

Marzena Zalewska-Ziob¹, Brygida Adamek¹, Jolanta Kasperczyk², Dorota Łyko³,
Anna Płachetka¹, Marek Rokicki², Agnieszka Machorowska-Pieniążek², Stefan Baron²,
Iwona Niedzielska³, Andrzej Wiczowski¹

Received: 14.04.2014

Accepted: 22.05.2014

Published: 31.10.2014

Uwarunkowania genetyczne rozszczepu wargi górnej i/lub podniebienia – czy polimorfizm genu *MMP2* ma znaczenie w rozwoju tej wady?

Cleft lip and/or palate genetic conditioning – is *MMP2* gene polymorphism important for this defect development?

¹ Katedra i Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Polska.

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Andrzej Wiczowski

² Katedra Dysfunkcji Narządu Żucia i Ortodoncji Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Polska.

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Stefan Baron

³ Katedra Chirurgii Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowej i Chirurgii Stomatologicznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Polska.

Kierownik: dr hab. n. med. Iwona Niedzielska

Adres do korespondencji: Dr n. med. Marzena Zalewska-Ziob, Katedra i Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach,

Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze, Polska

¹ Department of General, Medical Biology at the Medical University of Silesia, School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, Poland. Head: Professor Andrzej Wiczowski, MD, PhD

² Department of Temporomandibular Joint Dysfunction and Orthodontics, Medical University of Silesia, School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, Poland. Head: Professor Stefan Baron, MD, PhD

³ Department of Craniomaxillofacial and Oral Surgery at the Medical University of Silesia, School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, Poland. Head: Iwona Niedzielska, MD, PhD

Correspondence: Marzena Zalewska-Ziob, MD, PhD, Department of General, Medical Biology at the Medical University of Silesia, School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, Jordana 19, 41-808 Zabrze, Poland

Streszczenie

Wstęp: Rozszczep wargi górnej i/lub podniebienia jest jedną z najczęściej występujących wad rozwojowych. W Polsce każdego roku przychodzi na świat około 500 dzieci z rozszczepem w okolicy twarzoczaszki. W proces tworzenia struktur twarzoczaszki zaangażowane są metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, odpowiedzialne za przebudowę i degradację podłoża łącznotkankowego. Polimorfizm w regionie promotorowym genu kodującego *MMP2* może mieć wpływ na efektywność transkrypcji, a tym samym na aktywność produktu białkowego tego genu. Celem niniejszej pracy była ocena polimorfizmu 1306 C/T promotora genu *MMP2* w grupie dzieci z rozszczepem wargi i/lub podniebienia oraz w grupie kontrolnej, a także ocena częstości występowania poszczególnych genotypów w różnych typach rozszczepów. **Material i metoda:** Badanie przeprowadzono w grupie 150 dzieci z rozpoznany rozszczepem wargi i/lub podniebienia oraz w grupie 102 dzieci bez wady rozszczepowej twarzoczaszki. Genomowe DNA uzyskano z komórek nabłonkowych błony śluzowej jamy ustnej. Polimorfizm promotora genu *MMP2* oznaczono metodą tetra-primer ARMS-PCR. **Wyniki:** Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania poszczególnych alleli w różnych typach rozszczepów. Częstość występowania genotypu CC w grupie dzieci z rozszczepem wargi i podniebienia była znacząco wyższa w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0,005$). **Wniosek:** Określenie polimorfizmu sekwencji promotorowych genów kodujących metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej może przyczynić się do wyjaśnienia etiopatogenezy rozszczepu wargi i/lub podniebienia.

Słowa kluczowe: rozszczep wargi i/lub podniebienia, metaloproteina macierzy zewnątrzkomórkowej 2, polimorfizm promotora genu *MMP2*

Abstract

Introduction: Cleft lip/palate is one of the most common congenital malformations. In Poland, approximately 500 children with an orofacial cleft are born every year. Matrix metalloproteinases are involved in periodontal tissue remodelling and degradation. Polymorphisms in the promoter region of the *MMP2* gene may affect transcription and activity of the protein produced by this gene. The aim of the study was to examine 1306 C/T *MMP2* gene promoter polymorphisms in the group of children with cleft lip/palate and in the control group as well as to determine the frequency of individual genotypes in different types of orofacial clefts. **Material and methods:** The study was conducted in the group of 150 children with cleft lip/palate and 102 children without an orofacial cleft. Genomic DNA was obtained from oral mucosa epithelium. The *MMP2* gene promoter polymorphism was genotyped by tetra-primer ARMS-PCR. **Results:** There are no significant

differences in the frequency of individual alleles in different types of orofacial clefts. The occurrence of the CC genotype was significantly higher in the group with cleft lip and palate than in the healthy group ($p = 0.005$). **Conclusion:** Determining the polymorphism of matrix metalloproteinase gene promoter sequence can contribute to the elucidation of cleft lip/palate aetiopathogenesis.

Key words: cleft lip and/or palate, matrix metalloproteinase 2, *MMP2* gene promoter polymorphism

WSTĘP

Rozszczep wargi górnej i/lub podniebienia jest malformacją polegającą na nieprawidłowym rozwoju struktur wchodzących w skład twarzoczaszki. Rozszczepem nazywamy szczelinę, która występuje w miejscu niezrośnięcia się części tworzących wargę i/lub podniebienie. Występowanie rozszczepu podniebienia polega na niepełnym oddzieleniu jamy nosowej od jamy ustno-gardłowej⁽¹⁾. Rozszczep wargi i/lub podniebienia stwierdzany jest w różnych populacjach z częstością od 1:500 do 1:1000 i należy do najczęściej występujących wad rozwojowych twarzoczaszki^(2,3). W Polsce wskaźnik ten wynosi od 1,07 do 1,7 na 1000 żywych urodzeń, co oznacza, że co roku rodzi się około 500 dzieci z tą malformacją⁽⁴⁾. Rozszczep wargi obserwowany jest częściej u chłopców, natomiast izolowany rozszczep podniebienia zazwyczaj występuje u dziewcząt⁽⁵⁾. Nieprawidłowe ukształtowanie wargi górnej i/lub podniebienia wymaga kompleksowego postępowania, a w skład zespołu leczącego powinni wchodzić pediatra, chirurg szczękowy, pedodonta, ortodonta, stomatolog ogólny, protetyk, logopeda, laryngolog, foniatra, nierzadko ze wsparciem psychologa⁽⁶⁻⁸⁾.

Rozszczepy w obrębie twarzy są efektem zaburzeń w przebiegu procesów prowadzących do uformowania się podniebienia pierwotnego (odcinek leżący do przodu od otworu siecznego, czyli wargę, wyrostek zębodołowy i kość przysieczna), a następnie wtórnego (obszar leżący ku tyłowi od otworu siecznego, obejmujący podniebienie twarde i miękkie) w okresie od 3. do 12. tygodnia życia płodowego^(7,9). Rozszczep wargi definiowany jest jako wada wrodzona obejmująca podniebienie pierwotne, natomiast rozszczep podniebienia stanowi wadę rozwojową podniebienia wtórnego. Rozszczepowi wargi może towarzyszyć rozszczep podniebienia i wyrostka zębodołowego, niemniej taka wada jest epidemiologicznie i etiologicznie różna od izolowanego rozszczepu podniebienia^(1,10). Wada obejmująca rozszczep podniebienia i/lub wargi bez innych malformacji określana jest jako rozszczep izolowany – przypadki te stanowią 50–70% wad rozszczepowych. W pozostałych sytuacjach rozszczepy występują w zespołach wad wrodzonych, na które składa się około 300 jednostek chorobowych^(9,10).

Już od lat 40. ubiegłego wieku postuluje się współdziałanie czynników środowiskowych i uwarunkowań genetycznych w powstawaniu rozszczepów^(2,3,7,11). Koncepcję znaczenia predyspozycji genetycznych wspiera obserwacja, że u bliźniąt monozygotycznych (jednojąjowych) rozszczep wargi i/lub podniebienia występuje z 36-procentową zgodnością, podczas gdy u bliźniąt dizygotycznych obserwowana jest

INTRODUCTION

Cleft lip and/or palate is a malformation that results in anomalous development of the facial skeleton. A cleft is a fissure or a gap in the place where the parts creating the lip and/or palate failed to fuse. Cleft palate consists in an incomplete division of the nasal cavity from the oropharyngeal cavity⁽¹⁾. Cleft lip and/or palate is diagnosed in various populations with the frequency ranging from 1:500 to 1:1000 and is one of the most common craniofacial malformations^(2,3). In Poland, the incidence ranges from 1.07 to 1.7 in 1000 live births, which means that each year, 500 children are born with this malformation⁽⁴⁾. Cleft lip is more frequently observed in boys, but isolated cleft palate occurs usually in girls⁽⁵⁾. Anomalous development of the upper lip and/or palate requires comprehensive management, and the medical team should consist of a paediatrician, oral surgeon, paedodontist, orthodontist, general dentist, prosthetist, speech therapist, laryngologist, phoniatrist and sometimes even a psychologist⁽⁶⁻⁸⁾.

Facial clefts result from disorders in the course of the processes that shape the primary palate (the fragment anterior to the incisive foramen, i.e. lip, alveolar process and incisive bone) and, subsequently, the secondary palate (the area posterior to the incisive foramen encompassing the hard and soft palate) in the period from the 3rd to 12th week of gestation^(7,9). Lip cleft is defined as a congenital anomaly encompassing the primary palate, and a congenital defect involving the secondary palate is referred to as cleft palate. Cleft lip may be accompanied by cleft palate and alveolar process. Nevertheless, such a defect is different from isolated cleft palate in both epidemiological and aetiological aspects^(1,10). The defect involving cleft palate and/or lip without other malformations is referred to as an isolated cleft – such cases constitute 50–70% of all cleft deformities. In the remaining cases, clefts are part of congenital defect syndromes which comprise approximately 300 entities^(9,10). Since the 1940s, it has been postulated that environmental and genetic factors play a role in cleft development^(2,3,7,11). The theory of genetic predispositions is supported with an observation that in monozygotic (identical) twins, cleft lip and/or palate occurs with the agreement level of 36% whereas in the dizygotic twins the agreement reaches 4.7%. However, the risk that a child will be born with a cleft when his/her siblings have been born with one, is estimated at 3–4%, and if the defect occurs in two children, the probability of another one developing it rises to 9%⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Observations of facial skeleton development on animal models indicate that there is an active shift of the groups

zgodność na poziomie 4,7%. Z kolei w sytuacji, gdy u jednego dziecka występuje taka wada, ryzyko urodzenia się kolejnego dziecka z rozszczepem szacowane jest na 3–4%, a w przypadku wystąpienia wady u dwójki dzieci w rodzinie ryzyko rozwoju rozszczepu u kolejnego rośnie do 9%^(12–14). Obserwacje przebiegu rozwoju struktur twarzoczaszki na modelach zwierzęcych wskazują, że następuje aktywne przemieszczanie się grup komórek tworzących wyrostki szczękowe, a w następnej kolejności wyrostki podniebienne. Te grupy komórek muszą połączyć się w linii środkowej i zlać, tworząc ciągłą strukturę, co musi być precyzyjnie skoordynowane w czasie. Proces łączenia się tych fragmentów tkanek zarodkowych realizowany jest w ciągu minut lub godzin, a każde opóźnienie skutkuje brakiem prawidłowego wytworzenia podniebienia^(14–16). Prolifercja i migracja komórek wiąże się ściśle z przebudową i modelowaniem podłoża łącznotkankowego, tzw. macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix*, ECM). W toku identyfikacji genów aktywnych w procesie tworzenia struktur twarzoczaszki zainteresowanie kierowane jest również na geny kodujące składowe ECM, zarówno w grupie czynników wzrostowych, ich receptorów, czynników transkrypcyjnych, jak i białek strukturalnych czy modyfikujących ich aktywność enzymów – metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (*matrix metalloproteinases*, MMPs) – oraz ich tkankowych inhibitorów^(2,7,17,18). W grupie MMPs aktywnie modulujących ECM w rozwoju zarodkowym podkreślany jest udział żelatynazy A (MMP-2), stromelizyny (MMP-3), żelatynazy B (MMP-9), kolagenazy 3 (MMP-13), jak również związanej z błonami komórkowymi MMP-14^(15,19). Udział cząsteczek białkowych w regulacji procesów życiowych opiera się głównie na interakcjach przestrzennych, a te są pochodną składu aminokwasowego, zależnego od realizacji zapisu kodu genetycznego⁽²⁰⁾. Zmienność międzysobnicza na poziomie genetycznym manifestuje się zmianami pojedynczych nukleotydów w strukturze danego genu, co określane jest jako polimorfizm. Zjawisko to może skutkować niewielką zmianą składu aminokwasów w białku docelowym, powodując czasem istotną zmianę jego aktywności^(20,21). W niniejszej pracy wykonano analizę polimorfizmu 1306 C/T promotora genu *MMP2* w grupie dzieci z rozpoznaniem rozszczepem wargi i/lub podniebienia oraz porównano częstość występowania stwierdzonych wariantów polimorficznych z obecnymi w grupie dzieci bez wady rozszczepowej.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono w Zakładzie Ortodontji Katedry i Kliniki Stomatologii Wieku Rozwojowego Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach w grupie 150 dzieci z rozszczepem wargi i/lub podniebienia (grupa badana) oraz 102 dzieci bez rozpoznanych wad rozwojowych twarzoczaszki (grupa kontrolna). Rozpoznanie wady rozszczepowej definiowano zgodnie z Międzynarodową

of cells forming the maxillary process and, subsequently, the palatal process. These groups of cells must join in the median line and fuse to create a continuous structure. The timing must be precisely coordinated. The fusing process of tissues is completed within minutes or hours and any delay results in the lack of normally formed palate^(14–16). Cell proliferation and migration are closely associated with the remodelling and modelling of the connective tissue base, so-called extracellular matrix (ECM). In identifying genes that are active in forming the structures of the facial skeleton, the interest is also directed to the genes that code ECM components in the group of growth factors, their receptors, transcription factors as well as structural proteins or enzymes that modify their activity – matrix metalloproteinases (MMPs), and their tissue inhibitors^(2,7,17,18). The group of MMPs that actively modulate ECM in embryonic development includes: gelatinase A (MMP-2), stromelysin (MMP-3), gelatinase B (MMP-9), collagenase-3 (MMP-13) as well as MMP-14 associated with cellular membranes^(15,19). The participation of protein molecules in the regulation of life processes is primarily based on spatial interactions, which are associated with the amino acids composition that depends on the realisation of the genetic code⁽²⁰⁾. The inter-individual variability on the genetic level is manifested with changes in single nucleotides in the structure of a given gene, which is referred to as polymorphism. This phenomenon may result in a slight change in the amino acids composition in the target protein and sometimes cause a significant change in its activity^(20,21).

This study analysed 1306 C/T *MMP2* gene promoter polymorphism in the group of children with cleft lip/palate and compared the frequency in which individual polymorphic variants occurred in this group with the frequency observed in the group of children without a cleft deformation.

MATERIAL AND METHODS

The study was conducted in the Orthodontics Unit of the Department of Developmental Age Stomatology at the School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze of the Medical University of Silesia in Katowice, Poland. The study enrolled 150 children with cleft lip and/or palate (examined group) and 102 children without any congenital defect of the facial skeleton (control group). Cleft defects were defined in accordance with the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th revision (ICD-10). The examined group included: Q35 – cleft palate, Q36 – cleft lip and Q37 – cleft palate and lip. During the appointment conducted according to the clinical needs of patients, their age, sex and diagnosis of a cleft (in the examined group) were noted. Subsequently, the aim of the study and the procedures planned were explained. When the consent of the legal guardian and patient (in the case of patients aged 13 and more) was obtained, buccal smear was conducted in each patient with the use of sterile cotton swabs manufactured by GEMINI,

Statystyczną Klasyfikacją Chorób i Problemów Zdrowotnych, rewizja 10. (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD-10*). W grupie badanej rozpoznano: Q35 – rozszczep podniebienia, Q36 – rozszczep wargi, Q37 – rozszczep podniebienia wraz z rozszczepem wargi. W toku wizyty, realizowanej zgodnie z potrzebami klinicznymi pacjentów, odnotowywano wiek i płeć pacjenta, rozpoznanie wady rozszczepowej (w grupie badanej), a następnie wyjaśniano cel badania i planowane procedury. Po uzyskaniu zgody prawnego opiekuna oraz pacjenta w przypadku dzieci powyżej 13. roku życia u wszystkich badanych pobierano wymaz z wewnętrznej strony policzka za pomocą bawełnianego końca sterylnych pałeczek wymazowych firmy GEMINI, które uprzednio zwilżano trzema kroplami sterylnego roztworu fizjologicznego NaCl. Pobrany materiał, zawierający komórki nabłonka błony śluzowej jamy ustnej, suszono przez 3–4 godziny na sterylnych jednorazowych tackach, po czym umieszczano go w sterylnej polipropylenowej probówce dołączonej do wymazówki i zamrażano w temperaturze -80°C do czasu izolacji DNA. Projekt badań uzyskał pozytywną opinię Terenowej Komisji Bioetycznej działającej przy Śląskim Uniwersytecie Medycznym w Katowicach (KNW-6501-9/08).

Genomowy DNA uzyskiwano z komórek nabłonkowych przy użyciu zestawu Swab-Extract (EURx, Polska). Zestaw ten zawiera minikolumny do izolacji oraz oczyszczania DNA i wykorzystuje zdolność ziół krzemionkowych do wiązania kwasów nukleinowych w obecności wysokich stężeń soli chaotropowych (izotiocyanianu guanidyny). Podczas procedury izolacji DNA postępowano zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu. W kolejnym etapie oznaczano polimorfizm promotora genu *MMP2* metodą tetra-primer ARMS-PCR, w której stosuje się dwie pary starterów do jednoczesnej amplifikacji dwóch różnych alleli badanego genu. Używając po 2 μl każdego ze starterów⁽²²⁾:

- *outer forward*: 5'-ACC AGA CAA GCC TGA ACT TGT CTG A-3';
- *outer reverse*: 5'-TGT GAC AAC CGT CTC TGA GGA ATG-3';
- *inner forward*: 5'-ATA TTC CCC ACC CAG CAC GCT-3';
- *inner reverse*: 5'-GCT GAG ACC TGA AGA GCT AAA GAG TTG-3'

o stężeniu 10 pmol/ μl (zsyntetyzowanych w firmie Genomed, Warszawa), namnożono wybrany fragment DNA w aparacie Mastercycler Personal (Eppendorf, Niemcy). Mieszanina reakcyjna o objętości 25 μl oprócz starterów zawierała 9 μl sterylnej, dejonizowanej wody dla celów biologii molekularnej (Eppendorf, Niemcy), 2 μl mieszaniny deoksyrybonukleotydów dATP, dCTP, dGTP, dTTP o stężeniu 2,5 mmol (Epicentre Technologies), 0,5 μl termostabilnej polimerazy Taq (DyNAzymeTM II DNA Polymerase) o stężeniu 2 U/ μl (Finnzymes), 2,5 μl 10 \times stężonego buforu reakcyjnego dla polimerazy DyNAzymeTM o składzie 10 mM Tris-HCl (pH = 8,8 w 25°C), 1,5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl oraz 0,1% Triton X-100 (FINNZYMES), 3 μl roztworu DNA (czyli 100 ng DNA). Reakcję prowadzono zgodnie

which were moistened with three drops of a sterile saline solution (NaCl) prior to the swab. The material collected, which contained epithelial cells of the mucosa of the oral cavity, was dried for 3–4 hours in sterile single-use trays. Subsequently, it was placed in a sterile polypropylene test tubes delivered with the cotton swab and frozen in the temperature of -80°C until DNA could be extracted. The study protocol was approved of by the Local Ethics Committee acting at the Medical University of Silesia in Katowice, Poland (KNW-6501-9/08).

Genomic DNA was obtained from the epithelial cells with the use of a Swab-Extract kit (EURx, Poland). The kit includes mini-columns for DNA extraction and purification. It uses the capacity of silica particles to bind to nucleic acids in the presence of high concentrations of chaotropic salts (guanidine isothiocyanate). DNA extraction proceeded in accordance with the protocol attached to the kit. The subsequent stage involved determination of the *MMP2* gene promoter polymorphism by means of the tetra-primer ARMS-PCR method that uses two pairs of primers for simultaneous amplification of two different alleles of the examined gene. The selected DNA fragment was amplified in a Mastercycler Personal device (Eppendorf, Germany) using 2 μl of each primer⁽²²⁾:

- *outer forward*: 5'-ACC AGA CAA GCC TGA ACT TGT CTG A-3';
- *outer reverse*: 5'-TGT GAC AAC CGT CTC TGA GGA ATG-3';
- *inner forward*: 5'-ATA TTC CCC ACC CAG CAC GCT-3';
- *inner reverse*: 5'-GCT GAG ACC TGA AGA GCT AAA GAG TTG-3'

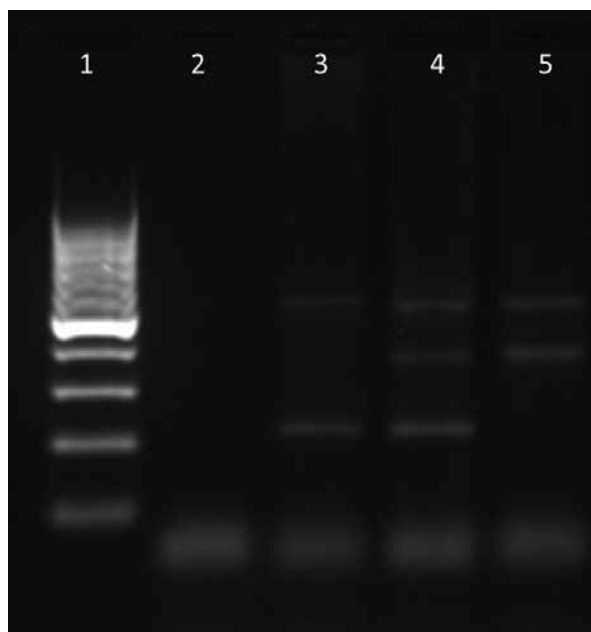
with the concentration of 10 pmol/ μl (synthesised in Genomed, Warsaw, Poland). The reaction mix with the volume of 25 μl contained, apart from the primers, 9 μl of sterile, deionised water for molecular biology (Eppendorf, Germany), 2 μl of dATP, dCTP, dGTP, dTTP deoxyribonucleotide mixture with the concentration of 2.5 mmol (Epicentre Technologies), 0.5 μl of thermostable Taq polymerase (DyNAzymeTM II DNA Polymerase) with the concentration of 2 U/ μl (Finnzymes), 2.5 μl of 10 \times concentrated DyNAzymeTM buffer consisting of 10 mM Tris-HCl (pH = 8.8 at 25°C), 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl and 0.1% Triton X-100 (FINNZYMES) and 3 μl of DNA solution (i.e. 100 ng of DNA). The reaction was conducted in accordance with the temperature profile: initial denaturation for 5 minutes in 95°C ; 35 cycles: 45 seconds in 95°C , 45 seconds in 58°C , 45 seconds in 72°C ; final extension for 5 minutes in 72°C .

The amplification products of the polymorphic *MMP2* gene fragments and the negative control were separated in a 2% agarose gel dyed with ethidium bromide. Electrophoresis was conducted for 90 minutes at 100 mV in a Sigma Maxi Horizontal Gel Electrophoresis device, model SHU 20 (Sigma-Aldrich, Germany). Following the separation, the image of the band was obtained by placing the gel on the UV transilluminator (BTX-20M, CBS Scientific, USA). The size of the PCR was assessed according to DNA GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder

z profilem temperaturowym: wstępna denaturacja przez 5 minut w temperaturze 95°C; 35 cykli: 45 sekund w temperaturze 95°C, 45 sekund w temperaturze 58°C, 45 sekund w temperaturze 72°C; końcowe wydłużanie przez 5 minut w temperaturze 72°C.

Produkty amplifikacji polimorficznych fragmentów genu *MMP2* wraz z kontrolą negatywną rozdzielano w 2-procentowym żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny. Elektroforezę prowadzono przez 90 minut pod napięciem 100 mV w aparacie Sigma Maxi Horizontal Gel Electrophoresis, model SHU 20 (Sigma-Aldrich, Niemcy). Po zakończonym rozdziale obraz prążków uzyskiwano, umieszczając żel na transiluminatorze UV (BTX-20M, CBS Scientific, USA). Wielkość produktów PCR oceniano według wzorca wielkości DNA GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Litwa). Na podstawie uzyskanych produktów amplifikacji zidentyfikowano trzy możliwe układy alleli: CC (542 pz i 379 pz), CT (542 pz, 379 pz i 211 pz) oraz TT (542 pz i 211 pz), co przedstawiono na ryc. 1.

Uzyskane dane po wprowadzeniu do bazy analizowano za pomocą pakietu STATISTICA 10. Wstępnie wyliczono statystykę opisową (dla zmiennych ilościowych średnie i odchylenia standardowe, dla zmiennych jakościowych frakcje procentowe w badanych grupach). Istotność różnic



Ryc. 1. Rozdział produktów amplifikacji polimorficznych fragmentów genu *MMP2* w 2-procentowym żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny. Ścieżka 1 – wzorzec wielkości 100 pz, ścieżka 2 – kontrola negatywna PCR, ścieżka 3 – homozygota TT, ścieżka 4 – heterozygota CT, ścieżka 5 – homozygota CC

Fig. 1. Separation of the amplicons of *MMP2* gene polymorphic fragments in 2% agarose gel dyed with ethidium bromide. Lane 1 – 100 bp ladder, lane 2 – negative PCR control, lane 3 – TT homozygote, lane 4 – CT heterozygote, lane 5 – CC homozygote

(Fermentas, Lithuania). Based on the amplification products obtained, three possible allele arrangements were identified: CC (542 bp and 379 bp), CT (542 bp, 379 bp and 211 bp) and TT (542 bp and 211 bp), which is presented in fig. 1.

The data obtained were entered into the database and analysed with the use of the STATISTICA 10 system. Initially, descriptive statistics were calculated (mean and standard deviation values for quantitative variables and percentage for qualitative variables). The significance of differences between the groups analysed was tested with the use of maximum likelihood χ^2 test. The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The group of children with cleft defects consisted of 76 boys aged 11.0 ± 4.6 and 74 girls aged 11.1 ± 4.3 . The control group consisted of 46 boys aged 8.4 ± 3.6 and 56 girls aged 9.4 ± 4.2 . Age difference between boys and girls in the examined and control groups were not significant. Since the subject of this analysis is the *MMP2* gene promoter polymorphism, which is a constant feature of the genome created at the time when the genetic material of reproductive cells is connected, possible age differences between the examined and control groups do not affect this parameter. The most common defect was cleft lip and palate – Q37 (66.7%), followed by cleft palate – Q35 (21.3%). The most rarely diagnosed defect was cleft lip – Q36 (12.0%). In the examined group, none of the defects occurred significantly more frequently in either boys or girls (tab. 1). Moreover, no significant differences were observed in the incidence of individual defects in the group of girls and boys compared to all subjects (fig. 2).

Gelatinase A is one of the most common ECM enzymes that undergoes a constitutive expression in the majority of connective tissue cells^(23,24). Xu *et al.* demonstrated *MMP2* expression in human cytotrophoblast cells from the 6th to 11th weeks of fetal development with gradual decrease in its activity over time⁽²⁵⁾. The palate forming process that takes place at this stage of fetal development, the essential element of which is ECM structure remodelling, among others requires the activity of metalloproteinases, including *MMP-2*^(15,17). The studies of Blavier *et al.* revealed that proteolytic activity of MMPs, accurately regulated by growth factors and tissue inhibitors of metalloproteinases, is a crucial condition for normal fusion of the secondary palate⁽¹⁹⁾. Changes in the sequence of nucleotides that make up a gene may cause significant alteration in its expression, and subsequently in the function of the entire protein product^(21,24). Over 90% of polymorphisms within DNA are so-called single nucleotide polymorphisms (SNPs), which consist in replacing one base in the DNA strand into another^(20,21). The possibility of binding proteins that give a signal to commence the transcription process (“reading information”) and determine the course of this process depend on the structure of the gene promoter⁽²⁰⁾. The *MMP-2* gene was localised on

		Chłopcy Boys	Dziewczeta Girls	Chłopcy vs dziewczęta Boys vs. girls <i>p</i>	Ogółem Total	
Rozpoznanie Diagnosis	Q35	12 (15,8%)	20 (27,0%)	NS	32 (21,3%)	
	Q36	11 (14,5%)	7 (9,5%)		18 (12,0%)	
	Q37	53 (69,7%)	47 (63,5%)		100 (66,7%)	
	Grupa kontrolna Control group	46 (45,1%)	56 (54,9%)		102 (100%)	
Polimorfizm 1306 C/T promotora <i>MMP2</i> 1306 C/T <i>MMP2</i> gene promoter polymorphism	Grupa badana Examined group	CT	30 (39,5%)	NS	58 (38,7%)	
		CC	42 (55,3%)		42 (56,8%)	84 (56,0%)
		TT	4 (5,2%)		4 (5,4%)	8 (5,3%)
	Grupa kontrolna Control group	CT	29 (63,0%)	NS	57 (55,9%)	
		CC	15 (32,6%)		26 (46,4%)	41 (40,2%)
		TT	2 (4,4%)		2 (3,6%)	4 (3,9%)

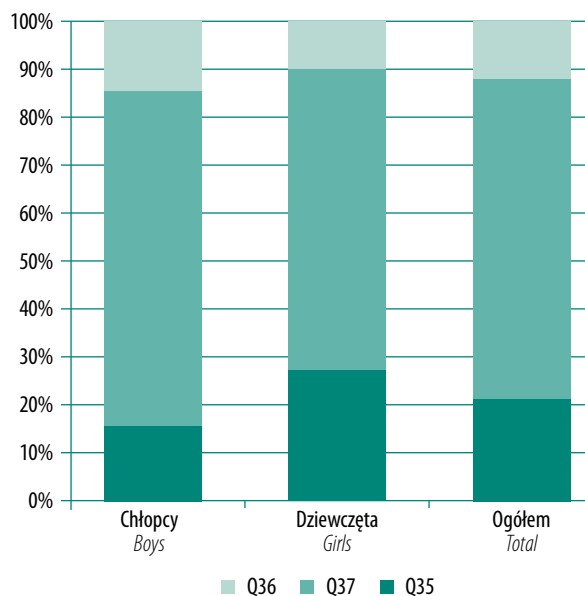
Tab. 1. Rozpoznane wady rozszczepowe oraz częstość występowania odmian polimorficznych promotora *MMP2* w grupie badanej i kontrolnej
 Tab. 1. Diagnosis of a cleft defect and frequency of occurrence of the *MMP2* gene promoter polymorphisms in the examined group and controls

pomiędzy analizowanymi grupami testowano, wykorzystując test χ^2 NW. W analizach za poziom istotny przyjęto wartość $p < 0,05$.

WYNIKI

Grupę dzieci z rozpoznanymi wadami rozszczepowymi stanowiło 76 chłopców w wieku $11,0 \pm 4,6$ roku oraz 74 dziewczęta w wieku $11,1 \pm 4,3$ roku. Grupę kontrolną tworzyło 46 chłopców w wieku $8,4 \pm 3,6$ roku i 56 dziewcząt w wieku $9,4 \pm 4,2$ roku; różnice wieku pomiędzy przedstawicielami obu płci w grupach badanej i kontrolnej nie były istotne. Wobec faktu, że przedmiotem docelowej analizy jest polimorfizm promotora genu *MMP2*, który to zapis jest stałą cechą genomu powstającego w chwili połączenia się materiału genetycznego komórek rozrodczych, ewentualne różnice wieku pomiędzy grupą badaną i kontrolną nie mają wpływu na analizowany parametr. Najczęściej rozpoznawaną wadą okazał się rozszczep podniebienia wraz z rozszczepem wargi – Q37 (66,7%), drugi co do częstości był rozszczep podniebienia – Q35 (21,3%), zaś najrzadziej występował rozszczep wargi – Q36 (12,0%). W grupie badanej żadna z rozpoznanych wad nie występowała istotnie częściej u którejś z płci (tab. 1), nie stwierdzono również istotnych różnic częstości występowania poszczególnych wad rozszczepowych w grupie chłopców i dziewcząt w porównaniu ze wszystkimi badanymi (ryc. 2). Żelatynaza A jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych enzymów ECM, podlegającym konstytutywnej ekspresji w większości komórek tkanki łącznej^(23,24). Xu i wsp. wykazali ekspresję *MMP2* w ludzkich komórkach cytotrofoblastu w okresie od 6. do 11. tygodnia rozwoju zarodkowego, odnotowując stopniowe obniżenie jej aktywności w miarę upływu czasu⁽²⁵⁾. Zachodzący na tym etapie rozwoju zarodkowego proces formowania się podniebienia, czego koniecznym elementem jest remodeling struktur ECM, wymaga m.in. aktywności metaloproteinaz, w tym *MMP-2*^(15,17). Badania Blavier i zespołu pokazały, że aktywność proteolityczna *MMPs*, precyzyjnie regulowana przez czynniki wzrostowe i tkankowe inhibitory metaloproteinaz, jest

the chromosome 16 (16q13), but several polymorphic loci were identified within its promoter. Three polymorphic variants of the *MMP2* promoter occurred to be associated with gene activity. The most common variant is C→T transition (change of cytosine into thymine) at 1306 (rs243865), which causes considerably smaller activity of the promoter if TT genotype occurs. The CC genotype, in turn, is associated with a high transcription level and enzymatic activation of *MMP-2*; the CT variant determines indirect promoter activity⁽²⁴⁾.



Q35 – rozszczep podniebienia, Q36 – rozszczep wargi,
 Q37 – rozszczep podniebienia wraz z rozszczepem wargi.
 Q35 – cleft palate, Q36 – cleft lip, Q37 – cleft palate and lip.

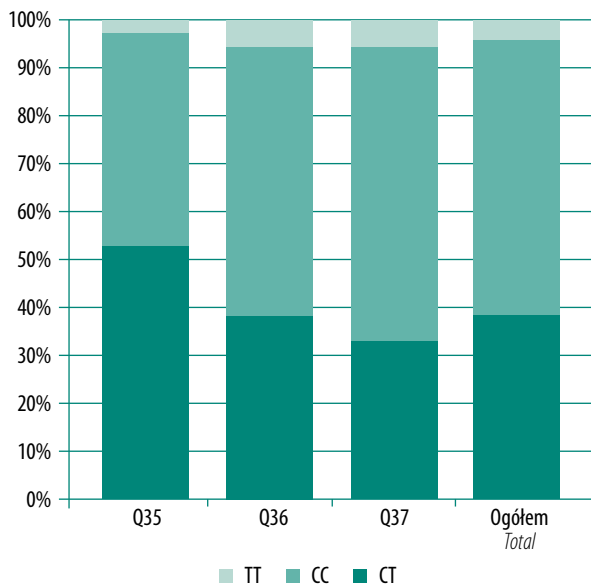
Ryc. 2. Częstość występowania poszczególnych wad rozszczepowych u chłopców i dziewcząt w grupie badanej vs ogół badanych (brak znamienych różnic)

Fig. 2. Frequency of occurrence of individual cleft defects in boys and girls in the examined group vs. all subjects (no significant differences)

warunkiem koniecznym do prawidłowej fuzji podniebienia wtórnego⁽¹⁹⁾.

Zmiany w sekwencji nukleotydów tworzących gen mogą powodować znaczące zmiany w jego ekspresji, a następnie funkcjonowaniu produktu białkowego^(21,24). Ponad 90% polimorfizmów w obrębie DNA to tzw. polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), które polegają na zamianie (podstawieniu) jednej zasady w nici DNA na inną^(20,21). Od struktury promotora genu zależy możliwość przyłączenia się do niego białek dających sygnał do rozpoczęcia procesu transkrypcji („odczytywania informacji”) i determinujących przebieg tego procesu⁽²⁰⁾. Gen kodujący MMP-2 zlokalizowano na chromosomie 16 (16q13), natomiast w obrębie jego promotora zidentyfikowano kilka miejsc polimorficznych. Trzy warianty polimorficzne promotora *MMP2* okazały się mieć związek z aktywnością genu – spośród nich najczęstszy wariant to tranzycja C→T (zamiana cytozyny na tyminę) w pozycji 1306 (rs243865), która powoduje znacząco mniejszą aktywność promotora w przypadku wystąpienia genotypu TT, natomiast genotyp CC związany jest z wysokim poziomem transkrypcji i aktywnością enzymatyczną MMP-2; wariant CT warunkuje pośrednią aktywność promotora⁽²⁴⁾.

W analizowanych grupach: badanej i kontrolnej oznaczoną częstość występowania poszczególnych wariantów polimorficznych promotora *MMP2* zamieszczono w tab. 1. Nie stwierdzono istotnie częstszego występowania żadnego z wariantów względem płci, zarówno w grupie badanej, jak i u dzieci bez wad rozszczepowych (tab. 1), pomimo publikowanych



Q35 – rozszczep podniebienia, Q36 – rozszczep wargi, Q37 – rozszczep podniebienia wraz z rozszczepem wargi, TT, CT, CC – warianty polimorficzne. Q35 – cleft palate, Q36 – cleft lip, Q37 – cleft palate and lip; TT, CT, CC – polymorphic variants.

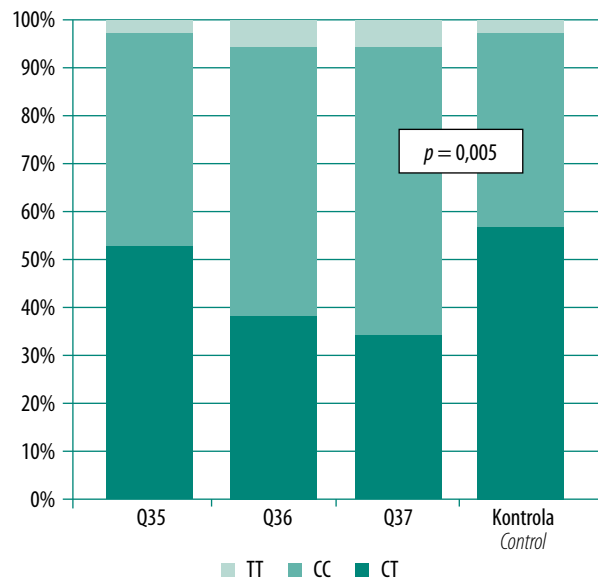
Ryc. 3. Warianty polimorficzne 1306 C/T promotora *MMP2* w zależności od rozpoznanej wady rozszczepowej
Fig. 3. 1306 C/T polymorphisms in the promoter of *MMP2* gene depending on a cleft defect

The frequency in which individual *MMP2* promoter polymorphic variants occurred in the analysed groups, both the examined one and controls, is presented in tab. 1. Sex-dependent occurrence of any of the variants was not found either in the examined group or in children without cleft defects (tab. 1) despite published information that suggest variable occurrence of these defects in boys and girls⁽⁵⁾. Nonetheless, the groups are not sufficiently large to undermine the epidemiological data based on large populations or to state that the observations are in agreement.

The analysis of the polymorphisms determined in the examined group did not reveal significantly more frequent occurrence of any of the variants depending on the cleft defect diagnosed, as is illustrated in fig. 3.

The comparison of the distribution of the frequency in which individual *MMP2* promoter polymorphisms occurred in children with cleft defects with the distribution of frequency in the control group revealed significantly different distribution of individual variants only in the group with cleft lip and palate (fig. 4).

According to earlier presumptions, the CC genotype that occurred significantly more frequently in the Q37 group is associated with the promoter activity and, subsequently with greater *MMP2* gene expression. It is postulated that despite similar genetic factors determining cleft defects, cleft palate may result from expression activation/disorders of a different set of genes than cleft palate and lip⁽²⁶⁾. The observations



Q35 – rozszczep podniebienia, Q36 – rozszczep wargi, Q37 – rozszczep podniebienia wraz z rozszczepem wargi, TT, CT, CC – warianty polimorficzne. Q35 – cleft palate, Q36 – cleft lip, Q37 – cleft palate and lip; TT, CT, CC – polymorphic variants.

Ryc. 4. Częstość występowania odmian polimorficznych promotora *MMP2* u dzieci z rozpoznanymi wadami rozszczepowymi w porównaniu z grupą kontrolną

Fig. 4. Frequency in which the *MMP2* gene promoter polymorphisms occurred in children with cleft defects as against the controls

danych sugerujących zmienną częstość tych wad w zależności od płci⁽⁵⁾. Niemniej grupa badana nie jest na tyle liczna, by obserwacje mogły być całkowicie zgodne lub podważać dane epidemiologiczne oparte na dużych populacjach.

Analiza oznaczonych polimorfizmów w grupie badanej nie wykazała istotnie częstszego występowania któregoś z wariantów w zależności od rozpoznanej wady rozszczepowej, co zilustrowano na ryc. 3.

Porównanie rozkładu częstości poszczególnych wariantów polimorficznych promotora *MMP2* u dzieci z rozpoznanymi wadami rozszczepowymi z rozkładem częstości w grupie kontrolnej wykazało istotnie różny udział poszczególnych odmian jedynie w grupie dzieci z rozszczepem podniebienia wraz z rozszczepem wargi (ryc. 4).

Istotnie częściej występujący w grupie z rozpoznaniem Q37 genotyp CC, według wcześniejszych ustaleń, powiązany jest z większą aktywnością promotora i następnie większą ekspresją genu kodującego MMP-2. Postuluje się, że pomimo podobnego podłoża genetycznego wad rozszczepowych rozszczep podniebienia może być skutkiem aktywacji/zaburzeń ekspresji innego zestawu genów niż w przypadku rozszczepu podniebienia wraz z rozszczepem wargi⁽²⁶⁾.

Poczynione w naszej grupie badanej obserwacje sugerują, że jednym z czynników różnicujących może być właśnie polimorfizm promotora *MMP2*, co oczywiście wymaga dalszej eksploracji. Metaloproteiny stanowią grupę enzymów o zróżnicowanym powinowactwie do składowych ECM, a proces ich syntezy, aktywacji i inhibicji podlega wielopoziomym regulacjom⁽²⁷⁾. Tym samym stwierdzoną istotną statystycznie zależność należy interpretować z dużą ostrożnością, która nakazuje nie wiązać bezpośrednio zjawisk: polimorfizm 1306 C/T – rozpoznanie Q37. Modyfikacja oddziaływań aktywnej MMP-2 realizowana jest poprzez interakcje z tkankowym inhibitorem metaloproteinaz 2 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-2*, TIMP2)⁽²⁸⁾. Badanie przeprowadzone w populacji dzieci brazylijskich pozwoliło na potwierdzenie istotnego ($p = 0,002$) związku wad rozszczepowych, rozpoznanych tak jak w opisywanej przez nas grupie badanej, z polimorfizmem promotora genu *TIMP2*⁽²⁹⁾.

Analiza zmian polimorficznych w obrębie promotorów genów MMPs pozostaje przedmiotem badań nakierowanych na ocenę zjawisk patofizjologicznych leżących u podłoża zaburzeń rozwojowych, jak również wielu procesów chorobowych. Znaczące wydają się wyniki badań potwierdzające związek polimorfizmu 1306 C/T promotora *MMP2* ze zwiększonym ryzykiem opóźnienia rozwoju wewnątrzmacicznego płodu; nie znaleziono takiego związku z polimorfizmami w obrębie promotora *MMP9*⁽³⁰⁾. Obserwacje Letra i wsp. wykazały związek występowania rozszczepu wargi i podniebienia z polimorfizmem promotora genu kodującego stromelizynę (*MMP3*), natomiast nie znaleziono istotnej zależności z polimorfizmem w obrębie promotora *MMP1*. Poczynione spostrzeżenia skłoniły autorów do sugestii, że polimorfizm promotorów genów kodujących MMPs, zaangażowanych w rozwój twarzoczaszki, może prowadzić do wyjaśnienia pewnych aspektów etiopatogenezy wad rozszczepowych⁽³¹⁾.

made in our subjects suggest that one of the differentiating factors may be the *MMP2* gene promoter polymorphism, which certainly requires further investigation. Metalloproteinases constitute a group of enzymes with diversified affinity to ECM components, and their synthesis, activation and inhibition is subject to multilevel regulations⁽²⁷⁾. Therefore, the statistically significant correlation demonstrated should be interpreted with great caution which dictates that the phenomena of 1306 C/T polymorphism and Q37 diagnosis should not be directly combined. The modification of active *MMP2* interactions is carried out by interaction with tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP2)⁽²⁸⁾. The study conducted in the Brazilian paediatric population enabled confirmation of a significant ($p = 0.002$) correlation of cleft defects, diagnosed as in our subjects, with polymorphism of *TIMP2* gene promoter⁽²⁹⁾.

The analysis of polymorphic changes within MMP gene promoters remains the subject of research, the aim of which is to assess pathophysiological phenomena underlying the developmental disorders and numerous disease entities. The results that confirm the correlation of 1306 C/T polymorphism of *MMP2* gene promoter with increased risk of delayed intrauterine fetal development appear significant. No such correlation was found between polymorphisms within the *MMP9* gene promoter⁽³⁰⁾. The investigation of Letra *et al.* revealed correlation between cleft lip and palate and stromelysin (*MMP-3*) gene promoter polymorphism, but no significant correlation was found concerning polymorphism within *MMP1* gene promoter. Based on these observations, the authors suggested that polymorphism of MMP gene promoters involved in the development of the facial skeleton may help elucidate certain aetiopathogenetic aspects associated with cleft defects⁽³¹⁾.

According to our best knowledge, no extensive studies on genetic factors, including polymorphisms within promoters of genes that code ECM modulating particles in fetal development and those associated with the risk of cleft defects, have been conducted in the Polish population till now. Moreover, the role of genes participating in the development of facial structures may be modified by environmental factors influencing embryonic and fetal development and therefore, plans of such studies should also include a detailed environmental interview.

CONCLUSION

The analysis of polymorphic variants of MMP gene promoters, which are active in the first trimester of gestation, in children with cleft defects is an important direction of research on genetic factors determining the occurrence of such malformations. A significant difference in the frequency in which the 1306 C/T polymorphism in the promoter of *MMP2* gene occurs in children with cleft palate and lip indicates that this factor plays a certain role in normal development of the facial skeleton. Extensive population-based studies are essential for a comprehensive assessment of complex causes of cleft defects.

Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą w populacji polskiej nie przeprowadzono do tej pory szeroko zakrojonych badań uwarunkowań genetycznych, w tym polimorfizmów w obrębie promotorów genów kodujących cząsteczki modelujące ECM w rozwoju zarodkowym i powiązane z ryzykiem rozwoju wad rozszczepowych. Co więcej, rola genów współuczestniczących w rozwoju struktur twarzoczaszki może być modyfikowana wpływem czynników środowiskowych oddziałujących w okresie rozwoju zarodkowego i płodowego, więc projekty takich badań powinny uwzględnić również szczegółowy wywiad środowiskowy.

PODSUMOWANIE

Analiza odmian polimorficznych promotorów genów kodujących MMPs aktywne w pierwszym trymestrze ciąży u dzieci z rozpoznanymi wadami rozszczepowymi stanowi istotny kierunek badań nad uwarunkowaniami genetycznymi występowania tych malformacji. Istotna różnica częstości występowania wariantów polimorficznych 1306 C/T promotora *MMP2* w grupie dzieci z rozszczepem podniebienia wraz z rozszczepem wargi wskazuje na rolę tego czynnika w prawidłowym rozwoju struktur twarzoczaszki. Dla kompleksowej oceny złożonych przyczyn wad rozszczepowych niezbędne są szeroko zakrojone badania populacyjne.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają żadnych finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji.

Piśmiennictwo/References

1. Carinci F, Scapoli L, Palmieri A *et al.*: Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; 71: 1509–1519.
2. Schutte BC, Murray JC: The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1853–1859.
3. Murray JC: Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 2002; 61: 248–256.
4. Antoszewski B, Kruk-Jeromin J: Epidemiology of cleft lip and palate in Lodz, Poland, in the years 1981–1995. *Acta Chir Plast* 1997; 39: 109–112.
5. Mossey PA, Little J, Munger RG *et al.*: Cleft lip and palate. *Lancet* 2009; 374: 1773–1785.
6. Strauss RP: The organization and delivery of craniofacial health services: the state of the art. *Cleft Palate Craniofac J* 1999; 36: 189–195.
7. Bender PL: Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs* 2000; 15: 242–249.
8. Wong FK, Hägg U: An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med J* 2004; 10: 331–336.
9. Murray JC: Face facts: genes, environment, and clefts. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 227–232.
10. Goodacre T, Swan MC: Cleft lip and palate: current management. *Paed Child Health* 2008; 18: 283–292.
11. Romitti PA, Lidral AC, Munger RG *et al.*: Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environ-

Conflict of interest

Authors do not report any financial or personal links with other persons or organizations, which might affect negatively the content of this publication and/or claim authorship rights to this publication.

- ment interventions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 1999; 59: 39–50.
12. Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S: Nonsyndromic cleft lip and palate: complex genetics and environmental effects. *Ann Hum Genet* 2001; 65: 505–515.
13. Lipińska J, Foryś S: Rodzinne występowanie rozszczepów podniebienia. *Fol Med Lodz* 2000; 27: 57–69.
14. Cox TC: Taking it to the max: the genetic and developmental mechanisms coordinating midfacial morphogenesis and dysmorphology. *Clin Genet* 2004; 65: 163–176.
15. Brown NL, Yarram SJ, Mansell JP *et al.*: Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J Dent Res* 2002; 81: 826–830.
16. Martínez-Alvarez C, Tudela C, Pérez-Miguelsanz J *et al.*: Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Dev Biol* 2000; 220: 343–357.
17. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM *et al.*: The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007; 65: 1–13.
18. Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M *et al.*: The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2011; 121: 636–646.
19. Blavier L, Lazaryev A, Groffen J *et al.*: TGF- β -induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 1457–1466.
20. Epstein R.J.: *Biologia molekularna człowieka*. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2005.
21. Ye S: Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol* 2000; 19: 623–629.
22. Kubben FJ, Sier CF, Meijer MJ *et al.*: Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *Br J Cancer* 2006; 95: 744–751.
23. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S *et al.*: Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 3–19.
24. Price SJ, Greaves DR, Watkins H: Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2001; 276: 7549–7558.
25. Xu P, Wang YL, Zhu SJ *et al.*: Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biol Reprod* 2000; 62: 988–994.
26. Bernardo MM, Fridman R: TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J* 2003; 374: 739–745.
27. Ichikawa E, Watanabe A, Nakano Y *et al.*: *PAX9* and *TGFB3* are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analyses. *J Hum Genet* 2006; 51: 38–46.
28. Ra HJ, Parks WC: Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007; 26: 587–596.
29. Letra A, Silva RM, Motta LG *et al.*: Association of *MMP3* and *TIMP2* promoter polymorphisms with nonsyndromic oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012; 94: 540–548.
30. Gremlich S, Nguyen D, Reymondin D *et al.*: Fetal *MMP2/MMP9* polymorphisms and intrauterine growth restriction risk. *J Reprod Immunol* 2007; 74: 143–151.
31. Letra A, Silva RA, Menezes R *et al.*: MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: association with *MMP3* but not *MMP1*. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 954–960.