

PAULINA BAUTEMBACH-KOBERDA

**POLIMORFIZM W GENIE *DSPP*
W POPULACJI OSÓB NIE PREZENTUJĄCYCH
FENOTYPU *DENTINOGENESIS IMPERFECTA*
TYPU II I/LUB III ORAZ DYSPLAZJI ZĘBINY**

PRACA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Z KATEDRY I ZAKŁADU PROTETYKI STOMATOLOGICZNEJ
GDAŃSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO

PROMOTOR
DR HAB. N. MED. IZABELA MACIEJEWSKA

BADANIA WYKONANO W KATEDRZE I ZAKŁADZIE MEDYCZYNY SĄDOWEJ
GDAŃSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO
PRACA FINANSOWANA Z PROJEKTU BADAWCZEGO 1300/B/PO1/2011/40 IM

KIEROWNIK KATEDRY:
DR HAB. ZBIGNIEW JANKOWSKI



GDAŃSK 2013

*Pragnę serdecznie podziękować mojemu Promotorowi
Pani Dr hab. Izabeli Maciejewskiej za opiekę merytoryczną,
cierpliwość i zaufanie, a także za poświęcony czas i pomoc
podczas powstawania i redagowania niniejszej pracy.*

*Serdecznie dziękuję Panu Dr hab. Zbigniewowi Jankowskiemu
oraz Panu Profesorowi dr hab. Ryszardowi Pawłowskiemu
za umożliwienie przeprowadzenia badań
w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej.*

*Pani Dr Agnieszce Maciejewskiej z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej
dziękuję za cenne rady i wskazówkioraz ogromną pomoc,
podczas wykonywania części badawczej niniejszej pracy.*

*Dziękuję Mojej Rodzinie za wsparcie i wyrozumiałość, w szczególności
mojemu mężowi Maciejowi oraz synkowi Mikołajowi,
którzy wykazali ogrom dobrej woli i cierpliwości.
Bez Waszego wsparcia i pomocy stworzenie tej pracy byłoby znacznie trudniejsze.*

Spis treści

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW I SYMBOLI UŻYWANYCH W PRACY.....	5
1. STRESZCZENIE.....	8
2. SUMMARY.....	12
3. WSTĘP.....	15
3.1. Zębina.....	15
3.1.1. Białka budujące organiczną macierz zębiny	16
3.1.1.1. Kolagen.....	16
3.1.1.2. Proteoglikany z rodziny SLRP (Small Leucine Rich Proteoglicans)	18
3.1.1.3. Rodzina białek SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein)	20
3.1.1.4. Sialofosfoproteina zębiny DSPP (Dentin SialoPhosphoProtein)	21
3.1.1.5. Białko macierzy zębinowej 1 DMP 1, (Dentin Matrix Protein 1).....	25
3.2. Gen kodujący białko DSPP	27
3.2.1. Zmiany w sekwencji genu <i>DSPP</i>	29
4. CEL PODJĘTYCH BADAŃ.....	31
5. MATERIAŁY I METODY	32
5.1 Próbki biologiczne	32
5.1.1 Izolacja DNA.....	32
5.1.2 Pomiar stężenia DNA	33
5.1.3 Amplifikacja fragmentów genu <i>DSPP</i>	33
5.1.4 Sekwencjonowanie produktów amplifikacji fragmentów eksonów 2, 3, 4.1, 4.2, 5.1, 5.2, 5.5, 5.6 genu <i>DSPP</i>	36
5.1.5 Precypitacja produktów reakcji sekwencjonowania.....	37
5.1.6 Rozdział produktów reakcji sekwencjonowania elektroforezą kapilarną (CE) z zastosowaniem automatycznego analizatora DNA typu ABI PRISM 310.....	37
6. WYNIKI	39
6.1 Polimorfizm w sekwencji genu <i>DSPP</i> kodującej białko DSP	39
6.2 Mutacje w sekwencji genu <i>DSPP</i> kodującej białko DSP	41
6.3 Polimorfizm w sekwencji genu <i>DSPP</i> kodującej białko DPP	43
6.3.1 Polimorfizm typu SNP w sekwencji genu <i>DSPP</i> kodującej białko DPP	43

6.3.1.1	Tranzycja C → T w sekwencji genu DSPP w kodonach kodujących serynę w białku DPP.....	43
6.3.1.2	Tranzycja T → C w sekwencji genu DSPP w kodonach kodujących serynę w białku DPP.....	51
6.3.1.3	Tranzycja T → C w sekwencji genu DSPP w kodonach kodujących kwas asparaginowy w białku DPP.....	55
6.3.1.4	Tranzycja C → T w sekwencji genu DSPP kodującej kwas asparaginowy w białku DPP.....	59
6.3.1.5	Tranzycja T → C w sekwencji genu DSPP w kodonach kodujących asparaginę w białku DPP.....	62
6.3.2	Zmiany ilościowe w sekwencji kodującej białko DPP (insercje/delecje).....	64
6.4	Mutacje w sekwencji genu <i>DSPP</i> kodującej białko DPP.....	65
6.4.1	Mutacje w pierwszym nukleotydzie kodonów w sekwencji genu <i>DSPP</i> kodującej białko DPP.....	65
6.4.2	Mutacje w drugim nukleotydzie kodonów w sekwencji genu <i>DSPP</i> kodującej białko DPP.....	66
6.4.3	Mutacje w trzecim nukleotydzie kodonów w sekwencji genu <i>DSPP</i> kodującej białko DPP.....	67
6.5	Wyniki analizy statystycznej: zmiany dotyczące probantów (statystyka opisowa).....	68
6.5.1	Allele bez zmian.....	68
6.5.2	Polimorfizm i mutacja.....	69
6.5.3	Analiza liczby zmian w pojedynczym allelu versus obydwu allelach w badanej zbiorowości.....	71
6.6	Wyniki analizy statystycznej dotyczącej zależności między wystąpieniem polimorfizmu/mutacji przy zmienionym 1 allelu lub przy 2 zmienionych allelach.....	73
6.6.1	Zależność wystąpienia polimorfizmu przy zamianie sekwencji 1 allela.....	73
6.6.2	Zależność wystąpienia mutacji przy zamianie sekwencji 1 allela.....	74
7.	DYSKUSJA.....	75
8.	WNIOSKI.....	84
9.	PIŚMIENNICTWO.....	85

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW I SYMBOLI UŻYWANYCH W PRACY

A	– adenina
aa.	– aminokwas
Asn	– asparagina
Asp	– kwas asparaginowy
Arg	– arginina
BSP	– sialoproteina kostna (ang. Bone Sialoprotein)
C	– cytozyna
CE	– elektroforeza kapilarna
CS	– siarczan chondroityny
Cys	– cysteina
DD	– dysplazja zębiny (ang. Dentin Dysplasia)
dATP	– deoksyadenozynotrójfosforan
dCTP	– deoksycytydynotrójfosforan
DGI II/III	– wrodzony niedorozwój zębiny typu II/III (ang. Dentinogenesis Imperfecta type II/III)
dGTP	– dezoksyguanidynotrójfosforan
DMP1	– białko macierzy zębinowej 1(ang. Dentin Matrix Protein 1)
DMP-PG	– fragment 37 kDa białka macierzy zębinowej 1 – forma proteoglikanu (ang. Dentin Matrix Protein Proteoglican)
DS	– siarczan dermatanu
DSP	– białko sialowe zębiny u człowieka (ang. Dentin Sialoprotein)
<i>DSPP</i>	– gen kodujący białko sialofosforowe zębiny u człowieka
DSPP	– białko sialofosforowe zębiny (ang. Dentin Sialophosphoprotein) u człowieka
<i>dspp</i>	– gen kodujący białko sialofosforowe zębiny u zwierząt
<i>dsp</i>	– białko sialofosforowe zębiny u zwierząt
DSP-PG	– białko sialowe zębiny – forma proteoglikanu (ang. Dentin Glycoprotein)
DPP	– fosfoproteina zębiny (ang. Dentin Phosphoprotein)
dUTP	– deoksyurydynotrójfosforan
EDTA	– sól sodowa kwasu etylenodwuaminoczworoocowego

ENAM	–	enamelina
G	–	guanina
g.	–	genomowe DNA
GAG	–	glikozaminoglikany
Glu	–	kwask glutaminowy
HA	–	hydroksyapatyt
HMW-DSP	–	sialoproteina zębiny o wysokiej masie cząsteczkowej (ang. <i>High Molecular Weight Dentin Sialoprotein</i>)
HPLC	–	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LMW-DSP	–	sialoproteina zębiny o niskiej masie cząsteczkowej (ang. <i>Low Molarular Weight Dentin Sialoprotein</i>)
MC3T3	–	linia komórek prekursorowych osteoblastów pochodzenia mysiego
MECP 2	–	gen kodujący białko MECP2
MEPE	–	fosfoglikoproteina macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. <i>Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein</i>)
MMW-DSP	–	sialoproteina zębinowa o średniej masie cząsteczkowej (ang. <i>Medium Molecular Weigh Dentin Sialoprotein</i>)
NTP	–	nukleotydy
OPN	–	osteopontyna (ang <i>Osteopontin</i>)
PCR	–	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PG	–	proteoglikany
POP6	–	polimer denaturujący
Pse	–	seryna ufosforylowana
rER	–	szorstkie retikulum endoplazmatyczne (ang. <i>rough Endoplasmic Reticulum</i>)
RGD	–	sekwencja peptydowa wiążąca integryny (arginina-glicyna-kwas asparaginowy)
Runx2	–	czynnik transkrypcyjny
Ser	–	seryna

SIBLING –	rodzina białek niekolagenowych (ang. <i>Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoproteins</i>)
SLRP –	rodzina małych, bogatych w leucynę proteoglikanów (ang. <i>Small Leucyn-Rich Proteoglycans</i>)
SNP –	polimorfizm dotyczący pojedynczego nukleotydu (ang. <i>Single Nucleotide Polimorphism</i>)
T –	tymina
TGFβ –	transformujący czynnik wzrostu β (ang. <i>Transforming Growth Factor β</i>)
Tprs 1 –	czynnik transkrypcyjny
Tris –	bufor biochemiczny, hydroksymetyl/aminometan
Trp –	tryptofan
U –	uracyl
UTR –	obszar mRNA nieulegający translacji (ang. <i>Untranslated Region</i>)

1. STRESZCZENIE

Najnowsze wyniki analizy molekularnej sekwencji genu *DSPP* u osób obciążonych fenotypem *dentinogenesis imperfecta* typu II/III (DGI II/III) bądź dysplazją zębiny (DD) dowodzą, iż obydwa fenotypy reprezentują tę samą jednostkę chorobową, będącą efektem mutacji w genie *DSPP*, a różniącą się jedynie stopniem penetracji wady. Zmiany chorobowe dziedziczone są w sposób autosomalny dominujący lub też są wynikiem mutacji *de novo*. Z uwagi na istotność funkcji jaką białko DSPP pełni w procesie nukleacji kryształów hydroksyapatytu oraz następczej mineralizacji zębiny, mutacje w genie *DSPP* skutkują nieprawidłową budową zębiny, zarówno w uzębieniu mlecznym, jak i stałym. Gen *DSPP* zlokalizowany jest na chromosomie 4q21.3 i koduje białko natywne DSPP, które w wyniku intensywnej modyfikacji potranslacyjnych ulega podziałowi na dwa białka potomne odpowiednio: – sialoproteinę (DSP) oraz – fosfoproteinę (DPP) zębiny. Pomimo wspólnego pochodzenia, białka te mają całkowicie odmienny charakter biochemiczny, co w konsekwencji rzutuje na ich skrajnie różną funkcję w procesie mineralizacji zębiny. Uważa się, że białko DSP bierze udział w bardzo wczesnym etapie mineralizacji, podczas gdy białko DPP aktywnie uczestniczy w nukleacji kryształu hydroksyapatytu, a następnie pośredniczy w dojrzewaniu i pełnej mineralizacji zębiny.

Mutacje wykryte w genie *DSPP* arbitralnie podzielono na trzy grupy uwzględniając ich lokalizację w sekwencji genu *DSPP*. Są to mutacje zlokalizowane w sekwencji kodującej: – peptyd sygnalizacyjny, – białko DSP oraz – białko DPP. Mutacje sekwencji kodującej peptyd sygnalizacyjny oraz te w sekwencji kodującej białko DSP najczęściej mają charakter transwersji i/lub translacji (SNP), podczas gdy mutacje zlokalizowane w sekwencji DPP mogą mieć zarówno charakter SNP, jak charakter ilościowy w postaci delecji i/lub insercji. Dotychczas w literaturze światowej opisano około 40 mutacji w genie *DSPP* skutkujących powstaniem fenotypu DGI II/III bądź DD oraz bardzo dużą ilość mutacji utajonych o charakterze polimorfizmu. Polimorfizm dotyczy zarówno mutacji typu SNP, jak i delecji i insercji bez przesunięcia ramki odczytu.

Celem pracy była analiza molekularna polimorfizmu genu *DSPP* u osób nie wykazujących cech klinicznych *dentinogenesis imperfecta* typu II/III bądź dysplazji zębiny. Badaniu poddano sekwencję genu *DSPP* kodującą zarówno białko DSP, jak i białko DPP poszukując polimorfizmu typu SNP oraz delecji i insercji i porównując je z danymi zgromadzonymi w światowej bazie ludzkiego genomu Ensembl (www.ensembl.org).

Jednocześnie weryfikowano czy w badanej grupie istnieją mutacje, które nie skutkują powstaniem fenotypu DGI II/III lub DD oraz jaka jest częstość występowania tych mutacji, określanych jako polimorfizm lokalny, w odniesieniu do całej populacji. Badania prowadzono za zgodą Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym i każdorazowo uzyskano pisemną zgodę probanta na wykonanie badania.

Do analizy użyto DNA pochodzące od 30 probantów, nie prezentujących fenotypu DGI II/III i/lub DD. Materiał do badań stanowiły wymazy pobierane z błony śluzowej jamy ustnej za pomocą jałowych wymazówek. Izolacja DNA przeprowadzona została klasyczną metodą organiczną przy użyciu mieszaniny fenol-chloroform. Kolejnym etapem był pomiar stężenia DNA, którego dokonano metodą fluorymetryczną. Materiał badany (sekwencja genu *DSPP*) został poddany amplifikacji metodą PCR z użyciem starterów zaproponowanych przez grupę McKnight oraz Bai. Amplikony DNA poddano oczyszczeniu, sekwencjonowaniu, a następnie rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej z zastosowaniem automatycznego analizatora.

Analiza molekularna DNA 30 probantów wykazała obecność zmian polimorficznych w 48 pozycjach sekwencji genu *DSPP*, w tym zmiany o charakterze SNP oraz insercje i delecje. Ponadto, wykryto 11 mutacji punktowych; 1 w sekwencji kodującej białko DSP i 10 w sekwencji kodującej białko DPP. W sekwencji kodującej białko DSP odnotowano pojedynczą zmianę o charakterze SNP w pozycji g.930. Zmiana miała charakter tranzycji i dotyczyła ostatniego nukleotydu w kodonie kodującym aminokwas serynę. W pozycji g.235 natomiast wykazano tranzycję A → T, w wyniku której doszło do zmiany aminokwasu argininy w tryptofan.

Znacząco więcej zmian o charakterze polimorfizmu wykazano w sekwencji kodującej białko DPP. U wszystkich 30 probantów odnotowano łącznie tranzycje pirymidyn w 47 pozycjach sekwencji kodującej białko DPP. Zmiany występowały w ostatnim nukleotydzie kodonów kodujących aminokwasy: – serynę (28 zmian), – kwas asparaginowy (18 zmian) oraz – asparaginę (1 zmiana) i żadna nie prowadziła do zmiany kodowanego aminokwasu. Analiza sekwencji kodującej DPP wykazała ponadto obecność 10 mutacji punktowych, każdorazowo w pojedynczym allelu. U żadnego probanta nie stwierdzono tej samej mutacji w obu allelach.

Dodatkowo w sekwencji kodującej białko DPP odnotowano 7 zmian o charakterze ilościowym, w tym 2 insercje oraz 5 delecji. Wśród odnotowanych delecji największa liczba utraconych nukleotydów wynosiła 171, a najmniejsza 9, natomiast w odnotowanych 2 przypadkach insercji ilość dodanych nukleotydów wynosiła 18.

Przez wzgląd na degenerację kodu genetycznego wykryte zmiany o charakterze polimorfizmu SNP nie skutkowały zamianą kodowanego aminokwasu, stąd u przebadanych probantów nie stwierdzono objawów klinicznych DGI II/III lub DD. Najciekawszym zaobserwowanym typem zmian była obecność 11 mutacji punktowych w sekwencjach genu *DSPP* kodujących zarówno białko DSP, jak i DPP. Pomimo braku stwierdzenia jakichkolwiek cech fenotypu DGI II/III lub DD w badanej grupie, trzykrotnie powtarzana analiza jednoznacznie wykazała, że każdy nosiciel mutacji był heterozygotą.

Mimo intensywnie prowadzonych badań klinicznych, powiązanych ze szczegółową analizą molekularną, na dzień dzisiejszy nie jesteśmy w stanie stwierdzić, dlaczego u niektórych osób mutacja o charakterze zmiany sensu, powoduje powstanie fenotypu DGI II/III lub DD, natomiast u innych nie stwierdza się jakichkolwiek cech klinicznych wady genetycznej. W trakcie analizy uzyskanych wyników postawiono dwie hipotezy. Zakładając, że najbardziej istotnym efektem mutacji jest zmiana w budowie i funkcjonowaniu białka, a także jego aktywność *in-situ* należy rozważyć, że w przypadku heterozygot ilość białka produkowanego z transkryptu powstającego z allele z sekwencją referencyjną jest wystarczająca dla zapewnienia funkcjonalności białek DSP oraz DPP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej odontoblasta. W dużo mniejszym procencie dopuszcza się możliwość obecności w uzębieniu mlecznym szczątkowej postaci DD u pacjentów z mutacją, która nie wykazuje objawów w uzębieniu stałym. Ostatecznie, porównanie pozyskanych wyników z danymi ludzkiego genomu zamieszczonymi w światowej bazie Ensembl sugeruje, że zarówno obserwowane w badanej grupie mutacje, jak i polimorfizm genu *DSPP* mogą mieć charakter rzadkich, „niepatogennych” odmian sekwencji genu *DSPP*, które są specyficzne dla populacji z danego rejonu.

Na podstawie przeprowadzonej analizy można wywnioskować, że gen *DSPP* kodujący sialofosfoproteinę zębiny wykazuje wysoki stopień polimorfizmu w populacji osób nie prezentujących fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II/III bądź dysplazji zębiny.

Polimorfizm SNP dotyczy sekwencji kodującej białko DSP oraz sekwencji kodującej DPP, natomiast zmiany ilościowe (delecja, insercja) odnotowane zostały jedynie w sekwencji kodującej fosfoproteinę. Analiza wykazała także obecność mutacji, które pomimo zmiany kodowanego aminokwasu, nie skutkują powstaniem fenotypu DGI II/III bądź DD, a częstość ich występowania pozwala zakwalifikować je do zmian o charakterze polimorfizmu, który jest specyficzny dla badanej próby.

Jak dotąd na terenie Polski nigdy nie podjęto badań mających na celu molekularną analizę sekwencji genu *DSPP* zarówno u pacjentów prezentujących cechy kliniczne *dentinogenesis imperfecta* typu II/III lub dysplazji zębiny, jak też w zdrowej populacji. Badania takie wydają się jak najbardziej zasadne przez wzgląd na ogromny problem leczniczy, jaki niesie za sobą leczenie chorych z *dentinogenesis imperfecta* typu II/III lub dysplazją zębiny. Zastosowanie najbardziej nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej pozwala również na stworzenie profilu zmienności genu *DSPP* (polimorfizm) w polskiej populacji, który zgodnie z wynikami uzyskanymi w obecnej pracy wydaje się prezentować polimorfizm specyficzny dla naszego regionu, różniący się od danych zawartych w ogólnoświatowej bazie ludzkiego genomu Ensembl określonych dla populacji europejskiej (rasy Kaukaskie) i ogólnoświatowej.

2. SUMMARY

The most updated molecular analysis of the *DSPP* gene revealed that both diseases *dentinogenesis imperfecta* (DGI) type II/III and dentin dysplasia (DD) are the same hereditary dentin disorder with the phenotype reflecting mutations in the *DSPP*. The disease is inherited as a dominant autosomal disorder or may result from *de novo* mutation in the *DSPP* gene.

Dentin sialophosphoprotein (DSPP) is the key noncollagenous dentin matrix protein that participates in the nucleation of hydroxyapatite crystal and dentin mineralization. Thus any mutation in the *DSPP* gene usually manifests in inappropriate dentin formation and maturation either in deciduous or permanent teeth. In human, the *DSPP* gene is located on chromosome 4q21.1. Right after translation, the DSPP undergoes the extended posttranslational modifications including cleavage into two daughter proteins dentin sialoprotein (DSP) and dentin phosphoprotein (DPP). Even though these two proteins are of the same origin, they show completely different biochemical properties thus play diverse roles in dentin production and mineralization. DSP participates in a very early dentin nucleation while DPP is critical for dentin mineralization and final maturation.

According to the localization in the sequence, the mutations in the *DSPP* gene may be arranged into three divisions; those in the – signal peptide, – coding sequence of the DSP and – coding sequence of the DPP. The mutations in the signal peptide and DSP are mostly transversions and/or transitions, while those which are localized in the DPP coding sequence may be also deletions and/or insertions. To date about 40 mutations in the *DSPP* gene were characterized. All of them resulted in the phenotype of DGI II/III and/or DD. Additionally, a remarkable polymorphism of the *DSPP* gene has been reported.

The aim of the study was to analyze polymorphism of the *DSPP* gene in the group of 30 unrelated probands who presented none clinical symptom of *dentinogenesis imperfecta* type II/III or dentin dysplasia. The sequence of the *DSPP* gene was studied and analyzed with the special consideration for both the coding sequence of DSP and DPP. The analysis was supposed to determine the polymorphic changes (SNP, deletion, insertion), but also verify the presence of potential mutations, which did not result in the phenotype of DGI II/III or DD. Additionally, the frequency of both polymorphism and mutations was compared to data from Human Genome database Ensembl (www.ensembl.org).

The study was conducted with the approval of the Independent Ethics Commission of Medical University of Gdańsk and each proband written consent to perform the study.

DNA was subjected to the standard procedure, in accordance with the principles of molecular genetics. DNA was swabbed from oral mucosa and thereafter isolated with the standard phenol-chloroform method. After fluorescent measurement of DNA concentration, the *DSPP* fragments were amplified with PCR, purified and sequenced. At the very last step the DNA was separated with the capillary electrophoresis.

The sequence analysis of the *DSPP* gene showed the presence of 48 single nucleotide polymorphism (SNP) in the sequences of all 30 probands. All those changes were localized in the last – third nucleotide from a particular codon thus did not result in the changes of the coded aminoacids. One SNP was detected in the coding sequence of DSP, while 47 occurred in the coding sequence of DPP. SNP at 28 positions appeared in the codons of serine, 18 in the codons of aspartic acid and the last 1 in the codon of asparagine. Additionally, 2 insertions and 5 deletions in the coding sequence of DPP were noted. The minimal number of the lost base pairs was 9 and the maximal 171. In both cases of insertion, 18 nucleotides were added to the reference sequence of *DSPP*. Our scrutinized analysis showed also 11 point mutations in the *DSPP* gene sequence; 1 in the coding sequence of DSP and 10 in the coding sequence of DPP. Each mutation appeared in a single allele. Thus, all 10 probands appeared to be heterozygote.

Due to the degeneracy of the genetic code the SNPs detected in this study did not result in the change of the coded aminoacid. Thus, it seems conceivable that none of our patient presented the phenotype of *dentinogenesis imperfecta* type II/III or dentin dysplasia.

Even though an intensive clinical studies combined with the detailed molecular analysis, it is hard to determine why some people with a missense mutation in the *DSPP* gene present the phenotype of DGI II/III or DD, whereas others do not.

In the current study two hypothesis were evaluated. Assuming that the most important effect of a mutation is a change in the protein structure, function and activity, it should be considered that at heterozygote the amount of protein translated from the proper transcript is sufficient for the correct functioning of the DSP and DPP in the dentin extracellular matrix. Less probably the evaluated heterozygots could present very mild shape of the DD at childhood, which cannot be detected anymore

Finally, a comparison of the results from the current investigation to the data gathered in the Human Genome database Ensembl suggested, that both the observed mutations and polymorphism may reflect the rare sequence variants specific for the local population.

Overall analysis allows for the conclusion that the *DSPP* gene is highly polymorphic at the coding sequences of both DSP and DPP, although the deletions and insertions happen exclusively in the DPP coding sequence.

Up-to-date there has never been undertaken research aimed the molecular analysis of the *DSPP* gene in Polish population neither at the people presenting clinical symptoms of *dentinogenesis imperfecta* type II / III or dentin dysplasia or healthy inhabitants. Such studies would be essential due to a critical medical problem connected with the treatment of the patients with *dentinogenesis imperfecta* type II / III or dentin dysplasia. Usage of the most contemporary molecular diagnostics would help to create a sophisticated profile of *DSPP* polymorphism for the Polish population since the results from the current study showed its specificity and variation compared to the data gathered in the Human Genome database Ensembl.

3. WSTĘP

3.1. Zębina

Zębina stanowi „elastyczną” i jednocześnie zmineralizowaną tkankę będącą główną komponentą budulcową zęba, oddzielającą komorę miazgi od szkliwa. Dojrzała zębina zbudowana jest ze składników mineralnych, głównie dwuhydroksyapatytów, natomiast jej część organiczną stanowią kolagen oraz liczne białka niekolagenowe. Pomimo znacznego spowolnienia po okresie zakończonej morfogenezy, apozycyjne odkładanie zębiny trwa przez cały okres życia osobniczego i jest efektem reakcji komórek zębinotwórczych na fizjologiczne i patologiczne bodźce środowiskowe.

Główny budulec zęba stanowi zębina pierwotna zwana także zębina okołomiazgową. Zewnętrzna warstwa tej zębiny, zwana zębina płaszczową, leży w bezpośrednim sąsiedztwie szkliwa i cementu korzeniowego i różni się od pozostałej części zębiny pierwotnej zarówno stopniem mineralizacji, jak również wzajemnym strukturalnym połączeniem kolagenowych i niekolagenowych komponent macierzy [1, 2]. Cechą charakterystyczną zębiny płaszczowej jest brak kanalików zębinowych w całym jej obszarze. Jedynie nieliczne canaliculi występują pomiędzy warstwą niezmineralizowaną i zmineralizowaną [3]. Mineralizacja zębiny przebiega w kierunku od komory zęba do granicy szkliwno-zębinowej, a granicę odkładania minerału nazwano frontem mineralizacji [1, 4, 5].

Zębina wtórna jest stosunkowo wolno odkładana przez odontoblasty i w stosunku do zębiny pierwotnej charakteryzuje się mniej regularną strukturą kanalikową, pomimo porównywalnej zawartości składników mineralnych i organicznych [6, 7]. Odkładanie zębiny wtórnej następuje w efekcie obciążenia zgryzowego i w konsekwencji prowadzi do asymetrii w kształcie, i wielkości komory miazgi, wraz z jednoczesną recesją miazgi zęba [8, 9]. Kolejny rodzaj zębiny tzw. zębina trzeciorzędowa, zwana inaczej reperacyjną, jest odkładana pod wpływem bezpośrednich bodźców środowiskowych w postaci: atrycji, aktywnego ogniska próchnicowego lub czynności związanych ze stomatologią odtwórczą. Strukturę kanalikową zębiny reperacyjnej cechuje duża różnorodność, a ilość i przebieg kanalików zębinowych może być identyczny jak w zębinie wtórnej bądź mniejszy

i nieregularny. Zdarza się również, że w zębinię reparacyjnej kanaliki zębinowe w ogóle nie występują [5, 8].

Prawidłowo wykształcona zębina jest tkanką zmineralizowaną, która w 70% składa się z materiału nieorganicznego, w 20% z materiału organicznego, natomiast 10% stanowi woda [10]. Komponentę nieorganiczną macierzy zębiny tworzą głównie kryształy dwuhydroksyapatytu [10]. Fazę organiczną w 90% budują białka kolagenowe, głównie kolagen typu I (86%), trymer typu I oraz niewielkie ilości kolagenu typu III, V i VI [1], a także białka niekolagenowe oraz lipidy [1, 11, 12]. Niekolagenowe białka organicznej macierzy zębiny, do których należą osteonektyna, osteokalcyna, białka z rodziny SIBLING (Small Integrin – Binding Ligand N-linked Glykoproteins) oraz białka z rodziny SLRP (Small Leucin Rich Proteoglycan), wypełniają przestrzeń pomiędzy włóknami kolagenu i odkładają się peryferyjnie wzdłuż kanalików zębinowych [13, 14, 15].

3.1.1. Białka budujące organiczną macierz zębiny

3.1.1.1. *Kolagen*

Głównym składnikiem organicznej macierzy zębiny są włókna kolagenu typu I, który stanowi około 86% białek kolagenowych zębiny [14, 15]. Gen kodujący kolagen typu I u człowieka znajduje się na chromosomie 17q21. Dodatkowo, w znacząco mniejszej ilości w zębinię, występuje kolagen typu III, V, VI oraz trymer typu I [14, 15, 16, 17]. Kolagen typu I jest złożony z dwóch identycznych łańcuchów (alfa)1 i jednego łańcucha (alfa)2 o kompozycji $[\text{alfa}1(\text{I})]_2\text{alfa}2$, a każdy z łańcuchów składa się średnio z 1000 reszt aminokwasowych [15, 16, 17]. Centralny, około 95% odcinek cząsteczki kolagenu posiada strukturę potrójnej helisy, co zapewnia budowa każdego indywidualnego łańcucha alfa, w którym co trzecim aminokwasem jest glicyna. Taka budowa stanowi warunek konieczny dla tworzenia helisy [17, 18]. Kolejną jedną czwartą wszystkich reszt aminokwasowych budujących kolagen typu I stanowią prolina i hydroksyprolina [1]. Budowa przestrzenna cząsteczek kolagenu przypomina kształtem laseczki, których naprzemienne, podłużne usytuowanie skutkuje utworzeniem włókna kolagenowego. Jednocześnie, ułożenie to skutkuje powstawaniem we włóknach, na przemian, miejsc nakładających się

(*overlap zones*) oraz luk (*hole zones*), widocznych w mikroskopie elektronowym jako krzyżujące się prążki [1]. Kolagen typu I jest syntetyzowany jako dłuższy propeptyd zwany prokolagenem, zawierającym dodatkowe sekwencje N-końcową i C-końcową. Synteza kolagenu rozpoczyna się w kompleksie rybosomalnym rER odontoblasta, gdzie powstają łańcuchy prokolagenu [1]. W następstwie modyfikacji potranslacyjnych reszty proliny i lizyny ulegają hydroksylacji oraz dochodzi do odcięcia peptydu sygnałowego. Następnie hydroksylizyna ulega glikozylacji oraz formują się potrójne helisy prokolagenu. Helisy te w aparacie Golgiego są „pakowane” do pęcherzyków sekrecyjnych i ulegają egzocytozie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Tam specyficzne peptydazy odcinają N-końcowe i C-końcowe propeptydy, co prowadzi do powstania łańcuchów kolagenowych, które spontanicznie, naprzemiennie grupując się, tworzą ostateczne włókna kolagenowe [18, 19, 20].

Kolagen typu III jest homopolimerem zbudowanym z trzech łańcuchów alfa, stanowiącym składnik połowy macierzy kolagenowej miazgi zęba [21, 22, 23]. Inne doniesienia wskazują, iż tkanki zmineralizowane również zawierają kolagen typu III [24]. Karjalainen i wsp. [25] udowodnili, że dojrzałe odontoblasty syntetyzują kolagen typu III tuż po całkowitym zakończeniu rozwoju zęba. Prokolagen typu III występuje krótkotrwale w przębinie podczas formowania się macierzy organicznej, natomiast nie odnaleziono go w zmineralizowanej zębinie [24]. Funkcja kolagenu typu III w prawidłowej, nie zmienionej chorobowo zębinie, nie jest do końca wyjaśniona. Odmiennie w przypadku zębiny reperacyjnej oraz w zębinie zmienionej chorobowo [25, 26]. W tej drugiej badanie wykazały zwiększoną obecność kolagenu typu III u chorych z fenotypem *dentinogenesis imperfecta* typu I [27] będącej efektem mutacji w genie kodującym kolagen typu I.

Typ V kolagenu stanowi nieznaczną część zębiny (około 2%) [16, 28]. Cząsteczki kolagenu typu V mogą być homo- bądź heterotrimerami, złożonymi z trzech unikalnych łańcuchów alfa.

W tkankach zmineralizowanych najobficiej występuje heterotrimer $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$, który jednocześnie jest jedynym typem kolagenu typu V występującym również w kościach [16, 29]. Znaczenie kolagenu typu V w zębinie jak dotąd nie zostało poznane, podobnie jak znaczenie trymeru typu I. Wykazano jedynie, że aktywne sekrecyjnie odontoblasty, wytwarzają duże ilości trymeru typu I, o strukturze $[\alpha 1(I)]_3$ [30]. Generalnie, wszystkie rodzaje kolagenu są syntetyzowane przez

odontoblasty, a następnie wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej bezpośrednio przy podstawie komórki [15]. Tam biorą udział w budowie organicznej macierzy zwanej przezębiną. Kolejno, sieć kolagenowa zagęszcza się wypełniając przestrzeń między przezębiną, a zębiną tworząc następczo swoiste, organiczne rusztowanie dla kryształów minerału [31, 32].

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

Istotną rolę w czasowo-przestrzennej kontroli mineralizacji zębiny odgrywiają proteoglikany należące do rodziny SLRP (Small Leucin-Rich Proteoglycans) [33-39]. Głównymi przedstawicielami SLPR w zębinie są biglikan i dekorin, zbudowane z rdzenia białkowego połączonego kowalencyjnie z łańcuchami glikoaminoglikanów, głównie siarczanu chondroityny (CS) i siarczanu dermatanu (DS) [33, 34, 35]. Zarówno dekorin, jak i biglikan wydzielane są przez odontoblasty do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, w której tworzą swoisty gradient pomiędzy przezębiną, frontem mineralizacji i zmineralizowaną zębiną [36]. Gradient ten, w badaniach immunohistochemicznych, objawia się zmienną immunoreaktywnością okolicy frontu mineralizacji z przeciwciałami przeciwko biglikanowi i dekorinowi [36]. Specyficzną cechą proteoglikanów z rodziny SLRP jest obecność w „rdzeniu” białkowym od 7 do 24 tandemowo powtarzających się reszt leucyny [33, 37]. Oprócz przezębiny i zębiny biglikan i decorin ulegają ekspresji w kości oraz tkankach miękkich: – więzadłach, – dziąśle oraz skórze [38].

Rdzeń białkowy dekorinu ma masę cząsteczkową równą 45 kDa, jednak po przyłączeniu łańcucha cukrowego masa cząsteczkowa wzrasta do 120 kDa [40]. Dekorin przyłącza z reguły jeden łańcuch cukrowy przy czwartym N-końcowym aminokwasie. W tkankach zmineralizowanych łańcuch cukrowy dekorinu jest zbudowany z siarczanu-6-chondroityny [40], podczas gdy w tkankach miękkich dominuje siarczan dermatanu [38, 41]. Proksymalnie w stosunku do miejsca wiążącego łańcuch GAG znajduje się domena bogata w aminokwasy tyrozynę i cysteinę, tworzące pętlę podobną do tej występującej na C-końcowym odcinku dekorinu [42].

Struktura biglikanu jest bardzo zbliżona do cząsteczki dekorinu, mimo iż oba białka kodowane są na różnych chromosomach, odpowiednio chromosomie X oraz 12q23

[43, 44]. Biglikan z reguły przyłącza dwa łańcuchy GAG zbudowane z CS i/lub DS. Są one związane z resztą Arg w pozycji 6 oraz resztą Ser w pozycji 9 [42]. Masa cząsteczkowa białka wynosi około 45 kDa, a po przyłączeniu łańcuchów cukrowych wzrasta do 200 kDa [42].

Jedną z najważniejszych funkcji jaką pełnią proteoglikany z rodziny SLRP w zębinie jest przestrzenno-czasowa kontrola formowania organicznej macierzy zębiny, w tym kontrola rozmieszczenia i ułożenia włókien kolagenowych [35]. Funkcja ta wiąże się ze zdolnością rdzenia białkowego do łączenia się z kolagenem w strategicznych miejscach, przy jednoczesnym regulowaniu odległości między poszczególnymi włóknami kolagenu, z udziałem łańcuchów GAG [45, 46, 47]. Badania wykazały, że DS-zależne SLRP hamują tworzenie włókien kolagenowych, podczas gdy CS-zależne działają odwrotnie, promując fibrillogenezę [45, 47, 48, 49]. Interesujące badania dotyczące roli proteoglikanów w formowaniu zębiny zostały przeprowadzone przez Milan i współautorów [50, 51]. Badacze porównali stężenia proteoglikanów pochodzące z trzech różnych faz mineralizacyjnych zębiny tj. niezmineralizowanej przębiny, z fazy przejściowej przębina/zębina oraz ze zmineralizowanej zębiny. Dodatkowo sprawdzano wpływ biglikanu i dekorinu na czasowo-przestrzenne powstawanie siatki włókien kolagenowych [50]. Doświadczenie wykazało, iż proteoglikany obecne w przębinnie, charakteryzują się większą zawartością DS w stosunku do CS i znacząco opóźniają proces fibrillogenezę, co skutkowało pogrubieniem włókien kolagenowych [50]. Rolą kontrolną dekorinu i biglikanu na proces mineralizacji zębiny tłumaczy się również oddziaływanie obu proteoglikanów z czynnikami wzrostu, szczególnie z TGF β . Ta ścieżka sygnalizacyjna moduluje aktywność czynników wzrostu [52], a co za tym idzie zdolności TGF β do łączenia się z receptorami powierzchniowymi komórek, wpływając tym samym na progresję cyklu komórkowego oraz ekspresję *downstream genes* [42].

Rola dekorinu i biglikanu w procesach mineralizacyjnych jest związana głównie z zawartymi w ich strukturach łańcuchami GAG, posiadającymi zdolność wiązania wapnia oraz interakcji z kryształami hydroksyapatytu [33]. Uważa się, że PG, których synteza zachodzi we wczesnej fazie tworzenia macierzy przębiny, zapobiega przedwczesnej mineralizacji zębiny, podczas gdy CS-zależne SLRP regulują tempo i natężenie procesu mineralizacji [33, 53]. Dodatkowo DS oraz CS różnią się w odniesieniu do zdolności wiązania wapnia, a w konsekwencji różne SLRP odmiennie oddziałują z kryształami

hydroksyapatytu, co skutkuje naprzemiennym hamowaniem bądź aktywowaniem procesów mineralizacyjnych [33].

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

Rodzina SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) składa się z sześciu niekolagenowych białek kodowanych u człowieka na chromosomie 4q13-21 [54]. Należą do nich: – sialofosfoproteina zębiny (DSPP), sialoproteina kostna (BSP), – białko macierzy zębinowej 1 (DMP1), – osteopontyna (OPN), – białko fosfoglikozyłowe macierzy zewnątrzkomórkowej (MEPE) oraz enamelina (ENAM) [55, 56, 57, 58]. Pomimo, iż struktura pierwszorzędowa (sekwencja aminokwasów) białek SIBLING różni się, to fakt bezpośredniej kolokalizacji wszystkich genów w tym samym loci oraz analiza sekwencji genów kodujących poszczególne białka z rodziny, sugerują pochodzenie SIBLING od jednego, wspólnego genu „przodka”, który w trakcie ewolucji uległ powieleniu, a następnie podziałowi [59, 60]. Szczegółowa analiza sekwencji genów kodujących poszczególne białka SIBLING oraz analiza sekwencji aminokwasowej tych białek wykazała obecność krótkich, aczkolwiek istotnych sekwencji konserwatywnych [60]. Analiza sekwencji genów zgromadzonych w Human Genome Project wskazuje, że geny kodujące wszystkie sześć białek SIBLING składają się z 5 eksonów i 4 intronów, z czego ekson 1 jest niekodujący. Ekson 2 koduje peptyd sygnalizacyjny, zawiera kodon startowy oraz od dwóch do trzech kodonów kodujących białko właściwe. Złożony z przewagi aminokwasów hydrofobowych peptyd sygnalizacyjny odpowiada za kierowanie białka do szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. Następnie białko jest kierowane do aparatu Golgiego, gdzie ulega modyfikacjom potranslacyjnym i jest następnie wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Ekson 3 zawiera sekwencję kodującą właściwe białko, w tym krótką sekwencją SSEE odpowiedzialną za fosforylację z udziałem kinazy kazeinowej II [54]. W eksonie 4 białek SIBLING zazwyczaj zawarta jest długa sekwencja bogata w prolinę PPPP. Ekson 5 w sekwencjach kodujących *DSPP*, *DMP1*, *ENAM* oraz *MEPE* jest eksonem najdłuższym w przeciwieństwie do sekwencji kodujących *BSP* oraz *OPN*. We wszystkich jednak przypadkach ekson 5 zawiera

konserwatywną sekwencję RGD wiążącą integryny oraz drugą sekwencję odpowiedzialną za fosforylację z udziałem kinazy kazeinowej II [54]. Pomimo podobieństw w organizacji sekwencji genów, białka SIBLING znacząco różnią się właściwościami biochemicznymi. Białka DSPP, DMP1, OPN oraz BSP mają silnie kwaśny charakter i przed modyfikacjami potranslacyjnymi ich punkt izoelektryczny wynosi około 3,4 – 4,3 [54]. DSPP, DMP1 oraz OPN zawierają dużą ilość reszt Asp oraz Glu, natomiast kwaśny charakter BSP wynika z dużej zawartości jedynie reszt Glu. W przeciwieństwie do poprzednich białek, MEPE wykazuje charakter silnie zasadowy ($pI=9,2$), a ENAM neutralny [54].

Badania immunohistochemiczne oraz Western Blot wykazały różny poziom biosyntezy białek SIBLING w tkankach zmineralizowanych: kości, zębinie oraz cemencie korzeniowym [56], a także w tkankach miękkich [61]. Dodatkowo wykryto, iż każdy SIBLING posiada „własnego” partnera wśród metaloproteinaz odpowiedzialnych za rozkład białka [62, 63, 64]. Profil ekspresji genów kodujących białka SIBLINGs, oraz właściwości biochemiczne SIBLINGs potwierdzone intensywnymi badaniami zarówno *in vitro* [63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70] jak i *in vivo* [60] wykazały, że SIBLING pełnią istotne funkcje w procesie mineralizacji zewnątrzkomórkowej macierzy kości oraz zębiny, w tym w ukierunkowanym wzroście kryształów hydroksyapatytów zębiny we wszystkich trzech osiach [70]. Jednak profil ekspresji poszczególnych członków rodziny SIBLING różni się znacząco w kości i zębinie [56], dlatego dla potrzeb niniejszej rozprawy omówione zostaną jedynie białka DSPP i DMP1 posiadające największy poziom podobieństwa biochemicznego [57, 71, 72], w tym rodzaje modyfikacji potranslacyjnych [72] oraz funkcjonalnego czyli pełniące najbardziej istotną rolę w mineralizacji zębiny [73, 74, 75, 76, 77].

3.1.1.4. Sialofosfoproteina zębiny DSPP (*Dentin SialoPhosphoProtein*)

Białko niekolagenowe, które najobficiej występuje w organicznej macierz zębiny to sialofosfoproteina zębiny (DSPP) [55, 78, 79]. U ludzi białko DSPP składa się z 1301 aminokwasów, a jego punkt izoelektryczny ocenia się na $pI=3,4$ [63, 64,]. Białko DSPP jest uznane za jedyny specyficzny marker dla zębiny, gdyż ulega syntezie w zębinie na około 400 krotnie wyższym poziomie w porównaniu z innymi tkankami [56, 79].

Analiza transkryptu kodującego białko DSPP pozwala skalkulować masę cząsteczkową białka DSPP na 125 kDa [80]. W trakcie modyfikacji potranslacyjnych DSPP ulega intensywnej fosforylacji, O-glikozylacji i N-glikozylacji oraz podziałowi na dwa białka potomne sialoproteinę zębiny (DSP) oraz fosfoproteinę zębiny (DPP), co prawdopodobnie wiąże się z bezpośrednią aktywacją obydwu białek potomnych do podjęcia funkcji promineralizacyjnych [62, 81, 82, 83]. Sekwencja 370 aminokwasowego białka DSP pochodzi z N-końcowej, a sekwencja 489 aminokwasowego DPP z C-końcowej części propeptydu DSPP [83, 84]. Dodatkowo, Qin i wsp. wykazali obecność formy proteoglikanu DSP nazywając to białko DSP-PG [83, 85]. W zmineralizowanej zębiny stosunek ilościowy DPP do DSP wynosi 10:1, co świadczy o szybszej degradacji białka DSP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a tym samym sugeruje odmienną funkcję DPP oraz DSP [86]. DSP oraz DPP znacząco różnią się również właściwościami biochemicznymi [13, 86].

Hydrofilne białko DPP jest po kolagenie typu I najobficiej występującym białkiem w organicznej macierzy zębiny i stanowi około 50% wszystkich białek niekolagenowych [58]. DPP zawiera dużą ilość reszt kwasu asparaginowego (Asp) oraz seryny (Ser), z przewagą seryny ufosforylowanej (Pse) [87, 88, 89]. Reszty Asp oraz Pse są obecne głównie w powtarzających się sekwencjach (Asp-Pse-Pse)_n oraz (Asp-Pse)_n w C-końcowym odcinku DPP [90, 91]. Tak duża zawartość Asp i Pse powoduje, iż cząsteczka DPP jest najbardziej kwaśnym białkiem w organizmie człowieka jakie dotąd poznano, a jego punkt izoelektryczny wynosi około 1,1 [92]. DPP obecne w macierzy zębiny jest związane z jej fazą mineralną. Weinstock i Leblond lokalizując DPP u szczurów przy użyciu [³²P] fosforanu i [³H] seryny wykazali, że w odróżnieniu od kolagenu, DPP było wydzielane z odontoblasta bezpośrednio na froncie mineralizacji, co miało sugerować, że DPP wydzielane jest bezpośrednio do miejsca podjęcia funkcji promineralizacyjnych [93]. Do podobnych wniosków doszli Huang i wsp., którzy w swoich badaniach wykazali, iż białka DSP oraz DPP są zlokalizowane w różnych fazach kompleksu przębina/zębina [57]. Białko DSP znajdują się głównie w przębiniu, natomiast białko DPP w zmineralizowanej zębiny [73, 94]. Wysoki poziom Asp oraz Pse powoduje, iż DPP jest białkiem polianionowym [95, 96] i posiada wysokie powinowactwo do jonów wapnia. To w konsekwencji sprawia, iż DPP reguluje zarówno szybkość nukleacji kryształów hydroksyapatytów (HA) [97, 98, 99, 100], jak i steruje późniejszym

dojrzwaniem zębiny [101, 102]. Procesowi nukleacji sprzyja ponadto struktura przestrzenna DPP. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej białko DPP kształtem przypomina wstęgę, gdzie właściwy peptyd tworzy rdzeń, na zewnątrz którego skierowane są równoległe dwa rzędy reszt fosforanowych [90]. Pomimo licznych danych wskazujących na silnie promineralizujący charakter białka DPP, intensywne badania *in vitro* wykazały, iż DPP stymuluje mineralizację jedynie w niskich stężeniach, natomiast wysokie stężenie białka wpływa hamująco na proces mineralizacji zębiny [12]. Zależność aktywności białka DPP od stężenia ma prawdopodobnie „kontrolować” natężenie procesu mineralizacji zębiny i zapobiegać nadmiernemu stwardnieniu tkanki [12]. Podobną rolę regulacyjną odgrywają interakcje DPP z włóknami kolagenu. Badania *in vitro*, prowadzone przez Milan i wsp. wykazały, że DPP stymuluje proces mineralizacji jedynie będąc bezpośrednio związane z włóknami kolagenu, podczas gdy brak interakcji z kolagenem sprawia, że DPP hamuje proces mineralizacji zębiny w stopniu proporcjonalnym do stężenia DPP *in situ* [103]. Badania przeprowadzone przy użyciu mikroskopu sił atomowych udowodniły, iż DPP wiążąc się z powierzchnią kryształów szkliwa, tworzy charakterystyczną matrycę łączącą [104], podczas gdy jednocześnie DPP łączy się z włóknami kolagenu typu I wybiórczo w paśmie „e” włókna [101, 105]. Pasma „e” zlokalizowane jest w pobliżu *gap zone* i stanowi specyficzne miejsce wiązania proteoglikanów [106], jak również miejsce odkładania składników minerału [106, 107]. Wiązanie białka DPP z powierzchnią kolagenu następuje z wykorzystaniem hydrofobowych domen w sekwencji DPP pełniących kluczową rolę w wiązaniu hydrofobowych domen wewnętrznej struktury kolagenu [107, 108], a powstała w ten sposób struktura przestrzenna poprawia zdolność przyłączania jonów wapnia przez grupy fosforowe [95, 101].

Drugim produktem rozpadu natywnego białka DSPP jest sialoproteina zębiny (DSP). Białko to stanowi około 5 – 8% niekolagenowych białek zębiny [109]. Istotne różnice składu aminokwasowego pomiędzy N-końcowym i C-końcowym DSPP sugerują, że DPP oraz DSP pomimo wspólnego pochodzenia mogą spełniać różne funkcje w procesie biomineralizacji [12].

DSP posiada ogólne cechy podobne do innych sialoprotein syntetyzowanych w kościach: OPN, BSP czy DMP-1, jednakże poziom ich podobieństwa jest niski [57]. DSP jest białkiem posiadającym niewiele reszt fosforanowych [13]. Zawiera 29,6% reszt węglowodanowych, 9% kwasu sialowego, a także glutaminę, asparaginę, serynę oraz

glicynę [109, 110]. Masa cząsteczkowa DSP określona na podstawie ultrawiorowania, wynosi 52,570 Da [111], jednak szczegółowa analiza wykazała, że białko DSP wykazuje wysoką różnorodność pod względem masy cząsteczkowej, co skutkuje występowaniem DSP w postaci ciężkiej (HMW-DSP), średniej (MMW-DSP) oraz lekkiej (LMW-DSP) [83]. Badania immunohistochemiczne wskazały, iż DSP występuje w odontoblastach, przezębinie i zębinie [58, 112, 113, 114] oraz tymczasowo w preameloblastach [94, 115]. Jednocześnie potwierdzono, iż DSP występuje bardziej obficie w przezębinie niż w zębinie zmineralizowanej [58, 113, 114], w której sąsiaduje jedynie z wypustką odontoblastyczną Tomesa, zlokalizowaną w kanalikach zębinowych [58, 116]. Taka lokalizacja białka sugeruje, że DSP bierze czynny udział w procesie mineralizacji [58, 112, 116]. Jednak badania *in vivo*, przeprowadzone przez Suzuki i wsp., wykazały, że DSP uczestniczy jedynie we wczesnych etapach dentinogenezy, będąc czynnikiem inicjującym proces mineralizacji zębiny, natomiast nie uczestniczy w jej dojrzewaniu [12]. Dodatkowo, fakt przejściowej obecności DSP w preameloblastach świadczy o możliwej roli modulacyjnej DSP w procesie amelogenezy oraz udziale DSP w wytwarzaniu połączenia szkliwno-zębinowego i tworzeniu przyległego szkliwa apryzmatycznego [58, 112, 116]. Obecność DSP w znacząco niższych stężeniach odnotowano także w cemencie korzeniowym, kości wyrostka zębodołowego, kościach długich [72] oraz tkankach miękkich [117].

Przez wzgląd na szybką modyfikację białka natywnego DSPP, następującą tuż po translacji, białka potomne DSP i DPP zostały odkryte wcześniej aniżeli białko macierzyste DSPP [11]. Do czasu odkrycia wspólnego transkryptu *DSPP*, przypuszczano, że sekwencja łącząca DSP z DPP jest sekwencją zdegradowaną. Jednak analiza przeprowadzona na świniach przez Yamakoshi i wsp. udowodniła, iż region ten stanowi stabilne białko macierzy zębinowej nazwane później glikoproteiną zębiny (DSP-PG) [81, 112]. Cechą charakterystyczną DSP-PG jest jego unikalna sekwencja aminokwasowa, niepokrywająca się z żadną poznaną dotychczas sekwencją aminokwasową [81, 112,]. Sekwencja DSP-PG u świni wykazuje komplementarność z sekwencją pochodzącą od człowieka w 81% [81, 112]. Badania, przeprowadzone przez Zhu i wsp. wykazały, że fragment DSP-PG prawdopodobnie wpływa na regulację inicjacji mineralizacji, ale nie bierze bezpośredniego udziału w samym procesie dojrzewania zębiny [85].

3.1.1.5. *Białko macierzy zębinowej 1 DMP 1, (Dentin Matrix Protein 1)*

DMP1 jest syntetyzowane przez dojrzałe, aktywne sekrecyjnie odontoblasty i ze względu na zawartość 72 reszt Asp oraz 62 reszt Glu ma hydrofilny, silnie kwaśny charakter. Po raz pierwszy DMP1 zostało odkryte w wyniku klonowania biblioteki cDNA u myszy [118]. Mysie DMP1 zbudowane jest z 473 aminokwasów i zawiera 107 reszt seryny, z czego ponad połowa ulega fosforylacji w trakcie modyfikacji potranslacyjnych [71]. Taka budowa biochemiczna DMP1 wskazuje na istotną rolę tego białka w procesie nukleacji kryształów HA oraz następczej mineralizacji zębiny [119]. Potwierdzają to badania *in vitro* na komórkach MC3T3 wykazujących wysoką ekspresję DMP1, w których stwierdzono znaczące przyspieszenie tworzenia jąder nukleacji kryształu HA w porównaniu z komórkami kontrolnymi [120]. Dodatkowo rolę promineralizacyjną DMP1 potwierdza fakt obecności w sekwencji DMP1 pojedynczej sekwencji (Asn-X-Ser) dla N-glikozylacji oraz kilku potrójnych sekwencji Ser-X-Glu stanowiących potencjalne miejsca O-glikozylacji [118]. Natomiast w okolicy C-końcowego białka DMP1 znajduje się sekwencja RGD odpowiedzialna za połączenie białko-komórka [118]. Uważa się, że modyfikacją, która inicjuje aktywność białka DMP1 jest potranslacyjny podział natywnego białka DMP1 na fragmenty 37 kDa oraz 57 kDa; odpowiednio N-końcowe i C-końcowe, o krańcowo różnych właściwościach biochemicznych [71]. Jak dotąd, nie poznano enzymu odpowiedzialnego za podział natywnego białka DMP1 i wciąż trwają spekulacje czy proces ten zachodzi wewnątrzkomórkowo, czy zewnątrzkomórkowo. Ponadto, w przębnie wykazano obecność fragmentu N-końcowego w formie proteoglikanu nazwanego odpowiednio DMP1-PG [121, 122, 123]. Badania *in vitro* wykazały różny stopień zaangażowania poszczególnych pochodnych białka DMP1 tj. 37 kDa – dla DMP1, 57 kDa – dla DMP1 oraz DMP-PG w proces mineralizacji zębiny [71]. Potwierdzono, że jedynie fragment 57 kDa zawiera przeważającą ilość reszt Asp, Glu oraz Ser co sprawia, że fragment 57 kDa bierze czynny udział w nukleacji kryształów HA oraz następczej mineralizacji zębiny [71]. Potwierdzają to badania immunohistochemiczne wykazujące lokalizację fragmentu 57 kDa jedynie w części zmineralizowanej zębiny [71] oraz szeroko prowadzone badania *in vitro* nad powstawaniem kryształu apatytu w obecności fragmentu 57 kDa [98]. Na chwilę obecną funkcja fragmentu 37 kDa oraz DMP1-PG nie została do końca poznana. Jednak, fakt obecności obu fragmentów jedynie w przębnie nasuwa

przypuszczenie, że DMP-PG może spowalniać proces mineralizacji, przez co tworzy swoisty balans dla fragmentu 57 kDa zapobiegając zbyt szybkiej, niekontrolowanej mineralizacji zębiny [71]. Dodatkowo uważa się, że jedynie DMP-PG pełni funkcje mineralizacyjne w zębinie, natomiast fragment 37 kDa jest produktem degradacji białka DMP1 [71, 121]. Białko DMP-1 występuje w odontoblastach, kanalikach zębinowych oraz przejściowo w ameloblastach [73]. Badania wykazały, iż największy poziom DMP1 występuje w spolaryzowanych odontoblastach podczas pierwszych etapów syntezy zmineralizowanej macierzy zębiny [66, 73, 123]. W późniejszych fazach, po osiągnięciu przez odontoblast pełnego zróżnicowania komórkowego, poziom biosyntezy DMP1 znacząco maleje, co stanowi kolejne potwierdzenie, że DMP1 bierze głównie udział w nukleacji kryształów hydroksyapatytu oraz reguluje ich wzrost [71].

Fakt istotności białka DMP1 dla mineralizacji kości i zębiny został ostatecznie potwierdzony przez badania prowadzone na myszach transgenicznym [69]. Omawiane badania wykazały, powstawanie od 3 dnia życia osobniczego zaburzeń w mineralizacji kości i zębiny u myszy *knock-out* nie wykazujących ekspresji fragmentu 57 kDa DMP1. Wraz z postępem czasu, zwierzęta *knock-out* prezentowały fenotyp specyficzny dla krzywicy [69]. W rozwoju zębów dochodziło do hipomineralizacji zębiny towarzyszącej zmniejszonemu jej odkładaniu na korzyść warstwy przębiny wraz z następczym poszerzeniem komór zębów i kanałów korzeniowych [69]. Niezwykle ciekawym wydaje się również fakt stwierdzenia czasowej obecności fragmentu 57 kDa białka DMP-1 w jądrze komórkowym komórek MC3T3 [71, 122]. Autorzy powyższych doniesień sugerują, iż fragment 57 kDa białka DMP1 może dodatkowo pełnić funkcję czynnika transkrypcyjnego i po uprzedniej fosforylacji [122] regulować ekspresję genu *DSPP* [71, 122].

3.2. Gen kodujący białko DSPP

Gen kodujący białko DSPP jako pojedynczy transkrypt odkryto po raz pierwszy u myszy w 1997 roku [11], a u człowieka trzy lata później [80]. Wcześniej uważano bowiem, że sekwencje kodujące białka dsp oraz dpp są niezależne i stanowią dwa oddzielnie kodowane transkrypty [80, 91]. U człowieka gen *DSPP* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 4q22.1 i zbudowany jest z 8331 par zasad, kończąc się nietypową sekwencją polyA: ATTAAA, w odróżnieniu od typowej sekwencji ATAAAA znajdującej się 177 par zasad bliżej końca 5' [80]. *DSPP* składa się z 5 eksonów i 4 intronów. Analiza metodą Northern Blot, mRNA pozyskanego z korzenia ludzkiego zęba, wykazała obecność transkryptu wielkości około 4,6 kb oraz brak transkryptów wielkości 1,5 kb i 2,5 kb wykrytych uprzednio w sekwencji kodującej *dspp* u myszy [84] i szczura [91]. Obecność oddzielnych transkryptów mogłaby świadczyć o alternatywnym składaniu transkryptów również u człowieka, jednak jak dotąd ani badania zwierząt *knock-out dspp* [124, 125], ani analiza ludzkiego i mysiego genomu nie wskazują na obecność alternatywnych transkryptów kodujących sekwencję białka DSPP. Jedyny znany transkrypt kodujący DSPP (NM-014208) u człowieka zawiera 4331 par zasad. Organizacja genu *DSPP* jest zbliżona u człowieka, myszy i szczura [11, 80, 84] i jest podobna do pozostałych genów kodujących białka SIBLING. Pierwszy ekson liczący 92 pary zasad jest eksonem niekodującym. Ekson 2 łączący nukleotydy 93 – 171, poza sekwencją kodującą peptyd sygnalizacyjny (nt. 121 – 165), koduje również trzy pierwsze aminokwasy białka DSP [54]. Pozostała sekwencja kodująca białko DSPP znajduje się w eksonie 3 (nt. 166 – 255), eksonie 4 (nt. 256 – 1242) oraz w eksonie 5 (nt. 1243 – 4331). Całkowita sekwencja kodująca białko potomne DSP zawarta jest w nukleotydach 166 – 1506. Sekwencja nukleotydów od 1507 – 4023 koduje białko DPP [54], a w jej obszarze 3' znajduje się 9-nukleotydowa sekwencja obecna w około 200 powtórzeniach. Pozostałe nukleotydy tworzą 3' UTR.

Szczegółowa analiza mysiego genu *dspp* dokonana przez Fenga i wsp. [126] wykazała obecność kilku sekwencji wzmacniających i wyciszających w sekwencji –1447 par zasad powyżej ramki odczytu końca 5' *dspp*. Sekwencje wzmacniające zlokalizowano pomiędzy –1447, a –791 parą zasad, natomiast najsilniejsza sekwencja promotorowa znajduje się w rejonie –95 pz [126]. Dodatkowo w rejonie – 97 i –74 odnotowano obecność sekwencji regulatorowej CCAAT przyłączającej czynniki transkrypcyjne aktywujące ekspresję *dspp*

[127]. Obok standardowych składowych kompleksu transkrypcyjnego, aktywność promotora genu *dspp* jest regulowana przez szereg czynników transkrypcyjnych, stanowiących składowe ścieżek sygnalizacyjnych, aktywnych w procesach biomineralizacji. Jednym z najbardziej istotnych jest czynnik transkrypcyjny Runx2 odpowiedzialny za aktywację transkrypcji genów, kodujących białka bezpośrednio zaangażowane w dojrzewanie osteoblastów [127, 128]. Stwierdzono, że Runx2 wzmacnia ekspresję *dspp* we wczesnym okresie dojrzewania odontoblasta, natomiast hamuje ekspresję *dspp* w odontoblastie dojrzałym [127]. Najnowszym odkryciem regulacji ekspresji genu *dspp* jest ustalenie, że promotor *dspp* podlega silnej aktywacji pod wpływem czynnika transkrypcyjnego *tpr1*, którego mutacje są odpowiedzialne za powstanie zespołu włosowo-nosowo-palcowego [129]. Kolejnym, niezwykle ciekawym jest fakt regulacji transkrypcji *dspp* przez inne białko należące do rodziny SIBLING – fragment 57 kDa *dmp1* [69]. Stwierdzono, że fragment 57 kDa *dmp1* posiada jądrową sekwencję sygnałową oraz sekwencję specyficzną dla wiązania z promotorem *dspp*. We wczesnej fazie rozwoju odontoblasta fragment 57 kDa *dmp1* łączy się z promotorem *dspp* na odcinku -450 i +80, aktywując tym samym ekspresję *dspp* [69].

Szczegółowa analiza regulacji transkrypcji genu *DSPP* jest niezwykle ważna z powodu bezpośredniego powiązania wrodzonych zaburzeń rozwoju zębiny o fenotypie *dentinogenesis imperfecta* typu II/III (GDI/DD) (OMIM 125490) oraz dysplazji zębiny z mutacjami zlokalizowanymi wyłącznie w genie *DSPP*. Analiza molekularna genomu probantów z cechami *dentinogenesis imperfecta* typu II/III ostatecznie wykluczyła próby wiązania fenotypu GDI/DD z mutacjami w sekwencji innych genów kodujących białka SIBLING, w tym, w genie *DMP1* [130]. DGI typu II/III oraz dysplazja zębiny (OMIM 125490) jest izolowaną, wrodzoną wadą rozwojową polegającą na nieprawidłowym rozwoju zębiny zarówno w zębach mlecznych, jak i stałych, która ujawnia się z częstotliwością 1:8000 żywych urodzeń [131]. W typie II DGI dochodzi do zaburzenia procesu mineralizacji zębiny, co objawia się opalizująco-żółtym, błękitnym, a niekiedy, nawet bursztynowym jej zabarwieniem. W konsekwencji zaburzeń w budowie zębiny, a tym samym zmniejszeniu jej właściwości amortyzacyjnych, dochodzi do odpryskiwania pryzmatów szkliwa, co z kolei skutkuje szybkim ścieraniem zębów. Charakterystyczną cechą DGI typu II jest również obliteracja komory zęba i kanałów korzeniowych oraz skrócenie i zwężenie korzeni zębów [132]. Dwie główne cechy (odsłanianie się komór

miazgi zęba oraz zęby typu muszelkowego) uznawane do niedawna jako odróżniające DGI typu II od DGI typu III, obecnie uznaje się za objawy DGI II/III występujące sekwencyjnie, gdyż komory miazgi zębów w niektórych przypadkach DGI typu II, mogą być początkowo nadmiernie szerokie i ulec obliteracji w późniejszym czasie [133, 134, 135]. Podobny obraz kliniczny dotyczący głównie uzębienia mlecznego obserwuje się w dysplazji zębiny [136, 137]. Szczątkowe korzenie zębów mlecznych w obrazie rtg są wyraźnie skrócone i wykazują nieprawidłową morfologię, z towarzyszącą zwiększoną przejrzystością. Komora miazgi zęba jest częściowo lub całkowicie zamknięta, a kanały korzeniowe zwykle zobliterowane [132]. W dysplazji zębiny kolor i morfologia uzębienia stałego jest zazwyczaj prawidłowa, a w nielicznych przypadkach zęby mogą być matowe, niebieskawe lub brązowawe. Dysplazji zębiny towarzyszy również zwiększone prawdopodobieństwo występowania zębiniaków w uzębieniu stałym [136].

3.2.1. Zmiany w sekwencji genu *DSPP*

Do dnia dzisiejszego opisano około 40 mutacji w genie *DSPP* [60, 138]. Niektóre z nich stanowią grupę tzw. mutacji utajonych, bez widocznych objawów klinicznych. Mutacje w genie *DSPP* zlokalizowane są w sekwencjach kodujących peptyd sygnalizacyjny, białko DSP oraz białko DPP. Mutacje w sekwencjach kodujących peptyd sygnalizacyjny oraz białko DSP zazwyczaj mają charakter transwersji i/lub tranzycji, podczas gdy mutacje w genie kodującym białko DPP to najczęściej delecje i/lub insercje z przesunięciem ramki odczytu [138, 139]. Jednocześnie badania epidemiologiczne wykazują obecność w sekwencji genu *DSPP* licznych mutacji utajonych, co świadczy o wysokim stopniu polimorfizmu tego genu [60, 138, 139].

Generalnie, za polimorfizm genu uważa się występowanie różnic w jego sekwencji objawiających się w badanej populacji z częstotliwością większą niż 1%. Istotną różnicą między polimorfizmem, a mutacją jest fakt zamiany nukleotydu w kodonie, która ze względu na degenerację kodu genetycznego nie skutkuje zamianą kodowanego aminokwasu, a tym samym nie powstaje fenotyp przynależny jednostce chorobowej przypisanej danej mutacji. Gen *DSPP*, kodujący białko DSPP jest oceniany jako wysoce polimorficzny [132, 139]. W literaturze opisuje się liczne delecje (nawet do 225

nukleotydów) [139], bez przesunięcia ramki odczytu, w rejonie repetytywnej sekwencji Ser-Ser-Asp na końcu 3' białka DPP, którym towarzyszy całkowity brak jakichkolwiek cech klinicznych *dentinogenesis imperfecta* typu II/III [60, 138]. Odmiennym typem polimorfizmu jest polimorfizm SNP (ang. *Single Nucleotide Polimorphism*). SNP pojawiają się zarówno w sekwencjach kodujących, jak i niekodujących genów lub w regionach międzygenowych. Zależnie od lokalizacji występowania SNP dzieli się go na synonimiczny lub niesynonimiczny [60]. Polimorfizm synonimiczny to polimorfizm kiedy różne allele kodują ten sam aminokwas, natomiast polimorfizm niesynonimiczny, to taki, w którym różne allele kodują różne aminokwasy [60].

Zmiany w sekwencji ludzkiego DNA mogą skutkować powstawaniem wad rozwojowych, jak również zaburzeń metabolicznych prowadzących do nieprawidłowości w budowie, bądź funkcjonowaniu danego organu lub zmiany w odpowiedzi organizmu na patogeny, substancje chemiczne, leki [137]. Jednocześnie szczegółowe badania kodu genetycznego wykazują, iż pewne zmiany w sekwencjach aminokwasowych białek prowadzą do powstania poważnych, niejednokrotnie letalnych wad rozwojowych [138], podczas gdy inne pozostają swoiście „obojętne” w trakcie życia osobniczego [137]. Dlatego niezwykle istotne wydaje się stworzenie tzw. markerów genetycznych na podstawie porównania sekwencji DNA osób chorych *versus* populacji bez widocznego fenotypu. Dotychczas liczne przypadki polimorfizmu typu SNP genu *DSPP* zostały opisane w literaturze [130, 132, 139]. Dotyczyły one exonów 3, 4 oraz najliczniej exonu 5. Jednak zgromadzone informacje dotyczą głównie populacji Mongoidalnej oraz heterogennej populacji Amerykańskiej [60, 76, 130], natomiast brakuje spójnych informacji dotyczących polimorfizmu genu *DSPP* w homogennej populacji rasy Kaukaskiej. Jak dotąd nie prowadzono również żadnych badań mających na celu analizę sekwencji genu *DSPP* w homogennej populacji polskiej.

4. CEL PODJĘTYCH BADAŃ

Celem pracy jest zbadanie polimorfizmu genu *DSPP* kodującego białko sialofosforowe zębiny w populacji osób nie prezentujących fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II i/lub III oraz dysplazji zębiny, a w szczególności:

1. Zbadanie polimorfizmu genu *DSPP* w zakresie sekwencji kodującej białko DSP oraz DPP
2. Określenie polimorfizmu jakościowego typu SNP oraz ilościowego w postaci insercji i delecji w sekwencjach kodujących białka DSP oraz DPP,
3. Zweryfikowanie czy w badanej populacji istnieją mutacje w genie *DSPP* nieskutkujące powstaniem fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II/III lub dysplazji zębiny,
4. Określenie częstotliwości występowania mutacji w genie *DSPP* uznanych za rzadką, „niepatogenną” odmianę genetyczną specyficzną dla danej populacji określaną jako tzw. polimorfizm lokalny

5. MATERIAŁY I METODY

5.1 Próbkki biologiczne

Badaniem objętych zostało 30 niespokrewnionych probantów obojga płci w wieku od 20 do 57 lat. Pobranie materiału poprzedzało badanie kliniczne każdego probanta, mające na celu wykluczenie obecności cech klinicznych *dentinogenesis imperfecta* typu II i/lub III oraz dysplazji zębiny. Materiał doświadczalny stanowiło DNA wyizolowane z komórek nabłonka jamy ustnej w postaci wymazów pobieranych na jałowe wymazówki. Badanie to jest całkowicie nieinwazyjne i każdorazowo zostało poprzedzone uzyskaniem pisemnej zgody probanta.

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego nr NKBBN/464/2012

5.1.1 Izolacja DNA

DNA z wymazów zostało poddane izolacji standardową metodą organiczną według Sambrook i wsp., [140]. Materiał biologiczny umieszczano w 2 mL zakręcanej próbówce do której dodawano: 313 μL buforu ekstrakcyjnego TE (200 mL wody dejonizowanej, 0,24 g Tris, 40 μL 0,5 M EDTA), o pH 8,0 (pH ustalano z użyciem 1 N HCl), 12 μL 20% SDS i 5 μL *proteiny K* (10 mg/ μL). Izolaty porcjowano po 100 μL i zamrażano w temp. -20°C . Kolejno próbki inkubowano w łaźni wodnej o temperaturze 56°C przez 12 godzin, a następnie silnie wstrząsano przez 10 sekund i wirowano przez 12 minut przy 13000 rpm w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu, 300 μL supernatantu przenoszono do nowych probówek i dodawano równą objętość mieszaniny fenol/chloroform. Próbki ponownie wstrząsano przez 10 sekund i wirowano przez 12 minut przy 13000 rpm w temperaturze pokojowej.

DNA precypitowano przez dodanie do fazy wodnej 1/10 objętości 3M octanu sodu (pH 5,2) i 3 objętości lodowatego alkoholu absolutnego. DNA wytrącano przez noc w temperaturze -20°C . Następnie próbki wirowano przy 13000 rpm przez 12 minut.

Sprecypitowany DNA suszono przez około 2 godziny w temperaturze pokojowej. Ostatecznie DNA zawieszano w 20 μL Tris o pH 8,5.

5.1.2 Pomiar stężenia DNA

Pomiar stężenia DNA dokonywano przy użyciu metody fluorymetrycznej z wykorzystaniem aparatu Fluoroskan Ascent FL (Labsystems) oraz barwnika PicoGreen wiążącego się do dwuniciowej formy DNA. Po związaniu z fragmentem DNA barwnik wzbudzano światłem o długości fali 485 nm i mierzono emisję światła o długości fali 538 nm. Natężenie wyemitowanego światła, która jest proporcjonalna do ilości barwnika związanego z DNA szacowano stężenie DNA w roztworze względem krzywej standardowej, utworzonej na podstawie pomiarów: próby ślepej stanowiącej 50 μL buforu TE pH 7,5 oraz trzech punktów pomiarowych o stężeniu standardu DNA odpowiednio: 2ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL. Próbki badane przygotowano do pomiaru poprzez dodanie do dwóch kolejnych studzienek po 1 μL mierzonego DNA oraz 49 μL buforu TE pH 7,5, a następnie 50 μL barwnika PicoGreen. Do pomiaru ilości DNA metodą fluorymetryczną użyto zestaw firmy Molecular Probes (USA). Wynik ostateczny wyliczano jako średnią wartość z dwóch pomiarów.

5.1.3 Amplifikacja fragmentów genu *DSPP*

Amplifikację badanych fragmentów genu *DSPP* prowadzono metodą PCR w objętości 10 μL , w termocyklerze firmy Perkin Elemer 9700. Poszczególne fragmenty/eksony genu *DSPP* były amplifikowane z użyciem par starterów wg McKnight i wsp. oraz Bai i wsp. [60, 141] (tabela 1, 2). Ze względu na długość sekwencji eksonów 4 i 5 zostały one podzielone odpowiednio na 2 (ekson 4) i 4 fragmenty (ekson 5) i oznaczone zgodnie ze źródłowym piśmiennictwem [60, 141].

Tabela 1. Sekwencje starterów dla eksonów 2, 3 oraz fragmentów 4.1, 4.2, 5.1, 5.2 eksonów 4 i 5 genu *DSPP* wg McKnight i wsp. [60]

DSPP / ekson	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 – 662)	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 fragmentów: 5.5 i 5.6 eksonu 5 genu *DSPP* wg. Bai i wsp. [141].

DSPP/ ekson	Sekwencja (5' → 3')
5.5 (2170 - 3809)	F: GCAGTGACAGCAACGAAAGCAGCAAT R: GTTGTTACCGTTACCAGACTTGCTC
5.6 (3810 - 4071)	F: TGACAGCACATCTGACAGCAAT R: TCCCCAGTTGTTTTTGTTT

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

Objętość mieszaniny dopełniano sterylną wodą HPLC (Promega, USA) do końcowej objętości 10 μ L.

Mieszaninę poddawano amplifikacji w warunkach opisanych w tabeli 3 (tabela 3).

Tabela 3. Warunki amplifikacji fragmentów eksonów 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/1 min 30 s	72°C/10 min
3	95°C / 15 min	94°C/30 s; 58°C/1 min 30 s; 72°C/1 min 30 s	72°C/10 min
4.1	95°C / 15 min	94°C/30 s; 58°C/1 min 30 s; 72°C/1 min 30 s	72°C/10 min
4.2	95°C / 15 min	94°C/30 s; 58°C/1 min 30 s; 72°C/1 min 30 s	72°C/10 min
5.1	95°C / 15 min	94°C/30 s; 58°C/1 min 30 s; 72°C/1 min 30 s	72°C/10 min
5.2	95°C / 15 min	94°C/30 s; 58°C/1 min 30 s; 72°C/1 min 30 s	72°C/10 min
5.5	95°C / 15 min	94°C/30 s; 58°C/1 min 30 s; 72°C/1 min 30 s	72°C/10 min
5.6	95°C / 15 min	94°C/30 s; 58°C/1 min 30 s; 72°C/1 min 30 s	72°C/10 min

Otrzymane produkty amplifikacji oczyszczano z wykorzystaniem zestawu Exo Sap firmy Affymetrix (USA) zgodnie z zaleceniem producenta.

5.1.4 Sekwencjonowanie produktów amplifikacji fragmentów eksonów 2, 3, 4.1, 4.2, 5.1, 5.2, 5.5, 5.6 genu *DSPP*

Reakcję sekwencjonowania fragmentów eksonów: 2, 3, 4.1, 4.2, 5.1, 5.2, 5.5, 5.6 genu *DSPP* przeprowadzano z zastosowaniem zestawu ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v. 1.1 (Applied Biosystems, USA), w skład którego wchodzi: – terminator A znakowany dwuchloro [*R6G*], – terminator C znakowany dwuchloro [*ROXI*], – terminator G znakowany dwuchloro [*R 110*], – terminator T znakowany dwuchloro [*TAMRA*], – dezoksytrójfosforany (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) – Stoffel – Amlitaq DNA polimerazę, – MgCl₂, – Tris-HCl pH 9,0. Amplifikację prowadzono zgodnie z zaleceniem producenta, z użyciem: 8 µl mieszaniny znakowanych terminatorów, po 2 µL (3,2 pmol nieznakowanego startera odpowiednio każdego z badanego fragmentu) każdego oraz 4 µL matrycowego DNA. Objętość mieszaniny dopełniano 6 µl wody HPLC firmy Promega (USA), do objętości końcowej 20 µL. Reakcję sekwencjonowania prowadzono w 0,2 µL probówkach typu MicroAmp (*Applied Biosystems*) z wykorzystaniem aparatu do PCR z serii 9700 (*Perkin Elmer*).

Tabela 4. Warunki sekwencjonowania fragmentów genu *DSPP*

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

W analogiczny sposób przeprowadzano reakcję sekwencjonowania dla drugiej nici DNA stosując starter 2 odpowiednio badanego fragmentu.

5.1.5 Precypitacja produktów reakcji sekwencjonowania

Produkty reakcji sekwencjonowania (20 μ l) przenoszono do probówki typu Eppendorf, do którego dodawano 2 μ L octanu sodu (Sigma, USA) i 50 μ L 95% etanolu (POCH, Polska). Po 30 minutach precypitacji w temperaturze pokojowej próbki wirowano w wirówce Centrifuge 5804 R, Eppendorf przy 14 000 rpm przez 20 minut. Za pomocą pipety automatycznej usuwano supernatant, a produkty płukano w 500 μ L 70% etanolu (POCH, Polska). Po wstrząśnięciu i zwirowaniu przy szybkości obrotów 14000 rpm przez 5 minut etanol usuwano, a produkt suszono w 90°C przez 1 minutę przy użyciu bloku grzejnego (Multi-blok Heater firmy Lab-Line).

5.1.6 Rozdział produktów reakcji sekwencjonowania elektroforezą kapilarną (CE) z zastosowaniem automatycznego analizatora DNA typu ABI PRISM 310

Do wysuszonego produktu reakcji sekwencjonowania dodawano 20 μ L dejonizowanego formamidu (Applied Biosystems, USA), a następnie próbki denaturowano w temperaturze 95°C przez 5 minut i bezpośrednio umieszczano w łaźni wodno-lodowej na 3 minuty. Zdenaturowane produkty poddawane były elektrokinetycznemu pobraniu przez 30 sekund przy 2 kV. Rozdział produktów sekwencjonowania prowadzono w niepokrytej kapilarze (*Applied Biosystems*) o wymiarach 47 cm \times 50 mm, wypełnionej denaturującym polimerem POP6 (*Applied Biosystems*). Droga rozdziału wynosiła 36 cm. Elektroforezę prowadzono przy 12 kV, 9 mA, 10 mW przy stałej temperaturze 50°C. Czas rozdziału i detekcji jednego produktu reakcji sekwencjonowania trwał 36 minut.

Do elektroforezy stosowano bufor elektrodowy EDTA (*Applied Biosystems*). Wykrywanie produktów sekwencjonowania przeprowadzono przy zastosowaniu filtra E i programu komputerowego 310 *Genetic Analyser Data Collection v 1.0.4*. Analizę uzyskanych wyników dokonywano stosując program komputerowy *Sequencing Analysis v. 3.0 i 5.2* oraz *Sequence Navigator v. 2.0 i v 2.5*.

Procedurę sekwencjonowania powtarzano 3-krotnie dla każdej próby.

Tabela 5. Oprogramowanie stosowane do analizy produktów sekwencjonowania genu *DSPP*.

STOSOWANE OPROGRAMOWANIE	OPIS OPROGRAMOWANIA
Sequencing Analysing Software v. 3.0	Program do analizy uzyskanych sekwencji nukleotydowych stanowiący integralne oprogramowanie analizatora DNA ABI PRISM 310 firmy Applied Biosystems.
Sequencing Analysing Software v. 5.2	Program do analizy uzyskanych sekwencji nukleotydowych stanowiący integralne oprogramowanie analizatora DNA Genetic Analyzer 3130 firmy Applied Biosystems
Sequence Navigator v.2.5 i v.2.0	Program do porównywania oraz analizy sekwencji DNA firmy Applied Biosystems.

6. WYNIKI

Analiza sekwencji genu *DSPP* u 30 probantów z rejonu Polski, bez cech klinicznych DGI II i/lub III oraz DD wykazała występowanie zmian polimorficznych, jak również mutacji. Te ostatnie skutkowały powstaniem heterozygot w odniesieniu do badanego nukleotydu. Zaobserwowano polimorfizm o charakterze SNP oraz insercje i delecje. Zarówno polimorfizm jak i mutacje dotyczyły sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP (g.166 – 1506) jak również DPP (g. 1507 – 4023).

6.1 Polimorfizm w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP

W sekwencji kodującej białko DSP, zmiany typu SNP w pozycji g.930 zaobserwowano u 19 osób. Zamiana miała charakter tranzycji TCA→TCG i dotyczyła ostatniego nukleotydu w kodonie kodującym aminokwas serynę. U 11 osób obserwowano zamianę jednego allela (11 alleli), natomiast u 8 probantów zamiana g.930 A → G nastąpiła w obu allelach (16 alleli).

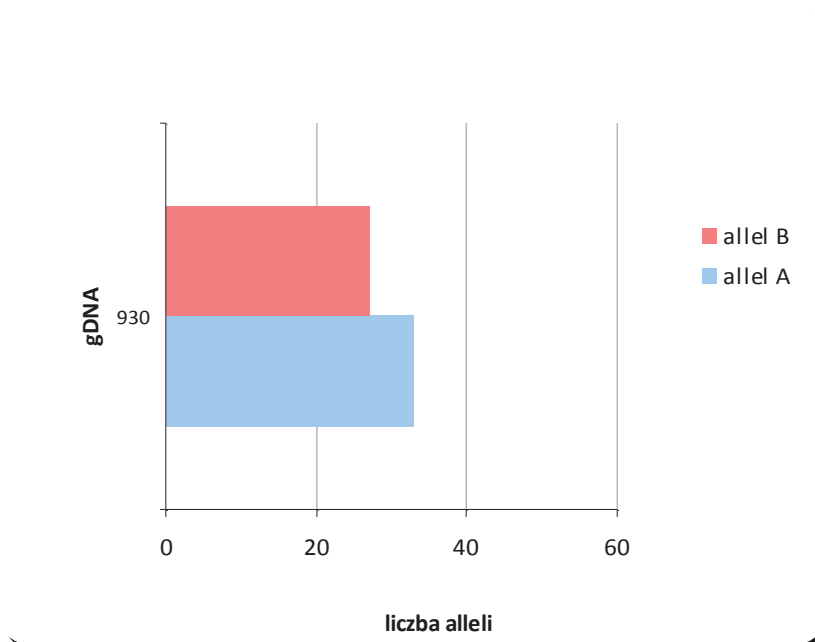
U pozostałych 11 probantów odnotowano sekwencję referencyjną a w obu allelach (22 allele) (tabela 6, 7; rycina 1). Łącznie w badanej grupie odnotowano sekwencję referencyjną w 55% alleli natomiast zamiana A → G nastąpiła w 45% alleli (tabela 2, rycina 2).

Tabela 6. Zamiana typu SNP w sekwencji kodującej białko DSP.

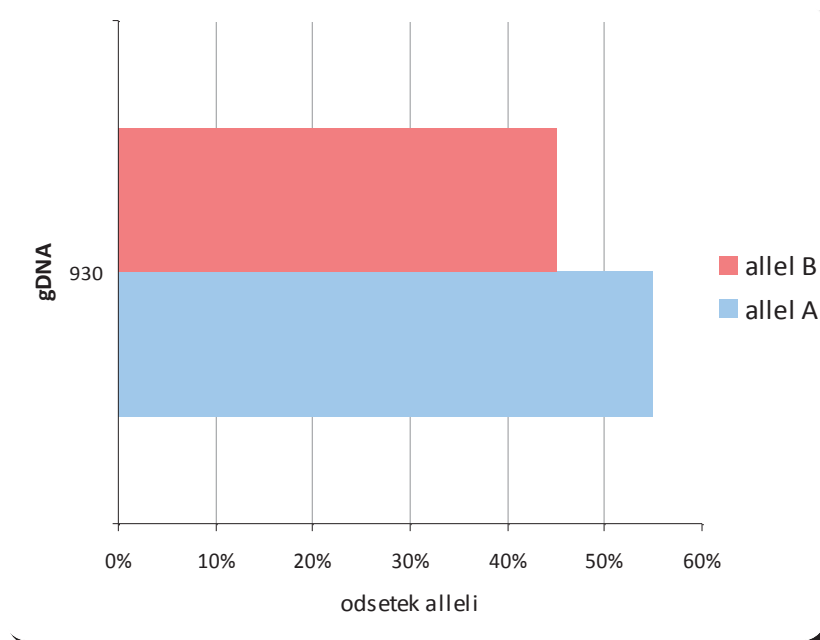
gDNA	Zamiana nukleotydu w kodonie	Nukleotyd referencyjny	Heterozygoty	Liczba homozygot z allelami polimorficznymi	Liczba homozygot z allelami referencyjnym
930	TCA→ TCG	A	11	8	11

Tabela 7. Zamiana typu SNP w sekwencji kodującej białko DSP w odniesieniu do liczby alleli; allel A – sekwencja referencyjna, allel B – sekwencja polimorficzna.

gDNA	Zamiana nukleotydu w kodonie	Nukleotyd referencyjny	Liczba alleli A	Liczba alleli B	% A	% B	Aminokwas
930	TCA → TCG	A	33	27	55	45	Ser



Rycina 1. Liczba alleli referencyjnych oraz alleli zmienionych w pozycji g.930 w sekwencji genu DSPP kodującej białko DSP; A – allel z sekwencją referencyjną, B – allel z sekwencją polimorficzną.



Rycina 2. Odsetek alleli referencyjnych oraz alleli zmienionych w pozycji g. 930 sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP; A – allel z sekwencją referencyjną, B – allel z sekwencją polimorficzną.

W sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP nie wykryto polimorfizmu ilościowego (insercji i/lub delecji).

6.2 Mutacje w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP

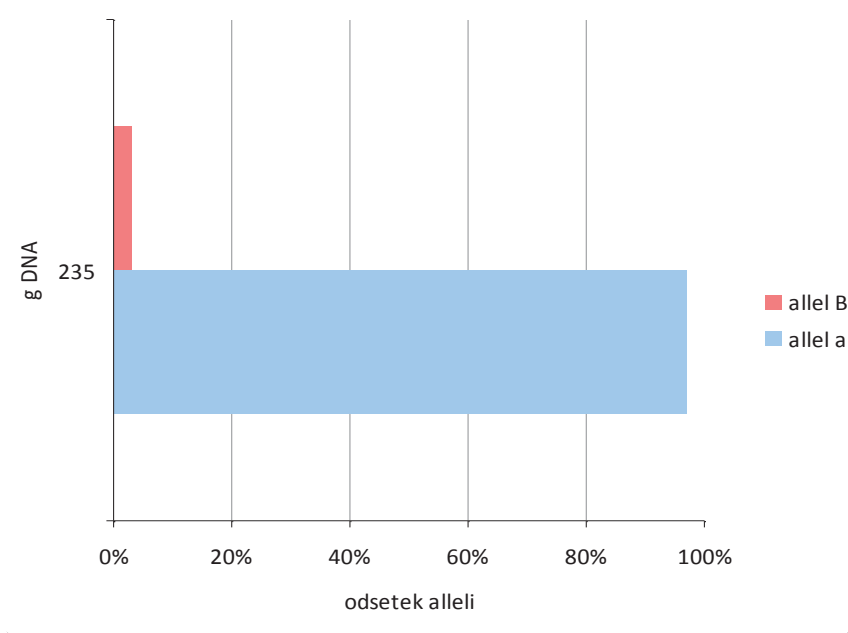
Analiza sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP wykazała u 2 probantów zmianę o charakterze transwersji A → T w pozycji g.235, co skutkowało zamianą argininy w tryptofan (tabela 8).

U każdego z 2 probantów mutacji uległ jedynie 1 allel (łącznie 2 allele).

Tabela 8. Mutacja w pozycji g.235 sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP; A – allel referencyjny, B – allel zmutowany.

gDNA	Zamiana nukleotydu	Nukleotyd referencyjny	Liczba alleli A	Liczba alleli B	% A	% B	Zamiana aminokwasu	Liczba probantów z mutacją
235	GGA → GGT	A	58	2	97	3	Arg → Trp	2

Przeprowadzona analiza wykazała, iż odsetek alleli referencyjnych stanowił 97%, a alleli zmutowanych 3%, co daje odpowiednio: 58 alleli z sekwencją referencyjną oraz 2 allele z sekwencją zmutowaną (rycina 3).



Rycina 3. Odsetek alleli referencyjnych (allel A) i alleli zmutowanych (allel B) w pozycji g.235 sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP.

6.3 Polimorfizm w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP

W sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP zaobserwowano zmiany polimorficzne typu SNP, jak również delecje i insercje, przy czym zmiany typu SNP dotyczyły jedynie pirymidyn i miały charakter tranzycji trzeciego nukleotydu w kodonie.

6.3.1 Polimorfizm typu SNP w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP

U wszystkich 30 probantów odnotowano liczne zmiany polimorficzne o charakterze tranzycji pomiędzy pirymidynami. Tranzycje występowały w trzecim nukleotydzie w 47 kodonach i dotyczyły nukleotydów zlokalizowanych w pozycjach: g.2004, g.3504, g.3507, g.3513, g.3516, g.3522, g.3525, g.3531, g.3540, g.3543, g.3549, g.3552, g.3558, g.3561, g.3567, g.3570, g.3576, g.3579, g.3585, g.3588, g.3594, g.3597, g.3603, g.3606, g.3612, g.3615, g.3621, g.3624, g.3630, 3639, g.3642, g.3645, g.3648, g.3651, g.3654, g.3657, g.3660, g.3663, g.3669, g.3675, g.3693, g.3711, g.3720, g.3738, g.3741, g.3756, g.3759 (tabele 9 – 14).

6.3.1.1 *Tranzycja C → T w sekwencji genu *DSPP* w kodonach kodujących serynę w białku DPP*

W 19 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 wykryto tranzycję C → T skutkującą zamianą AGC → AGT, co nie powodowało zmiany kodowania aminokwasu, gdyż obie sekwencje kodują serynę.

Tabela 9. Zamiana typu SNP w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP w odniesieniu do ilości alleli; allel A – sekwencja referencyjna, allel B – sekwencja polimorficzna; *brak doniesień dotyczących polimorfizmu w bazie Ensembl.

gDNA	Zamiana nukleotydu w kodonie	Nukleotyd referencyjny	Liczba alleli A	Liczba alleli B	% A	% B	Aminokwas
2004	AGC → AGT	C	47	13	78	22	Ser
3504*	AGC → AGT	C	49	11	82	18	Ser
3522*	AGC → AGT	C	27	25	45	42	Ser
3531	AGC → AGT	C	27	23	45	38	Ser
3540	AGC → AGT	C	30	22	50	37	Ser
3549*	AGC → AGT	C	31	21	52	35	Ser
3567*	AGC → AGT	C	35	17	58	28	Ser
3585*	AGC → AGT	C	32	22	53	37	Ser
3612*	AGC → AGT	C	44	14	73	23	Ser
3621*	AGC → AGT	C	52	6	87	10	Ser
3630*	AGC → AGT	C	41	17	68	28	Ser
3639	AGC → AGT	C	23	35	38	58	Ser
3654*	AGC → AGT	C	53	5	88	8	Ser
3663*	AGC → AGT	C	57	1	95	2	Ser
3675	AGC → AGT	C	41	17	68	28	Ser
3693*	AGC → AGT	C	55	3	92	5	Ser
3711*	AGC → AGT	C	55	5	92	8	Ser
3738	AGC → AGT	C	58	2	97	3	Ser
3756*	AGC → AGT	C	59	1	98	2	Ser

U 7 probantów w pozycji g.2004 zmianę C → T wykryto w jednym allelu (7 alleli), a u 3 osób w obu allelach (6 alleli), natomiast u pozostałych 20 osób w 40 allelach odnotowano sekwencję referencyjną. Łącznie 47 alleli z sekwencją referencyjną stanowiło 78% wszystkich badanych, a 13 alleli z sekwencją polimorficzną dawało odsetek 22% (tabela 9, rycina 4, 5).

W pozycji g.3504, u 11 probantów wykazano zamianę C → T w 1 allelu (11 alleli), natomiast 19 osób (38 alleli) posiadało w obu allelach sekwencję zgodną z sekwencją referencyjną. W konsekwencji 49 alleli (82%) było zgodnych z sekwencją referencyjną, natomiast 11 alleli, czyli 18 % stanowiło allele z sekwencją polimorficzną (tabela 9, rycina 4, 5).

W pozycji g.3522 u 23 osób doszło do zmiany C → T w 1 allelu (23 allele), natomiast 1 osoba posiadała oba allele z sekwencją T. Kolejno, 2 osoby posiadały w pozycji g.3522 sekwencję C zgodną z referencyjną w obu allelach, natomiast u 4 osób w pozycji g.3522 wykazano delecję (tabela 10, rycina 6). Sumując, 45% (27 alleli) alleli było zgodne z sekwencją referencyjną, a 42% (25) alleli stanowiło allele z sekwencją polimorficzną (tabela 9, rycina 4, 5).

W pozycji g.3531, u 21 osób wykazano zamianę C → T w 1 allelu (21 alleli), natomiast u 1 osoby obydwa allele uległy zamianie (2 allele). Dodatkowo u 5 osób wykryto delecję (tabela 10, rycina 6). Pozostałe 3 osoby posiadały w obu allelach sekwencję referencyjną C. Obliczono, że 45% (27) alleli było zgodne z sekwencją referencyjną, a 38% (23) alleli stanowiły allele z sekwencją polimorficzną (tabela 9, rycina 4, 5). Kolejno, w pozycji g.3540, 22 osoby posiadały 1 allel ze zmienioną sekwencją C → T (łącznie 22 allele), natomiast u 4 osób w obu allelach wykazano sekwencję referencyjną C. U kolejnych 4 osób wykryto delecję w pozycji g. 3540. (tabela 10, rycina 6). Allele z sekwencją referencyjną stanowiły 50% (30 alleli), natomiast 37% (22 allele) stanowiło allele z sekwencją polimorficzną (tabela 9, rycina 4, 5).

W pozycji g.3549 u 21 osób zaszła zmiana C → T w 1 allelu (21 alleli), u 4 osób wykryto delecję (tabela 10, rycina 6), natomiast pozostałych 10 alleli u 5 osób posiadało sekwencję C zgodną z sekwencją referencyjną. Przeanalizowano, że 52% (31) ocenianych alleli miało sekwencję zgodną z allelem referencyjnym, natomiast 35% (21 alleli) to allele z sekwencją polimorficzną (tabela 9, rycina 4, 5).

W pozycji g.3567 u 17 osób wykazano zamianę cytozyny w tyminę w 1 allelu, natomiast pozostałe 9 osób w obu allelach posiadało sekwencję C allela referencyjnego (18 alleli). U 4 osób wykazano delecję (tabela 10, rycina 6). 58% (35) alleli było zgodne z allelem referencyjnym, natomiast 28% (17 alleli) stanowiły allele z sekwencją polimorficzną (tabela 9, rycina 4, 5).

W pozycji g. 3585 u 22 osób wykazano zmienioną sekwencję T w 1 allelu (22 allele), natomiast pozostałe 5 osób posiadało w obu allelach (10) sekwencję referencyjną. U 3 osób wykryto delecję (tabela 10, rycina 6). Z obliczeń wynika, że 32 allele, czyli 53% posiadało sekwencję zgodną z allelem referencyjnym, natomiast 37% (22 allele) uległo tranzycji (tabela 9, rycina 4, 5).

W pozycji g.3612 u 14 osób zaszła zamiana C → T w 1 allelu (łącznie 14 alleli), u 1 osoby wykryto delecję (tabela 10, rycina 6), a pozostałe 15 osób posiadało w obu allelach sekwencję zgodną z sekwencją referencyjną. W konsekwencji 73% (44) alleli było zgodne z allelem referencyjnym T, natomiast 23% (14) to allele zmienione C → T (tabela 9; rycina 4, 5).

W pozycji g.3621 u 1 osoby wykryto delecję (tabela 10, rycina 6), 6 osób posiadało zmienioną sekwencję T w 1 allelu (6 alleli), natomiast pozostałe 23 osoby posiadały referencyjną sekwencję C w obu allelach. Podsumowano, że 87% (52) alleli miało sekwencję C, zgodną z allelem referencyjnym, natomiast 10% (6 alleli) to allele zmienione C → T (tabela 9, rycina 4, 5).

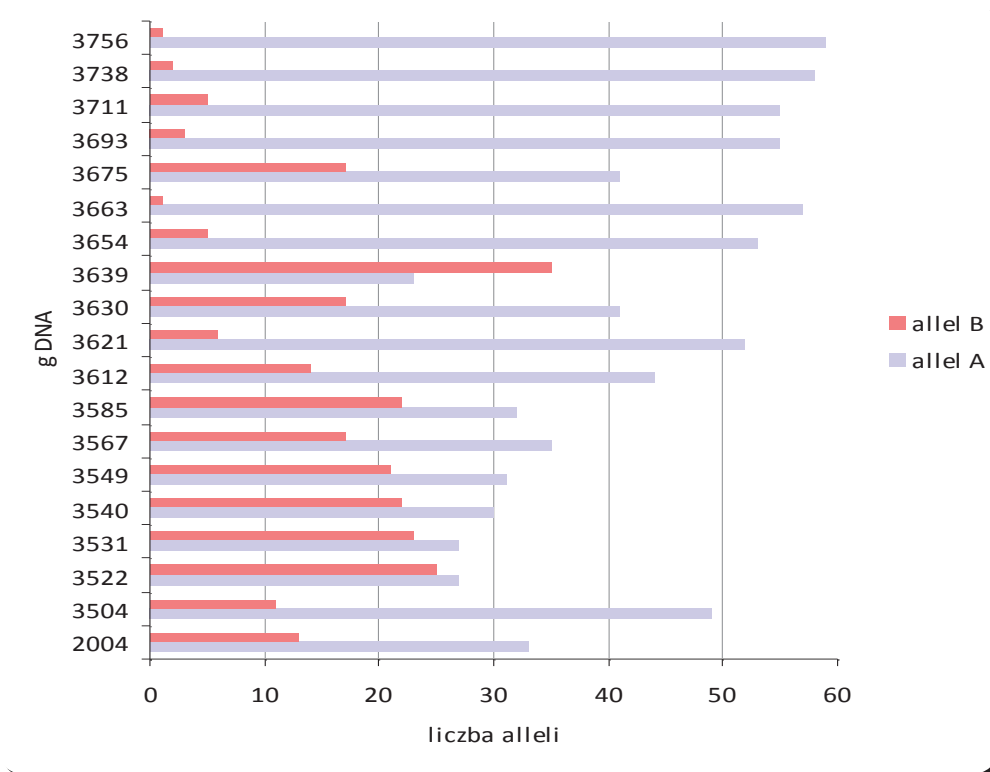
W pozycjach g.3630 oraz g.3639 zmiana C → T zaszła u 17 osób w 1 allelu (17 alleli) oraz wykryto delecję obu nukleotydów u 1 osoby. Kolejno, 12 osób posiadało sekwencję zgodną z referencyjną w pozycji g.3630, co świadczy o braku polimorfizmu w 68% (41) alleli, a jego obecności w 28% (17) alleli. Z kolei w pozycji g.3639 u 9 osób zanotowano sekwencję zmienioną w obu allelach (18 alleli), a pozostałe 3 osoby posiadały sekwencję C zgodną z sekwencją referencyjną. Ostatecznie w pozycji g.3639 38% (23) alleli posiadało sekwencję referencyjną, natomiast 58% (35) alleli to allele z sekwencją polimorficzną (tabela 9, rycina 4, 5).

W pozycji g.3654 u 5 osób zaszła zamiana C → T w 1 allelu (5 alleli), a pozostałe 24 osoby (48 alleli) posiadały sekwencję zgodną z referencyjną.

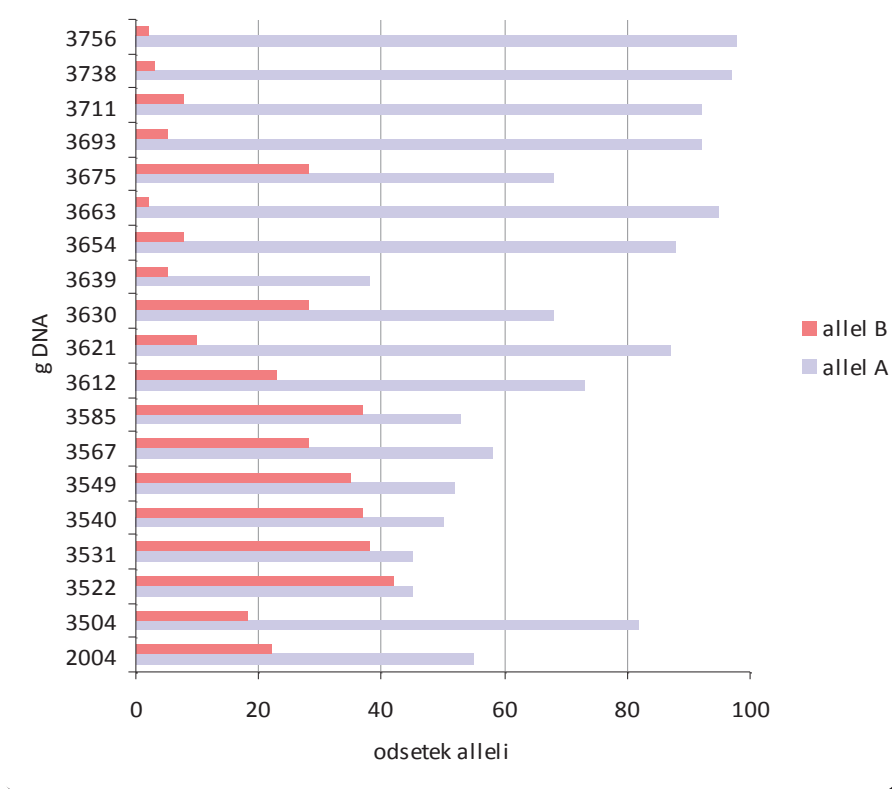
Dodatkowo u 1 osoby doszło do delecji (tabela 10, rycina 6). Obliczono, że 88% (53) alleli było zgodne z sekwencją referencyjną C, natomiast 8% (5 alleli) uległo tranzycji C → T (tabela 9, rycina 4, 5).

W pozycji g.3663 jedynie 1 allel u 1 osoby posiadał sekwencję zmienioną C → T, co stanowi 2% ogółu przebadanych alleli, natomiast pozostałe 95% (57) alleli pochodzących od 28 osób posiadało sekwencję zgodną z sekwencją referencyjną. U jednej osoby odnotowano delecję nukleotydu g.3663 (tabela 9, 10, rycina 4, 5, 6).

W pozycjach g.3675, g.3693, g.3711, g.3738, g.3756 zamiana C → T w pojedynczym allelu nastąpiła odpowiednio u 17, 3, 5, 2, 1 osoby. W wymienionych pozycjach nie zanotowano ani jednej osoby ze zmienioną sekwencją w obu allelach, dlatego odpowiednio 12, 26, 25, 28 oraz 29 osób miało sekwencję C, zgodną z sekwencją referencyjną (tabela 9, rycina 4). Ponadto zanotowano u 1 osoby delecję nukleotydu w pozycjach g.3675 oraz g.3693. W pozycjach obliczenia kształtowały się następująco: g.3675 – 68% (41) alleli z sekwencją referencyjną, a 28% czyli 17 alleli z sekwencją polimorficzną, g.3693 – 92% (55) alleli z sekwencją referencyjną, a 5% czyli 3 allele z sekwencją polimorficzną, g.3711 – 92% (55) alleli z sekwencją referencyjną, a 8% (5) alleli z sekwencją polimorficzną, g.3738 – 97% (58) alleli z sekwencją referencyjną, a 3% czyli 2 allele z sekwencją polimorficzną oraz g.3756 – 98% (59) alleli z sekwencją referencyjną, a 2% czyli 1 allel z sekwencją polimorficzną (tabela 10, rycina 6).



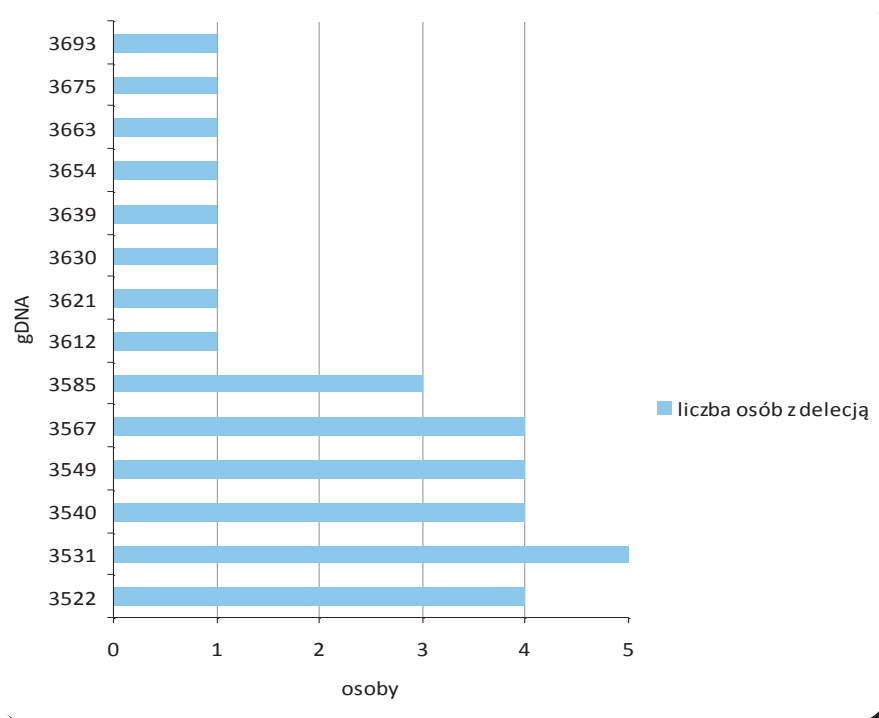
Rycina 4. Liczba alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli zmienionych (allel B) w pozycjach: g.2004, g.3504, g.3522, g.3531, g.3540, g.3549, g.3567, g.3585, g.3612, g.3621, g.3630, g.3639, g.3654, g.3663, g.3675, g.3693, g.3711, g.3738, g.3756 w sekwencji genu *DSPP*.



Rycina 5. Odsetek alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli zmienionych (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*.

Tabela 10. Liczba osób 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*.

gDNA	3522	3531	3540	3549	3567	3585	3612	3621	3630	3639	3654	3663	3675	3693
Liczba osób z delecją	4	5	4	4	4	3	1	1	1	1	1	1	1	1



Rycina 6. Liczba osób 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*.

6.3.1.2 Tranzycja $T \rightarrow C$ w sekwencji genu *DSPP* w kodonach kodujących serynę w białku *DPP*

Kolejno odnotowano polimorfizm o charakterze tranzycji $T \rightarrow C$ w pozycjach: g.3513, g.3558, g.3576, g.3594, g.3603, g.3645, g.3648, g.3657, g.3720 sekwencji genu *DSPP*. Odnotowane tranzycje wystąpiły w ostatnim nukleotydzie w kodonie $AGT \rightarrow AGC$ i nie skutkowały zamianą kodowanego aminokwasu, którym była serynę.

Tabela 11. Zamiana typu SNP w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko *DPP* w odniesieniu do ilości alleli; allel A – sekwencja referencyjna, allel B – sekwencja polimorficzna; *brak doniesień dotyczących polimorfizmu w danej lokalizacji w bazie Ensembl

gDNA	Zamiana nukleotydu w kodonie	Nukleotyd referencyjny	Liczba alleli A	Liczba alleli B	% A	% B	Aminokwas
3513*	AGT→AGC	T	52	8	87	13	Ser
3558	AGT→AGC	T	47	5	78	8	Ser
3576	AGT→AGC	T	43	9	72	15	Ser
3594	AGT→AGC	T	54	2	90	3	Ser
3603	AGT→AGC	T	56	2	93	3	Ser
3645	AGT→AGC	T	49	9	82	15	Ser
3648	AGT→AGC	T	57	1	95	2	Ser
3657	AGT→AGC	T	54	4	90	7	Ser
3720	AGT→AGC	T	56	4	93	7	Ser

W pozycji g.3513 u 8 osób doszło do tranzycji w 1 allelu (8 alleli). Pozostałe 22 osoby posiadały w obu allelach sekwencję T, zgodną z sekwencją referencyjną, co daje 87% (52) alleli zgodnych oraz 13% (8) alleli polimorficznych (tabela 11, rycina 7, 8).

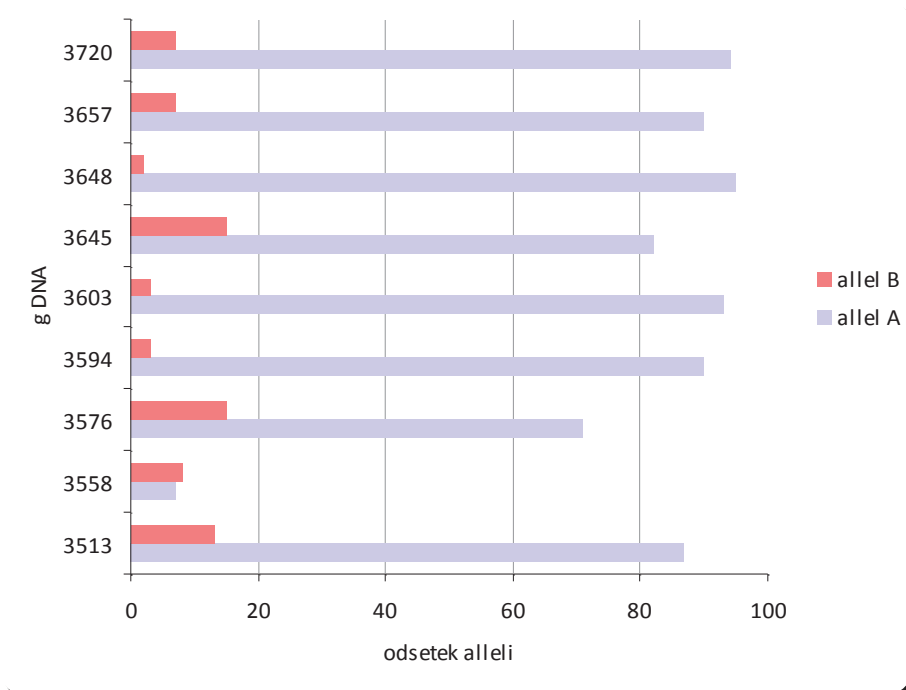
W pozycji g.3558, 21 osób posiadało w obu allelach sekwencję T zgodną z sekwencją referencyjną, a u 5 osób zaszła tranzycja T → C w 1 allelu (5 alleli), co w sumie stanowiło 78% (47) alleli z sekwencją referencyjną oraz 8% (5) alleli zmienionych (tabela 11, rycina 7, 8). Ponadto u 4 osób wykryto delecję g.3558 (tabela 12, rycina 9).

Delecję wykryto również u 4 osób w pozycji g.3576 (tabela 12, rycina 9). Dodatkowo, w tej samej lokalizacji u 9 osób zaszła zamiana T → C w 1 allelu (9 alleli), a pozostałe 17 osób posiadało w obu allelach sekwencję T zgodną z sekwencją referencyjną. Stanowiło to 72% (43) alleli z sekwencją referencyjną, natomiast 15% (9) alleli z sekwencją zmienioną T → C (tabela 11, rycina 7, 8).

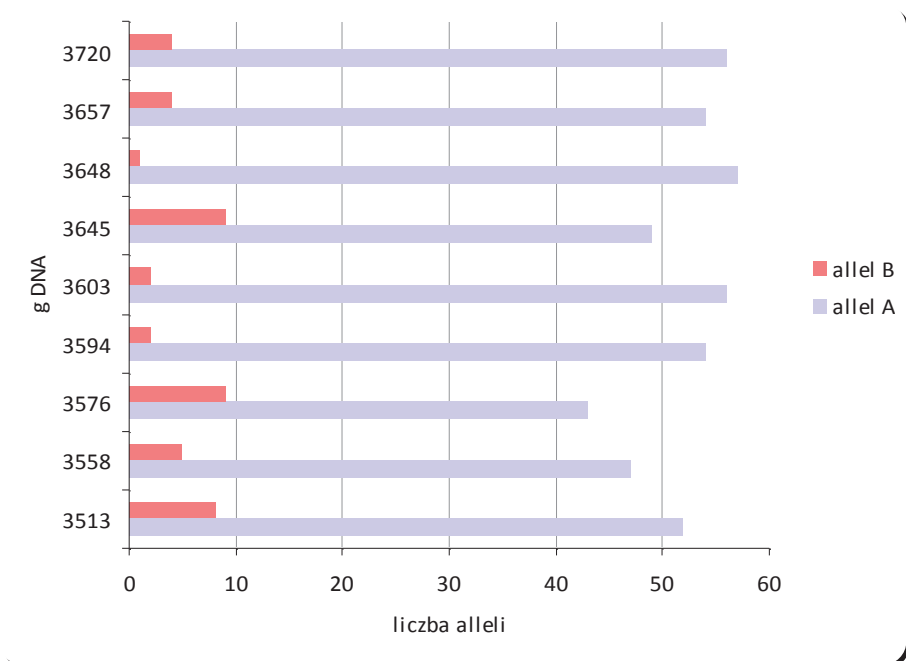
W pozycji g.3594 u 2 osób zaszła zamiana T → C w 1 allelu (łącznie 2 allele), u 2 osób wykryto delecję (tabela 12, rycina 9), a pozostałe 26 osób posiadało w obu allelach sekwencję zgodną z sekwencją referencyjną. W konsekwencji 90% (54) allele były zgodne z allelem referencyjnym T, natomiast 3% (2) to allele zmienione T → C (tabela 11, rycina 7, 8).

W dalszej analizie u 1 osoby wykazano delecję nukleotydów w pozycjach: g.3603, g.3645, g.3648, g.3657 (tabela 12, rycina 9). Ponadto w pozycji g.3603 u 2 osób tranzycja T → C zaszła w 1 allelu (2 allele), natomiast pozostałe 27 osób w obu allelach posiadało sekwencję T, zgodną z sekwencją referencyjną. Zatem, 93% (56) alleli było zgodnych z allelem referencyjnym, a 3% (2) alleli uległo tranzycji. Kolejno, w pozycji g.3645 zamiana T → C w 1 allelu (9 alleli – 15%) nastąpiła u 9 osób, a 20 osób posiadało w obu allelach sekwencję T, czyli 82% (49) alleli miało sekwencję referencyjną. Oprócz delecji w pozycji g.3648 odnotowano zamianę sekwencji T → C w 1 allelu (1 allel) u 1 osoby, a w pozycji g.3657 u 4 osób. W pozycji g.3648, 28 osób (95% – 57 alleli) posiadało w obu allelach sekwencję zgodną z referencyjną, a w pozycji g.3657 sekwencja zgodna z referencyjną występowała u 25 osób (90% – 54 allele), co świadczy, że w pozycji g.3648 było 2% alleli polimorficznych, a w pozycji g.3657 alleli polimorficznych było 7% (tabela 11, rycina 7, 8).

Ostatnią tranzycję T → C w sekwencji genu *DSPP* kodującej DPP odnotowano u 4 osób w pozycji g.3720 i polegała ona na zamianie sekwencji 1 allela (4 allele). Pozostałe 26 osób w obu allelach posiadało sekwencję zgodną z sekwencją referencyjną, co daje 93% (56) alleli z sekwencją T oraz 7% (4) alleli z sekwencją polimorficzną C (tabela 11, rycina 7, 8).



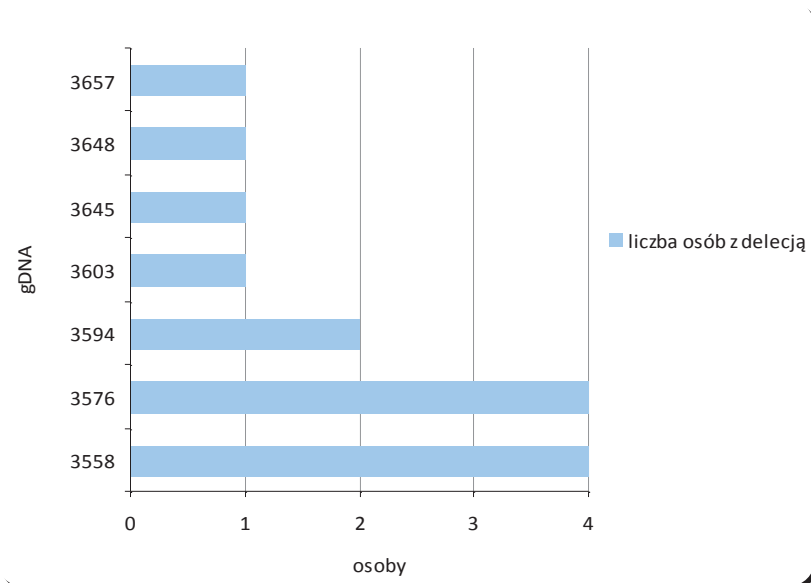
Rycina 7. Odsetek alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli zmienionych (allel B) w pozycjach: g.3513, g.3558, g.3576, g.3594, g.3603, g.3645, g.3648, g.3657, g.3720 sekwencji genu *DSPP*.



Rycina 8. Liczba alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli zmienionych (allel B) w pozycjach: g.3513, g.3558, g.3576, g.3594, g.3603, g.3645, g.3648, g.3657, g.3720 sekwencji genu *DSPP*.

Tabela 12. Liczba osób z delecją w pozycjach: g.3558, g.3576, g.3594, g.3603, g.3645, g.3648, g.3657 w sekwencji genu *DSPP*.

gDNA	Liczba osób z delecją
3558	4
3576	4
3594	2
3603	1
3645	1
3648	1
3657	1



Rycina 9. Liczba osób z delecją w pozycjach: g.3558, g.3576, g. 3594, g.3603, g.3645, g.3648, g.3657 w sekwencji genu *DSPP*.

6.3.1.3 *Tranzycja T → C w sekwencji genu DSPP w kodonach kodujących kwas asparaginowy w białku DPP*

Polimorfizm o charakterze tranzycji T → C obserwowany był również w trzecim nukleotydzie kodonu GAT → GAC kodującego kwas asparaginowy (tabela 13).

Tabela 13. Zamiana typu SNP w sekwencji kodującej białko DPP w odniesieniu do ilości alleli; allel A – sekwencja referencyjna, allel B – sekwencja polimorficzna; *brak doniesień dotyczących polimorfizmu w danej lokalizacji w bazie Ensembl.

gDNA	Zamiana nukleotydu w kodonie	Nukleotyd referencyjny	Liczba alleli A	Liczba alleli B	% A	% B	Aminokwas
3507	GAT → GAC	T	55	5	92	8	Asp
3525*	GAT → GAC	T	36	14	60	23	Asp
3552*	GAT → GAC	T	35	17	58	28	Asp
3579	GAT → GAC	T	42	10	70	17	Asp
3597	GAT → GAC	T	47	9	78	15	Asp
3624	GAT → GAC	T	44	14	73	23	Asp
3642	GAT → GAC	T	50	8	83	13	Asp
3651	GAT → GAC	T	57	1	95	2	Asp
3759*	GAT → GAC	T	59	1	98	2	Asp

W pozycji g.3507 u 5 osób doszło do tranzycji w 1 allelu (5 alleli). Pozostałe 25 osób posiadało w obu allelach sekwencję T, zgodną z referencyjną, co daje 92% (55) alleli zgodnych oraz 8% (5) alleli polimorficznych (tabela 13, rycina 10, 11).

W pozycji g.3525, 12 osób posiadało w obu allelach sekwencję zgodną z sekwencją referencyjną T, natomiast u 12 kolejnych osób nastąpiła zamiana w 1 allelu (12 alleli). U 1 osoby w tej pozycji obydwie allele uległy zamianie (2 allele). Stanowiło to 60% (36) alleli z sekwencją referencyjną T oraz 23% (14) alleli z sekwencją zmienioną T → C (tabela 13, rycina 10, 11). Ponadto u 5 probantów wykryto delecję (tabela 14, rycina 12).

Delecję wykryto również u 4 osób w pozycji g.3552 (tabela 14, rycina 12). Dodatkowo, w tej samej lokalizacji u 17 osób zaszła zamiana T → C w 1 allelu (17 alleli), a pozostałe 9 osób posiadało sekwencję w obu allelach zgodną z sekwencją referencyjną.

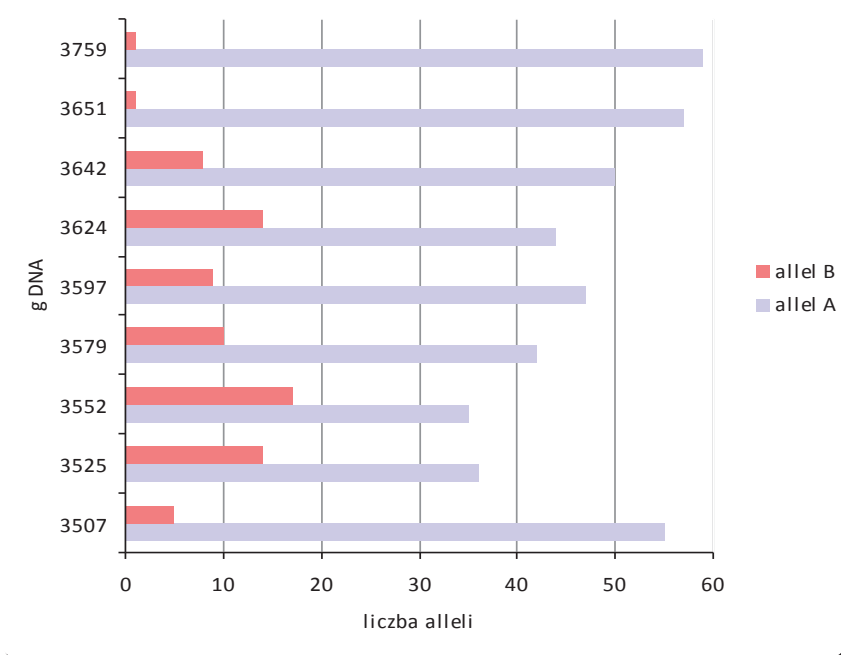
W sumie allele z sekwencją referencyjną T stanowiły 58% (35), natomiast 28% (17) alleli było z sekwencją zmienioną T → C (tabela 13, rycina 10, 11).

W pozycji g.3579 u 10 osób zaszła zmiana T → C w 1 allelu (10 alleli), u 4 osób wykryto delecję (tabela 14, rycina 12), a pozostałe 16 osób posiadało w obu allelach sekwencję T zgodną z referencyjną. W konsekwencji 70% (42) alleli było zgodne z allelem referencyjnym, natomiast 17% (10) alleli to allele polimorficzne (tabela 13, rycina 10, 11).

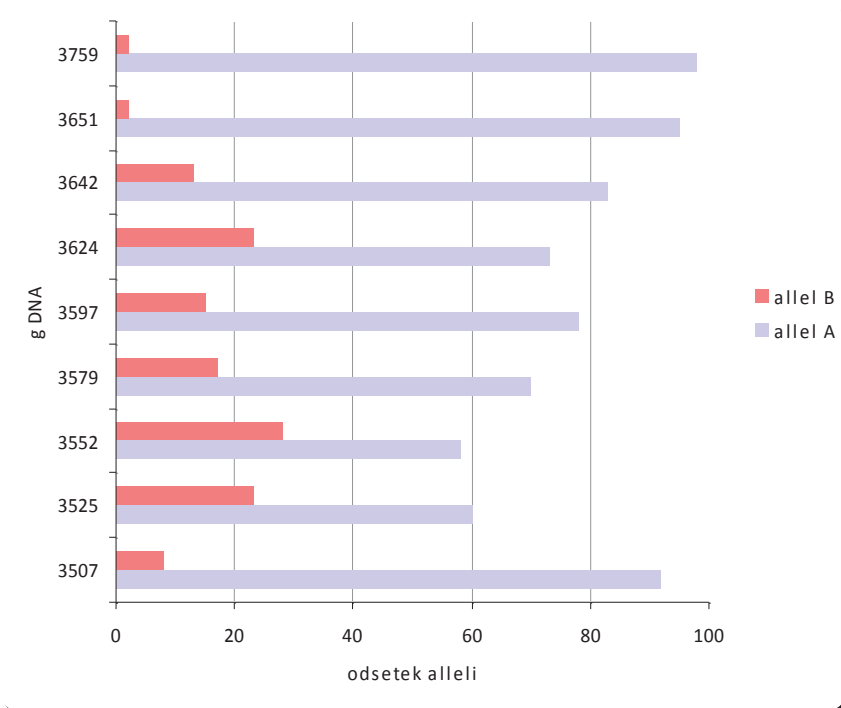
W pozycji g.3597 zmiana T → C zaszła u 9 osób w 1 allelu (9 alleli) oraz wykryto delecję nukleotydu u 2 osób (tabela 14, rycina 12). Kolejno, pozostałe 19 osób posiadało w obu allelach sekwencję zgodną z referencyjną, co świadczy o braku polimorfizmu w 78% (47), oraz obecności polimorfizmu w 15% (9) alleli (tabela 13, rycina 10, 11)

W dalszej analizie u 1 osoby wykazano delecję nukleotydów w pozycjach: g.3624, g.3642, g.3651 (tabela 14, rycina 12). Ponadto, w pozycji g.3624 u 12 osób tranzycja T → C zaszła w 1 allelu (12 alleli), a u 1 osoby obu allelach (2 allele). Pozostałe 16 osób posiadało sekwencję zgodną z referencyjną. Zatem 73% (44) alleli było zgodnych z allelem referencyjnym, a 23% (14) alleli uległo tranzycji. Kolejno w pozycji g.3642 zamiana T → C nastąpiła w 1 allelu (8 alleli – 13%) u 8 osób, a 21 osób posiadało w obu allelach sekwencję T, czyli 83% (50) alleli miało sekwencję referencyjną. Oprócz delecji w pozycji g.3651 odnotowano zmianę sekwencji T → C w 1 allelu (1 allel – 2%) u 1 osoby. 28 osób (95% – 57 alleli) posiadało w obu allelach sekwencję T zgodną z referencyjną (tabela 13, rycina 10, 11).

Ostatnią tranzycję T → C w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP odnotowano u 1 osoby w pozycji g.3759 i polegała ona na zmianie sekwencji 1 allela (1 allel). Pozostałe 29 osób w obu allelach posiadało sekwencję zgodną z sekwencją referencyjną, co daje 98% (59) alleli z sekwencją T oraz 2% (1) alleli z sekwencją polimorficzną C (tabela 13, rycina 10, 11).



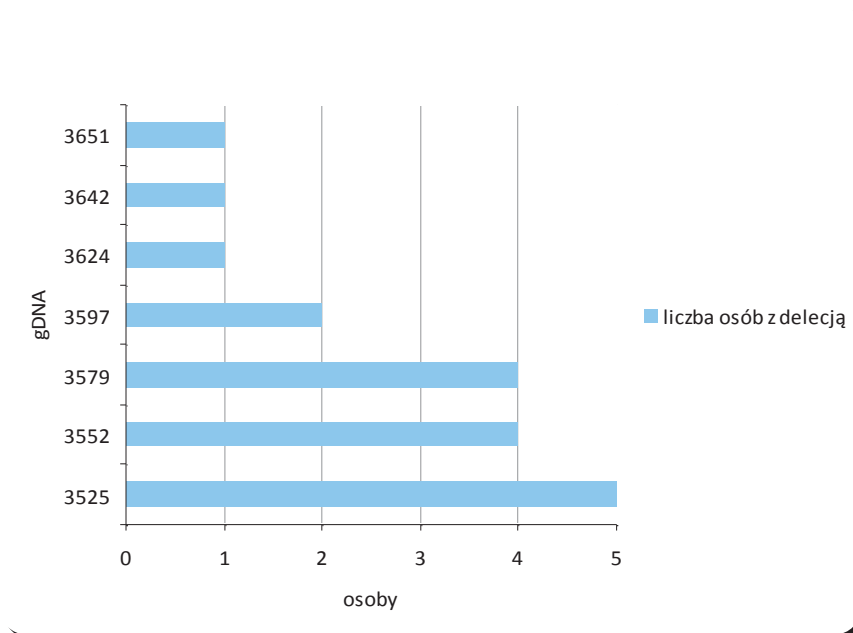
Rycina 10. Liczba alleli referencyjnych (allele A) oraz alleli zmienionych (allele B) w pozycjach: g.3507, g.3525, g.3552, g.3579, g.3597, g.3624, g.3642, g.3651, g.3759 sekwencji genu *DSPP*.



Rycina 11. Odsetek alleli referencyjnych (allele A) oraz alleli zmienionych (allele B) w pozycjach: g.3507, g.3525, g.3552, g.3579, g.3597, g.3624, g.3642, g.3651, g.3759 sekwencji genu *DSPP*.

Tabela 14. Liczba osób z delecją w pozycjach: g.3525, g.3552, g.3579, g.3597, g.3624, g.3642, g.3651 sekwencji genu *DSPP*.

gDNA	Liczba osób z delecją
3525	5
3552	4
3579	4
3597	2
3624	1
3642	1
3651	1



Rycina 12. Liczba osób z delecją w pozycjach: g.3525, g.3552, g.3579, g.3597, g.3624, g.3642, g.3651 w sekwencji genu *DSPP*.

6.3.1.4 *Tranzycja C → T w sekwencji genu DSPP kodującej kwas asparaginowy w białku DPP*

Kolejno odnotowano polimorfizm o charakterze tranzycji C → T w pozycjach: g.3516, g.3543, g.3561, g.3588, g.3606, g.3615, g.3660, G.3669, g.3741 w sekwencji genu *DSPP*. Obserwowane tranzycje wystąpiły w ostatnim nukleotydzie w kodonie GAC → GAT i nie skutkowały zmianą kodowanego aminokwasu, którym był kwas asparaginowy (tabela 15).

Tabela 15. Zamiana typu SNP w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP w odniesieniu do ilości alleli; allel A – sekwencja referencyjna, allel B – sekwencja polimorficzna; *brak doniesień dotyczących polimorfizmu w danej lokalizacji w bazie Ensembl.

gDNA	Zamiana nukleotydu w kodonie	Nukleotyd referencyjny	Liczba alleli A	Liczba alleli B	% A	% B	Aminokwas
3516*	GAC → GAT	C	56	4	93	7	Asp
3543*	GAC → GAT	C	50	2	83	3	Asp
3561	GAC → GAT	C	48	4	80	7	Asp
3588*	GAC → GAT	C	46	8	77	13	Asp
3606	GAC → GAT	C	53	5	88	8	Asp
3615*	GAC → GAT	C	56	2	93	3	Asp
3660*	GAC → GAT	C	51	7	85	12	Asp
3669	GAC → GAT	C	56	2	93	3	Asp
3741	GAC → GAT	C	57	3	95	5	Asp

W pozycji g.3516 u 4 osób doszło do tranzycji C → T w 1 allelu (4 allele). Pozostałe 26 osób posiadało w obu allelach sekwencję C, zgodną z sekwencją referencyjną, co daje 93% (56) alleli zgodnych oraz 7% (4) alleli polimorficznych (tabela 15, rycina 13, 14).

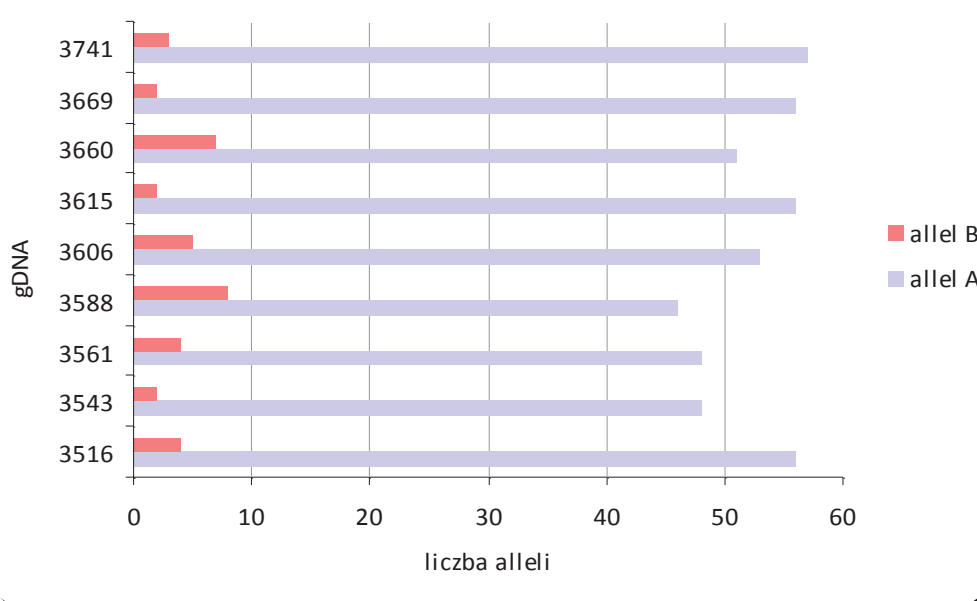
W dalszej analizie u 4 osób wykazano delecję nukleotydów w pozycjach: g.3543 i g.3561 (tabela 16, rycina 15).

Ponadto, w pozycji g.3543, 24 osoby posiadały w obu allelach sekwencję zgodną z sekwencją referencyjną C, a u 2 osób zaszła zmiana C → T w 1 allelu (2 allele), co w sumie stanowiło 83% (50) alleli z sekwencją referencyjną oraz 3% (2) alleli zmienionych (tabela 15, rycina 13, 14). Kolejno w pozycji g.3561 u 4 osób zaszła tranzycja C → T w 1 allelu (4 allele), natomiast pozostałe 22 osoby w obu allelach posiadały sekwencję zgodną z sekwencją referencyjną. Zatem, 80% (48) alleli było zgodne z allelem referencyjnym, natomiast 7% (4) alleli uległo tranzycji (tabela 15, rycina 13, 14).

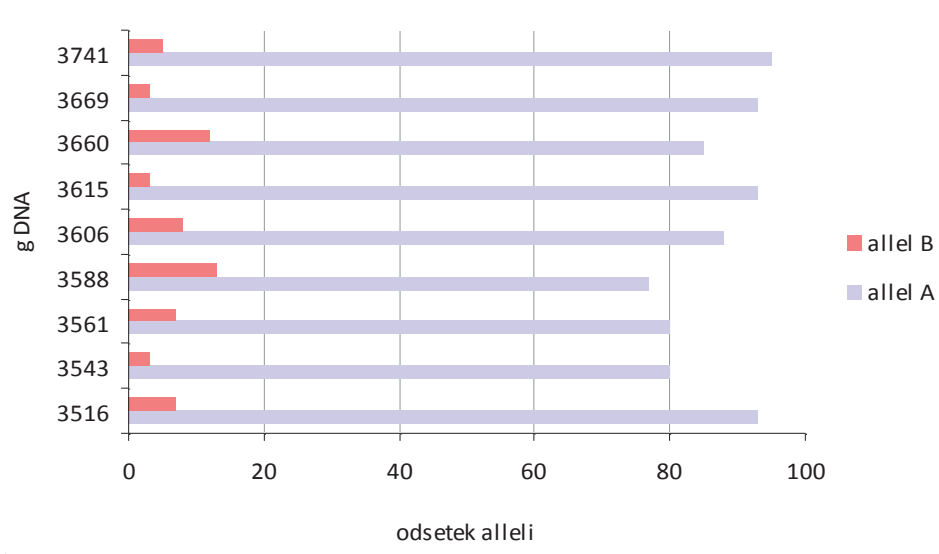
W pozycji g.3588 oprócz delecji u 3 osób (tabela 16, rycina 15) odnotowano u 8 osób zamianę sekwencji C → T w 1 allelu (8 alleli). 19 osób (77% – 46 alleli) posiadało w obu allelach sekwencję zgodną z referencyjną, natomiast 13% (8) alleli było polimorficznych (tabela 15, rycina 13, 14).

W pozycjach g.3606, g.3615, g.3660 i g.3669 zamiana C → T w pojedynczym allelu nastąpiła odpowiednio u 5, 2, 7, 2 osób. W wymienionych pozycjach nie zanotowano ani jednej osoby za zmienioną sekwencją w obu allelach, dlatego odpowiednio 24, 27, 22 oraz 27 osób miało sekwencję C zgodną z sekwencją referencyjną (tabela 15, rycina 13). Ponadto, wykazano u 1 osoby delecję we wszystkich wymienionych pozycjach (tabela 16, rycina 15). W pozycji g.3606, 88% (53) alleli było zgodne z allelem referencyjnym, natomiast 8% (5) alleli to allele polimorficzne (tabela 15, rycina 13, 14). W kolejnych pozycjach obliczenia kształtowały się następująco: g.3615 – 93% (56) alleli było zgodne z sekwencją referencyjną, a 3% czyli 2 allele z sekwencją polimorficzną, g.3660 – 85% (51) alleli z sekwencją referencyjną, a 12% czyli 7 alleli z sekwencją polimorficzną oraz g.3669 – 93% (56) alleli z sekwencją referencyjną, a 3% (2) alleli z sekwencją polimorficzną. (tabela 15, rycina 13, 14)

Ostatnią tranzycję C → T w sekwencji genu *DSPP* kodującego białko DPP odnotowano w pozycji g.3741. W pozycji tej nie odnotowano osób z delecją wymienionych nukleotydów, natomiast 27 osób posiadało sekwencję zgodną z referencyjną, a u 3 osób zamiana C → T zaszła w 1 allelu (3 allele) (tabela 15). Sumując, w pozycji g.3741, 95% (57) alleli było zgodne z sekwencją referencyjną, natomiast 5% (3) alleli stanowiły allele polimorficzne (tabela 15, rycina 13, 14).



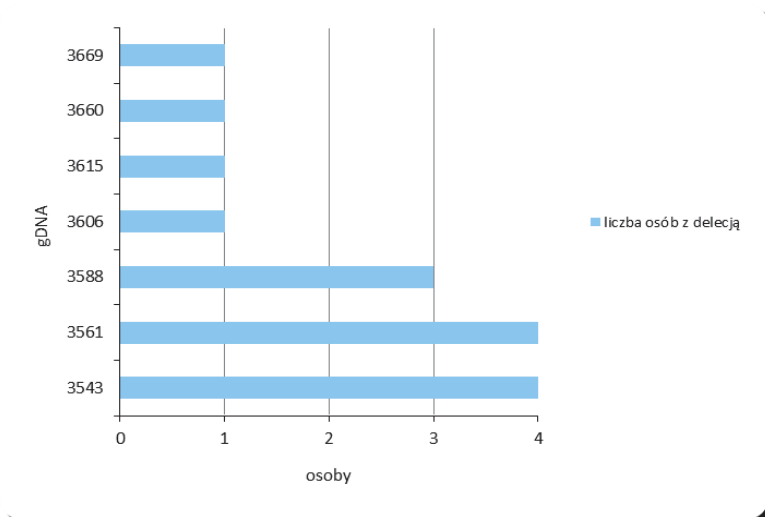
Rycina 13. Liczba alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli zmienionych (allel B) w pozycjach: g.3516, g.3543, g.3561, g.3588, g.3606, g.3615, g.3660, g.3669, g.3741 sekwencji genu *DSPP*.



Rycina 14. Odsetek alleli referencyjnych (allel A) oraz alleli zmienionych (allel B) w pozycjach: g.3516, g.3543, g.3561, g.3588, g.3606, g.3615, g.3660, g.3669, g.3741 sekwencji genu *DSPP*.

Tabela 16. Liczba osób z delecją w pozycjach: g.3543, g.3561, g.3588, g.3606, g.3615, g.3660, g.3669 sekwencji genu *DSPP*.

gDNA	Liczba osób z delecją
3543	4
3561	4
3588	3
3606	1
3615	1
3660	1
3669	1



Rycina 15. Liczba osób z delecją w pozycjach: g.3543, g.3561, g.3588, g.3606, g.3615, g.3660, g.3669 sekwencji genu *DSPP*.

6.3.1.5 *Tranzycja T → C w sekwencji genu DSPP w kodonach kodujących asparaginę w białku DPP*

W pozycji g. 3570 zamiana T → C miała charakter tranzycji ostatniego nukleotydu w kodonie AAT → AAC kodującym asparaginę. Był to jedyny obserwowany wynik dotyczący polimorfizmu kodonu kodującego Asn. U 17 osób tranzycja nastąpiła w jednym allelu (łącznie 17 alleli), a u 9 probantów (18 alleli) w obu allelach odnotowano sekwencję referencyjną T. Jednocześnie u 4 osób wykryto delecję nukleotydu g.3570.

Łącznie, allele referencyjne stanowiły 58% (35 alleli), natomiast odsetek alleli polimorficznych wyniósł 28% (17 alleli) (tabela 17).

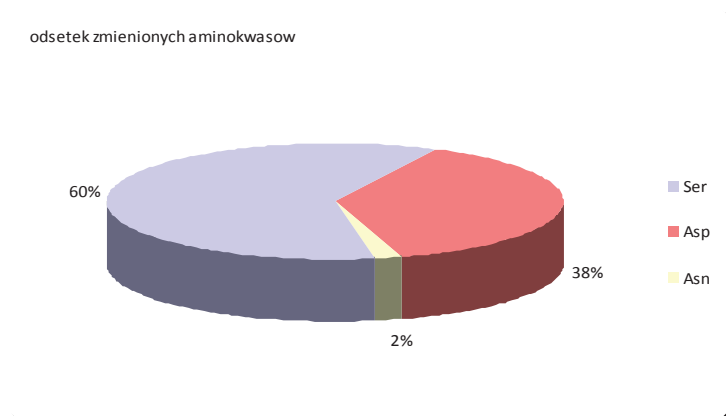
Tabela 17. Zamiana typu SNP w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP w odniesieniu do ilości alleli; allel A – sekwencja referencyjna, allel B – sekwencja polimorficzna.

gDNA	Zamiana nukleotydu w kodonie	Nukleotyd referencyjny	Liczba alleli A	Liczba alleli B	% A	% B	Aminokwas
3570	AAT → AAC	T	35	17	58	28	Asn

Spośród wszystkich 47 zmian typu SNP w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP, 60% (28 zmian) dotyczyło kodonów kodujących serynę, 38% (18 zmian) kodonów kodujących kwas asparaginowy, a jedynie 2% (1 zmiana) kodonów asparaginy (tabela 18, rycina 16).

Tabela 18. Liczba oraz odsetek zmian typu SNP odnotowanych w kodonach kodujących Ser, Asp oraz Asn w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP.

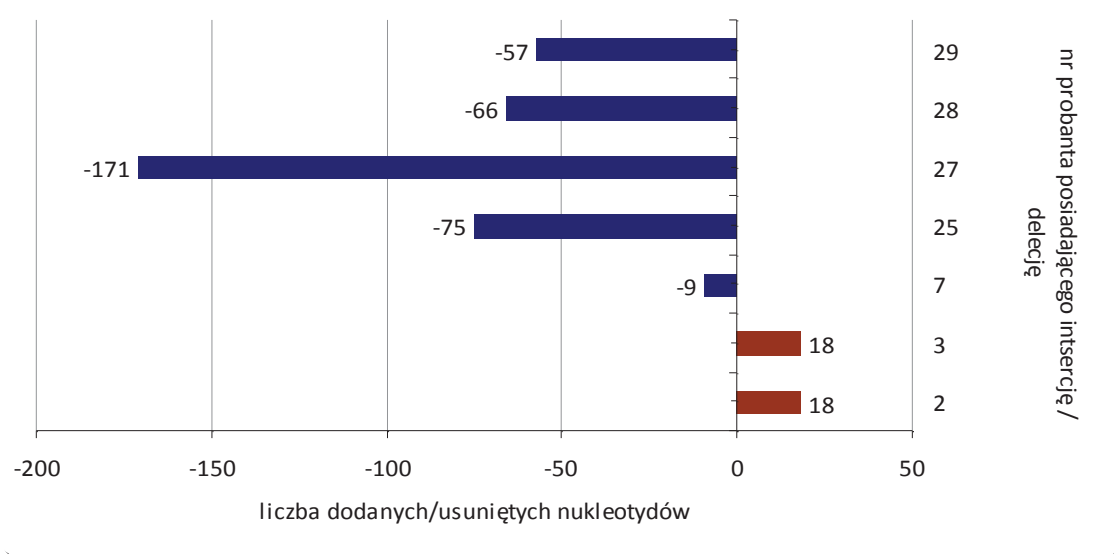
Aminokwas	Odsetek zmian (%)	Liczba zmian
Seryna	60	28
Kwas asparaginowy	38	18
Asparagina	2	1



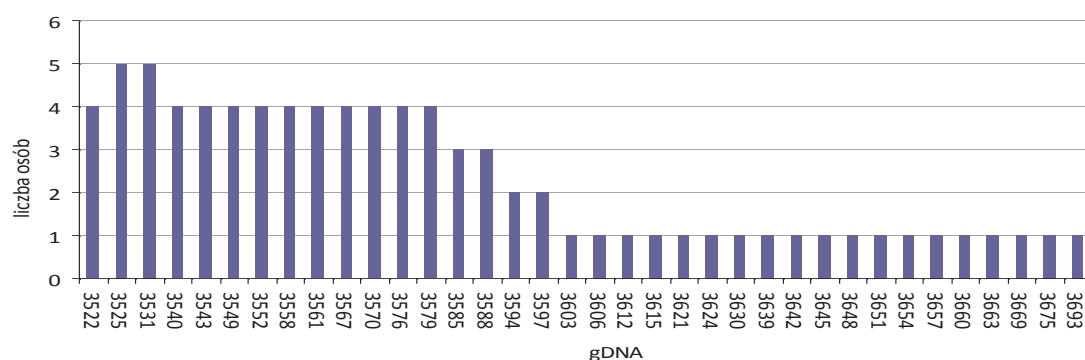
Rycina 16. Odsetek zmian polimorficznych typu SNP przypadających na aminokwas Ser, Asp, Asn w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP.

6.3.2 Zmiany ilościowe w sekwencji kodującej białko DPP (insercje/delecje)

Analiza sekwencji kodującej białko DPP wykazała u 7 probantów zmiany o charakterze ilościowym. U 2 osób odnotowano insercje 18 nukleotydów w pozycji g.2086. U 4 osób stwierdzono delecję rozpoczynającą się od pozycji g.3522, w której doszło do utraty odpowiednio 75, 171, 66 oraz 57 nukleotydów. U jednego probanta delecja 9 nukleotydów rozpoczynała się w pozycji g.3525 (rycina 17, 18). Wszystkie zmiany ilościowe były podzielne przez 3 i nie powodowały przesunięcia ramki odczytu.



Rycina 17. Liczba dodanych i usuniętych nukleotydów u poszczególnych probantów, u których wystąpiła zmiana ilościowa w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP.



Rycina 18. Liczba probantów z delecją w sekwencji genu *DSPP*.

6.4 Mutacje w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP

Analiza sekwencji kodującej białko DPP wykazała obecność 10 mutacji punktowych w pozycjach: g.3568, g.3598, g.3615, g.3622, g.3710, g.3714, g.3728, g.3732, g.3768, g.3805. Jednocześnie, szczegółowa analiza wykazała, iż każda z mutacji pojawiła się w pojedynczym allelu, natomiast u żadnego probanta nie stwierdzono tej samej mutacji w obu allelach.

6.4.1 Mutacje w pierwszym nukleotydzie kodonów w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP

Dokonana analiza sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP wykazała, iż mutacje pierwszego nukleotydu w kodonach wystąpiły w 4 przypadkach i zlokalizowane były w pozycjach: g.3568, g.3598, g.3622 i g.3805. W pozycjach g.3568 oraz g.3622 mutacja miała charakter tranzycji, odpowiednio A → G oraz G → A, natomiast w pozycjach g. 3598 oraz g.3805 wystąpiła transwersja puryny w pirymidynę A → T (tabela 19).

Tabela 19. Mutacja pierwszego nukleotydu w kodonie w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP; A – allel referencyjny, B – allel zmutowany; *brak doniesień dotyczących polimorfizmu w danej lokalizacji w bazie Ensembl.

gDNA	Zamiana nukleotydu	Zamiana aminokwasu	Liczba alleli A	Liczba alleli B	% A	% B	Liczba probantów
3568	AAT → GAT	Asn → Asp	41	11	68	18	11
3598*	AGC → TGC	Ser → Cys	38	20	63	33	20
3622*	GAT → AAT	Asp → Asn	44	14	73	23	14
3805*	AGC → TGC	Ser → Cys	37	23	62	38	23

W pozycji g.3568 zamianie uległa A → G, co skutkowało zamianą kodonu AAT kodującego Asn w kodon GAT kodujący Asp. Mutację tę zaobserwowano u 11 probantów (11 alleli), co stanowiło 18% wszystkich przebadanych alleli.

W lokalizacji g.3598 kodon AGC kodujący Ser został zamieniony na kodon TGC (A → T) kodujący Cys. Mutacja dotyczyła 33% alleli u 20 probantów (20 alleli). Kolejno w lokalizacji g.3622 doszło do mutacji G → A u 14 osób. W konsekwencji zamiast Asp (GAT) zakodowany został Asn (AAT). Mutacja dotyczyła 23% czyli 14 alleli. Ostatnia mutacja pierwszego nukleotydu w kodonie pojawiła się u 23 osób w pozycji g.3805 i polegała na zmianie A → T (AGC → TGC). Transwersja poskutkowała zamianą Ser w Cys. Odsetek zmienionych alleli wyniósł 38% (23 allele) (tabela 19, rycina 19).

6.4.2 Mutacje w drugim nukleotydzie kodonów w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP

Zamiana drugiego nukleotydu w kodonach kodujących sekwencję białka DPP wystąpiła w 2 pozycjach g.3710 i g.3728 (tabela 20).

Tabela 20. Mutacja drugiego nukleotydu w kodonie w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP; A – allel referencyjny, B – allel zmutowany; *brak doniesień dotyczących polimorfizmu w danej lokalizacji w bazie Ensembl.

gDNA	Zamiana nukleotydu w kodonie	Zamiana aminokwasu	Liczba alleliA	Liczba alleliB	% A	% B	Liczba probantów
3710*	AGC → AAC	Ser →Asn	56	4	93	7	4
3728	AAT → AGT	Asn →Ser	56	4	93	7	4

U 4 probantów w pozycji g.3710 kodon AGC został zamieniony na AAC, co skutkowało zamianą Ser w Asn. Odsetek zmienionych alleli wynosił 7% (4 allele). Również u 4 probantów wykryto zmianę A → G w pozycji g.3728. Efektem powyższej tranzycji była zamiana AAT → AGT, a tym samym zamiana Asn w Ser. Podobnie jak w poprzednim przypadku odsetek zmienionych alleli wynosił 7% (tabela 20, rycina 19).

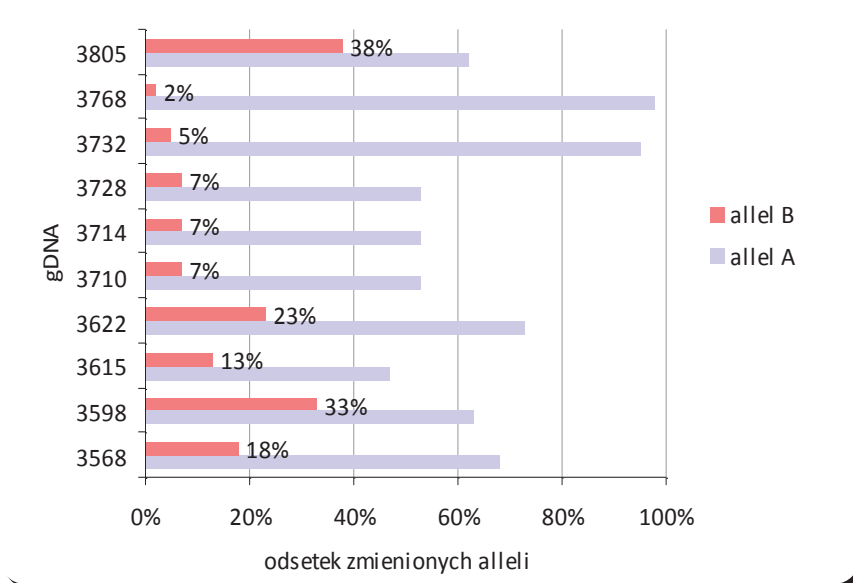
6.4.3 Mutacje w trzecim nukleotydzie kodonów w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP

Zmiany kodu genetycznego skutkujące powstaniem mutacji zlokalizowane w 3 pozycji w kodonie sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP zaobserwowano w 4 pozycjach: g.3615, g.3714, g.3732 oraz g.3768 (tabela 21). Wszystkie mutacje miały charakter transwersji.

Tabela 21. Mutacja trzeciego nukleotydu w kodonie w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP; A – allel referencyjny, B – allel zmutowany; *brak doniesień dotyczących polimorfizmu w danej lokalizacji w bazie Ensembl.

gDNA	Zamiana nukleotydu	Zamiana aminokwasu	Liczba alleli A	Liczba alleli B	% A	% B	Liczba probantów
3615*	GAC → GAA	Asp → Glu	50	8	83	13	8
3714*	GAC → GAA	Asp → Glu	56	4	93	7	4
3732	GAA → GAC	Glu → Asp	57	3	95	5	3
3768*	GAC → GAA	Asp → Glu	59	1	98	2	1

Analiza sekwencji genu *DSPP* w pozycji g.3615, g.3714 oraz g.3768 wykazała zmianę C → A, co skutkowało zmianą Asp w Glu. Odsetek zmienionych alleli wynosił odpowiednio dla g.3615 – 13% (8 alleli), dla g.3714 – 7% (4 allele), a dla g.3768 – 2% (1 allel). Natomiast w lokalizacji g.3732 u 3 probantów wykazano transwersję A → C, skutkującą zamianą Glu w Asp. Odsetek zmutowanych alleli wyniósł 5% (3 allele) (tabela 21, rycina 19).



Rycina 19. Odsetek alleli referencyjnych (allel A) i alleli zmutowanych (allel B) w pozycjach: 3568, g.3598, g.3615, g.3622, g.3710, g.3714, g.3728, g.3732, g.3768, g.3805, sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP.

6.5 Wyniki analizy statystycznej: zmiany dotyczące probantów (statystyka opisowa)

6.5.1 Allele bez zmian

Analiza statystyczna wykazała, że w badanej zbiorowości połowa probantów miała nie mniej niż 99% alleli z sekwencją referencyjną, 25% probantów miała, co najwyżej 90% alleli z sekwencją referencyjną, a 75% probantów miała, co najwyżej 104 allele bez zmian. Minimalna liczba alleli z sekwencją referencyjną u probanta wynosiła 61, natomiast maksymalna 117 (tabela 22).

Tabela 22. Liczba alleli bez zmian wśród 30 przebadanych probantów.

Probandzi	Allele bez zmian	Probandzi	Allele bez zmian
1	88	15	101
2	101	16	104
3	98	17	110
4	99	18	99
5	89	19	88
6	109	20	99
7	93	21	90
8	98	22	99
9	91	23	109
10	94	24	104
11	102	25	61
12	104	26	115
13	86	27	103
14	92	28	68
15	101	29	79
16	104	30	117

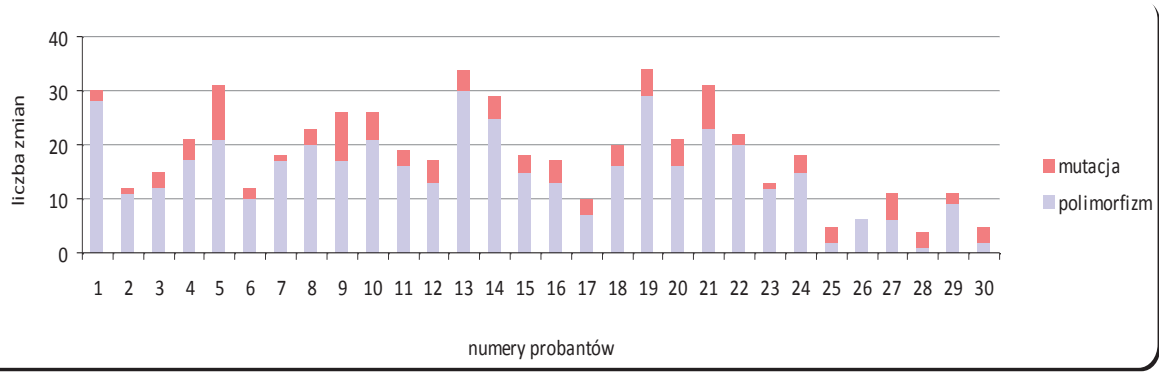
6.5.2 Polimorfizm i mutacja

W badanej zbiorowości 30 osób połowa probantów miała nie mniej niż 16 alleli z sekwencją polimorficzną, 25% probantów miała, co najwyżej 10 alleli z sekwencją polimorficzną, a 75% probantów miała co najwyżej 20 alleli z sekwencją polimorficzną. Minimalna liczba alleli z sekwencją polimorficzną u jednego probanta wynosiła 1, natomiast maksymalna 30 (tabela 23, rycina 20).

W badanej zbiorowości 30 osób połowa probantów miała nie mniej niż 3 mutacje, 25% probantów miała, co najwyżej 2 mutacje, a 75% probantów miała, co najwyżej 4 mutacje. Minimalna liczba mutacji u probanta wynosiła 0, natomiast maksymalna 10 (tabela 23, rycina 20).

Tabela 23. Liczba zmian o charakterze polimorfizmu oraz mutacji u 30 probantów.

Probanci	Polimorfizm	Mutacja	Probanci	Polimorfizm	Mutacja
1	28	2	16	13	4
2	11	1	17	7	3
3	12	3	18	16	4
4	17	4	19	29	5
5	21	10	20	16	5
6	10	2	21	23	8
7	17	1	22	20	2
8	20	3	23	12	1
9	17	9	24	15	3
10	21	5	25	2	3
11	16	3	26	6	0
12	13	4	27	6	5
13	30	4	28	1	3
14	25	4	29	9	2
15	15	3	30	2	3



Rycina 20. Liczba zmian o charakterze polimorfizmu oraz mutacji u 30 probantów

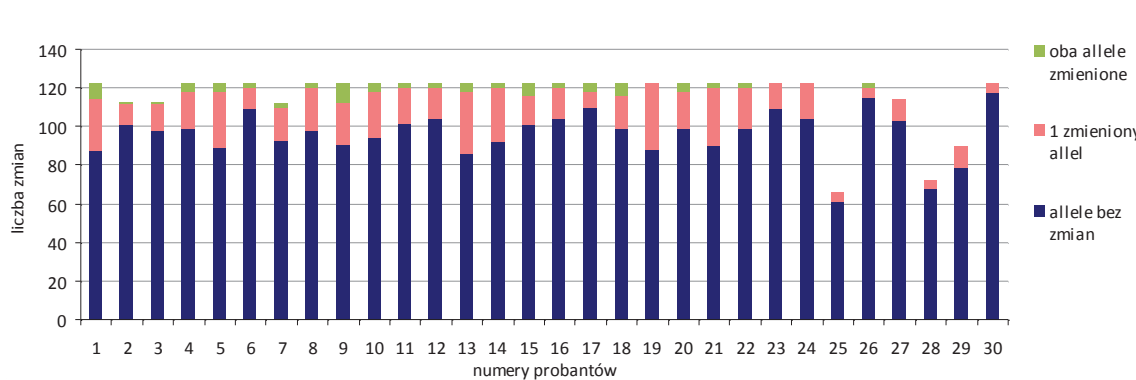
6.5.3. Analiza liczby zmian w pojedynczym allelu versus obydwu allelach w badanej zbiorowości

W badanej zbiorowości połowa probantów miała zmienioną sekwencję w pojedynczym allelu nie mniej niż w 17 pozycjach, u 25% probantów było to najwyżej 11 pozycji, a u 75% probantów 1 allel ze zmienioną sekwencją występował co najwyżej w 22 pozycjach. Minimalna liczba pozycji, w których wystąpił 1 allel ze zmienioną sekwencją u pojedynczego probanta wynosiła 4, natomiast maksymalna 34 (tabela 24, rycina 21).

W badanej u połowy probantów wystąpiła jednoczesna zamiana sekwencji w dwóch allelach nie rzadziej niż w 2 pozycjach. U 25% probantów zamiana taka w ogóle nie wystąpiła, podczas gdy u 75% probantów jednoczesna zamiana sekwencji w dwóch allelach miała miejsce co najwyżej w 4 pozycjach. Minimalna liczba pozycji z dwoma allelami o zmienionej sekwencji u probanta wynosiła 0, natomiast maksymalna 10 (tabela 24, rycina 21).

Tabela 24. Liczba pozycji w sekwencji genu *DSPP*, w których wystąpiła zamiana sekwencji typu SNP w 1 i/lub 2 allelach jednocześnie u 30 przebadanych probantów.

Probant	1 zmieniony allel	2 zmienione allele	Probant	1 zmieniony allel	2 zmienione allele
1	26	8	16	16	2
2	11	1	17	8	4
3	14	1	18	17	6
4	19	4	19	34	0
5	29	4	20	19	4
6	11	2	21	30	2
7	17	2	22	21	2
8	22	2	23	13	0
9	21	10	24	18	0
10	24	4	25	5	0
11	18	2	26	5	2
12	16	2	27	11	0
13	32	4	28	4	0
14	28	2	29	11	0
15	15	6	30	5	0



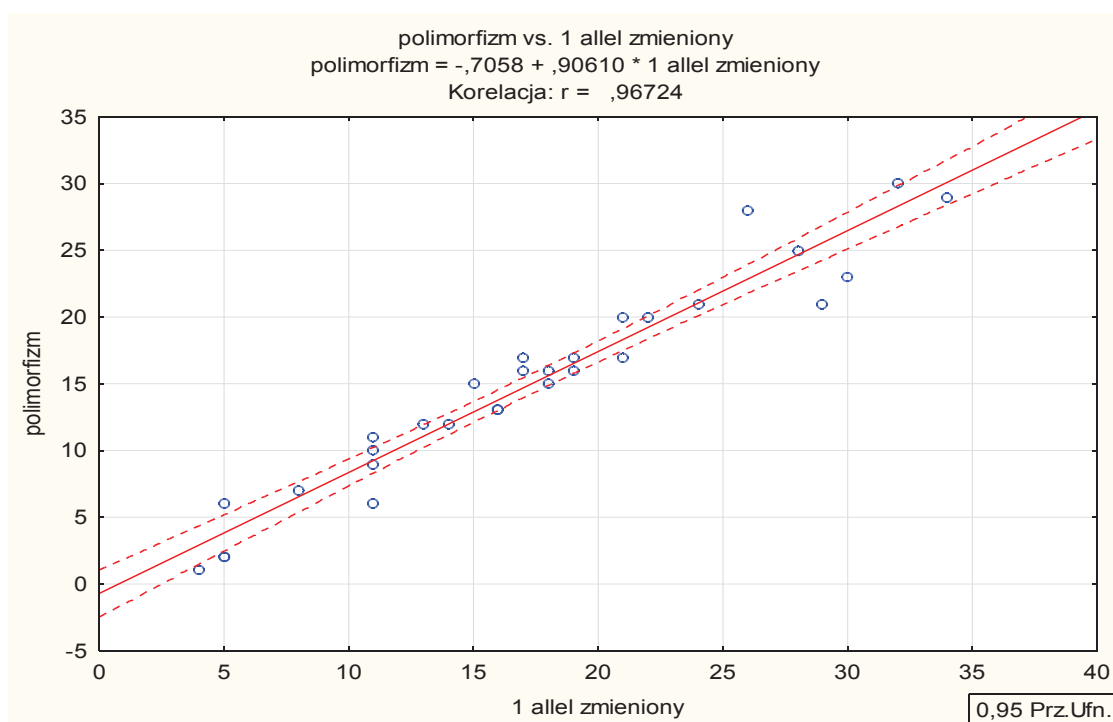
Rycina 21. Liczba zmian w allelach w badanej grupie.

6.6 Wyniki analizy statystycznej dotyczącej zależności między wystąpieniem polimorfizmu/mutacji przy zmienionym 1 allelu lub przy 2 zmienionych allelach

Analiza statystyczna zależności między liczbą zmienionych alleli, a wystąpieniem zmian polimorficznych i/lub mutacji prowadzono z zastosowaniem testu istotności współczynnika korelacji liniowej Pearsona

6.6.1 Zależność wystąpienia polimorfizmu przy zamianie sekwencji 1 allela

Analizując w grupie 30 osób korelację między polimorfizmem, a 1 allelem polimorficznym za pomocą współczynnika korelacji r-Pearsona ($r = 0,967$) uzyskano wynik wskazujący na obecność bardzo silnej zależności liniowej. Zależność ta jest statystycznie istotna przy $p < 0,001$, ponieważ $t_e(28) = 20,16 > t_{0,001}(28) = 3,674$ po zastosowaniu testu statystycznego (Rycina 22).



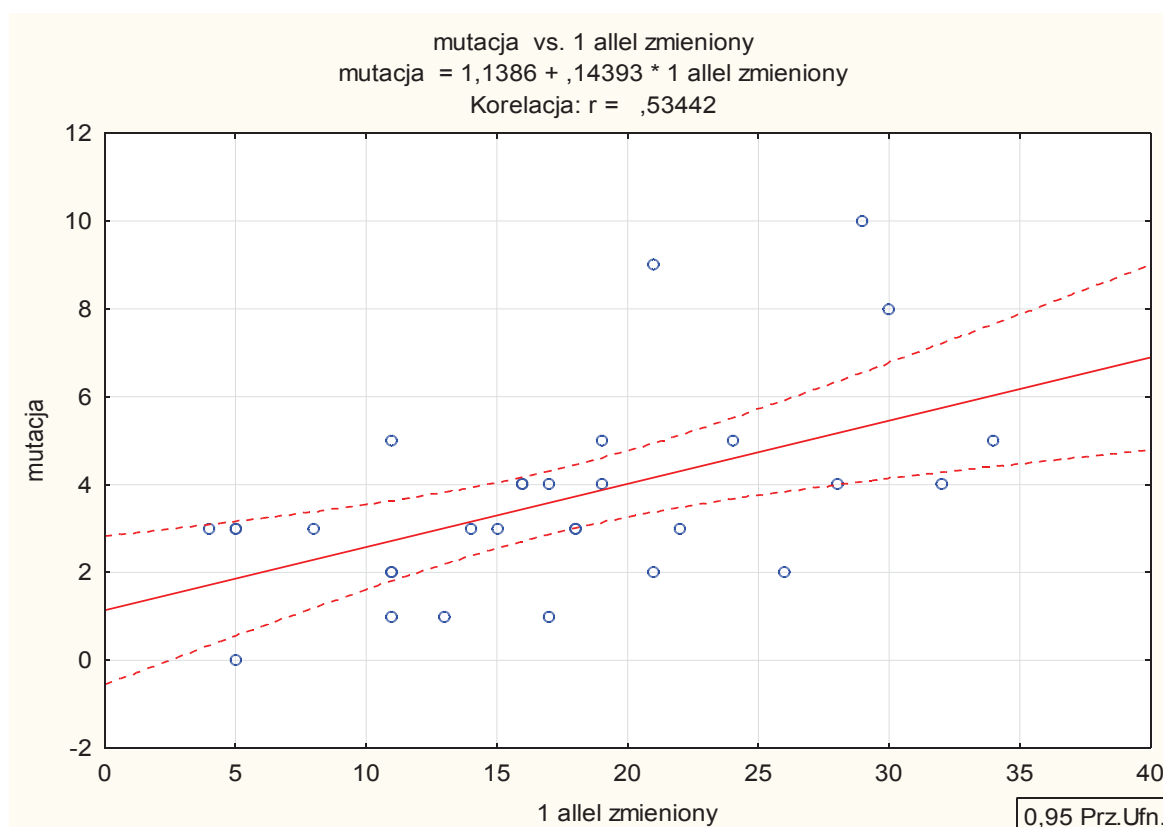
Rycina 22. Zależność wystąpienia polimorfizmu przy zamianie sekwencji 1 allela

Współczynnik determinacji $r^2 = 0,93$ świadczy o dobrym dopasowaniu funkcji regresji do danych empirycznych (93%).

Tylko niecałe 7% zmian o charakterze polimorfizmu nie zostało spowodowane przez zmianę 1 allele.

6.6.2 Zależność wystąpienia mutacji przy zamianie sekwencji 1 allele

Badając zależność pomiędzy wystąpieniem mutacji przy 1 zmienionym allele wyniki współczynnika korelacji r-Pearsona ($r = 0,53$) wykazał istnienie umiarkowanej zależności liniowej. Wartość testu dla współczynnika korelacji $t_e(28) = 3,346$ przy $p = 0,002348$ wykazał zależność istotną statystycznie przy $p < 0,001$ (Rycina 23).



Rycina 23. Zależność wystąpienia mutacji przy zamianie sekwencji 1 allele.

Współczynnik determinacji $r^2 = 0,286$ oznacza, że około 30% mutacji zostało spowodowane poprzez zmianę 1 allele.

7. DYSKUSJA

Analiza sekwencji genu *DSPP* wykonana u 30 probantów z przebadanej grupy wykazała obecność polimorfizmu ilościowego i jakościowego oraz mutacji zarówno w sekwencji kodującej białko DSP, DPP jak i w rejonie niekodującym 3' (UTR 3'). Natomiast nie wykazano żadnych zmian w sekwencji peptydu sygnałowego, która całkowicie pokrywała się z sekwencją referencyjną ludzkiego genomu zawartą w bazie Ensembl. Inni autorzy badań przeprowadzonych u osób, u których doszło do powstania fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II/III bądź dysplazji zębiny podają, iż zmiany o charakterze mutacji zaobserwowano głównie w eksonie 2, 3 lub 4 kodującym białko DSP [141,142] oraz eksonie 5 kodującym białko DPP [60,141], natomiast peptyd sygnalizacyjny pozostawał genetycznie stabilny. Te dane wydają się zgodne z poczynionymi obserwacjami własnymi.

W sekwencji kodującej białko DSP wykryto jedną zmianę o charakterze SNP oraz jedną mutację. Odnotowany w pozycji g.930 polimorfizm dotyczył ostatniego nukleotydu w kodonie i nie skutkował zamianą kodowania aminokwasu, gdyż zarówno kodon TCA, jak i kodon TCG kodują aminokwas serynę. Zaobserwowana tranzycja A → G została również odnotowana w bazie Ensembl, w której określono częstotliwość wystąpienia zamiany w populacji rasy kaukaskiej na 66%, natomiast w grupie badanej z obecnego doświadczenia tranzycji uległo 27 alleli z czego u 8 probantów odnotowano po dwa allele polimorficzne, a u 11 osób jeden allel polimorficzny i jeden z sekwencją referencyjną, co daje 45% alleli zmienionych. Dalsza analiza sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DSP, wykazała również obecność mutacji w pozycji g.235, która polegała na transwersji A → T i skutkowała zamianą aminokwasu Arg w Trp. Ta sama mutacja wystąpiła u dwóch spośród 30 przebadanych osób. Stwierdzono, że obaj probanci byli heterozygotami czyli posiadali jeden allel polimorficzny T oraz jeden allel z sekwencją referencyjną A. Po porównaniu z bazą Ensembl okazało się, że mutacja Arg59Trp została odnotowana jako forma polimorfizmu, gdyż nie skutkuje pojawieniem się fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II/III bądź dysplazją zębiny. Dane Ensembl dotyczące rasy kaukaskiej wskazują, że w pozycji g.235 sekwencji genu *DSPP* allele z sekwencją A stanowią 91%, natomiast sekwencja T występuje u 9% badanych.

Zastanawiającym jest brak fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II/III bądź dysplazją zębiny u probantów z mutacją Arg59Trp. W dostępnym piśmiennictwie opisane zostały jedynie dwie mutacje dotyczące sekwencji kodującej białko DSP, jednak te mutacje zlokalizowane były w pozycjach g.133 oraz g.135 i skutkowały fenotypem DGI II/III bądź DD [60, 76, 142, 143]. W kodonie 45 tranzycja C → T prowadziła do powstania kodonu stop, co powodowało wytworzenie skróconego białka DSP na skutek przedwczesnego zahamowania translacji. Natomiast mutacja w kodonie 46 polegała na zamianie G → A, co powodowało zmianę sekwencji determinującej składanie eksonów z następczym wypadnięciem eksonu 3 [76]. Identyczna mutacja została opisana przez McKnight i wsp [60]. Fakt, iż w obecnych badaniach u żadnej z przebadanych 30 osób nie stwierdzono ani jednej cechy DGI II/III i/lub DD, świadczy, że mutacja w pozycji g.235 nie jest kluczowa dla funkcjonalności białka DSP, które bierze udział w mineralizacji zębiny jedynie w bardzo wczesnych etapach dentinogenezy [66, 67].

Kontrowersje dotyczące braku fenotypu w przypadku wykrycia mutacji genetycznej pojawiają się również w kontekście innych wad genetycznych, w tym mutacji w genie *MECP2* w pozycjach: c.1282 G → C, c.1196 C → T oraz c.590 C → T odpowiedzialnych za powstawanie zespołu Rett'a [144, 145, 146]. Autorzy zajmujący się mutacjami w genie *MECP2* podnoszą kwestę pojawiającą się również w obecnych badaniach, a dotyczącą faktu obecności lub braku fenotypu, w tym przypadku zespołu Rett'a, u probantów z potwierdzoną mutacją w „genie przyczynowym”. Ci sami autorzy sugerują, że nowo wykryta mutacja każdorazowo może stanowić rzadką, „niepatogenną” odmianę polimorfizmu specyficznego dla danej populacji [147]. Podkreślają również konieczność prowadzenia szerokich badań populacyjnych mających wyjaśnić istotność danej mutacji [144].

Opisywana w bieżącej pracy analiza sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP również wykazała obecność polimorfizmu typu SNP, delecji i insercji, a także 10 mutacji punktowych.

Zmiany SNP o charakterze tranzycji pomiędzy pirymidynami zaobserwowano u wszystkich 30 przebadanych osób. W badanej grupie tranzycja C → T zachodziła aż w 19 różnych pozycjach w sekwencji genu *DSPP* kodującej białko DPP i skutkowała zamianą kodonu AGC w kodon AGT.

W tych przypadkach brak fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II/III oraz dysplazji zębiny wydaje się oczywisty przez wzgląd na fakt, iż obie sekwencje kodonów kodują aminokwas serynę. Ciekawym pozostaje fakt, iż w 13 pozycjach ocenianych sekwencji tj. g.3504, g.3522, g.3549, g.3567, g.3585, g.3612, g.3621, g.3630, g.3654, g.3663, g.3693, g.3711, g.3756 wystąpił „nowy” polimorfizm, nie odnotowany w bazie Ensembl. W pozostałych 6 pozycjach: g.2004, g.3531, g.3540, g.3639, g.3675, g.3738 wykazano dane zbliżone do uzyskanych w grupie badanej. Przykładem są wyniki z pozycji g.2004, i g.3639, w których odsetek wystąpienia zamiany w populacji rasy kaukaskiej wynosił odpowiednio 27% i 65%, natomiast w omawianej grupie tranzykcji uległo odpowiednio 22% (13) (g.2004) i 58% (35) (g.3639) alleli z czego u 3 probantów w pozycji g.2004 i u 9 probantów w pozycji g.3639 odnotowano po dwa allele polimorficzne, a u 7 probantów w pozycji g.2004 i 17 probantów w pozycji g.3639 jeden allel polimorficzny i jeden z sekwencją referencyjną. Obecność tak częstych zmian w kodonach kodujących serynę tłumaczyć należy obecnością w 3' końcowym genu *DSPP* około 200, 9-nukleotydowych powtórzeń kodujących sekwencję Ser-Ser-Asp. Zatem liczba sekwencji polimorficznych w genie *DSPP* rozkłada się proporcjonalnie do liczby kodonów Ser, co można zaobserwować liczbą zanotowanych tranzykcji T → C w kolejnych kodonach AGT → AGC również kodujących serynę.

Kolejno zaobserwowano 9 zmian tego typu. W pozycji g.3513 u 8 osób doszło to zmiany w obrębie 1 allele, co stanowi 13% (8) alleli polimorficznych, natomiast pozostałe 22 osoby posiadały sekwencję zgodną z sekwencją referencyjną. Zamiana T → C w wymienionej pozycji g.3513 nie została jak dotąd zgłoszona do bazy Ensembl, co może sugerować, że jest to polimorfizm specyficzny dla populacji z danego regionu. Z kolei w 8 pozostałych przypadkach nie wyróżnia się istotnych odchyień od odsetka alleli polimorficznych i referencyjnych zgłoszonych do bazy Ensembl przez innych badaczy. Spośród wszystkich 47 zmian polimorficznych typu SNP wykrytych w trakcie obecnej analizy sekwencji genu *DSPP*, 60% stanowiło zmiany dotyczące kodonów kodujących serynę. Pozostałe, 38% dotyczyło zmian w kodonach kodujących kwas asparaginowy natomiast jedynie 2% było w kodonach kodujących asparaginę. Te wyniki są zgodne z obserwacjami innych autorów, z których wynika, że polimorfizm genu *DSPP* dotyczy w głównej mierze repetytywnych sekwencji Ser-Ser-Asp z 3' końcowego [60, 139].

Stąd w omawianych badaniach proporcjonalnie mniejsza liczba zmian typu SNP została zlokalizowana w kodonach kodujących kwas asparaginowy i asparaginę.

Prowadzona analiza kodonów kodujących Asp również wykazała obecność głównie tranzykcji pirymidyn. Polimorfizm typu SNP dotyczący kodonów kodujących kwas asparaginowy dotyczył, podobnie jak w wielu przypadkach kodonów seryny, ostatniego z trzech nukleotydów. Odnotowano 9 zamian $T \rightarrow C$ w kodonie $GAT \rightarrow GAC$ oraz 9 zamian $C \rightarrow T$ w kodonie $GAC \rightarrow GAT$. W pierwszym przypadku, w którym doszło do tranzykcji $T \rightarrow C$ wykryto 3 zmiany w pozycjach g.3525, g.3552 oraz g.3759, które nie zostały odnotowane w bazie Ensembl wobec czego podobnie jak to miało miejsce w przypadku polimorfizmu w kodonach Ser wnioskować należy, że występujące z częstotliwością odpowiednio: 23%, 28% oraz 2% tranzykcje $T \rightarrow C$ w pozycjach g.3525, g.3552 oraz g.3759 mogą mieć charakter lokalnego polimorfizmu związanego z badaną populacją. Sugestia ta wydaje się tym bardziej słuszna, że jak dotąd na terenie Polski nie były prowadzone żadne badania molekularne mające na celu skanowanie sekwencji genu *DSPP* w polskiej populacji, co nie pozwala na analizę porównawczą, gdyż bieżące doniesienie stanowi pierwsze tego typu. W bazie Ensembl odnotowano natomiast tranzykcje zlokalizowane w pozycjach: g.3507, g.3579, g.3597, g.3624, g.3642, g.3651, w których odsetek alleli polimorficznych oraz alleli referencyjnych był zbliżony do wartości obliczonej zarówno dla populacji europejskiej, jak i ogólnoświatowej.

Kolejno odnotowany polimorfizm o charakterze tranzykcji $C \rightarrow T$ wystąpił w 9 pozycjach sekwencji kodującej białko DPP, z czego tylko 4 były podane w bazie Ensembl. Pozostałych 5 stanowiło zmiany nowo wykryte w badanej grupie. Zamiany $GAC \rightarrow GAT$ charakteryzowały się niewielkim odsetkiem alleli polimorficznych z czego można wnioskować, że jest to „nowa” wariacja w sekwencji genu *DSPP*. Maksymalnie odsetek zmian wynosił 12% – 13% w pozycjach g.3360 i g.3588, natomiast minimalnie 3% w pozycjach g.3543, g.3615 oraz g.3669.

Ciekawym pozostaje fakt pojawienia się jedynie pojedynczej tranzykcji $T \rightarrow C$ w sekwencji genu *DSPP* w kodonie kodującym asparaginę. Tranzykcja $AAT \rightarrow AAC$ wystąpiła u 17 osób w pojedynczym allelu, a u 9 osób zmiana dotyczyła obu alleli, co stanowiło odpowiednio 28% (17 alleli) zmienionych i 58% (35) alleli zgodnych z sekwencją referencyjną.

Wytłumaczenie braku powstania fenotypu u osób, u których stwierdziliśmy zmiany typu SNP, w sekwencjach kodujących białko DSP oraz DPP jest stosunkowo łatwe biorąc pod uwagę „degenerację” kodu genetycznego, gdzie zmiana ostatniego nukleotydu w kodonie, w większości przypadków nie skutkuje zmianą kodowania aminokwasu. Wyjątek stanowią dwa aminokwasy: metionina i tryptofan, które kodowane są przez wybiórcze kodony odpowiednio ATG i TGG. W dokładnie przeprowadzonej analizie sekwencji genu *DSPP* u 30 badanych probantów odnotowano 48 pozycji, w których doszło do zmiany trzeciego nukleotydu w kodonie, z czego jedna dotyczyła sekwencji kodującej białko DSP, pozostałe dotyczyły sekwencji DPP.

Gen kodujący białko sialofosforowe zębiny liczy 8343 pary zasad i składa się z 5 eksonów oraz 4 intronów. Sekwencja białka DSP kodowana jest w eksonach: 2 (pierwsze trzy aminokwasy), 3, 4 oraz w niewielkiej ilości w eksonie 5. Cała sekwencja białka DPP kodowana jest natomiast w eksonie 5, który to ekson, jak potwierdziły badania na grupie 30 osób oraz liczne badania innych autorów, wykazują wysoki stopień polimorfizmu [60, 137, 138]. Objawia się to faktem istnienia licznych odmienności zarówno o charakterze SNP, jak i insercji oraz delecji, bez przesunięcia ramki odczytu.

W przeanalizowanej grupie badanych osób na uwagę zasługuje również fakt wystąpienia 7 zmian o charakterze ilościowym, insercji oraz delecji. Podobnie, jak wynika z innych doniesień [138, 149], odnotowane zmiany wystąpiły w sekwencji kodującej białko DPP, w rejonie repetytywnych powtórzeń sekwencji Ser-Ser-Asp. Spośród 30 osób, u pięciu doszło do delecji, natomiast u dwóch do insercji. Największa liczba utraconych par zasad wynosiła 171, a najmniejsza 9. W pozostałych przypadkach było to odpowiednio: – 75;– 66 oraz – 57 par zasad. W tym rejonie genu, w odniesieniu do piśmiennictwa zagranicznego, może dochodzić do utraty nawet 225 par zasad [139]. Oprócz delecji, w rejonie kodującym białko DPP odnotowano także dwie insercje po 18 nukleotydów u każdego z badanych. Zarówno omawiane delecje, jak i insercje dotyczyły całych kodonów, przez co nie dochodziło do przesunięcia ramki odczytu, skutkowało natomiast, skróceniem bądź wydłużeniem kodowanego białka o kolejne 9 aminokwasów w repetytywnej sekwencji Ser-Ser-Asp, co najwyraźniej w żaden sposób nie wpływa na funkcjonalność białka DPP u człowieka i wydaje się słusznym przypuszczeniem, w kontekście dużej zmienności długości odcinka Ser-Ser-Asp u innych gatunków [150].

Ostatnim, a zarazem najciekawszym typem zmian zaobserwowanych w obecnym doświadczeniu, była potwierdzona obecność 11 mutacji punktowych w badanych sekwencjach genu *DSPP*. Trzykrotnie powtarzana analiza wykazała, że każdy nosiciel mutacji był heterozygotą. Pomimo, iż mutacjom ulegały nukleotydy pierwszy, drugi lub trzeci w kodonie, za każdym razem odnotowano zamianę kodowanego aminokwasu.

Analiza porównawcza z bazą Ensembl wykazała, iż tylko jedna z odnotowanych mutacji występowała w bazie Ensembl, reszta wydaje się być mutacjami specyficznymi dla badanej populacji. Zgłoszona do bazy Ensembl mutacja w pozycji g.3568, skutkuje zamianą kodonu AAT → GAT (Asn → Asp). Pomimo braku cech klinicznych *dentinogenesis imperfecta* typu II/III oraz dysplazji zębiny stwierdziliśmy, że mutacja AAT → GAT wystąpiła u 11 spośród 30 przebadanych probantów. Ponadto, potwierdzono, że wszyscy probanci byli heterozygotami posiadając jeden allel zmutowany G oraz jeden allel z sekwencją referencyjną A. Po porównaniu z bazą Ensembl okazało się, że mutacja Asn1180Asp została odnotowana jako rzadka forma polimorfizmu, nieskutkująca pojawieniem się fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II/III bądź dysplazją zębiny, co najprawdopodobniej wiąże się z faktem, iż aminokwasy Asn i Asp poza ładunkiem elektrycznym nie różnią się znacząco, a także faktem lokalizacji mutacji w sekwencji białka DPP, która nie wpływa na znaczącą zmianę konformacji przestrzennej białka DPP, gdyż reszty Pse oraz Asp w 3' końcowym białka DPP umiejscowione są na zewnątrz łańcucha białkowego [90]. Do zakwalifikowania mutacji Asn1180Asp do grupy polimorfizmu przyczynia się również fakt częstości pojawiania się tej zmiany w badanej populacji, gdyż w tzw. wątpliwych przypadkach stosuje się kryterium częstości występowania zmienności genetycznej [147], której próg określono na 1%.

Kolejne, trzy mutacje: Ser1189Cys, Ser1258Cys oraz Asp1198Asn w sekwencji kodującej białko DPP wykazano odpowiednio u 20, 23 i 14 osób, a odsetek alleli zmienionych wynosił kolejno 33%, 38% oraz 23%.

Mutacje w drugim nukleotydzie w kodonach Ser1226Asn oraz Asn1232Ser w sekwencji białka DPP wystąpiły u 4 osób z czego tylko ta druga została odnotowana w bazie Ensembl. Odsetek zmienionych alleli w obu przypadkach wynosił 7% – 4 allele, co przy przekroczeniu progu 1% występowania dla badanej populacji również pozwala na zakwalifikowanie tych mutacji jako formy miejscowego polimorfizmu.

Ostatnie zarejestrowane zmiany kodu genetycznego skutkujące powstaniem mutacji dotyczyły 4 pozycji sekwencji kodującej białko DPP i polegały na transwersji ostatniego nukleotydu w kodonie. Trzech z nich Asp1194Glu, Asp1227Glu oraz Asp1245Glu nie odnotowanych w bazie Ensembl. Mutacje polegały na zamianie kodonu GAC → GAA. Odsetek zmienionych alleli wynosił odpowiednio: 13% (8 alleli), 7% (4 allele) oraz 2% (1 allel). W lokalizacji g.3732 transwersja A → C poskutkowała zmianą Glu → Asn. Mutację potwierdzono u 3 probantów, gdzie odsetek zmutowanych alleli wyniósł 5% (3allele). W bazie Ensembl zmiana g.3732 jest również odnotowana, jednak nie są podane wartości pozwalające do przeprowadzenia analizy porównawczej.

Pomimo intensywnie prowadzonych badań klinicznych, skorelowanych ze szczegółową analizą molekularną, na chwilę obecną nie zostało do końca wyjaśnione, dlaczego mutacja o charakterze zmiany sensu u niektórych pacjentów powoduje pojawienie się cech klinicznych DGI II/III bądź DD, natomiast u innych nie stwierdza się jakichkolwiek cech klinicznych wady genetycznej. Przypuszcza się, że najbardziej istotną przyczyną jest wpływ mutacji na zmiany w budowie i funkcjonowaniu kodowanego białka. Niebagatelne znaczenia może mieć również wymagana aktywność białka *in-situ*. Istnieją doniesienia potwierdzające, iż w niektórych przypadkach wystarczy 10% prawidłowego mRNA dla supresji defektu genu [147]. W badaniach, przeprowadzonych przez von Marschall i Fisher'a [150] przedstawiono dowody na to, że mutacje w sekwencji genu *DSPP*, które skutkują fenotypem *dentinogenesis imperfecta* typu II lub III bądź dysplazją zębiny, powodują zatrzymanie zmutowanego białka wewnątrz szorstkiego reticulum endoplazmatycznego (rER), na skutek nieprawidłowego łączenia białka z receptorem IPV, a w konsekwencji zahamowaniem transportu białka poza rER, brakiem modyfikacji potranslacyjnych i wydzielania białka do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. W takich przypadkach dochodzi do całkowitego niedoboru pochodnych białka DSPP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Jednak według autorów ta ewentualność pojawia się jedynie w przypadku mutacji w sekwencji kodującej peptyd sygnalizacyjny oraz pierwsze 3 aminokwasy odpowiedzialne za odcięcie peptydu [150]. Drugą możliwością przedstawioną przez autorów jest mutacja skutkująca przesunięciem ramki odczytu występująca w domenach hydrofobowych, która powoduje zakotwiczenie zmutowanego białka DSPP w błonie rER. Również w tej sytuacji nie dochodzi do modyfikacji potranslacyjnych białka

DSPP oraz nie jest ono transportowane do macierzy zewnątrzkomórkowej, natomiast ulega natychmiastowej degradacji w cytoplazmie odontoblasta [147].

Brak powstania fenotypu w badanej grupie można wytłumaczyć dwojako. Po pierwsze wszystkie przebadane osoby były heterozygotami, w związku z czym posiadały jeden allel zmutowany oraz jeden allel z sekwencją referencyjną. Można stąd wywnioskować, że ilość białka wytworzona z niezmienionego allela była wystarczająca dla prawidłowego formowania i mineralizacji zębiny, co również potwierdzają badania innych autorów [60, 150]. Po drugie, fakt odnotowania u niektórych osób mutacji może świadczyć o tym, że istniała u tych probantów w uzębieniu mlecznym szczątkowa forma dysplazji zębiny, o której nie dowiedzieliśmy się podczas szczegółowego wywiadu, a tym samym po zakończeniu wymiany uzębienia na stałe nie mamy możliwości sprawdzenia powyższej hipotezy.

Mutacje w obszarze kodującym białko DPP najczęściej skutkują powstaniem zmian fenotypowych [137, 138, 139]. Należy jednak uwzględnić fakt, iż u naszych probantów mutacje w genie *DSPP* występowały w kodonach końcowych sekwencji tego genu, stąd istnieje możliwość, że nie wpłynęły na istotną zmianę funkcjonalności białka DPP.

Pomimo, iż gen *DSPP* jest jedynym, jak dotąd, potwierdzonym genem, którego mutacje prowadzą do powstania wady rozwojowej uzębienia stałego i mlecznego objawiającej się fenotypem *dentinogenesis imperfecta* typu II/III oraz dysplazji zębiny, jak dotąd na terenie Polski nigdy nie podjęto badań mających na celu molekularną analizę sekwencji genu *DSPP* zarówno u pacjentów prezentujących cechy kliniczne *dentinogenesis imperfecta* typu II/III lub dysplazję zębiny, jak też w zdrowej populacji. Badania takie wydają się jak najbardziej zasadne przez wzgląd na ogromny problem leczniczy, jaki niesie za sobą leczenie chorych z *dentinogenesis imperfecta* typu II/III lub dysplazją zębiny [151, 152, 153]. Zastosowanie najbardziej nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej pozwala również na stworzenie profilu zmienności genu *DSPP* (polimorfizm) w polskiej populacji, który zgodnie z wynikami uzyskanymi w obecnej pracy wydaje się prezentować polimorfizm specyficzny dla naszego regionu, różniący się od danych zawartych w ogólnosiwiatowej bazie ludzkiego genomu Ensembl, określonych zarówno dla populacji europejskiej (rasy Kaukaskie), jak i dla ogólnosiwiatowej.

Najnowsze doniesienia z zakresu diagnostyki molekularnej sugerują również istotność tworzenia dla określonych populacji, profilu zmian polimorficznych o charakterze SNP, które są stabilne mutacyjnie, przez co pozwolą w przyszłości na prognozowanie i określenie obrazu klinicznego wad genetycznych. Tworzenie wzorów osobistych map SNP daje bowiem możliwość porównania ich z wzorcem danej choroby, a tym samym dostarcza informacji dotyczących stopnia penetracji wady i określenia prawdopodobieństwa wystąpienia fenotypu u przyszłych pokoleń.

8. WNIOSKI

Gen *DSPP* kodujący białko sialofosforowe zębiny wykazuje wysoki stopień polimorfizmu w populacji osób nie prezentujących fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II i/lub III oraz dysplazji zębiny.

1. Polimorfizm genu *DSPP* występuje zarówno w sekwencji kodującej białko DSP jak i sekwencji kodującej białko DPP.
2. Polimorfizm genu *DSPP* zarówno w sekwencji kodującej białko DSP jak i DPP objawia się zmianami o charakterze jakościowym w postaci zmian w sekwencji pojedynczych nukleotydów. Natomiast polimorfizm ilościowy w postaci insercji i delecji w badanej populacji występuje jedynie w sekwencji kodującej białko DPP.
3. W badanej populacji istnieją mutacje w genie *DSPP*, nie skutkujące powstaniem fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II/III lub dysplazji zębiny.
4. Częstotliwość występowania zbadanych mutacji genu *DSPP* w badanej grupie pozwala zakwalifikować je do zmian o charakterze rzadkich, „niepatogennych” odmian sekwencji genu *DSPP*, a odnotowany polimorfizm w dużym procencie ma charakter zmian „lokalnych”, specyficznych dla badanej grupy.

9. PIŚMIENICTWO

1. Linde A., Goldberg M.: (1993). Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 4: 679 – 728.
2. Thomas HF.: (1995). Root formation. *International Journal of Developmental Biology* 39: 231 – 237
3. Nanci A.: (2007). *Ten Cate's Oral Histology, 7th Edition. Development, Structure and Function.* Morsby.
4. Ruch JV., Begue-Kirn C.: (1995). Odontoblast differentiation. *International Journal of Developmental Biology* 39: 51 – 68.
5. Baume LJ.: (1980). The biology of pulp and dentine. *Monographs in Oral Science* 8: 1 – 245.
6. Lisi S., Peterkova R., Peterka M., et al: (2003). Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. *Connective Tissue Research* 44(1): 167.
7. Sasaki T., Garant PR.: (1996). Structure and organization of odontoblasts. *The Anatomical Record* 245: 235 – 249.
8. Jernvall J., Thesleff I.: (2012). Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development* 139: 3487 – 97.
9. D'Souza RN., Bachman T., Baumgardner KR., Butler WT., Litz M.: (1995). Characterisation of cellular responses involved in reparative dentinogenesis. *Journal of Dental Research* 74: 702 – 709.
10. Ten Cate's and Butler WT.: (1995). Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connective Tissue Research* 33: 59 – 65.
11. MacDougall M., Simmons D., Luan X., Nydegger J., Feng J., Gu T.T.: (1997). Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 835 – 842.
12. Suzuki S., Sreenath T., Haruyama N., Honeycutt C., Terse A., Cho A., Kohler T., Muller R., Goldberg M., Kulkarni AB.: (2009). Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biology* 28: 221 – 229.

13. Prasad M., Butler WT., Qin C.: (2010). Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) in Biomineralization. *Connective Tissue Research* 5: 404 – 41.
14. About I., Bottero MJ., deDenato P., Camps J., Franquin JC., Mitsiadis TA.: (2000). Human Dentin Production in Vitro. *Experimental Cell Research* 258: 33 – 41.
15. Butler WT.: (1984). Dentin Collagen: Chemical structure and role in mineralization. *The Morphology of Dentin and Dentinogenesis*. In: *Dentin and Dentinogenesis*. pp 37 – 53. Vol. 2, (A.Linde, Ed.) CRC Press, Boca Raton.
16. Miller EJ., Gay S.: (1987). The Collagens. An Overview and Update. *Methods in enzymology*. 144: 3 – 41.
17. Eyre D.: (1987). Collagen cross-linking amino acids. *Methods in Enzymology* 144: 115 – 39.
18. Wess TJ.: (2005). Collagen fibril form and function. *Advances in Protein Chemistry* 70: 341 – 74.
19. Yamauchi M., Katz EP.: (1993). The post-translational chemistry and molecular packing of mineralizing tendon collagens. *Connective Tissue Research* 29: 81 – 98.
20. Veis A.: (1997). Collagen fibrillar structure in mineralized and nonmineralized tissues. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : an Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 2: 370 – 8.
21. Lukinmaa PL., Vaahtokari A., Vainio S., Sandberg M., Waltimo J., Thesleff I.: (1993). Transient expression of type III collagen by odontoblasts: developmental changes in the distribution of pro-alpha 1(III) and pro-alpha 1(I) collagen mRNAs in dental tissues. *Matrix* 13: 503 – 15.
22. Lesot H., Osman M., Ruch JV.: (1981). Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin, and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Developmental Biology* 82: 371 – 81.
23. Thesleff I., Vaahtokari A., Partanen AM.: (1995). Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *The International Journal of Developmental Biology* 39: 35 – 50.

24. Becker J., Schuppan D., Benzian H., Bals T., Hahn EG., Cantaluppi C., Reichart P.: (1986). Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V, and VI and of pro-collagens types I and III in human alveolar bone and dentine. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* 34: 1417 – 29.
25. Karjalainen S., Söderling E., Pelliniemi L., Foidart JM.: (1986). Immunohistochemical localization of types I and III collagen and fibronectin in the dentine of carious human teeth. *Archives of Oral Biology* 31: 801 – 6
26. Magloire H., Joffre A., Hartmann DJ.: (1988). Localization and synthesis of type III collagen and fibronectin in human reparative dentine. *Immunoperoxidase and Immunogold staining. Histochemistry* 88: 141 – 9.
27. Waltimo J., Risteli L., Risteli J., Lukinmaa PL.: (1994). Altered collagen expression in human dentin: increased reactivity of type III and presence of type VI in dentinogenesis imperfecta, as revealed by immunoelectron microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* 42: 1593 – 601.
28. Sodek J., Mandell SM.: (1982). Collagen metabolism in rat incisor predentine in vivo: synthesis and maturation of type I, alpha 1 (I) trimer, and type V collagens. *Biochemistry* 21: 2011 – 5.
29. Bronckers AL., Gay S., Lyaruu DM., Gay RE., Miller EJ.: (1986). Localization of type V collagen with monoclonal antibodies in developing dental and periodontal tissues of the rat and hamster. *Collagen and Related Research* 6: 1 – 13.
30. Andujar MB., Magloire HJ.: (1990). Collagen gene expression and tooth development. An overview. *Journal de Biologie Buccale* 18: 117 – 22.
31. Reith EJ.: (1976). Collagen formation in developing molar teeth of rats. *Journal of Ultrastructure Research* 21: 383 – 414.
32. Leblond CP.: (1989). Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone, and dentin. *The Anatomical Record* 224: 123 – 38.
33. Embery G., Hall R., Waddington R., Septier D., Goldberg M.: (2001). Proteoglycans in dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : an Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 12: 331 – 349.

34. Goldberg M., Rapoport O., Septier D., Palmier K., Hall R., Embery G., Young M., Ameye L.: (2003). Proteoglycans in pre-dentine: the last 15 micrometers before mineralization. *Connective Tissue Research* 44: 184 – 188.
35. Waddington RJ., Hall RC., Embery G., Lloyd DM.: (2003). Changing profiles of proteoglycans in the transition of pre-dentine to dentine. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology* 22:153 – 161.
36. Septier D., Hall RC., Lloyd D., Embery G., Goldberg M.: (1998). Quantitative immunohistochemical evidence of a functional gradient of chondroitin 4-sulphate/dermatan developmentally regulated in the pre-dentine of rat incisor. *The Histochemical Journal* 30: 275 – 284.
37. Goldberg M., Escaig F.: (1985). Incorporation of (35S) sulfate and (3H) glucosamine into glycoaminoglycans in rat incisor pre-dentine and dentine: comparison by autoradiography of fixation by rapid freezing, freeze-substitution, and aldehyde fixation. *Calcified Tissue International* 37: 511 – 518.
38. Bratt P., Anderson MM., Mansson-Rahemtulla B., Stevens JW., Zhou C., Rahemtulla F.: (1992). Isolation and characterization of bovine gingival proteoglycans versican and decorin. *The International Journal of Biochemistry* 24: 1573 – 1583.
39. Rahemtulla F., Prince CW., Butler WT.: (1984). Isolation and partial characterization of proteoglycans of rat incisors. *The Biochemical Journal*. 218: 877 – 885.
40. Fisher LW., Termine JD., Young MF.: (1989). 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. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 4571 – 4576.
41. Steinfort J., van de Stadt R., Beertsen W.: (1994). Identification of new rat dentin proteoglycans utilizing C18 chromatography. *The Journal of biological chemistry* 269: 22397 – 22404.
42. Iozzo RV.: (1997). The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 32: 141 – 174.

43. McBride OW., Fisher LW., Young MF.: (1990). Localization of PGI (biglycan, BGN) and PGH (decorin, DCN, PG-40) genes on human chromosomes Xq-13-qater and 12q, respectively. *Genomics* 6: 219 – 225.
44. Danielson KG., Fazzio A., Cohen I., Cannizzaro LA., Eichstetter I., Iozzo RV.: (1993). The human decorin gene: intron-exon localization, discovery of two alternatively spliced exonsin 5' untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23. *Genomics* 15: 146 – 160.
45. Scott JE.: (1986). Proteoglycan-collagen interactions. *Ciba Foundation Symposium* 124: 104 – 24.
46. Pogány G., Hernandez DJ., Vogel KG.: (1994). The in vitro interaction of proteoglycans with type i collagen is modulated by phosphate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 313: 102 – 11.
47. Schönherr E., Witsch-Prehm P., Harrach B., Robenek H., Rauterberg J., Kresse H.: (1995). Interaction of biglycan with type i collagen. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 2776 – 83.
48. Hedbom E., Heinegård D.: (1993). Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 27307 12.
49. Sugars RV., Milan AM., Brown JO., Waddington RJ., Hall RC., Embery G.: (2003). Molecular interaction of recombinant decorin and biglycan with type i collagen influences crystal growth. *Connective Tissue Research*. 44: 189 – 95.
50. Milan AM., Sugars RV., Embery G., Waddington RJ.: (2005). Modulation of collagen fibrillogenesis by dentinal proteoglycans. *Calcified Tissue International*. 76: 127 – 35.
51. Milan AM., Sugars RV., Embery G., Waddington RJ.: (2004). Dentinal proteoglycans demonstrate an increasing order of affinity for hydroxyapatite crystals during the transition of predentine to dentine. *Calcified Tissue International*. 75: 197 – 204.
52. Iozzo RV., Murdoch: (1996). Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 10: 598 – 614.

53. Sugars RV., Milan AM., Brown JO., Waddington RJ., Hall RC., Embery G.: (2003). Molecular interaction of recombinant decorin and biglycan with type I collagen influences crystal growth. *Connective Tissue Research*. 44: 189 – 95.
54. Fisher LW., Fedarko NS.: (2003). Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connective Tissue Research*. 44: 33 – 40.
55. Yamakoshi Y.: (2008). Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) and Dentin.. *Journal of oral Biosciences / JAOB, Japanese Association for Oral Biology* 50: 33 – 44.
56. Qin C., Brunn JC., Cadena E., Ridall A., Tsujigiwa H., Nagatsuka H., Nagai N., Butler WT.: (2002). The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *Journal of Dental Research* 81: 392 – 4.
57. Huang B., Sun Y., Maciejewska I., Qin D., Peng T., McIntyre B., Wygant J., Butler WT., Qin C.: (2008). Distribution of SIBLING proteins in the organic and inorganic phases of rat dentin and bone. *European Journal of Oral Sciences* 116: 104 – 12.
58. Butler WT.: (1998). Dentin matrix proteins. *European Journal of Oral Sciences* 106: 204 – 10.
59. Fisher LW.: (2011). DMP1 and DSPP: evidence for duplication and convergent evolution of two SIBLING proteins. *Cells, Tissues, Organs* 194: 113 – 8.
60. McKnight DA., Suzanne Hart P., Hart TC., Hartsfield JK., Wilson A., Wright JT., Fisher LW.: (2008). A comprehensive analysis of normal variation and disease-causing mutations in the human DSPP gene. *Human Molecular Genetics* 29: 1392 – 404.
61. Ogburke Kalu UE., Fisher LW.: (2005). Renal expression of SIBLING proteins and their partner matrix metalloproteinases (MMPs). *Kidney International* 68: 1 – 12.
62. von Marschall Z., Fisher LW.: (2010). Dentin sialophosphoprotein (DSPP) is cleaved into its two natural dentin matrix products by three isoforms of bone morphogenetic protein-1 (BMP1). *Matrix biology : Journal of the International Society for Matrix Biology* 29: 295 – 303.
63. Jain A., Karadag A., Fisher LW., Fedarko NS.: (2009). Structural requirements for bone sialoprotein binding and modulation of matrix metalloproteinase-2. *Biochemistry* 47: 10162 – 70.

64. Fedarko NS., Jain A., Karadag A., Fisher LW.: (2004). Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 734 – 6.
65. Narayanan K., Ramachandran A., Peterson MC., Hao J., Kolstø AB., Friedman AD., George A.: (2004). The CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP)beta and Nrf1 interact to regulate dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene expression during odontoblast differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 45423 – 32.
66. Hao J., Zou B., Narayanan K., George A.: (2004). Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation. *Bone* 34: 921 – 32.
67. He WX., Niu ZY., Zhao SL., Jin WL., Gao J., Smith AJ.: (2004). TGF-beta activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Archives of Oral Biology* 49: 911 – 8.
68. He G., Dahl T., Veis A., George A.: (2003). Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nature materials* 2: 552 – 8.
69. Ye L., MacDougall M., Zhang S., Xie Y., Zhang J., Li Z., Lu Y., Mishina Y., Feng JQ.: (2004). 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. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 19141 – 8.
70. Butler WT., Brunn JC., Qin C., McKee MD.: (2002). Extracellular matrix proteins and the dynamics of dentin formation. *Connective Tissue Research* 43: 301 – 7.
71. Maciejewska I., Qin D., Huang B., Sun Y., Mues G., Svoboda K., Bonewald L., Butler WT., Feng JQ., Qin C.: (2009). Distinct compartmentalization of dentin matrix protein 1 fragments in mineralized tissues and cells. *Cells, Tissues, Organs* 189: 186 – 91.
72. Qin C., Baba O., Butler WT.: (2004). Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: an Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 15: 126 – 36.

73. Baba O., Qin C., Brunn JC., Wygant JN., McIntyre BW., Butler WT.: (2004). Colocalization of dentin matrix protein 1 and dentin sialoprotein at late stages of rat molar development. *Matrix biology : Journal of the International Society for Matrix Biology* 23: 371 – 9.
74. He G., Dahl T., Veis A., George A.: (2003). Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation in vitro. *Connective Tissue Research* 44: 240 – 5.
75. He G., George A.: (2004). Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 11649 – 56.
76. Zhang X., Zhao J., Li C., Gao S., Qiu C., Liu P., Wu G., Qiang B., Lo WH., Shen Y.: (2001). DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. *Nature Genetics* 27: 151 – 2.
77. Feng JQ., Huang H., Lu Y., Ye L., Xie Y., Tsutsui TW., Kunieda T., Castranio T., Scott G., Bonewald LB., Mishina Y.: (2003). The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *Journal of Dental Research* 82: 776 – 80.
78. Yamakoshi Y.: (2009). Dentinogenesis and Dentin Sialophosphoprotein (DSPP). *Journal of Oral Biosciences / JAOB, Japanese Association for Oral Biology* 51:134.
79. Butler WT., Brunn JC., Qin C.: (2003). Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connective Tissue Research* 44: 171 – 8.
80. Gu K., Chang S., Ritchie HH., Clarkson BH., Rutherford RB.: (2000). Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene. *European Journal of Oral Sciences* 108: 35 – 42.
81. Yamakoshi Y., Lu Y., Hu JC., Kim JW., Iwata T., Kobayashi K., Nagano T., Yamakoshi F., Hu Y., Fukae M., Simmer JP.: (2008). Porcine dentin sialophosphoprotein: length polymorphisms, glycosylation, phosphorylation, and stability. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 14835 – 44.
82. Butler WT., Ritchie H.: (1995). The nature and functional significance of dentin. *The International Journal of Developmental Biology* 39: 169 – 79.

83. Qin C., Brunn JC., Baba O., Wygant JN., McIntyre BW., Butler WT.: (2003). Dentin sialoprotein isoforms: detection and characterization of a high molecular weight dentin sialoprotein. *European Journal of Oral Sciences* 111: 235 – 42.
84. Ritchie HH., Wang LH., Knudtson K.: (2010). a novel rat 523 amino acid phosphophoryn: nucleotide sequence and genomic organization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1520: 212 – 22.
85. Zhu Q., Sun Y., Prasad M., Wang X., Yamoah AK., Li Y., Feng J., Qin C.: (2010). Glycosaminoglycan chain of dentin sialoprotein proteoglycan. *Journal of Dental Research* 89: 808 – 12.
86. Ritchie HH., Ritchie DG., Wang LH.: (1998). Six decades of dentinogenesis research. Historical and prospective views on phosphophoryn and dentin sialoprotein. *European Journal of Oral Sciences* 106: 211 – 20.
87. MacDougall M., Zeichner-David M., Slavkin HC.: (1985). Production and characterization of antibodies against murine dentine phosphoprotein. *The Biochemical Journal* 232: 493 – 500.
88. Butler WT., Bhowm M., DiMuzio MT., Cothran WC., Linde A.: (1983). Multiple forms of rat dentin phosphoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 225: 178 – 86.
89. Lee SL., Veis A., Glonek T.: (1997). Dentin phosphoprotein: an extracellular calcium-binding protein. *Biochemistry* 16: 2971 – 9.
90. George A., Bannon L., Sabsay B., Dillon JW., Malone J., Veis A., Jenkins NA., Gilbert DJ., Copeland NG.: (1996). The carboxyl-terminal domain of phosphophoryn contains unique extended triplet amino acid repeat sequences forming ordered carboxyl-phosphate interaction ridges that may be essential in the biomineralization process. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 32869 – 73.
91. Ritchie HH., Wang LH.: (1996). Sequence determination of an extremely acidic rat dentin phosphoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 21695 – 8.
92. Jonsson M., Fredriksson S.: (1978). Isoelectric focusing of the phosphoprotein of rat incisor dentin in ampholine and acid pH gradients. Evidence for carrier ampholyte-protein complexes. *Journal of Chromatography* 157: 234 – 42.

93. Weinstock M., Leblond CP.: (1973). Radioautographic visualization of the deposition of a phosphoprotein at the mineralization front in the dentin of the rat incisor. *The Journal of Cell Biology* 56: 838 – 45.
94. Bronckers AL., D'Souza RN., Butler WT., Lyaruu DM., van Dijk S., Gay S., Woltgens JH.: (1993). Dentin sialoprotein: biosynthesis and developmental appearance in rat tooth germs in comparison with amelogenins, osteocalcin and collagen type-I. *Cell and Tissue Research* 272: 237 – 47.
95. Zanetti M., de Bernard B., Jontell M., Linde A.: (1981). Ca²⁺-binding studies of the phosphoprotein from rat-incisor dentine. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 113: 541 – 5.
96. Marsh ME.: (1989). Binding of calcium and phosphate ions to dentin phosphophoryn. *Biochemistry* 28: 346 – 52.
97. Linde A.: (1989). Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *The Anatomical Record* 224: 154 – 66.
98. Boskey AL., Maresca M., Doty S., Sabsay B., Veis A.: (1990). Concentration-dependent effects of dentin phosphophoryn in the regulation of in vitro hydroxyapatite formation and growth. *Bone and Mineral* 11: 55 – 65.
99. Kuboki Y., Fujisawa R., Aoyama K., Sasaki S.: (1979). Calcium-specific precipitation of dentin phosphoprotein: a new method of purification and the significance for the mechanism of calcification. *Journal of Dental Research* 58: 1926 – 32.
100. Marsh ME.: (1989). Self-association of calcium and magnesium complexes of dentin phosphophoryn. *Biochemistry*. 28: 339 – 45.
101. Saito T., Arsenault AL., Yamauchi M., Kuboki Y., Crenshaw MA.: (1997). Mineral induction by immobilized phosphoproteins. *Bone* 21: 305 – 11.
102. Stetler-Stevenson WG., Veis A.: (1986). Type I collagen shows a specific binding affinity for bovine dentin phosphophoryn. *Calcified Tissue International* 38: 135 – 41.
103. Milan AM., Sugars RV., Embery G., Waddington RJ.: (2006). Adsorption and interactions of dentine phosphoprotein with hydroxyapatite and collagen. *European Journal of Oral Sciences* 114: 223 – 31.

104. Wallwork ML., Kirkham J., Chen H., Chang SX., Robinson C., Smith DA., Clarkson BH.: (2002). Binding of dentin noncollagenous matrix proteins to biological mineral crystals: an atomic force microscopy study. *Calcified Tissue International* 71: 249 – 55.
105. Traub W., Jodaikin A., Arad T., Veis A., Sabsay B.: (1992). Dentin phosphophoryn binding to collagen fibrils. *Matrix* 12: 197 – 201.
106. Scott JE., Haigh M.: (1988). Identification of specific binding sites for keratan sulphate proteoglycans and chondroitin-dermatan sulphate proteoglycans on collagen fibrils in cornea by the use of cupromeronic blue in ‘critical-electrolyte-concentration’ techniques. *The Biochemical Journal* 253: 607 – 610.
107. Van Den Bos T., Beertsen W.: (1994). Bound phosphoproteins enhance mineralization of alkaline phosphatase–collagen complexes in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research : the Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 9: 1205 – 1209.
108. Boskey AL.: (1992). Mineral–matrix interactions in bone and cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 281: 244 – 274.
109. Qin C., Cook RG., Orkiszewski RS., Butler WT.: (2001). Identification and characterization of the carboxyl-terminal region of rat dentin sialoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 904 – 9.
110. Butler WT., Bhowan M., Brunn JC., D'Souza RN., Farach-Carson MC., Happonen RP., Schrohenloher RE., Seyer JM., Somerman MJ., Foster RA., et al.: (1992). Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDal dentin sialoprotein (DSP). *Matrix* 12: 343 – 5.
111. Ritchie HH., Pinero GJ., Hou H., Butler WT.: (1995). Molecular analysis of rat dentin sialoprotein. *Connective Tissue Research* 33: 73 – 9.
112. Yamakoshi Y., Hu JC., Fukae M., Zhang H., Simmer JP. :(2005). Dentin glycoprotein: the protein in the middle of the dentin sialophosphoprotein chimera. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 17472 – 9.
113. Yamakoshi Y., Hu JC., Iwata T., Kobayashi K., Fukae M., Simmer JP.: (2006). Dentin sialophosphoprotein is processed by MMP-2 and MMP-20 in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 38235 – 43.

114. Steiglitz BM., Ayala M., Narayanan K., George A., Greenspan DS.: (2004). Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 980 – 6.
115. D'Souza RN., Bronckers AL., Happonen RP., Doga DA., Farach-Carson MC., Butler WT.: (1992). Developmental expression of a 53 KD dentin sialoprotein in rat tooth organs. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 40: 359 – 66.
116. Qin C., Brunn JC., Cadena E., Ridall A., Butler WT.: (2003). Dentin sialoprotein in bone and dentin sialophosphoprotein gene expressed by osteoblasts. *Connective Tissue Research* 44: 179 – 83.
117. Ogbureke KU., Fisher LW.: (2004). Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in salivary glands. *Journal of Dental Research* 83: 664 – 70.
118. George A., Sabsay B., Simonian PA., Veis A.: (1993). Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 12624 – 30.
119. Goldberg M., Kulkarni AB., Young M., Boskey A.: (2011). Dentin: structure, composition and mineralization. *Frontiers in bioscience: a Journal and Virtual Library (Elite Ed)* 3: 711 – 35.
120. Narayanan K., Srinivas R., Ramachandran A., Hao J., Quinn B., George A.: (2001) Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 4516 – 21.
121. Huang B., Maciejewska I., Sun Y., Peng T., Qin D., Lu Y., Bonewald L., Butler WT., Feng J., Qin C.: (2008). Identification of full-length dentin matrix protein 1 in dentin and bone. *Calcified Tissue International* 82: 401 – 10.
122. Narayanan K., Ramachandran A., Hao J., He G., Park KW., Cho M., George A.: (2003). Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca²⁺ store. *Journal of Biological Chemistry* 278: 17500 – 8.

123. Massa LF., Ramachandran A., George A., Arana-Chavez VE.: (2005) Developmental appearance of dentin matrix protein 1 during the early dentinogenesis in rat molars as identified by high-resolution immunocytochemistry. *Histochemistry and Cell Biology* 124: 197 – 205.
124. Bègue-Kirn C., Ruch JV., Ridall AL., Butler WT.: (1998). Comparative analysis of mouse DSP and DPP expression in odontoblasts, preameloblasts, and experimentally induced odontoblast-like cells. *European Journal of Oral Sciences* 106: 254 – 9.
125. Sreenath T., Thyagarajan T., Hall B., Longenecker G., D'Souza R., Hong S., Wright JT., MacDougall M., Sauk J., Kulkarni AB.: (2003). Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened pre-dentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *Journal of Biological Chemistry* 278: 24874 – 80.
126. Feng JQ., Luan X., Wallace J., Jing D., Ohshima T., Kulkarni AB., D'Souza RN., Kozak CA., MacDougall M.: (1998). Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dsp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 273: 9457 – 64.
127. Chen S., Rani S., Wu Y., Unterbrink A., Gu TT., Gluhak-Heinrich J., Chuang HH., Macdougall M.: (2005). Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by Runx2 during odontoblast cytodifferentiation *The Journal of Biological Chemistry* 280: 29717 – 27.
128. Karsenty G., Kronenberg HM., Settembre C.: (2009). Genetic control of bone formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25: 629 – 48.
129. Napierala D., Sun Y., Maciejewska I., Bertin TK., Dawson B., D'Souza R., Qin C., Lee B.: (2012). Transcriptional repression of the Dsp gene leads to dentinogenesis imperfecta phenotype in Coll1a1-Trps1 transgenic mice. *Journal of Bone and Mineral Research: the Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27: 1735 – 45.
130. MacDougall M., Dong J., Acevedo AC.: (2006). Molecular basis of human dentin diseases. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 140: 2536 – 46.

131. Witkop CJ Jr., MacLean CJ., Schmidt PJ., Henry JL.: (1996). Medical and dental findings in the Brandywine isolate. *The Alabama Journal of Medical Sciences*. 3: 382 – 403.
132. Kim JW., Simmer JP.: (2007). Hereditary dentin defects. *Journal of Dental Research* 86: 392 – 9.
133. Heimler A., Sciubba J., Lieber E., Kamen S.: (1985). An unusual presentation of opalescent dentin and Brandywine isolate hereditary opalescent dentin in an Ashkenazic Jewish family. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 59: 608 – 15.
134. Kim JW., Hu JC., Lee JI., Moon SK., Kim YJ., Jang KT., Lee SH., Kim CC., Hahn SH., Simmer JP.: (2005). Mutational hot spot in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II. *Human Molecular Genetics* 116: 186 – 91.
135. O Carroll MK., Duncan WK.: (1994). Dentin dysplasia type I. Radiologic and genetic perspectives in a six-generation family. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 78: 375 – 381.
136. Shields ED., Bixler D., el-Kafrawy AM.: (1973). a proposed classification for heritable human dentine defects with a description of a new entity. *Archives of Oral Biology* 18: 543 – 553.
137. Barron MJ., McDonnell ST., MacKie I., Dixon MJ: (2008). Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 3: 31.
138. Beattie ML., Kim JW., Gong SG., Murdoch-Kinch CA., Simmer JP., Hu JC.: (2006). Phenotypic variation in dentinogenesis imperfecta/dentin dysplasia linked to 4q21. *Journal of Dental Research* 85: 329 – 33.
139. Nieminen P., Papagiannoulis-Lascarides L., Waltimo-Siren J., Ollila P., Karjalainen S., Arte S., Veerkamp J., Tallon Walton V., Chimenos Küstner E., Siltanen T., Holappa H., Lukinmaa PL., Alaluusua S.: (2011). Frameshift mutations in dentin phosphoprotein and dependence of dentin disease phenotype on mutation location. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26: 873 – 80.
140. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Press, New York.

141. Bai H., Agula H., Wu Q., Zhou W., Sun Y.: (2010). a novel DSPP mutation causes dentinogenesis imperfecta type II in a large Mongolian family. *BMC Medical Genetics* 11: 23.
142. Song Y., Wang C., Peng B., Ye X., Zhao G., Fan M., Fu Q., Bian Z.: (2006). Phenotypes and genotypes in 2 DGI families with different DSPP mutations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 102: 360 – 74.
143. 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.: (2001). Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nature Genetics* 27: 201 – 204.
144. Laccone F., Zoll B., Huppke P., Hanefeld F., Pepinski W., Trappe R.: (2002). MECP2 gene nucleotide changes and their pathogenicity in males: proceed with caution. *Journal of Medical Genetics* 39: 586 – 8.
145. Cheadle JP., Gill H., Fleming N., Maynard J., Kerr A., Leonard H., Krawczak M., Cooper DN., Lynch S., Thomas N., Hughes H., Hulten M., Ravine D., Sampson JR., Clarke A.: (2000). Long-read sequence analysis of the MECP2 gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location. *Human Molecular Genetics* 9: 1119 – 29.
146. Huppke P., Laccone F., Kramer N., Engel W., Hanefeld F.: (2000). Rett syndrome: analysis of MECP2 and clinical characterization of 31 patients. *Human Molecular Genetics* 9: 1369 – 75.
147. Chinnery PF., Howell N., Lightowlers RN., Turnbull DM.: (1997). Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain: a Journal of Neurology* 120: 1713 – 21.
148. McKnight DA., Simmer JP., Hart PS., Hart TC., Fisher LW.: (2008). Overlapping DSPP mutations cause dentin dysplasia and dentinogenesis imperfecta. *Journal of Dental Research* 87: 1108 – 11.
149. McKnight DA., Fisher LW.: (2009). Molecular evaluation of dentin phosphoprotein among toothed and toothless animals. *BMC Evolutionary Biology* 9: 299.

150. Von Marschall Z., Mok S., Phillips MD., McKnight DA., Fisher LW.: (2012). 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. *Journal of Bone and Mineral Research : the Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27: 1309 – 21.
151. Kindelan J., Tobin M., Roberts-Harry D., Loukota RA.: (2003). Orthodontic and orthognathic management of a patient with osteogenesis imperfecta and dentinogenesis imperfecta: a case report. *Journal of Orthodontics* 30: 291 – 6.
152. Seymour DW., Chan MF., Nixon PJ.: (2012). Dentinogenesis imperfecta: full-mouth rehabilitation using implants and sinus grafts – a case report. *Dental Update* 39: 498 – 500, 503 – 4.
153. Bencharit S., Byrd WC., Mack CR., Border MB., Wright JT.: (2013). Full mouth rehabilitation for a patient with dentinogenesis imperfecta: a clinical report. *The Journal of oral implantology* Jan 4. [Epub ahead of print].