\$GTF2I GTF3R4.01	gctGATTgagg	-	0,86	1
		LEFF – LEF1/TCF	V\$LEF1.04	atggcTCAAtcagcgc	+	0,88	1
		LHXF	V\$LHX6.02	acgccgcgTGATtgaggccatc	-	0,96	1
		HMX	V\$HMX1.02 – 1	ggatggcctcaatcagcgcgg	+	0,82	1
		GEN	V\$GEN.INI.B	cctcaatc	+	0,99	1
		AP	V\$AP1.Q6.02	gagttagt	-	0,94	1
	Alēle G	C/EBPdelta	V\$C/EBPdelta	ggcctcaat	+	-	1
		AP-1	V\$AP-1	ctcaatcag	+	-	1
		LTSM	V\$LTSM.02	tgatcgaggcCATCc	-	0,99	1
		HOMEZ	V\$HOMEZ.01	atggcctcgatcagcgc	+	0,92	1
		P53	V\$P53.04	ggctctggatggcctcgate	+	0,91	1
		P53	V\$P53.04	ccaggacctaccggagctag	-	0,87	1
rs1544410	Alēle T	HES	V\$HES1.01	tgggaatGTGCaggc	+	0,89	1
		OCT	V\$OCT2.02	ggccTGCAttcc	-	0,87	1
		PLU	V\$PLU1 JARID1B.01	GCAAttcc	-	0,95	1
		PAX	V\$PAX Q6	ccttacagtc	-	0,82	1
	Alēle C	TCFAP2C	V\$TCFAP2C.02	caggCCTGcgcattc	-	0,87	1

Saīsinājumi: MSS - TF matricas līdzības rādītājs (*matrix similarity score*); CSS - TF kodola sekvenses līdzības rādītājs (*core similarity score*). Sekvencē ar kapiteļiem izceltas kodola sekvenses un ar sarkanu - pētīto SNP alēles.

5. pielikums

Populāciju un etnisko grupu apzīmējumu skaidrojumi

Virspopulācijas kods	Populācijas kods	Populācijas apraksts
EAS (Austrumāzijas)	CHB	Han ķīnieši Pekinā, Ķīnā
	JPT	Japāņi Tokijā, Japānā
	CHS	Dienvidu hanu ķīnieši
	CDX	Chinese Dai Xishuangbanna iedzīvotāji Ķīnā
	KHV	Kinh Ho Chi Minh iedzīvotāji, Vjetnamā
	CHN	Ķīnas iedzīvotāji
	TWN	Taivānas iedzīvotāji
	MNG	Mongolijas iedzīvotāji
EUR (Eiropas)	CEU	Jūtas iedzīvotāji (CEPH) ar Ziemeļeiropas un Rietumeiropas senčiem
	TSI	Toskānieši Itālijā
	FIN	Somi Somijā
	GBR	Briti Anglijā un Skotijā
	IBS	Ibērijas iedzīvotāji Spānijā
	CYP	Kipras iedzīvotāji
	GRE	Grieķijas iedzīvotāji
	TUR	Turcijas iedzīvotāji
	IRL	Īrijas iedzīvotāji
AFR (Afrikāņu)	YRI	Jorubieši Ibadanā, Nigērijā
	LWK	Luhjas iedzīvotāji Vebuže, Kenijā
	GWD	Gambieši Gambijas rietumu divīzijā
	MSL	Mīdieši Sjerraleonē
	ESN	Esanieši Nigērijā
	ASW	Āfrikas senču amerikāņi dienvidrietumu ASV
	ACB	Āfrikas Karībieši Barbadosā
	TUN	Tunisijas iedzīvotāji
	AMR (Jaukto amerikāņu)	MXL
PUR		Puertorikieši no Puertoriko
CLM		Kolumbieši no Medeljinas, Kolumbijas
PEL		Peruāņi no Limas, Peru
USA		Amerikas Savienoto Valstu iedzīvotāji
CHL		Čīles iedzīvotāji
SAS (Dienvidāzijas)		GIH
	PJL	Pendžabi no Lahoras, Pakistānā
	BEB	Bengāļi no Bangladešas
	STU	Šrilankas tamils no Lielbritānijas
	ITU	Indijas telugu no Lielbritānijas
	IRN	Irānas iedzīvotāji

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs “D vitamīna receptora gēna polimorfismu saistība ar bronhiālo astmu Latvijas populācijā” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektriskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Samanta Pļaviņa

27.05.2021.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. biol. Natalia Paramonova

27.05.2021.

Recenzents:

Dr. med. Ilva Trapiņa

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 27.05.2021.

Lietvede:

Darbs aizstāvēts (bakalaura) gala pārbaudījuma sēdē

Prot. Nr. _____, vērtējums

Komisijas sekretārs/e: