

IWONA ORDYNIEC-KWAŚNICA

**ANALIZA MUTACJI W GENIE *DSPP* SKUTKUJĄCYCH
POWSTANIEM FENOTYPU *DENTINOGENESIS*
IMPERFECTA TYPU II I/LUB III ORAZ DYSPLAZJI ZĘBINY.
BADANIE POLSKIEJ POPULACJI**

PRACA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Z Katedry i Zakładu Protetyki Stomatologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor Prof. dr hab. n. med. Izabela Maciejewska

Badania wykonano w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego

Kierownik: dr hab. med. Zbigniew Jankowski

Praca finansowana z projektu badawczego NN 403 1300/40

Gdańsk 2014

Mojemu promotorowi, Pani Prof. dr hab. n. med. Izabeli Maciejewskiej, składam serdeczne podziękowania za przekazaną wiedzę, udzielone wskazówki, pomoc i motywację podczas realizacji pracy doktorskiej.

*Składam podziękowania Panu Dr. hab. med. Zbigniewowi Jankowskiemu,
Panu Prof. dr. hab. med. Ryszardowi Pawłowskiemu oraz Pani Dr. Agnieszce Maciejewskiej
za pomoc i umożliwienie wykonania badań
w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej GUMed.*

Pracę tę dedykuję moim Rodzicom

Spis treści

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW UŻYWANYCH W PRACY	6
1. STRESZCZENIE	9
2. SUMMARY	14
3. WSTĘP	18
3.1. Zaburzenia rozwojowe zębiny	18
3.1.1. Definicja, klasyfikacja i epidemiologia zaburzeń rozwoju zębiny	18
3.1.2. Obraz kliniczny i radiologiczny <i>dentinogenesis imperfecta</i> typu II i III oraz dysplazji zębiny typu II	21
3.1.2.1. Konsekwencje <i>dentinogenesis imperfecta</i> typu II/III i/lub dysplazji zębiny typu II dla układu stomatognatycznego	23
3.1.3. Postępowanie lecznicze u chorych z DGI typu II/III i/lub DD typu II	24
3.2. Wybrane niekolagenowe białka budujące organiczną macierz zębiny	26
3.2.1. Proteoglikany	26
3.2.1.1. Proteoglikany z rodziny SLRP (<i>Small Leucine Rich Proteoglycans</i>)	27
3.2.1.2. Rodzina białek SIBLING (<i>Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein</i>)	29
3.2.1.2.1. Białko macierzy zębiny 1 (DMP1)	31
3.2.1.2.2. Białko sialofosforowe zębiny (DSPP)	33
3.2.1.2.3. Proteolityczny podział białka DSPP	35
3.2.1.2.4. Występowanie białka DSPP	35
3.2.1.2.5. Białko sialowe zębiny (DSP)	37
3.2.1.2.6. Białko fosforowe zębiny (DPP)	38
3.2.1.2.7. Rola DSP i DPP w mineralizacji zębiny	39
3.3. Struktura genu kodującego białko DSPP	40
3.3.1. Mutacje w sekwencji genu kodującego białko DSPP	44
3.3.1.1. Mutacje sekwencji kodującej peptyd sygnałowy	45
3.3.1.2. Mutacje sekwencji kodującej białko sialowe zębiny	45
3.3.1.3. Mutacje sekwencji kodującej białko fosforowe zębiny	46
4. CEL PRACY	48
5. MATERIAŁ I METODY	49
5.1. Materiał badawczy	49
5.2. Izolacja DNA	49

5.3. Pomiar stężenia DNA	50
5.4. Amplifikacja fragmentów genu <i>DSPP</i>	51
5.5. Sekwencjonowanie produktów amplifikacji fragmentów eksonów 2, 3, 4.1, 4.2, 5.1, 5.2, 5.5, 5.6 genu <i>DSPP</i>	53
5.6. Precypitacja produktów reakcji sekwencjonowania.....	54
5.7. Rozdział produktów reakcji sekwencjonowania elektroforezą kapilarną (CE) przy użyciu automatycznego analizatora DNA typu ABI PRISM 310	55
6. WYNIKI	56
6.1. Zmiany w kodzie genetycznym genu <i>DSPP</i> w sekwencji kodującej białko DSP	56
6.1.1. Mutacje w sekwencji genu <i>DSPP</i> w rejonie kodującym białko DSP	56
6.1.2. Polimorfizm w sekwencji genu <i>DSPP</i> w rejonie kodującym białko DSP	58
6.2. Zmiany w kodzie genetycznym genu <i>DSPP</i> w sekwencji kodującej białko DPP	60
6.2.1. Mutacje w sekwencji genu <i>DSPP</i> w rejonie kodującym białko DPP	60
6.2.1.1. Mutacje w pierwszym nukleotydzie w kodonie w sekwencji genu <i>DSPP</i> w rejonie kodującym białko DPP	60
6.2.1.2. Mutacje w drugim nukleotydzie w kodonie w sekwencji genu <i>DSPP</i> w rejonie kodującym białko DPP	64
6.2.1.3. Mutacje w trzecim nukleotydzie w kodonie w sekwencji genu <i>DSPP</i> w rejonie kodującym białko DPP	68
6.2.2. Polimorfizm w sekwencji genu <i>DSPP</i> w rejonie kodującym białko DPP	71
6.2.2.1. Tranzycja C → T w sekwencji genu <i>DSPP</i> w kodonach kodujących serynę w rejonie kodującym białko DPP	72
6.2.2.2. Tranzycja T → C w sekwencji genu <i>DSPP</i> w kodonach kodujących serynę w rejonie kodującym białko DPP	81
6.2.2.3. Tranzycja T → C w sekwencji genu <i>DSPP</i> w kodonach kodujących kwas asparaginowy w rejonie kodującym białko DPP	86
6.2.2.4. Tranzycja C → T w sekwencji genu <i>DSPP</i> w kodonach kodujących kwas asparaginowy w rejonie kodującym białko DPP	90
6.2.2.4. Tranzycja T → C w sekwencji genu <i>DSPP</i> w kodonach kodujących asparaginę w rejonie kodującym białko DPP	96
6.2.2.5. Tranzycja C → T w sekwencji genu <i>DSPP</i> w kodonach kodujących asparaginę w rejonie kodującym białko DPP	98
6.3. Rearanżacje genowe (zmiany ilościowe) w sekwencji genu <i>DSPP</i> w rejonie kodującym białko DPP	100

6.4. Zmiany w sekwencji genu <i>DSPP</i> w rejonie 3' nieulegającym translacji (3'UTR).....	101
6.5. ANALIZA STATYSTYCZNA	104
6.5.1. Allele referencyjne	104
6.5.2. Mutacje i polimorfizmy	105
6.5.3. Zmiany w pojedynczym allelu w porównaniu do zmian w obu allelach	108
7. DYSKUSJA	113
7.1. Mutacje w sekwencji genu <i>DSPP</i> w rejonie kodującym białko DSP	114
7.2. Mutacje w sekwencji genu <i>DSPP</i> w rejonie kodującym białko DPP	116
7.3. Mutacje w rejonie 3'UTR genu <i>DSPP</i>	122
7.4. Polimorfizm genu <i>DSPP</i>	124
8. WNIOSKI	127
8. PIŚMIENNICTWO	128

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW UŻYWANYCH W PRACY

A –	adenina
Ala (A) –	alanina
Arg (R) –	arginina
Asn (N) –	asparagina
Asp (D) –	kwask asparaginowy
BGN –	biglikan
BMP2 –	białko morfogenetyczne kości 2 (<i>ang. Bone Morphogenetic Protein 2</i>)
BSP –	białko sialowe kości (<i>ang. Bone Sialoprotein</i>)
C –	cytozyna
c. –	pozycja nukleotydu w transkrypcie mRNA
CBF –	czynnik transkrypcyjny łączący się z sekwencją CCAAT (<i>ang. CCAAT Binding Factor</i>)
C4S –	siarczan-4-chondroityny
C6S –	siarczan-6-chondroityny
Cys (C) –	cysteina
Da –	dalton, jednostka masy atomowej
DCN –	dekoryn
DD –	dysplazja zębiny (<i>ang. Dentin Dysplasia</i>)
DE1 –	miejsce przyłączenia czynnika CBF (NF-Y) do sekwencji genu <i>DSPP</i>
DE2 –	miejsce przyłączenia białka DE2 do sekwencji genu <i>DSPP</i>
DGI (DI) –	<i>dentinogenesis imperfecta</i>
DGP –	białko glikozylowane zębiny (<i>ang. Dentin Glycoprotein</i>)
DMP 1 –	białko macierzy zębiny 1 (<i>ang. Dentin Matrix Protein 1</i>)

DPP –	białko fosforowe zębiny (<i>ang. Dentin Phosphoprotein</i>)
DS –	siarczan dermatanu
DSP –	białko sialowe zębiny (<i>ang. Dentin Sialoprotein</i>)
DSPP –	białko sialofosforowe zębiny (<i>ang. Dentin Sialophosphoprotein</i>)
<i>DSPP</i> –	gen kodujący białko DSPP
DSP-PG –	forma proteoglikanu białka sialowego zębiny
EDTA –	sól sodowa kwasu etylenodwuaminoczteroctowego
ENAM –	białko enamelina
G –	guanina
gDNA –	pozycja w sekwencji genomowego DNA
GAG –	glikozaminoglikan – mukopolisacharyd (<i>ang. Glycosaminoglycan</i>)
Glu (E) –	kwas glutaminowy
Gly (G) –	glicyna
HA –	hialuronian
HMW-DSP –	białko sialowe zębiny o wysokiej masie cząsteczkowej (<i>ang. High Molecular Weight Dentin Sialoprotein</i>)
HS –	siarczan heparanu
Ile (I) –	izoleucyna
KS –	siarczan keratyny
MEP1A –	enzym endopeptydaza
MEPE –	białko glikofosforowe macierzy zewnątrzkomórkowej (<i>ang. Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein</i>)
MMP –	enzym metaloproteinaza (<i>ang. Matrix Metalloproteinase</i>)
NF-Y –	czynnik transkrypcyjny należący do rodziny białek CBF, czynnik jądrowy Y (<i>ang. Nuclear Factor-Y</i>)

nt	– nukleotyd
OPN	– osteopontyna
PCR	– reakcja łańcuchowa polimerazy
PG	– proteoglikan (<i>ang. Proteoglycan</i>)
Phe (F)	– fenyloalanina
POP-6	– polimer denaturujący używany do sekwencjonowania DNA
Pro (P)	– prolina
p-Ser	– seryna ufosforylowana
pz	– para zasad
RDG	– sekwencja 3 aminokwasów odpowiedzialna za łączenie z integrzynami (arginina-glicyna-kwas asparaginowy)
Runx2	– czynnik transkrypcyjny (<i>ang. Runt Related Transcription Factor 2</i>)
Ser (S)	– seryna
SIBLING	– rodzina białek niekolagenowych (<i>ang. Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoproteins</i>)
SLPR	– rodzina małych, bogatych w leucynę proteoglikanów (<i>ang. Small Leucine-Rich proteoglycans</i>)
T	– tymina
TGF- β	– transformujący czynnik wzrostu β (<i>ang. Transforming growth Factor β</i>)
Thr (T)	– treonina
Trps 1	– czynnik transkrypcyjny 1 (<i>ang. Trichorhinophalangeal Syndrome 1</i>)
3'UTR	– rejon nieulegający translacji na końcu 3' sekwencji mRNA (<i>ang. 3'Untranslated Region</i>)
Val (V)	– walina

1. STRESZCZENIE

Ustalenia najnowszych badań dowodzą, iż wrodzony niedorozwój zębiny objawiający się fenotypem *dentinogenesis imperfecta* typu II/III (DGI II/III) i/lub dysplazją zębiny typu II (DD II) stanowią tę samą jednostkę chorobową o różnym stopniu penetracji. DGI II/III oraz DD II dziedziczone są w sposób autosomalny dominujący lub powstają w wyniku mutacji *de novo* i są wadami izolowanymi, co oznacza, że fenotyp pojawia się jedynie w uzębieniu. Częstość występowania DGI II/III oraz DD II oceniana jest w populacji ogólnoswiatowej na 1:8000 żywych urodzeń. Jednocześnie brakuje jakichkolwiek danych dotyczących częstości występowania *dentinogenesis imperfecta* typu II/III oraz dysplazji zębiny typu II w polskiej populacji. DGI II/III oraz DD II są efektem mutacji w genie *DSPP* zlokalizowanym u człowieka na chromosomie 4q21.3 i kodującym białko sialofosforowe zębiny (DSPP). Białko DSPP jest syntetyzowane w odontoblastach i po kolagenie typu I jest najobficiej występującym białkiem w organicznej macierzy zębiny. Jednocześnie DSPP jest białkiem markerowym dla zębiny, ponieważ jego stężenie w innych tkankach, w tym kościach i tkankach miękkich jest obecne na znacznie niższym poziomie (około 400-krotnie). Bezpośrednio po translacji, DSPP ulega licznym modyfikacjom potranslacyjnym, w tym podziałowi na dwa białka potomne białko sialowe zębiny – DSP oraz białko fosforowe zębiny – DPP. Ze względu na odmienną budowę oraz charakter biochemiczny białka DSP oraz DPP pełnią różne funkcje w procesie mineralizacji zębiny. DPP bierze udział w nukleacji i dojrzewaniu kryształów hydroksyapatytu zębiny, natomiast DSP spowalnia proces mineralizacji.

Fenotyp DGI II/II i/lub DD dotyczy zarówno uzębienia mlecznego, jak i stałego i charakteryzuje się nieprawidłową budową zębiny. Korony zębów wykazują opalizację w kolorach żółtym, brązowym lub niebieskim. Szkliwo pomimo prawidłowej budowy ma tendencję do pękania i odpryskiwania na granicy szkliwno-zębinowej, co powoduje

odsłonięcie miękkiej zębiny, która ulega szybkiemu starciu. W wyniku słabszej mineralizacji zęby mleczne są zwykle bardziej uszkodzone niż stałe. Korony zębów mają kształt dzwonu z silnym zwężeniem w okolicy szyjek zębów. W badaniu radiologicznym stwierdza się obliterację komór i kanałów korzeniowych zębów oraz występowanie zębiniaków. Korzenie zębów są skrócone i cienkie, często występują przejaśnienia w okolicach wierzchołków korzeni. Główną różnicą kliniczną pomiędzy DGI II/III oraz DD II jest to, iż DD II występuje głównie w uzębieniu mlecznym, a uzębienie stałe nie wykazuje zmian z wyjątkiem częstszej obecności zębiniaków. W przypadku DGI II/III objawy niedorozwoju zębiny występują już w uzębieniu mlecznym i nasilają się z wiekiem zakłócając rozwój i funkcjonowanie narządu żucia.

Do chwili obecnej wykryto około 30 mutacji w genie *DSPP* odpowiedzialnych za powstanie fenotypu DGI II/II i/lub DD. Dotyczyły one sekwencji kodującej peptyd sygnałowy, białko DSP i białko DPP. Równocześnie, stwierdzono występowanie dużej liczby mutacji utajonych, które sklasyfikowano jako cechę polimorfizmu genu *DSPP*.

Celem pracy była analiza molekularna genu *DSPP* u osób z fenotypem *dentinogenesis imperfecta* typu II/III i/lub dysplazją zębiny typu II oraz próba wykrycia mutacji będących przyczyną wystąpienia objawów klinicznych choroby. Analizie poddano sekwencje genu *DSPP* kodujące peptyd sygnałowy, białko DSP, białko DPP oraz sekwencję 3' UTR. Materiał genetyczny pochodził od 10 osób z rozpoznaniem klinicznym i radiologicznym DGI II/II i/lub DD II oraz 30 osób zdrowych bez cech klinicznych DGI II/III i/lub DD II, które stanowiły grupę kontrolną. Sekwencje obu grup porównywano do sekwencji referencyjnych zgromadzonych w światowej bazie ludzkiego genomu Ensembl (www.ensembl.org). Na wykonanie badania otrzymywano pisemną zgodę probanta lub jego opiekuna prawnego w przypadku osób niepełnoletnich i prowadzono za zgodą Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym NKEBN/164/2011. Materiał doświadczalny stanowiło

DNA wyizolowane z nabłonka śluzówki jamy ustnej w postaci wymazów pobieranych na jałowe wymazówki. DNA izolowano klasyczną metodą organiczną używając mieszaniny fenol - chloroform. Pomiar stężenia DNA dokonywano metodą fluorymetryczną. Następnie, metodą PCR przeprowadzono amplifikację fragmentów genu *DSPP* przy użyciu starterów opisanych przez McKnight i wsp. oraz Bai i wsp., a uzyskane fragmenty poddano oczyszczaniu, precypitacji, rozdziałowi oraz sekwencjonowaniu.

Analiza molekularna sekwencji genu *DSPP* u osób w polskiej populacji prezentujących fenotyp DGI typu II/III i/lub DD typu II oraz w grupie kontrolnej wykazała brak mutacji w sekwencji kodującej peptyd sygnałowy, natomiast stwierdzono obecność mutacji i licznych zmian polimorficznych typu SNP w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP, DPP oraz w rejonie 3' UTR.

W sekwencji kodującej białko DSP odnotowano jedną mutację w pozycji g.235. W obu grupach badanych była to zamiana o charakterze transwersji, powodująca zamianę argininy w tryptofan, przy czym w grupie osób chorych wszyscy probanci, u których wystąpiła były heterozygotami. Natomiast wśród osób zdrowych, u których stwierdzono tę samą mutację 1 osoba była homozygotą z obydwoma zmutowanymi allelami. W obu grupach stwierdzono również występowanie 1 zmiany polimorficznej typu SNP w pozycji g.930, która nie skutkowała zamianą kodowanego aminokwasu.

W sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP w grupie osób chorych zaobserwowano 11, a w grupie osób zdrowych 13 mutacji punktowych. Mutacja w pozycji g.3550 (GAT→AAT) występowała tylko u osób chorych, natomiast w pozycjach: g.2006 (GAC→GGC), g.2024 (AAC→AGC), g.3592 (AGT→GGT), g.3768 (GAC→GAA) mutacje pojawiły się jedynie u osób zdrowych. Mutacje zmieniające sens występowały w pierwszym, drugim i trzecim nukleotydzie w kodonie. Dodatkowo w sekwencji kodującej białko DPP wykryto liczne zmiany polimorficzne typu SNP, o charakterze tranzycji pomiędzy

pirymidynami, które nie powodowały zmiany kodowanego aminokwasu. W obu badanych grupach tranzykcje pirymidyn wystąpiły w 30 pozycjach w sekwencji DNA. W grupie osób zdrowych stwierdzono 18 dodatkowych zmian polimorficznych typu SNP, których nie odnotowano wśród chorych probantów. W grupie osób chorych zmiany polimorficzne w sekwencji kodującej białko DPP w 60% dotyczyły kodonów kodujących serynę, natomiast 37% kodonów kodujących kwas asparaginowy. Jedynie 3% zmian dotyczyło kodonów kodujących asparaginę. W grupie kontrolnej odsetki kształtowały się podobnie i wynosiły odpowiednio: 58%, 38% i 4%. Dodatkowo, tylko w grupie osób zdrowych wystąpiły aranżacje genowe (zmiany ilościowe) w postaci insercji i delecji. Insercja 18 nukleotydów wystąpiła u 2 probantów w obu allelach, natomiast delecje w obu allelach u 5 probantów, przy czym liczba utraconych nukleotydów wynosiła odpowiednio: 171, 75, 66, 57, 9. Żadna z odnotowanych zmian ilościowych nie powodowała przesunięcia ramki odczytu.

W sekwencji genu *DSPP* w rejonie 3' nieulegającym translacji (3'UTR) stwierdzono występowanie 2 tranzykcji. W pozycji g.3956 tranzykcja wystąpiła w obu badanych grupach, a liczba osób będących homozygotami z allelami zmutowanymi wynosiła 7 wśród chorych oraz 26 wśród zdrowych probantów. W pozycji g.4070 stwierdzono występowanie mutacji jedynie u 1 chorego probanta.

Analiza materiału genetycznego wykazała, że w obu badanych grupach gen *DSPP* wykazuje wysoki stopień zmienności w postaci mutacji zmieniających sens jak i polimorfizmu. Mutacje oraz zmiany polimorficzne występują w sekwencjach kodujących zarówno białko DSP jak i DPP, natomiast polimorfizm ilościowy wystąpił jedynie w grupie kontrolnej. W obu badanych grupach mutacje zmieniające sens i zmiany polimorficzne występowały w tych samych loci genu *DSPP*, co nie pozwala jednoznacznie określić przyczyny wystąpienia fenotypu DGI II/III lub DD II u badanych chorych. Brak informacji w bazie ludzkiego genomu Ensembl o niektórych mutacjach występujących w grupie badanej

oraz kontrolnej, pozwala zakwalifikować je jako zmiany o charakterze polimorfizmu lokalnego.

2. SUMMARY

Contemporary research shows that *dentinogenesis imperfecta* type II/III (DGI II/III) and/or dentin dysplasia type II (DD II) are the same disease entity with various degrees of severity. DGI II/III and DD II are inherited as autosomal dominant disorders or as a result of *de novo* mutations and are insulated defects. The estimated frequency in the worldwide population is 1: 8000, but the Polish population data are incomplete due to the fact that there is no register of people with phenotype DGI II/III and/or DD II. *Dentinogenesis imperfecta* type II/III and dentin dysplasia type II are the result of mutations in the *DSPP* gene located on chromosome 4q22.1 and encoding a dentine sialophosphoprotein (DSPP). DSPP is synthesized in the odontoblasts and after the type I collagen is the most abundant protein of the organic matrix of dentin. DSPP is proposed to be a marker protein for the dentin because its biosynthesis in other tissues, including bone and soft tissue, is present at a lower level (approximately 400-fold). Immediately after the translation, DSPP undergoes number of modifications, including cleavage into two daughter proteins: dentin sialoprotein (DSP) and phosphoprotein (DPP). Due to the different structure and the biochemical properties both daughter proteins perform different functions in the process of dentin mineralization. DPP participates in the nucleation of hydroxyapatite crystal and maturation of dentin, while DSP slows down or even inhibits the process of mineralization.

DGI II/I and/or DD affects both deciduous and permanent teeth and is characterized by malformation of a structure of dentin. Tooth crowns exhibit iridescence in yellow, brown or blue. In spite of a proper structure enamel has a tendency to crack and chip on the border of enamel-dentine, which causes the exposure of the soft dentin. Consequently the soft dentin undergoes rapid attrition. As a result of weaker mineralization, primary teeth are usually more damaged than permanent ones. Anatomically, tooth crowns are bell-shaped with marked cervical constriction. The radiological study concludes the obliteration of chambers and root

canals as well as the presence of pulp stones. The roots are shortened and thin and show periapical radiolucencies. The main clinical differences between the DGI II/III and DD is that DD mainly occurs in deciduous dentition while permanent dentition shows no change except for the frequent presence of pulp stones. The symptoms of DGI II are already present in the deciduous dentition and intensify with age interfering with the development and function of the masticatory system.

So far approximately 30 mutations have been detected in the *DSPP* gene, which reflect in the phenotype of DGI II/II and/or DD II. They have been related to a sequence encoding: a signal peptide, DPP and DSP. Simultaneously an occurrence of a large number of latent mutations of *DSPP* gene classified as a polymorphism, has been observed.

The aim of the study was the molecular analysis of *DSPP* gene in patients with *dentinogenesis imperfecta* type II/III and/or dentin dysplasia type II and an attempt to detect causative mutations. The sequence of *DSPP* gene encoding the signal peptide, DPP, DSP and 3'UTR was studied and analyzed. DNA was taken from 10 probands with *dentinogenesis imperfecta* II/III and /or dentin dysplasia II and was compared to the sequences of 30 healthy probands without clinical features of DGI II/II and/or DD II, who constituted the control group. Sequences of these two groups were compared to a marker sequence presented in the Human Genome database Ensemble (www.ensembl.org). In order to carry out the study, a written consent from the proband or a proband's legal guardian if participant was underage was obtained. The study was carried out with the approval of the Independent Ethics Commission of the Medical University of Gdańsk. The experimental material consisted of DNA samples isolated from the oral mucosa epithelium collected with swabs. DNA was isolated with the standard phenol – chloroform method. DNA concentration was measured by fluorimetric method. Subsequently, PCR amplification of gene fragments was performed

using primers *DSPP* proposed and described by McKnight et al. and Bai et al. The obtained fragments were purified, precipitated, and sequenced.

Molecular analysis of the *DSPP* sequences in individuals with DGI II/III or/and DD II phenotype and in the control group in the Polish population showed no mutation in the coding sequence of the signal peptide. In contrast, the presence of mutations and numerous SNP polymorphic changes in the coding sequences of the DSP, DPP and in the region of the 3'UTR was observed.

In the sequence coding DSP, 1 mutation at the g.235 position (AGG → TGG) in both groups was recorded. It was a transversion resulting in the conversion of arginine to tryptophan. In the experimental group all patients were heterozygotes, while among healthy people with this mutation, one person was a homozygote with both mutant alleles. In the both groups one SNP polymorphic change at the g.930 position was found, but it did not result in the conversion of the encoded aminoacid.

The sequence coding DPP showed 11 point mutations in the group of sick patients and 13 point mutations in the group of healthy individuals. The mutation at the position g.3550 (GAT → AAT) occurred only in sick patients, while at positions g.2006 (GAC → GGC), g.2024 (AAC → AGC), g.3592 (AGT → GGT), g.3768 (GAC → GAA) only in healthy subjects. Mutations were observed in the first, second and third nucleotide in codon. In the sequence coding DPP a number of SNP polymorphic changes as transitions between pyrimidines has been detected but they did not alter the encoded aminoacid. In both groups, they occurred in 30 positions of DPP sequence of the *DSPP* gene. In the group of healthy subjects 18 additional polymorphic changes were found. In the group of sick patients polymorphic changes in the sequence coding DPP in 60% were related to serine codons, in 37% were related to the codons encoding aspartic acid, and only in 3% were related to asparagine codons. In the control group rates were quite similar: 58%, 38% and 4%. In

addition, only in the group of healthy subjects quantitative gene arrangements occurred in the form of insertions and deletions. Insertion of 18 nucleotides was observed in 2 probands in both alleles, and deletions in the 5 „control” persons also in both alleles; the numbers of deleted nucleotides were: 171, 75, 66, 57, 9. All quantitative changes did not result in a frame shift.

In the *DSPP* gene sequence in the 3' untranslated region (3'UTR) two transitions have been identified. At the position g.3956 transition occurred in the both groups, and the numbers of homozygotes with mutant alleles were 7 (sick) and 26 (healthy). At the position g.4070 a mutation was found in one sick proband who was a homozygote with both mutant alleles.

The molecular study showed that the *DSPP* gene exhibits a high degree of variability involving missense mutations and polymorphisms in the both evaluated groups. Mutations and polymorphic changes occurred in the sequences coding both the DPP and DSP. In contrast, quantitative polymorphism occurred only in the control group. In both groups missense mutations and polymorphic changes occurred in the same loci of *DSPP*, which does not allow to clearly identify the causative mutations for the phenotype of DGI II/III or DD II occurrence in sick patients. No information in the human genome database Ensembl about some of the mutations occurring in the experimental and control group allows to qualify them as local polymorphism changes.

3. WSTĘP

3.1. Zaburzenia rozwojowe zębiny

Z pośród ponad 7000 chorób uwarunkowanych genetycznie opisanych u człowieka 30 – 40% manifestuje się objawami w obrębie twarzoczaszki, jamy ustnej i/lub zębów. Objawom ogólnoustrojowym niejednokrotnie towarzyszy zmniejszenie ilości zębów zarówno mlecznych jak i stałych, zmiany w budowie anatomicznej poszczególnych grup zębowych lub całego uzębienia, a także zaburzenia jakościowe w budowie poszczególnych tkanek zęba, w tym nieprawidłowości w budowie i mineralizacji szkliwa, zębiny i cementu korzeniowego [Angus i wsp.2003, Kuczyńska i wsp.1993, Szpranger-Nodzak i wsp.2003]. Obserwowane zmiany są wynikiem zaburzeń w rozwoju, powstałych podczas formowania się zawiązków zębów i mogą występować jako samodzielne jednostki chorobowe zwane wadami izolowanymi, bądź też są objawem stomatologicznym zespołów wad uwarunkowanych genetycznie. Zaburzenia rozwoju tkanek zęba jako samodzielne jednostki chorobowe należą do rzadkich wad rozwojowych [Angus i wsp.2003, Szpranger-Nodzak 2003, Jańczuk 2006]. Zmiany mogą dotyczyć pojedynczych tkanek zęba to jest szkliwa, zębiny i/lub cementu korzeniowego bądź też obejmować wszystkie struktury budujące ząb [Angus i wsp.2003, Szpranger-Nodzak i wsp.2003, Jańczuk 2006].

3.1.1. Definicja, klasyfikacja i epidemiologia zaburzeń rozwoju zębiny

Wrodzone zaburzenia rozwoju zębiny należą do izolowanych wad genetycznych dziedziczonych w sposób autosomalny dominujący [Angus i wsp.2003, Szpranger-Nodzak i wsp.2003, Jańczuk 2006, AAPD 2010]. Wady te mogą skutkować wystąpieniem fenotypu jedynie w uzębieniu mlecznym lub objawiać się zarówno w uzębieniu mlecznym jak i stałym [Angus i wsp.2003, Barron i wsp. 2008, AAPD 2010].

Wrodzone zaburzenia rozwoju zębiny podzielono arbitralnie na: – nieprawidłowy rozwój zębiny *dentinogenesis imperfecta* (DI\ DGI) oraz – dysplazję zębiny (*dentin dysplasia*, DD), jednak powyższa klasyfikacja powstała jedynie na podstawie obserwowanych objawów klinicznych i radiologicznych, przed wprowadzeniem metod biologii molekularnej do codziennej diagnostyki klinicznej [Witkop 1975, Shields i wsp. 1973].

Dentinogenesis imperfecta wg Shields występuje [Shields 1973, Kuczyńska i wsp. 1993] w trzech postaciach: – DGI typu I, DGI typu II lub DGI typu III.

DGI typu I (OMIM 166200) jest zaburzeniem rozwoju zębów współtowarzyszącym wrodzonej łamliwości kości (*osteogenesis imperfecta*), będącej efektem nieprawidłowej budowy kolagenu typu I, jako bezpośrednie następstwo mutacji w genach *COL1A1* i *COL1A2* zlokalizowanych u człowieka odpowiednio na chromosomach 17q21.31-q22 i 7q22.1 [Kim i wsp. 2007]. Większość przypadków *osteogenesis imperfecta* dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący [Hart i wsp. 2007, Szpringer-Nodzak i wsp. 2003, Angus i wsp. 2003] z częstością występowania około 1: 35 000 żywych urodzeń [Szpringer-Nodzak i wsp. 2003]. W przeciwieństwie do GDI typu I, DGI typu II (OMIM 125490), zwana również opalizującą zębiną lub chorobą Capdepona, jest izolowaną wadą rozwojową wykazującą fenotyp jedynie w obrębie uzębienia i pojawia się z częstością 1: 8000 żywych urodzeń [Barron i wsp. 2008, Kida i wsp. 2009, Kim i wsp. 2007]. Podobnie, DGI typu III (OMIM 125500) pierwotnie uznana za defekt zębowy dotyczący odizolowanej społeczności Brandywine (Maryland, USA), w której wada występowała z częstością 1:15 przypadków żywych urodzeń [MacDougall i wsp. 2006]. Jednak obecnie szacuje się, iż w populacji ogólnoswiatowej DGI typu III występuje z częstością zbliżoną do odnotowanej dla DGI typu II [Hart i wsp. 2007, Kim i wsp. 2007].

Dysplazja zębiny (*Dentin Dysplasia*) wg Shields [Shields i wsp. 1973, Kuczyńska i wsp. 1993] występuje w dwóch postaciach: DD typu I oraz DD typu II. DD typu I (OMIM

125400) została nazwana dysplazją zębiny korzeniowej. Obserwowany fenotyp występuje w zębach mlecznych i stałych, których korony pozostają fenotypowo niezmienione, natomiast zęby mają skrócone korzenie czego efektem jest wczesna utrata uzębienia [Angus i wsp. 2003, Hart i wsp. 2007, Lee SK. i wsp. 2011]. Częstość występowania DD typu I szacuje się na 1:100000 żywych urodzeń [Hart i wsp. 2007, Jańczuk 2006]. Odmienne objawy fenotypowe obserwuje się w dysplazji zębiny typu II (DD typ II), zwanej dysplazją zębiny koronowej (OMIM 125420), która również objawia się zarówno w zębach mlecznych jak i stałych [Angus i wsp. 2003, Hart i wsp. 2007].

Wszystkie opisane zaburzenia rozwoju zębiny dziedziczone są w sposób autosomalny dominujący [Angus i wsp. 2003] jednak jak dotąd nie zidentyfikowano molekularnych przyczyn DD typu I [Hart i wsp. 2007]. Jednocześnie potwierdzono, że wszystkie pozostałe wady rozwojowe zębiny są efektem mutacji w genie *DSPP* zlokalizowanym na chromosomie 4q22.1 i kodującym niekolagenowe białko sialofosforowe zębiny (*dentin sialophosphoprotein*; DSPP) [Barron i wsp. 2008, Hart i wsp. 2007]. Pozyskanie na poziomie molekularnym szczegółowych wyników dotyczących przyczyn powstawania fenotypu DGI typu II/ III oraz DD typu II pozwala wnioskować, że fenotyp będący efektem mutacji w genie *DSPP* jest jedną jednostką chorobową różniącą się jedynie stopniem penetracji wady, co klinicznie skutkuje różnym nasileniem klinicznych objawów choroby [Barron i wsp. 2008, Beattie i wsp. 2006, Jańczuk 2006]. Używając zaproponowanego schematu, fenotyp DD typu II skutkowałby fenotypem dającym najslabsze symptomy, DGI typu II średnim zaawansowaniem choroby, a fenotyp DGI typu III byłby najcięższą postacią choroby [Barron i wsp. 2008, Beattie i wsp. 2006].

3.2.1. Obraz kliniczny i radiologiczny *dentinogenesis imperfecta* typu II i III oraz dysplazji zębiny typu II

Symptomy *dentinogenesis imperfecta* typu II występują zarówno w uzębieniu mlecznym jak i stałymi cechują się występowaniem przebarwień zębów na kolor niebiesko-szary bądź bursztynowo-brązowy z charakterystyczną opalizacją [Angus i wsp. 2003, Szpringer-Nodzak i wsp. 2003]. Po wyrznięciu zębów, szkliwo łatwo ulega odkruszeniu odsłaniając miękką, szybko ścierającą się zębinę. W skrajnych przypadkach korony zębów mlecznych w przeciągu 2 lat mogą ulec starciu do poziomu dziąsła [Jańczuk 2006, MacDougall i wsp. 2006]. Bulwiaste, baniaste lub opuszkowate korony zębów są silnie poszerzone, a w okolicy szyjek zębów występują przewężenia predysponujące do spontanicznych odłamów korony zęba [Barron i wsp. 2008, Jańczuk 2006, Komorowska 1994]. W badaniu radiologicznym stwierdza się zwężenie i skrócenie korzeni zębów oraz obecność cienkich i zobliterowanych kanałów korzeniowych. Pomimo, iż komory miazgi są również zobliterowane, to na skutek szybkiego ścierania zębów w krótkim czasie dochodzi do obnażenia miazgi, z jej następczą martwicą i zgorzelą, która niejednokrotnie prowadzi do powikłań w obrębie tkanek okołowierzchołkowych [Angus i wsp. 2003, Hart i wsp. 2007, Jańczuk 2006, Szpringer-Nodzak i wsp. 2003]. Niejednokrotnie obliterację komór zębów można stwierdzić jeszcze przed rozpoczęciem wyrzynania zęba [AAPD 2010].

Badanie histologiczne zębów z *dentinogenesis imperfecta* typu II wykazuje obecność cienkiego szkliwa o prawidłowej budowie. Zębina ma natomiast budowę nieprawidłową, co szczególnie dotyczy zębiny okołomiazgowej, którą cechuje zmniejszona liczba skróconych kanalików zębinowych, niejednokrotnie silnie zobliterowanych oraz obecność licznych rozgałęzień międzykanalikowych. Badania w mikroskopie elektronowym wykazały nieregularny układ kryształów apatytu w stosunku do konfiguracji włókien kolagenowych [MacDougall i wsp. 2006, Szpringer-Nodzak i wsp. 2003], natomiast analiza chemiczna

uszkodzonej zębiny wskazuje na podwyższoną zawartość wody i zmniejszoną zawartość składników nieorganicznych w porównaniu z zębiną o prawidłowej budowie [Hart i wsp. 2007, Jańczuk 2006, Szpranger-Nodzak i wsp. 2003].

Symptomy kliniczne *dentinogenesis imperfecta* typu III są zbliżone do zmian obserwowanych w DGI-II, jednak w tym przypadku korony zębów stałych przybierają kształt dzwonu [Jańczuk 2006, AAPD 2010]. W uzębieniu mlecznym stwierdza się występowanie tzw. zębów skorupkowych oraz licznych obnażeń miazgi [Barron i wsp. 2008, AAPD 2010, Hart i wsp. 2007]. Korony zębów pokryte są szkliwem o prawidłowej grubości, posiadają bardzo cienką warstwę zębiny oraz dramatycznie powiększoną komorę miazgi zęba [Kim i wsp. 2007, MacDougall i wsp. 2006, AAPD 2010].

W badaniu radiologicznym zęby mleczne wyglądem przypominają skorupkę stąd nazwano je zębami muszelkowymi lub skorupkowymi [Jańczuk 2006, Kim i wsp. 2007]. W przeciwieństwie do DGI typu II komory miazgi zębów oraz kanały korzeniowe są duże i otacza je cienka warstwa zębiny o nieprawidłowej budowie [Angus i wsp. 2003, Hart i wsp. 2007, Barron i wsp. 2008]. W niektórych przypadkach warstwa zębiny może występować jedynie w obrębie korzenia [AAPD 2010]. GDI typu III często współtowarzyszy młodzieńcze zapalenie przyzębia [Kuczyńska i wsp. 1993].

Przeciwnie do DGI typu II/III dysplazja zębiny typu II charakteryzuje się występowaniem odmiennych objawów w uzębieniu mlecznym i stałym [Jańczuk 2006, Barron i wsp. 2008]. Uzębienie mleczne nie różni się od DGI typu II i cechuje je występowanie bursztynowo przebarwionego szkliwa i zębiny, które ulegają szybkiemu starciu. Korony mają baniasty kształt oraz przewężenie w okolicy szyjki zęba [Barron i wsp. 2008, MacDougall i wsp. 2006]. Ciekawym pozostaje fakt, iż w dysplazji zębiny zęby stałe mają prawidłowy wygląd kliniczny, bądź wykazują delikatne, prawie niewidoczne przebarwienia [Angus i wsp. 2003, Barron i wsp. 2008, Jańczuk 2006]. Długość korzeni

zębów pozostaje prawidłowa zarówno w uzębieniu mlecznym jak i stałym [Barron i wsp. 2008, AAPD 2010].

W obrazie radiologicznym uzębienia mlecznego w dysplazji zębiny typu II stwierdza się obecność bulwiastych koron klinicznych, którym towarzyszy znaczne zwężenie szyjek zębowych oraz szybką obliterację komór miazgi [AAPD 2010]. Natomiast zdjęcia radiologiczne zębów stałych pokazują prawidłowy kształt koron. Obserwuje się obecność anomalii morfologicznej komory miazgi w postaci zwapnień wewnątrzmiarzgowych, zębiniaków i/lub kamieni miazgi, co wyglądem upodabnia komorę miazgi do kwiatu ostu lub płomienia [Angus i wsp. 2003, Barron i wsp. 2008, AAPD 2010, Hart i wsp. 2007]. Stopniowo zwężające się kanały korzeniowe wcześniej ulegają całkowitej obliteracji [Jańczuk 2006].

3.1.2.1. Konsekwencje *dentinogenesis imperfecta* typu II/III i/lub dysplazji zębiny typu II dla układu stomatognatycznego

Pomimo iż pierwotne objawy GDI typu II/III oraz DD typu II dotyczą jedynie uzębienia to fakt, iż ujawniają się one bardzo wcześnie w okresie rozwojowym skutkuje powstaniem wtórnych objawów w całym układzie stomatognatycznym. Szybkie ścieranie koron zębów prowadzi do obniżenia wysokości zwarcia, co w konsekwencji często skutkuje przemieszczeniem głów żuchwy w stawach skroniowo-żuchwowych, prowadząc do bolesnych dysfunkcji stawów oraz zmian w rysach twarzy. Twarz przybiera wygląd progeniczny, z wyraźną protruzją bródki, co nadaje pacjentowi wygląd „starczy” tzw. „*witches profile*”. Fałdy nosowo – wargowe oraz bruzda bródkowa ulegają znacznemu pogłębieniu, a kąciki ust opadają ku dołowi ograniczając widoczność czerwieni wargowej [Angus i wsp. 2003, Malejewska i wsp. 1986]. Utrata twardych tkanek zębów skutkuje przebudową narządu żucia, co uniemożliwia prawidłowe funkcje, w tym żucie i mowę i w konsekwencji wywiera niekorzystny wpływ na stan psychiczny pacjenta oraz jego relacje

interpersonalne [Barron i wsp. 2008, Mayordomo i wsp. 1994]. Przy braku wczesnej i rozległej interwencji protetycznej dochodzi do całkowitej utraty zębów spowodowanej niemożliwością wdrożenia leczenia endodontycznego jako efekt nieprawidłowości w budowie anatomiczno-morfologicznej komór i kanałów korzeniowych. Przedwczesna utrata uzębienia mlecznego może również skutkować zaburzeniami wyrzynania zębów stałych ze względu na powstawanie blizn kostnych. Ostatecznie do obrazu klinicznego DGI typu II/III i/lub dysplazji zębiny typu II dołączają się symptomy różnych wad zgryzu [Komorowska 1994, Mayordomo i wsp. 1994].

Interesujące, aczkolwiek nieliczne doniesienia wskazują, że DGI typu II/III może towarzyszyć upośledzenie słuchu o różnym stopniu nasilenia od średniego niedosłuchu do ciężkiej postaci całkowitej utraty słuchu [Xiao i wsp. 2001]. Badacze spekulują, że przyczyną upośledzenia słuchu u chorych z GDI typu II/III są zmiany w stawach skroniowo-żuchwowych jako następstwo uszkodzenia ucha środkowego spowodowanego obniżeniem wysokości zwarcia na skutek rozległego starcia zębów [MacDougall i wsp. 2006].

3.1.3. Postępowanie lecznicze u chorych z DGI typu II/III i/lub DD typu II

Wczesne i prawidłowe rozpoznanie DGI typu II/III lub dysplazji zębiny typu II jest kluczowe dla wdrożenia właściwej profilaktyki stomatologicznej, a następnie procedur leczniczych pozwalających pacjentowi zachować prawidłowe funkcjonowanie narządu żucia. Z uwagi na fakt, że podejmowane leczenie jest jedynie objawowe, pacjenci z potwierdzonym rozpoznaniem *dentinogenesis imperfecta* typu II/III powinni od najmłodszych lat być objęci stałą opieką lekarzy wszystkich specjalności stomatologicznych z przystosowaniem wdrażanych procedur leczniczych odpowiednio do wieku pacjenta oraz nasilenia objawów, w tym oszacowanego ryzyka szybkości utraty twardych struktur zęba. Leczenie ma na celu przywracać prawidłową funkcję układu stomatognatycznego i estetykę twarzy oraz obejmować zakres świadczeń szerszy od konwencjonalnych metod postępowania

stomatologicznego [Barron i wsp. 2008, Komorowska 1994, Malejewska i wsp. 1986]. W pierwszej kolejności należy wyeliminować źródła infekcji i bólu oraz zapobiegać ścieraniu zębów. Kolejno, powinno się odbudowywać utraconą wysokość zwarcia poprzez uzupełnienie istniejących braków zębowych oraz nadbudowę zębów startych. U pacjentów młodocianych istotnym wydaje się wczesna profilaktyka zaburzeń wyrzynania zębów stałych oraz leczenie współistniejących wad zgryzu. Natomiast rodziny, w których rozpoznano DGI typu II/III lub DD typu II powinny mieć wykonany rodowód oraz na tej podstawie zostać poinformowane o ryzyku urodzenia się kolejnych dzieci dotkniętych tą wadą rozwojową [Barron i wsp. 2008, Darendeliev-Kaba i wsp. 1992, Ferkäinen 1981, Malejewska 1986, Mayordomo i wsp. 1994].

Szczególną rolę w procesie opóźnienia skutków choroby może odegrać lekarz protetyk, gdyż nadrzędnym celem profilaktyki postępu choroby jest zachowanie właściwej wysokości zwarcia poprzez ochronę zębów bocznych przed atrycją. Konwencjonalna protetyka stomatologiczna daje możliwość całkowitego pokrycia startych zębów koronami protetycznymi oraz uzupełnienie brakujących zębów z użyciem mostów protetycznych. Ponadto, leczenie protetyczne może pomóc w zapewnieniu estetycznego wyglądu zębów przednich poprzez zastosowanie elementów adhezyjnych w tym licówek kompozytowych lub ceramicznych. Jednak dla zapewnienia powodzenia w leczeniu protetycznym z wykorzystaniem uzupełnień stałych, proces leczenia należy rozpocząć u pacjentów z niewielkim i/lub średnim nasileniem objawów klinicznych DGI typu II/III kiedy kształt i wielkość koron zębów pozwalają na uzyskanie satysfakcjonującej retencji dla koron i mostów protetycznych. Stąd, coraz większą wagę przywiązuje się do wczesnej i pełnej diagnostyki molekularnej mogącej jednoznacznie zdefiniować rozpoznanie kliniczne [Barron i wsp. 2008, Ferkäinen 1981, Groten 2009, AAPD 2010, Komorowska 1994].

3.2. Wybrane niekolagenowe białka budujące organiczną macierz zębiny

3.2.1. Proteoglikany

Proteoglikany (PG) są jednym z podstawowych i kluczowych składników tkanki łącznej [Embery i wsp. 2001]. Te wielkocząsteczkowe związki zbudowane są z rdzenia białkowego połączonego wiązaniami kowalencyjnymi z łańcuchami glikozaminoglikanów (GAG) i uczestniczą w formowaniu zewnątrzkomórkowej macierzy zębiny [Embery i wsp. 2001]. Skład biochemiczny łańcuchów GAG ma decydujący wpływ na właściwości proteoglikanów, które są opisywane jako liniowe heteropolisacharydy składające się z powtarzających się jednostek disacharydowych: – N-acetyloheksosaminy i kwasu heksanowego [Embery i wsp. 2002]. Można wyróżnić siedem glikozaminoglikanów budujących łańcuch boczny proteoglikanów. Należą do nich: hialuronian (HA), siarczan dermatanu (DS), siarczan-4-chondroityny (C4S), siarczan-6-chondroityny (C6S), siarczan keratyny (KS), siarczan heparanu (HS), heparyna [Embery i wsp. 2001]. Dla przykładu, selektywna interkonwersja reszty kwasu heksanowego w obrębie DS i HS oraz wybiórcze siarczanowanie reszty heksozaminy w CS, DS, HS, KS i heparynie pozwala na większe zróżnicowanie, a tym samym wpływa na tworzenie łańcuchów glikozaminoglikanów o odmiennych cechach [Embery i wsp. 2001]. Proteoglikany występujące w zewnątrzkomórkowej przestrzeni odontoblasta (organicznej macierzy zębiny) dzieli się w zależności od ich masy cząsteczkowej i stanu skupienia na: proteglikany agregujące, proteoglikany SLPR (*Small Leucine Rich Proteoglycans*), proteoglikany powierzchniowe (*cell surface proteoglycans*) i grupę proteoglikanów niesklasyfikowanych (*orphans*) [Embery i wsp. 2001, Iozzo 1997]. Proteoglikany z rodziny SLRP mają istotne znaczenie dla budowy organicznej macierzy zębiny, stąd dla potrzeb tej monografii zostaną omówione szczegółowo.

3.2.1.1. Proteoglikany z rodziny SLRP (*Small Leucine Rich Proteoglycans*)

Rodzinę SLRP tworzą: dekoryn, biglikan, lumikan, fibromodulina, keratocan (KTN), osteoadheryn (OSAD) - osteomodulina, epifikan - PG-Lb, osteoglicyna poprzednio nazywana czynnikiem osteoindukcyjnym i PRELP (*proline/arginine-rich and leucine-rich repeat protein*) [Iozzo 1997, Krusius i wsp. 1986, Fisher i wsp. 1989, Blochberger i wsp. 1992, Oldberg i wsp. 1989, Funderburgh i wsp. 1996, Deere i wsp. 1996, Madisen i wsp. 1990, Bengtsson i wsp. 1995]. Specyfikę SLRP stanowi obecność w trzonie białkowym od 7 do 24 tandemowych powtórzeń odcinków sekwencji bogatych w reszty leucyny (LRRs) [Iozzo 1997]. Poszczególne proteoglikany różnią się liczbą reszt leucyny, składem pozostałych aminokwasów oraz modyfikacjami potranslacyjnymi [Iozzo 1997]. W mineralizacji zębiny czynnie uczestniczą dekoryn (DCN) i biglikan (BGN) [Krusius i wsp. 1986]. Pełnią one funkcję regulacyjną czasowo-przestrzennej kontroli postępu procesu mineralizacji zębiny [Iozzo 1997, Krusius i wsp. 1986, Goldberg i wsp. 2005].

Dekoryn o masie cząsteczkowej 120 kDa (rdzeń białkowy 45 kDa) posiada jeden łańcuch cukrowy przyłączony do grupy aminowej treoniny w pozycji czwartej łańcucha białkowego. W tkankach zmineralizowanych łańcuch GAG składa się głównie z siarczanu chondroityny [Fisher i wsp. 1989], podczas gdy w tkance łącznej „miękkiej” przeważa siarczan dermatanu [Bratt i wsp. 1992]. W pobliżu miejsca przyłączenia łańcucha GAG znajduje się domena bogata w tyrozynę i cysteinę, które tworzą pętlę dwusiarczkową. Jest ona podobna do pętli cysteinowej znajdującej się na COOH-końcu białka [Iozzo 1997].

Biglikan posiada masę cząsteczkową około 200 kDa (rdzeń białkowy 40-45 kDa) i strukturą biochemiczną przypomina dekoryn [Iozzo 1997]. Posiada dwa łańcuchy GAG składające się z siarczanu chondroityny i/lub siarczanu dermatanu przyłączone przy piątej i jedenastej reszcie seryny [Iozzo 1997]. Podobnie jak w dekorynie CS dominuje w tkankach zmineralizowanych [Fisher i wsp. 1989], a DS w tkankach miękkich [Bratt i wsp. 1992].

Jedną z ważniejszych funkcji dekorynu i biglikanu podczas rozwoju zębiny jest udział obu proteoglikanów w organizacji przestrzennego ułożenia włókien kolagenowych budujących organiczny zrąb zębiny. Zarówno dekoryn jak i biglikan posiadają zdolność wiązania kolagenu do białkowego rdzenia w odpowiedniej konformacji przestrzennej, przez co regulują odległości pomiędzy włóknami kolagenu „rozdzielając” je łańcuchami GAG [Progeny i wsp. 1994, Scott 1986]. Właściwości chemiczne obu proteoglikanów zależą od rodzaju przyłączonych łańcuchów GAG oraz lokalizacji w macierzy zewnątrzkomórkowej. Milan i współautorzy wykazali obecność dekorynu i biglikanu w trzech fazach mineralizacji zębiny (niezmineralizowanej przębiny, fazy przejściowej przębina-zębina i zmineralizowanej zębiny) [Milan i wsp. 2004, 2005]. Proteoglikany wyizolowane z przębiny, posiadały wyższą zawartość siarczanu dermatanu, znacząco opóźniały tworzenie włókien kolagenowych, co sprzyjało ich pogrubieniu, a utrata łańcuchów GAG powodowała opóźnienie w tworzeniu włókien kolagenowych oraz ich ścieńczenie. Proteoglikany z fazy przębina-zębina zawierające większą ilość siarczanu chondroityny również opóźniały fibrylogenezę, co skutkowało pogrubieniem włókien kolagenu. Natomiast, proteoglikany obecne w zmineralizowanej zębinie działały hamująco zarówno na powstawanie jak i dojrzewanie (grubość) włókien kolagenowych [Milan i wsp. 2004]. Łańcuchy GAG dekorynu i biglikanu mają również domeny wiążące jony wapnia [Embery i wsp. 1998], przy czym siarczan chondroityny wiąże pięć razy więcej jonów wapnia niż siarczan dermatanu. Stąd, proteoglikany z przewagą łańcuchów zbudowanych z siarczanu chondroityny są głównymi białkami biorącymi udział w wiązaniu jonów wapnia podczas procesu mineralizacji zębiny. Jednocześnie obecność łańcucha białkowego stanowi przeciwwagę dla promineralizacyjnej aktywności łańcucha GAG, gdyż hamuje wzrost kryształu apatytu. W efekcie końcowym powstaje swoisty balans dla promineralizacyjnej i hamującej mineralizację aktywności proteoglikanu, co sprzyja właściwej cyklicznej mineralizacji zębiny [Embery i wsp. 1998].

Obecność proteoglikanów na powierzchni kryształu apatytu ściśle precyzuje liczbę dostępnych miejsc nukleacji i precyzyjnie steruje kierunkiem ich wzrostu [Embery i wsp. 1998]. Chen i Boskey przedstawili mechanizm hamowania wzrostu kryształów apatytu poprzez bezpośrednią adsorpcję ujemnie naładowanych grup siarczanowych proteoglikanów do miejsc wzrostu, co zakłócało przyrost ilości jonów wiązanych w tych miejscach [Chen CC. i wsp. 1985]. Badania *in vivo* przeprowadzone na myszach knock-out biglikanu i/lub dekorynu wykazały, iż brak tych dwóch proteoglikanów ma podobny efekt na powstawanie zębiny, która wykazuje cechy hipomineralizacji, nasilone w przypadku braku dekorynu [Goldberg i wsp. 2005].

Dodatkowo, dekoryn i biglikan posiadają funkcje regulatorowe, oddziałując z czynnikami wzrostu, głównie z TGF- β , przez co wpływają na ich funkcjonalną aktywność [Iozzo i wsp. 1996], a łącząc się z receptorami powierzchniowymi komórek powodują postęp cyklu komórkowego i aktywację ekspresji wybranych genów [Iozzo 1997].

3.2.1.2. Rodzina białek SIBLING (*Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein*)

SIBLING (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*) jest to rodzina niekolagenowych białek w skład której wchodzi: osteopontyna (OPN), białko sialowe kości (BSP), białko glikofosforowe macierzy pozakomórkowej (MEPE), białko macierzy zębiny 1 (DMP 1), białko sialofosforowe zębiny (DSPP) oraz enamelina (ENAM) [Fisher i wsp. 2003, Huang i wsp. 2008]. Oprócz zębiny i kości występowanie białek SIBLING potwierdzono w chrząstce oraz tkankach miękkich takich jak ślinianki czy nerki [Baba i wsp. 2004, Hudkins i wsp. 1999, Ogburke i wsp. 2004, Prasad i wsp. 2011]. Pomimo, że struktura pierwszorzędowa białek SIBLING wykazuje znaczące różnice, to SIBLING posiadają również cechy wspólne do których należą: lokalizacja występowania głównie w macierzy zewnątrzkomórkowej kości i zębiny, aktywna modulacja nukleacji i mineralizacji apatytów oraz dojrzewania kryształu minerału. Stwierdzono, że ekspresja BSP, OPN, DMP1 i DSPP w zębinie i kości jest

jakościowo podobna lecz różna ilościowo [Qin i wsp. 2001]. Kolejną cechą wspólną dla białek SIBLING jest podobieństwo modyfikacji potranslacyjnych, w tym fosforylacji, glikozylacji oraz proteolitycznego podziału na aktywne białka potomne [MacDougall i wsp. 2006, Qin i wsp. 2004].

Analiza sekwencji genów zgromadzonych w bazie Human Genome Project wykazuje, iż geny kodujące pięć białek SIBLING zgrupowane są ściśle obok siebie, a szósty gen kodujący ENAM znajduje się bliżej centromeru na chromosomie 4. *DSPP*, *DMP1*, *BSP*, *MEPE* i *OPN* u człowieka zlokalizowane są na chromosomie 4 w pozycji 4q21-23 i obejmują około 750000 par zasad. Gen *ENAM* ma obecnie przypisaną pozycję 4q13 [Fisher i wsp. 2003]. Geny kodujące sześć białek rodziny SIBLING (osteopontynę, białko sialowe kości, białko glikfosforowe macierzy pozakomórkowej, białko macierzy zębiny1, białko sialofosforowe zębiny i enamelinę) składają się z 5 eksonów i 4 intronów. Ekson 1 jest zawsze eksonem niekodującym, podczas gdy ekson 2 koduje peptyd sygnałowy, kodon startowy oraz kodony pierwszych trzech aminokwasów właściwego białka. Jedyny wyjątek stanowi białko *ENAM*, w którym również 2 ekson jest eksonem niekodującym. Ekson 3 kodujący białka SIBLING zwykle zawiera sekwencję (SSEE) odpowiedzialną za fosforylację przez kinazę kazeinową II, natomiast sekwencja eksonu 4 jest bogata w aminokwas prolinę (PPPP). Ostatni, najdłuższy ekson 5 zawiera drugą sekwencję odpowiedzialną za fosforylację z udziałem kinazy kazeinowej II, koduje największą część białka właściwego i zawsze zawiera sekwencję RGD wiążącą integryny [Fisher i wsp. 2003]. Pomimo, iż białka rodziny SIBLING posiadają zbliżoną sekwencję molekularną na poziomie DNA, to jednak znacząco różnią się właściwościami chemicznymi. *BSP*, *DMP1*, *DSPP* i *OPN* mają odczyn kwaśny, a ich punkt izoelektryczny przed modyfikacjami potranslacyjnymi wynosi od 3,4 do 4,3. *ENAM* jest białkiem obojętnym, podczas gdy *MEPE* wykazuje charakter silnie zasadowy z punktem izoelektrycznym równym 9,2 [Fisher i wsp. 2003]. Kwaśny charakter białka *BSP*

wynika z dużej zawartości reszt kwasu glutaminowego, podczas gdy pozostałe „kwaśne” białka rodziny SIBLING są bogate w kwas asparaginowy lub też posiadają zarówno reszty kwasu asparaginowego jak i glutaminowego [Fisher i wsp. 2003].

3.2.1.2.1. Białko macierzy zębiny 1 (DMP1)

Białko macierzy zębiny 1 zostało odkryte dzięki klonowaniu cDNA odontoblasta szczura i początkowo uważane było za specyficzne dla zębiny [George i wsp. 1993]. Następnie zostało zidentyfikowane w tkance kostnej [MacDougall i wsp. 1998] oraz w niewielkiej ilości również w wątrobie, mózgu, mięśniach, nerkach, trzustce i śliniankach [Hirst i wsp. 1997, Ogburke i wsp. 2004, Terasawa i wsp. 2004]. Jest ono zbudowane jest z dużej ilości reszt seryny (22%), kwasu glutaminowego (15%) i kwasu asparaginowego (13%), a punkt izoelektryczny postaci niefosforylowanej wynosi 4,15 [George i wsp. 1993]. DMP1 człowieka składa się z 451 aminokwasów, natomiast myszy z 473 aa., z czego 107 aminokwasów stanowi seryna, która w ponad połowie ulega fosforylacji podczas potranslacyjnych modyfikacji białka natywnego [George i wsp. 1993, Silvent i wsp. 2013]. Ta specyficzna budowa z dużą zawartością kwaśnych domen wskazuje na znaczącą rolę DMP1 w procesie nukleacji kryształów hydroksyapatytów oraz mineralizacji [George i wsp. 1993]. DMP1 zostało zidentyfikowane w zębinie i kości w czterech postaciach: (1) białko o pełnej długości, (2) fragment NH₂-końcowy 37 kDa, (3) fragment COOH-końcowy 57 kDa, (4) proteoglikan pochodzący z fragmentu NH₂-końcowego nazwany DMP1-PG [Huang i wsp. 2008, Maciejewska i wsp. 2009a, Silvent i wsp. 2013, Qin i wsp. 2003b]. DMP1-PG połączony jest z łańcuchem glikozaminoglikanów (GAG) zawierającym siarczan-4-chondroityny (C4S) poprzez dwupeptyd seryna-glicyna w pozycji 74-75 [Qin i wsp. 2006]. Sekwencja ta jest silnie konserwatywna u różnych gatunków, co może świadczyć, iż łańcuch GAG ma kluczowe znaczenie dla biologicznej funkcji tego białka [Qin i wsp. 2006]. Stosunek występowania w macierzy pozakomórkowej fragmentu NH₂-końcowego 37 kDa do

DMP1-PG wynosi 1:1 [Qin i wsp. 2006]. Qin i współautorzy badając DMP1 z kości szczura, zlokalizowali miejsca jego podziału na fragment NH₂-końcowy 37 kDa i fragment COOH-końcowy 57 kDa [Qin i wsp. 2003b]. Podczas modyfikacji potranslacyjnych podziałowi ulegają cztery wiązania peptydowe w pozycjach Phe173-Asp174, Ser180-Asp181, Ser217-Asp218 oraz Glu221-Asp222, co prowadzi do powstania czterech różnych fragmentów 37 kDa (najkrótszy zbudowany jest z 173 aminokwasów, a najdłuższy z 221) oraz czterech fragmentów 57 kDa (najkrótszy-252 aminokwasy, a najdłuższy 300) [Qin i wsp. 2003b]. Analizując miejsca podziałów stwierdzono, że wszystkie występują na NH₂-końcu reszty kwasu asparaginowego, a bezpośrednio po trzech z nich występuje motyw Asp-Asp. Pomimo, że jak dotąd nie dowiedziono która proteinaza odpowiedzialna jest za podział natywnego DMP1, to Qin i współautorzy przypuszczają, iż może to być ulegająca ekspresji głównie w kościach i zębach endopeptydaza kodowana przez *PHEX* (*phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on X chromosome*) [Qin i wsp. 2003b]. Martin i współautorzy postulują, iż endopeptydaza PHEX przyłącza się do DMP1 i w ten sposób ochrania domenę ASARM (*acidic serine-and aspartate-rich motif*) przed proteolizą. Ta krótka sekwencja znajduje się na COOH-końcu białka i ma działanie hamujące mineralizację [Martin i wsp. 2008].

Białka potomne DMP1 różnią się między sobą budową i dystrybucją w macierzy pozakomórkowej zębiny [Qin i wsp. 2003b]. Maciejewska i współautorzy zlokalizowali fragment NH₂-końcowy głównie w przębinnie, a fragment COOH-końcowy w zmineralizowanej zębinnie [Maciejewska i wsp. 2009b]. Biochemiczna analiza dowiodła istnienie dużej ilości DMP1-PG w przębinnie, podczas gdy zębina zmineralizowana zawierała głównie fragment COOH-końcowy [Maciejewska i wsp. 2009a]. Zróżnicowana budowa i występowanie dowodzą, że białka potomne natywnego DMP1 pełnią różne role w procesie mineralizacji zębiny. Badania *in vitro* wykazały, iż białko DMP1 o pełnej długości i fragment

COOH- końcowy stymulują nukleację kryształu hydroksyapatytu, podczas gdy fragment NH₂-końcowy może być zarówno promotorem [Gericke i wsp. 2010] jak i inhibitorem procesu mineralizacji [Gajjermann i wsp. 2007]. DMP1-PG sklasyfikowano jako inhibitor mineralizacji [Gericke i wsp. 2010]. Fragment COOH-końcowy pełni dodatkowo funkcję czynnika transkrypcyjnego w trakcie dojrzewania odontoblasta inicjując ekspresję *DSPP*. Tłumaczy się to faktem, iż fragment COOH- końcowy DMP1 posiada sekwencję NLS (*nuclear location sequence*) odpowiedzialną za transport tego białka do jądra komórkowego, gdzie przyłącza się on do promotora genu *DSPP*, zapoczątkowując ekspresję *DSPP* we wczesnych fazach rozwoju odontoblasta. Natomiast, w końcowych fazach różnicowania odontoblasta ekspresja *DSPP* jest niezależna od DMP1 [Narayanan i wsp. 2003,2006; Lu i wsp. 2007, Silvent i wsp. 2013].

3.2.1.2.2. Białko sialofosforowe zębiny (DSPP)

Białko sialofosforowe zębiny jest to nieaktywne białko prekursorowe, z którego po proteolitycznym podziale przez proteazy BMP1, MMP20 i MMP2 [Yamakoshi i wsp. 2006, Yamakoshi 2009] powstają trzy biologicznie aktywne białka potomne: – białko sialowe zębiny (DSP) zbudowane z NH₂-końca białka macierzystego DSPP, – białko fosforowe zębiny (DPP) odpowiadające odcinkowi COOH-końca DSPP oraz forma proteoglikanu (DGP) zawarta w sekwencji pośredniej pomiędzy DSP i DPP [Huang i wsp. 2008, Yamakoshi i wsp. 2005b, 2008; Yamakoshi 2008, 2009]. Białka DSP i DPP występują obficie w macierzy pozakomórkowej zębiny, podczas gdy DSPP w formie natywnej została jak dotąd w śladowej ilości wykryta w przestrzeni zewnątrzkomórkowej odontoblasta jedynie przez zespół Qin [Sun i wsp. 2010]. Forma natywna białka DSPP wykazuje różnice pomiędzy gatunkami [Prasad i wsp. 2010]. U człowieka DSPP składa się z 1301 aminokwasów, natomiast u szczura i myszy DSPP zbudowana jest odpowiednio z 970 i 945 aminokwasów [Gu i wsp. 2000, MacDougall i wsp. 1997, Ritchie i wsp. 2001, Prasad i wsp. 2010]. Pomimo,

iż cała sekwencja DSPP człowieka jest najdłuższa pomiędzy gatunkami, to długość fragmentu odpowiadająca DSP jest prawie identyczna u trzech gatunków i wynosi odpowiednio: u człowieka 462 aa., szczura 447 aa., myszy 451 aa. [Prasad i wsp. 2010]. Odmienne fragment DPP, jest dłuższy u człowieka 839 aa. niż u szczura 523 aa. lub myszy 494 aa. [Prasad i wsp. 2010]. DPP i DSP różnią się od siebie właściwościami chemicznymi oraz lokalizacją i natężeniem ekspresji. Stosunek ilościowy mierzony stężeniem molowym DPP do DSP w zmineralizowanej zębiny wynosi 10:1 [Prasad i wsp. 2010]. W formie natywnej DSPP wyróżniamy również hydrofobowy peptyd sygnałowy, obecny w NH₂-końcowej części DSPP, który odpowiada za kierowanie natywnego białka DSPP do retikulum endoplazmatycznego i składa się z 17 reszt aminokwasowych u szczura i myszy oraz 15 reszt aminokwasowych u człowieka [Prasad i wsp. 2010]. Kolejne, po peptydzie sygnałowym aminokwasy w sekwencji DSPP budują białko DSP, które po modyfikacjach potranslacyjnych jest proteoglikanem posiadającym łańcuch GAG zbudowany z siarczanu-6-chondroityny [Yamakoshi i wsp. 2005a]. DSP występuje w dwóch formach: – białko nieglikozylowanego i proteoglikanu DSP-PG [Huang i wsp. 2008, Zhu i wsp. 2010]. COOH-końcowy fragment DSPP, obejmujący sekwencję białka DPP zawiera wielokrotnie (200-krotnie) powtarzającą się sekwencję reszt Asp-Ser-Ser (DSS) oraz Asp-Ser (DS), co sprawia, że jest to białko hydrofilne o silnie kwaśnym charakterze [Yamakoshi 2008, 2009]. Sekwencja białka DSPP w czterech rejonach jest silnie „konserwatywna” co oznacza, że wykazuje wysoki stopień podobieństwa u myszy, szczura i człowieka [Prasad i wsp. 2010]. W DSPP myszy pierwszy obszar konwergencji występuje pomiędzy 1 a 28 resztą aminokwasową i obejmuje peptyd sygnałowy i NH₂-końcową część białka natywnego. Drugi obszar konwergencji znajduje się pomiędzy 117 a 147 resztą aminokwasową, a jego rola jak dotąd nie została jednoznacznie określona. Natomiast, obszar trzeci obejmuje aminokwasy pomiędzy 222 a 257, gdzie reszty seryny w motywach Ser-Gly (SG) są miejscami

przyłączenia bocznych łańcuchów glikozaminoglikanów (GAG) stąd nazwano je domeną GAG. Ostatni, czwarty region podobieństwa występuje pomiędzy 426 a 462 resztą aminokwasową i obejmuje COOH- końcowe białka potomnego DSP oraz NH₂-końcowe białka potomnego DPP; dokładnie jest to domena łącząca dwa białka potomne DSP i DPP [Prasad i wsp.2010]. Niezwykle istotnym pozostaje fakt, iż potencjalna mutacja w pozycji 452 polegająca na zamianie Asp → Ala blokuje proteolityczny podział natywnego białka DSPP u myszy nie pozwalając tym samym na proteolityczny podział DSPP i hamując funkcję obu białek potomnych DSP i DPP [Sun i wsp. 2010]. Sugeruje to, iż wiązanie peptydowe w pozycji Asp 452 części NH₂-końcowej w DSPP jest kluczowe w rozpoczęciu podziału natywnego białka [Sun i wsp. 2009, 2010]. U człowieka kluczowym dla podziału DSPP jest Asp w pozycji 463 [Sun i wsp. 2009, 2010].

3.2.1.2.3. Proteolityczny podział białka DSPP

DSPP w formie natywnej, reprezentującej całą sekwencję aminokwasów po raz pierwszy została wyizolowana z macierzy pozakomórkowej zębiny myszy przez zespół badawczy Qin [Sun i wsp. 2010]. Po syntezie, DSPP bardzo szybko ulega podziałowi na DSP, DSP-PG oraz DPP z udziałem BMP-1 i MEP1A [Steiglitz i wsp. 2004, Tsuchiya i wsp. 2011, Yamakoshi 2009]. Kolejno, DSP oraz DSP-PG ulegają degradacji z udziałem MMP 20, natomiast mechanizm rozpadu DPP *in vivo* nie został jeszcze poznany z wyjątkiem obserwacji Tsuchiya i wsp., którzy udowodnili, iż MEP 1B przystępuje do degradacji DPP proporcjonalnie do spadającego stężenia wolnych jonów wapniowych [Tsuchiya i wsp. 2011].

3.2.1.2.4. Występowanie białka DSPP

Białka potomne DSPP, DSP, DSP-PG oraz DPP występują głównie w zębinie lecz ich obecność została również wykryta w kościach [Qin i wsp. 2002], cemencie korzeniowym [Baba i wsp. 2004] i niektórych tkankach miękkich jak: ślinianki, chrząstka, wątroba i nerki

[Ogburke i wsp. 2004, 2007; Prasad i wsp. 2011]. W kości poziom ekspresji DSPP jest 400 – krotnie niższy niż w zębiny [Butler i wsp. 2003, Qin i wsp. 2002].

DPP występuje w macierzy pozakomórkowej i powiązana jest z nieorganiczną fazą zębiny (tzn. kryształami hydroksyapatytu). Weinstock i Leblond wykazali, iż DPP powstaje w odontoblastach i wydzielane jest na froncie mineralizacji przez wypustkę Tomesa [Weinstock i wsp. 1973]. MacDougall i współpracownicy badając DPP myszy odkryli, że DPP jest zlokalizowana w odontoblastach, wypustkach odontoblastów i nowo utworzonej zmineralizowanej zębiny, lecz nie w przębiny [MacDougall i wsp. 1985]. Wnioski te potwierdzili Rabie i Veis dowodząc, że u szczura DPP jest transportowana przez wypustki odontoblastów do frontu mineralizacji [Rabie i wsp. 1995]. Badania porównawcze lokalizacji białek potomnych pochodzących z DSPP prowadzone przez Huang i wsp. wykazały, że obie formy białka DSP (DSP i DSP-PG) są obecne głównie w przębiny i nie są związane z kryształami hydroksyapatytu, natomiast DPP została wykryta w fazie mineralnej wykazując silne wiązanie z kryształami hydroksyapatytu [Huang i wsp. 2008]. Wyłączna obecność DSP-PG w przębiny może wskazywać, iż znaczna część lub całość DSP-PG może ulegać degradacji przed całkowitą mineralizacją skutkującą zamianą przębiny w zębiny [Huang i wsp. 2008]. W oparciu o badania Qin i wsp. wywnioskowano, że DSPP ulega podziałowi wewnątrzkomórkowo w odontoblastach, a następnie DSP i DPP są wydzielane w okolicy frontu mineralizacji do przębiny, gdzie DSP-PG ulega względnie szybkiej degradacji, a DPP zostaje włączona w strukturę przestrzenną tworzących się kryształów minerału [Prasad i wsp. 2010]. Dodatkowo badania immunohistochemiczne wykazały przejściowe występowanie DSPP w preameloblastach [Bègue-Kirn i wsp. 1998], co może wskazywać na funkcję DSPP we wczesnych etapach amelogenezy, a w szczególności na formowanie połączenia szkliwno-zębinowego i powstawanie przylegającego do tej granicy tzw. „apryzmatycznego” szkliwa [Paine i wsp. 2005].

3.2.1.2.5. Białko sialowe zębiny (DSP)

Białko sialowe zębiny zostało odkryte przez Butlera i współpracowników [Butler i wsp. 1981] i jest drugim najczęściej występującym niekolagenowym białkiem organicznej macierzy zębiny, a jego zawartość stanowi 5-8% wszystkich białek budujących zębiny [MacDougall i wsp. 1997, Qin i wsp. 2003a, Qin i wsp. 2004]. DSP zawiera 29,6% reszt węglowodanowych i 9% kwasu sialowego oraz glutaminę, asparaginę, serynę i glicynę [Butler i wsp. 1992, MacDougall i wsp. 1997, Yamakoshi 2008]. DSP w formie proteoglikanu jest zarówno O- jak i N-glikozylowany i składa się z rdzenia białkowego oraz dwóch łańcuchów siarczanu chondroityny [Butler i wsp. 1992, Yamakoshi i wsp. 2005a]. Masa cząsteczkowa DSP szczura zmierzona metodą analizy sedymentacyjnej wynosi 52,57 kDa [Butler i wsp. 1992]. Jednakże szczegółowa analiza wykazała występowanie DSP o wysokiej masie cząsteczkowej (HMW-DSP) równej 95 kDa [Qin i wsp. 2003a, Butler i wsp. 1981]. HMW-DSP jest formą proteoglikanu DSP nazwaną DSP-PG [Zhu i wsp. 2010]. U różnych gatunków DSP wykazuje odmienną strukturę przestrzenną i różni się masą cząsteczkową [Qin i wsp. 2004, Yamakoshi i wsp. 2005a, Butler i wsp. 1981, Sugars i wsp. 2006], co jest skutkiem nie tylko występowania dwóch postaci: DSP i DSP-PG, ale również zdolności DSP do tworzenia dimerów [Qin i wsp. 2004, Sugars i wsp. 2006, Yamakoshi i wsp. 2005a]. Yamakoshi w swoich badaniach *in vivo* u świni wykazał, iż z podziału proteolitycznego jako pierwszy uwalniany jest DPP z COOH-końcowej części białka DSPP [Yamakoshi 2008, 2009]. Następny podział uwalnia DGP lub rozszerzony DGP z COOH-końcowej części DSP-DGP. COOH-końcowa część DSP różni się w zależności od miejsca podziału. Głównym miejscem podziału jest wiązanie przy Arg w pozycji 391 [Yamakoshi i wsp. 2005a, 2005b]. DSP świni składa się z 376 aminokwasów od Ile16 do Arg 391. Proteolityczny podział DSPP świni generuje nie tylko powstanie trzech produktów, którymi są DSP, DGP (obecny jedynie u świni) i DPP, lecz oprócz tych domen istnieją również niezbyt stabilne formy pośrednie,

które są produktami zewnątrzkomórkowej degradacji DSPP [Yamakoshi 2008, 2009]. Jednak do dzisiaj nie udało się precyzyjnie ustalić czy ten sam schemat funkcjonuje u człowieka. Bardzo ważnym elementem DSP są potencjalne miejsca potranslacyjnych modyfikacji. Omawiane już badania Yamakoshi wykazały, że DSP u świń ma sześć miejsc N-glikozylacji, trzy O-glikozylacji oraz dwa miejsca przyłączania siarczanu-6-chondroityny [Yamakoshi 2008].

3.2.1.2.6. Białko fosforowe zębiny (DPP)

Białko fosforowe zębiny nazywane również fosforyną (PP) zostało odkryte przez Veis'a i współpracowników i stanowi około 50% niekolagenowych białek organicznej macierzy zębiny [Dickinson i wsp. 1975, MacDougall i wsp. 1985]. Charakterystyczną cechą DPP jest wysoka zawartość reszt kwasu asparaginowego i seryny (około reszt 155 Asp i 310 reszt Ser), przy czym blisko połowa seryny ulega fosforylacji [Butler i wsp. 1983, Yamakoshi i wsp. 2008, Yamakoshi 2009]. Wysoka zawartość Asp i fosfoseryny (p-Ser) powoduje, że jest to najbardziej kwaśne białko jakie odkryto w ludzkim organizmie, a jego punkt izoelektryczny wynosi około 1,1 [Jonsson i wsp. 1978]. Butler i współpracownicy wykazali, że DPP szczura występuje w trzech różnych formach w zależności od stopnia fosforylacji; jest to DPP wysokofosforylowana (HP), średniofosforylowana (MP) oraz niskofosforylowana (LP) [Butler i wsp. 1983]. Występowanie tych trzech form DPP o różnym stopniu fosforylacji nie zostało potwierdzone u innych ssaków [Yamakoshi 2008]. Kwas asparaginowy i fosfoseryna występują głównie w powtarzającej się sekwencji (Asp-p-Ser-p-Ser)_n oraz (Asp- p-Ser)_n [Gu i wsp. 2000, MacDougall i wsp. 1997, Ritchie i wsp. 2001]. Wizualizacje komputerowe przedstawiają powyższe powtarzające się sekwencje jako długie konstrukcje szkieletowe w postaci grzebieni zbudowanych z grup karboksylowych i fosforanowych, zlokalizowanych zewnętrznie w stosunku głównego łańcucha białkowego [George i wsp. 1996]. Ten typ struktury odpowiada potencjalnej funkcji DPP, którą jest

nukleacja kryształu hydroksyapatytów, co wiąże się z wiązaniem jonów wapnia w sposób ściśle zorganizowany [Prasad i wsp. 2010]. Długość DPP różni się u poszczególnych gatunków, a masa cząsteczkowa DPP wynosi od 100 kDa u szczurów, bydła i świni do 140 kDa u człowieka [Butler i wsp. 1983, Chang i wsp. 1996]. Pierwsze cztery aminokwasy DPP szczura to sekwencja: Asp 448-Asp-Pro-Asn 451 i jest ona identyczna u bydła [Huq i wsp. 2000, 2005], świni [Yamakoshi i wsp. 2003] i człowieka [Gu i wsp. 2000]. Pierwszy aminokwas DPP - Asp w pozycji 448 u szczura odpowiada Asp 452 u myszy, Asp 473 u świni oraz Asp 463 u człowieka [Prasad i wsp. 2010]. Yamakoshi i wsp. odkryli, iż DPP różni się długością również w obrębie jednego gatunku, jednak opisane cztery warianty długości obszaru repetytywnego nie miały wpływu na funkcję DPP i zostały uznane za efekt polimorfizmu genu *DSPP* [Yamakoshi i wsp. 2008].

3.2.1.2.7. Rola DSP i DPP w mineralizacji zębiny

Analiza biochemiczna białka DSPP wskazuje na jego istotną rolę w procesie mineralizacji zębiny [Yamakoshi 2008, 2009]. Natomiast skrajna odmienność cech i właściwości DSP i DPP sugeruje, iż pełnią one różne funkcje w procesie mineralizacji [Prasad i wsp. 2010].

Funkcja DSP jak dotąd nie została precyzyjnie określona, jednak badania *in vitro* nad samoistną nukleacją kryształu hydroksyapatytów na powierzchni DSP wykazały niskie powinowactwo oraz ograniczony wpływ na formowanie i wzrost hydroksyapatytów [Boskey i wsp. 2000]. Uważa się, iż DSP pełni rolę białka regulatorowego (tzw. cząsteczki sygnalizacyjnej) w procesie mineralizacji zębiny [Boskey i wsp. 2000]. DSP może ułatwiać zapoczątkowanie formowania kryształu hydroksyapatytu wewnątrz lub wzdłuż włókien kolagenowych prowadząc do przekształcenia przębiny w zębinę na froncie mineralizacji [Milan i wsp. 2004, Suzuki i wsp. 2009]. W ostatnich latach została wyizolowana i opisana postać proteoglikanu DSP (DSP-PG) [Qin i wsp. 2003a, Yamakoshi i wsp. 2005a]. W

macierzy pozakomórkowej zębiny szczurów DSP-PG występuje w większej ilości niż DSP [Qin i wsp. 2003a, Yamakoshi i wsp. 2005a], co sugeruje, że jest to forma aktywna białka DSP, podczas gdy nieglikozylowana forma DSP jest produktem degradacji DSP-PG [Prasad i wsp. 2010].

Powszechnie uważa się, że białko fosforowe zębiny jest bezpośrednio związane z nukleacją i wzrostem kryształu minerału [Dickinson i wsp. 1975, Veis i wsp. 1967]. Dzięki dużej zawartości kwasu asparaginowego i ufosforylowanej seryny DPP posiada silne powinowactwo do wiązania jonów wapnia [Zanetti i wsp. 1981]. W obecności jonów wapnia i magnezu DPP tworzy nierozpuszczalne kuliste skupiska [Marsh 1989]. Wysokofosforylowana postać DPP przy pH 7,4-8,0 może przyłączyć maksymalnie 1,33 jonu wapnia lub 1,07 jonu magnezu przypadających na jedną resztę fosforanową [Marsh 1989]. Uważa się, iż to białko o dużym powinowactwie do jonów wapnia, przyłącza się do włókien kolagenowych typu I i tworzy trójwymiarową strukturę reszt fosforanowych i karboksylowych zapoczątkowującą nukleację i wzrost kryształu hydroksyapatytów zębiny [Stetler-Stevenson i wsp. 1986]. Liczne badania wykazały, że po syntezie i wydzieleniu przez dojrzałe odontoblasty, DPP jest transportowany do frontu mineralizacji [MacDougall i wsp. 1985, Weinstock i wsp. 1973, Yamakoshi 2008]. Podczas postępu mineralizacji najbardziej zewnętrzne warstwy przębiny ulegają mineralizacji dlatego kryształy hydroksyapatytu wzrastają w ściśle określonym kierunku, gdyż DPP w dużym stężeniu i inne białka spowalniają wzrost kryształu hydroksyapatytów zębiny modulują tym samym ich kształt i wielkość [Butler i wsp. 2003].

3.3. Struktura genu kodującego białko DSPP

Badania genetyczne nad strukturą genomu człowieka wykazały, że istnieje jeden gen kodujący białko DSPP i jest on zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 4 w pozycji 22.1 (4q22.1). Gen *DSPP* składa się z 8331 par zasad i kończy się sekwencją ATTAAA.

Zarówno cała sekwencja genu *DSPP*, jak i sekwencje kodujące odpowiednio DSP i DPP zostały dokładnie określone [Gu i wsp. 2000]. Sekwencja kodująca DSP znajduje się na końcu 5' transkryptu *DSPP*, natomiast sekwencja kodująca DPP odpowiednio na końcu 3' [Gu i wsp. 2000, MacDougall i wsp. 1997]. Analiza porównawcza sekwencji genu *DSPP* pomiędzy gatunkami wykazała wysoki stopień konserwatyzmu gryzoni i człowieka [Gu i wsp. 2000, MacDougall i wsp. 1997, Ritchie i wsp. 2001]. Sekwencja *DSPP* składa się z 5 eksonów i 4 intronów. Eksony 2-4 kodują białko DSP, natomiast w eksonie 5 zakodowana jest COOH-końcowa część białka DSP oraz cała sekwencja białka DPP [Gu i wsp. 2000, Ritchie i wsp. 2001, Fisher i wsp. 2003]. Ekson 1 liczący 92 nukleotydy zawiera sekwencję niekodującą, natomiast składający się z nukleotydów 93-171 ekson 2 zawiera miejsce rozpoczęcia transkrypcji, koduje sekwencję peptydu sygnałowego (nt.121-165) i sekwencję trzech pierwszych aminokwasów NH₂-końca białka DSP. Eksony 3 (nt.166-255) i 4 (nt. 256-1242) kodują sekwencję białka DSP, a w eksonie 5 (nt.1243-4331) zakodowana jest pozostała część sekwencji białka DSP (nt.1243-1506) oraz cała sekwencja białka DPP (nt. 1507-4023). Pozostałe nukleotydy (nt.4024-4331) kodują 3'UTR, który jest częścią mRNA nieulegającą translacji [Fisher i wsp. 2003, Prasad i wsp. 2010]. Rejon 3' UTR pomimo, iż nie koduje sekwencji białka, zawiera tzw. sekwencje sygnałowe regulujące między innymi stabilność biochemiczną transkryptów mRNA [Barreau i wsp. 2006], wpływające na położenie mRNA w komórce, regulujące proces translacji, adenyacji oraz miejsca wiązania miRNA [Hesketh 2004, Mazumder i wsp. 2005, Ara i wsp. 2006, Yang i wsp. 2005].

Restrykcyjna rejonizacja ekspresji genu *DSPP* ograniczona głównie do zębiny, a w niewielkiej ilości do tkanki kostnej i innych tkanek miękkich takich jak gruczoły ślinowe, nerki, mózg, wątroba i chrząstka [Ogburke i wsp. 2004, 2007, Qin i wsp. 2002, Prasad i wsp. 2011] pozwala przypuszczać, iż transkrypcja *DSPP* podlega precyzyjnym mechanizmom regulacyjnym odmiennym w zębinie, kości lub innych tkankach [Chen S. i wsp. 2005].

Analiza genu *DSPP* u myszy wykonana przez Fenga i wsp. dowiodła występowania kilku sekwencji wzmacniających i wyciszających w rejonie –1447 par zasad od miejsca rozpoczęcia transkrypcji [Feng i wsp. 1998]. Silna sekwencja promotorowa została odkryta w rejonie –95 pary zasad końca 5'*DSPP*, a dwie słabsze sekwencje wzmacniające zidentyfikowano w rejonach pomiędzy –1447 oraz –791. Z kolei sekwencje wyciszające odkryto w rejonie pomiędzy –791 i –95 parą zasad [Feng i wsp. 1998]. Badania te potwierdził Chen ze współpracownikami wykazując, iż najsilniejsza aktywność promotora w mysim genie *DSPP* znajduje się pomiędzy –97 i +54 parą zasad, a dwie potencjalne sekwencje wzmacniające istnieją odpowiednio pomiędzy –1243 i –792 oraz –791 i –242 parą zasad [Chen S. i wsp. 2004]. Odnotowano również sekwencję wyciszającą pomiędzy –241 i –98 pz [Chen S. i wsp. 2004]. Te same badania wykazały, że sekwencja CCAAT wiążąca czynnik CBF (znany również jako NF-Y i CP1) działa wzmacniająco i przyłącza się do sekwencji *DSPP* w miejscu nazwanym DE1, zlokalizowanym pomiędzy –97 i –74 parą zasad. Zidentyfikowano również białko DF2 (72kDa), które przyłączając się w miejscu nazwanym DE2 znajdującym się pomiędzy –127 i –95 parą zasad hamuje ekspresję *DSPP* [Chen S. i wsp. 2004].

Powstawanie i rozwój zębiny jest złożonym procesem, w którym krzyżuje się wiele ścieżek sygnalizacyjnych aktywnych w procesach biomineralizacji i jest kontrolowany przez szereg czynników wzrostu i czynników transkrypcyjnych. Jednym z najważniejszych jest czynnik transkrypcyjny Runx2, który zaangażowany jest w aktywację transkrypcji genów kodujących białka biorące udział w dojrzewaniu odontoblasta [Chen S. i wsp. 2005, 2009]. Odnotowano, iż Runx2 powoduje przyspieszenie ekspresji *DSPP* we wczesnym okresie dojrzewania komórek zębinotwórczych, natomiast hamuje ekspresję *DSPP* w dojrzałych odontoblastach [Chen S. i wsp. 2005]. Ostatnie badania Napierały i wsp. nad genem *Trps1* u myszy wykazały, że wysoki poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego *Trps1* w

odontoblastach prowadzi do dramatycznego spadku ekspresji *DSPP*, co wynika z bezpośredniego hamowania promotora *DSPP* [Napierala i wsp. 2012]. Szczegółowa analiza potwierdziła silną ekspresję czynnika *Trps1* w preodontoblastach, natomiast gwałtowny spadek jego ekspresji w dojrzałych odontoblastach wskazując jednocześnie, iż *Trps1* jest kolejnym odkrytym czynnikiem transkrypcyjnym ulegającym ekspresji wcześniej w ścieżce sygnalizacyjnej *DSPP* i bezpośrednio regulującym ekspresję *DSPP* [Napierala i wsp. 2012]. Kolejnym poznany czynnikiem regulacji ekspresji genu *DSPP* jest białko morfogenetyczne kości 2 (BMP2). Ta cząsteczka sygnalizacyjna odgrywa ważną rolę w sygnałowaniu w trakcie rozwoju odontoblasta. Badania Chen i współpracowników dowodzą, że BMP2 stymuluje poziom ekspresji *DSPP*, co wykazano badaniem aktywności lucyferazy w plazmidzie zawierającym sekwencję promotora *DSPP* obejmującą nt. 72 – 97 sekwencji genu *DSPP* [Chen S. i wsp. 2008]. Sygnalizacja BMP2 wymaga współdziałania heterotrimeru czynnika NF-Y (czynnik jądrowy Y), a odbywa się poprzez odwróconą sekwencję CCAAT [Chen S. i wsp. 2008]. BMP2 pobudza akumulację NF-Y w jądrze komórkowym zwiększając jego rekrutację do sekwencji promotorowej *DSPP in vivo* [Chen S. i wsp. 2008]. Wymuszona nadekspresja NF-Y zwiększa zarówno poziom ekspresji transkryptu jak i biosyntezy białka *DSPP*; Natomiast mutacje w miejscu wiązania czynnika NF-Y powodują znaczne zahamowanie ekspresji genu *DSPP* w preodontoblastach [Chen S. i wsp. 2008]. Dodatkowo, stwierdzono, iż antagonistą BMP2 – Noggin powoduje znaczne zahamowanie ekspresji genu *DSPP* w preodontoblastach [Chen S. i wsp. 2008]. Niezwykle ciekawym wydaje się fakt regulacji ekspresji genu *DSPP* przez inne niekolagenowe białko z rodziny SIBLING – DMP1 [Ye i wsp. 2004]. Badania Narayanana udowodniły, że COOH–końcowe białko DMP1 tzw. fragment 57 kDa w okresie rozwojowym wędruje do jądra komórkowego odontoblasta szczura gdzie pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego przyłączając się do sekwencji

promotora *DSPP* w pozycji – 450 i aktywując tym samym transkrypcję genu *DSPP* [Narayanan i wsp. 2006].

3.3.1. Mutacje w sekwencji genu kodującego białko DSPP

Na podstawie dotychczasowych doniesień naukowych opisujących skrupulatną analizę molekularną genu *DSPP* u osób prezentujących fenotyp *dentinogenesis imperfecta* typu II/III i \lub dysplazji zębiny typu II udało się powiązać jedynie mutacje w genie *DSPP* jako przyczynę wystąpienia tego fenotypu [Hart i wsp. 2007]. Do tej pory opisano ponad 30 takich mutacji [Hart i wsp. 2007, Kida i wsp. 2009, Kim i wsp. 2007, Lee SK. i wsp. 2011, MacDougall i wsp. 2006, Nieminen i wsp. 2011, Maciejewska i wsp. 2012, Rajpar i wsp. 2002], jednakże niektóre z nich nie skutkują powstaniem fenotypu [McKnight i wsp. 2008b, Nieminen i wsp. 2011, Maciejewska i wsp. 2012]. Te ostatnie nazywane są mutacjami cichymi i najczęściej dotyczą zamiany trzeciego nukleotydu w kodonie, która ze względu na degenerację kodu genetycznego nie skutkuje zmianą kodowanego aminokwasu. Niezwykle istotnym jest również fakt obecności w sekwencji genu *DSPP* mutacji ilościowych insercji i\lub delecji bez przesunięcia ramki odczytu, co zdarza się bardzo często szczególnie w części repetytywnych powtórzeń DSS zlokalizowanej w sekwencji kodującej białko DPP [Nieminen i wsp. 2011]. Wskazuje to na wysoki stopień polimorfizmu genu *DSPP* [Bai i wsp. 2010, Kim i wsp. 2007, Song i wsp. 2006].

Mutacje genu *DSPP* podzielono arbitralnie na trzy grupy dotyczącą sekwencji kodującej: – peptyd sygnałowy, – DSP oraz – DPP. Interesującym pozostaje fakt, iż mutacje typu zmiana sensu i mutacje nonsensowne o charakterze transwersji i\lub tranzycji występują głównie w sekwencjach kodujących peptyd sygnałowy i białko DSP, natomiast mutacje w sekwencjach kodujących białko DPP mogą mieć zarówno charakter jakościowy (tranzycje, transwersje) i\lub ilościowy (insercje/delecje) skutkujące przesunięciem ramki odczytu [Kida

i wsp. 2009, Lee KE. i wsp. 2011, Maciejewska i wsp. 2012, Nieminen i wsp. 2011, Rajpar i wsp. 2002].

3.3.1.1. Mutacje sekwencji kodującej peptyd sygnałowy

Dotychczas, opisano dwa rodzaje mutacji dotyczących sekwencji kodującej peptyd sygnałowy. W obu przypadkach były to mutacje typu zmiany sensu. Pierwsza mutacja skutkowała fenotypem dysplazji zębiny i polegała na transwersji nukleotydu 16 T>G w eksonie 2, czego efektem była substytucja tyrozyny na kwas asparaginowy w kodonie 6 (Y6 D) peptydu sygnałowego [Rajpar i wsp. 2002]. Drugą mutację opisano w kodonie sygnałowym w pozycji c. 15 (C>T). Ta mutacja powodowała zamianę alaniny w walinę (A 6 V) [Malmgren i wsp. 2004].

3.3.1.2. Mutacje sekwencji kodującej białko sialowe zębiny

Kolejne dotychczas wykryte mutacje dotyczą sekwencji kodującej DSP. Wykazano obecność mutacji o charakterze transwersji C>A w eksonie 2 pozycji c.49 . Efektem jest zamiana aminokwasu proliny na treoninę (P 17 T) [Hart i wsp. 2007, Zhang i wsp. 2007]. W tej samej pozycji c.49 opisano również tranzycję C>T skutkującą zamianą proliny na serynę (P 17S) [Hart i wsp. 2007, Xiao i wsp. 2001, Zhang i wsp. 2007]. Kolejno, w eksonie 2, w pozycji c.52 opisano transwersję G>T skutkującą zamianą waliny na fenyloalaninę (V 18F) [Holappa i wsp. 2006, Kim i wsp. 2005, Song i wsp. 2006, Xiao i wsp. 2001].

Następną mutację w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP odkryto w eksonie 3 w pozycji c.133 i polegała ona na tranzycji C>T typu nonsens skutkującą zamianą glutaminy w kodon stop (Q45stop) [Zhang i wsp. 2001]. Efektem tej mutacji jest przedwczesne zakończenie procesu translacji, a powstające białko DSP ma istotnie skróconą sekwencję, natomiast białko DPP nie powstaje w ogóle [Song i wsp. 2006]. W efekcie tej mutacji w przestrzeni zewnątrzkomórkowej odontoblasta nie występuje białko DPP, co istotnie zaburza

nukleację kryształów minerału i skutkuje dramatycznym spadkiem stopnia mineralizacji zębiny. Kolejną mutacją w sekwencji DSP zaobserwowano w pozycji c.135. Była to tranzycja G>A w miejscu GT intronu 3 gdzie następuje składanie transkryptu (splicing). Efektem tej mutacji jest tzw. wypadnięcie eksonu 3 [Xiao i wsp. 2001]. Podobny efekt daje transwersja G>T w pozycji c.135 [McKnight i wsp. 2008b], przy czym w tym przypadku następuje utrata części akceptorowej po stronie 5' eksonu 4 przy równoczesnym braku alternatywnej sekwencji akceptorowej na odcinku 50 kolejnych nukleotydów. Obie opisane mutacje oraz inne skutkujące utratą eksonu 3, klinicznie manifestują się fenotypem DGI typu II [Bai i wsp. 2010, Kim i wsp. 2004, McKnight i wsp. 2008b, Xiao i wsp. 2001].

3.3.1.3. Mutacje sekwencji kodującej białko fosforowe zębiny

Mutacje genu *DSPP* w obszarze kodującym białko DPP są również przyczyną występowania fenotypu *dentinogenesis imperfecta* II/III oraz dysplazji zębiny typu II [McKnight i wsp. 2008b, Maciejewska i wsp. 2012]. Charakterystyczną cechą jest znacząco częstsze występowanie w tym rejonie aranżacji genowych typu delecji i/lub insercji skutkujących przesunięciem ramki odczytu [Dong i wsp. 2005, Holappa i wsp. 2006, Lee KE. i wsp. 2011, McKnight i wsp. 2008a, Nieminen i wsp. 2011]. McKnight i wsp. opisali 5 odmiennych mutacji skutkujących przesunięciem ramki odczytu, które spowodowały zmiany w obszarze repetytywnym genu *DSPP* [McKnight i wsp. 2008a, 2008b]. W konsekwencji powstała długa sekwencja aminokwasowa (około 500 do 600) zbudowana z aminokwasów hydrofobowych, głównie alaniny, waliny i izoleucyny. Probandzi dotknięci taką mutacją prezentowali fenotyp DGI II oraz DD II, jednakże zamiana dłuższej sekwencji aminokwasowej (600 lub więcej) skutkowałą łagodniejszą formą dysplazji zębiny, podczas gdy zamiana krótszej sekwencji aminokwasowej (500 aa) prowadziła do powstania cech klinicznych *dentinogenesis imperfecta* typu II. Autorzy uważają, iż zjawisko to może być związane z polimorfizmem genów oraz występowaniem haplotypów [McKnight i wsp. 2008a,

2008b]. Występowanie fenotypu związane jest z aktywnością dominującego allele, który może być zmutowany lub zdrowy [McKnight i wsp. 2008a, 2008b]. Ostatnie badania von Marschall i wsp. dowodzą, iż mutacje z przesunięciem ramki odczytu końca 3' kodującego repetytywną domenę, wiążącą jony wapnia spowodowane są przez zatrzymanie zmutowanego białka przez błony szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, co równocześnie wpływa na wewnątrzkomórkowy transport białka o prawidłowej budowie [von Marschall i wsp. 2012].

4. CEL PRACY

Celem pracy jest określenie zmienności sekwencji genu *DSPP* kodującego białko sialofosforowe zębiny poprzez określenie mutacji oraz zmian o charakterze polimorfizmu w populacji osób z rozpoznaniem klinicznym i radiologicznym *dentinogenesis imperfecta* typu II oraz dysplazji zębiny typu II oraz analiza porównawcza z grupą kontrolną pochodzącą z populacji polskiej i sekwencją referencyjną (ENSG00000152991) oraz danymi zgromadzonymi w bazie ludzkiego genomu Ensembl.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Porównanie częstości występowania mutacji zmieniających sens oraz zmian o charakterze polimorfizmu typu SNP i polimorfizmu jakościowego (insercji/delecji) w genie *DSPP* w rejonach kodujących białko DSP oraz DPP.
2. Zweryfikowanie czy w genie *DSPP* w grupie osób z rozpoznaniem klinicznym i radiologicznym *dentinogenesis imperfecta* typu II oraz dysplazji zębiny typu II istnieją mutacje przyczynowe wystąpienia fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II lub dysplazji zębiny typu II.
3. Określenie w grupie osób chorych oraz zdrowych obecności mutacji w genie *DSPP* uznanych za rzadką wariację genetyczną specyficzną dla danej populacji określaną jako polimorfizm lokalny.

5. MATERIAŁ I METODY

5.1. Materiał badawczy

Badaniem objęto 10 osób (grupa doświadczalna) obojga płci w wieku od 8 do 60 lat pochodzących z terenu Polski, u których stomatologiczne badanie kliniczne potwierdziło występowanie cech fenotypowych *dentinogenesis imperfecta* typu II i\lub III i\lub dysplazji zębiny typu II. Materiał stanowiło DNA wyizolowane z komórek nabłonka jamy ustnej probantów. Pozyskanie materiału genetycznego polegało na pobraniu wymazów na jałowe wymazówki i poprzedzone było badaniem przedmiotowym i podmiotowym. Wszystkich badanych poinformowano, iż są to nieinwazyjne i niebolesne metody badawcze oraz, że w żaden sposób nie wpływają negatywnie na stan zdrowia. W każdym przypadku otrzymano pisemną zgodę probanta lub opiekuna prawnego na pobranie i analizę materiału genetycznego.

Grupę kontrolną stanowiło 30 niespokrewnionych osób obojga płci wieku od 20 do 57 lat pochodzących z terenu Polski. Każda z tych osób została poddana stomatologicznemu badaniu klinicznemu, które wykluczyło występowanie cech fenotypowych *dentinogenesis imperfecta* typu II i\lub III oraz dysplazji zębiny typu II.

Badanie otrzymało zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego NKEBN/164/2011.

5.2. Izolacja DNA

DNA uzyskane z wymazów poddano izolacji organiczną metodą standardową według Sambrook i współautorów [Sambrook i wsp. 1989]. W zakręcaniej probówce o pojemności 2 mL umieszczano materiał badawczy, do którego dodawano 313 μ L buforu ekstrakcyjnego TE (200 mL dejonizowanej wody, 40 μ L 0,5 M EDTA, 0,24 g Tris) o pH 8,0, 5 μ L proteiny K

(10 mg/ μ L) i 12 μ L 20% SDS. Izolaty dzielono po 100 μ L i zamrażano w temperaturze -20°C . Następnie przez 12 godzin inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 56°C . Kolejno wstrząsano przez 10 sekund oraz wirowano z prędkością 13000 rpm w temperaturze pokojowej przez 12 minut. 300 μ L supernatantu przekładano do nowych probówek i dodawano identyczną objętość mieszaniny fenol/chloroform. Kolejno wstrząsano przez 10 sekund oraz wirowano z prędkością 13000 rpm w temperaturze pokojowej przez 12 minut. DNA precypitowano poprzez dołączenie do fazy wodnej 1/10 objętości 3M octanu sodu o $\text{pH} = 5,2$ oraz 3 objętości lodowatego alkoholu absolutnego. DNA wytrącano przez noc w temperaturze -20°C . Kolejnego dnia próbki wirowano z prędkością 13000 rpm w temperaturze pokojowej przez 12 minut. Po usunięciu supernatantu, DNA suszono w temperaturze pokojowej przez 2 godziny, po czym zawieszano w 20 μ L Tris ($\text{pH} 8,5$).

5.3. Pomiar stężenia DNA

Pomiar stężenia DNA wykonywano z wykorzystaniem metody fluorymetrycznej aparatem Fluoroskan Ascent FL firmy Labsystems, z użyciem barwnika PicoGreen wiążącego dwuniciową spiralę DNA. Po związaniu DNA, barwnik wzbudzano światłem o długości fali 485 nm, a następnie mierzono emisję światła o długości fali 538 nm, która jest proporcjonalna do ilości barwnika związanego z DNA. Stężenie DNA w roztworze szacowano względem krzywej standardowej, utworzonej na bazie pomiarów: próby ślepej stanowiącej 50 μ L buforu TE $\text{pH} = 7,5$ i trzech punktów pomiarowych o stężeniu standardu DNA: 2 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL. Przed pomiarem do dwóch kolejnych studzienek dodano po 1 μ L mierzonego DNA oraz 49 μ L buforu TE $\text{pH} = 7,5$ i barwnika PicoGreen. Pomiar ilości DNA metodą fluorymetryczną dokonywano przy użyciu zestawu Molecular Probes (USA). Końcowy wynik obliczono jako średnią wartość dwóch pomiarów.

5.4. Amplifikacja fragmentów genu *DSPP*

Amplifikację fragmentów genu *DSPP* przeprowadzono metodą PCR w objętości końcowej 10µL, w termocyklerze 9700 (Perkin Elmer,USA). Fragmenty kodujące genu *DSPP* były amplifikowane przy wykorzystaniu par starterów wg. McKnight i współautorów oraz Bai i współautorów [McKniht i wsp. 2008, Bai i wsp. 2010] (tabela 1,2). Ze względu na długość wyjściową i możliwości techniczne amplifikacji poszczególnych eksonów, ekson 4 genu *DSPP* został podzielony na 2 fragmenty, a ekson 5 na 4 fragmenty, które oznaczono zgodnie z piśmiennictwem [McKniht i wsp. 2008, Bai i wsp. 2010].

Tabela 1. Sekwencje starterów dla eksonów 2 i 3 oraz 4 (fragmentów 4.1, 4.2) i 5 (fragmentów 5.1, 5.2) genu *DSPP* wg. McKnight i wsp. [McKnight i wsp. 2008b].

<i>DSPP</i> \ ekson kolejne nukleotydy	Sekwencja (5'→3')
2 (1 - 84)	F: CGT ATG TCT TCT CGT GTT AGA TAC R: TGA AGC AAA GAT GGA CAA AGT CTC
3 (85 - 168)	F: ATC ATA CTT TGG CCT TTG TGT TAA R: GAT GGT TCC ACT GGC ATT TAA CTC
4.1 (169 - 660)	F: CCA AGA TTG CAA TTT GCT TTC C R: AGT CCC ATT TCT CTT GCT GTT GAT
4.2 (663 - 1155)	F: GCT GGA AGC AAT AAC AGT ACA GA R: TTG TCA TGG TTT ATT TTT GTG CTA
5.1 (1156 - 1664)	F: CCC AGT TAT TCT TCC TCA GAT CAA T R: TCA CTG CTA TCT GAT TTA CCT TTG C
5.2 (1665 – 2170)	F: CTG ATG AAT CAA AAG ATA ATG GC R: TGT CAC TAT CGC TGC TGT TAC TAT T

Tabela 2. Sekwencje starterów dla eksonu 5 (fragmentów 5.5 oraz 5.6) genu *DSPP* wg. Bai i wsp. [Bai i wsp. 2010].

<i>DSPP</i> / ekson kolejne nukleotydy	Sekwencja (5' → 3')
5.5 (2170 - 3809)	F: GCAGTGACAGCAACGAAAGCAGCAAT R: GTTGTTACCGTTACCAGACTTGCTC
5.6 (3810 - 4071)	F: TGACAGCACATCTGACAGCAAT R: TCCCCCAGTTGTTTTTGTTT

Do amplifikacji fragmentów genu *DSPP* wykorzystano mieszaninę reakcyjną Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Niemcy) o następującym składzie: HotStarTaq DNA Polimerase; 6 mM MgCl₂ pH 8,7; NTP mix; 0,2 μM każdego ze starterów (IDT, USA); 1 ng matrycowego DNA dla eksonów 2 i 3, 10 ng matrycowego DNA dla fragmentów 4.1, 4.2, 5.1, 5.6 eksonu 4 i 5 oraz 50 ng matrycowego DNA dla fragmentów 5.2, 5.5 eksonu 5.

Aby uzyskać końcową objętość 10 μL mieszaninę dopełniano wodą wolną od RNA-zy (Promega, USA).

Fragmenty genu *DSPP* poddawano amplifikacji metodą PCR w warunkach przedstawionych w tabeli 3.

Tabela 3. Warunki amplifikacji fragmentów genu *DSPP*.

Badany fragment genu <i>DSPP</i>	Denaturacja wstępna	30 cykli	Wydłużanie końcowe
2	95°C \ 15 min	94°C\30 s; 58°C\1 min 30 s; 72°C\1min 30 s	72°C\10 min
3	95°C \ 15 min	94°C\30 s; 58°C\1 min 30 s; 72°C\1min 30 s	72°C\10 min
4.1	95°C \ 15 min	94°C\30 s; 58°C\1 min 30 s; 72°C\1min 30 s	72°C\10 min
4.2	95°C \ 15 min	94°C\30 s; 58°C\1 min 30 s; 72°C\1min 30 s	72°C\10 min
5.1	95°C \ 15 min	94°C\30 s; 58°C\1 min 30 s; 72°C\1min 30 s	72°C\10 min
5.2	95°C \ 15 min	94°C\30 s; 58°C\1 min 30 s; 72°C\1min 30 s	72°C\10 min
5.5	95°C \ 15 min	94°C\30 s; 58°C\1 min 30 s; 72°C\1min 30 s	72°C\10 min
5.6	95°C \ 15 min	94°C\30 s; 58°C\1 min 30 s; 72°C\1min 30 s	72°C\10 min

Uzyskane produkty amplifikacji oczyszczano przy użyciu zestawu Expo Sap (Afymetrix, USA) według wskazówek producenta.

5.5. Sekwencjonowanie produktów amplifikacji fragmentów eksonów 2, 3,

4.1, 4.2, 5.1, 5.2, 5.5, 5.6 genu *DSPP*

Sekwencjonowanie eksonów i fragmentów eksonów 2, 3, 4.1, 4.2, 5.1, 5.2, 5.5, 5.6 genu *DSPP* wykonano z wykorzystaniem zestawu ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v. 1.1 (Applied Biosystems, USA), składającego się z: - terminatora A znakowanego dwuchloro [*R6G*], - terminatora C znakowanego dwuchloro [*ROXI*], - terminatora G znakowanego dwuchloro [*R 110*], - terminatora T znakowanego dwuchloro [*TAMRA*], - dezoksytrójfosforanów (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), - Stoffel-Amlitaq DNA polimerazy, - MgCl₂, - Tris-HCl o pH 9,0. Amplifikację przeprowadzono z wykorzystaniem: 8μL mieszaniny znakowanych terminatorów, po 2 μL każdego (3,2 pmol

nieznakowanego startera każdego badanego fragmentu) i 4 µl matrycowego DNA. Objętość końcową 20 µL otrzymywano przez dopełnienie 6 µL wodą wolną od RNA-zy (Promega, USA).

Do sekwencjonowania wykorzystano probówki 0,2 µL typu MicroAmp (Applied Biosystems, USA) oraz aparat do PCR serii 9700 (Perkin Elmer, USA).

Tabela 4. Warunki sekwencjonowania genu *DSPP*.

Badany fragment genu <i>DSPP</i>	Denaturacja wstępna	25 cykli
2	96°C \ 11 s	96°\ 10 s; 50°C\ 0,05 min; 60°C\ 4 min
3	96°C \ 11 s	96°\ 10 s; 50°C\ 0,05 min; 60°C\ 4 min
4.1	96°C \ 11 s	96°\ 10 s; 50°C\ 0,05 min; 60°C\ 4 min
4.2	96°C \ 11 s	96°\ 10 s; 50°C\ 0,05 min; 60°C\ 4 min
5.1	96°C \ 11 s	96°\ 10 s; 50°C\ 0,05 min; 60°C\ 4 min
5.2	96°C \ 11 s	96°\ 10 s; 50°C\ 0,05 min; 60°C\ 4 min
5.5	96°C \ 11 s	96°\ 10 s; 50°C\ 0,05 min; 60°C\ 4 min
5.6	96°C \ 11 s	96°\ 10 s; 50°C\ 0,05 min; 60°C\ 4 min

W podobnym trybie przeprowadzono sekwencjonowanie odwrotnej nici DNA używając startera odwrotnego odpowiednio badanego fragmentu.

5.6. Precypitacja produktów reakcji sekwencjonowania

Produkty reakcji sekwencjonowania (20 µL) przenoszono do probówki Eppendorf, a następnie dodawano 2 µl octanu sodu (Sigma, USA) oraz 50 µL etanolu (POCH, Polska). Precypitację przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Następnie próbki poddano wirowaniu w wirówce Centrifuge 5804 R, Eppendorf przy prędkości 14000 rpm

przez 20 minut. Supernatant usuwano przy użyciu pipety automatycznej, produkty płukano w 500µL 70% etanolu (POCH, Polska). Etanol usuwano po wstrząśnięciu i odwirowaniu z prędkością 14000 przez 5 minut. Produkt końcowy suszono w 90°C przez 1 minutę przy wykorzystaniu bloku grzejnego Multi-blok Heater (Lab-Line, USA).

5.7. Rozdział produktów reakcji sekwencjonowania elektroforezą kapilarną (CE) przy użyciu automatycznego analizatora DNA typu ABI PRISM

310

Wysuszony produkt reakcji sekwencjonowania łączono z 20 µL dejonizowanego formamidu (Applied Biosystems, USA), próbki denaturowano kolejno w 95°C przez 5 minut i umieszczano w łaźni wodno-lodowej na 3 minuty. Zdenaturowane produkty poddawano elektokinetycznemu pobraniu przy 2 kV przez 30 sekund. W niepokrytej kapilarze (Applied Biosystems, USA) napełnionej denaturującym polimerem POP-6 (Applied Biosystems, USA) przeprowadzono rozdział produktów sekwencjonowania. Droga rozdziału wynosiła 36 cm. Elektroforezę przeprowadzono w temperaturze 50°C przy 12 kV, 9 mA, 10 mW. Czas rozdziału i detekcji jednego produktu reakcji sekwencjonowania wynosił 36 minut.

Bufor elektrodowy EDTA (Applied Biosystems, USA) użyto do elektroforezy. Przy wykorzystaniu filtra E i programu komputerowego 310 Genetic Analyser Data Collection 1.0.4 wykrywano produkty sekwencjonowania. Programy komputerowe Sequencing Analysis v. 3.0 oraz 5.2 i Sequence Navigator v. 2.0 oraz v. 2.5 posłużyły do analizy uzyskanych wyników.

Procedurę sekwencjonowania dla każdej próby powtarzano trzykrotnie.

6. WYNIKI

Analiza molekularna sekwencji genu *DSPP* u osób w polskiej populacji prezentujących fenotyp DGI typu II\III i\lub DD typu II oraz w grupie kontrolnej, bez zmian fenotypowych DGI typu II\III i\lub DD wykazała brak mutacji w sekwencji kodującej peptyd sygnałowy. Jednocześnie stwierdzono występowanie mutacji i licznych zmian polimorficznych w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP, DPP oraz w rejonie 3'UTR.

6.1. Zmiany w kodzie genetycznym genu *DSPP* w sekwencji kodującej białko DSP

6.1.1. Mutacje w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DSP

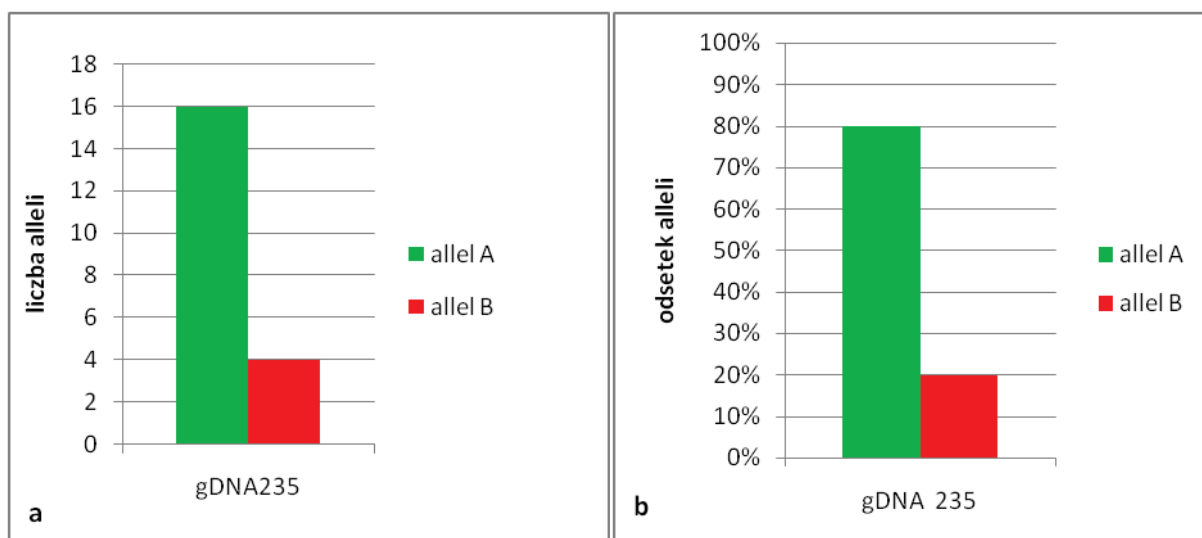
W sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP w pozycji g.235 u 4 chorych (40% badanych) wykryto obecność mutacji o charakterze transwersji A → T, co skutkowało zamianą argininy na tryptofan. U każdego z 4 probantów mutacji uległ jedynie 1 allel (łącznie 4 allele). Pozostałe osoby posiadały sekwencję zgodną z referencyjną w obu allelach (tabela 5, 6; rycina 1). Analiza wykazała, że 80% odsetek stanowiły allele referencyjne, a 20% allele zmutowane. Stanowi to odpowiednio: 16 alleli z sekwencją referencyjną i 4 allele z sekwencją zmutowaną (tabela 5, rycina 1). W grupie osób zdrowych tę samą zmianę zaobserwowano u 5 probantów, co stanowiło 17% badanej grupy. U 4 badanych mutacji uległ 1 allel (łącznie 4 allele), a u 1 osoby mutacji uległy oba allele (tabela 5, 6; rycina 2). Z obliczeń wynika, iż 54 allele z sekwencją prawidłową stanowiły 90%, a 6 alleli z sekwencją zmutowaną – 10% (rycina 2).

Tabela 5. Mutacja w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DSP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b) w odniesieniu do liczby alleli; A – allel referencyjny, B – allel zmutowany.

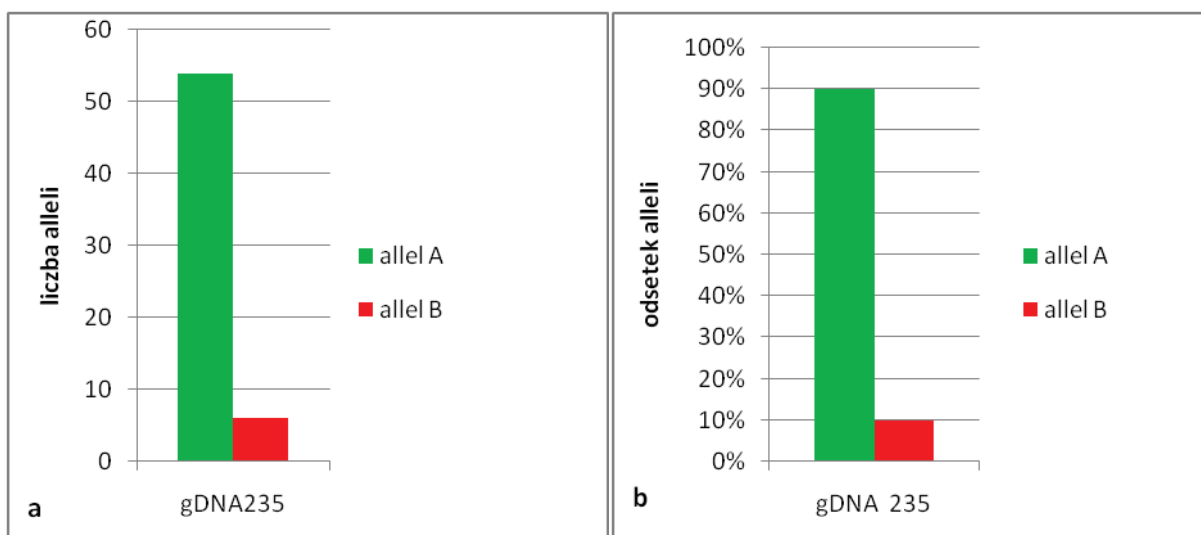
Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zmiana nukleotydu w kodonie	Zamiana aminokwasu	Grupa	Liczba alleli A	% A	Liczba alleli B	% B	Liczba probantów z mutacją
235	A	AGG→TGG	Arg→Trp	a	16	80	4	20	4
				b	54	90	6	10	5

Tabela 6. Mutacja w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b).

Pozycja w DNA	Zamiana aminokwasu	Grupa	Liczba homozygot z allelami referencyjnymi	Liczba homozygot z allelami zmutowanymi	Liczba heterozygot
235	Arg→Trp	a	6	0	4
		b	25	1	4



Rycina 1. Liczba (a) oraz odsetek (b) alleli referencyjnych (A) oraz alleli zmutowanych (B) w sekwencji genu *DSPP* w pozycji g.235 w rejonie białka DSP w grupie osób chorych.



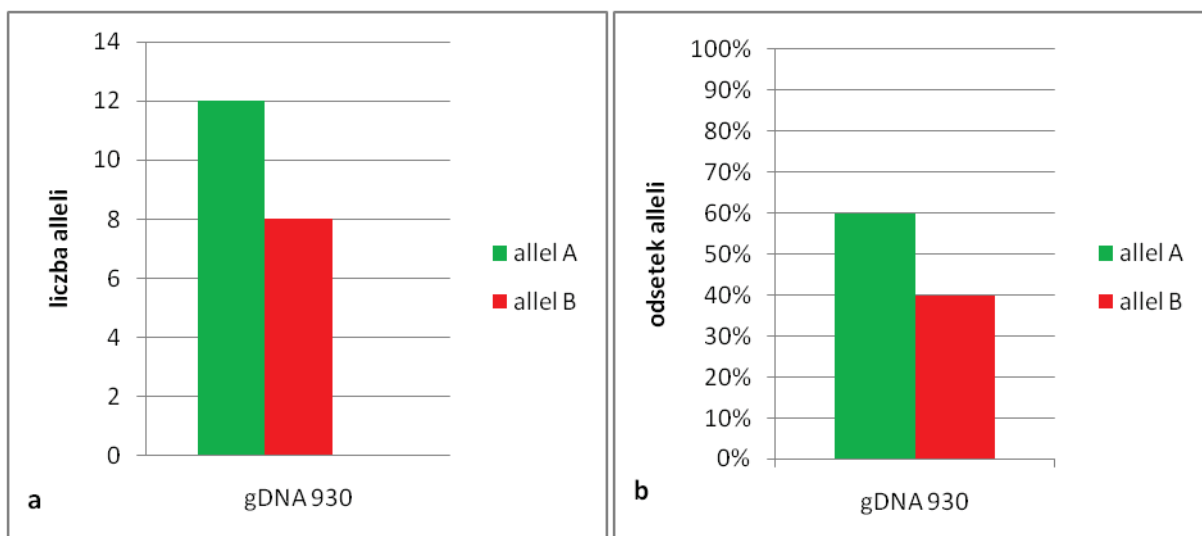
Rycina 2. Liczba (a) oraz odsetek (b) alleli referencyjnych (A) oraz alleli zmutowanych (B) w sekwencji genu *DSPP* w pozycji g.235 w rejonie białka DSP w grupie osób zdrowych.

6.1.2. Polimorfizm w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DSP

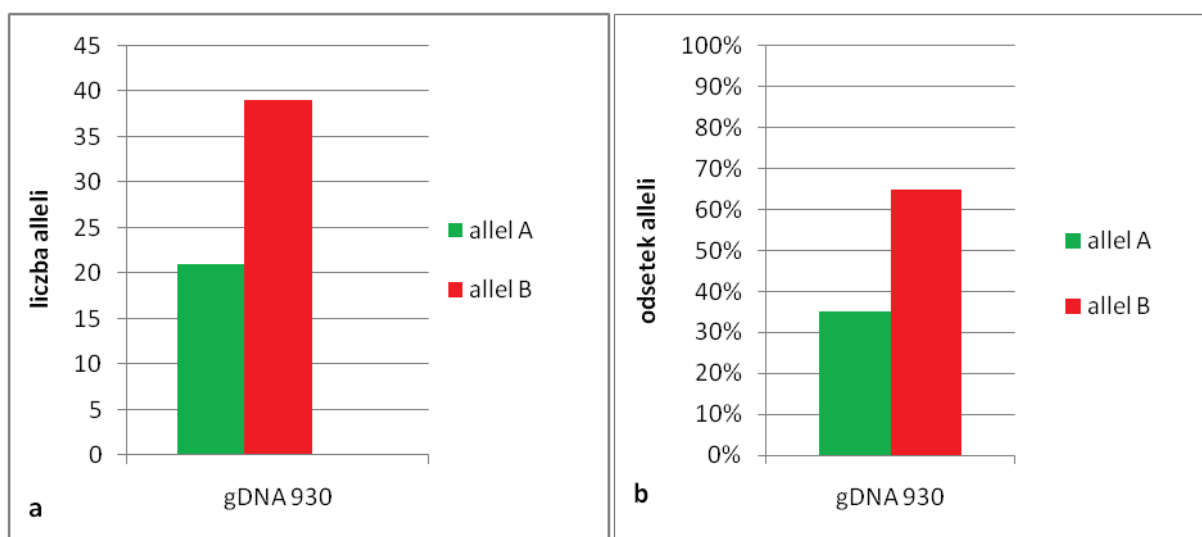
W sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP w pozycji g.930 zaobserwowano zmianę typu SNP u 7 chorych (70% badanych). Była to zmiana o charakterze tranzycji TCA → TCG i dotyczyła trzeciego nukleotydu A → G w kodonie kodującym serynę. U 6 probantów zamianie uległ 1 allel (6 alleli), a u 1 probanta zamiana nastąpiła w obu allelach (2 allele), co skutkowało powstaniem homozygoty z dwoma polimorficznymi allelami (tabela 7; rycina 3). U 3 osób w pozycji g.930 zidentyfikowano sekwencję referencyjną w obu allelach, co stanowiło łącznie 60% alleli referencyjnych oraz 40% alleli polimorficznych (tabela 7; rycina 3). Ta sama zmiana wystąpiła u 28 osób zdrowych (93% badanych). U 17 badanych odnotowano zamianę 1 allela (17 alleli), a u 11 osób zamiana nastąpiła w obu allelach (22 allele). U pozostałych 2 probantów występowała sekwencja referencyjna. 21 alleli z sekwencją referencyjną stanowiło 35% , a 39 alleli polimorficznych stanowiło odpowiednio 65% (tabela 7; rycina 4).

Tabela 7. Zamiana polimorficzna typu SNP w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DSP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b) ; A – sekwencja referencyjna, B – sekwencja polimorficzna.

Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zamiana nukleotydu w kodonie	Kodowany aminokwas	Grupa	Liczba alleli A	%A	Liczba alleli B	%B	Liczba osób z zamianą
930	A	TCA→TCG	seryna	a	12	60	8	40	7
				b	21	35	39	65	28



Rycina 3. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych oraz alleli polimorficznych w pozycji g.930 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DSP w grupie osób chorych; A – allele z sekwencją referencyjną, B – allele z sekwencją polimorficzną.



Rycina 4. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych oraz alleli polimorficznych w pozycji g.930 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DSP w grupie osób zdrowych; A – allele z sekwencją referencyjną, B – allele z sekwencją polimorficzną.

W sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP w grupie osób chorych oraz zdrowych nie stwierdzono rearanżacji ilościowych (insercji i/lub delecji).

6.2. Zmiany w kodzie genetycznym genu *DSPP* w sekwencji kodującej białko DPP

6.2.1. Mutacje w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP

W sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP w grupie osób chorych odnotowano mutacje punktowe zmieniające sens w 11 pozycjach: g.3550, g.3568, g.3598, g.3611, g.3615, g.3622, g.3710, g.3714, g.3728, g.3732, g.3805. Natomiast u osób zdrowych wykryto 13 mutacji punktowych w pozycjach: g.2006, g.2024, g.3568, g.3592, g.3598, g.3615, g.3622, g.3710, g.3714, g.3728, g.3732, g.3768, g.3805. Mutacja g.3550 wystąpiła tylko u osób chorych, natomiast mutacje w pozycjach g.2006, g.2024, g.3592, g.3768 odnotowano jedynie u osób zdrowych. Mutacje występowały w pierwszym, drugim i trzecim nukleotydzie w kodonie.

6.2.1.1. Mutacje w pierwszym nukleotydzie w kodonie w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP

Analiza sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP u osób chorych wykazała występowanie mutacji pierwszego nukleotydu w kodonie w 5 pozycjach: g.3550, g.3568, g.3598, g.3622, g.3805. W pozycjach g.3550 i g.3622 była to zamiana G → A, a w pozycji g.3568 zamiana A → G, wszystkie o charakterze tranzycji. Jednocześnie w pozycjach g.3598 i g.3805 doszło do transwersji A → T (tabela 8). U osób zdrowych wykryto obecność mutacji pierwszego nukleotydu w kodonie w 5 pozycjach: g.3568, g.3592, g.3598, g.3622 oraz g.3805. W pozycjach g.3568, g. 3598, g.3622, g.3805 były to te same mutacje, które

obserwowano w grupie osób chorych, a w pozycji g.3592 wystąpiła tranzycja A → G (tabela 8).

Tabela 8. Mutacja pierwszego nukleotydu w kodonie w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b); A – allel referencyjny, B – allel zmutowany; * - brak doniesień w bazie Ensembl.

Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zamiana nukleotydu w kodonie	Zamiana aminokwasu	Grupa	Liczba alleli A	% A	Liczba alleli B	% B	Liczba osób z mutacją
3550	G	GAT→AAT	Asp→Asn	a	16	80	4	20	4
3568	A	AAT→GAT	Asn→Asp	a	12	60	8	40	8
				b	41	68	11	18	11
3592*	A	AGT→GGT	Ser→Gly	b	52	87	4	7	2
3598*	A	AGC→TGC	Ser→Cys	a	11	55	9	45	9
				b	36	60	22	37	20
3622*	G	GAT→AAT	Asp→Asn	a	10	50	10	50	10
				b	44	73	14	23	14
3805*	A	AGC→TGC	Ser→Cys	a	9	45	11	55	10
				b	37	62	23	38	23

Tabela 9. Mutacje w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b).

Pozycja w DNA	Zamiana aminokwasu	Grupa	Liczba homozygot z allelami referencyjnymi	Liczba homozygot z allelami zmutowanymi	Liczba heterozygot	Liczba osób z delecją
3550	Asp→Asn	a	6	0	4	0
3568	Asn→Asp	a	2	0	8	0
		b	15	0	11	4
3592	Ser→Gly	b	26	2	0	2
3598	Ser→Cys	a	1	0	9	0
		b	9	2	18	1
3622	Asp→Asn	a	0	0	10	0
		b	15	0	14	1
3805	Ser→Cys	a	0	1	9	0
		b	7	0	23	0

U chorych w pozycji g.3550 zamianie uległa G → A, co spowodowało zamianę kodonu GAT kodującego kwas asparaginowy na kodon AAT kodujący asparaginę. Mutacja ta wystąpiła w jednym allelu u 4 osób – heterozygot. 4 allele stanowiły 20% przebadanych alleli. Pozostałe 6 osób posiadało oba allele referencyjne. 80% stanowiło 16 alleli zgodnych z sekwencją referencyjną (tabela 8, 9; rycina 5).

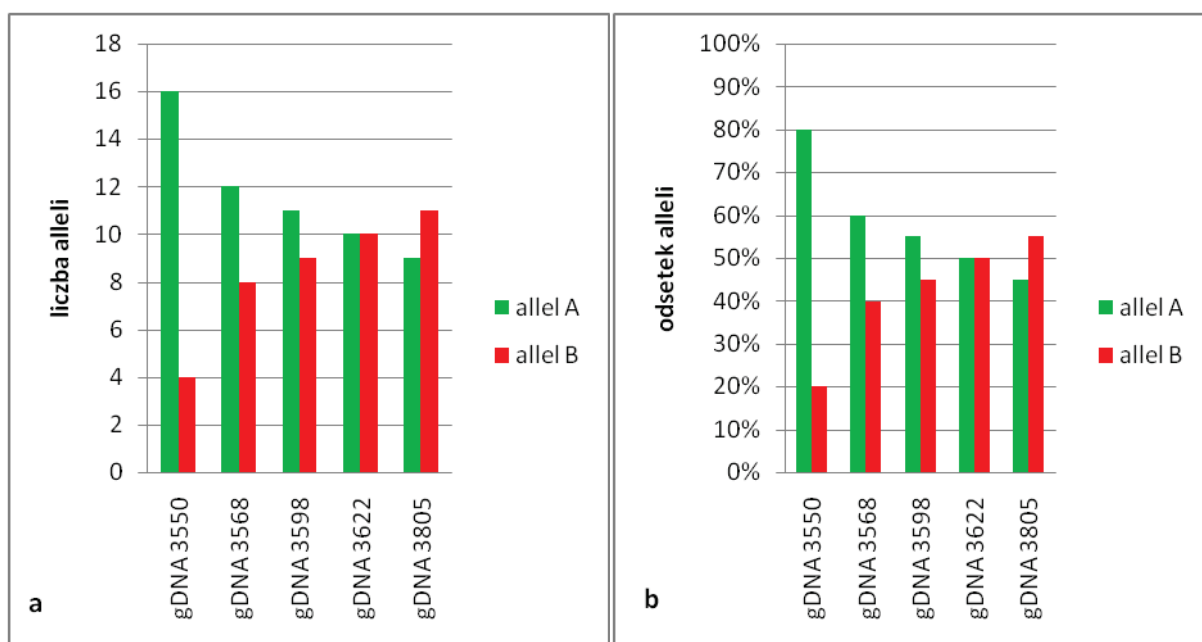
Kolejno w pozycji g.3568 obserwowano zamianę $A \rightarrow G$, co skutkowało zamianą kodonu AAT kodującego asparaginę w kodon GAT, który koduje kwas asparaginowy. U osób chorych mutację dotyczącą jednego allela zaobserwowano u 8 osób. Łącznie 8 zmienionych alleli stanowiło 40%. Kolejne 2 osoby chore w pozycji g. 3568 posiadały oba allele referencyjne. Sumując, 12 alleli referencyjnych u osób chorych stanowiło 60%. Natomiast u 11 osób zdrowych zamianie uległo 11 pojedynczych alleli, co stanowiło 18% wszystkich przebadanych alleli. 15 osób z grupy kontrolnej posiadało obydwa allele prawidłowe, co daje wynik 41 czyli 68% alleli z sekwencją referencyjną. Jednocześnie zaobserwowano delecję nukleotydu g.3568 u 4 osób zdrowych (tabela 8, 9; rycina 5, 6, 7).

Tranzycja $A \rightarrow T$ w kodonie AGT, który koduje serynę na kodon GGT kodujący glicynę wystąpiła w pozycji g.3592 u 2 probantów z grupy kontrolnej w obu allelach (4 allele), które w tej grupie stanowiły 7% przebadanych alleli. U 26 osób stwierdzono oba allele zgodne z sekwencją referencyjną (łącznie 52 allele), co stanowiło 87% alleli. Delecja nukleotydu g.3592 wystąpiła jedynie u 2 badanych z grupy kontrolnej (tabela 8, 9; rycina 6, 7).

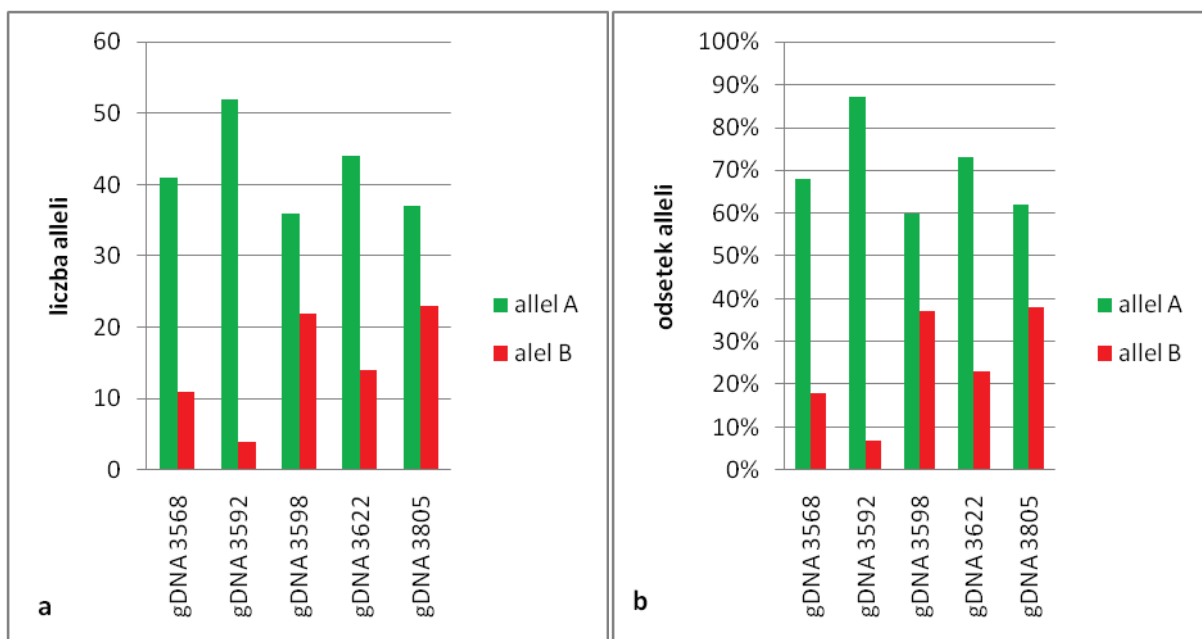
W lokalizacji g. 3598 adenina uległa zamianie w tyminę ($A \rightarrow T$), co skutkowało zamianą kodonu AGC kodującego serynę w kodon TGC, który koduje cysteinę. Mutacje pojedynczego allela wykryto u 9 chorych, łącznie w 9 allelach, które stanowiły 45% alleli przebadanych w tej grupie, natomiast 55 % (11) alleli miało sekwencję referencyjną. Tylko 1 badany chory posiadał oba allele referencyjne. Zamianę $A \rightarrow T$ w pozycji g.3598 zaobserwowano również w 18 pojedynczych allelach u 18 osób zdrowych, natomiast u 2 zdrowych probantów transwersja pojawiła się w obu allelach (4 allele), co stanowiło 37% przebadanych alleli. Odsetek alleli niezmiennych u osób zdrowych wynosił łącznie 60% (36 alleli). Dodatkowo, u 1 zdrowego probanta w badanej lokalizacji doszło do delecji (tabela 8, 9; rycina 5, 6, 7).

W pozycji g.3622 nastąpiła zamiana G → A, zamiast kwasu asparaginowego (GAT) zakodowana została asparagina (AAT). W grupie chorych mutacja wystąpiła w jednym allelu u 10 osób. 10 alleli zmutowanych stanowiło 50% alleli przebadanych w grupie chorych. Natomiast w tej samej pozycji g.3622 u 14 osób zdrowych uległ mutacji 1 allel, czyli 23% badanych alleli, podczas gdy 73% stanowiły allele referencyjne. Podobnie jak w pozycji poprzedniej u 1 osoby zdrowej stwierdzono delecję nukleotydu g.3622 (tabela 8, 9; rycina 5, 6, 7).

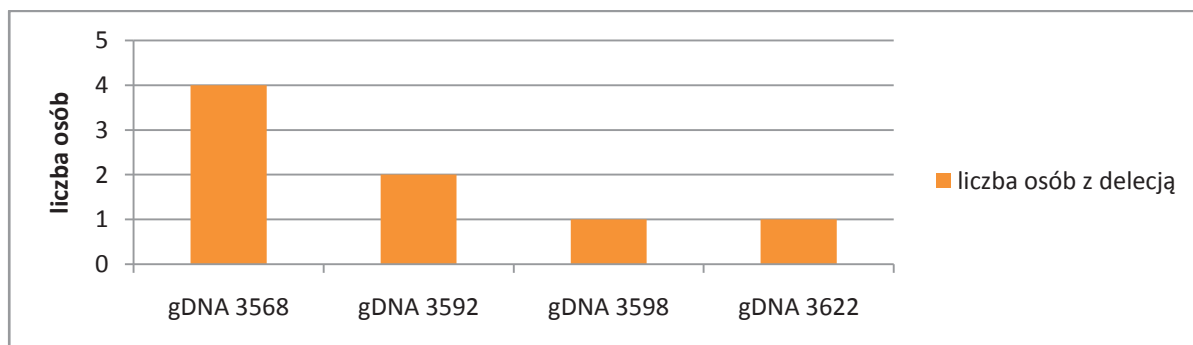
W pozycji g.3805 nastąpiła zamiana A → T, co skutkowało zamianą kodonu AGC kodującego serynę w kodon TGC kodujący cysteinę. Mutację zaobserwowano w jednym allelu u 9 chorych, natomiast u 1 chorego zmutowane były oba allele. 11 alleli zmutowanych, stanowiło 55% alleli z grupy osób chorych, a 9 alleli prawidłowych stanowiło odpowiednio 45%. Z kolei, u 23 zdrowych probantów w lokalizacji g.3805 stwierdzono identyczną mutację, która dotyczyła 23 czyli 38% pojedynczych alleli. U 7 osób oba allele posiadały sekwencję referencyjną. Zatem 37 alleli referencyjnych tworzyło 62% (tabela 7, 8; rycina 5, 6).



Rycina 5. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) i alleli zmutowanych (allel B) w pozycjach: g.3550, g.3568, g.3598, g.3622, g.3805 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób chorych.



Rycina 6. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (A) i alleli zmutowanych (B) w pozycjach: g.3568, g.3592, g.3598, g.3622, g.3805 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób zdrowych.



Rycina 7. Liczba osób zdrowych z delecją w pozycjach: g.3568, g.3592, g.3598, g.3622 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP.

6.2.1.2. Mutacje w drugim nukleotydzie w kodonie w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP

Mutacje w drugim nukleotydzie w kodonie w sekwencji kodującej białko DPP zarówno u osób chorych jak i zdrowych z grupy kontrolnej wystąpiły w 3 pozycjach: g.3611, g.3710, g.3728. Były to tranzykcje G → A w pozycjach g.3611 i g.3710, oraz tranzykcja A → G w pozycji g.3728. Wszyscy probanci byli heterozygotami posiadając jeden allel referencyjny oraz jeden z sekwencją zmutowaną. Dodatkowo, w grupie osób zdrowych wykazano zamianę

drugiego nukleotydu w kodonie w pozycji g.2006 oraz g.2024. Zamiany miały charakter tranzykcji A → G (tabela 10).

Tabela 10. Mutacje drugiego nukleotydu w kodonie w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b); A – allel referencyjny, B – allel zmutowany; * - brak doniesień w bazie Ensembl.

Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zamiana nukleotydu w kodonie	Zamiana aminokwasu	Grupa	Liczba alleli A	% A	Liczba alleli B	% B	Liczba osób z mutacją
2006*	A	GAC→GGC	Asp→Gly	b	57	95	3	5	2
2024*	A	AAC→AGC	Asn→Ser	b	59	98	1	2	1
3611*	G	AGC→AAC	Ser→Asn	a	16	80	4	20	4
				b	47	78	11	18	10
3710*	G	AGC→AAC	Ser→Asn	a	16	80	4	20	4
				b	56	93	4	7	4
3728	A	AAT→AGT	Asn→Ser	a	16	80	4	20	4
				b	56	93	4	7	4

Tabela 11. Mutacje w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b).

Pozycja w DNA	Zamiana aminokwasu	Grupa	Liczba homozygot z allelami referencyjnymi	Liczba homozygot z allelami zmutowanymi	Liczba heterozygot	Liczba osób z delecją
2006	Asp→Gly	b	28	1	1	0
2024	Asn→Ser	b	29	0	1	0
3611	Ser→Asn	a	6	0	4	0
		b	19	1	9	1
3710	Ser→Asn	a	6	0	4	0
		b	26	0	4	0
3728	Asn→Ser	a	6	0	4	0
		b	26	0	4	0

U dwóch osób zdrowych w lokalizacji g.2006 kodon GAC kodujący kwas asparaginowy uległ zamianie w kodon GGC kodujący glicynę (A→G). U jednej osoby odnotowano zmianę w 1 allelu, natomiast u drugiej oba allele miały sekwencję zmutowaną. Łącznie te 3 allele stanowiły 5%, a pozostałe 57 alleli referencyjnych (95%) wszystkich alleli przebadanych w grupie kontrolnej. 28 badanych posiadało oba allele referencyjne (tabela 10, 11; rycina 9).

Tranzykcja A → G (g.2024) w kodonie AAC na kodon AGC spowodowała zamianę asparaginy w serynę. Tę mutację odnotowano jedynie w jednym allelu, u 1 zdrowego

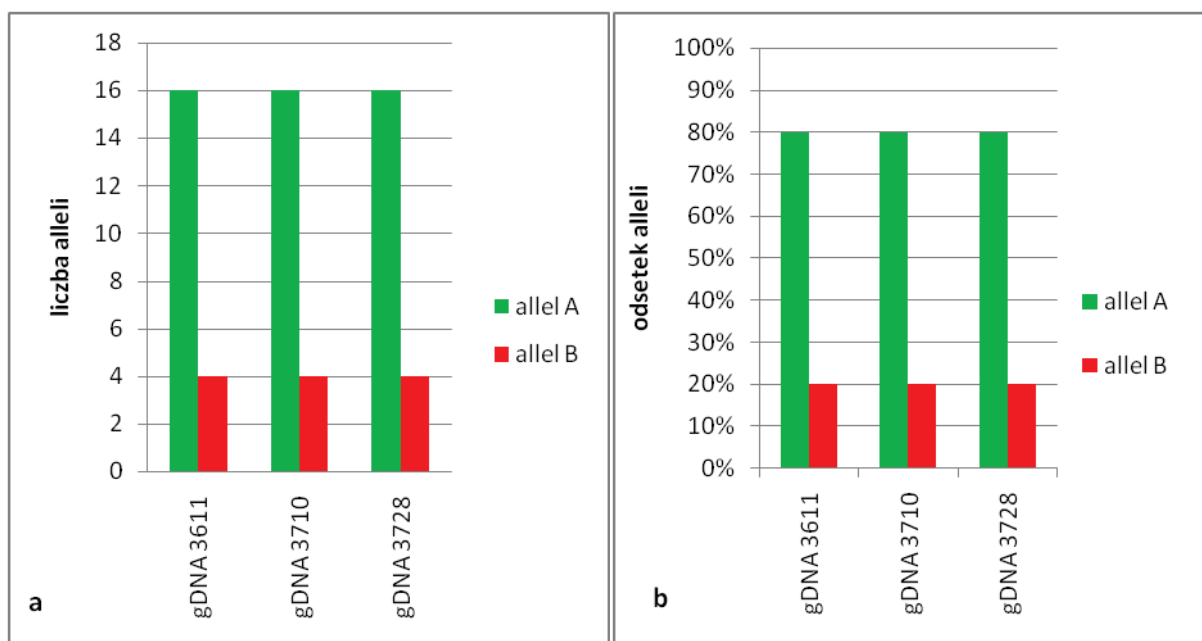
probanda (2%). Pozostałe 29 osób miało oba allele zgodne z sekwencją referencyjną. 59 alleli referencyjnych stanowiło 98% (tabela 10,11; rycina 9).

W pozycji g.3611 u 4 osób chorych zamianę $G \rightarrow A$ odnotowano w jednym alelu (4 allele, 20%). Mutacja skutkowała zamianą kodonu AGC na kodon AAC (Ser $\rightarrow$ Asn). U 6 chorych w pozycji g.3611 oba allele posiadały sekwencję referencyjną. W konsekwencji 80% alleli w grupie osób chorych posiadało sekwencję referencyjną. W grupie kontrolnej osób zdrowych 9 probantów posiadało jeden zmutowany allel, a u 1 osoby oba allele posiadały sekwencję zmutowaną A, co daje łącznie 11 zmutowanych alleli (18%). U 19 badanych stwierdzono sekwencję referencyjną w obydwu allelach. Zatem 47 alleli referencyjnych tworzyło 78% przebadanych alleli. Dodatkowo, u 1 osoby zdrowej odnotowano delecję w pozycji g. 3611 (tabela 10, 11; rycina 8, 9, 10).

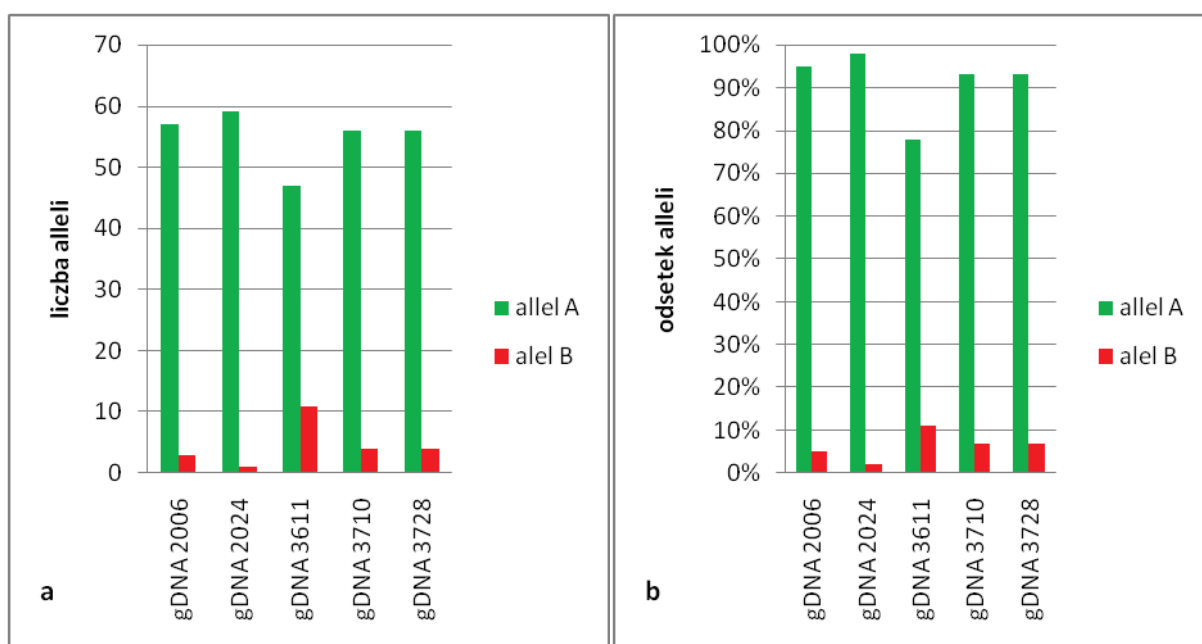
Tę samą tranzycję $G \rightarrow A$ (AGC $\rightarrow$ AAC) odnotowano w pozycji g.3710. Wystąpiła ona u 4 osób chorych w 4 pojedynczych allelach (20%). 16 alleli (80%) posiadało sekwencję zgodną z sekwencją referencyjną. Również w grupie osób zdrowych tranzycie $G \rightarrow A$ (AGC $\rightarrow$ AAC) odnotowano u 4 probantów w pojedynczym alelu. W grupie osób zdrowych 4 zmienione allele stanowiły 7% wszystkich badanych alleli. Ponadto, 26 osób posiadało oba allele zgodne z sekwencją referencyjną, co daje odsetek 93% (56 alleli) (tabela 10, 11; rycina 8, 9).

Z kolei w lokalizacji g.3728 u 4 osób chorych w 4 pojedynczych allelach wystąpiła mutacja $A \rightarrow G$, co spowodowało zamianę kodonu AAT kodującego asparaginę na kodon AGT kodujący serynę. W konsekwencji 20% przebadanych alleli było zmutowanych, a 16 posiadało sekwencję referencyjną, co tworzyło grupę 80% alleli badanych w tej grupie. Podobnie u 4 zdrowych probantów mutację odnotowano w pojedynczych allelach (4 allele). Pozostałe 26 osób posiadało allele zgodne z sekwencją referencyjną. Łącznie odsetek

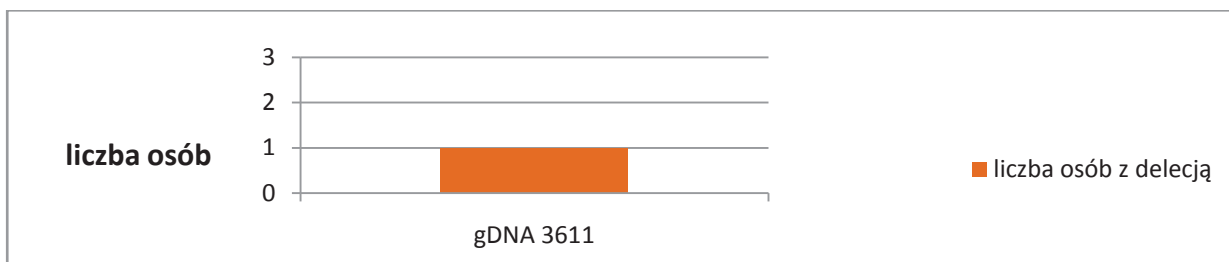
zmutowanych alleli wynosił 7%, a alleli z sekwencją referencyjną 93% (56 alleli) (tabela 10, 11; rycina 8, 9).



Rycina 8. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli zmutowanych (allel B) pozycjach: g3611, g.3710, g.3728 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób chorych.



Rycina 9. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) i alleli zmutowanych (allel B) w pozycjach: g.2006, g.2024, g.3611, g.3710, g.3728 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób zdrowych.



Rycina 10. Liczba osób zdrowych z delecją w pozycji g.3611 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP.

6.2.1.3. Mutacje w trzecim nukleotydzie w kodonie w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP

Mutacje trzeciego nukleotydu w kodonie w grupie osób chorych odnotowano w 3 pozycjach: g.3615, g.3714, g.3732. Były to transwersja: C → A w pozycjach g.3615 i g.3714 oraz A → C w pozycji g.3732. W tych pozycjach badani mieli zmieniony tylko jeden allel. W grupie osób zdrowych zamianę ostatniego nukleotydu w kodonie stwierdzono w 4 pozycjach: g.3615, g.3714, g.3732, g.3768. Trzy pierwsze pozycje pokrywały się z mutacjami u osób chorych, natomiast w pozycji g.3768 była to transwersja C → A (tabela 12).

Tabela 12. Mutacje trzeciego nukleotydu w kodonie w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b); A – allel referencyjny, B – allel zmutowany; * - brak doniesień w bazie Ensembl.

Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zamiana nukleotydu	Zamiana aminokwasu	Grupa	Liczba alleli A	% A	Liczba alleli B	% B	Liczba osób z mutacją
3615*	C	GAC→GAA	Asp→Glu	a	12	60	8	40	8
				b	48	80	8	13	8
3714*	C	GAC→GAA	Asp→Glu	a	16	80	4	20	4
				b	56	93	4	7	4
3732	A	GAA→GAC	Glu→Asp	a	16	80	4	20	4
				b	57	95	3	5	3
3768*	C	GAC→GAA	Asp→Glu	b	59	98	1	2	1

Tabela 13. Mutacje w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b).

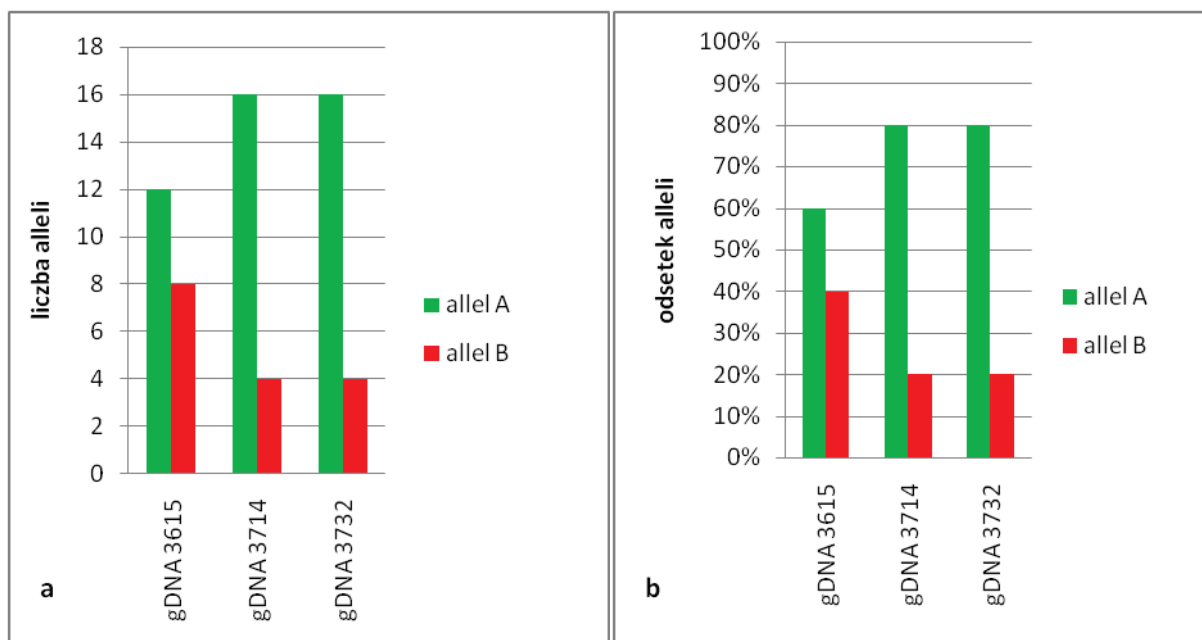
Pozycja w DNA	Zamiana aminokwasu	Grupa	Liczba homozygot z allelami referencyjnymi	Liczba homozygot z allelami zmutowanymi	Liczba heterozygot	Liczba osób z delecją
3615	Asp→Glu	a	2	0	8	0
		b	21	0	8	1
3714	Asp→Glu	a	6	0	4	0
		b	26	0	4	0
3732	Glu→Asp	a	6	0	4	0
		b	27	0	3	0
3768	Asp→Glu	b	29	0	1	0

Analiza sekwencji genu *DSPP* w pozycji g.3615 wykazała zamianę C → A w kodonie GAC kodującym kwas asparaginowy na kodon GAA kodujący kwas glutaminowy u 8 osób chorych w pojedynczym allelu. Pozostałe 2 osoby posiadały sekwencję referencyjną w obu allelach. Odsetek zmutowanych alleli w grupie osób chorych wynosił 40% (8 alleli), a alleli prawidłowych 60% (12 alleli). W tej samej lokalizacji u osób zdrowych stwierdzono 13% (8 alleli) z sekwencją zmutowaną oraz 80% (48 alleli) z sekwencją referencyjną. Dodatkowo w tej pozycji doszło do delecji nukleotydu u 1 osoby z grupy kontrolnej (tabela 12, 13; rycina 11, 12, 13).

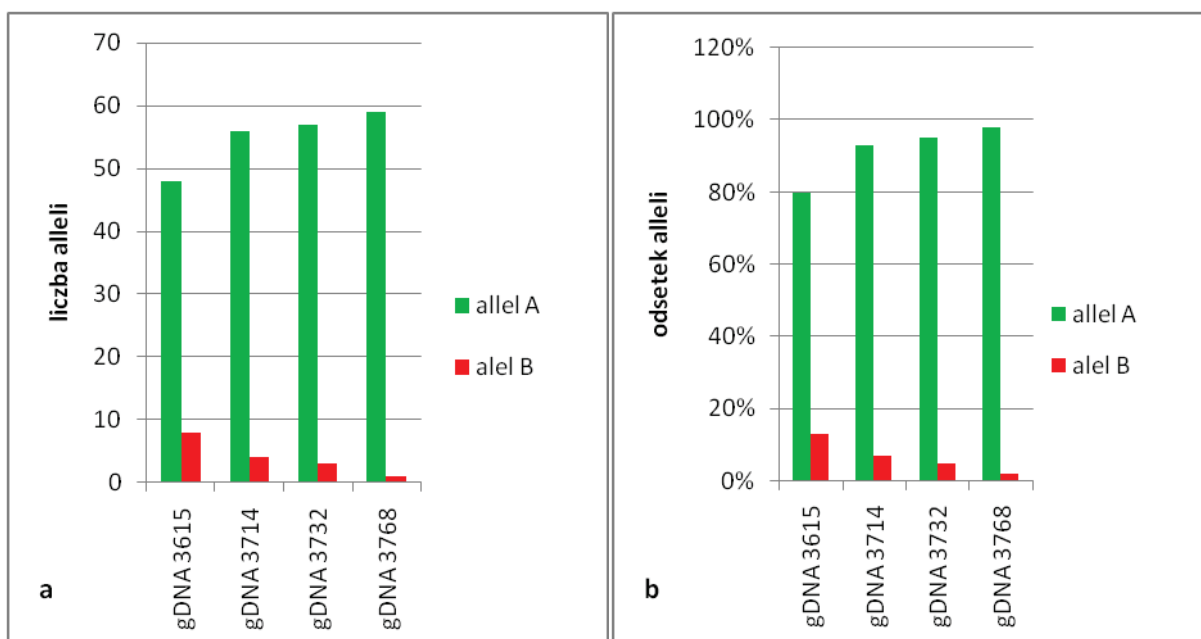
W pozycji g.3714 stwierdzono transwersję C → A u 4 chorych probantów w pojedynczym allelu (4 allele), co stanowiło 20% wszystkich przebadanych alleli. 6 badanych posiadało oba allele referencyjne. 16 alleli zgodnych z sekwencją referencyjną daje odsetek 80%. W tej samej lokalizacji u osób z grupy kontrolnej stwierdzono 4 allele (7%) z sekwencją zmutowaną oraz 56 alleli (93%) z sekwencją referencyjną (tabela 12, 13; rycina 11, 12).

W pozycji g.3732 u 4 chorych w pojedynczym allelu (4 allele, 20%) nastąpiła zamiana A → C w kodonie GAA kodującym kwas glutaminowy na kodon GAC kodujący kwas asparaginowy. 6 osób posiadało allele zgodne z sekwencją referencyjną, zatem odsetek referencyjnych alleli wynosił 80% (16 alleli). Dla porównania u 3 zdrowych probantów stwierdzono zmiany w pojedynczym allelu w tej samej lokalizacji. 3 zmienione allele stanowiły 5% alleli przebadanych w grupie osób zdrowych (tabela 11, 12; rycina 11, 12).

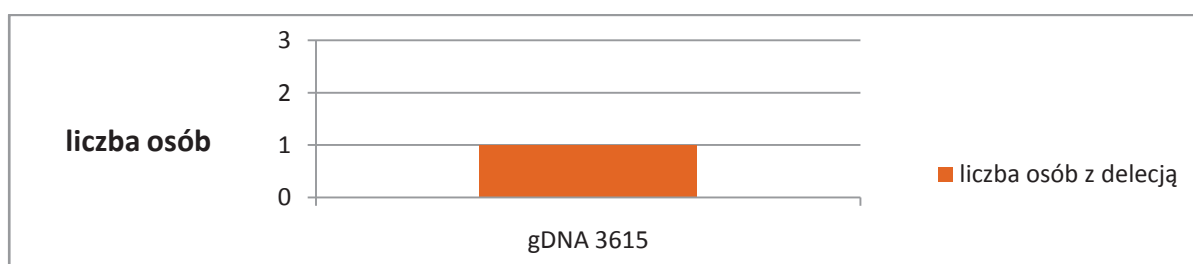
W pozycji g.3768, u 29 osób zdrowych stwierdzono sekwencję referencyjną, natomiast 1 osoba posiadała sekwencję zmutowaną w pojedynczym allelu (2%) (tabela 12, 13; rycina 11, 12).



Rycina 11. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) i alleli zmutowanych (allel B) w pozycjach: g.3615, g.3714, 3732 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób chorych.



Rycina 12. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) i alleli zmutowanych (allel B) w pozycjach: g.3615, g.3714, g.3732, g.3768 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób zdrowych.



Rycina 13. Liczba osób zdrowych z delecją w pozycji g.3615 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP.

6.2.2. Polimorfizm w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP

W sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP w obu badanych grupach (doświadczalnej i kontrolnej) wykryto liczne zmiany polimorficzne typu SNP. Najczęściej obserwowano tranzycje pomiędzy pirymidynami, które zlokalizowano w trzecim nukleotydzie w kodonie. Ze względu na degenerację kodu genetycznego zmiany SNP nie powodowały zamian kodowanych aminokwasów. Dodatkowo, jedynie w grupie kontrolnej osób zdrowych stwierdzono występowanie delecji i insercji.

W obu badanych grupach w trzecim nukleotydzie w kodonie zaobserwowano zmiany polimorficzne typu SNP występujące w 30 następujących pozycjach DNA: g.2004, g.3504,

g.3507, g.3522, g. 3525, g.3531, g.3540, g.3543, g.3549, g.3552,g.3561, g.3567, g.3570, g.3576, g.3585, g.3597, g.3612, g.3621, g.3624, g.3630, g.3639, g.3642, g.3645, g.3651, g.3657, g.3660, g.3675, g.3711, g.3720, g.3741. Dodatkowo jedynie w grupie osób zdrowych odnotowano 18 zmian polimorficznych typu SNP w pozycjach: g.2025, g.3513, g.3516, g.3558, g.3579, g.3588, g.3594, g.3603, g.3606, g.3615, g.3648, g.3654, g.3663, g.3669, g.3693, g.3738, g.3756 oraz g.3759.

6.2.2.1. Tranzycja C → T w sekwencji genu *DSPP* w kodonach kodujących serynę w rejonie kodującym białko DPP

W grupie osób chorych i zdrowych tranzycja C → T w kodonach AGC → AGT kodujących serynę wystąpiła w 14 pozycjach: g.2004, g.3504, g.3522, g.3531, g. 3540, g.3549, g.3567, g.3585, g.3612, g.3621, g.3630, g.3639, g.3675, g.3711, co nie spowodowało zmiany kodowanego aminokwasu. Wszystkie osoby były heterozygotami. W grupie osób zdrowych tranzycja C → T stwierdzono również w 5 dodatkowych loci: g.3654, g.3663, g.3693, g.3738, g.3756 (tabela 14).

Tabela 14. Zmiana AGC → AGT w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b); A – allel referencyjny, B – allel polimorficzny; * - brak doniesień w bazie Ensembl.

Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zamiana nukleotydu w kodonie	Aminokwas	Grupa	Liczba alleli A	% A	Liczba alleli B	% B	Liczba osób ze zmianą	Liczba osób z delecją
2004	C	AGC→AGT	Ser	a	16	80	4	20	4	0
				b	43	72	17	29	14	0
3504*	C	AGC→AGT	Ser	a	12	60	8	40	8	0
				b	49	82	11	18	11	0
3522*	C	AGC→AGT	Ser	a	12	60	8	40	8	0
				b	27	45	25	42	24	4
3531	C	AGC→AGT	Ser	a	10	50	10	50	10	0
				b	27	45	23	38	22	5
3540	C	AGC→AGT	Ser	a	16	80	4	20	4	0
				b	30	50	22	37	26	4
3549*	C	AGC→AGT	Ser	a	14	70	6	30	6	0
				b	31	52	21	35	21	4
3567*	C	AGC→AGT	Ser	a	18	90	2	10	2	0
				b	35	58	17	28	17	4
3585*	C	AGC→AGT	Ser	a	14	70	6	30	6	0
				b	32	53	22	37	22	3
3612*	C	AGC→AGT	Ser	a	13	65	7	35	7	0
				b	44	73	14	23	14	1
3621*	C	AGC→AGT	Ser	a	16	80	4	20	4	0
				b	52	87	6	10	6	1
3630*	C	AGC→AGT	Ser	a	15	75	5	25	5	0
				b	41	68	17	28	17	1
3639	C	AGC→AGT	Ser	a	10	50	10	50	10	0
				b	23	38	35	58	26	1
3654*	C	AGC→AGT	Ser	b	53	88	5	8	5	1
3663*	C	AGC→AGT	Ser	b	57	95	1	2	1	1
3675	C	AGC→AGT	Ser	a	13	65	7	35	7	0
				b	41	68	17	28	17	1
3693*	C	AGC→AGT	Ser	b	55	92	3	5	3	1
3711*	C	AGC→AGT	Ser	a	14	70	6	30	6	0
				b	55	92	5	8	5	0
3738	C	AGC→AGT	Ser	b	58	97	2	3	2	0
3756*	C	AGC→AGT	Ser	b	59	98	1	2	1	0

W pozycji g.2004 zamianę C → T w pojedynczym allelu wykryto u 4 osób chorych (4 allele 20%). U pozostałych 6 osób odnotowano sekwencję referencyjną w obu allelach (16 alleli, 80%). W tej samej pozycji u 11 osób zdrowych zamianę C → T odnotowano w jednym allelu (11 alleli), a u 3 badanych w obu allelach (6 alleli). Pozostałych 16 probantów posiadało sekwencję referencyjną w obu allelach (32 alleli). 17 alleli ze zmienioną sekwencją

stanowiło 28% przebadanych alleli, natomiast 43 alleli referencyjnych 72% (tabela 14; rycina 14, 15).

U 8 chorych w pozycji g.3504 odnotowano zamianę $C \rightarrow T$ w jednym allelu. 8 zmienionych alleli stanowiło 40% przebadanych alleli. 2 osoby chore posiadały oba allele referencyjne. Allele w liczbie 12 czyli 60% alleli badanych w grupie osób chorych miało sekwencję referencyjną. Jednocześnie, u 11 zdrowych probantów wykryto identyczną zamianę w jednym allelu (11 alleli, 18%), a 19 osób posiadało sekwencję referencyjną w obu allelach (38 alleli). Ostatecznie 49 (82%) alleli badanych w grupie kontrolnej posiadało sekwencję referencyjną (tabela 14; rycina 14, 15).

W pozycji g.3522 u 8 chorych zaobserwowano zamianę $C \rightarrow T$ w pojedynczym allelu, co stanowiło 40%. Pozostałe 12 alleli posiadało sekwencję referencyjną (60%), w tym 2 osoby miały oba allele z sekwencją referencyjną. Z kolei u 23 zdrowych osób w pozycji g.3522 zamiana $C \rightarrow T$ wystąpiła w jednym allelu (23 allele). U 1 osoby stwierdzono oba allele z sekwencją T. Natomiast 2 badanych posiadało oba allele z sekwencją referencyjną C. 25 alleli z sekwencją polimorficzną stanowiło 42% przebadanych alleli z grupy kontrolnej, a 27 alleli referencyjnych odpowiednio 45%. Jednocześnie w tej samej pozycji odnotowano delecję u 4 zdrowych osób (tabela 14; rycina 14, 15, 16).

W pozycji g.3531, 10 chorych osób posiadało po jednym allelu z sekwencją T ($C \rightarrow T$) (10 alleli), co stanowiło 50% przebadanych alleli. Pozostałe 50% tworzyło 10 alleli z sekwencję referencyjną. Zamianę $C \rightarrow T$ w pozycji g.3531 stwierdzono również u 21 zdrowych osób, po jednym allelu (21 alleli) u każdego probanta, natomiast u 1 probanta zmienione zostały dwa allele. Równocześnie u 5 osób stwierdzono delecję. Jedynie 3 osoby zdrowe posiadały oba allele z sekwencją referencyjną. Reasumując w grupie kontrolnej 23 allele, czyli 38% posiadały sekwencję polimorficzną, natomiast 27 alleli (45%) było z sekwencją referencyjną (tabela 14; rycina 14, 15, 16).

Kolejno u 4 chorych probantów zaobserwowano zamianę $C \rightarrow T$ w jednym allelu w pozycji g.3540. 4 allele polimorficzne stanowiły 20% przebadanych alleli. U 6 osób nie wykryto zmian w żadnym z alleli. Łącznie w grupie chorych 16 (80%) alleli posiadało sekwencję referencyjną. W lokalizacji g.3540 jeden allel z sekwencją zmienioną $C \rightarrow T$ wykryto u 22 zdrowych probantów (22 allele), równocześnie 4 osoby miały oba allele niezmienione. Natomiast u 4 badanych odnotowano delecję. 37% przebadanych alleli stanowiły 22 allele polimorficzne, natomiast 50% tworzyło 30 alleli referencyjnych (tabela 14; rycina 14, 15, 16).

W pozycji g.3549 u 6 badanych chorych probantów stwierdzono zamianę $C \rightarrow T$ w pojedynczym allelu, podczas gdy 4 osoby posiadały oba allele z sekwencją referencyjną. 6 zmienionych alleli tworzyło 30% przebadanych alleli w grupie osób chorych, jednocześnie pozostałe niezmienione 14 alleli stanowiło 70%. U osób zdrowych zamiana $C \rightarrow T$ wystąpiła w jednym allelu u 21 badanych (21 alleli), natomiast u 4 osób stwierdzono delecję. Pozostałe 5 osób posiadało obydwa allele z sekwencją referencyjną. Sumując, 35% (21 alleli) alleli posiadało sekwencję polimorficzną, a 52% (31 alleli) było zgodne z sekwencją referencyjną (tabela 14; rycina 14, 15, 16).

W lokalizacji g.3567 tranzycja $C \rightarrow T$ w jednym allelu wystąpiła u 2 chorych oraz 17 zdrowych probantów. 2 zmienione allele u osób chorych to 10% przebadanych alleli w tej grupie, natomiast 17 alleli u osób zdrowych daje odsetek 28%. Oba allele z sekwencją referencyjną odnotowano u 8 osób chorych, co stanowiło 18 alleli i odpowiednio 90% alleli z sekwencją referencyjną. W grupie osób zdrowych 9 badanych posiadało oba allele referencyjne (18 alleli), a u 4 osób stwierdzono delecję w tej pozycji. Reasumując, w grupie kontrolnej 28% (17) alleli posiadało sekwencję polimorficzną, a 58% (35) alleli nie uległo zamianie (tabela 14; rycina 14, 15, 16).

U 6 badanych chorych wykryto zamianę $C \rightarrow T$ w pozycji g.3585 w 6 pojedynczych allelach, czyli w 30%, a 4 osoby miały oba allele zgodne z sekwencją referencyjną. 14 niezmienionych alleli stanowiło 70% wszystkich alleli analizowanych w grupie osób chorych. Zamianę cytozyny w tyminę w jednym allelu stwierdzono jednocześnie u 22 zdrowych osób (22 allele). 5 badanych z grupy kontrolnej posiadało sekwencję referencyjną w obu allelach (10 alleli), a u 3 zdrowych probantów nastąpiła delecja. Łącznie w grupie kontrolnej 37% (22 allele) alleli posiadało sekwencję zmienioną T, natomiast 53% (32 allele) stanowiły allele referencyjne C (tabela 14; rycina 14, 15, 16).

W pozycji g.3612 zamiana $C \rightarrow T$ w pojedynczym allelu wystąpiła u 7 osób chorych (7 alleli, 35%) oraz 14 osób zdrowych (14 alleli, 23%). Oba allele niezmienione zaobserwowano u 3 chorych i 15 zdrowych probantów. Zatem w grupie chorych 13 alleli posiadało sekwencję referencyjną (65%), a u zdrowych probantów sekwencja referencyjna wystąpiła w 44 allelach (73%). 1 zdrowy probant miał delecję w pozycji g. 3612 (tabela 14, rycina 14, 15, 16).

W pozycji g.3621 $C \rightarrow T$ uległo zamianie u 4 badanych chorych w 4 pojedynczych allelach, które stanowiły 20% alleli badanych w tej grupie. Pozostałe 6 osób nie miało zmienionych alleli. Podsumowując, 16 alleli posiadało niezmienioną sekwencję, stanowiąc 80% przebadanych alleli. W pozycji g.3621 zamiana $C \rightarrow T$ w jednym allelu wystąpiła u 6 zdrowych probantów (6 alleli), a u 1 osoby z tej grupy stwierdzono delecję. 23 badanych posiadało sekwencję referencyjną w obu allelach. W konsekwencji 10% (6 alleli) posiadało sekwencję polimorficzną, a 87% (52 allele) alleli miało sekwencję referencyjną (tabela 14; rycina 14, 15, 16).

W pozycji g.3630 odnotowano zamianę $C \rightarrow T$ w jednym allelu u 5 chorych probantów. Jednocześnie u pozostałych 5 nie wykryto zmian. 5 zmienionych alleli stanowiło 25% przebadanych alleli, a 15 alleli z sekwencją referencyjną stanowiło 75%. Jednocześnie

sekwencję T w jednym allelu stwierdzono u 17 zdrowych osób (17 alleli), a u 1 badanego wystąpiła delecja. Sekwencja referencyjna w obu allelach została odnotowana u 12 zdrowych probantów. Ostatecznie 28% (17 alleli) to allele polimorficzne, a 68% (41 alleli) referencyjne (tabela 14; rycina 14, 15, 16).

U 10 chorych osób doszło do zmiany C → T w pojedynczym allelu w pozycji g.3639. Łącznie w 10 allelach, które stanowiły 50% przebadanych alleli odnotowano sekwencję polimorficzną T, natomiast pozostałe 10 alleli dawało 50% odsetek alleli referencyjnych w grupie osób chorych. Dla porównania, u 17 zdrowych probantów zamiana C → T w pozycji g. 3639 wystąpiła w pojedynczym allelu (17 alleli), a u 1 osoby wykryto delecję. Ponadto, 9 osób posiadało oba allele polimorficzne (18 alleli), a tylko 3 osoby oba allele referencyjne. Z obliczeń wynika, iż w grupie kontrolnej 58% (35 alleli) alleli posiadało sekwencję polimorficzną, a 38% (23 allele) sekwencję referencyjną (tabela 14; rycina 14, 15, 16).

W pozycji g.3654 wykryto zmienioną sekwencję T w jednym allelu u 5 zdrowych osób (5 alleli), jednocześnie u 1 badanego wystąpiła delecja. Pozostałe 24 zdrowe osoby (48 alleli) miały sekwencję referencyjną C. 8% (5 alleli) alleli przebadanych stanowiły allele z sekwencją polimorficzną, a 88% (53 allele) alleli to allele z sekwencją referencyjną (tabela 14; rycina 15, 16).

U 1 osoby zdrowej w pozycji g.3663 odnotowano zamianę C → T w pojedynczym allelu. Również u 1 osoby doszło do delecji, a pozostałych 28 zdrowych badanych posiadało allele referencyjne (56 alleli). 2% stanowił 1 allel polimorficzny, a 95% (57 alleli) alleli z sekwencją zgodną z referencyjną (tabela 14; rycina 15, 16).

W pozycji g.3675 tranzycja C → T pojawiła się u 7 chorych osób w pojedynczym allelu (7 alleli), co stanowiło 35% przebadanych alleli w grupie osób chorych. Równocześnie u 3 probantów żaden z alleli nie uległ zmianie. 13 alleli z sekwencją referencyjną stanowiło 65%. W tej samej pozycji zamiana C → T w pojedynczym allelu wystąpiła u 17 zdrowych

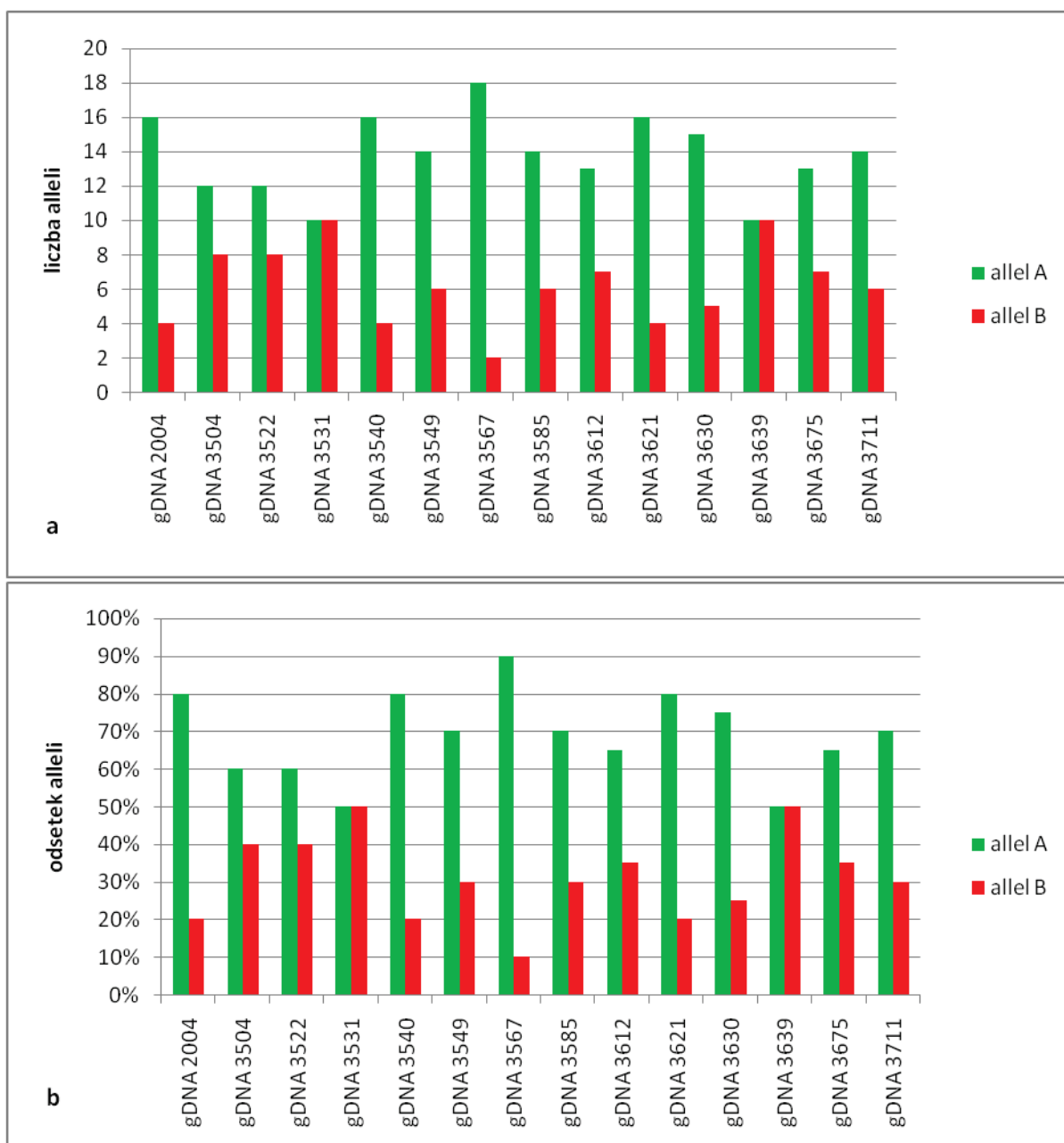
probandów (17 alleli), jednocześnie u 1 osoby stwierdzono delecję. Pozostałe 12 zdrowych osób posiadało sekwencję referencyjną w obu allelach. 17 alleli polimorficznych stanowiło 28% alleli przebadanych w grupie kontrolnej, natomiast allele z sekwencją referencyjną (41 alleli) stanowiły 68% (tabela 14; rycina 14, 15, 16).

U osób zdrowych w lokalizacji g.3693 zamianę C → T w pojedynczym allelu wykryto u 3 probantów (3 allele), natomiast u 1 badanego stwierdzono delecję. Pozostałe 26 osób posiadało oba allele z sekwencją referencyjną. Podsumowując, 92% (55 alleli) alleli to allele referencyjne, a 5% (3 allele) alleli posiadało sekwencję polimorficzną (tabela 14; rycina 15, 16).

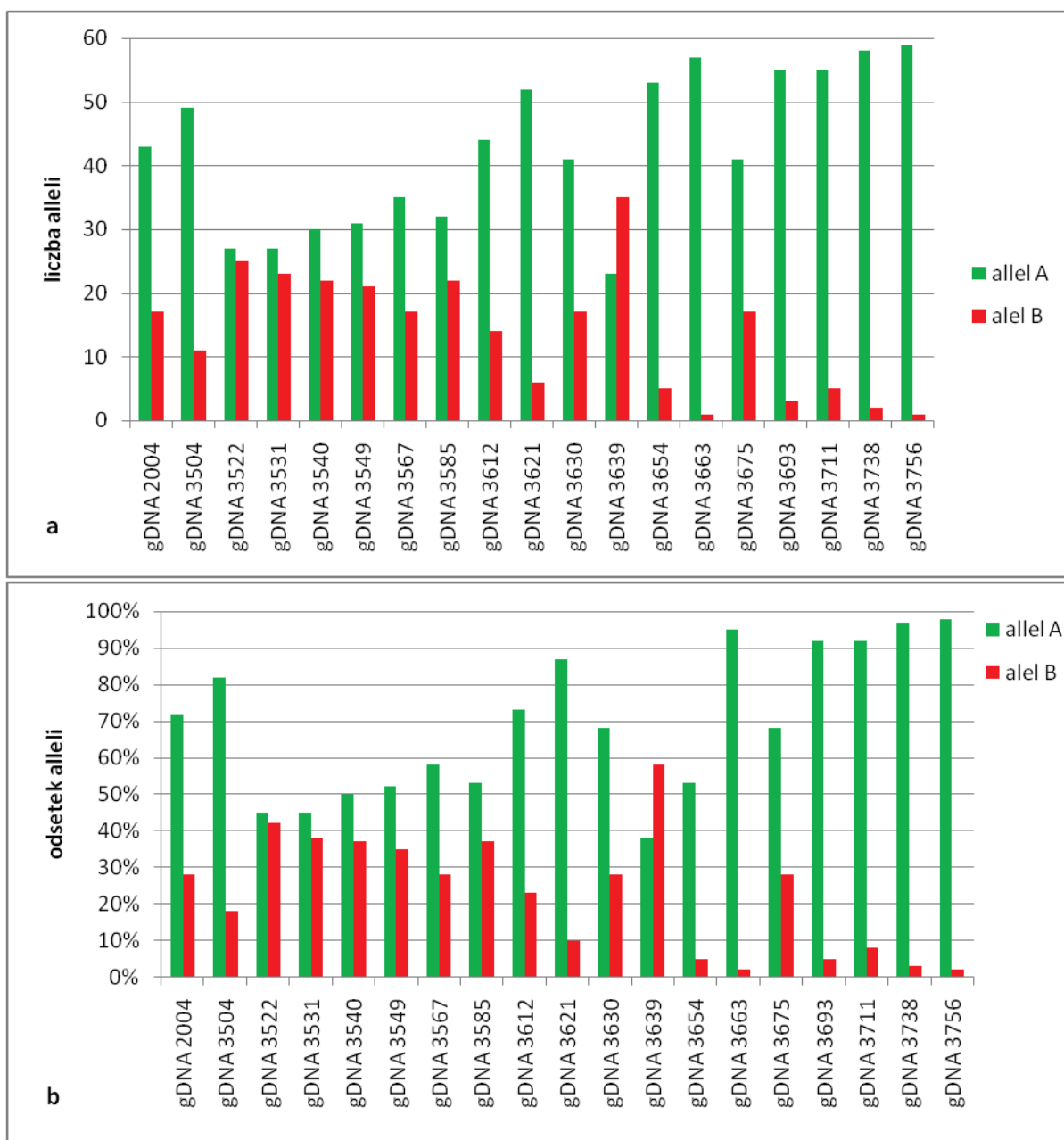
W pozycji g.3711 u 6 chorych i 5 zdrowych probantów zaobserwowano zamianę C → T w pojedynczym allelu. 6 zmienionych alleli w grupie chorych stanowiło 30% przebadanych alleli, a w grupie zdrowych 8%. Z kolei 4 osoby chore miały oba allele z sekwencją referencyjną, podczas gdy w grupie kontrolnej było to 25 osób. 14 alleli z sekwencją referencyjną w grupie chorych stanowiło odpowiednio 70%, a 55 alleli w grupie kontrolnej daje odsetek 92% (tabela 14; rycina 14, 15).

W pozycji g.3738 zmieniona sekwencja C → T w jednym allelu wystąpiła u 2 zdrowych probantów (2 allele), a pozostałe 28 osób z tej grupy posiadało sekwencję C zgodną z referencyjną. 58 alleli prawidłowych stanowiło 97% , a 2 polimorficzne odpowiednio 3%. W grupie chorych nie odnotowano zmian typu SNP w pozycji g. 3738 (tabela 14; rycina 15).

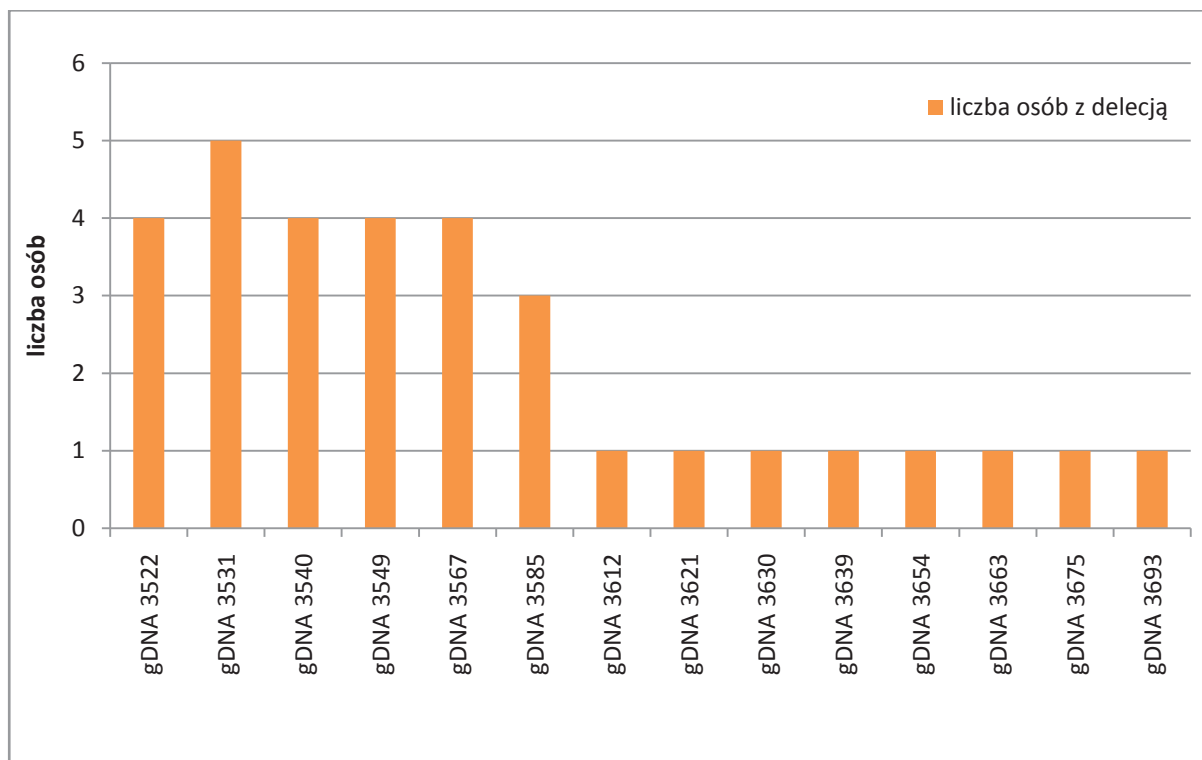
Podobnie jak w poprzedniej lokalizacji, zamianę C → T w lokalizacji g.3756 odnotowano jedynie w grupie zdrowych probantów. W pojedynczym allelu sekwencja polimorficzna T pojawiła się u 1 osoby (1 allel), co stanowiło 2% alleli przebadanych w tej grupie. Pozostałe 59 alleli, które były niezmiennione stanowiło 98% (tabela 14; rycina 15).



Rycina 14. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli polimorficznych (allel B) w pozycjach: g.2004, g.3504, g.3522, g.3531, g. 3540, g.3549, g.3567, g.3585, g.3612, g.3621, g.3630, g.3639, g.3675, g.3711 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób chorych.



Rycina 15. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) i alleli polimorficznych (allel B) w pozycjach: g.2004, g.3504, g.3522, g. 3531, g.3540, g.3549, g.3567, g.3585, g.3612, g.3621, g.3630, g.3639, g.3654, g.3663, g.3675, g.3693, g.3711, g.3738, g.3756 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób zdrowych.



Rycina 16. Liczba osób zdrowych z delecją w pozycjach: g.3522, g.3531, g.3540, g.3549, g.3567, g.3585, g.3621, g.3630, g.3639, g.3654, g.3663, g.3669, g.3675, g.3693 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP.

6.2.2.2. Tranzycja T → C w sekwencji genu *DSPP* w kodonach kodujących serynę w rejonie kodującym białko DPP

W grupie osób chorych i zdrowych w sekwencji genu *DSPP* polimorfizm o charakterze tranzycji T → C w ostatnim nukleotydzie w kodonie AGT → AGC zaobserwowano w 4 pozycjach: g.3576, g.3645, g.3657 oraz g.3720. Ze względu na degenerację kodu genetycznego zmiany te nie skutkowały zamianą kodowanego aminokwasu – seryny. Dodatkowo, w grupie osób zdrowych tranzycję T → C (AGT → AGC) zaobserwowano w 5 pozycjach: g.3513, g.3558, g.3594, g.3603, g.3648, (tabela 15).

Tabela 15. Zamiana AGT → AGC w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b); A – allel referencyjny, B – allel zmieniony; * - brak doniesień w bazie Ensembl.

Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zmiana nukleotydu w kodonie	Aminokwas	Grupa	Liczba alleli A	% A	Liczba alleli B	% B	Liczba osób ze zmianą	Liczba osób z delecją
3513*	T	AGT→AGC	Ser	b	52	87	8	13	8	0
3558	T	AGT→AGC	Ser	b	47	78	5	8	5	4
3576	T	AGT→AGC	Ser	a	18	90	2	10	2	0
				b	43	72	9	15	9	4
3594	T	AGT→AGC	Ser	b	54	90	2	3	2	2
3603	T	AGT→AGC	Ser	b	56	93	2	3	2	1
3645	T	AGT→AGC	Ser	a	14	70	6	30	6	0
				b	49	82	9	15	9	1
3648	T	AGT→AGC	Ser	b	57	95	1	2	1	1
3657	T	AGT→AGC	Ser	a	14	70	6	30	6	0
				b	54	90	4	7	4	1
3720	T	AGT→AGC	Ser	a	16	80	4	20	4	0
				b	56	93	4	7	4	0

U 8 zdrowych probantów w pozycji g.3513 odnotowano zamianę T → C w jednym allelu (8 alleli), natomiast u 22 badanych stwierdzono oba allele z sekwencją referencyjną T. Allele polimorficzne stanowiły 13% (8 alleli) wszystkich przebadanych alleli, a allele referencyjne 87% (52 allele) (tabela 15; rycina 18).

W lokalizacji g.3558 tranzycja T → C w jednym allelu wystąpiła u 5 zdrowych osób (5 alleli), pozostałe 21 osób posiadało sekwencję referencyjną w obu allelach. Dodatkowo, u 4 badanych wykryto delecję. Reasumując, 5 alleli zmienionych stanowiło 8%, a 47 alleli z sekwencją referencyjną 78% alleli badanych w tej grupie (tabela 15; rycina 18, 19).

W pozycji g.3576 wystąpiła zamiana T → C u 2 osób chorych w pojedynczym allelu, łącznie w 2 allelach, które stanowiły 10% przebadanych alleli. Natomiast u 8 osób allele posiadały sekwencje referencyjną T, zatem 18 alleli miało sekwencję referencyjną, co stanowiło 90% alleli przebadanych w grupie osób chorych. W tej samej pozycji g. 3576 zamianę T → C w pojedynczym allelu stwierdzono u 9 zdrowych probantów (9 alleli). U kolejnych 17 zdrowych probantów wystąpiła sekwencja referencyjna, natomiast u 4 badanych

doszło do delecji. W konsekwencji allele referencyjne stanowiły 72% (43 allele), a polimorficzne 15% (9 alleli) (tabela 15; rycina 17,18, 19).

Kolejną tranzycję $T \rightarrow C$ w pojedynczym allele wykryto u 2 zdrowych probantów (2 allele) w pozycji g.3594. Jednocześnie 26 osób miało w obu allelach sekwencję referencyjną T, a u 2 badanych wystąpiła delecja. Ostatecznie 90% alleli (54 allele) posiadało sekwencję referencyjną, natomiast 3% (2 allele) sekwencję polimorficzną (tabela 15; rycina 18, 19).

U 2 zdrowych osób odnotowano zamianę $T \rightarrow C$ w jednym allele (2 allele) w pozycji g.3603, a u 1 osoby wykryto delecję. 27 badanych posiadało sekwencję referencyjną w obu allelach. Reasumując allele referencyjne stanowiły 93% (56 alleli), a polimorficzne 3% (2 allele) (tabela 15; rycina 18, 19).

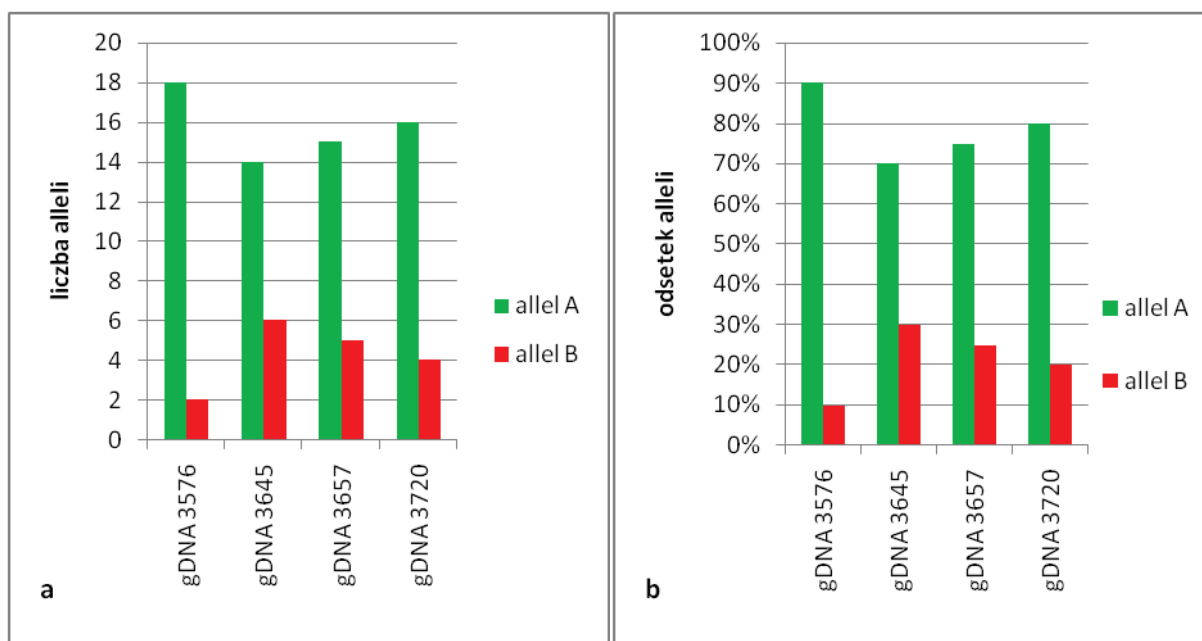
W pozycji g.3645 w pojedynczym allele doszło do tranzycji $T \rightarrow C$ u 6 chorych osób. Te 6 alleli stanowiło 30% alleli przebadanych w grupie osób chorych. Brak zmian w obu allelach odnotowano u 4 badanych. Allele w liczbie 14 (70%) posiadały sekwencję referencyjną T. W pozycji g.3645 zamiana w jednym allele wystąpiła u 9 zdrowych probantów (9 alleli), a u 1 osoby doszło do delecji. Pozostałe 20 zdrowych osób posiadało sekwencję T zgodną z referencyjną. Ostatecznie allele referencyjne stanowiły 82% (49 alleli), a polimorficzne 15% (9 alleli). (tabela 15; rycina 17, 18, 19).

Zamiana $T \rightarrow C$ w jednym allele wystąpiła u 1 zdrowej osoby (1allel) w pozycji g.3648, równocześnie u 1 osoby stwierdzono delecję. 28 badanych zdrowych probantów posiadało sekwencję referencyjną T. W pozycji g.3648, 95% (57 alleli) stanowiły allele referencyjne, a 2% (1 allel) allele polimorficzne (tabela 15; rycina 18, 19).

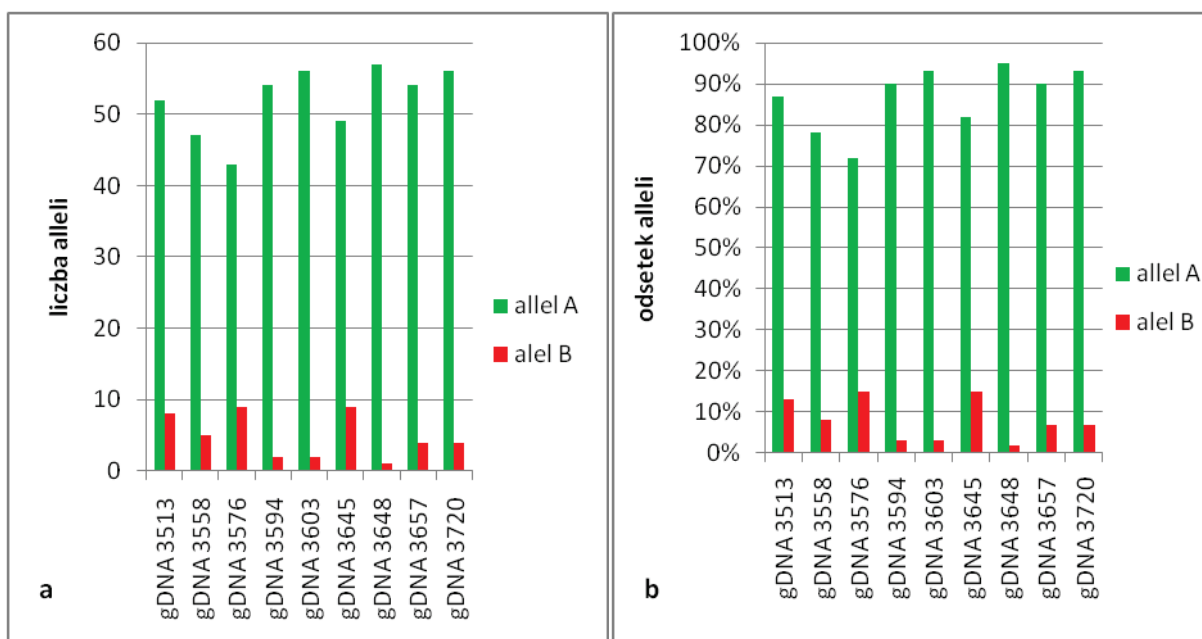
U 6 chorych probantów wykryto zamianę $T \rightarrow C$ w pozycji g.3657 w pojedynczych allelach (6 alleli), które stanowiły 30% alleli przebadanych w grupie osób chorych. 4 osoby chore posiadały oba allele z sekwencją referencyjną. Łącznie 14 alleli z sekwencją zgodną z referencyjną stanowiło 70% alleli przebadanych w tej grupie. W tej samej lokalizacji u 4

zdrowych badanych doszło do zamiany $T \rightarrow C$ w pojedynczym allelu (4 allele) oraz u 1 osoby wystąpiła delecja. Sekwencję referencyjną w obu allelach odnotowano u 25 osób. Podsumowując, allele referencyjne stanowiły 90% (54 allele), a zmienione 7% (4 allele) wszystkich alleli przebadanych w grupie osób zdrowych (tabela 15; rycina 17, 18, 19).

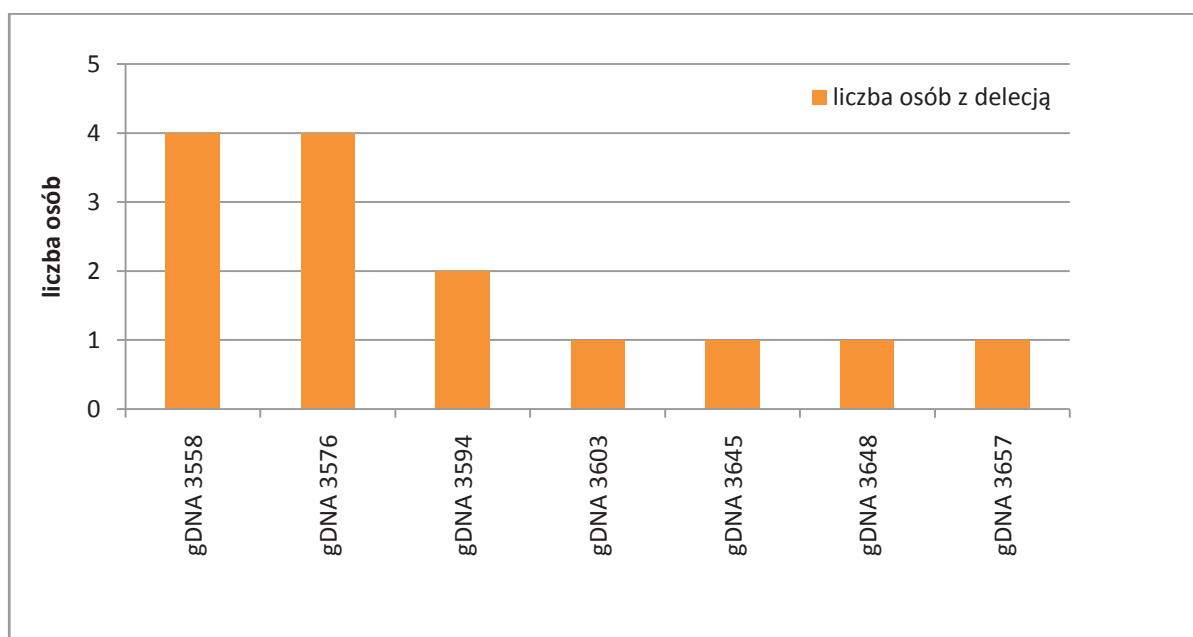
Zamianę $T \rightarrow C$ odnotowano również w pozycji g.3720 u 4 chorych oraz 4 osób zdrowych w pojedynczym allelu. U 6 probantów chorych nie zaobserwowano zmian sekwencji. 4 allele polimorficzne stanowiły 20% alleli przebadanych w grupie osób chorych, a nukleotyd referencyjny T występował w 16 allelach, czyli 80%. Z kolei 26 zdrowych probantów posiadało sekwencję referencyjną w obu allelach. W konsekwencji allele referencyjne stanowiły 93% (56 alleli), a zmienione 7% (4 allele) alleli analizowanych w grupie kontrolnej (tabela 15; rycina 17, 18).



Rycina 17. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli polimorficznych (allel B) w pozycjach: g.3576, g.3645, g.3657, g.3720 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób chorych.



Rycina 18. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) i alleli polimorficznych (allel B) w pozycjach: g.3513, g.3558, g.3576, g.3594, g.3603, g.3645, g.3648, g.3657, g.3720 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób zdrowych.



Rycina 19. Liczba osób zdrowych z delecją w pozycjach: g.3558, g.3576, g.3594, g.3603, g.3645, g.3648, g.3657 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP.

6.2.2.3. Tranzycja T → C w sekwencji genu *DSPP* w kodonach kodujących kwas asparaginowy w rejonie kodującym białko DPP

U osób chorych i w grupie kontrolnej polimorfizm o charakterze tranzycji T → C w ostatnim nukleotydzie w kodonie GAT → GAC kodującym kwas asparaginowy odnotowano w pozycjach: g.3525, g.4552, g.3597, g.3624, g.3642, g.3651. Wszystkie zmiany w grupie osób chorych dotyczyły tylko pojedynczego allele. Dodatkowo, u osób zdrowych odnotowano ten sam rodzaj polimorfizmu w 2 pozycjach: g.3579 i g.3759 (tabela 16).

Tabela 16. Zamiana GAT → GAC w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b); A – allele referencyjne, B – allele zmienione; * - brak doniesień w bazie Ensembl.

Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zamiana nukleotydu w kodonie	Aminokwas	Grupa	Liczba alleli A	% A	Liczba alleli B	% B	Liczba osób ze zmianą	Liczba osób z delecją
3525	T	GAT→GAC	Asp	a	16	80	4	20	4	0
				b	36	60	14	23	13	5
3552	T	GAT→GAC	Asp	a	17	85	3	15	3	0
				b	35	58	17	28	17	4
3579	T	GAT→GAC	Asp	b	41	68	11	18	11	4
3597	T	GAT→GAC	Asp	a	16	80	4	20	4	0
				b	47	78	9	15	9	2
3624	T	GAT→GAC	Asp	a	13	65	7	35	7	0
				b	44	73	14	23	13	1
3642	T	GAT→GAC	Asp	a	15	75	5	25	5	0
				b	50	83	8	13	8	1
3651	T	GAT→GAC	Asp	a	17	85	3	15	3	0
				b	57	95	1	2	1	1
3759*	T	GAT→GAC	Asp	b	59	98	1	2	1	0

W pozycji g.3525 doszło do zamiany T → C w pojedynczym allele u 4 chorych probantów, a u 6 nie stwierdzono zmian. 4 zmienione allele stanowiły 20% wszystkich alleli, natomiast 16 alleli z sekwencją referencyjną odpowiednio 80%. W tej samej lokalizacji odnotowano zamianę u 13 zdrowych probantów, w tym u 1 probanta stwierdzono zamianę w obu allelech (14 alleli). U 5 osób doszło do delecji, a pozostałe 12 miało sekwencję referencyjną T w obu allelech. W konsekwencji allele z sekwencją referencyjną T w grupie kontrolnej stanowiły 60% (36 alleli), a z sekwencją polimorficzną C 23% (14 alleli) (tabela 16; rycina 20, 21, 22).

U 3 osób chorych odnotowano zamianę $T \rightarrow C$ w pojedynczym allelu w pozycji g.3552 łącznie w 3 allelach, które stanowiły 15% przebadanych alleli. 7 chorych posiadało oba allele z sekwencją referencyjną. Zatem w grupie osób chorych 85% stanowiło 17 alleli z sekwencją referencyjną. Jednocześnie w grupie kontrolnej zamiana $T \rightarrow C$ wystąpiła w pojedynczym allelu u 17 osób (17 alleli), a u 4 wykryto delecję. Pozostałych 9 badanych miało sekwencję referencyjną w obu allelach. Reasumując, 58% (35 alleli) tworzyły allele z sekwencją referencyjną T, a 28% (17 alleli) allele zmienione (tabela 16; rycina 20, 21, 22).

Kolejno, w pozycji g. 3579 u 11 zdrowych probantów zaobserwowano zmianę $T \rightarrow C$ w pojedynczym allelu (11 alleli) w pozycji g.3579, natomiast u 4 badanych doszło do delecji. U 15 osób zdrowych odnotowano sekwencję referencyjną T w obu allelach. Ostatecznie 18% (11 alleli) stanowiły allele z sekwencją zmienioną C, a allele referencyjne 68% (41 alleli) wszystkich alleli przebadanych w grupie osób zdrowych (tabela 16; rycina 21, 22).

W lokalizacji g.3597 sekwencję zmienioną C u 4 osób chorych stwierdzono w pojedynczym allelu, co stanowiło 20% wszystkich alleli badanych w tej grupie, natomiast sekwencja referencyjna T wystąpiła w obu allelach u 6 badanych. Łącznie w 16 allelach (80%) odnotowano sekwencję T. W grupie osób zdrowych, w tym samym loci doszło do zamiany $T \rightarrow C$ w pojedynczym allelu u 9 badanych (9 alleli), a u 2 osób odnotowano delecję. Natomiast 19 osób posiadało oba allele referencyjne. Zatem allele polimorficzne stanowiły 15%, a 47 alleli referencyjnych – 78% wszystkich alleli badanych w grupie kontrolnej (tabela 16; rycina 20, 21, 22).

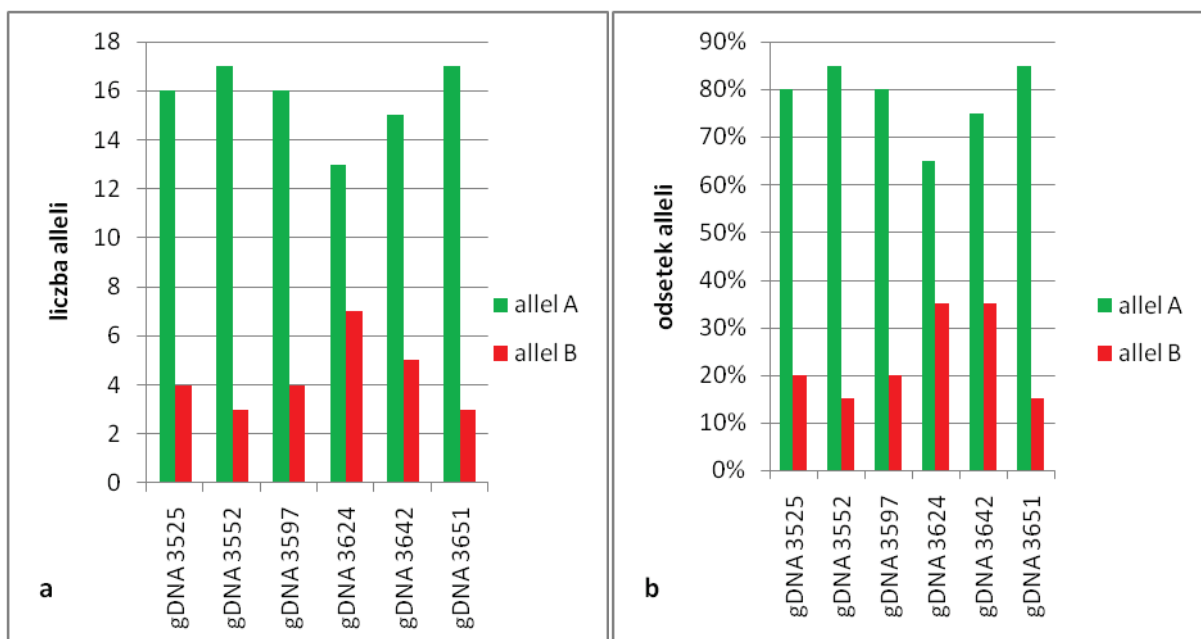
W pozycji g.3624 zamiana $T \rightarrow C$ pojedynczego allele wystąpiła u 7 badanych chorych (7 alleli), co tworzyło odsetek 35% przebadanych alleli. 3 osoby chore posiadały oba allele z sekwencją referencyjną. W konsekwencji 13 alleli referencyjnych stanowiło 65%. W tej samej pozycji g.3624 doszło do zamiany w pojedynczym allelu u 12 zdrowych probantów (12 alleli), a u 1 zdrowego probanta zamiana $T \rightarrow C$ nastąpiła w obu allelach (2 allele).

Dodatkowo, u 1 osoby zdrowej wystąpiła delecja, a 16 badanych posiadało sekwencję referencyjną w obu allelach. Łącznie 73% alleli w grupie kontrolnej posiadało sekwencję referencyjną T (tabela 16, rycina 20, 21, 22).

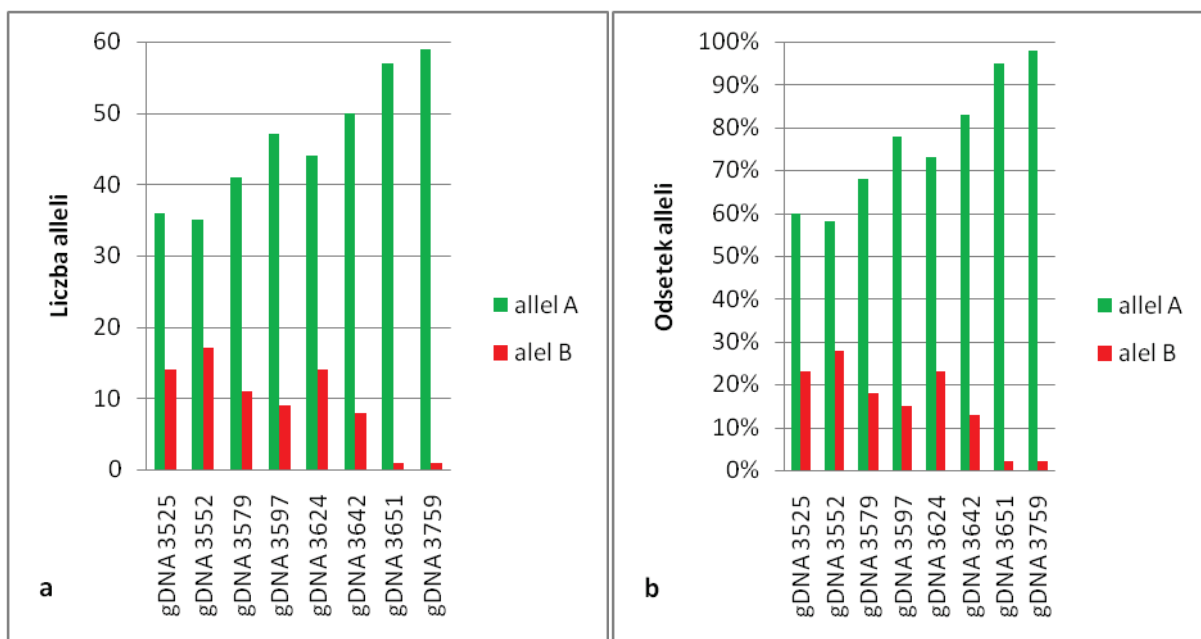
U 5 chorych probantów w pozycji g.3642 doszło do zamiany $T \rightarrow C$ w pojedynczym allelu (5 alleli), a u pozostałych 5 osób nie wykryto zmian w żadnym z alleli. Łącznie w grupie osób chorych 5 alleli posiadało sekwencję zmienioną C, a 15 alleli sekwencję referencyjną T, odpowiednio 25% i 75%. W grupie osób zdrowych odnotowano zmianę $T \rightarrow C$ w pojedynczym allelu u 8 badanych (8 alleli) oraz delecję u 1 osoby. Pozostałych 21 badanych miało sekwencję zgodną z referencyjną w obu allelach. Zatem 8 alleli polimorficznych stanowiło 13%, a 50 alleli referencyjnych 83% wszystkich przebadanych alleli (tabela 16; rycina 20, 21, 22).

W pozycji g.3651 zaobserwowano zamianę $T \rightarrow C$ w pojedynczym allelu u 3 chorych i 1 zdrowego probanta. Jednocześnie 7 osób chorych i 28 osób zdrowych miało oba allele zgodne z sekwencją referencyjną. Dodatkowo u 1 osoby zdrowej odnotowano delecję. Sumując, w grupie osób chorych 3 allele polimorficzne stanowiły 15%, a 17 alleli z sekwencją referencyjną 85% wszystkich alleli. Natomiast w grupie kontrolnej 1 allel zmieniony to 2%, a 57 alleli z sekwencją referencyjną to 95% (tabela 16; rycina 20, 21, 22).

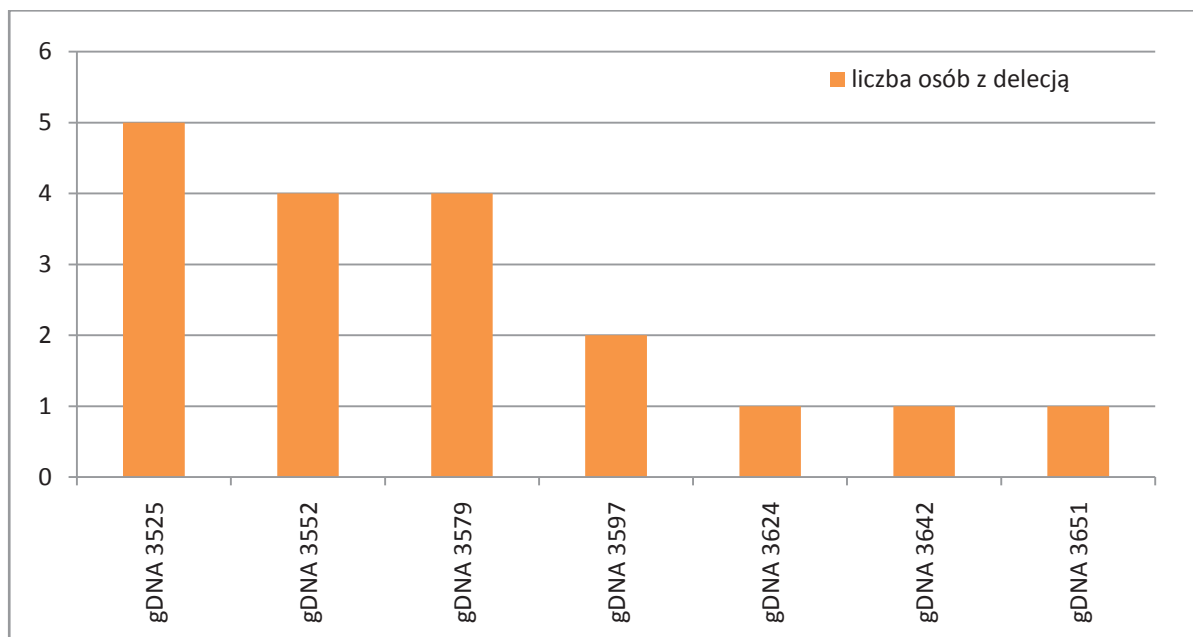
Ostatnią pozycją, w której stwierdzono zamianę $T \rightarrow C$ była pozycja g.3759. Zamianę odnotowano jedynie u 1 zdrowego probanta, u którego sekwencja polimorficzna C wystąpiła w pojedynczym allelu. Pozostali probanci posiadali sekwencję referencyjną T. 1 allel polimorficzny stanowił 2%, a 59 alleli referencyjnych 98% alleli przebadanych w grupie osób zdrowych (tabela 16; rycina 21).



Rycina 20. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli polimorficznych (allel B) w pozycjach: g.3525, g.3552, g.3597, g.3624, g.3642, g.3651 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób chorych.



Rycina 21. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) i alleli polimorficznych (allel B) w pozycjach: 3525, g.3552, g.3579, g.3624, g.3642, g.3651, g.3759 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób zdrowych.



Rycina 22. Liczba osób zdrowych z delecją w pozycjach: 3525, g.3552, g.3579, g.3624, g.3642, g.3651, g.3759 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP.

6.2.2.4. Tranzycja C → T w sekwencji genu *DSPP* w kodonach kodujących kwas asparaginowy w rejonie kodującym białko DPP

W grupie osób chorych tranzycja C → T w kodonach GAC → GAT kodujących kwas asparaginowy wystąpiła w 5 pozycjach: g.3507, g.3543, g.3561, g.3660, g.3741. Ponieważ zamianie uległ ostatni nukleotyd w kodonie, zamiana nie powodowała zmiany kodowanego aminokwasu. Wszystkie osoby miały zmieniony tylko jeden allel. W grupie osób zdrowych ten sam polimorfizm (GAC → GAT) wystąpił w dodatkowych 5 pozycjach: g.3516, g.3588, g.3606, g.3615, g.3669 (tabela 17).

Tabela 17. Zamiana GAC → GAT w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b); A – allel referencyjny, B – allel zmieniony; * - brak doniesień w bazie Ensembl.

Pozycja w DNA	Zamiana nukleotydu w kodonie	Nukleotyd referencyjny	Aminokwas	Grupa	Liczba alleli A	% A	Liczba alleli B	% B	Liczba osób ze zmianą	Liczba osób z delecją
3507	GAC→GAT	C	Asp	a	18	90	2	10	2	0
				b	55	92	5	8	5	0
3516*	GAC→GAT	C	Asp	b	56	93	4	7	4	0
3543	GAC→GAT	C	Asp	a	17	85	3	15	3	0
				b	50	83	2	3	2	4
3561	GAC→GAT	C	Asp	a	19	95	1	5	1	0
				b	48	80	4	7	4	4
3588*	GAC→GAT	C	Asp	b	46	77	8	13	8	3
3606	GAC→GAT	C	Asp	b	53	88	5	8	5	1
3615*	GAC→GAT	C	Asp	b	48	80	2	3	2	1
3660*	GAC→GAT	C	Asp	a	19	95	1	5	1	0
				b	51	85	7	12	7	1
3669	GAC→GAT	C	Asp	b	56	93	2	3	2	1
3741	GAC→GAT	C	Asp	a	16	80	4	20	4	0
				b	57	95	3	5	3	0

W pozycji g.3507 u 8 chorych osób stwierdzono oba allele referencyjne. Jednocześnie odnotowano zamianę C → T w jednym allelu u 2 badanych, łącznie w 2 allelach, które stanowiły 10% przebadanych alleli. Pozostałe 18 alleli posiadało sekwencję referencyjną, co stanowiło 90%. U 5 zdrowych probantów w tej samej pozycji wystąpiła zamiana w pojedynczym allelu (5 alleli), reszta osób w liczbie 25 miała sekwencję referencyjną C. Sumując, w grupie kontrolnej allele polimorficzne stanowiły 8% (5 alleli), a referencyjne 92% (55 alleli) (tabela 17; rycina 23, 24).

W pozycji g.3516 doszło do zamiany C → T w jednym allelu u 4 zdrowych badanych (4 allele). U 26 osób stwierdzono w obu allelach sekwencję referencyjną C. 7% stanowią allele z sekwencją polimorficzną T (4 allele), pozostałe 93% tworzą allele z sekwencją referencyjną (56 alleli) (tabela 17; rycina 24).

W pozycji g.3543 zamiana C → T w pojedynczym allelu wystąpiła u 3 chorych i 2 zdrowych probantów. U 7 chorych i 24 zdrowych probantów sekwencja referencyjna wystąpiła w obu allelach. W grupie osób chorych 3 allele polimorficzne stanowiły 15%

przebadanych alleli. Jednocześnie 17 alleli miało niezmienną sekwencję, co stanowiło 85%. Natomiast w grupie osób zdrowych dodatkowo odnotowano delecję nt.3543 u 4 probantów. Pozostałe 24 osoby posiadały sekwencję referencyjną w obu allelach, co daje 83% (50 alleli) alleli zgodnych z sekwencją referencyjną i 3% (2 allele) alleli polimorficznych (tabela 17; rycina 23, 24, 26).

U 1 osoby chorej w pozycji g.3561 stwierdzono występowanie 1 allelu polimorficznego T, który stanowił 5% przebadanych alleli, a u 9 badanych nie odnotowano zmian w żadnym allelu. 19 alleli (95%) było zgodnych z sekwencją referencyjną. Natomiast, w grupie osób zdrowych odnotowano tranzycję w jednym allelu u 4 probantów (4 allele) oraz delecję u 4 osób. Sekwencję zgodną z referencyjną w obu allelach zaobserwowano u 22 osób. W konsekwencji w grupie zdrowych probantów 80% (48 alleli) to allele referencyjne, a 7% (4 allele) allele polimorficzne (tabela 17; rycina 23, 24, 25).

Kolejno, u 8 zdrowych osób doszło do zamiany C $\rightarrow$ T w pojedynczym allelu (8 alleli) w pozycji g.3588, a u 3 probantów wykryto delecję w tej samej lokalizacji. 19 badanych posiadało sekwencję referencyjną C. 46 alleli referencyjnych stanowiło 77%, a 8 alleli polimorficznych 13% wszystkich alleli badanych w grupie kontrolnej (tabela 17; rycina 24, 25).

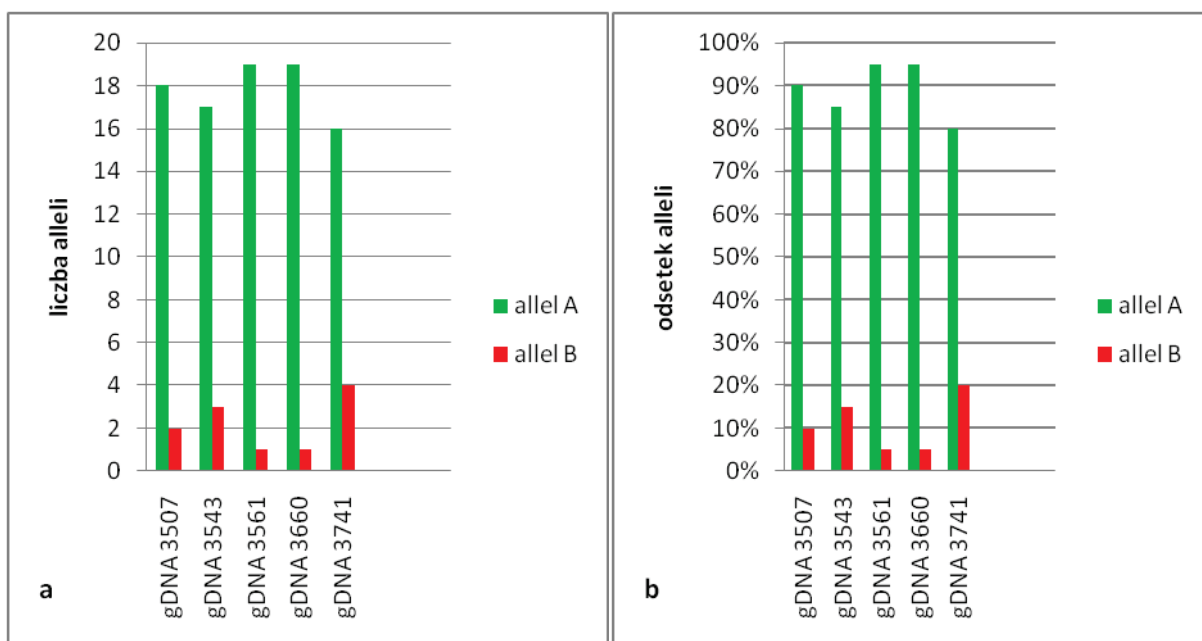
Pozycja g.3606 charakteryzowała się zamianą C $\rightarrow$ T w pojedynczym allelu u 5 zdrowych badanych (5 alleli) oraz delecją u 1 osoby. 24 badanych miało sekwencję referencyjną w obu allelach. Zatem 8% (5 alleli) to allele z sekwencją polimorficzną, a 88% (53 allele) to allele referencyjne (tabela 17; rycina 24, 25).

Tranzycję C $\rightarrow$ T w 1 allelu stwierdzono u 2 zdrowych osób (2 allele) w pozycji g.3615. Delecja wystąpiła u 1 osoby, a 27 probantów miało sekwencję referencyjną w obu allelach. Reasumując 3% (2 allele) stanowią allele polimorficzne, a 80% (48 alleli) allele z sekwencją referencyjną C (tabela 17; rycina 24, 25).

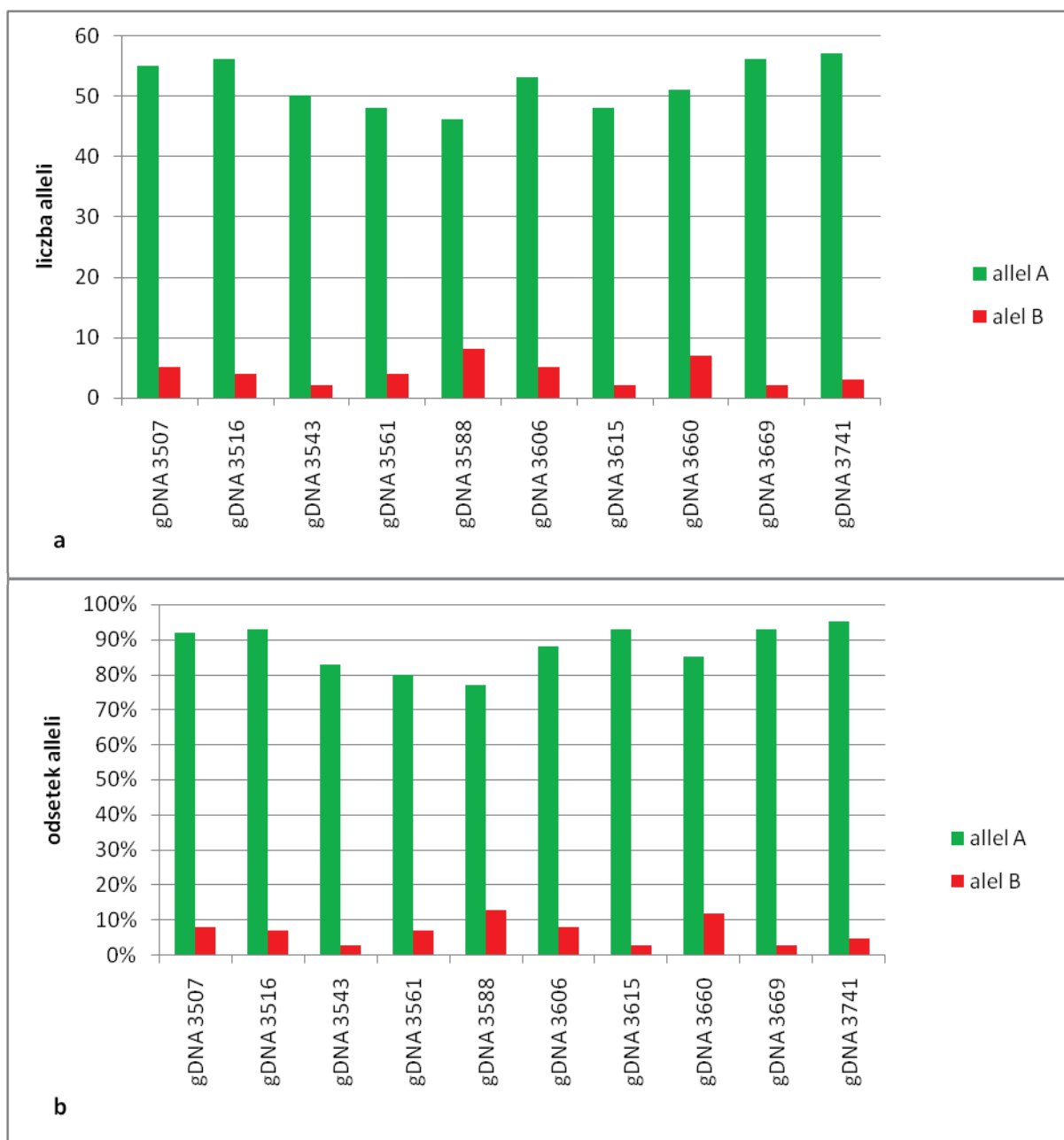
W pozycji g. 3660 u 1 chorej osoby zaobserwowano 1 allel z sekwencją T, stanowiący 5% alleli badanych w tej grupie. 9 osób chorych miało sekwencję zgodną z referencyjną w obu allelach. 95% (19 alleli) były to allele niezmienione. Lokalizacja g.3660 u osób zdrowych charakteryzowała się tranzycją pojedynczego allela u 7 badanych (7 alleli) oraz delecją u 1 osoby. U 22 badanych stwierdzono oba allele referencyjne. Zatem 12% (7 alleli) tworzyły allele polimorficzne, a 85% (51 alleli) allele zgodne z sekwencją referencyjną (tabela 17; rycina 23, 24, 25).

U 2 zdrowych probantów odnotowano zamianę C $\rightarrow$ T w jednym allelu (2 allele) w pozycji g.3669 oraz delecję nt.3669 u 1 osoby. U 27 badanych nie doszło do żadnych zmian. Reasumując 2 allele polimorficzne stanowiły 3%, a 56 alleli referencyjnych 93% (tabela 17; rycina 24, 25).

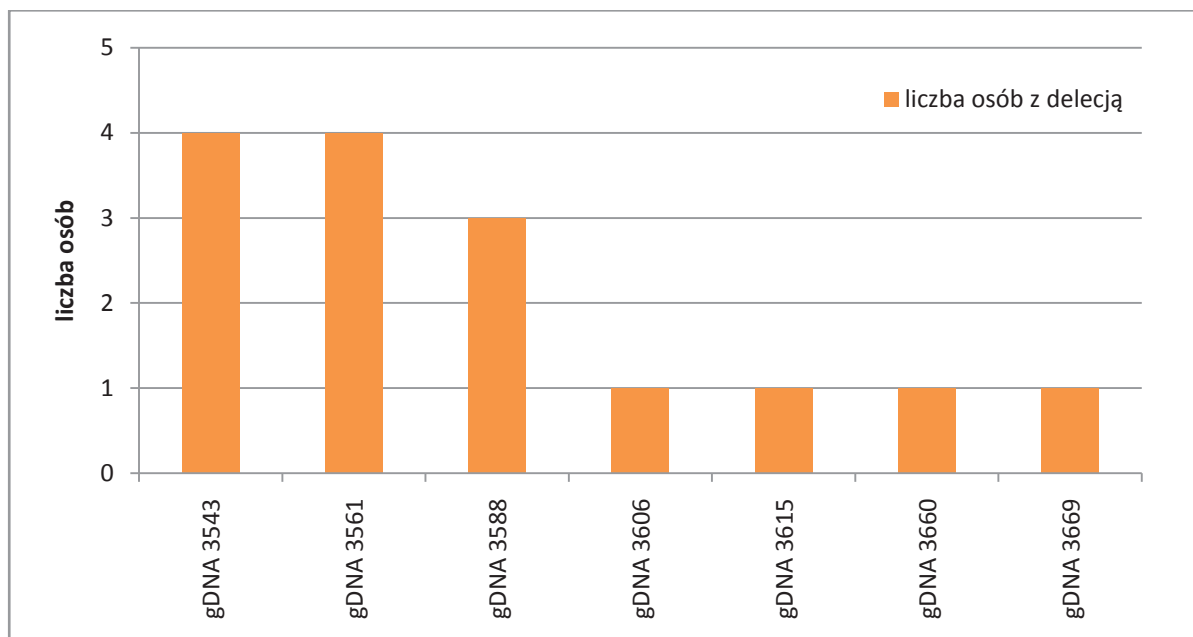
U 4 chorych probantów w pozycji g.3741 stwierdzono występowanie 4 pojedynczych polimorficznych alleli T, które stanowiły 20% alleli przebadanych w grupie osób chorych. 6 osób posiadało oba allele z sekwencją referencyjną, co stanowiło 80%. Natomiast w grupie osób zdrowych ten sam polimorfizm C $\rightarrow$ T odnotowano w pojedynczym allelu u 3 badanych (3 allele), jednocześnie 27 probantów miało sekwencję C w obu allelach. Tak więc, 5% (3 allele) to allele z sekwencją polimorficzną, a 95% (57 alleli) to allele z sekwencją referencyjną (tabela 17; rycina 24, 25).



Rycina 23. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli polimorficznych (allel B) w pozycjach: g.3507, g.3543, g.3561, g.3660, g.3741 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób chorych.



Rycina 24. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) i alleli polimorficznych (allel B) w pozycjach: g.3507, g.3516, g.3543, g.3561, g.3588, g.3606, g.3615, g.3660, g.3669, g.3741 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób zdrowych.



Rycina 25. Liczba osób zdrowych z delecją w pozycjach: g.3543, g.3561, g.3588, g.3606, g.3615, g.3660, g.3669 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP.

6.2.2.4. Tranzycja T → C w sekwencji genu *DSPP* w kodonach kodujących asparaginę w rejonie kodującym białko DPP

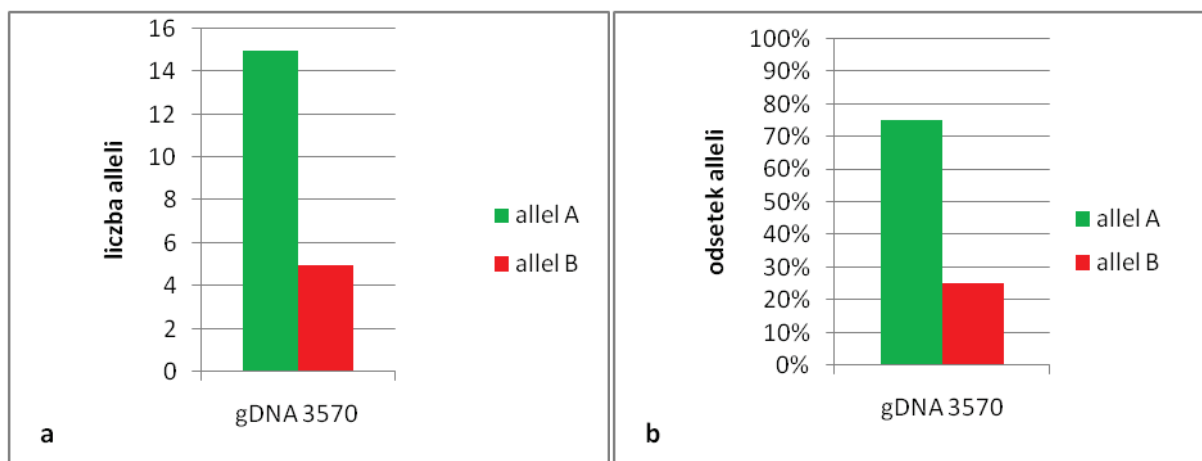
Tranzycja T → C ostatniego nukleotydu w kodonie AAT → AAC kodującym asparaginę w białku DPP u osób chorych i zdrowych wystąpiła w 1 pozycji g.3570. Wszystkie osoby, u których stwierdzono tą zmianę polimorficzną miały zmieniony tylko jeden allel (tabela 18).

Tabela 18. Zamiana AAT → AAC w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b); A – allel referencyjny, B – allel zmieniony;

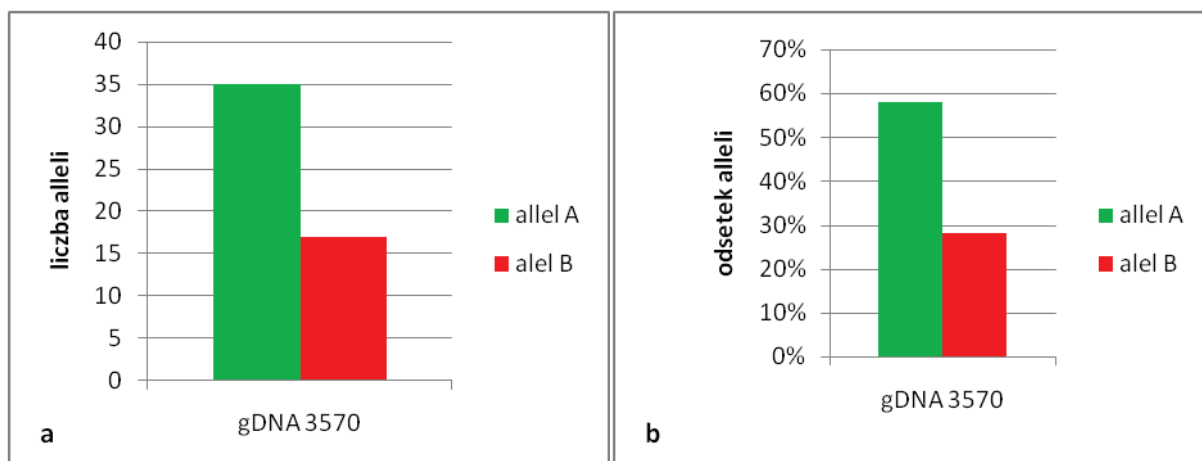
Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zamiana nukleotydu w kodonie	Aminokwas	Grupa	Liczba alleli A	% A	Liczba alleli B	% B	Liczba osób ze zmianą	Liczba osób z delecją
3570	T	AAT→AAC	Asn	a	15	75	5	25	5	0
				b	35	58	17	28	17	4

W pozycji g.3570 odnotowano zamianę pojedynczego allela T → C u 5 chorych probantów, równocześnie u pozostałych 5 nie wykryto zmian. 5 polimorficznych alleli stanowiło 25% wszystkich przebadanych alleli, natomiast pozostałe allele w liczbie 15 z sekwencją referencyjną stanowiły 75% (tabela 18; rycina 26). U osób zdrowych w tej samej

pozycji tranzycja wystąpiła u 17 badanych w pojedynczym allelu (17 alleli). Równocześnie doszło do delecji u 4 probantów. Sekwencja referencyjna T w obu allelach wystąpiła u 9 osób. W konsekwencji 28% (17 alleli) stanowiły allele polimorficzne, a 58% (35 alleli) allele zgodne z sekwencją referencyjną (tabela 18; rycina 27).



Rycina 26. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli polimorficznych (allel B) w pozycji g.3570 sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób chorych.



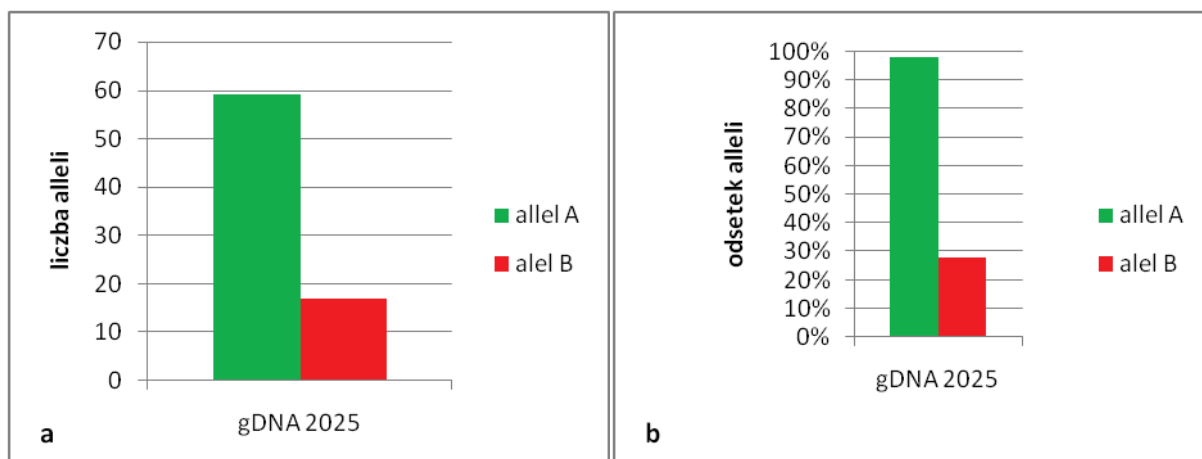
Rycina 27. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) i alleli polimorficznych (allel B) w pozycji g.3570 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób zdrowych.

6.2.2.5. Tranzycja C → T w sekwencji genu *DSPP* w kodonach kodujących asparaginę w rejonie kodującym białko DPP

W pozycji g.2025 zaobserwowano zamianę C → T trzeciego nukleotydu w kodonie AAC → AAT, który koduje asparaginę. Polimorfizm wystąpił wyłącznie u osób zdrowych. Sekwencję T w pojedynczym allelu stwierdzono u 1 osoby (1 allel), a u pozostałych 29 wystąpiła sekwencja referencyjna C w obu allelach. Allele referencyjne w liczbie 59 stanowiły 98% przebadanych alleli, a 1 allel polimorficzny – 2% (tabela 19; rycina 28).

Tabela 19. Zamiana AAC → AAT w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP w grupie osób zdrowych; A – allel referencyjny, B – allel zmieniony; * - brak doniesień w bazie Ensembl.

Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zamiana nukleotydu w kodonie	Aminokwas	Liczba alleli A	% A	Liczba alleli B	% B	Liczba osób ze zmianą
2025*	C	AAC→AAT	Asn	59	98	1	2	1



Rycina 28. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) i alleli polimorficznych (allel B) w pozycji g.2025 w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób zdrowych.

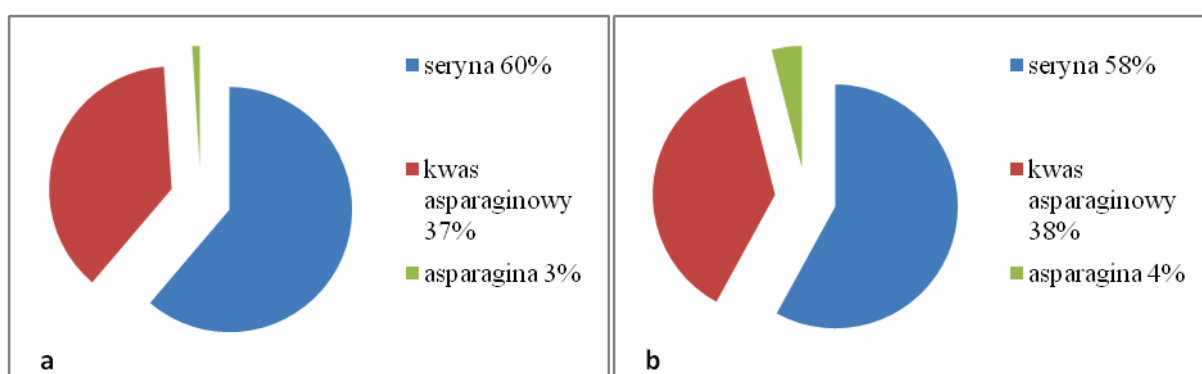
W grupie osób chorych z fenotypem DGI typu II\III i\lub DD II spośród 30 zmian polimorficznych dotyczących ostatniego nukleotydu w kodonie w sekwencji genu *DSPP* w obszarze kodującym białko DPP 60%, czyli 18 zmian dotyczyło kodonów kodujących serynę,

natomiast 37% (11 zmian) kodonów kodujących kwas asparaginowy. Tylko 3%, czyli 1 zmiana dotyczyła kodonu kodującego asparaginę (tabela 20; rycina 29).

U osób zdrowych bez fenotypu DGI typu II/III i/lub DD II łącznie odnotowano 47 zmian polimorficznych typu SNP w sekwencji kodującej białko DPP. Do 28 (58%) zmian doszło w kodonach kodujących serynę, kolejnych 18 zmian stwierdzono w kodonach kodujących kwas asparaginowy – 38%, a 2 zmiany dotyczyły asparaginy – 4% (tabela 20; rycina 29).

Tabela 20. Liczba i odsetek zmian polimorficznych typu SNP w ostatnim nukleotydzie w kodonach kodujących serynę, kwas asparaginowy i asparaginę w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b).

Aminokwas	Grupa	Liczba zmian	Odsetek zmian (%)
seryna	a	18	60
	b	28	58
kwas asparaginowy	a	11	37
	b	18	38
asparagina	a	1	3
	b	2	4

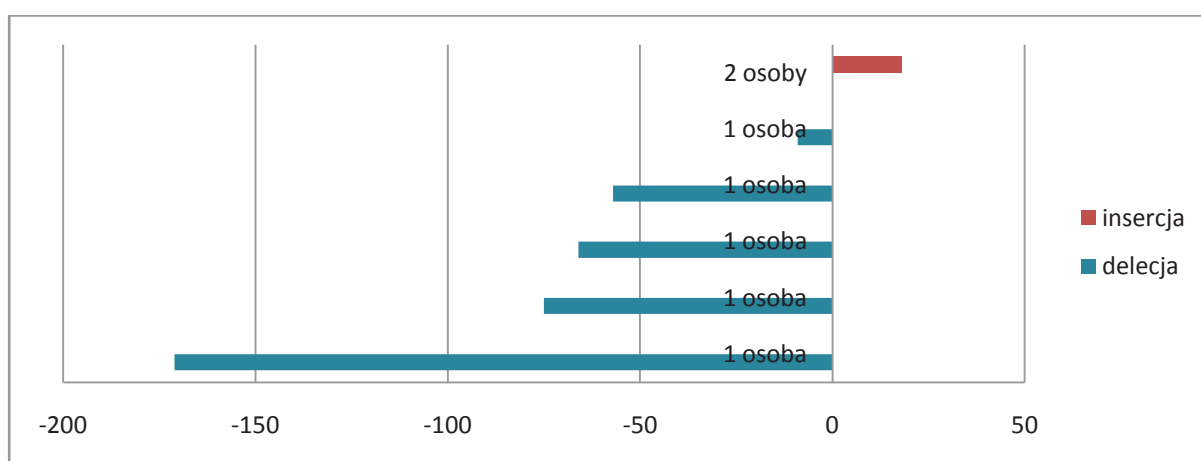


Rycina 29. Odsetek zmian polimorficznych w ostatnim nukleotydzie w kodonach kodujących serynę, kwas asparaginowy i asparaginę w sekwencji genu *DSPP* w rejonie białka DPP w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b).

6.3. Rearanżacje genowe (zmiany ilościowe) w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP

Jedynie w grupie osób zdrowych w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP odnotowano rearanżacje genowe w postaci delekcji lub insercji. Wystąpiły one u 7 osób czyli 14% przebadanej populacji (rycina 30).

W pozycji g.3522 doszło do delekcji u 4 badanych, u których nastąpiła utrata odpowiednio 171, 75, 66 i 57 nukleotydów. Natomiast delekcję 9 nukleotydów u 1 badanego zaobserwowano w pozycji g.3525. Z kolei insercja 18 nukleotydów wystąpiła u 2 probantów w pozycji g.2086 (rycina 30; tabela 21).



Rycina 30. Liczba utraconych i wbudowanych nukleotydów w grupie osób zdrowych w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP.

Tabela 21. Liczba osób zdrowych z delecją w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP.

Pozycja w DNA	Liczba osób	Pozycja w DNA	Liczba osób	Pozycja w DNA	Liczba osób	Pozycja w DNA	Liczba osób
3522	4	3568	4	3606	1	3648	1
3525	5	3570	4	3612	1	3651	1
3531	5	3576	4	3615	1	3654	1
3540	4	3579	4	3621	1	3657	1
3543	4	3585	3	3622	1	3660	1
3549	4	3588	3	3624	1	3663	1
3552	4	3594	2	3630	1	3669	1
3558	4	3597	2	3639	1	3675	1
3561	4	3598	1	3642	1	3693	1
3567	4	3603	1	3645	1		

6.4. Zmiany w sekwencji genu *DSPP* w rejonie 3' nieulegającym translacji (3'UTR)

W grupie osób chorych w rejonie 3'UTR odnotowano dwie tranzycje w pozycjach g.3956 (G → A) oraz g.4070 (A → G). Natomiast u osób zdrowych wystąpiła jedynie tranzycja (G → A) w pozycji g.3956 (tabela 22, 23).

Tabela 22. Zamiana w sekwencji genu *DSPP* w rejonie 3'UTR w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b); A – allel referencyjny, B – allel zmutowany; * - brak doniesień w bazie Ensembl.

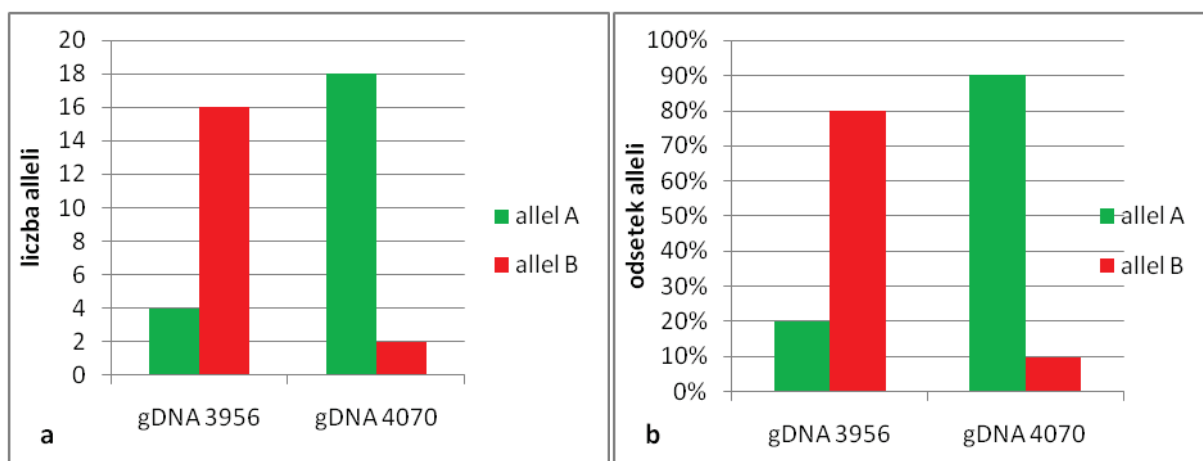
Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zmiana Nukleotydu	Grupa	Liczba alleli A	%A	Liczba alleli B	%B	Liczba osób ze zmianą
3956	G	G→A	a	4	20	16	80	9
			b	5	8	55	92	29
4070*	A	A→G	a	18	90	2	10	1

Tabela 23. Zamiana w sekwencji genu *DSPP* w rejonie 3'UTR w grupie osób chorych (a) i zdrowych (b).

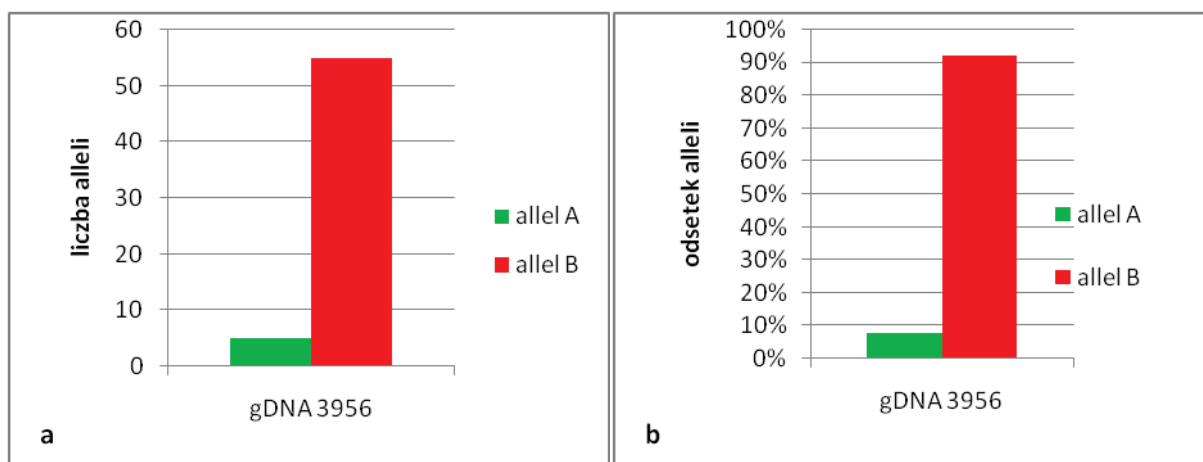
Pozycja w DNA	Nukleotyd referencyjny	Zamiana nukleotydu	Grupa	Liczba homozygot z allelami referencyjnymi	Liczba homozygot z allelami zmutowanymi	Liczba heterozygot
3956	G	G→A	a	1	7	2
			b	1	26	3
4070	A	A→G	a	9	1	0

U 9 osób chorych w pozycji g.3956 wystąpiła zmiana $G \rightarrow A$, w tym u 7 chorych zmienione były oba allele, a 2 probantów miało zmieniony jeden allel. W badanej grupie 10 osób, tylko 1 z nich miała oba allele zgodne z sekwencją referencyjną. 16 zmienionych alleli stanowiło 80% wszystkich przebadanych alleli, natomiast 4 prawidłowe allele stanowiły 20% (tabela 22, 23; rycina 31). W tej samej pozycji u zdrowych probantów doszło do zamiany w obu allelach u 26 osób, a w jednym allelu u 3 osób. Natomiast tylko 1 osoba miała allele z sekwencją zgodną z referencyjną. Odsetek alleli prawidłowych wynosił 8% (5 alleli), a zmienionych 92% (55 alleli) (tabela 22, 23; rycina 32).

W grupie osób chorych u 1 probanta wykryto zmianę $A \rightarrow G$ w pozycji g.4070. Osoba ta miała zmienione oba allele. U pozostałych osób w obu allelach występowała sekwencja A zgodna z referencyjną. 2 zmienione allele stanowiły 10% wszystkich przebadanych alleli, a allele referencyjne w liczbie 18 stanowiły 90% alleli badanych w grupie osób chorych (tabela 22, 23; rycina 31).



Rycina 31. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli zmienionych (allel B) w sekwencji genu *DSPP* w rejonie 3'UTR w pozycjach g.3956 oraz g.4070 w grupie osób chorych.



Rycina 32. Liczba (a) i odsetek (b) alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli zmienionych (allel B) w sekwencji genu *DSPP* w rejonie 3'UTR w pozycji g.3956 w grupie osób zdrowych.

6.5. ANALIZA STATYSTYCZNA

6.5.1. Allele referencyjne

Analiza statystyczna 66 loci genu *DSPP* wykazała, iż w grupie 10 osób chorych połowa (50%) badanych posiadała nie mniej niż 106 alleli (80%) z sekwencją zgodną z sekwencją referencyjną. 25% badanych miało co najwyżej 101 (76%) alleli zgodnych z sekwencją referencyjną. 75% chorych probantów miało co najwyżej 116 (88%) alleli zgodnych z sekwencją referencyjną. Maksymalna liczba alleli z sekwencją referencyjną wynosiła 118, natomiast minimalna 95 (tabela 24).

W grupie 30 osób zdrowych (grupa kontrolna) w odniesieniu do 66 loci genu *DSPP* 50% badanych miało nie mniej niż 109 (82%) alleli referencyjnych, a 25% badanych miało co najwyżej 98 (74%) alleli zgodnych z sekwencją referencyjną. U 75% badanych odnotowano co najwyżej 112 (85%) alleli zgodnych z sekwencją referencyjną. W grupie kontrolnej maksymalna liczba alleli zgodnych z sekwencją referencyjną wynosiła 123, a minimalna 34 (tabela 25).

Tabela 24. Liczba alleli zgodnych z sekwencją referencyjną w grupie osób chorych.

osoba	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
allele referencyjne	106	98	108	101	103	95	113	116	116	118
% alleli referencyjnych	80	74	82	76	78	72	86	88	88	89

Tabela 25. Liczba alleli zgodnych z sekwencją referencyjną w grupie osób zdrowych.

osoba	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
allele referencyjne	93	102	117	111	87	120	34	91	88	123
% alleli referencyjnych	70	77	89	84	66	91	26	69	67	93
osoba	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
allele referencyjne	98	115	112	109	99	119	101	108	101	104
% alleli referencyjnych	74	87	85	82	75	90	76	82	76	79
osoba	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
allele referencyjne	112	114	96	102	111	112	120	109	98	109
% alleli referencyjnych	85	86	73	77	84	85	91	82	74	82

6.5.2. Mutacje i polimorfizmy

W grupie 10 (100%) osób prezentujących fenotyp DGI typu II/III i/lub DD II połowa miała nie mniej niż 8 mutacji, a 25% badanych miało co najwyżej 6 mutacji. 75% osób chorych miało co najwyżej 11 mutacji. Maksymalna liczba mutacji wynosiła 13, a minimalna 4 (tabela 26, rycina 33).

W grupie 10 osób prezentujących fenotyp DGI typu II/III i/lub DD II połowa badanych miała nie mniej niż 14 zmian polimorficznych typu SNP. 25% chorych miało co najwyżej 11 zmian polimorficznych typu SNP, natomiast 75% miało nie więcej niż 19 zmian. Największa liczba zmian polimorficznych typu SNP w grupie osób chorych to 22, a najmniejsza 6 (tabela 26, rycina 33).

W grupie kontrolnej 30 osób zdrowych, nie prezentujących fenotypu DGI typu II/III i/lub DD II, 50% badanych miało nie więcej niż 4 mutacje, a 25% nie więcej niż 3 mutacje.

75% zdrowych probantów miało co najwyżej 5 mutacji. Maksymalna liczba mutacji wynosiła 11, a minimalna 2 (tabela 27, rycina 34).

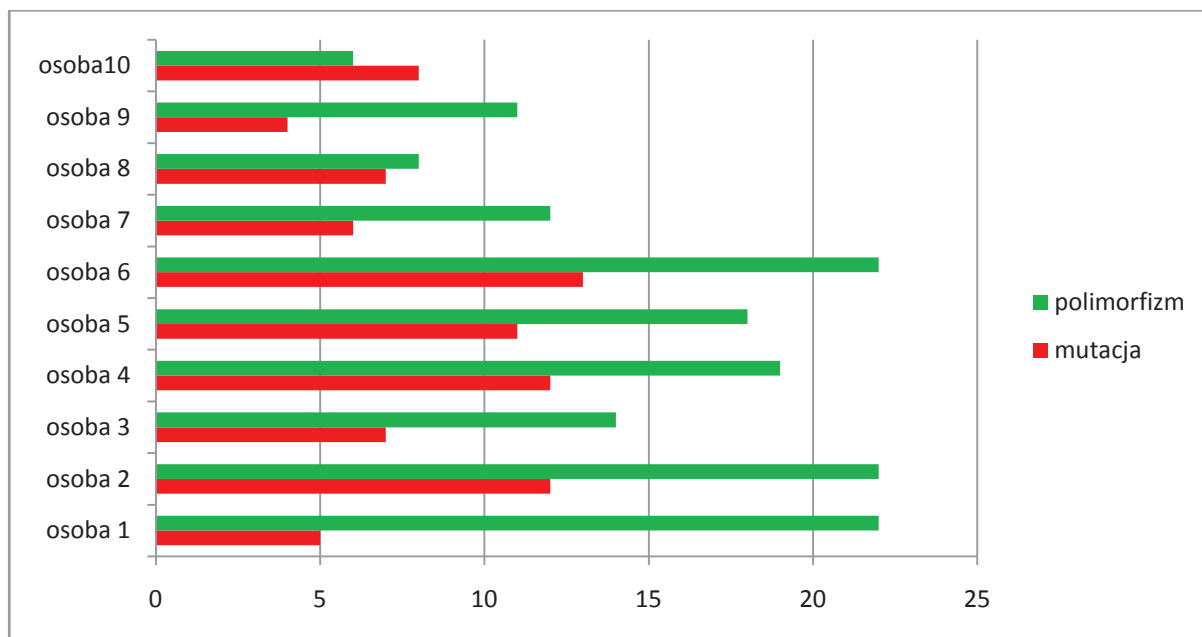
W grupie kontrolnej 30 osób zdrowych nie prezentujących fenotypu DGI typu II/III i/lub DD II połowa (50%) badanych miała nie mniej niż 14 zmian polimorficznych typu SNP, a 25% miało co najwyżej 9 zmian. 75% badanych miało co najwyżej 20 zmian polimorficznych typu SNP. Największa liczba zmian polimorficznych typu SNP to 30, a najmniejsza 1 (tabela 27, rycina 34).

Tabela 26. Liczba mutacji i zmian polimorficznych typu SNP w sekwencji genu *DSPP* w grupie osób chorych.

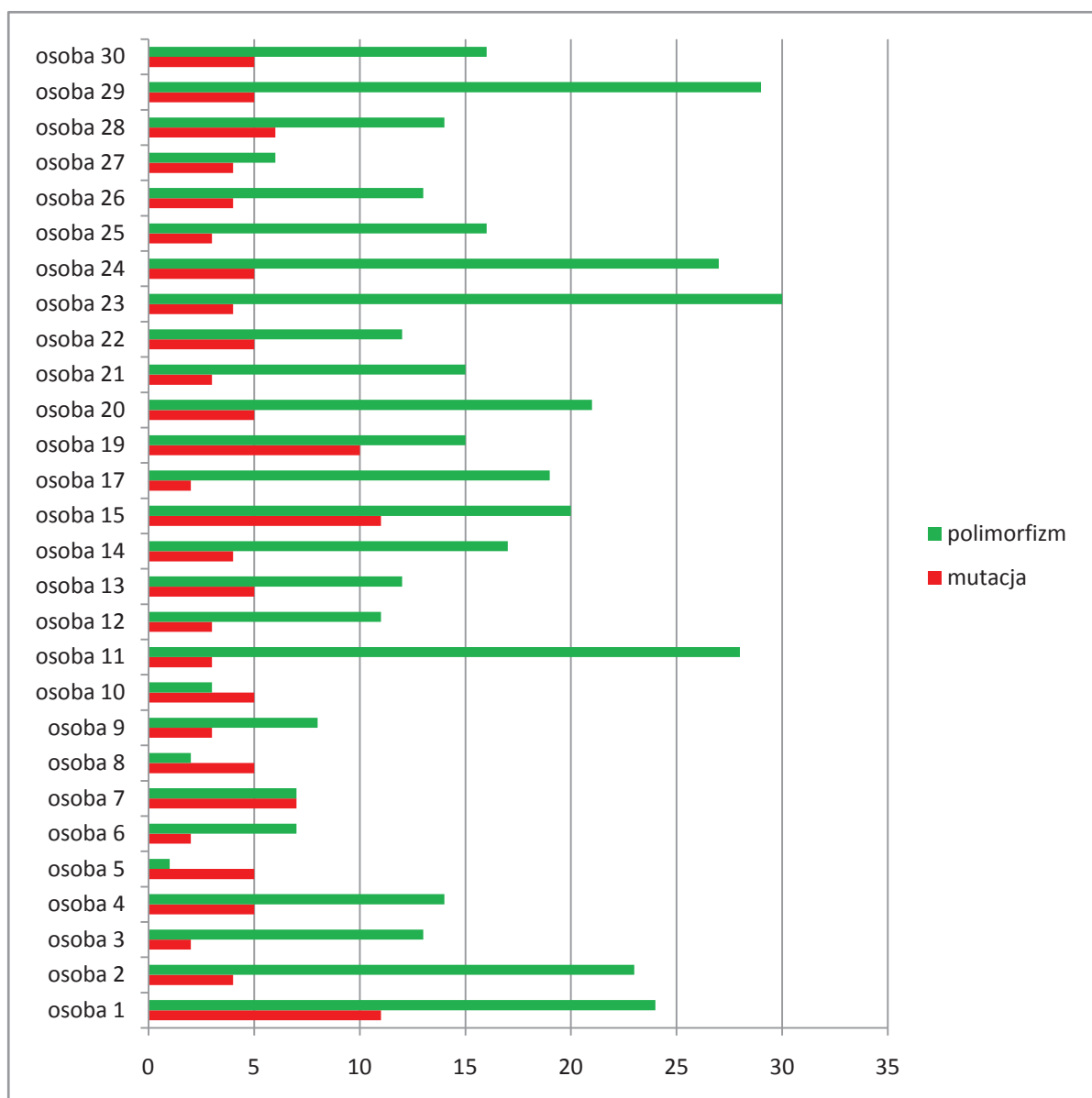
osoba	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mutacja	5	12	7	12	11	13	6	7	4	8
polimorfizm	22	22	14	19	18	22	12	8	11	6

Tabela 27. Liczba mutacji i zmian polimorficznych typu SNP w sekwencji genu *DSPP* w grupie osób zdrowych.

osoba	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mutacja	11	4	2	5	5	2	7	5	3	5
polimorfizm	24	23	13	14	1	7	7	2	8	3
osoba	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
mutacja	3	3	5	4	11	3	2	3	10	5
polimorfizm	28	11	12	17	20	9	19	20	15	21
osoba	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
mutacja	3	5	4	5	3	4	4	6	5	5
polimorfizm	15	12	30	27	16	13	6	14	29	16



Rycina 33. Liczba mutacji i zmian polimorficznych typu SNP w sekwencji genu *DSPP* w grupie osób chorych.



Rycina 34. Liczba mutacji i zmian polimorficznych typu SNP w sekwencji genu *DSPP* w grupie osób zdrowych.

6.5.3. Zmiany w pojedynczym allelu w porównaniu do zmian w obu allelach

W grupie osób chorych prezentujących fenotyp DGI typu II/III i/lub DD II, u połowy badanych (50%) wykryto zmienioną sekwencję w pojedynczym allelu nie mniej niż w 17 loci sekwencji genu *DSPP*. 25% osób chorych miało zmienioną sekwencję w 1 allelu co najwyżej w 14 pozycjach, a u 75% chorych probantów zmiany wystąpiły co najwyżej w 31 loci

sekwencji genu *DSPP*. Maksymalna liczba zmian w sekwencji genu *DSPP* w 1 allelu u jednego badanego wyniosła 32, a minimalna 10 (tabela 28, rycina 35).

W grupie osób chorych prezentujących fenotyp DGI typu II/III i/lub DD II, u połowy badanych (50%) zmienioną sekwencję w obu allelach odnotowano w nie mniej niż 1 locus, a u 25% osób zmiana nie wystąpiła w żadnym z obydwu alleli. U 75% badanych zmiana w obu allelach wystąpiła co najwyżej w 1 locus. Maksymalna liczba loci ze zmienioną sekwencją w obu allelach u jednej osoby wyniosła 2, a minimalna 0 (tabela 28, rycina 35).

W grupie osób zdrowych, nie prezentujących fenotypu DGI typu II/III i/lub DD II, u 50% probantów odnotowano zmienioną sekwencję w jednym allelu nie mniej niż w 17 loci. U 25% badanych było to najwyżej 11 loci, a u 75% zdrowych probantów zmiana sekwencji w pojedynczym allelu wystąpiła co najwyżej w 23 pozycjach. Maksymalna liczba loci ze zmienioną sekwencją w pojedynczym allelu u jednego zdrowego probanta wynosiła 34, a minimalna 5 (tabela 29, rycina 36).

W grupie osób nie prezentujących fenotypu DGI typu II/III i/lub DD II zmienioną sekwencję w obu allelach stwierdzono u 50% badanych w nie mniej niż 2 loci sekwencji genu *DSPP*, a u 25% osób zmiana wystąpiła w 1 allelu. 75% zdrowych probantów miało zmienioną sekwencję w obu allelach co najwyżej w 3 loci. Maksymalna liczba loci ze zmienioną sekwencją w obu allelach u jednej osoby wynosiła 4, a minimalna 0 (tabela 29, rycina 36).

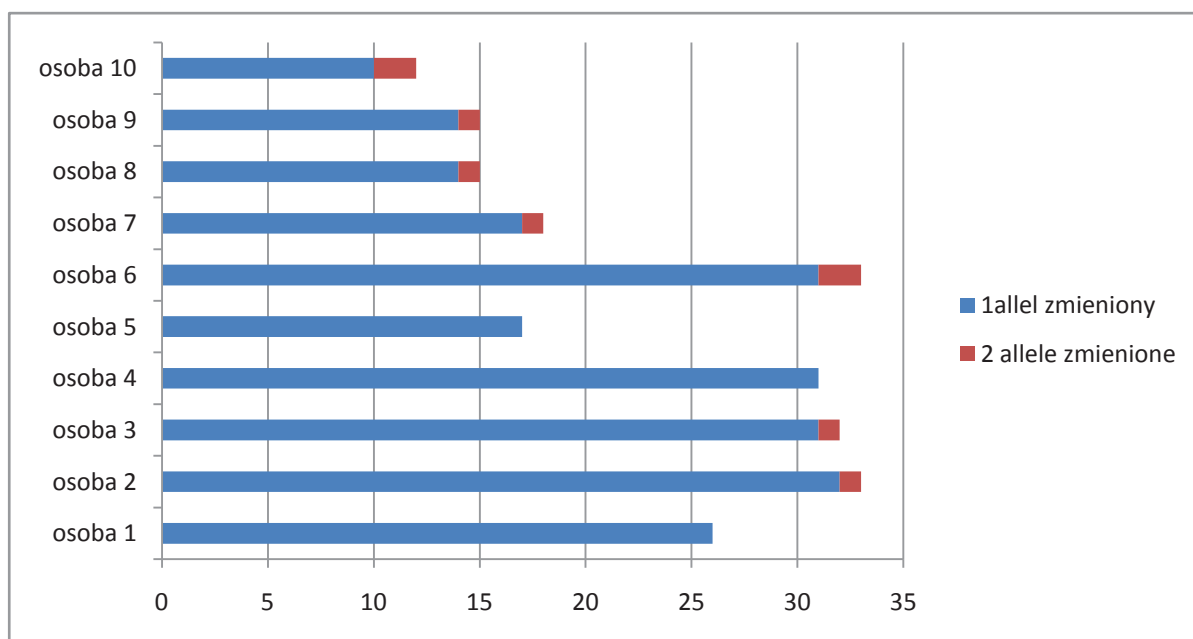
Tabela 28. Liczba pozycji (loci) w sekwencji genu *DSPP*, w których odnotowano mutacje i zmiany polimorficzne typu SNP w 1 i/lub 2 allelach w grupie osób chorych.

osoba	1 zmieniony allel			2 zmienione allele		
	mutacja	polimorfizm	razem	mutacja	polimorfizm	razem
1	5	21	26	0	0	0
2	11	21	32	1	0	1
3	10	21	31	1	0	1
4	12	19	31	0	0	0
5	10	17	17	0	0	0
6	11	20	31	1	1	2
7	5	12	17	1	0	1
8	6	8	14	1	0	1
9	3	11	14	1	0	1
10	4	6	10	2	0	2

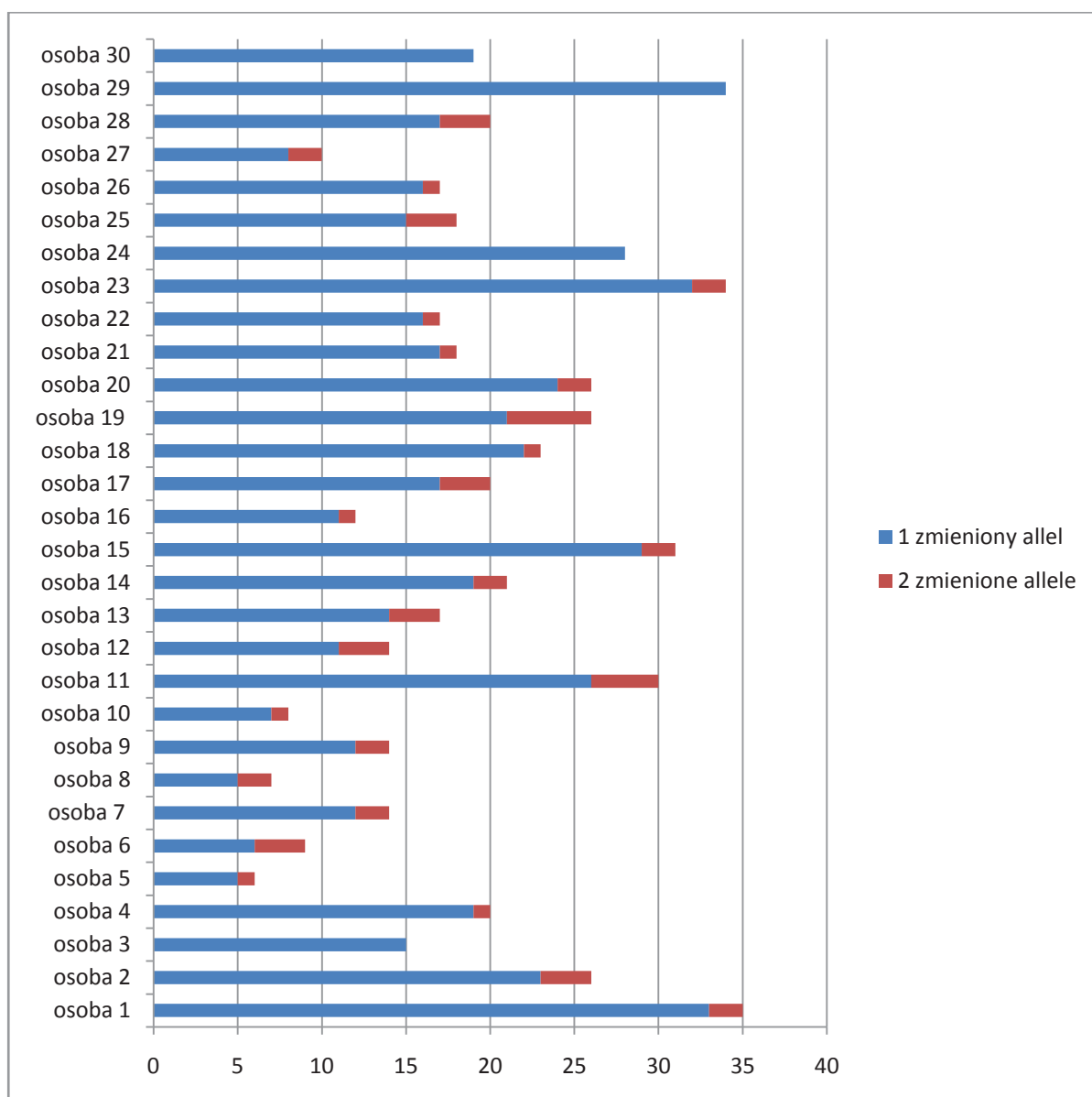
Tabela 29. Liczba pozycji (loci) w sekwencji genu *DSPP*, w których odnotowano mutacje i zmiany polimorficzne typu SNP 1 i/lub 2 allelach w grupie osób zdrowych.

osoba	1 zmieniony allel			2 zmienione allele		
	mutacja	polimorfizm	razem	mutacja	polimorfizm	razem
1	11	21	33	1	1	2
2	2	21	23	2	1	3
3	2	13	15	0	0	0
4	4	15	19	1	0	1
5	4	1	5	1	0	1
6	1	5	6	1	2	3
7	5	7	12	2	0	2
8	3	2	5	2	0	2
9	2	10	12	1	1	2
10	4	3	7	1	0	1
11	1	25	26	1	3	4
12	2	9	11	1	2	3
13	4	10	14	1	2	3
14	3	16	19	1	1	2
15	10	19	29	1	1	2
16	2	9	11	1	0	1

osoba	1 zmieniony allel			2 zmienione allele		
	mutacja	polimorfizm	razem	mutacja	polimorfizm	razem
17	1	16	17	1	2	3
18	2	20	22	1	0	1
19	7	14	21	3	2	5
20	4	20	24	1	1	2
21	2	15	17	1	0	1
22	4	12	16	1	0	1
23	3	29	32	1	1	2
24	4	24	28	0	0	0
25	2	13	15	1	2	3
26	3	13	16	1	0	1
27	3	5	8	1	1	2
28	4	13	17	2	1	3
29	5	29	34	0	0	0
30	4	15	19	2	2	4



Rycina 35. Liczba pozycji w sekwencji genu *DSPP*, w których odnotowano mutacje i zmiany polimorficzne typu SNP w 1 i/lub 2 allelach w grupie osób chorych.



Rycina 36. Liczba pozycji w sekwencji genu *DSPP*, w których odnotowano mutacje i zmiany polimorficzne typu SNP w 1 i/lub 2 allelach w grupie osób zdrowych.

7. DYSKUSJA

Analiza sekwencji genu *DSPP* u 10 osób chorych prezentujących fenotyp DGI typu II/III i/lub DD typu II oraz 30 osób z grupy kontrolnej, u których w badaniu klinicznym nie stwierdzono cech fenotypowych DGI typu II/III i/lub DD typu II, wykazała obecność mutacji oraz polimorfizmu typu SNP w sekwencji genu *DSPP* kodującego białko sialofosforowe zębiny. Zmiany sekwencji genu *DSPP* o charakterze mutacji punktowych zmieniających sens odnotowano w obydwu badanych grupach w rejonach kodujących białko sialowe oraz fosforowe zębiny, a także w sekwencji 3'UTR. Niezwykle interesującym było pozyskanie wyniku analizy wykazującego występowanie zmian ilościowych w sekwencji genu *DSPP* w postaci delecji i/lub insercji jedynie w grupie kontrolnej, przy czym odnotowane zmiany ilościowe stanowiły n-powtórzeń tripletów nukleotydów, stąd nie powodowały przesunięcia ramki odczytu. Jednocześnie wykonana analiza sekwencji genu *DSPP* w obu badanych grupach nie wykazała żadnych zmian w rejonie kodującym peptyd sygnałowy.

Z uwagi na fakt, że peptyd sygnałowy jest niezbędny do przeniesienia białka do retikulum endoplazmatycznego, a jego hydrofobowy, środkowy odcinek ma zasadnicze znaczenie dla pełnionej funkcji, mutacje w jego obrębie upośledzają zdolność białka do translokacji do retikulum endoplazmatycznego, co bezpośrednio wpływa na poziom biosyntezy białka DSPP prowadząc do niedoborów białka z następczą nieprawidłową mineralizacją zębiny [Rajpar i wsp. 2002].

Badania von Marshal i Fishera [von Marschal i wsp. 2012] jednoznacznie wykazały, że mutacje w obrębie sekwencji kodującej peptyd sygnałowy powodują zahamowanie translacji transkrypu mRNA jako skutek trwałego połączenia („zatkania”) transkryptu z podjednostkami kompleksu rybosomalnego i następczym brakiem możliwości transportu uszkodzonego białka poza kompleks rybosomalny. Zatem, brak stwierdzonych mutacji w obrębie peptydu sygnałowego wyklucza możliwość całkowitego braku translacji transkryptu

mRNA-*DSPP*, co pozwala wnioskować, że fenotyp obserwowany w grupie osób chorych był skutkiem powstawania prawidłowych bądź wadliwych fragmentów białek pochodnych natywnego białka DSPP i/lub eliminacji translacji jednego z tych białek DSP lub DPP.

7.1. Mutacje w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DSP

Dane z piśmiennictwa wskazują, że za powstawanie fenotypu DGI typu II/III i/lub DD typu II odpowiedzialne są mutacje zmieniające sens w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DSP. Dotychczas opisano 8 takich mutacji [Hart i wsp. 2007, Holappa i wsp. 2006, Kida i wsp. 2009, Kim i wsp. 2004, 2005; Lee SK. i wsp. 2011, Maciejewska i wsp. 2012, Song i wsp. 2006, Xiao i wsp. 2001, Zhang i wsp. 2001, 2007]. Z uwagi na fakt, że ostatnie aminokwasy peptydu sygnałowego oraz trzy pierwsze aminokwasy białka właściwego odgrywają istotną rolę dla funkcji DSPP gdyż zawierają sekwencję odcięcia peptydu sygnałowego, mutacje w tym obszarze skutkują zablokowaniem transportu natywnego białka DSPP na zewnątrz retikulum entoplazmatycznego [Hart i wsp. 2007, Xiao i wsp. 2001, Rajpar i wsp. 2002], stąd uważa się, że mutacje dotyczące pierwszych trzech aminokwasów białka DSP skutkują powstaniem klinicznych cech DGI typu II [Kim i wsp. 2005, Maciejewska i wsp. 2012, Malmgren i wsp. 2004, Song i wsp. 2006, Xiao i wsp. 2001]. W badaniach własnych opisanych w obecnym opracowaniu wykryto jedynie jedną mutację zlokalizowaną w sekwencji odpowiedzialnej za kodowanie białka siałowego zębiny.

Była to odnotowana w obu badanych grupach mutacja w pozycji g.235 (A → T), która polegała na transwersji pierwszego nukleotydu w kodonie AGG → TGG, co skutkowało zastąpieniem aminokwasu argininy przez tryptofan. W grupie osób chorych tę mutację stwierdzono u 4 osób (40% grupy), wśród których wszystkie były heterozygotami, gdyż mutacja wystąpiła w pojedynczym allelu. Ta sama mutacja w grupie osób zdrowych wystąpiła u 5 badanych, jednak 4 osoby były heterozygotami, a 1 homozygotą z dwoma allelami zmutowanymi. Po porównaniu do wyników z bazy Ensembl ustalono, iż w populacji

ogólnoświatowej allele z sekwencją referencyjną A występują z częstością 89% na 100 przebadanych alleli, natomiast sekwencja T stanowi odsetek 11%. Ta sama baza wskazuje, że u osób rasy Kaukaskiej sekwencje A i T tworzą odpowiednio – 91% i – 9%. Wyniki pozyskane w bieżącym doświadczeniu wydają się niezwykle interesujące z uwagi na fakt, iż w badaniach Malmgren i współautorów obecność mutacji g.235 (A → T) skutkowała wystąpieniem fenotypu DGI typu II u 6 członków tej samej rodziny, podczas gdy u pozostałych członków rodziny, u których nie stwierdzono omawianej mutacji, nie zaobserwowano żadnych cech klinicznych DGI typu II [Malmgren i wsp. 2004]. Potwierdzeniem obserwacji własnych są późniejsze doniesienia wskazujące na częste występowanie mutacji g.235 (A → T) w badanych populacjach rasy Kaukaskiej, w których również podobnie jak w opisywanych badaniach własnych nie obserwowano wystąpienia fenotypu DGI typu II i/lub DD typu II (15% populacji Fińskiej) [Holappa i wsp. 2006]. Porównując wyniki własne z doniesieniami innych autorów zasadnym wydaje się stwierdzenie, że mutacje g. 235 w sekwencji genu *DSPP* należy uznać za niepatogenną odmianę polimorfizm, a przyczyny pojawienia się fenotypu DGI typu II w grupie osób chorych należy poszukiwać w innej lokalizacji sekwencji genu *DSPP* i/lub określeniu tła genetycznego mogącego warunkować wystąpienia symptomów choroby [Acevedo i wsp. 2009, Hart i wsp. 2007, Holappa i wsp. 2006]. Podobne wnioski sugerują autorzy najnowszych badań epidemiologicznych, którzy wskazują na obecność mutacji g. 235 (A → T) nie tylko u osób chorych, ale również u osób zdrowych bez cech fenotypowych specyficznych dla DGI II/III i/lub DD II [Hart i wsp. 2007, Holappa i wsp. 2006]. Jedną z hipotez coraz powszechniej używaną dla wytłumaczenia tego zjawiska jest powstanie tzw. niewydolności haplotypowej [von Marschall i wsp. 2012]. Okazuje się bowiem, że dopiero niedobór ponad połowy białka DSPP, określony jako tzw. ilość krytyczna, może skutkować wystąpieniem objawów *dentinogenesis imperfecta* typu II/III i/lub dysplazji zębiny typu II.

Zgodnie z tą hipotezą pojawiające się symptomy kliniczne DGI typu II/III i/lub DD II są tym poważniejsze, im mniej białka o prawidłowej budowie zostanie wyprodukowane przez odontoblast i wydzielone do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [von Marschall i wsp. 2012]. Hipoteza niewydolności haplotypowej powstała na podstawie obserwacji *in vivo* łączenia się zmutowanego białka DSPP, poprzez Ca^{2+} zależne polianionowe domeny, z białkiem powstałym z prawidłowego allele, z następczym utworzeniem „uszkodzonych” dimerów, które są z kolei zatrzymywane wewnątrz szorstkiego retikulum endoplazmatycznego i poddane natychmiastowej degradacji. Mutacje takie określa się jako mutacje negatywnie dominujące [von Marschall i wsp. 2012].

7.2. Mutacje w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP

Do chwili obecnej w piśmiennictwie światowym opisano 14 mutacji w genie *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP [Dong i wsp. 2005, Holappa i wsp. 2006, Lee KE. i wsp. 2011, Maciejewska i wsp. 2012, McKnight i wsp. 2008a, 2008b; Nieminen i wsp. 2011]. W badaniach własnych polskiej populacji w rejonie sekwencji kodującej białko DPP mutacje punktowe skutkujące zmianą kodowanego aminokwasu odnotowano zarówno w pierwszym, drugim jak i trzecim nukleotydzie w kodonie. Mutacje pierwszego nukleotydu w kodonie odnotowane w obu badanych grupach zaobserwowano w pozycjach g.3568 (AAT→GAT), g.3598 (AGC→TGC), g.3622 (GAT→AAT) oraz g.3805 (AGC→TGC). W pozycji g.3568 tranzycja A → G skutkowałą zamianą asparaginy na kwas asparaginowy i u wszystkich badanych dotyczyła pojedynczego allele. U osób chorych mutacja wystąpiła w 8 przypadkach (80% grupy), a u osób z grupy kontrolnej u 11 osób (36% grupy). Pomimo, iż mutacja A → G (AAT→GAT) w pozycji g. 3568 została zgłoszona do bazy ludzkiego genomu Ensembl, to jednak częstość jej występowania zarówno w populacji rasy Kaukaskiej jak i Afro-Amerykańskiej określono na 1 promil. Jednocześnie nie zgłoszono potencjalnych korelacji pomiędzy występowaniem tej mutacji, a pojawieniem się specyficznego fenotypu DGI typu

II/III lub DD typu II. Uwzględniając zastąpienie w pozycji a.1179 aminokwasu asparaginy o charakterze obojętnym przez kwas asparaginowy, należy pamiętać, że zamiana wystąpiła we fragmencie białka DPP o silnie kwaśnym charakterze, co pozwala spekulować, iż pojawienie się w tym rejonie dodatkowej grupy ketonowej nie wpływa negatywnie, a wręcz poprawia warunki nukleacji kryształu apatytu. Kolejna mutacja w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP wykryta została w pozycji g.3598 A → T (AGC→TGC) i powodowała substitucję seryny przez cysteinę. U osób chorych, w pozycji g.3598 transwersję A → T zaobserwowano w pojedynczym allelu u 9 badanych (90% grupy), natomiast wśród zdrowych probantów 18 osób (60% grupy) było heterozygotami i miało zmieniony jeden allel, a 2 osoby miały zmienione obydwa allele (6,6% grupy). Tę samą transwersję A → T (AGC→TGC) skutkującą zamianą seryny w cysteinę odnotowano w pozycji g.3805 u 9 osób chorych (90% grupy) w pojedynczym allelu oraz u jednej osoby chorej w dwóch allelach (10% grupy). Jednocześnie w grupie kontrolnej zdiagnozowano 23 osoby z mutacją A → T (AGC→TGC) w pojedynczym allelu (76% grupy). Niezwykle interesującym wydaje się fakt braku w bazie Ensembl doniesień o mutacjach w genie *DSPP* w pozycjach g. 3598 oraz 3805. Nie znaleziono również jakichkolwiek danych w piśmiennictwie opisujących powyższe mutacje. Fakt występowania obu mutacji zarówno w grupie chorych jak i kontrolnej oraz brak różnorodności fenotypowych pomiędzy homozygotami i heterozygotami pozwala domniemywać, że mutacje powyższe nie są bezpośrednią przyczyną pojawienia się symptomów *dentinogenesis imperfecta* typu II lub dysplazji zębiny, co pośrednio można wytłumaczyć zbliżonymi właściwościami biochemicznymi seryny oraz zastępującej ją cysteiny.

Ciekawą obserwacją poczynioną w trakcie analizy sekwencji genu *DSPP* rejonu kodującego białko DPP było odnotowanie mutacji typu zmiany sensu, którą zaobserwowano jedynie w grupie osób chorych. Była to mutacja G → A (GAT→AAT) w pozycji g.3550 i

wystąpiła w pojedynczym allelu u 4 osób (40% grupy). Mutacja skutkowała zamianą kwasu asparaginowego a.1173 w asparaginę. Jednak analiza właściwości biochemicznych obu aminokwasów nie pozwala jednoznacznie określić czy mutacja $G \rightarrow A$ (GAT $\rightarrow$ AAT) w pozycji g. 3550 była mutacją przyczynową wystąpienia fenotypu DGI typu II u 4 chorych probantów nosicieli tej mutacji. Można jedynie spekulować, że zamiana kwasu asparaginowego posiadającego ładunek negatywny, a tym samym aktywną grupę wiążącą wapń, na neutralną biochemicznie asparaginę, może powodować niewielkie zaburzenia w miejscowej nukleacji kryształów minerału.

Kolejno, mutację powodującą zastąpienie seryny przez glicynę na skutek transwersji $A \rightarrow T$ w pozycji g.3592 stwierdzono wyłącznie w pojedynczym allelu u 2 osób zdrowych (6,6% grupy). Ta mutacja również nie została odnotowana w bazie Ensembl.

Mutacje drugiego nukleotydu w kodonie w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP w obu badanych grupach wystąpiły w pozycjach g.3611 (AGC $\rightarrow$ AAC), g.3710 (AGC $\rightarrow$ AAC) oraz g.3728 (AAT $\rightarrow$ AGT). Dwie pierwsze dotyczą zamiany aminokwasu seryny w asparaginę, a trzecia asparaginy w serynę. W pozycji g.3611, 4 osoby chore (40% grupy) posiadały zmieniony jeden allel $G \rightarrow A$. Wśród osób zdrowych 1 badany (3,3 % grupy) był homozygotą z obydwoma allelami zmutowanymi A, a 9 osób (30% grupy) było heterozygotami. Natomiast w lokalizacji g.3710 po 4 osoby z każdej grupy chorych i zdrowych probantów były homozygotami posiadającymi sekwencję zmutowaną A, co stanowiło odpowiednio 40% populacji chorych oraz 13,3% populacji zdrowych badanych. Analiza wykazała, że jedynie mutacja $G \rightarrow A$ w pozycji g. 3710 nie została jak dotąd odnotowana w bazie Ensembl, natomiast obecność sekwencji A w pozycji g. 3611 określono na 1% zarówno w populacji rasy Kaukaskiej jak i Afro-Amerykańskiej.

Tranzycja $A \rightarrow G$ w pozycji g.3728 powodująca powstanie seryny w miejsce asparaginy wystąpiła w pojedynczym allelu u 4 badanych w obu grupach. Mutacja ta została

opisana w bazie Ensembl jednak nie podano informacji o częstości jej występowania w poszczególnych populacjach. Autorzy zgłaszający mutację A → G w pozycji g.3728 do bazy Ensembl uważają jednak, że nie jest ona mutacją przyczynową powstawania fenotypu DGI II/II i/lub DD II.

Dodatkowo, w omawianych badaniach własnych mutacje drugiego nukleotydu w kodonach kodujących białko DPP wykryto jedynie u osób zdrowych w pozycjach g. 2006 (GAC → GGC) i g.2024 (AAC → AGC). Mutacje te spowodowały odpowiednio zamianę kwasu asparaginowego w glicynę oraz asparaginy w serynę. W pozycji g.2006 odnotowano zamianę A → G tylko u 2 osób, przy czym 1 osoba była homozygotą z dwoma allelami zmutowanymi G, a 1 posiadała jeden allel zmutowany G oraz jeden allel z sekwencją referencyjną A. W pozycji g.2024 jedynie u 1 badanego stwierdzono zmieniony 1 allel z sekwencją G. Żadna z mutacji obserwowanych w tych dwóch pozycjach nie została odnotowana w bazie ludzkiego genomu Ensembl.

Mutacje trzeciego nukleotydu w kodonie w pozycjach g.3615 (GAC → GAA), g.3714 (GAC → GAA) i g.3732 (GAA → GAC) były jednakże w obu grupach i spowodowały zamianę kwasu asparaginowego w kwas glutaminowy w dwóch pierwszych pozycjach oraz zamianę kwasu asparaginowego w kwas glutaminowy w pozycji trzeciej. W pozycji g.3615, 8 osób w każdej grupie posiadało jeden allel z sekwencją zmutowaną A, co stanowiło odpowiednio 80% populacji chorych oraz 26,6% zdrowych probantów. Kolejno, w pozycji g.3714 stwierdzono obecność 4 pojedynczych zmutowanych alleli w każdej z badanych grup, co stanowi 40% przebadanych chorych oraz 13% osób z grupy kontrolnej. 4 osoby chore (40%) oraz 3 zdrowe (10%) posiadały zmutowaną sekwencję C w pojedynczym allelu w pozycji g.3732. Dodatkowo, u 1 osoby z grupy kontrolnej wykazano występowanie w pojedynczym allelu mutacji C → A (GAC→GAA) w pozycji g.3768, co powodowało zamianę kodowania kwasu asparaginowego a.1245 na kwas glutaminowy. Wszystkie cztery

mutacje trzeciego nukleotydu w kodonie skutkowały wymiennym kodowaniem kwasów asparaginowego bądź glutaminowego. Ze względu na fakt, iż obydwie aminokwasy należą do tej samej grupy aminokwasów „kwaśnych” obarczonych ujemnym ładunkiem, ich obecność w łańcuchu białka DPP odpowiada za tworzenie środowiska sprzyjającego przyłączaniu jonów Ca^{2+} , a w konsekwencji nukleacji kryształu apatytu i mineralizacji zębiny [Qin i wsp. 2004]. Z uwagi na fakt, iż struktura pierwszorzędowa obu kwasów różni się jedynie obecnością dodatkowego atomu węgla, a co za tym idzie długością łańcucha węglowego, wydaje się zasadne uznanie mutacji w pozycjach g. 3615, 3714, 3732, 3768 jako obrazu polimorfizmu genu *DSPP* oraz zwrócenie uwagi, iż może być to polimorfizm lokalny o czym świadczy brak danych porównawczych w bazie Ensembl. Jedynie mutacja w pozycji g.3732 znalazła swój opis w bazie Ensembl, jednak autorzy nie podali żadnych danych dotyczących odsetka występowania polimorficznej sekwencji C w poszczególnych populacjach.

Szczegółowa analiza porównawcza sekwencji genu *DSPP* w populacji osób zdrowych oraz zdiagnozowanych z wadą *dentinogenesis imperfecta* typu II lub dysplazją zębiny typu II wskazuje na obecność licznych mutacji typu zmiany sensu w obu badanych grupach. Pozyskane wyniki analizy molekularnej porównane z obrazem klinicznym badanych pacjentów pozwalają wnioskować, że opisane mutacje mają charakter polimorfizmu i nie są przyczyną powstawania fenotypu DGI II/III i/lub DD II z wyłączeniem mutacji g.3550, która jako jedyna została zdiagnozowana wyłącznie w grupie osób chorych. Istotnym wydaje się zatem postawienie pytania: Dlaczego mutacje zmieniające sens pozostają „ciche”? oraz Co sprawia, że ta sama mutacja u niektórych probantów objawia się specyficznym fenotypem, a u innych pozostaje cicha? W chwili obecnej najbliższa wyjaśnienia postawionych kwestii zdaje się teoria opracowana przez zespół profesora Fishera [von Marschall i wsp. 2010], która zakłada, że istnieje tzw. ilość krytyczna białka DSPP o prawidłowej budowie, której obecność w zewnątrzkomórkowej przestrzeni odontoblasta pozwala na prawidłowy przebieg procesu

pierwotnej (nukleacji) i wtórnej (dojrzewania) mineralizacji zębiny. Jak dotąd nie poznano jednak wartości bezwzględnej białka DSPP wymaganej do prawidłowego przebiegu procesu mineralizacji zębiny. Rozpatrując jednak, że proces mineralizacji przebiega wieloetapowo i zależy nie tylko od obecności poszczególnych białek, ale również od wzajemnej interakcji licznych niekolagenowych białek budujących organiczną macierz zębiny, należy rozważać możliwość występowania tzw. efektu uzupełnienia funkcji DSPP przez inne białka w tym DMP1 lub białka z rodziny SLRP [Gericke i wsp. 2010, Gajjerman i wsp. 2007]. Spekulacje te uwiarygodnia fakt, iż najcięższe przypadki kliniczne DGI typu II i/lub DD typu II zdiagnozowano i opisano u osób, u których wykryto mutacje w sekwencji kodującej peptyd sygnałowy [Rajpar i wsp. 2002, Malmgren i wsp. 2004], co prowadziło do całkowitego braku translacji białka DSPP, a tym samym eliminowało jego obecność w przestrzeni zewnątrzkomórkowej odontoblasta. von Marschall i współautorzy po przeprowadzeniu skrupulatnej analizy transkrypcji mRNA i translacji DSPP w komórce odontoblasta, wykazali, iż mutacje genu *DSPP* (z wyjątkiem mutacji a. Y6D) powodują zatrzymanie zmutowanego białka w przestrzeni szorstkiego retikulum endoplazmatycznego [von Marschall i wsp. 2012]. Ustalono, że zmiana sekwencji w obrębie trzech pierwszych aminokwasów białka właściwego (IleProVal), powoduje nieprawidłowe łączenie z receptorem IPV odpowiedzialnym za transport białka DSPP poza szorstkie retikulum endoplazmatyczne.

Kolejnym istotnym powodem zaburzeń mineralizacji zębiny są mutacje skutkujące przesunięciem ramki odczytu w obrębie repetytywnej części sekwencji genu *DSPP*. W takich przypadkach dochodzi do zamiany kodowania znaczącej liczby (nawet do 600) kwaśnych aminokwasów z repetytywnej sekwencji Asp-Asp-Ser na aminokwasy o odczynie zasadowym, co eliminuje z sekwencji białka DPP domeny łączące jony wapnia i uniemożliwia zarówno nukleację kryształu apatytu jak i późniejsze dojrzewanie minerału [McKnight i wsp. 2008a,b]. Dodatkowo, zmodyfikowane białko przepisywane ze zmutowanej

matrycy mRNA tworzy spontanicznie wielowartościowe, kationowo (Ca^{2+}) zależne połączenia między zmodyfikowanymi cząsteczkami, przyłączając następnie białko o prawidłowej budowie (powstające na bazie matrycy prawidłowego mRNA) do własnych domen wiążących wapń. Takie kompleksy białkowe DSPP są rozpoznawane przez specyficzne proteazy i poddawane szybkim procesom degradacji w cytoplazmie odontoblasta [von Marschall i wsp. 2012]. Powyższa teoria nie znajduje jednak zastosowania w analizowanym materiale własnym, gdyż u osób zdiagnozowanych z DGI II/III lub DD II nie stwierdzono zmian sekwencji genu *DSPP* o charakterze ilościowym, natomiast delecje i insercje wykryte w grupie kontrolnej dotyczyły $n \times$ tripletów nukleotydów, a co za tym idzie nie powodowały przesunięcia ramki odczytu. Z uwagi na fakt, iż w analizowanym materiale własnym mutacje o charakterze zmiany sensu zdiagnozowano zarówno w grupie kontrolnej jak i doświadczalnej, w chwili obecnej jedynym wytłumaczeniem ujawnienia się fenotypu u osób chorych jest występowanie tzw. tła genetycznego. Należy zatem rozważyć, że rodzaj i ilość mutacji oraz zmian polimorficznych występujących u poszczególnych chorych może wywierać efekt wzmocnienia i w korelacji przyczynić się do ujawnienia cech fenotypowych.

7.3. Mutacje w rejonie 3'UTR genu *DSPP*

Do chwili obecnej zmiany w sekwencji genu *DSPP* w rejonie 3' nieulegającym translacji (3'UTR) zgłoszono do bazy Ensembl dla 5 loci: g.3956 ($\text{G} \rightarrow \text{A}$), g.4077 ($\text{T} \rightarrow \text{A}$), g.4135 ($\text{T} \rightarrow \text{G}$), g.4166 ($\text{G} \rightarrow \text{C}$), g.4263 ($\text{A} \rightarrow \text{G}$). Natomiast w badanej grupie własnej zarówno doświadczalnej jak i kontrolnej w rejonie 3'UTR spośród wymienionych odnotowano jedynie tranzykcje $\text{G} \rightarrow \text{A}$ w pozycji g. 3956. Zmianę ujawniono w pojedynczym allelu u 4 osób chorych (40% grupy) oraz u 29 osób z grupy kontrolnej (96,6% grupy), przy czym w tej ostatniej 26 osób miało sekwencję polimorficzną A w obu allelach, a jedynie 3 osoby były heterozygotami. Porównanie z bazą Ensembl wykazało, iż rozkład wyników pochodzących z bieżącego doświadczenia jest odwrotnie proporcjonalny do danych

pozyskanych w bazie, które wskazują, iż w pozycji g. 3956 sekwencja referencyjna A w populacji kaukaskiej wynosi 86%, natomiast sekwencja polimorficzna G – 14% i dane te nie różnią się znacząco z wynikami uzyskanymi dla populacji ogólnoświatowej (odpowiednio 88%, 12%). Jednocześnie ani dane z bazy Ensembl ani publikacje o zasięgu światowym nie wykazały, iż tranzycja $G \rightarrow A$ w pozycji g. 3956 może powodować powstawanie symptomów klinicznych DGI typu II/III lub DD typu II. Pozostałe 4 mutacje odnotowane w bazie Ensembl nie występują w populacji Kaukaskiej, co pozostaje w zgodzie z własnymi obserwacjami, a w populacji ogólnoświatowej częstotliwość ich występowania ocenia się poniżej 0,01%.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt wykrycia w bieżącym doświadczeniu mutacji w rejonie 3'UTR w pozycji g.4070 ($A \rightarrow G$). Zamianę tę zaobserwowano u 1 osoby chorej w obu allelach i jak dotąd nie została ona zgłoszona do bazy Ensembl. Rejon 3'UTR pomimo, iż nie ulega translacji odgrywa niezwykle istotną rolę w stabilizacji transkryptów mRNA, zawiera sekwencje komplementarne do mikro-RNA oraz sekwencje zaangażowane w regulację ekspresji genów [Chen JM. i wsp. 2006]. Dla przykładu na poziomie pre-mRNA sekwencje 3'UTR uczestniczą w tworzeniu 3'końca mRNA i poliadenylacji [Zhao i wsp. 1999], natomiast na poziomie dojrzałego mRNA determinują stabilność, degradację, skuteczność translacji transkryptu oraz jego transport z jądra komórkowego [Chabanon i wsp. 2004, Conne i wsp. 2000, Mignone i wsp. 2002]. Są również miejscem przyłączania mikro-RNA [Xie i wsp. 2005]. Pomimo tak licznych funkcji ocenia się, że tylko około 0,2% mutacji w rejonie 3'UTR stanowi przyczynę wystąpienia jednostek chorobowych [Chen JM. i wsp. 2006], jednakże brak jakichkolwiek danych na temat mutacji w pozycji g.4070 nie wyklucza jej jako przyczyny powstania fenotypu DGI II/III i\lub DD II obserwowanego w grupie osób chorych.

7.4. Polimorfizm genu *DSPP*

Badania licznych autorów [Kim i wsp. 2007, Bai i wsp. 2010, Song i wsp. 2006, Acevedo i wsp. 2009, Holappa i wsp. 2004] wykazały, iż gen *DSPP* charakteryzuje się wysokim stopniem polimorfizmu, co potwierdzają wyniki uzyskane w bieżącym doświadczeniu zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej. Stwierdzono, że 31 zmian o charakterze polimorfizmu typu SNP wystąpiło w obu badanych grupach. Jednocześnie, w grupie osób zdrowych stwierdzono występowanie 18 dodatkowych zmian typu SNP oraz 7 ilościowych aranżacji genowych nieskutkujących przesunięciem ramki odczytu.

W sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP w obu badanych grupach odnotowano tylko jedną tranzycję A → G w kodonie kodującym serynę w pozycji g.930, a odsetek osób z sekwencją polimorficzną wynosił 70% w grupie chorych oraz 93% w grupie zdrowych probantów. Wynik uzyskany w badaniach własnych znacząco różni się od danych zgromadzonych w bazie Ensembl, gdzie odsetek alleli z sekwencją referencyjną A dla populacji europejskiej wynosi 34%.

Bardziej liczne przypadki polimorfizmu typu SNP w grupie osób chorych jak i zdrowych probantów wykazano w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP. Tranzycję C → T w kodonach kodujących serynę stwierdzono aż w 19 pozycjach wśród, których 5 wystąpiło jedynie w grupie osób zdrowych. Zmiany w pozycjach g.2004, g.3531, g.3540, g.3639, g.3675 wystąpiły jednocześnie w obu badanych grupach i zostały opisane również w bazie danych Ensembl. Analiza porównawcza tych zmian wykazała zbliżony odsetek ich występowania w populacji ogólnoświatowej jak i grupach badanych w bieżącym doświadczeniu. Przykładowo w pozycji g.2004 w populacji ogólnoświatowej i europejskiej sekwencja referencyjna C występuje odpowiednio w 82% i 73% badanych alleli, podczas gdy w grupie chorych i zdrowych w populacji polskiej wynik wyniósł odpowiednio 80% i 72%. Specyfikę występowania polimorfizmu lokalnego określono na podstawie wyników

polimorfizmu typu SNP pochodzącego z analizy sekwencji genu *DSPP* obu badanych grup, w których wykryto tranzycje C → T w pozycjach g.3504 (C:60% chorzy; 82% zdrowi), g.3522 (C:60%; 45%), g.3549 (C:70%; 52%), g.3567 (C:90%; 58%), g.3585 (C:70%; 53%), g.5612 (C:65%; 73%), g.3621 (C:80%; 87%), g.3630 (C:75%; 68%), g.3711 (C:70%; 92%) , a które nie zostały odnotowane w bazie Ensembl. Ciekawym wydaje się fakt określenia zmian polimorficznych typu SNP wykrytych jedynie u zdrowych probantów. W badaniach własnych ilość takich zmian wyniosła 18. Są to zmiany w kodonach kodujących serynę (10), kwas asparaginowy (7) oraz asparaginę (1). Odsetek zmian polimorficznych w kodonach seryny wynosił 60% u chorych i 58% u zdrowych, a w kodonach kwasu asparaginowego odpowiednio 37% i 38%. Uzyskane wyniki pokrywają się z doniesieniami innych autorów, iż polimorfizm genu *DSPP* występuje głównie w obrębie powtarzalnej sekwencji kodującej Ser-Ser-Asp [C4,C14]. Obecność tak wielu zmian polimorficznych w kodonach kodujących serynę i kwas asparaginowy w sekwencji genu *DSPP* w rejonie kodującym białko DPP zarówno wśród osób chorych jak i zdrowych należy tłumaczyć liczbą powtórzeń (około 200) 9 – nukleotydowych sekwencji Ser-Ser-Asp-Ser-Ser-Asp-Ser-Ser-Asp.

20 zmian typu SNP, które odnotowano w doświadczeniu własnym w obu badanych grupach, nie występowały w bazie danych Ensembl, co może świadczyć, iż jest to polimorfizm lokalny, specyficzny dla stosunkowo homogennej populacji polskiej.

Bardzo ciekawym pozostaje fakt wystąpienia aranżacji genowych w postaci insercji i delecji tylko w grupie osób zdrowych. W dwóch przypadkach doszło do insercji 18 nukleotydów, a u 5 osób wystąpiła delecja odpowiednio 9, 57, 66, 75 171 nukleotydów. Jak podaje piśmiennictwo [Nieminen i wsp. 2011] zmiany ilościowe bez przesunięcia ramki odczytu występują w głównie w 3' końcowej części genu *DSPP*, w odcinku sekwencji repetytywnych Ser-Ser-Asp, a delecja może dotyczyć nawet 200 nukleotydów i nie skutkuje zaburzeniem mineralizacji zębiny. Wszystkie zaobserwowane aranżacje ilościowe w

opisanym doświadczeniu własnym przebiegały bez przesunięcia ramki odczytu, a jedynie powodowały wydłużenie, bądź skrócenie długości białka DPP. W związku z brakiem fenotypu DGI II/III i/lub DD II można wywnioskować, iż zmiany tego typu w obszarze powtarzalnej sekwencji nie mają wpływu na funkcję białka DPP, co potwierdza fakt dużej międzygatunkowej zmienności długości białka DPP [McKnight i wsp. 2009].

Przeprowadzona skrupulatna analiza porównawcza sekwencji genu *DSPP* u 9 osób chorych z rozpoznaniem klinicznym i radiologicznym *dentinogenesis imperfecta* typu II oraz u 1 osoby z dysplazją zębiny typu II z sekwencjami uzyskanymi od 30 osób stanowiących grupę kontrolną, a także z sekwencją referencyjną dla rasy Kaukaskiej i populacji ogólnoświatowej zgłoszonej w bazie ludzkiego genomu Ensembl, nie pozwoliła jednoznacznie zdefiniować mutacji przyczynowej wystąpienia fenotypu DGI typu II oraz DD typu II u poszczególnych osób z grupy doświadczalnej. Mutacje zmieniające sens wykryte w grupie doświadczalnej wykryto również w sekwencji genu *DSPP* pozyskanej od osób zdrowych, co sugeruje, że pojawienie się fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II lub dysplazji zębiny typu II u osób chorych miało tło wieloprzyczynowe i stanowiło wypadkową licznych zmian o charakterze mutacji oraz polimorfizmu obserwowanego w sekwencji genu *DSPP* u poszczególnych osób.

8. WNIOSKI

Gen *DSPP* kodujący białko sialofosforowe zębiny wykazuje wysoki stopień zmienności o charakterze mutacji zmieniających sens jak i polimorfizmu zarówno w populacji osób z rozpoznaniem klinicznym i radiologicznym *dentinogenesis imperfecta* typu II oraz dysplazji zębiny typu II jak i w grupie kontrolnej.

1. Zmiany o charakterze mutacji zmieniających sens jak i polimorfizm genu *DSPP* występują z porównywalną częstością zarówno w sekwencji kodującej białko DSP jak i sekwencji kodującej białko DPP w obu badanych grupach, podczas gdy polimorfizm ilościowy w formie insercji i delecji wystąpił jedynie w grupie kontrolnej.

2. Zarówno w populacji osób z rozpoznaniem klinicznym i radiologicznym *dentinogenesis imperfecta* typu II oraz dysplazji zębiny typu II jak i grupie kontrolnej zdiagnozowano liczne mutacje zmieniające sens oraz zmiany o charakterze polimorfizmu w tych samych loci genu *DSPP*, co nie pozwala jednoznacznie określić przyczyny wystąpienia fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II lub dysplazji zębiny typu II w grupie osób chorych.

3. Częstotliwość występowania mutacji genu *DSPP* zarówno w populacji osób z rozpoznaniem klinicznym i radiologicznym *dentinogenesis imperfecta* typu II oraz dysplazji zębiny typu II jak i grupie kontrolnej jak i brak informacji o tych mutacjach w bazie ludzkiego genomu Ensembl, pozwala zakwalifikować je jako zmiany o charakterze polimorfizmu lokalnego.

8. PIŚMIENNICTWO

- AAPD (American Academy of Pediatric Dentistry). Guideline on oral health care/dental management of heritable dental developmental anomalies. *Pediatric Dentistry*. 2010;32:226-231.
- Acevedo AC, Santos LJS, Paula LM, Dong J, MacDougall M. Phenotype characterization and DSPP mutational analysis of three Brazilian dentinogenesis imperfecta type II families. *Cells Tissues organs*. 2009;189:230-236.
- Angus C. Widmer C, Widmer RP. *Stomatologia dziecięca*. 2003 Elsevier, Urban & Partner
- Ara T, Lopez F, Ritchie W, Benech P, Gautheret D. Conservation of alternative polyadenylation patterns in mammalian genes. *BMC Genomics*. 2006;7:189.
- Baba O, Qin C, Brunn JC, Jones JE, Wygant JN, McIntyre BW, Butler WT. Detection of dentin sialoprotein in rat periodontium. *Eur J Oral Sci*. 2004;112:163-170.
- Bai H, Agula H, Wu Q, Zhou W, Sun Y, Qi Y, Latu S, Chen Y, Mutu J, Qiu C. A novel *DSPP* mutation causes dentinogenesis imperfecta type II in large Mongolian family. *BMC Med Genet*. 2010;11:23.
- Barreau C, Paillard L, Osborne HB. U-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*. 2006;33.22:7138-7150.
- Barron MJ, McDonnell ST, MacKie I, Dixon MJ. Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:31.
- Beattie ML, Kim JW, Gong SG, Murdoch-Kinch CA, Simmer JP, Hu JCC. Phenotypic variation in dentinogenesis imperfecta/dentin dysplasia linked to 4q21. *J Dent Res*. 2006;85:329-333.
- Bègue-Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: youth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci*. 1998;106:963-970.

- Bengtsson E, Neame PJ, Heinegård D, Sommarin Y. The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. *J Biol Chem.* 1995;270:25639-25644.
- Blochberger TC, Vergnes J-P, Hempel J, Hasell JR. cDNA to chick lumican (corneal keratin sulfate proteoglycan) reveals homology to small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. *J Biol Chem.* 1992;267:347-352.
- Boskey A, Spevak L, Tan M, Doty SB, Butler WT. Dentin sialoprotein (DSP) has limited effects on in vitro apatite formation and growth. *Calcif Tissue Int.* 2000;67:472-478.
- Bratt P, Anderson MM, Mansson-Rahemtulla B, Stevens JW, Zhou C, Rahemtulla F. Isolation and characterization of bovine gingival proteoglycans versican and decorin. *Int J Biochem* 1992;24:1573-1583.
- Butler WT, Bhowm M, Dimuzio MT, Linde A. Noncollagenous proteins of dentin. Isolation and partial characterization of rat dentin proteins and proteoglycans using a three-step preparative method. *Coll Relat Res.* 1981;1:187-199.
- Butler WT, Bhowm M, Dimuzio MT, Cothran WC, Linde A. Multiple forms of rat dentin phosphoproteins. *Arch Biochem Biophys.* 1983;225(1):178-186.
- Butler WT, Bhowm M, Brunn JC, D'Souza RN, Farach-Carson MC, Happonen RP, Schrohenloher RE, Seyer JM, Someman MJ, Foster PA, et al. Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDal dentin sialoprotein (DSP). *Matrix.* 1992;12(5):343-351.
- Butler WT, Brunn JC, Qin C. Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connect Tissue Res.* 2003;44Suppl1:171-178.
- Chabanon H, Mickleburgh I, Hesketh J. Zipcodes and postage stamps: mRNA localization signals and their *trans*-acting binding proteins. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2004;3:240-256.

- Chang SR, Chiego D Jr, Clarkson BH. Characterization and identification of human dentin phosphophoryn. *Calcif Tissue Int.* 1996;59(3):149-153.
- Chen CC, Boskey AL. Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcify Tissue Int.* 1985;37:395-400.
- Chen JM, Fèrec C, Cooper DN. A systemic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Hum Genet.* 2006;120:1-24.
- Chen S, Unterbrink A, Kadapakkam S, Dong J, Gu TT, Dickson J, Chuang H-H, MacDougall M. Regulation of the Cell Type – specific dentinsialoprotein gene expression in mouse odontoblasts by a novel transcription repressor and an activator CCAAT-binding factor. *J Biol Chem.* 2004;279:42182-42191.
- Chen S, Rani S, Wu Y, Unterbrink A, Gu TT, Gluchak-Heinrich J, Chuang H-H, MacDougall M. Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by Runx2 during odontoblast cytodifferentiation. *J Biol Chem.* 2005;280:29717-29727.
- Chen S, Gluhak-Heinrich J, Martinez M, Li T, Wu Y, Chuang HH, Chen L, Dong J, Gay I, MacDougall M. Bone morphogenic protein 2 mediates dentin sialophosphoprotein expression and odontoblast differentiation via NF- κ B signaling. *J Biol Chem.* 2008;283:19359-19370.
- Chen S, Gluchak-Heinrich J, Wang YH, Wu YM, Chuang HH, Chen L, Yuan DH, Gay I, MacDougall M. Runx2, Osx, and Dspp in tooth development. *J Dent Res.* 2009;88:904-909.
- Conne B, Stutz A, Vassalli JD. The untranslated region of messengerRNA: a molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med.* 2000;6:637-641.
- Darendeliev-Kaba A, Marechaux SC: Hereditary dentinogenesis imperfecta: a treatment program using an overdenture. *ASDC J Dent Child.* 1992;59:273-276.

- Deere M, Johnson J, Garza S, Harrison WR, Yoon SJ, Elder FFB, Kucherlapati R, Höök M, Hecht JT. Characterization of human DSPG3, a small dermatan sulfate proteoglycan. *Genomics*. 1996;38:399-404.
- Dickinson IR, Dimuzo MT, Volpin D, Ananthanarayanan S, Veis A. The extraction of phosphoproteins from bovine dentin. *Calcif Tissue Res*. 1975;19(1):51-61.
- Dong J, Gu T, Jeffords L, MacDougall M. Dentin phosphoprotein compound mutation in dentin sialophosphoprotein causes dentinogenesis imperfecta type III. *Am J Med Genet A*. 2005;132A:305-309.
- Embery G, Rees S, Hall R, Rose K, Waddington R, Shellis P. Calcium- and hydroxyapatite – binding properties of glucuronic acid – rich iduronic acid – rich glycosaminoglycans and proteoglycans. *Eur J Oral Sci*. 1998;106:267-273.
- Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12:331-349.
- Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni AB, D’Souza, Kozak CA, MacDougall M. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem*. 1998;273:9457-9464.
- Ferkäinen E. Prosthetic treatment of dentinogenesis imperfecta. A case report. *J Oral Rehab*. 1981;8:79-102.
- Fisher LW, Termine JD, Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem*. 1989;264:4571-4576.
- Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tiss Res*. 2003;44:33-40.

- Funderburgh JL, Corpuz LM, Roth MR, Conrad GW. Identification of the 25 kilodalton corneal keratin sulfate proteoglycan core protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:S645.
- Gajjerman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J Biol Chem*. 2007;282:1193-1204.
- George A, Sabsay B, Simonian PA, Veis A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *J Biol Chem*. 1993;268:12624-12630.
- George A, Bannon L, Sabsay B, Malone J, Veis A, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG. The carboxyl – terminal domain of phosphophoryn contains unique extended triplet amino acid repeat sequences forming ordered carboxyl – phosphate intreraction ridges that may be essential in the biomineralization process. *J Biol Chem*. 1996;271:32869-32873.
- Gericke A, Qin C, Sun Y, Redfern R, Redfern D, Fujimoto Y, Taleb H, Butler WT, Boskey AL. Different forms of DMP1 play distinct roles in mineralization. *J Dent Res*. 2010;89:355-359.
- Goldberg M, Septier D, Rapport O, Iozzo RV, Young MF, Ameye LG. Targeted disruption of two small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin, excerpts divergent effects on enamel and dentin formation. *Calcif Tissue Int*. 2005;77:297-310.
- Groten M. Complex all-ceramic rehabilitation of a young patient with a severely compromised dentition: a case report. *Quintessence International*. 2009;40:19-27.
- Gu K, Chang S, Ritchie HH, Clarkson BH, Rutherford RB. Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene. *Eur J Oral Sci*. 2000;108(1):35-42.
- Hart P S, Hart T C. Disorders of human dentin. *Cells Tissue Organs*. 2007;186:70-77.

- Hesketh J. 3'- Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32:990-993.
- Hirst KL, Ibaraki-O'Connor K, Young MF, Dixon MJ. Cloning and expression analysis of the bovine dentin matrix acidic phosphoprotein gene. *J Dnt Res.* 1997; 76:754-760.
- Holappa H, Nieminen P, Tolva L, Lukinamäa P-L, Alaluusua S. Splicing site mutations in dentin sialophosphoprotein causing dentinogenesis imperfecta type II. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:381-384.
- Huang B, Sun Y, Maciejewska I, Qin D, Peng T, McIntyre B, Wygant J, Butler WT, Qin C. Distribution of SIBLING proteins in the organic and inorganic phases of rat dentin and bone. *Eur J Oral Sci.* 2008;116:104-112.
- Hudkins KL, Giachelli CM, Cui Y, Couser WG, Johnson RJ, Alpers CE. Osteopontin expression in fetal and mature human kidney. *J Am Soc Nephro.* 1999;10:1444-1457.
- Huq NL, Cross KJ, Talbo GH, Riley PF, Loganathan A, Crossley MA, Perich JW, Reynolds EC. N-terminal sequence analysis of bovine dentin phosphoryn after conversion of phosphoseryl to S-propylcysteinyl residues. *J Dent Res.* 2000;79:1914-9.
- Huq NL, Loganathan A, Cross KJ, ChenYY, Johnson NI, Willetts M, Veith PD, Reynolds EC. Association of bovine dentine phosphophoryn with collagen fragments. *Arch Oral Biol.* 2005;50:807-819.
- Iozzo RV, Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 1996;10:598-614.
- Iozzo RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 1997;32:141-174.

Jańczuk Z. Stomatologia zachowawcza, zarys kliniczny. 2006 PZWL

Jonsson M, Fredriksson S, Jontell M, Linde A. Isoelectric focusing of the phosphoprotein of rat-incisor dentin in ampholine and acid pH gradients. Evidence for carrier ampholyte – protein complexes. J Chromatogr. 1978;157:235-242.

Kida M, Tsutsumi T, Shindoh M, Ikeda H, Ariga T. De novo mutation in the DSPP gene associated with dentinogenesis imperfecta type II in a Japanese family. Eur J Oral Sci. 2009;117:691-694.

Kim JW, Nam SH, Jang KT, Lee SH, Kim CC, Hahn SH, Hu JCC, Simmer JP. A novel splice acceptor mutation in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II. Hum Genet. 2004;115:248-254.

Kim JW, Hu JCC, Lee JI, Moon SK, Kim YJ, Jang KT, Lee SH, Kim CC, Hahn SH, Simmer JP. Mutational hot spot in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II. Hum Genet. 2005;11:186-191.

Kim JW, Simmer JP. Hereditary Dentin Defects. J Dent Res. 2007;86:392-399.

Komorowska A. Leczenie ortodontyczne dzieci z *dentinogenesis imperfecta*. Mag Stomatol. 1994;4:6-9.

Krusius T, Ruoslahti E. Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. Proc Natl Acad Sci USA. 1986;83:7683-7687.

Kuczyńska E, Kiernicka M. Wrodzone nieprawidłowości budowy twardych tkanek zębów – problem klasyfikacji. Prz Stomatol Wieku Rozw. 1993;4:26-28.

Lee KE, Kang HY, Lee SK, Yoo SH, Lee JC, Hwang YH, Nam KH, Kim JS, Park JC, Kim JW. Novel dentin phosphoprotein frameshift mutations in dentinogenesis imperfecta type II. Clin Genet. 2011;79:378-384.

- Lee SK, Lee KE, Hwang YH, Kida M, Tsutsumi Y, Ariga T, Park J-C, Kim J-W. Identification of the DSPP mutation in a new kindred and phenotype – genotype correlation. *Oral Diseases*. 2011;17:314-319.
- Lu Y, Ye L, Yu S, Zhang S, Xie Y, McKee MD, Li YC, Kong J, Eick JD, Dallas SL, Feng JQ. Rescue of odontogenesis in Dmp1-deficient mice by targeted re- expression of DMP1 Reveals roles for DMP1 in early odontogenesis and dentin apposition in vivo. *Dev Biol*. 2007;303:191-201.
- MacDougall M, Zeichner-David M, Slavkin HC. Production and characterization of antibodies against murine dentine phosphoprotein. *Biochem J*. 1985;232:493-500.
- MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem*. 1997;272(2):835-842.
- MacDougall M, Gu TT, Luan X, Simmons D, Chen J. Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein1: spatial expression in mineralized tissues. *J Bone Miner Res*. 1998; 13:422-431.
- MacDougall M, Dong J, Acevedo AC. Molecular basis of human dentin diseases. *Am J Med Genet* 2006;140:2536-2546.
- Maciejewska I, Cowan C, Svoboda K, Butler WT, D'Souza R, Qin C. The NH₂ - terminal and COOH- terminal fragments of dentin matrix protein1 (DMP1) localize differently in the compartments of dentin and growth plate of bone. *J Histochem Cytochem*. 2009a;57:155-166.
- Maciejewska I, Qin D, Huang B, Sun Y, Mues G, Svoboda K, Bonewald L, Butler WT, Feng IQ, Qin C. Distinct compartmentalization of dentin matrix protein1 fragments in mineralized tissues and cells. *Cells Tissues Organs*. 2009b;189:186-191.

- Maciejewska I, Chomik E. Hereditary dentine diseases resulting from mutations in DSPP gene. *J Dent*. 2012;40:542-548.
- Madisen L, Neubauer M, Plowman G, Rosen D, Segarini P, Dasch J, Thompson A, Ziman J, Bentz H, Purchio AF. Molecular cloning of a novel bone-forming compound: osteoinductive factor. *DNA Cell Biol*. 1990;9:303-309.
- Malejewska D, Daniel A. Rozpoznanie oraz leczenie protetyczne dziedzicznego niedorozwoju zębiny. *Czas Stomat*. 1986;3:186-191.
- Malmgren B, Lindskog S, Elgadi A, Norgren S. Clinical, histopathologic, and genetic investigation in two large families with dentinogenesis imperfecta type II. *Hum Genet*. 2004;114:491-498.
- von Marschall Z, Mok S, Phillips MD, McKnight DA, Fisher LW. Rough endoplasmic reticulum trafficking errors by different classes of mutant dentin sialophosphoprotein (DSPP) cause dominant negative effects in both dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia by entrapping normal DSPP. *J Bone Miner Res*. 2012;27:1309-1321.
- Marsh ME. Self-association of calcium and magnesium complexes of dentin phosphoryn. *Biochemistry*. 1989;28:339-345.
- Martin A, David V, Laurence JS, Schwarz PM, Lafer EM, Hedge A-M, Rowe PSN. Degradation of MEPE, DMP1, and release of SIBLING ASARM-peptides (minhibins): ASARM-peptide(s) are directly responsible for defective mineralization in HYP. *Endocrinology*. 2008;149:1757-1772.
- Mayordomo FG, Estrela F, de Aldecoa EA. Niedorozwój dziedziczny zębiny: opis przypadku. *Quintessence*. 1994;11:745-752.
- Mazumder B, Sampath P, Fox PL. Regulation of macrophage ceruloplasmin gene expression: one paradigm of 3'-UTR-mediated translational control. *Mol Cells*. 2005;20.2:167-172.

- McKnight DA, Simmer JP, Hart PS, Hart TC, Fisher LW. Overlapping DSPP mutations cause dentin dysplasia and dentinogenesis imperfecta. *J Dent Res*. 2008a;87:1108-1111.
- McKnight DA, Hart PS, Hart TC, Hartsfield JK, Wilson A, Wright JT, Fisher LW. A comprehensive analysis of normal variation and disease-causing mutations in the human *DSPP* gene. *Hum Mutat*. 2008b;29:1392-1404.
- McKnight DA, Fisher LW. Molecular evaluation of dentin phosphoprotein among toothed and toothless animals. *BMC Evol Biol*. 2009;9:299.
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 2002;3:reviews0004.1-reviews00044.10.
- Milan AM, Sugars RV, Embery G, Waddington RJ. Dentinal proteoglycans demonstrate an increasing order of affinity for hydroxyapatite crystals during the transition of predentin to dentine. *Calcif Tissue Int*. 2004;75:197-204.
- Milan AM, Sugars RV, Embery G, Waddington RJ. Modulation of collagen fibrillogenesis by dentinal proteoglycans. *Calcif Tissue Int*. 2005;76:127-135.
- Napierala D, Sun J, Maciejewska I, Bertin TK, Dawson B, D'Souza R, Qin C, Lee B. Transcriptional repression of the *Dspp* gene leads to dentinogenesis imperfecta phenotype in *Cilla1-Trps1* transgenic mice. *J Bone Miner Res*. 2012;27:1735-1745.
- Narayanan K, Ramachandran A, Hao J, He G, Park KW, Cho M, George A. Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca^{2+} store. *J Biol Chem*. 2003;278:17500-17508.
- Narayanan K, Gajjeraman S, Ramachandran A, Hao J, George A. Dentin matrix protein1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2006;281:19064-19071.

- Nieminen P, Papagiannoulis – Lascardes L, Waltimo – Siren J, Ollia P, Karjalainen S, Arte S, Veerkamp J, Walton VT, Küstner EC, Siltanen T, Holappa H, Lukinmaa P-L, Alaluusua S. Frameshift mutations in dentin phosphoprotein and dependence of dentin disease phenotype on mutation location. *J Bone Miner Res.* 2011;26:873-880.
- Ogburke KU, Fisher LW. Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in salivary glands. *J Dent Res.* 2004;83:664-670.
- Ogburke KU, Fisher LW. SIBLING expression patterns in duct epithelia reflect the degree of metabolic activity. *J Histochem Cytochem.* 2007;55:403-409.
- Oldberg Å, Antonsson P, Lindblom K, Heinegård D. A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J.* 1989;8:2601-2604.
- Paine ML, Luo W, Wang HJ, Bringas P, Jr., Ngan AY, Miklus VG, Zhu DH, MacDougall M, White SN, Snead ML. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein overexpression during amelogenesis. *J Biol Chem.* 2005;280:31991-31998.
- Prasad M, Butler WT, Qin C. Dentin sialoprotein (DSPP) in biomineralization. *Connect Tissue Res.* 2010;51(5):404-417.
- Prasad M, Zhu Q, Sun Y, Wang X, Kulkarni A, Boskey A, Feng JQ, Qin C. Expression of dentin sialophosphoprotein in non-mineralized tissues. *J Histochem Cytochem.* 2011;59:1009-1021.
- Progeny G, Hernandez DJ, Vogel KG. The in vitro interaction of proteoglycans with type I collagen is modulated by phosphate. *Arch Biochem Biophys.* 1994;313:102-111.
- Qin C, Brunn JC, Jones J, George A, Ramachandran A, Gorski JP, Butler WT. A comparative study of sialic acid-rich proteins in rat bone and dentin. *Eur J Oral Sci.* 2001;109:133-141.

- Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Butler WT. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res*. 2002;81:392-394.
- Qin C, Brunn JC, Baba O, Wygant JN, McIntyre BW, Butler WT. Dentin sialoprotein isoforms: detection and characterization of a high molecular weight dentin sialoprotein. *Eur J Oral Sci*. 2003a;111(3):235-242.
- Qin C, Brunn JC, Cook RG, Orkiszewski RS, Malone JP, Veis A, Butler WT. Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J Biol Chem*. 2003b;278:34700-34708.
- Qin C, Baba O, Butler WT. Post – translational modifications of SIBLING proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15,3:126-136.
- Qin C, Huang B, Wygant JN, McIntyre BW, McDonald CH, Cook RG, Butler WT. A chondroitin sulfate chain attached to the bone dentin matrix protein1 NH₂ – terminal fragment. *J Biol Chem*. 2006;281:8034-8040.
- Rabie AM, Veis A. An immunohistochemical study of the routes of secretion of collagen and phosphophryn from odontoblasts into dentin. *Connect Tissue Res*. 1995;31:197-209.
- Rajpar MH, Koch MJ, Mellody KT, Kielty CM, Dixon MJ. Mutation of the signal peptide region of bicistronic gene DSPP affects translocation to the endoplasmic reticulum and results in defective dentine biomineralization. *Hum Mol Genet*. 2002;11:2559-2565.
- Ritchie HH, Wang LH, Kundtson K. A novel rat 523 amino acid phosphoryn: nucleotide sequence and genomic organization. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1520(3):212-222.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. 1989; Cold Spring Harbour Press, New York.
- Scott JE. Proteoglycan-collagen interactions. *Ciba Found Symp*. 1986;124:104-124.

- Shields ED, Bixler D, el-Kafrawy AM. A proposed classification for heritable human dentine defects with a description of a new entity. *Arch Oral Biol.* 1973;18:543-553.
- Silvent J, Sire J-Y, Delgado S. The dentin matrix acidic phosphoprotein1 (DMP1) in the light of mammalian evolution. *J Mol Evol.* 2013;76:59-70.
- Song Y, Wang C, Peng B, Ye X, Zhao G, Fan M, Fu Q, Bian Z. Phenotypes and genotypes in 2 DGI families with different DSPP mutations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:360-374.
- Steiglitz BM, Ayala M, Narayanan K, George A, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1. *J Biol Chem.* 2004;279:980-986.
- Stetler-Stevenson WG, Veis A. Type I collagen shows a specific binding affinity for bovine dentin phosphoryn. *Calcif Tissue Int.* 1986;38:135-141.
- Sugars RV, Olsson ML, Waddington RJ, Wendel M. Substitution of bovine dentine sialoprotein with chondroitin sulfate glycosaminoglycan chains. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:89-92.
- Sun Y, Prasad M, Wang X, Butler WT, Qin C. Detection of full – length dentin sialophosphoprotein in rat dentin – pulp complex. *J Dent Res.* 2009;88(Special Issue) Abstract #1690.
- Sun Y, Lu Y, Chen S, Prasad M, Wang X, Zhu Q, Zhang J, Ball H, Feng J, Butler WT, Qin C. Key proteolytic cleavage site and full-length form of DSPP. *J Dent Res.* 2010;85:498-503.
- Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Muller R, Goldberg M, Kulkarni AB. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 2009;28:221-229.
- Szpranger-Nodzak M, Wochny-Sobańska M. *Stomatologia wieku rozwojowego.* 2003 PZWL
- Terasawa M, Shimokawa R, Terashima T, Ohya K, Takagu Y, Shimokawa H. Expression of dentin matrix protein1 (DMP1) in nonmineralized tissues. *J Bone Miner Metab.* 2004;22:430-438.

- Tsuchiya S, Simmer J, Hu JC, Richardson AS, Yamakoshi F, Yamakoshi Y. Astacin proteases cleave dentin sialophosphoprotein (Dspp) to generate dentin phosphoprotein (Dpp). *J Bone Miner Res.* 2011;26(1):220-228.
- Veis A, Perry A. The phosphoprotein of the dentin matrix. *Biochemistry.* 1967;6:2409-2416.
- Weinstock M, Leblond CP. Radioautographic visualization of the deposition of a phosphoprotein at the mineralization front in the dentin of the rat incisor. *J Cell Biol.* 1973;56:838-845.
- Witkop CJ Jr. Hereditary defects of dentine. *Dent Clin North AM.* 1975;19:25-45.
- Xiao S, Yu C, Chou X, Yuan W, Wang Y, Bu L, Fu G, Qian M, Yang J, Shi Y, Hu L, Han B, Wang Z, Huang W, Liu J, Chen Z, Zhao G, Kong X. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive heating loss is associated with distinct mutations in *DSPP*. *Nat Genet.* 2001;27:201-204.
- Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindbad-Toh K, Lander ES, Kellis M. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3'UTRs by comparison of several mammals. *Nature.* 2005;434:338-345.
- Yamakoshi Y, Hu JC, Liu S, Zhang C, Oida S, Fukae M, Simmer JP. Characterization of porcine dentin sialoprotein (DSP) and dentin sialopfosphoprotein (DSPP) cDNA clones. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(1):60-67.
- Yamakoshi Y, Hu JC, Fukae M, Iwata T, Kim JW, Zhang H, Simmer JP. Porcine dentin sialoprotein is a proteoglycan with glycosaminoglycan chains containing chondroitin 6-sulfate. *J Biol Chem.* 2005a;280:1552-1560.
- Yamakoshi Y, Hu JC, Fukae M, Zhang H, Simmer JP. Dentin glycoprotein. The protein in the middle of the dentin sialophosphoprotein chimera. *J Biol Chem.* 2005b;280:17472-17479.

- Yamakoshi Y, Hu JC, Iwata T, Kobayashi K, Fukae M, Simmer JP. Dentin sialophosphoprotein is processed by MMP-2 and MMP-20 *in vitro* and *in vivo*. J Biol Chem. 2006;281:38235-38243.
- Yamakoshi Y, Lu Y, Hu JC, Kim J, Iwata T, Kobayashi K, Nagano T, Yamakoshi F, Hu Y, Fukae M, Simmer JP. Porcine dentin sialophosphoprotein length polymorphisms, glycosylation, phosphorylation, and stability. J Biol Chem. 2008;283:14835-14844.
- Yamakoshi Y. Dentin sialophosphoprotein (DSPP) and dentin. J Oral Biosci. 2008;50(1):33-44.
- Yamakoshi Y. Dentinogenesis and dentin sialophosphoprotein (DSPP). J Oral Biosci. 2009;51(3):134.
- Yang M, Li Y, Padgett RW. MicroRNAs: Small regulators with a big impact. Cytokine Growth factor Rev. 2005;16.4-5:387-393.
- Ye L, MacDougall M, Zhang S, Xie Y, Zhang J, Lu Y, Mishina Y, Feng JQ. Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. J Biol Chem. 2004;279:1914-1918.
- Zanetti M, de Bernard, Jontell M, Linde A. Ca^{2+} binding studies of phosphoprotein from rat-incisor dentine. Eur J Biochem. 1981;113:541-545.
- Zhang X, Zhao J, Li C, Gao S, Qiu C, Liu P, Wu G, Qiang B, Lo W, Shen Y. DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. Nat Genet. 2001;27:151-152.
- Zhang X, Chen L, Liu J, Zhao Z, Qu E, Wang X, Chang W, Xu C, Wang Q, Liu M. A novel *DSPP* mutation is associated with type II dentinogenesis imperfecta in a chinese family. BMC Med Genet. 2007;8:52-57.

Zhao J, Hyman L, Moore C. Formation of mRNA 3'ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63:405-445.

Zhu Q, Sun Y, Prasad M, Wang X, Yamoah, Li Y, Feng J, Qin C. Glycosaminoglycan chain of dentin sialoprotein proteoglycan. *J Dent Res.* 2010;89:808-812.