



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV BIOCHEMIE



Vztah mezi poruchami vývoje lidské dentice a genem pro EDA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIANA JANDOVÁ

Vedoucí práce: doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

Brno 2017

Bibliografický záznam

Autorka:	Diana Jandová Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav biochemie
Název práce:	Vztah mezi poruchami vývoje lidské dentice a genem pro EDA
Studijní program:	Biochemie
Studijní obor:	Analytická biochemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.
Akademický rok:	2016/2017
Počet stran:	78
Klíčová slova:	Ectodysplasin A, EDA, odontogeneze, dentální ageneze, hypodoncie, oligodoncie, sekvenace

Bibliographic Entry

Author: Diana Jandová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of Thesis: The relationship between developmental anomalies of the human dentition and EDA gene

Degree Programme: Biochemistry

Field of Study: Analytical biochemistry

Supervisor: doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

Academic year: 2016/2017

Number of Pages: 78

Keywords: Ectodysplasin A, EDA, odontogenesis, dental agenesis, hypodontia, oligodontia, sequenation

Abstrakt

Odontogeneze je poměrně složitý a dlouhodobý proces. Základem molekulárního řízení a kontroly procesu jsou reciproční interakce mezi epiteliální a mezenchymální tkání. Vše je dokonale geneticky naplánováno, včetně počtu, tvaru a uložení jednotlivých zubů. V dnešní době je známo přes 350 genů, které se podílí na vzniku a vývoji dentice u savců.

Jedním z těchto genů je gen pro ectodysplasin A (EDA). Mutace v genu pro EDA jsou mimo jiné spojovány s defektním vývojem zubů a dentálními agenezemi. Cílem diplomové práce byla analýza exonových sekvencí genu pro EDA u vzorků DNA osob, u kterých byla stanovena diagnóza dentální ageneze.

Ve čtvrtém exonu genu pro EDA byl identifikován homozygotní inzerčně-deleční polymorfismus v pozici g.70027876-70027918 s rizikovou deleční alelou D, který nezpůsobuje posun čtecího rámce. Ve stejném exonu se nacházela také potenciální homozygotní záměna A/T v pozici 581, která neovlivňuje kódování aminokyselin.

Zbylé mutace byly nalezeny v nekódující 3'-UTR oblasti osmého exonu genu pro EDA. Nejčastějším případem byla detekce heterozygotního stavu nebo homozygotní záměny T/G v pozici 70038665. nukleotidu gDNA. Dále byla identifikována heterozygotní i homozygotní substituce cytosinu za thymin na nukleotidové pozici 70037013 gDNA, heterozygotní mutace g.70037030C>T a homozygotní záměna g.70037349G>A.

Abstract

Odontogenesis is quite complex and long-term process. The basis of molecular management and control mechanisms of the process is reciprocal interactions between epithelial and mesenchymal tissues. Everything is perfectly genetically planned, including the number, shape and position of each individual tooth. Nowadays, it is known over 350 genes involved in the genesis and development of dentition in mammals.

One of these genes is the gene for ectodysplasin A (EDA). Mutations in this gene are, besides other things, associated with a defective development of teeth and dental agenesis. The aim of the Master's thesis was an analysis of exon's sequences of the gene for EDA on DNA samples of persons that have been diagnosed with dental agenesis.

In the fourth exon of EDA's gene was identified homozygous insertion/deletion polymorphism in position g.70027876-70027918 with risk deletion allele D which doesn't cause shifting of the reading frame. Potential homozygous substitution A/T in position 581 was found in the same exon and does not affect the coding of amino acids.

The remaining mutations were found in the non-coding 3'-UTR region of the eighth exon of the EDA gene. The most frequent case was the detection of heterozygous or homozygous mutation T/G in nucleotide position 70038665 gDNA. Furthermore, heterozygous and homozygous substitution of cytosine to thymine in position 70037013 gDNA, heterozygous mutation g.70037030C>T and homozygous substitution g.70037349G>A were identified.



Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta
Ústav biochemie
Kotlářská 2, 611 37 Brno, CZ



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Magisterský studijní program: Biochemie

Studijní obor: Analytická biochemie

Student(ka): **Bc. Diana Jandová**

Název tématu: **Vztah mezi poruchami vývoje lidské dentice
a genem pro EDA**

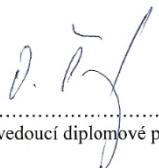
Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

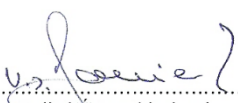
Odborný konzultant: Mgr. Ing. Ondřej Bonczek

Datum zadání diplomové práce: 14. 10. 2014

Datum odevzdání diplomové práce: květen 2016


.....
zpracovatel diplomové práce


.....
vedoucí diplomové práce


.....
ředitel Ústavu biochemie

V Brně, dne 14.10.2014

Zásady pro vypracování:

Hypodontie a oligodontie patří mezi poruchy vývoje dentice. Z molekulárního hlediska jde často o mutace v genech, které zasahují do vývoje zubních základů.

Cílem diplomové práce bude studium sekvence DNA genu pro EDA ve vztahu k hypodontii na souboru 50 pacientů. Součástí práce bude analýza DNA pomocí čtyřkapilárního DNA sekvenátoru ABI3130 a sekvenátoru na bázi NGS. Výsledné sekvence budou srovnány se standardními sekvencemi a nové polymorfizmy a mutace budou popsány z hlediska možné změny struktury a funkce mRNA, možných zásahů do miRNA regulací a změn exprese a struktury proteinu. Práce navazuje na spolupráci s klinickými pracovišti.

Seznam odborné literatury:

Yin W, Ye X, Bian Z. The second deletion mutation in exon 8 of EDA gene in an XLHED pedigree. *Dermatology*. 2013;226(2):105-10. doi: 10.1159/000346610. Epub 2013 Apr 26.

Yin W, Ye X, Fan H, Bian Z. Methylation state of the EDA gene promoter in Chinese X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia carriers. *PLoS One*. 2013 Apr 23;8(4):e62203. doi: 10.1371/journal.pone.0062203. Print 2013.

Yang Y, Luo L, Xu J, Zhu P, Xue W, Wang J, Li W, Wang M, Cheng K, Liu S, Tang Z, Ring BZ, Su L. Novel EDA p.Ile260Ser mutation linked to non-syndromic hypodontia. *J Dent Res*. 2013 Jun;92(6):500-6. doi: 10.1177/0022034513487557. Epub 2013 Apr 26.

Kumar K, Shetty DC, Dua M, Dua A, Dhanapal R. An insight into the genesis of hypohidrotic ectodermal dysplasia in a case report. *Case Rep Dent*. 2012;2012:281074. doi: 10.1155/2012/281074. Epub 2012 Dec 18.

Sarkar T, Bansal R, Das P. Whole Genome Sequencing Reveals Novel Non-Synonymous Mutation in Ectodysplasin A (EDA) Associated with Non-Syndromic X-Linked Dominant Congenital Tooth Agenesis. *PLoS One*. 2014 Sep 9;9(9):e106811. doi: 10.1371/journal.pone.0106811. eCollection 2014.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Omarovi Šerému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, bez nichž by tato práce nemohla vzniknout.

Dále bych chtěla vyjádřit svůj vděk kolektivu Laboratoře neurobiologie a molekulární psychiatrie, především Mgr. Ing. Ondřeji Bonczekovi jako svému odbornému konzultantovi.

Rovněž děkuji MUDr. Přemyslovi Krejčímu, Ph.D. z Kliniky zubního lékařství FN v Olomouci za poskytnutí biologického materiálu pro tento výzkum.

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci projektu IGA MZČR č: NT/11420-6/2010.

Závěrem bych chtěla ze srdce poděkovat své rodině a přátelům za jejich neocenitelnou podporu a slova povzbuzení.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 9. května 2017

.....
Diana Jandová

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	11
1 ÚVOD	14
2 TEORETICKÁ ČÁST	15
2.1 LIDSKÁ dentice.....	15
2.1.1 Systémy značení zubů	15
2.1.2 Stavba zubu.....	17
2.1.3 Vývoj zubu (odontogeneze).....	18
2.1.3.1 Raný vývoj dentice	19
2.1.3.2 Sklovinný orgán.....	20
2.1.3.3 Zubní dentin	20
2.1.3.4 Zubní cement.....	21
2.1.3.5 Zubní sklovina	22
2.1.3.6 Periodontium	22
2.1.3.7 Prořezávání zubu (erupce).....	22
2.2 Molekulární podstata odontogeneze.....	23
2.2.1 TGF- β (Transforming growth factor β) rodina	24
2.2.2 FGF (Fibroblast growth factor) rodina.....	25
2.2.3 Hh (Hedgehog) rodina.....	26
2.2.4 Wnt (Wingless-type MMTV integration site family) rodina.....	26
2.2.5 TNF (Tumor necrosis factor) rodina	27
2.3 EDA (Ectodysplasin A)	29
2.4 Ageneze zubů	32
2.4.1 Hypodontie.....	33
2.4.1.1 Hypodontie a gen pro EDA	34
3 CÍL PRÁCE.....	36
4 MATERIÁL A METODY	37

4.1 Popis souboru	37
4.2 Izolace genomické DNA.....	37
4.2.1 Stanovení čistoty a koncentrace vzorku	37
4.3 Sekvenace genomu	38
4.3.1 Příprava genomové knihovny	40
4.3.1.1 Přístroje a pomůcky	40
4.3.1.2 Použité kity a materiál	41
4.3.1.3 Příprava knihovny vzorku.....	42
4.3.1.4 Amplifikace knihovny vzorku.....	45
4.3.1.5 Hybridizace knihoven vzorků a hybridizačních sond.....	46
4.3.1.6 Promytí a „obnovení“ knihoven vzorků	48
4.3.1.7 Amplifikace knihoven vzorků.....	49
4.3.1.8 Ověření míry „obohacení“ vzorku (qPCR).....	51
4.3.2 Sekvenování.....	52
4.4 Analýza dat.....	55
5 VÝSLEDKY	56
5.1 Analýza kvality fragmentace DNA	56
5.2 Kvantitativní PCR	57
5.3 Vyhodnocení dentální ageneze.....	58
5.4 Sekvenace vzorků DNA.....	61
6 DISKUZE	64
7 ZÁVĚR.....	68
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	69
INTERNETOVÉ ZDROJE	78

SEZNAM ZKRATEK

ACTRII	Activin type II receptor
APC	Adenomatous polyposis coli genový produkt
Axin	Axis inhibitor
AXIN2	Axis inhibitor 2
BARX1	BARH like homeobox gene 1
BMP	Bone morphogenetic protein
BMP 2/4/7	Bone morphogenetic protein 2/4/7
BWA 0.7.13	Burrows-Wheeler Aligner 0.7.13
CDS	Coding sequence
CK1	Casein kinase 1
Co-Smad	Common-mediated Smad
COT-1 Human DNA	DNA z lidské placenty
CPEs	Cytoplasmic polyadenylation elements
Dhh	Desert hedgehog
DKK1	Dickkopf 1 (protein)
Dkk4	Dickkopf 4 (gen)
DLX 1/2	Distal-liss homeobox 1/2
DVL	Dishevelled protein
Eda	Ectodysplasin A (gen)
EDA	Ectodysplasin A (protein)
EDA-A1	Ectodysplasin-A1
EDAR	Ectodysplasin A receptor
EDARADD	EDAR-associated death domain
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
FDI	Světová dentální federace (Fédération Dentaire Internationale)
FGF	Fibroblast growth factor (protein)
FGF 3/4/8/9/10	Fibroblast growth factor 3/4/8/9/10 (protein)
Fgf20	Fibroblast growth factor 20 (gen)
FGFRs	Fibroblast growth factor receptors
Gli	Molekula účastníci se vývoje maligního gliomu
GS doména	Sekvence bohatá na glycin a serin
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
HED	Hypohidrotická ektodermální dysplazie
Hh	Hedgehog

HT1	Hybridizační pufr
IGV 2.3.88	Integrative Genomics Viewer 2.3.88
Ihh	Indian hedgehog
IKK komplex	Komplex podjednotek IKK α , IKK β a NEMO/IKK γ
IKK α	Inhibitor of kappaB kinase alpha; IKK1
IKK β	Inhibitor of kappaB kinase beta; IKK2
IKK γ	Inhibitor of kappaB kinase gamma
I-Smad	Inhibitory Smad
I κ B α	Nuclear factor kappaB inhibitor alpha inhibiční podjednotka NF- κ B
K3E	Tri-kalium EDTA
LEF	Lymphoid enhancer factor
LHX 6/7	Lim homeobox gene 6/7
LM-PCR	Ligation-Mediated PCR
Lrp4	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (gen)
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5
MAP3K	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases
MMTV	Murine mammary tumor virus
MSX 1/2	Muscle segment homeobox gene 1/2
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
NEMO	Nuclear factor kappaB essential modulator
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NGS	Next-Generation Sequencing
PAX9	Paired box 9
PEG/NaCl SPRI	Polyethylenglycol/NaCl Solid Phase Reversible Immobilisation beads
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PITX 1/2	Paired-like homeodomain transcription factor 1/2
PLC- γ	Phospholipase C gamma
Ptch	Patched receptor
RISC	RNA-induced silencing complex
R-Smad	Receptor-activated Smad
Shh	Sonic hedgehog
Smad1/2/3/4..	Mothers against decapentaplegic homolog 1/2/3/4...
Smo	Smoothed protein
Sost-dc1	Sclerostin domain containing 1 / Wise / ectodin protein
SPRY	Sprouty proteiny
TAB 1/2/3	TAK 1-binding protein 1/2/3
TAK 1	TGF- β activated kinase 1

TCF	T-cell factor
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
TRAFs	TNF receptor associated factors
UBC13	Ubiquitin conjugating enzyme 13
UEV1A	Ubiquitin conjugating enzyme variant 1A
UTR	Untranslated region
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family
WNT10A	Wingless-type MMTV integration site family, Member 10A
XEDAR	X-linked ectodysplasin A2 receptor
X-linked HED	Hypohidrotická ektodermální dysplazie vázaná na chromozóm X
β -Trep E3	Beta-transducin repeat-containing E3 ubiquitin protein ligase

1 ÚVOD

Lidský chrup již od pradávna hraje nezastupitelnou roli v životě člověka. V dávných dobách záviselo přežití jedince mimo jiné na schopnosti umět přijímanou stravu převážně v syrovém stavu kvalitně zpracovat rozžvýkáním v dutině ústní. Dnes jsou všechny možné potraviny běžně dostupné v průmyslově zpracované a mnohem stravitelnější formě, proto k náležitému rozmělnění jednotlivých soust není zapotřebí tolik úsilí jako tomu bylo dříve a chrup si tak déle zachovává svoji funkčnost a vitalitu.

Neméně důležitou funkcí zubů je jejich význam při správné artikulaci. Schopnost mluvení je založena kromě jiného na postavení zubů v dutině ústní. Souhra pohybů jazyka a rtů a poloha zubů zásadně ovlivňují srozumitelnost řeči a přispívají ke kvalitě komunikace mezi jedinci.

V poslední době je velký důraz kladen na estetičnost chrupu, který se velkou měrou podílí na celkovém vzhledu naší tváře a na tom, jak působíme na své okolí.

Deformace či ztráta chrupu v podobě dentálních agenezí mohou významně přispět k poškození kvality života člověka a v neposlední řadě i ke snížení jeho sebevědomí a s tím spojenými případnými psychickými problémy. V posledních letech probíhají intenzivní výzkumy zabývající se problematikou dentálních agenezí, které se snaží o nalezení korelací mezi molekulární podstatou odontogeneze a mutacemi v genech, které se podílí na embryonálním vývoji zubů. Gen pro ectodysplasin A (EDA) je jedním z genů, který se účastní raných fází odontogeneze. Bylo prokázáno, že mutace v tomto genu mohou sehrát svoji roli v patogenezi dentální ageneze.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 LIDSKÁ DENTICE

Pojem lidský chrup neboli dentice je definován jako počet a uspořádání zubů jako celku v dutině ústní, rovněž zahrnuje proces prořezávání chrupu (erupce) [1].

Všechny zuby jsou ukotveny v zubních jamkách nazývaných zubní alveoly a uspořádány do dvou bilaterálně symetrických oblouků umístěných na maxilární (horní čelist) a mandibulární kosti (dolní čelist) [2].

Chrup člověka je heterodontní. Jednotlivé typy zubů jsou morfologicky rozlišeny a plní odlišné funkce při mechanickém zpracování přijímané potravy v dutině ústní. Prvním typem zubů jsou řezáky (*dentis incisivi*), které mají dlátovitou korunku a zploštělý kořen. Jejich funkcí je ukusování sousta. Druhým typem zubů jsou špičáky (*dentis canini*), které se vyznačují dlouhým kořenem a jejich úkolem je uchopování a trhání sousta. Neméně důležitými typy zubů jsou třenové zuby (*dentis premolares*) s jedním kořenem a dvěma hrboly na korunce, a stoličky (*dentis molares*), které se vyznačují přítomností dvou až třech kořenů a čtyřmi až pěti hrbolky na korunce. Poslední dva jmenované typy zubů slouží k jemnému rozmělnění potravy [3], [4].

První dentice jinak označovaná jako chrup dočasný (též chrup mléčný) se sestává ze souboru 20 zubů, který zahrnuje 8 řezáků, 4 špičáky a 8 stoliček. K prořezávání zubů dočasného chrupu dochází mezi 6. až 24. měsícem života jedince [1].

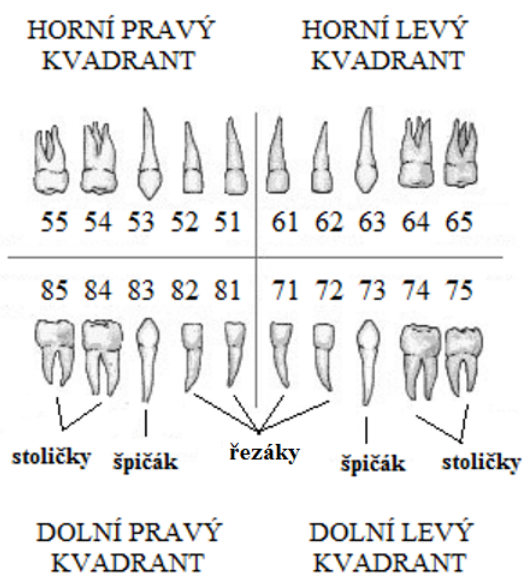
Zhruba mezi 5. až 6. rokem člověka se začínají prořezávat zuby chrupu trvalého, první dentice je tak nahrazena druhou denticí. Trvalý chrup obsahuje celkově 32 zubů, oproti dočasnému chrupu zahrnuje navíc 8 třenových zubů a 4 stoličky [1].

2.1.1 Systémy značení zubů

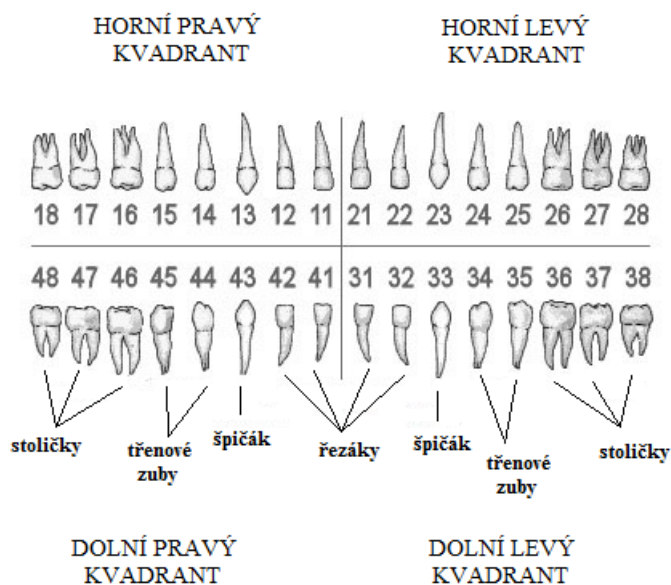
Pro značení jednotlivých zubů se využívají různé systémy, které usnadňují mezioborovou komunikaci v oblastech lékařství a vědy. Dle daných systémů je pozice každého zubu určena buď písmennou zkratkou odvozenou od latinského názvu konkrétního zubu nebo specifickým číselným kódem. Charakteristickým znakem všech zavedených systémů je tzv. zubní kříž [5], který člení zuby na čtyři pomyslné kvadranty. Chrup je rozdělen horizontálně na horní a dolní část a vertikálně na pravou a levou část. Číslování konkrétních kvadrantů je stanoveno po směru hodinových ručiček a začíná

u pravého horního kvadrantu, pokračuje přes levý horní kvadrant, levý dolní kvadrant a končí u pravého dolního kvadrantu (pohled od pacienta). U dočasného chrupu se v jednom kvadrantu nalézají 5 zubů. U trvalého chrupu jeden kvadrant zahrnuje 8 zubů [5].

Světová dentální federace (FDI) zavedla v roce 1971 v dnešní době asi nejpoužívanější systém značení zubů [6]. Jedná se o tzv. „Two-digit systém“ neboli dvojčíselný systém [4]. Kde první číslice udává kvadrant, ve kterém se konkrétní zub nachází. U trvalé dentice jsou kvadranty značeny číslicemi 1 až 4, u dočasné dentice číslicemi 5 až 8. Druhá číslice vyjadřuje pozici zubu v daném kvadrantu. Toto číslo se může nacházet v rozmezí hodnot 1 až 8 pro trvalý chrup a 1 až 5 pro dočasný chrup (viz *Obrázky 1 a 2*) [3].



Obrázek 1: Two-digit systém značení zubů pro dočasný chrup (URL1)



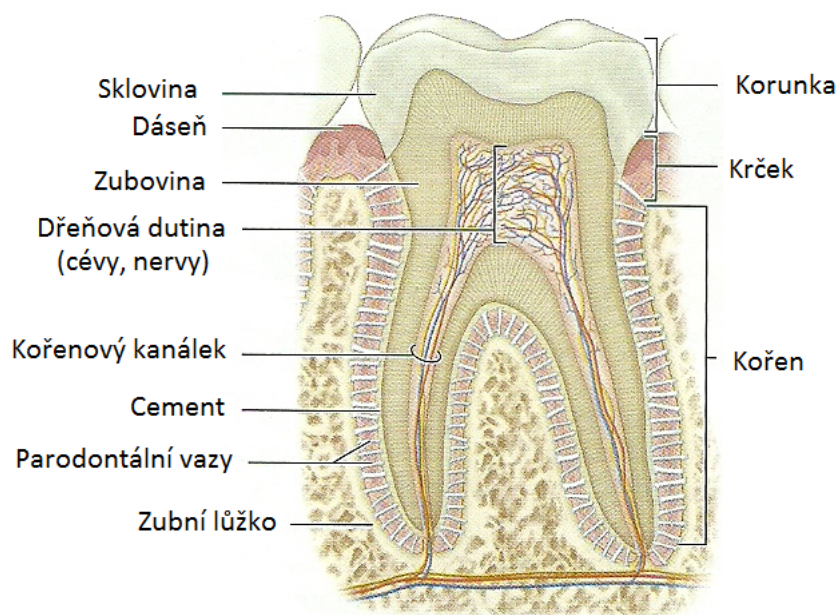
Obrázek 2: Two-digit systém pro značení zubů trvalého chrupu (URL1)

2.1.2 Stavba zubu

Zub je specializovaný produkt sliznice dutiny ústní, který je zároveň nejtvrdějším orgánem lidského těla [1]. Anatomie lidského zubu je znázorněna níže na uvedeném obrázku (viz Obrázek 3). Každý zub má jeden nebo více kořenů (*radix dentis*), které zajišťují pevné ukotvení zubu v jamkách čelistních kostí nazývaných zubní alveoly. Kořeny se spojují a plynule přechází v zúženou část pojmenovanou krček (*cervix dentis*), která je obklopena dásní (*gingiva*). Na krček navazuje zubní korunka (*corona dentis*), jež se uplatňuje při mechanickém zpracování potravy v dutině ústní [7].

Vnitřek zubu je tvořen dřevnou dutinou vyplněnou zubní dřeví (*pulpa dentis*), která je bohatě prokrvována a inervována. Krevní cévy a nervy vstupují do nitra zubu skrz apikální zakončení kořenů a kořenové kanálky. Dřevná dutina je obklopena tvrdou tkání zubovinou (*dentium*; dentin), která je v oblasti korunky překryta nejtvrděší nebuněčnou tkání sklovinou (*enamelum*) [1], [2].

Pojem ozubice (*periodontium*) označuje veškeré vazivo nacházející se mezi zubem a stěnou zubního lůžka, včetně cév, nervů a buněk. Ozubice plní funkci výživového a fixačního aparátu zubu. Kořenová oblast dentinu je obalena pojivovou tkání cementem (*cementum*). Do kořenového cementu se zanořují svazky kolagenních vláken (tzv. Sharpeyova vlákna), která tvoří parodontální vazy. Kořenový cement společně s parodontálními vazy a alveolárními kostmi umožňují fixaci zubu v čelisti [1], [2].



Obrázek 3: Anatomie lidského zubu (upraveno dle [2])

2.1.3 Vývoj zubu (odontogeneze)

Vývoj zubu a jeho prořezávání (erupce) je poměrně složitý a dlouhodobý proces. Vše je od počátku až do konce dokonale geneticky naplánováno, včetně počtu, tvaru a uložení zubů. Správný vývoj zubu je závislý na dostupnosti glycidů, minerálů (Ca, P, F) a vitaminů (C, A, D) [8]. Anomálie, značící nenormální průběh vzniku a vývoje chrupu potažmo jednotlivých zubů, se mohou objevit do šestého týdne embryonální existence plodu [9]. Prvotní základy zubů jsou označovány jako zubní zárodky [8]. Kompletní vývoj stálého zubu od doby založení zárodku až po dotvoření kořene a dovršení mineralizace trvá zhruba deset let [10].

Na vzniku zubních zárodků se podílejí dvě zárodečné složky. První, epitelová složka (ektoderm), je prekurzorem pro vznik skloviny. Ze druhé, mezenchymové složky (ektomezenchym z neurální lišty), se tvoří ostatní tkáň zubu (*viz Tabulka I*). Obě složky jsou navzájem odděleny bazální membránou. Interakce mezi epitelem ektodermu a mezenchymem ektomezodermu řídí prostřednictvím molekulárních signálů vývoj zubních zárodků [8]. Zárodky dočasného chrupu se začínají zakládat v šestém až osmém týdnu embryonálního vývoje. Zárodky trvalého chrupu vznikají mezi třetím až pátým měsícem prenatalního vývoje a desátým měsícem postnatálního vývoje plodu [8].

Vznik a vývoj zubních tkání se skládá z procesů růstu, mineralizace, erupce, vývoje kořene a zařazení zubu do funkce. U dočasného chrupu navíc dochází k resorpci kořene,

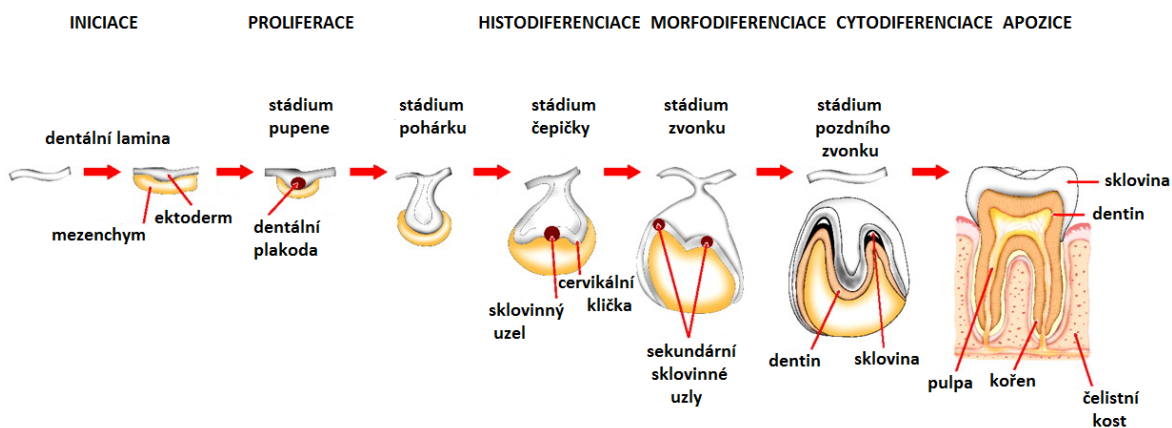
exfoliaci (viklání zubu) a eliminaci zubů [8]. Proces růstu je rozčleněn do šesti fází. Počáteční fází je **iniciace**, kdy dochází ke ztluštění epitelu a utváří se zubní lišta. Následuje fáze **proliferace**, která se vyznačuje množением buněk a vznikem zubního pupenu a formováním zubního zárodku. Ve fázi **histodiferenciace** se vytváří sklovinný orgán, zubní papila a folikul. Při další fázi, **morfodiferenciaci**, se určuje tvar korunky a kořene zubu. Během terminální **cytodiferenciace** se tvoří buňky, které produkují dentin (odontoblasty), sklovinu (ameloblasty) a cement (cementoblasty). Na závěr dochází k tzv. **apozici**, která je charakterizována genezí tvrdých zubních tkání, kdy se utváří vlastní zub (viz Obrázek 4) [8].

2.1.3.1 Raný vývoj dentice

Vývoj dočasné dentice je zahájen tvorbou dentogingivální neboli zubní lišty (*lamina dentalis primaria*) v období přelomu pátého a šestého týdne nitroděložního vývoje. Ztluštělý epitel ektodermu, který se nachází na povrchu mezenchymu primitivních čelistí, proniká do hloubky mezenchymu. Výsledkem je zrod malých ostrůvků buněk na nejzazším okraji dentální lišty, které jsou označovány jako tzv. zubní pupeny [8]. Každý zubní pupen odpovídá jednomu zárodku sklovinného orgánu potřebného pro vznik skloviny. V obou čelistech je umístěno po deseti zubních pupenech přichycených stopkou k dentální liště. Vývoj dentogingivální lišty je doprovázen formováním tzv. labiogingivální lišty, z níž se následně tvoří předsíň dutiny ústní (*vestibulum oris*) [8].

Nyní přebírá hlavní roli mezoderm, který invaginací přeměňuje zubní pupen v zubní pohárek. V prohlubni zubního pohárku se vyvíjí mezenchymová zubní papila. Koncentrující se mezenchym, který obklopuje zubní pohárek, umožňuje vznik zubního folikulu (zubní vak). Cévy z okolí pohárku prorůstají do nitra zubního vaku a papily. Zubní papila se stává vedle toho i inervovanou prostupujícím nervovým vláknem [8].

Vývoj trvalé dentice je podmíněný prodlužováním konců primární dentální lišty (stoličky) a formováním sekundární dentální lišty (*lamina dentalis secundaria*; řezáky, špičáky a třenové zuby nahrazující zuby dočasného chrupu) na mediální straně primární dentální lišty. Umístění zubních pupenů trvalého chrupu je mediální s ohledem k zárodkům dočasného chrupu. Tkáň primární a sekundární dentální lišty se po splnění své funkce zpětně resorbuje [8].



Obrázek 4: Schématické znázornění odontogeneze (upraveno dle [11])

2.1.3.2 Sklovinný orgán

Na vzniku a vývoji skloviny má podíl sklovinný orgán, epitelová složka zubního zárodku, která prochází stádiu zubního pupenu, pohárku, čepičky a zvonku [8]. Nastává rozlišování buněk orgánu skloviny na čtyři vrstvy, a to vnější zubní epitel (vnější ameloblasty), sklovinnou dřeň (hvězdicovité buňky), stratum intermedium (kubické buňky podílející se na diferenciaci a funkci ameloblastů) a vnitřní zubní epitel (prizmatické buňky diferencující se v preameloblasty a následně ve zralé vnitřní ameloblasty) [8].

Preameloblasty podněcují diferenciaci odontoblastů z buněk, které se nachází na okraji zubní papily. Tento proces iniciuje přeměnu buněk sklovinného orgánu na ameloblasty. V oblasti plánovaného krčku zubu se setkávají vrstvy vnějšího a vnitřního epitelu orgánu skloviny a utváří buněčný útvar zvaný cervikální klíčka nebo také Hertwigova pochva, který je odpovědný za vývoj kořene zubu [1], [4], [8]. Přibližně ve čtvrtém měsíci intrauterinního vývoje plodu se nově vzniklé buňky stávají aktivními, dochází k produkci skloviny a dentinu při špičce zubní papily, a dále periferně. Produkce dentinu je o něco málo rychlejší oproti produkci skloviny. V této etapě vývoje zubu se rovněž oddělují zubní pohárky od primární dentální lišty, a ta posléze zaniká (vyjma koncových částí lišty) [8].

2.1.3.3 Zubní dentin

Tvorba dentinu se odborně označuje jako dentinogeneze. Principiálně dochází k sekreci organické matrix (predentin) skrze odontoblasty, které jsou charakteristické

svými dlouhými výběžky nazývanými Tomesova vlákna. V následujícím kroku se matrix společně s těmito vlákny mineralizuje pomocí krystalků hydroxyapatitu [8].

Tvorba dentinu korunkové části zubu předchází tvorbu dentinu kořenové části. Na vnější straně zubní papily se shlukují tzv. Korffova vlákna, která jsou retikulární povahy a pojí se s bazální membránou, která slouží jako předěl mezi povrchem vrstvy ameloblastů a zubní papily [8]. Pozměněná membrána pak separuje nově vzniklé odontoblasty od ameloblastů, přičemž si zachovává trvalé spojení s výběžky odontoblastů. Retikulární vlákna jsou pohlcena vylučující se organickou matrix, která je zásobena krystalky hydroxyapatitu. Původní membrána se tak mineralizuje a vytváří odolné připojení dentinu ke sklovině [8].

Sekrecí mukopolysacharidů a tropokolagenu z odontoblastů se vytváří kolagenní fibrily, objevuje se predentin (nemineralizovaný) a později primární dentin (mineralizovaný) [8]. Odontoblasty se posunují do nitra zubu, koncové části Tomesových vláken se prodlužují. Tomesova vlákna jsou důležitá pro mineralizaci a vitalitu dentinu. Tato vlákna jsou kryta dentinovými tubuly, kterými probíhají budoucí nervová vlákna inervující dentin [8]. Apozicí je zajištěn konstantní nárůst dentinové tkáně. Po dokončení růstu zubu je tvorba primárního dentinu nahrazena vznikem sekundárního dentinu, který pomalu redukuje dřeňovou dutinu [8].

Na tvorbě dentinu kořenové části zubu se významně podílí Hertwigova pochva, která po dokončení korunky prorůstá do mezenchymu směrem k apikálnímu vrcholu plánovaného kořene a buduje „formu“, ve které je dodatečně hromaděno dentin [8]. V mezenchymu je stimulována diferenciací odontoblastů buňkami cervikální kličky, které následně produkují dentin směrem do nitra kořene [8].

2.1.3.4 Zubní cement

Po dovršení vývoje kořene zaniká Hertwigova pochva. Hlavní role se ujímá zubní vak, který celý kořen obalí do mezenchymového cementogenního pláště [8]. Z buněk pláště se diferencují cementoblasty a začíná sekrece zubního cementu. Nejdříve vzniká acelulární primární cement a později, když se produkce cementu zrychlí, tvoří se zejména při apikálním vrcholu kořene celulózní sekundární cement (obsahuje cementocyty) [8].

2.1.3.5 Zubní sklovina

Pojem amelogeneze označuje vznik a vývoj zubní skloviny. Základními buňkami, které tvoří sklovinu jsou ameloblasty, jejichž aktivitou je sekretována sklovinná matrix [8]. Později dochází k fázi zrání skloviny, kdy nastává její mineralizace. Fáze zrání je rozdělena do dvou období, před erupcí a po erupci zubu. Před erupcí sklovinná tkáň ztrácí vodu a určitý podíl organické složky, je zahájen růst krystalů a sklovina nabývá svého tvaru. V poerupčním stadiu se inkorporují anorganické ionty, které pochází ze slin, do hydroxyapatitové mřížky skloviny a sklovina se stává odolnější [8].

Z jednoho ameloblastu se vyvíjí jedno sklovinné prizma, které má sloupcovitý charakter. Apozicí se prizmata protahují a zužuje se pulpa skloviny. Vnější ameloblasty podléhají rozkladu. Vnitřní ameloblasty se přemísťují směrem k okrajové části zubu [8].

2.1.3.6 Periodontium

Ozubice je tvořena kolagenním vazivem, které je produkováno fibroblasty. Tyto buňky jsou deriváty buněk zubního vaku. Buněčná vrstva na povrchu zubního folikulu se mění ve vrstvu osteoblastů a podílí se na založení zubního lůžka [8].

Tabulka I: Přehled tkání zubu, jejich specializovaných buněk, lokalizace buněk v zubním zárodku a původ buněk (upraveno dle [8])

Zubní tkáň	Buňky	Část zubního zárodku	Původ
Sklovina	Ameloblasty	Sklovinný orgán	Ektoderm
Dentín	Odontoblasty	Zubní papila	Ektomezenchym
Cement	Cementoblasty	Zubní vak Cementogenní plášť	Ektomezenchym
Dřeňová dutina	-	Zubní papila	Ektomezenchym (odontoblasty, vazivo) Mezoderm (cévy) Neuroektoderm (nervy)
Ozubice	Fibroblasty	Zubní vak	Ektomezenchym (vazivo)
Zubní lůžko	Osteoblasty	Zubní vak	Ektomezenchym

2.1.3.7 Prořezávání zubu (erupce)

Prořezávání zubů, jinak také nazýváno erupce, je proces, při kterém se zub dostává z jeho nefunkční pozice v čelistní kosti do funkční okluze. Rostoucí kořen tlačí na čelist, a tím posouvá zub směrem k dásni [8].

U zubů dočasného chrupu nastává erupce obvykle od šestého do třicátého měsíce života jedince. Prořezávání zubů dolní čelisti předchází prořezávání zubů horní čelisti. Dítě ve věku dvou a půl roku by již mělo mít dočasný chrup kompletní, tedy dvacet zubů [12]. V následující fázi se vytváří kořen zubu, a zub se tak stává plně funkčním. Zvláštním jevem v organismu je resorpce kořenů zubů dočasného chrupu, po které přetrvá pouze korunka zubu lehce uchycená v dásni, zub jde tak snáze odstranit [12].

Erupce zubů trvalého chrupu do dutiny ústní probíhá od šestého do třináctého roku věku dítěte. Toto se netýká třetích stoliček („zuby moudrosti“), které mají značně rozšířené časové rozpětí prořezávání zhruba od osmnácti do třiceti let věku jedince. K dokončení tvorby kořenů zubů stálé dentice dochází přibližně za tři roky od erupce zubů do dutiny ústní [12].

2.2 MOLEKULÁRNÍ PODSTATA ODONTOGENEZE

Základem molekulárního řízení a kontroly procesu odontogeneze u savců jsou reciproční interakce mezi epiteliální a mezenchymální tkání [11]. V dnešní době je známo více než 350 genů, které se účastní vzniku a vývoje dentice u savců [13]. Tyto geny kódují transkripční a růstové faktory, které zde vystupují jako signální molekuly zprostředkovávající uvedené reciproční interakce [14]. Většina růstových faktorů náleží k několika evolučně konzervovaným rodinám: TGF- β (Transforming growth factor β), FGF (Fibroblast growth factor), Hh (Hedgehog) a Wnt (Wingless-type MMTV¹ integration site family), TNF (Tumor necrosis factor) rodina a další [11]. Jednotlivé proteinové interakce jsou úzce časoprostorově provázány, proto každá změna v proteinu či regulačním procesu může způsobit defektní vývoj zubu [14]–[16].

Růstový faktor svou vazbou na specifický membránový receptor spouští intracelulární signální kaskádu, která přenáší daný signál do buněčného jádra, kde dochází k aktivaci transkripčních faktorů a regulaci exprese genů [17]. Klíčovým momentem v průběhu morfogeneze zubů je tvorba dentálních plakod a sklovinných uzlů, které exprimují řadu genů signálních molekul rodin zmíněných výše [18]. Tým biologů z Helsinské univerzity vytvořil grafickou databázi, ve které lze zobrazit schématický přehled genů exprimovaných během odontogeneze (URL2) [11].

Počáteční vývoj lidské dentice je obdobný vývoji dentice u myší. Z tohoto důvodu se v současné době provádí výzkum odontogeneze zejména na myších modelech, které

¹ Murine mammary tumor virus

jsou pro dané účely vhodnější z hlediska krátké doby reprodukce, jasně definovaného genetického pozadí a důmyslných nástrojů pro manipulaci genů [19], [20].

V popředí stojí výzkumy, při kterých jsou využívány tzv. transgenní myši (knock-out/knock-in model), u nichž byl metodami genového inženýrství vyrazen specifický gen ze své funkce nebo naopak získal funkci novou. Následně se pozoruje vliv daného genu na vývoj jednotlivých orgánů i organismu jako celku [19], [20].

2.2.1 TGF- β (Transforming growth factor β) rodina

TGF- β je velká rodina růstových faktorů. U obratlovců je přenos signálu závislý především na proteinech náležících k activinové a BMP (Bone morphogenetic protein) rodině proteinů [21]. Receptory těchto růstových faktorů jsou dimerní transmembránové proteiny typu I a II, které ve svých strukturách zahrnují intracelulární serin/threoninkinázové domény [22]. Vazba ligandu indukuje vznik heteromerního komplexu receptorů I. a II. typu. Receptor II. typu fosforyluje konzervovanou GS doménu (sekvence bohatá na glycin a serin) receptoru I. typu [22]. Dochází k aktivaci kinázové domény receptoru I. typu a nastává fosforylace členů R-Smad² (Receptor-activated Smad; zahrnuje Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 a Smad8) podrodiny transkripčních faktorů. R-Smad proteiny tvoří komplexy s Co-Smad (Common-mediated Smad; Smad4) proteiny [17], [21]. Smad 4 se translokují do jádra, kde spouští genovou transkripci [22]. Třetím typem Smad proteinů jsou tzv. I-Smad (Inhibitory Smad; Smad6 a Smad7) proteiny, jejichž funkce spočívá v modulaci interakcí TGF- β signální dráhy [17], [21].

BMPs se podílí na inhibici vývoje dentálních plakod [23], vzniku a zániku sklovinných uzlů [24] nebo také na diferenciaci ameloblastů [25]. Nejčastěji zmiňovaným členem BMP rodiny růstových faktorů v souvislosti s vývojem zubů je BMP4 (Bone morphogenetic protein 4), kterému se přisuzuje role „přenašeče“ odontogenního potenciálu z epitelu do mezenchymu [26]. Exprese BMP4 je lokalizována v místě budoucích řezáků, kde zároveň BMP4 indukuje expresi transkripčních faktorů MSX 1/2 (Muscle segment homeobox gene 1/2) a inhibuje expresi transkripčního faktoru BARX1 (BARH like homeobox gene 1). Účinek antagonisty NOGGIN (také známý jako NOG) způsobuje aktivaci exprese BARX1 a vývoj molárů i v řezákové oblasti mezenchymu (URL3) [27].

V epitelu ektodermu je exprimován BMP4, který indukuje expresi MSX1 v mezenchymální tkáni. MSX1 podněcuje expresi BMP4 v oblasti mezenchymu [28]. Během odontogeneze MSX1 interaguje s transkripčním faktorem PAX9 (Paired box 9),

² Smad = Mothers against decapentaplegic homolog 1/2/3...

který podporuje jeho expresi. Společně přispívají k udržování funkce BMP4 v mezenchymální tkáni. Tento protein reguluje morfogenezi zubních zárodků, přechod mezi stádiem pupenu a čepičky, a indukci tvorby sklovinných uzlů [29], [30]. PAX9 hraje nezastupitelnou roli během procesů diferenciacce buněk a udržování jejich pluripotence [31], [32].

Dalším členem TGF- β rodiny, který se podílí na regulaci dentálního vývoje, je dimerní glykoprotein aktivin β A [1], [33]. Společně se svým receptorem ACTRII (Activin type II receptor) a transkripčním faktorem Smad2 se účastní vývoje řezáků a mandibulárních molárů [34]. Působení aktivinu β A může být inhibováno glykoproteinem folistatinem [25].

2.2.2 FGF (Fibroblast growth factor) rodina

FGFs představují velkou rodinu sekrečních molekul, které svými vlastnostmi přispívají ke správnému buněčnému růstu a proliferaci v průběhu odontogeneze [35], [36]. FGF ligandy se váží k transmembránovým tyrosinkinázovým receptorům FGFRs (Fibroblast growth factor receptors), které následně aktivují několik signálních kaskád ovlivňujících expresi genů. Mezi tyto signální kaskády patří PLC- γ (Phospholipase C gamma), PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) a Ras potažmo ERK (Extracellular signal-regulated protein kinase) signální dráha. ERKs tvoří podtřídu kináz MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) [35].

Expresce členů FGF rodiny byla zaznamenána během různých fází odontogeneze [37]. Ve fázi iniciace dochází k expresi FGF8 (Fibroblast growth factor 8) a FGF9 (Fibroblast growth factor 9) v epitelu budoucích molárů, která přetrvává až do stádia tvorby zubního pohárku [17], [38]. FGF8 indukuje v sousedící mezenchymální tkáni expresi transkripčních faktorů BARX1 a PAX9, homeoboxových genů DLX 1/2 (Distal-less homeobox 1/2) a LHX 6/7 (Lim homeobox gene 6/7) a glykoproteinu aktivinu β A [34], [38], [39]. Členové FGF4 (Fibroblast growth factor 4) a FGF9 jsou schopni stimulovat proliferaci buněk jak zubního epitelu, tak i mezenchymu [40]. Oproti tomu FGF10 (Fibroblast growth factor 10) spouští proliferaci buněk pouze epitelální tkáně a jeho exprese je omezena na oblast dentálního mezenchymu od přechodu ze stádia zubního pohárku do stádia zubní čepičky. V pozdním stádiu vývoje zubního pohárku nastává mezenchymální exprese FGF3 (Fibroblast growth factor 3) [17], [41]. Signály FGF dráhy indukují rovněž expresi genů pro PITX 1/2 (Paired-like homeodomain transcription factor 1/2) [42].

Indukce exprese PAX9 proteinem FGF8 je regulována účinkem antagonisty BMP4, který umožňuje indukci pouze v místech vývoje zubů [38]. Aktivace Ras (respektive MAPKs) může být inhibována SPRY (Sprouty) proteiny, jejichž expresi mají na svědomí FGFs [36], [43].

2.2.3 Hh (Hedgehog) rodina

Hedgehog rodina genů kóduje třídu sekrečních proteinů, které jsou složeny ze dvou aktivních domén, „Hedge“ domény (N-terminální) a „Hog“ domény (C-terminální). Proteiny Hh rodiny genů jsou klíčovými modulátory během procesu embryogeneze bezobratlých i obratlovců. U většiny obratlovců lze nalézt tři zástupce Hedgehog rodiny: Shh (Sonic hedgehog), Ihh (Indian hedgehog) a Dhh (Desert hedgehog) [44]. Významnou roli v procesech proliferace a diferenciace dentálního epitelu hraje Shh signální kaskáda [45].

Morfogen Shh je exprimován v epiteliálních plakodách, kde se svou signální funkcí podílí na vzniku dermálních kondenzátů. Signální odpověď kondenzátů stimuluje proliferaci epiteliálních buněk [46]. Navázání Shh proteinu na transmembránový proteinový receptor Ptch (Patched) zruší inhibiční efekt daného receptoru na jiný transmembránový protein nazývaný Smo (Smoothed) protein. Dochází k aktivaci signální kaskády, která vyúsťuje v konverzi role transkripčních faktorů Gli³ jako represorů na aktivátory transkripce příslušných genů [22], [36].

2.2.4 Wnt (Wingless-type MMTV integration site family) rodina

K Wnt rodině se řadí 19 sekrečních glykoproteinů. Proteiny Wnt rodiny se účastní mnoha signálních procesů, které jsou důležitou součástí embryonálního vývoje a regenerace tkání. Mutace v některých komponentách Wnt signální dráhy se mohou podílet na vzniku dysplazií kostní tkáně u lidí. Například mutace v genu pro koreceptor LRP5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) dle jejich charakteru mohou mít za následek buď zvýšení nebo snížení podílu kostní hmoty [47].

Wnt signální dráha může probíhat dvěma způsoby kanonicky a nekanonicky [47]. Kanonická Wnt signální dráha hraje nezastupitelnou roli ve vývoji tkání ektodermálního původu během stadia diferenciace [36], [48]. Klíčovou komponentou tohoto procesu je protein β -catenin, který zde vystupuje jako regulátor transkripce genů. Budoucí vývoj

³ Název odvozený od molekuly účastnící se vývoje maligního gliomu

signální kaskády závisí na přítomnosti nebo nepřítomnosti Wnt ligandu. Pokud není přítomen Wnt ligand dochází k proteozomální degradaci β -catenin. Vzniká spojení β -catenin s axinovým komplexem, který zahrnuje skafoldový protein AXIN (Axis inhibitor), tumor supresorový APC (Adenomatous polyposis coli) genový produkt, CK1 (Casein kinase 1) a GSK3 (Glycogen synthase kinase 3). Fosforylovaný β -catenin je rozpoznán β -Trcp podjednotkou E3 ubiquitinové ligázy (Beta-transducin repeat-containing E3 ubiquitin protein ligase) a odsouzen k degradaci [49]. Exprese cílových genů je potlačena působením komplexu TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid enhancer factor) proteinů. V případě existence Wnt ligandu nastává jeho vazba k receptoru Frizzled za asistence koreceptorů LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6). Aktivovaný Frizzled receptor rekrutuje skafoldový protein DVL (Dishevelled). Fosforylací LRP5/6 koreceptorů se aktivuje a naváže axinový komplex na daný koreceptor, a zabrání se tak degradaci β -catenin. Hromaděním β -catenin v jádře, který vystupuje jako koaktivátor k TCF/LEF, se spouští transkripce příslušných genů [50].

LRP5/6 koreceptory mohou být negativně regulovány vazbou sekrečního Sost-dc1 (Sclerostin domain containing 1; Wise, ectodin) proteinu [51]. Tento protein se rovněž podílí na inhibici aktivity růstových faktorů BMPs zpětnovazebným mechanismem. Exprese ectodinu je stimulována růstovými faktory BMP2 (Bone morphogenetic protein 2) a BMP7 (Bone morphogenetic protein 7) [52]. Dalším negativním regulátorem, který blokuje LRP koreceptory a Wnt signální dráhu, je DKK1 (Dickkopf 1) protein [53].

2.2.5 TNF (Tumor necrosis factor) rodina

Rodina TNF proteinů je poměrně rozsáhlá. Řadí se k ní celkem 19 členů, jejichž signály jsou transdukovány 29 receptory. Ligandy TNF rodiny hrají roli v procesu imunitní odpovědi, hematopoézy a morfogeneze. Mimo jiné se podílí na indukci proliferace buněk, jejich přežití, diferenciaci nebo také apoptóze [54].

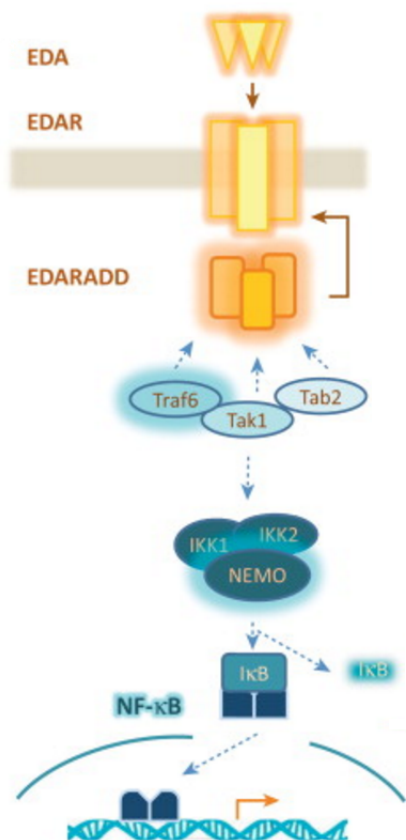
Ectodysplasin A (EDA), člen TNF rodiny, je zapojen do procesů regulace indukce, morfogeneze a udržování různých tkání jako jsou například zuby, vlasy a potní žlázy [36]. Během morfogeneze molárů je EDA signální dráha nezbytná pro udržování a růst dentálních plakod. Dále chrání sklovinné uzly před předčasnou apoptózou a v konečném důsledku se podílí i na tvorbě molárových hrbolků. Mutace v genech proteinů účastnících se signální kaskády mohou způsobit aberace v počtu zubů a jejich deformaci [17], [38].

Proteinový produkt Eda genu EDA-A1 (Ectodysplasin-A1) se váže k trimernímu receptoru EDAR (Ectodysplasin A receptor), jehož struktura zahrnuje signální peptid, tři

domény bohaté na cystein, transmembránovou doménu a tzv. death doménu, která je umístěna v intracelulárním úseku proteinu [55]. Prostřední z „cysteinových“ domén zodpovídá za vazbu ligandu, death doména pak za transdukcii signálu [36]. Navázáním ligandu dochází k aktivaci receptoru a k interakci jeho death domény s death doménou adaptérového proteinu EDARADD (EDAR-associated death domain) [56]. Tento protein následně interaguje s přenašeči signálu TRAFs (TNF receptor associated factors), konkrétně s TRAF6 (TNF receptor associated factor 6), který zprostředkovává aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B (Nuclear factor kappa B) (*viz Obrázek 5*) [57].

TRAF6 je E3 ubikvitinová ligáza, která je schopná katalyzovat syntézu polyubikvitinových řetězců (pojíjí se s Lys63) skrz vazbu s dimerním E2 komplexem UBC13/UEV1A (Ubiquitin conjugating enzyme 13/Ubiquitin conjugating enzyme variant 1A) [58]. Takováto polyubikvitinace v odpověď na různé podněty je zde poměrně častým jevem [59]. TRAF6 interaguje s proteinem EDARADD, a tím aktivuje komponenty proteinkinázového komplexu, který obsahuje TAK 1 (TGF- β activated kinase 1; člen MAP3K⁴ rodiny proteinů) a TAB proteiny (TAK 1-binding proteins), konkrétně TAB 1/2/3 (TAK 1-binding protein 1/2/3) [60]. Struktura proteinu TAB 2 v sobě ukrývá evolučně konzervovaný proteinový motiv tzv. zinkový prst, který umožňuje navázání ubikvitinu [1], [61]. Ústřední komponentou celého procesu je IKK komplex tvořený dvěma katalytickými podjednotkami IKK α (Inhibitor of kappaB kinase alpha; IKK1) a IKK β (Inhibitor of kappaB kinase beta; IKK2) a jednou regulační podjednotkou NEMO/IKK γ (Nuclear factor kappaB essential modulator/Inhibitor of kappaB kinase gamma) [61]. Podjednotka NEMO dokáže specificky rozpoznávat polyubikvitinové řetězce pojíjí se s Lys63 a následně vyvolat ubikvitinaci sebe sama [62]. Spolupůsobením s TAK1 kinázou dochází k fosforylaci IKK β podjednotky, a tím k aktivaci IKK komplexu. Poté nastává fosforylace I κ B α (Nuclear factor kappaB inhibitor alpha) inhibiční podjednotky NF- κ B. Zásluhou β -Trcp E3 ubikvitinové ligázi, která generuje polyubikvitinové řetězce pojíjí se s Lys48, podléhá inhibitor I κ B α proteazomální degradaci a volný dimer NF- κ B se translokuje do buněčného jádra, kde spouští transkripci příslušných genů [61].

⁴ Mitogen-activated protein kinase kinase kinase



Obrázek 5:

Schématické znázornění EDA signální dráhy (některé signální molekuly pro zjednodušení nejsou uvedeny; upraveno dle [63])

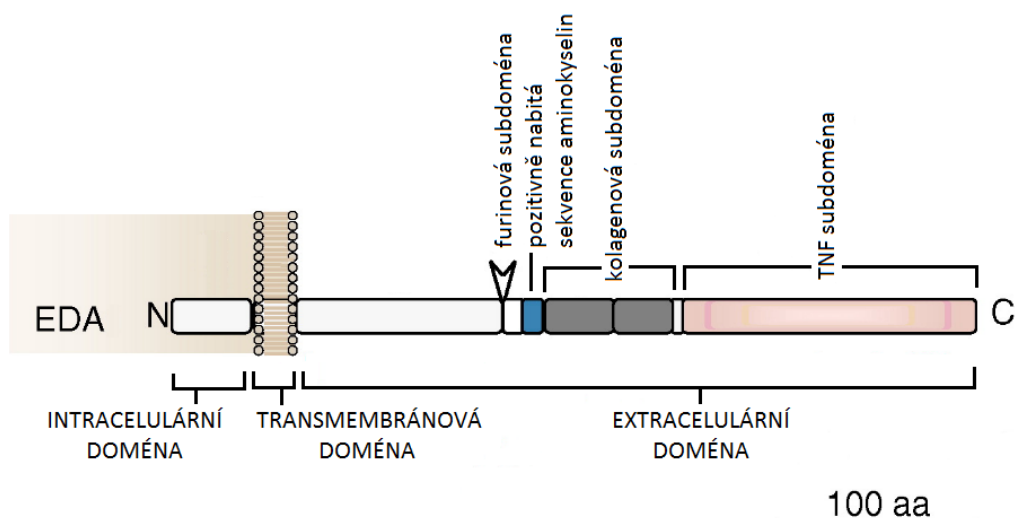
Exprese EDA proteinu je omezena na oblast orálního epitelu a epitelu zubního pohárku. Oproti tomu jeho receptor EDAR je výhradně exprimován ve tkáních dentálních plakod a sklovinných uzlů [45]. V průběhu stádia čepičky byla zaznamenána exprese proteinu EDARADD, stejně tak jako NF- κ B, I κ B α a IKK γ , ve sklovinných uzlech. V dentálním epitelu pak docházelo k expresi IKK α a IKK β [17].

EDA signální dráha má ústřední pozici v regulační síti genů, která zajišťuje správné řízení a vývoj odontogeneze. Jednotlivé signální dráhy, které se účastní vývoje chrupu jsou navzájem provázány [63]. Wnt signální dráha ovlivňuje expresi proteinu EDA, konkrétně Wnt6. Exprese receptoru EDAR je regulována působením aktivinu β A [64]. Signální funkce proteinu EDA ovlivňuje expresi Shh, Fgf20 (Fibroblast growth factor 20), Dkk4 (Dickkopf 4), folistatinu a Lrp4 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 4) [45], [65]–[67].

2.3 EDA (ECTODYSPLASIN A)

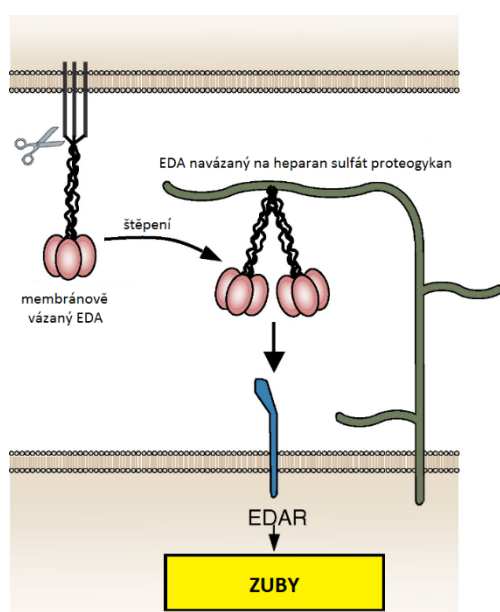
Gen pro EDA (Ectodysplasin A) je lokalizován na dlouhém raménku chromozómu X v pozici Xq12-q13.1 a jeho velikost odpovídá zhruba 423 kb (URL4) [36], [68], [69]. Tento gen obsahuje 12 exonů a kóduje transmembránový protein II. typu, který náleží k TNF (Tumor necrosis factor) rodině ligandů (URL5) [69]. Struktura proteinu se sestává ze sekvence 391 aminokyselin a zahrnuje krátkou intracelulární doménu (N-terminální část), transmembránovou doménu a extracelulární doménu (C-terminální část), která je tvořena úsekem sekvence aminokyselin s neznámou funkcí, furinovou subdoménou,

krátkou sekvencí aminokyselin nesoucí pozitivní náboj, kolagenovou subdoménou a TNF homologní subdoménou (viz Obrázek 6) [36].



Obrázek 6: Struktura proteinu EDA (upraveno dle [36])

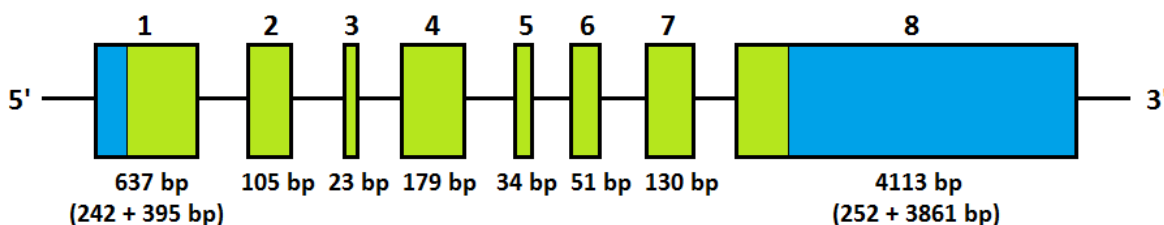
Pro získání proteinu v aktivní formě je zapotřebí proteolytických pochodů, které se odehrávají v oblasti furinové subdomény [36]. Dochází ke štěpení proteinu a uvolnění rozpustné signální molekuly. TNF homologní subdoména je složena z 10 antiparalelních β -listů, které jsou navzájem propojeny variabilními smyčkami [70]. Její struktura zahrnuje 3 cysteinová rezidua v pozicích 332, 346 a 352 [71]. Funkce subdomény spočívá v tvorbě homotrimerů ligandů a vazbě proteinu k jeho receptoru [70]. Kolagenová subdoména zvyšuje schopnost proteinu stimulovat receptor udržováním dvou a více homotrimerů proteinu ve vzájemné blízkosti v rámci jedné molekuly [36], [72], [73]. Struktura subdomény je tvořena úsekem 19 Gly-X-Y repeticí s jedním přerušením [71]. Pozitivně



navitá sekvence aminokyselin (vysoký obsah argininových a lysinových reziduí) zabezpečuje kontakt s membránově vázanými heparan sulfát proteoglykany [36], [71], [74]. Tato interakce reguluje difúzi odštěpené části proteinu v tkáni (viz Obrázek 7) [73].

Obrázek 7:
Princip aktivace receptoru EDAR endogenním EDA proteinem (upraveno dle [36])

Gen pro EDA podléhá alternativnímu sestřihu, jehož produktem jsou různé izoformy proteinu [70]. Pouze nejdelší dvě ze vzniklých izoform, které obsahují 8 exonů, jsou považovány za biologicky aktivní, EDA-A1 (Ectodysplasin-A1) (viz Obrázek 8) a EDA-A2 (Ectodysplasin-A2) [71], [75].



Obrázek 8: Schématické znázornění struktury genu pro EDA-A1 (modrá barva – netranslatující se oblasti genu tzv. UTR oblasti; zelená barva – kódující sekvence exonů genu tzv. CDS; černé spojovníky – intronové sekvence)

(vizualizováno pomocí nástroje IGV 2.3.88 (Integrative Genomics Viewer) [76], [77])

TNF homologní doména izoformy EDA-A1 obsahuje ve své struktuře dvě aminokyselinová rezidua (Glu308 a Val309), která izoforma EDA-A2 postrádá. Rozdíl ve strukturách obou izoform zajišťuje vazebnou specifitu k daným receptorům. Isoforma EDA-A1 specificky interaguje s receptorem EDAR (Ectodysplasin A receptor) oproti tomu izoforma EDA-A2 se váže na receptor XEDAR (X-linked ectodysplasin A2 receptor) [78].

Většina mutací, které zasahují do struktury TNF homologní subdomény, má za následek změnu kvartérní struktury proteinu, a tím podmíněnou ztrátu schopnosti komunikace ligandu s jeho receptorem [72], [79].

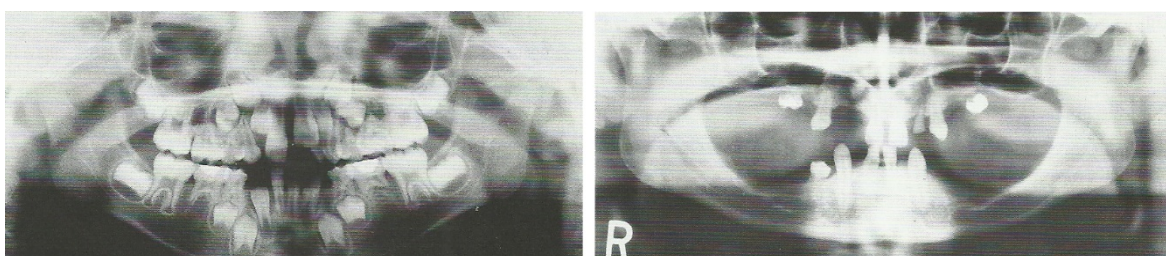
Signální dráha proteinu EDA je zahrnuta do raných fází vývoje zubů, které se vyznačují četnými interakcemi mezi orálním a dentálním epitelem a mezenchymem [80]. Většina analýz exprese EDA byla provedena metodou *in situ* hybridizace, při které není možné rozlišení jednotlivých izoform [79]. Během iniciační fáze odontogeneze dochází k expresi EDA na povrchu buněk orálního epitelu. Ve stádiu pohárku je EDA exprimován již i na buňkách dentálního epitelu. Při přechodu do stádia čepičky nastává změna exprese proteinu z buněk dentálního epitelu na buňky vnějšího sklovinného epitelu. Stadium zvonku je doprovázeno zánikem exprese EDA na buňkách orálního epitelu a přetrváváním exprese EDA na povrchu buněk vnějšího sklovinného epitelu až do fáze pozdního zvonku (URL2).

2.4 AGENEZE ZUBŮ

Poškozením zubních tkání během jejich vývoje a růstu může dojít k nenávratným poruchám vývoje dentice. Pokud je narušen zubní vývoj ve stádiu iniciace či proliferace, dochází k anomáliím v počtu zubů. Postižení zubní tkáně ve fázi histodiferenciace eventuálně apozice vede k odchylkám ve struktuře zubů. Období morfodiferenciace je kritické pro potenciální vznik defektů ve velikosti a tvaru zubů [5], [10]. Anomálie od normálního vývoje jednotlivých zubů i komplexního chrupu mohou vzniknout do šestého týdne embryonálního vývoje organismu [9].

Nejčastější poruchou vývoje zubů je dentální ageneze, která je definována jako vrozené nevyvinutí zubu [1], [38]. Následkem této poruchy je zastavení vývoje zubního zárodku, ke kterému došlo z důvodu narušení činnosti dentogingivální lišty během stadia morfogeneze zubu [81]. S danou poruchou jsou také spojovány anomálie vývoje, tvaru, velikosti a doby prořezávání zbývajících zubů. Z tohoto důvodu by se k dentální agenzi nemělo přistupovat pouze jako k izolované anomálii [81], [82].

Míru aberace od fyziologického počtu zubů charakterizují čtyři pojmy. Hypodontie je stav, který je charakterizován nepřítomností až šesti zubů (vyjma třetích molárů) (*viz Obrázek 9*) (URL6) [19]. Pojem oligodontie vyjadřuje agenezi šesti a více zubů různých skupin (toto se netýká třetích molárů) (*viz Obrázek 10*). Vzácnou anomálií je anodontie, kdy není založen ani jeden zárodek žádného zubu [8], [81], [83]. Zvláštním jevem je hyperodontie, pro kterou je typický zvýšený počet zubů [83].



Obrázek 9 a 10: Panoramatické rentgenové snímky chrupu jedinců postižených hypodontií (vlevo; absence zárodků druhých premolárů, retardace prořezávání řezáků) a oligodontií (vpravo; absence více zubů odlišných skupin) (upraveno dle [83])

Příčina vzniku ageneze zubů je ve většině případů genetického charakteru, ageneze vzniklé působením zevního prostředí se vyskytují ojediněle. Na vině mohou být somatická onemocnění jako je například rubeola, spála, syfilis, rachitis nebo nutriční poškození plodu během intrauterinního vývoje. Mezi další vlivy, které mohou negativně ovlivnit vývoj

zubů, patří ozařování organismu v období jeho raného vývoje popřípadě ozařování mateřského organismu, účinek různých chemických látek a léčiv např. thalidomidu. Z místních příčin je prokázán negativní vliv různých druhů traumat, zánětů a nádorů [38], [82], [84]–[89].

S výskytem dentální ageneze se setkáváme častěji u zubů trvalé dentice než u zubů chrupu dočasného [84]. Podle Larmoura a kol. se s následky ageneze zubu trvalého chrupu (vyjma třetích molárů) potýká zhruba 2,6 % až 11,3 % obecné populace [90]. Pro agenezi zubu dočasné dentice se uvádí procentuální zastoupení od 0,5 % do 0,9 % [84].

2.4.1 Hypodontie

Hypodontie je definována jako komplexní jednotka, pod kterou spadají jak anomálie v počtu zubů (ageneze), tak přidružené poruchy vývoje chrupu, anomálie tvaru, velikosti a doby erupce ostatních zubů [19].

Pokud se hypodontie objeví jako izolovaná vývojová vada, označujeme ji jako nesyndromickou hypodontii. V opačném případě se jedná o hypodontii syndromickou, která je podmíněna souběžnou přítomností komplexních syndromů, kdy dochází k vývojovým defektům i v jiných tkáních ektodermálního původu [31], [38]. Krejčí a kol. ve svém článku uvádí spojitost hypodontie s anhidrotickou ektodermální dysplazií, Riegrovým syndromem a Witkopovým syndromem [31].

Nesyndromická hypodontie se dále dělí na sporadickou a familiární. U familiární ageneze zubů se uvažuje o třech způsobech dědičnosti, a to autozomálně dominantně, autozomálně recesivně nebo gonozomálně (vazba na chromozóm X). Tento typ ageneze se vyskytuje i u dalších příbuzných. Příčinou sporadické hypodontie je nejpravděpodobněji spolupůsobení více faktorů, mezi které patří kombinace účinku více genů a vlivy prostředí (uvedeno výše) [19], [38].

Nesyndromická hypodontie je do značné míry geneticky a fenotypově různorodou poruchou. Mutace v různých genech způsobují odlišné manifestace fenotypu [38], [91], [92]. V databázi OMIM (URL6) jsou uvedeny mutace v genech PAX9, MSX1, EDA, AXIN2 (Axis inhibitor 2) a WNT10A (Wingless-type MMTV integration site family, Member 10A), které vykazují příčinnou souvislost s nesyndromickou hypodontií [38], [92]–[100]. Mutace v genech EDA (Ectodysplasin-A1), EDAR, EDARADD, NEMO, PITX2 a další údajně stojí za vznikem syndromických forem ageneze zubů [31], [38]. Další možnou alternativou je i role epigenetických faktorů, jejichž působením může

docházet ke snížení genové dávky, změně interakcí genů a dalších post-transkripčních modulačních nástrojů [38], [101].

Odontogeneze je velmi složitý proces, na jehož řízení se podílí exprese mnoha genů. Značná část těchto genů dodnes nebyla analyzována, proto možná spojitost dentální ageneze s dosud neidentifikovanými geny je velmi pravděpodobná. Určitý potenciál pro selekci genů odpovědných za nesyndromickou formu hypodontie se skrývá v identifikaci genů asociovaných se syndromickou hypodontií [38].

Diagnostika dentální ageneze probíhá na základě rentgenového a klinického vyšetření probandů. Pacientům je zhotoven panoramatický rentgenový snímek čelistí, který je následně analyzován, a je přistoupeno ke klinickému intraorálnímu vyšetření [19].

V současné době existuje několik terapeutických přístupů, které nabízí řešení, jak se s následky ageneze zubů vypořádat [13]. Jedním takovým přístupem je využití zubních implantátů, které mohou nahradit jednotlivé zuby, jejich části nebo zubní oblouky [102]. Dalším náročnějším přístupem je nahrazení defektních tkání nebo orgánů metodami autotransplantace, alotransplantace a xenotransplantace [103]–[106]. V posledních letech je hodně diskutovaným tématem vytvoření zcela nového zubu za pomoci kmenových buněk [13], [107], [108].

2.4.1.1 Hypodontie a gen pro EDA

Gen pro EDA je spojován jak se syndromickou tak i nesyndromickou formou hypodontie. Mutace v genu pro EDA vyúsťující v syndromickou formu hypodontie jsou příčinou hypohidrotické ektodermální dysplazie vázané na chromozóm X (X-linked HED) [109], [110]. Většina těchto mutací se nachází v úsecích genu kódujících tři hlavní funkční subdomény proteinu (furinová subdoména, kolagenová subdoména a TNF homologní subdoména) [75]. HED (také známa jako Christův-Siemensův-Tourainův syndrom) postihuje především jedince mužského pohlaví, ženy jsou většinou přenašečky, popřípadě trpí mírnými projevy poruchy. Klinické příznaky zahrnují absenci potních žláz, defekty slzných a slinných žláz, hypotrichózu, prořídle vlasy, dentální defekty apod. [1]. Dentice osob trpících HED vykazuje známky hypodontie nebo kompletní anodontie, jednotlivé zuby zaumají kónický nebo „kolíčkovitý“ tvar a doba erupce trvalého chrupu je prodloužena. Někdy může být HED asociována s projevy imunodeficiency [111].

Nejčastějším případem jsou substituční bodové mutace, konkrétně tzv. missense mutace (missense mutations), které způsobují změnu smyslu kodonu. Dále byly objeveny v souvislosti s genem pro EDA substituční bodové mutace „nonsense“ (nonsense

mutations), které vytváří terminační kodony, a inzerčně-deleční posunové mutace (frameshift mutations), které vedou ke změně čtecího rámce. Je známo i několik delečních mutací, které nezpůsobují posun čtecího rámce (in-frame mutations) nebo způsobují delecí celého exonu. Pokusy o odhalení korelačních vztahů mezi typem mutace a/nebo její lokalizací a závažností fenotypového projevu byly neúspěšné [75].

Schneider a kol. [72] zkoumali vliv několika „missense“ mutací genu pro EDA a zjistili, že dané mutace mohou nepříznivě ovlivňovat vazbu ligandu k jeho receptoru, multimerizaci a proteolytické štěpení proteinu.

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo shrnutí dosavadních poznatků o vývoji lidské dentice a možných poruchách, které jsou s procesem odontogeneze spojeny. Pozornost byla zaměřena primárně na gen pro EDA a jeho roli v patogenezi hypodoncie.

Cílem praktické části bylo nalezení mutací v exonových sekvencích DNA genu pro EDA souvisejících s hypodoncií na souboru 31 osob. Z krevních vzorků pacientů bylo cílem vyizolovat genomickou DNA, a pomocí sekvenátoru na bázi NGS (Next-Generation Sequencing) získat exonové sekvence genu pro EDA u studovaných osob. Dílčím cílem bylo srovnání získaných sekvencí se standardními sekvencemi a identifikace polymorfizmů a mutací v genu pro EDA souvisejících s hypodoncií. Konečným cílem této práce bylo porovnání získaných dat s údaji z předešlých studií zabývajících se daným tématem.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 POPIS SOUBORU

Předmětem studie bylo hledání souvislostí mezi sekvencí DNA genu pro EDA a hypodoncií. Do výzkumu bylo zapojeno celkem 31 osob. Účastníci studie byly děti předškolního a školního věku, z nichž 18 bylo ženského pohlaví a 13 mužského pohlaví. Jednalo se o osoby české národnosti. Všechny osoby byly podrobeny rentgenovému vyšetření chrupu a klinickému vyšetření. Na základě výsledků získaných z panoramatického rentgenového snímku čelistí a intraorálního vyšetření byla stanovena diagnóza a zjištěna přítomnost dentální ageneze. Zmíněná vyšetření byla provedena na Klinice zubního lékařství Fakulní nemocnice v Olomouci.

4.2 IZOLACE GENOMICKÉ DNA

Osobám zapojeným do výzkumu byl na základě předešlého vyšetření vykonaného na dříve zmíněné klinice proveden odběr kapilární krve z prstu. Do zkumavek Microvette[®] 200 K3E (Sarstedt, Německo) s přídavkem protisrážlivé látky tri-kalium EDTA bylo odebráno 200 μ l krve. Izolace DNA z krevních vzorků byla realizována na přístroji Chemagic Prepito (Chemagen, Německo). Použitá metoda izolace nukleových kyselin je založena na využití vlastností paramagnetických částic. K izolaci DNA byl použit izolační kit Chemagic Prepito DNA Blood250 Kit (Chemagen, Německo), který obsahuje magnetické částice, lyzační roztok, vazebný roztok, sadu promývacích roztoků, eluční roztok, proteinázu, destičku, reakční zkumavky (0,75 ml) a jednorázové špičky.

4.2.1 Stanovení čistoty a koncentrace vzorku

Po izolaci DNA následovalo stanovení čistoty a koncentrace vyizolovaných vzorků metodou UV spektrofotometrie. Měření bylo provedeno na fotometru GENESYS 10S Bio (Thermo Scientific, USA). U jednotlivých vzorků byla zjištěna absorbance při různých vlnových délkách (A_{230} , A_{260} , A_{280}) a analyzována míra znečištění balastními látkami. Hodnota absorbance při vlnové délce 260 nm vypovídá o koncentraci nukleové kyseliny ve vzorku, která byla stanovena v ng/ μ l. Znečištění vzorku organickými látkami se projeví

zvýšenou hodnotou A_{230} oproti A_{260} . Poměr hodnot A_{260} a A_{280} reflektuje míru čistoty vzorku respektive míru znečištění proteiny. Hodnota poměru A_{260}/A_{280} by se měla pohybovat v rozmezí 1,8 – 2,0. Hodnota poměru nižší než 1,8 značí přítomnost proteinů a vyšší než 2,0 přítomnost RNA.

4.3 SEKVENACE GENOMU

Společnost Illumina v roce 2007 představila světu první sekvenátor, který pracoval na principu sekvenace syntézou ve spojení s tzv. můstkovou amplifikací (bridge amplification) (viz *Obrázek 11*) [112], [113].

Počátečním krokem je příprava DNA knihovny, při níž je provedeno několik důležitých úkonů. Nejprve je DNA podrobena fragmentaci a následně jsou konce vzniklých fragmentů dále upravovány. Tyto úpravy zahrnují zarovnání konců fragmentů, jejich fosforylaci a adenylaci (na 3'-konci). Na závěr jsou k oběma koncům přidány specifické adaptérové sekvence [112].

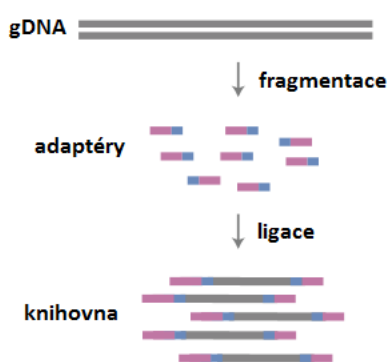
Po denaturaci knihovny probíhá hybridizace upravených fragmentů DNA k reakční komůrce. Adaptéry DNA fragmentů se párují s komplementárními adaptéry imobilizovanými na povrchu reakční komůrky, které slouží jako primery pro následnou syntézu dvouvláknové DNA (amplifikace pomocí PCR) [112]. V další fázi dochází k denaturaci a odmytí původních templátových vláken DNA. Nově syntetizovaná vlákna DNA se ohýbají a svým volným koncem hybridizují k primerům (adaptérům) navázaným na povrchu reakční komůrky. Je spuštěn další PCR cyklus, jehož produktem je dvouvláknový most (bridge amplification). Po cyklickém opakování celého procesu je přikročeno k denaturaci dvouvláknových mostů a odmytí reverzních řetězců DNA. Výsledkem je vznik shluků (tzv. klastrů), z nichž každý sestává z mnoha identických kopií templátových DNA fragmentů [112].

Při samotné sekvenaci jsou k adaptérovým sekvencím připojeny sekvenační primery. Do reakční komůrky (s klastry) je vpravena směs polymerázy a čtyř nukleotidů, které jsou odlišně fluorescenčně označeny a jejich 3'-OH skupina je chemicky inaktivována. Tímto je zajištěno začlenění výhradně jednoho nukleotidu do řetězce DNA v rámci jednoho cyklu [112]. Po inkorporaci nukleotidu fluorescenční značka vyše signál snímaný CCD kamerou, který udává pozici a typ příslušného nukleotidu. Poté je terminační skupina i fluorescenční značka odstraněna a cyklus je opakován. Sekvence

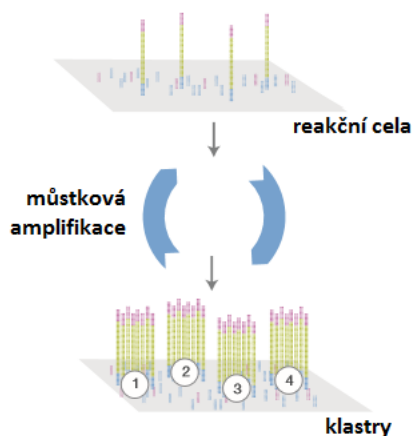
jednotlivých klastrů jsou získány na základě speciálních algoritmů, které konkrétním bázím přiřazují určitou hodnotu. Sekvence s nízkou kvalitou jsou tak eliminovány [112].

Analýza dat probíhá za využití příslušných softwarových nástrojů uvedených v *Kapitole 4.4*, které umožní mapování sekvenčních readů na referenční sekvenční, filtraci a vizualizaci získaných dat.

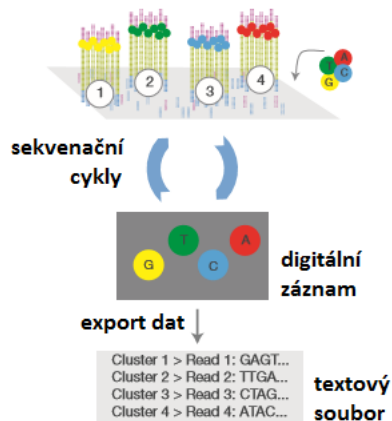
A) PŘÍPRAVA KNIHOVNY



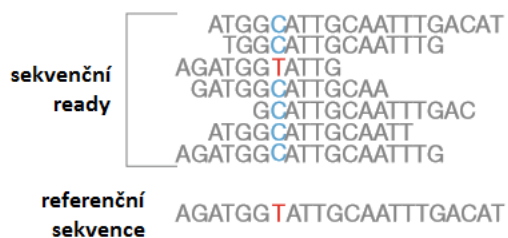
B) AMPLIFIKACE KLASTRŮ



C) SEKVENACE



D) ANALÝZA DAT



Obrázek 11: Schématické znázornění postupu sekvenování DNA (převzato dle URL7)

4.3.1 Příprava genomové knihovny

Technika cíleného sekvenování (targeted sequencing) dovoluje sekvenování vybraných genů nebo definovaných oblastí genomu. Pro přípravu genomové knihovny byla vybrána metoda cíleného „záchytu“ tzv. targeted capture s následnou multiplex PCR, která využívá specifických sond navržených pro záchyt daných oblastí a pozdějšího obohacení vzorku (enrichment) o tyto oblasti prostřednictvím metody PCR [112].

Pro účely této studie byla pro přípravu knihovny použita technologie SeqCap EZ System od společnosti Roche NimbleGen. Při přípravě knihovny bylo postupováno dle protokolu poskytnutého výrobcem⁵. Pro zjednodušení byly některé notoricky známé kroky jako je přípravné rozmrazení chemikálií, resuspendace, vortexace nebo centrifugace reagensů či vzorků, zpracování paramagnetických částic na magnetickém kolektoru, přepipetování do jiné zkumavky, odstranění supernatantu, opakované promývání vynechány. Postup v kapitolách 4.3.1.3 – 4.3.1.4 je koncipován pro přípravu individuální knihovny vzorku (Sample Library). V našem případě bylo při jednom experimentu zpracováno až 24 vzorků, jejichž knihovny byly zkombinovány dle postupu v kapitole 4.3.1.5 bod 2) Multiplexování knihoven vzorků DNA.

4.3.1.1 Přístroje a pomůcky

Covaris S220 Ultra-Sonicator (Covaris, USA) - sonikátor

2200 TapeStation System (Agilent, USA) - bioanalyzátor

Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) - termocyklér

GENESYS 10S Bio (Thermo Scientific, USA) - spektrofotometr

LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics, USA) - termocyklér

Thermo-Shaker TS-100 (Biosan, Lotyšsko) – termoblok

Mikrocentrifuga (16 000 x g)

Vortex mixer

Chemagic Stand 2x12 (Chemagen, Německo) – magnetický separátor

Automatické pipety

⁵ Roche (2015): SeqCap EZ Library SR User's Guide v5.1, Roche NimbleGen: Madison, USA

4.3.1.2 Použité kity a materiál

KAPA Library Preparation Kit Illumina (50 reakcí) (KK8251) (Kapa Biosystems, USA):

10X End-Repair Buffer 500 µl	End-Repair Enzyme Mix
10X A-Tailing Buffer 250 µl	A-Tailing Enzyme
5X Ligation Buffer 500 µl	T4 DNA Ligase
20% PEG 8000/2,5 M NaCl 20 ml	

SeqCap Adapter Kit A (96 reakcí) (Roche NimbleGen, USA):

SeqCap Index Adapter 2/4/5... 0,5 nmol
(12 zkumavek - A2,A4,A5,A6,A7,A12,A13,A14,A15,A16,A18,A19)
Pre-LM-PCR Oligos 1 & 2 2,75 nmol

SeqCap Adapter Kit B (96 reakcí) (Roche NimbleGen, USA):

SeqCap Index Adapter 1/3/8... 0,5 nmol
(12 zkumavek - A1,A3,A8,A9,A10,A11,A20,A21,A22,A23,A25,A27)
Pre-LM-PCR Oligos 1 & 2 2,75 nmol

SeqCap EZ Accessory Kit v2 (24 reakcí) (Roche NimbleGen, Německo):

COT-1 Human DNA 120 µl
2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix 1,25 ml
Post-LM-PCR Oligos 1 & 2 2,4 nmol

SeqCap EZ Probe Pool (Roche NimbleGen, Německo)

SeqCap Hybridization and Wash Kit (24 reakcí) (Roche NimbleGen, Německo):

2,5X Bead Wash Buffer 5 ml	10X Stringent Wash Buffer 1000 µl
10X Wash Buffer I 750 µl	2X Hybridization Buffer (tetramethylammonium chloride) 190 µl
10X Wash Buffer II 500 µl	Hybridization Component A (formamide) 75 µl
10X Wash Buffer III 500 µl	

SeqCap HE Oligo Kit A (96 reakcí) (Roche NimbleGen, Německo):

SeqCap HE Index 2/4/5... Oligo 10 nmol
(12 zkumavek - B2,B4,B5,B6,B7,B12,B13,B14,B15,B16,B18,B19)
SeqCap HE Universal Oligo 120 nmol

SeqCap HE Oligo Kit B (96 reakcí) (Roche NimbleGen, Německo):

SeqCap HE Index 1/3/8... Oligo 10 nmol
(12 zkumavek - B1,B3,B8,B9,B10,B11,B20,B21,B22,B23,B25,B27)
SeqCap HE Universal Oligo 120 nmol

D1000 ScreenTape Kit (Agilent, Německo):

D1000 ScreenTape (7 pieces)

D1000 Ladder 10 µl

D1000 Sample Buffer 400 µl

KAPA Library Quantification Kit (KK4854) (Kapa Biosystems, USA):

2X KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (SYBR® Green I dye) 5 ml

10X Primer Premix 1 ml

DNA Standard 1 – 6 (20 pM, 2 pM, 0,2 pM, 0,02 pM, 0,002 pM, 0,0002 pM) 80 µl

Agencourt Ampure XP Kit (60ml) (Beckman Coulter, USA):

Agencourt AMPure XP Reagent

SeqCap Pure Capture Bead Kit (24 reakcí) (Roche NimbleGen, Německo):

SeqCap Capture Beads 2,4 ml

1X TE pufr (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA; pH 8.0)

Eluční pufr (10 mM Tris-HCl; pH 8.0)

Ředící pufr (10 mM Tris-HCl + 0,05% Tween® 20; pH 8,0)

80 % ethanol

PCR voda

MicroTUBE AFA Fiber Pre-Slit Snap-Cap 6x16 mm (Covaris, USA)

PCR zkumavky (0,2 ml)

Mikrocentrifugační zkumavky (1,5 ml)

4.3.1.3 Příprava knihovny vzorku

Tato kapitola popisuje přípravu knihovny vzorku (Sample Library) a hodnocení její kvality před samotnou amplifikací.

- 1) Resuspendace indexovaných adaptérů – do každé z 24 zkumavek (SeqCap Adapter Kit A/B – 2 x 12 zkumavek) bylo přidáno po 50 µl chlazené PCR vody, po vortexaci a stočení byly zkumavky uskladněny v chladu při teplotě -15 °C až -25 °C.
- 2) Fragmentace gDNA pomocí ultrasonikátoru Covaris S220 – použité množství vstupní gDNA bylo 130 µl (c = 3 ng/ µl). Požadovaná průměrná délka fragmentů měla být zhruba 180 – 220 bp. Fragmentace probíhala při výkonu 175 W po dobu 180 s.

3) Velikost vzniklých fragmentů byla ověřena na přístroji 2200 TapeStation System (Agilent, USA), který pracuje na principu gelové elektroforézy s využitím „platíček“ ScreenTape. Pro tuto analýzu bylo smíšeno po 3 μl D1000 Sample Buffer s 1 μl D1000 Ladder a 1 μl vzorku DNA, a jednotlivé zkumavky s roztoky byly vloženy do přístroje na určené místo. Celý proces včetně nanesení vzorků, elektroforetické separace i vizualizace výsledku je zcela automatizovaný.

4) Zarovnání konců fragmentů

- Byl vytvořen End Repair Master Mix (viz Tabulka II) o objemu 20 μl , který byl smíchán s 50 μl fragmentované DNA ($c_{\text{DNA}} = 3 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Směs byla inkubována při 20 °C po dobu 30 min.

Tabulka II: Složení End Repair Master Mixu

<i>End Repair Master Mix</i>	<i>Pro individuální Sample Library</i>
PCR voda	8 μl
10X KAPA End Repair Buffer	7 μl
KAPA End Repair Enzyme Mix	5 μl
Celkový objem	20 μl

- Následovalo přečištění pomocí paramagnetických částic Agencourt AMPure XP Beads. K 70 μl dříve vytvořené směsi bylo přidáno 120 μl částic. Při inkubování směsi při pokojové teplotě po dobu 15 min se DNA navázala na povrch částic. Následovalo dvojnásobné promývání 200 μl 80 % ethanolu. Na závěr byly částice s navázanou DNA vysušeny při pokojové teplotě.

5) Adenylace konců fragmentů

- Do zkumavky s částicemi a navázanou DNA bylo připipetováno 50 μl A-Tailing Master Mixu (viz Tabulka III). Směs byla inkubována 30 min při 30 °C.

Tabulka III: Složení A-Tailing Master Mixu

<i>A-Tailing Master Mix</i>	<i>Pro individuální Sample Library</i>
PCR voda	42 μl
10X KAPA A-Tailing Buffer	5 μl
KAPA A-Tailing Enzyme	3 μl
Celkový objem	50 μl

- Přečištění směsi probíhalo za přítomnosti 90 μ l PEG/NaCl SPRI (Solid Phase Reversible Immobilisation beads) vazebního pufru. Inkubace směsi při pokojové teplotě trvala 15 min, poté bylo přikročeno k dvojnásobnému promývání 200 μ l 80 % ethanolu. Nakonec byly částice s navázanou DNA opět vysušeny.

6) Ligace adaptérů

- Částice s DNA byly smíchány se 47 μ l Ligation Master Mix (viz Tabulka IV). Následně byly do zkumavky připipetovány 3 μ l dříve připraveného roztoku adaptérů s vybraným značením (indexem). Reakční směs byla inkubována 15 min při 20 °C.

Tabulka IV: Složení Ligation Master Mixu

<i>Ligation Master Mix</i>	<i>Pro individuální Sample Library</i>
PCR voda	32 μ l
5X KAPA Ligation Buffer	10 μ l
KAPA T4 DNA Ligase	5 μ l
Celkový objem	47 μ l

- K přečištění byl opět použit vazebný pufr PEG/NaCl SPRI o objemu 50 μ l. Inkubace probíhala 15 min při pokojové teplotě. Promývání 200 μ l 80 % ethanolu bylo provedeno 2x. Po vysušení byly částice s navázanou DNA resuspendovány ve 100 μ l elučního pufru a inkubovány 2 min při pokojové teplotě.

7) Selektce fragmentů s navázanými adaptérovými sekvencemi dle velikosti

- Ke 100 μ l resuspendované DNA s částicemi bylo přidáno 60 μ l PEG/NaCl SPRI vazebního pufru. Inkubace při pokojové teplotě po dobu 15 min umožnila vazbu fragmentů > 450 bp k paramagnetickým částicím. Získaný supernatant o objemu 155 μ l obsahoval fragmenty < 450 bp.
- Přidáním 20 μ l nových paramagnetických částic Agencourt AMPure XP Beads k supernatantu a inkubací 15 min při pokojové teplotě se selektivně zachytily fragmenty > 250 bp na částicích. Následovalo 2x promývání 200 μ l 80 % ethanolu a vysušení částic při pokojové teplotě.

- Vysušené částice byly resuspendovány v 25 μ l PCR vody a inkubovány 2 min při pokojové teplotě. Odsátý supernatant obsahoval vyeluovanou DNA o velikosti fragmentů 250 – 450 bp.

4.3.1.4 Amplifikace knihovny vzorku

Kapitola vysvětluje, jak amplifikovat knihovnu vzorku (Sample Library) za využití metody LM-PCR (Ligation-Mediated PCR), jejíž název vyjadřuje, že pro PCR jsou využity primery komplementární k sekvencím adaptérů.

1) Resuspendace primerů – k resuspendování primerů (Pre-LM-PCR Oligos 1 & 2; 1 zkumavka) bylo použito 550 μ l PCR vody. Zkumavka byla uložena na chladném místě při -15 °C až -25 °C až do doby zpracování.

2) Amplifikace knihovny vzorku (Pre-Capture LM-PCR Amplification)

- 20 μ l knihovny vzorku (připravené v předchozí kapitole) bylo smícháno s 30 μ l Pre-Capture LM-PCR Master Mixu (*viz Tabulka V*). Reakce byla provedena na ledu, protože uvedený Master Mix je teplotně senzitivní. Jako negativní kontrola byla použita PCR voda, která byla zpracována analogickým způsobem.

Tabulka V: Složení Pre-Capture LM-PCR Master Mixu

<i>Pre-Capture LM-PCR Master Mix</i>	<i>Pro individuální Sample Library (negativní kontrolu)</i>
2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 μ l
Pre LM-PCR Oligos 1 & 2, 5 μ M	5 μ l
Celkový objem	30 μ l

- Amplifikace fragmentů DNA (a negativní kontroly) byla provedena na termocykléru Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) dle příslušného teplotního profilu reakce (*viz Tabulka VI*). Teplota vyhřívání víka termocykléru byla nastavena na +10 °C oproti inkubačním teplotám.

Tabulka VI: Teplotní profil Pre-Capture LM-PCR Amplifikace

Teplotní profil PCR reakce	
98 °C	45 s
98 °C (denaturace)	15 s
60 °C (annealing)	30 s
72 °C (extenze)	30 s
72 °C	1 min
4 °C	hold

- Purifikace amplifikované knihovny vzorku probíhala za pomoci paramagnetických částic Agencourt AMPure XP Beads. K 50 µl knihovny vzorku (a negativní kontroly) bylo připipetováno 90 µl částic. Inkubací 15 min při pokojové teplotě se navázaly fragmenty DNA k částicím. K dvojnásobnému promývání knihovny bylo využito 200 µl 80 % ethanolu. Následně byly částice s DNA vysušeny při pokojové teplotě po dobu cca 15 min.
 - Na závěr byla DNA resuspendována v 52 µl PCR vody. Po inkubaci 2 min při pokojové teplotě byl odstraněn supernatant o objemu 50 µl, který obsahoval amplifikovanou knihovnu vzorku.
- 3) Kvalita amplifikované knihovny vzorku byla ověřena pomocí spektrofotometru GENESYS 10S Bio (Thermo Scientific, USA) (vyhodnocení viz kapitola 4.2.1).

4.3.1.5 Hybridizace knihoven vzorků a hybridizačních sond

Kapitola se zabývá hybridizací amplifikovaných knihoven vzorků a hybridizačních sond. Pojem „hybridizační sondy“ zahrnuje kompletní soupravu biotinylovaných oligonukleotidových sond, které zprostředkovávají záchyt cílových oblastí (Targeted Capture) (viz úvod kapitoly 4.3.1).

- 1) Resuspendace primerů – primery SeqCap HE Universal Oligo byly resuspendovány ve 120 µl PCR vody ($c_{\text{roztoku}} = 1000 \mu\text{M}$). Primery SeqCap HE Index Oligo byly resuspendovány v 10 µl PCR vody ($c_{\text{roztoku}} = 1000 \mu\text{M}$) (SeqCap HE Oligo Kit A/B – 2 x 12 zkumavek). Zkumavky s primery byly uchovány v chladu při -15 až -25 °C až do jejich použití.

- 2) Multiplexování knihoven vzorků DNA – pokud bylo v předchozích krocích zpracováno více vzorků DNA respektive vytvořeno více knihoven vzorků DNA (Sample Libraries), pak v tomto kroku tyto indexované amplifikované knihovny byly smíseny v ekvivalentním poměru jejich hmotností, tak aby celková hmotnost směsi byla minimálně 1,25 µg.
- 3) Multiplexování primerů – pro vytvoření poolu primerů bylo zkombinováno 50 % SeqCap HE Universal Oligo primerů a 50 % směsi příslušných SeqCap HE Index Oligo primerů, tak aby celkové látkové množství poolu odpovídalo 2000 pmol.

Např.: Kdyby se pracovalo se 4 knihovnami vzorků DNA (4 Sample Libraries), které byly připravovány s adaptérovými indexy 2, 4, 6, 8, pak by pool primerů zahrnoval (*viz Tabulka VII*):

Tabulka VII: Ukázkové složení poolu primerů

<i>Složka</i>	<i>Množství</i>
SeqCap HE Universal Oligo	1000 pmol (1 µl z 1000 µM)
SeqCap HE Index 2 Oligo	250 pmol (0,25 µl z 1000 µM)
SeqCap HE Index 4 Oligo	250 pmol (0,25 µl z 1000 µM)
SeqCap HE Index 6 Oligo	250 pmol (0,25 µl z 1000 µM)
SeqCap HE Index 8 Oligo	250 pmol (0,25 µl z 1000 µM)
Celkové množství	2000 pmol (2 µl z 1000 µM)

4) Hybridizace

- Byla připravena hybridizační směs sestávající z 5 µl COT-1 Human DNA (c = 1 mg/ml; DNA z lidské placenty – potlačení nespecifických hybridizačních reakcí), 1 µg multiplexovaných knihoven vzorků (*viz bod 2*), 2 µl poolu primerů (1 µl SeqCap HE Universal Oligo o n = 1000 pmol a 1 µl SeqCap HE Index Oligo Poolu o n = 1000 pmol).
- Do zkumavky s hybridizační směsí byl přidán 2x větší objem paramagnetických částic Agencourt AMPure XP Beads oproti směsi. Po inkubaci 5 min při pokojové teplotě se směs promývala 200 µl 80 % ethanolu.

- Po vysušení pelety se k hybridizační směsi připipetovala směs 7,5 µl 2X Hybridization Buffer (přídavek tetramethylamonium chloridu) a 3 µl Hybridization Component A (přídavek formamidu) a zkumavka byla inkubována 2 min při pokojové teplotě. Odsátý supernatant byl umístěn na 10 min do termobloku při teplotě 95 °C, kde docházelo k denaturaci DNA.
- Následně byl supernatant smísen se 4,5 µl poolu hybridizačních sond (SeqCap EZ Probe Pool) a vzniklá směs (viz *Tabulka VIII*) byla inkubována 16 – 20 hod v termocyklu při 47 °C (teplota vyhřívání víka byla nastavena na 57 °C).

Tabulka VIII: Výsledná hybridizační směs

<i>Složka</i>	<i>Množství</i>
COT Human DNA	5 µg
Multiplexované knihovny vzorků	1 µg
Pool primerů	2000 pmol*
2X Hybridization Buffer	7,5 µl
Hybridization Component A	3 µl
Pool hybridizačních sond	4,5 µl
Celkový objem	15 µl

*50 % SeqCap HE Universal Oligo (1000 pmol)

a 50 % směs SeqCap HE Index Oligos (1000 pmol)

4.3.1.6 Promytí a „obnovení“ knihoven vzorků

Kapitola popisuje promytí (odstranění nenavázaných fragmentů) a obnovení „zachycené“ multiplexované DNA po hybridizaci.

- 1) Příprava pufrů – pufrů 10X Wash Buffers (I, II, III a Stringent) a 2,5X Bead Wash Buffer byly zředěny PCR vodou na koncentraci 1X (viz *Tabulka IX*). 400 µl 1X Stringent Wash Buffer a 100 µl 1X Wash Buffer I bylo předeřáno na 47 °C ve vodní lázni.

Tabulka IX: Ředění promývacích pufků

Pufk	Objem pufku 10X	Objem PCR vody	Objem pufku 1X
10X Stringent Wash Buffer	40 μ l	360 μ l	400 μ l
10X Wash Buffer I	30 μ l	270 μ l	300 μ l
10X Wash Buffer II	20 μ l	180 μ l	200 μ l
10X Wash Buffer III	20 μ l	180 μ l	200 μ l
2,5X Bead Wash Buffer	200 μ l	300 μ l	500 μ l

*uvedené objemy jsou pro 1 experiment (1 capture = 24 vzorků)

- 2) Příprava streptavidinových Capture Beads – 100 μ l částic bylo 2x promyto v 200 μ l pufku 1X Bead Wash Buffer a následně rozsuspendováno ve 100 μ l tohoto pufku. Po vyčerení roztoku byla odstraněna tekutá složka a částice byly připraveny k použití.
- 3) Vazba DNA – hybridizační směs (*viz předchozí kapitola*) byla přenesena do zkumavky s Capture Beads, která byla poté umístěna na 45 min do termocykléru při teplotě 47 °C (teplota vyhřívání víka byla 57 °C). Během inkubace byla zkumavka s roztokem krátce vortexována každých 15 min, aby byl zaručen suspenzní stav částic.
- 4) Promytí částic s navázanou DNA – po inkubaci bylo 15 μ l částic s DNA 1x promyto 100 μ l předeřátého 1X Wash Buffer I a 2x 200 μ l předeřátého 1X Stringent Wash Buffer (inkubace 5 min při 47 °C). Poté byly částice s DNA postupně vortexovány při pokojové teplotě nejdříve 2 min v 200 μ l 1X Wash Buffer I, následně 1 min v 200 μ l 1X Wash Buffer II a nakonec 30 s v 200 μ l 1X Wash Buffer III. Na závěr bylo k částicím s navázanou DNA přidáno 50 μ l PCR vody (pro další kroky nebylo zapotřebí eluace DNA).

4.3.1.7 Amplifikace knihoven vzorků

Kapitola popisuje amplifikaci „zachycené“ multiplexované DNA navázané na částice (Capture Beads) za využití metody LM-PCR (Ligation-Mediated PCR). Celkově jsou provedeny dvě PCR reakce na zkumavku knihoven vzorků, které jsou zkombinovány za účelem minimalizace odchylek při PCR.

- 1) Příprava směsi pro amplifikaci – do dvou PCR zkumavek bylo napipetováno po 30 μ l Post-Capture LM-PCR Master Mixu (*viz Tabulka X*) a 20 μ l částic s navázanou DNA. Pro negativní kontrolu bylo použito 20 μ l PCR vody místo částic s DNA.

Tabulka X: Složení Post-Capture LM-PCR Master Mixu

<i>Post-Capture LM-PCR Master Mix</i>	<i>Pro individuální PCR reakci</i>
2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µl
Post-LM-PCR Oligos 1 & 2, 5 µM	5 µl
Celkový objem	30 µl

2) Amplifikace multiplexovaných knihoven vzorků (Post-Capture LM-PCR Amplification) – PCR zkumavky s vytvořenou směsí byly umístěny do termocykléru, na kterém se nastavil příslušný teplotní profil PCR reakce (viz Tabulka XI). Teplota vyhřívaného víka byla seřizena na +10 °C oproti jednotlivým inkubačním krokům.

Tabulka XI: Teplotní profil Post-Capture LM-PCR Amplifikace

<i>Teplotní profil PCR reakce</i>	
98 °C	45 s
98 °C (denaturace)	15 s
60 °C (annealing)	30 s
72 °C (extenze)	30 s
72 °C	1 min
4 °C	hold

3) Purifikace amplifikované „zachycené“ multiplexované DNA – obě zkumavky s DNA vzorky byly smíchány (celkový objem 100 µl) a ke vzniklému roztoku bylo přidáno 180 µl paramagnetických částic Agencourt AMPure XP Beads (negativní kontrola byla zpracovávána obdobným způsobem). Po inkubaci 15 min při pokojové teplotě byla směs 2x promývána 200 µl 80 % ethanolu. Následně po vysušení byly částice s DNA rozsuspendovány v 52 µl PCR vody a inkubovány 2 min při pokojové teplotě. Bylo odpipetováno 50 µl supernatantu obsahujícího amplifikovanou „zachycenou“ multiplexovanou DNA.

4) Určení velikosti fragmentů DNA - pomocí bioanalyzáru 2200 TapeStation System (Agilent, USA) byla zkontrolována délka fragmentů DNA, která měla spadat přibližně do rozmezí hodnot 150 – 500 bp.

4.3.1.8 Ověření míry „obohacení“ vzorku (qPCR)

Při kvantitativní PCR nebo-li Real-Time PCR je v každém cyklu reakce kvantifikováno přibývající množství produktu. Princip detekce amplifikovaného produktu spočívá v zaznamenávání změny intenzity fluorescenčního záření v průběhu PCR, která je přímoúměrná množství nově vytvořené DNA. Daný fluorescenční signál je obvykle zajištěn použitím interkalačního barviva nebo specifických sond (URL8).

Zhodnocení míry kvantifikace se provádí na základě výpočtu amplifikační křivky a hodnoty C_t (Cycle Threshold), při níž dochází k nárůstu fluorescence nad prahovou hodnotu pozadí. Pro zpracování výsledků Real-Time PCR se využívá metody absolutní nebo relativní kvantifikace (URL8). V této studii byla aplikována metoda absolutní kvantifikace, která umožňuje stanovení výchozího počtu kopií daných molekul. Princip metody je založen na sestavení kalibrační křivky pro řadu standardů, ze které se následně odvozuje koncentrace neznámého vzorku.

Při realizaci qPCR bylo postupováno dle pokynů uvedených v protokolu dodaném výrobcem⁶.

- 1) 1 ml 10X Primer Premix byl smíchán s 5 ml 2X KAPA SYBR[®] FAST qPCR Master Mix, který obsahuje interkalační barvivo SYBR[®] Green I dye.
- 2) Ředění – vzorek DNA knihoven byl pro kvantifikaci vyředěn 10 000x a 50 000x. Pro ředění byl využit ředící pufr (10 mM Tris-HCl + 0,05% Tween[®] 20; pH 8,0).
- 3) Ke 4 μ l každého DNA Standardu 1 – 6, jednotlivých ředění vzorku DNA knihoven a PCR vody (negativní kontrola) bylo přidáno po 6 μ l Master Mixu s Primer Premixem a výsledné směsi byly nanášeny na PCR destičku. Všechny DNA standardy, ředění knihoven i negativní kontrola byly zpracovávány v duplikátech.
- 4) Metoda qPCR byla provedena pomocí přístroje LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche Diagnostics, USA) dle příslušného teplotního protokolu (*viz Tabulka XII*).

⁶ Kapa Biosystems (2014): KAPA Library Quantification Kit Illumina[®] platforms v6.14, Kapa Biosystems: USA

Tabulka XII: Teplotní profil qPCR reakce

Teplotní profil reakce	
95 °C	5 min
95 °C (denaturace)	30 s
60 °C (annealing, extenze)	45 s
65 – 95 °C	analýza křivky tání

5) Analýza dat probíhala za využití analyzačního modulu absolutní kvantifikace a metody hledání maxima druhé derivace. Hodnota C_t je tak určena jako bod (odpovídající maximu druhé derivace křivky), ve kterém se mění průběh amplifikační křivky. Pro ověření, zda-li nespecifické amplifikační produkty, dimery primerů a jiné artefakty neovlivňují C_t hodnoty vzorků, byla provedena analýza křivky tání. Vše je zcela automaticky řízeno příslušným softwarem bez nutnosti uživatelského zásahu.

4.3.2 Sekvenování

Vzorek DNA knihoven byl sekvenován pomocí sekvenátoru MiSeq V2 (300 cyklů, 2x151 bp) (Illumina, USA), který funguje na bázi NGS (Next-Generation Sequencing) a umožňuje masivně paralelní sekvenování vybraných úseků DNA. Princip této technologie je zmíněn výše (viz úvod kapitoly 4.3). Před samotným procesem sekvenování bylo nutné knihovny vzorků upravit denurací a zředěním. Navíc byla pro vyrovnání nedostatku sekvenční diverzity připravena kontrolní knihovna PhiX (Illumina, USA), která byla následně zkombinována s knihovnami vzorků. Výsledná směs byla přenesena do reakční kazety a bylo přistoupeno k sekvenaci provedené dle doporučení výrobce, v našem případě pro 15 pM knihovny. Jednotlivé úkony byly provedeny v souladu s protokoly poskytnutými výrobcem^{7,8}. Celý proces sekvenování je plně automatizovaný bez nutnosti uživatelského zásahu.

Použitý kit (viz Tabulka XIII), reagentie a pomůcky:

Tabulka XIII: Složení kitu na sekvenaci

MiSeq® v2 Reagent Kit (300 cycles) (Box 1 & 2) (Illumina, USA)	
Box 1	Box 2
Reagent Cartridge	PR2 Bottle - Incorporation Buffer 500ml
HT1 Hybridization Buffer 4,5ml	PE MiSeq® Flow Cell

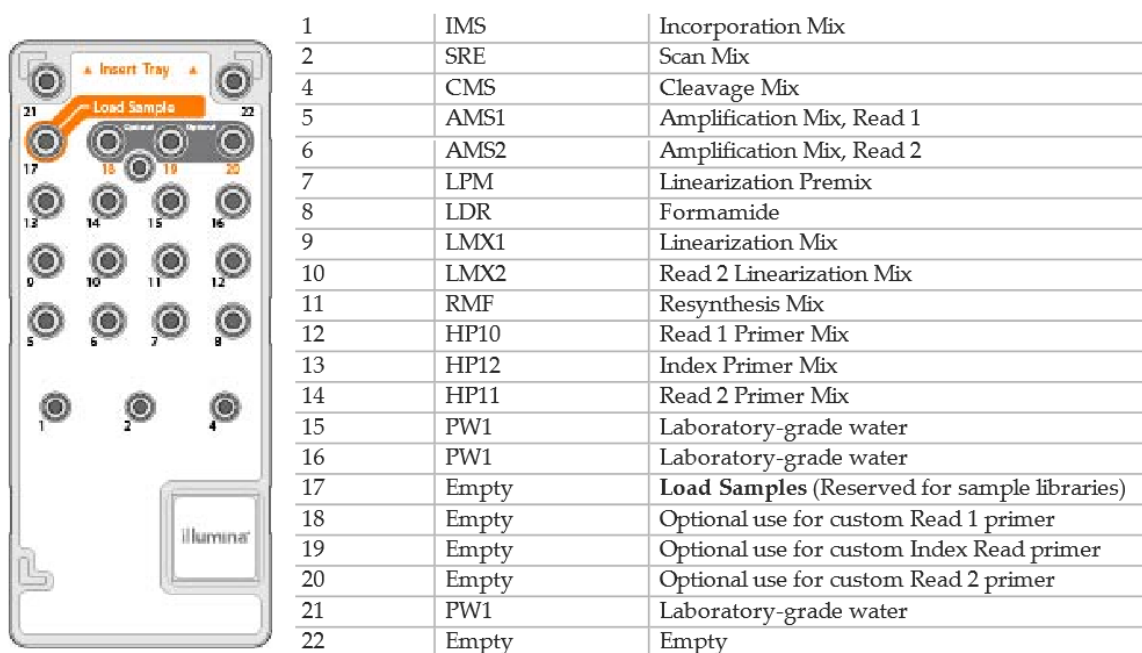
⁷ Illumina (2013): Preparing Libraries for Sequencing on the MiSeq®, Illumina: USA

⁸ Illumina (2015): MiSeq® System Guide, Illumina: USA

Illumina PhiX Control v3 (Illumina, USA)	Minicentrifuga
1,0 N NaOH	Vortex mixer
10 mM Tris-Cl (pH 8,5 + 0,1% Tween 20)	Mikropipety se špičkami
Voda (laboratorní kvalita)	Zkumavky 0,5 ml

- 1) Příprava roztoku NaOH – k přípravě 1 ml 0,2 N NaOH bylo použito 800 μ l PCR vody a 200 μ l 1,0 N NaOH.
- 2) Denaturace a zředění DNA – v tomto kroku bylo postupováno dle protokolu pro denaturaci a ředění 4 nM knihoven.
 - K denaturaci DNA bylo smíšeno 5 μ l 4 nM roztoku knihoven vzorků s 5 μ l 0,2 N NaOH a směs byla inkubována 5 min při pokojové teplotě. Poté bylo ke směsi připipetováno 990 μ l předchlazeného HT1 pufru, vznikla nám tak 20 pM denaturovaná knihovna (roztok knihoven vzorků) v 1 mM NAOH.
 - K získání 600 μ l 15 pM knihovny (roztok knihoven vzorků) bylo 450 μ l 20 pM denaturované knihovny naředěno 150 μ l předchlazeného HT1 pufru.
- 3) Příprava PhiX kontrolní knihovny – k přípravě 4 nM PhiX knihovny byly použity 2 μ l roztoku 10 nM PhiX knihovny a 3 μ l 10 mM Tris-Cl (pH 8,5 + 0,1 % Tween 20).
 - Denaturace PhiX knihovny – směs 5 μ l 4 nM PhiX knihovny a 5 μ l 0,2 N NaOH byla inkubována 5 min při pokojové teplotě. Následně bylo ke směsi přidáno 990 μ l předchlazeného HT1 pufru, aby vznikla 20 pM PhiX knihovna.
 - Ředění denaturované PhiX knihovny – 375 μ l 20 pM PhiX knihovny bylo zředěno 225 μ l předchlazeného HT1 pufru k dosažení finální koncentrace 12,5 pM.
- 4) Zkombinování knihoven vzorků s PhiX knihovnou – upravené knihovny byly spojeny v tomto množství 570 μ l roztoku knihoven vzorků a 30 μ l PhiX knihovny.
- 5) Příprava na sekvenaci – na sekvenátoru byl spuštěn příslušný promývací program (promývací kazeta). Reakční kazeta (Reagent Cartridge) byla rozmrazena ponořením

po rysku do vodní lázně pokojové teploty. Průtoková cela (Flow Cell) byla omyta vodou, osušena a umístěna na náležité místo do sekvenátoru. Stejně tak byla vložena do sekvenátoru na konkrétní místo láhev s inkorporačním pufrem (PR2 Bottle). 600 µl směsi knihoven vzorků a Phix kontroly bylo nanášeno do jamky číslo 17 sekvenační kazety (viz Obrázek 12), která byla následně vložena do sekvenátoru výměnou za promývací kazetu. Na přístroji byl nastaven příslušný protokol sekvenace (Sample Sheet) dle doporučení výrobce. Po kontrole průtoku reagensů byl spuštěn sekvenační běh. Po skončení sekvenace byl opět spuštěn příslušný promývací program a použitá sekvenační kazeta byla zlikvidována.



1	IMS	Incorporation Mix
2	SRE	Scan Mix
4	CMS	Cleavage Mix
5	AMS1	Amplification Mix, Read 1
6	AMS2	Amplification Mix, Read 2
7	LPM	Linearization Premix
8	LDR	Formamide
9	LMX1	Linearization Mix
10	LMX2	Read 2 Linearization Mix
11	RMF	Resynthesis Mix
12	HP10	Read 1 Primer Mix
13	HP12	Index Primer Mix
14	HP11	Read 2 Primer Mix
15	PW1	Laboratory-grade water
16	PW1	Laboratory-grade water
17	Empty	Load Samples (Reserved for sample libraries)
18	Empty	Optional use for custom Read 1 primer
19	Empty	Optional use for custom Index Read primer
20	Empty	Optional use for custom Read 2 primer
21	PW1	Laboratory-grade water
22	Empty	Empty

Obrázek 12: Předplněná reakční kazeta s popisem umístění jednotlivých reagensů
(upraveno dle ⁹)

⁹ Illumina (2012): MiSeq Reagent Kit Reagent Preparation Guide, Illumina: USA

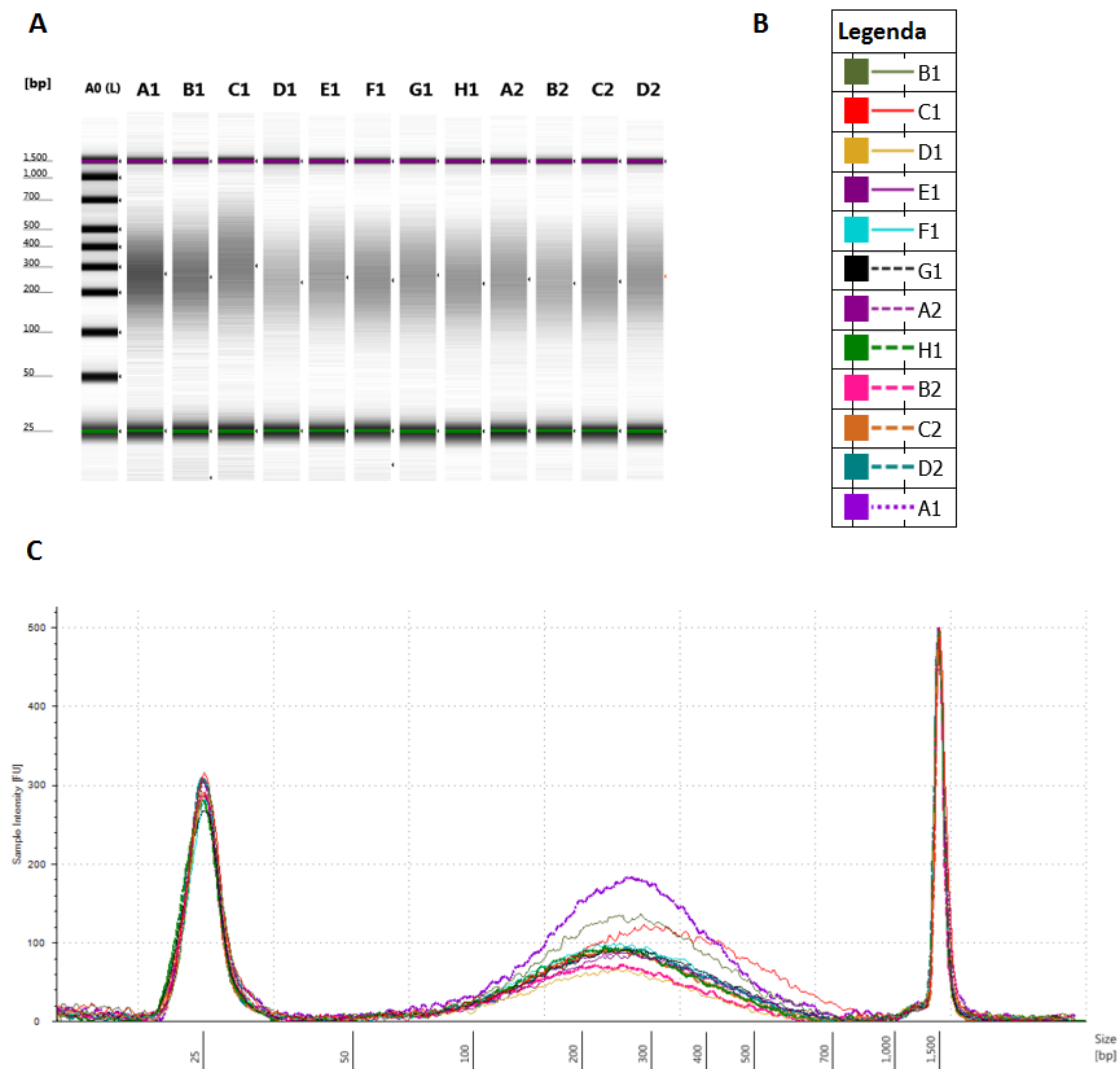
4.4 ANALÝZA DAT

Výsledná NGS data byla podrobena analýze, která byla provedena v souladu s doporučeními poskytnutými výrobcem Roche NimbleGen¹⁰ (Roche Diagnostics, 2015). Jako referenční genom byla použita verze hg38. Pro mapování na referenční genom byl vyžit software BWA 0.7.13 (Burrows-Wheeler Aligner) a pomocný algoritmus Burrowsova-Wheelerova transformace, které umožnily indexování referenčního genomu a zarovnání sekvenačních readů [114]. Následně pomocí programu Trimmomatic 0.32 [115] byly odstraněny adaptéry a prostřednictvím softwaru Picard Tools 1.110 byly eliminovány PCR duplikáty (URL9). Odhalení přítomnosti mutací tzv. variant calling a jejich filtrování bylo zajištěno využitím programů SAMtools 1.3 a BCFtools 1.3 [116], [117]. Softwarem R (R Core Team 2016) (URL10) byla určena hloubka pokrytí (depth of coverage) pro každou pozici na referenčním genomu, která odpovídá genu pro EDA. Tento parametr vyjadřuje průměrný počet kopií vzorku DNA, které obdržíme sekvenováním [118]. Vizualizace sekvenačních dat byla provedena pomocí nástroje IGV 2.3.88 (Integrative Genomics Viewer) [76], [77].

¹⁰ Roche (2015): Sequencing Solutions Technical Note: How To... Evaluate NimbleGen SeqCap EZ Target Enrichment Data, Roche Diagnostics: Německo

5 VÝSLEDKY

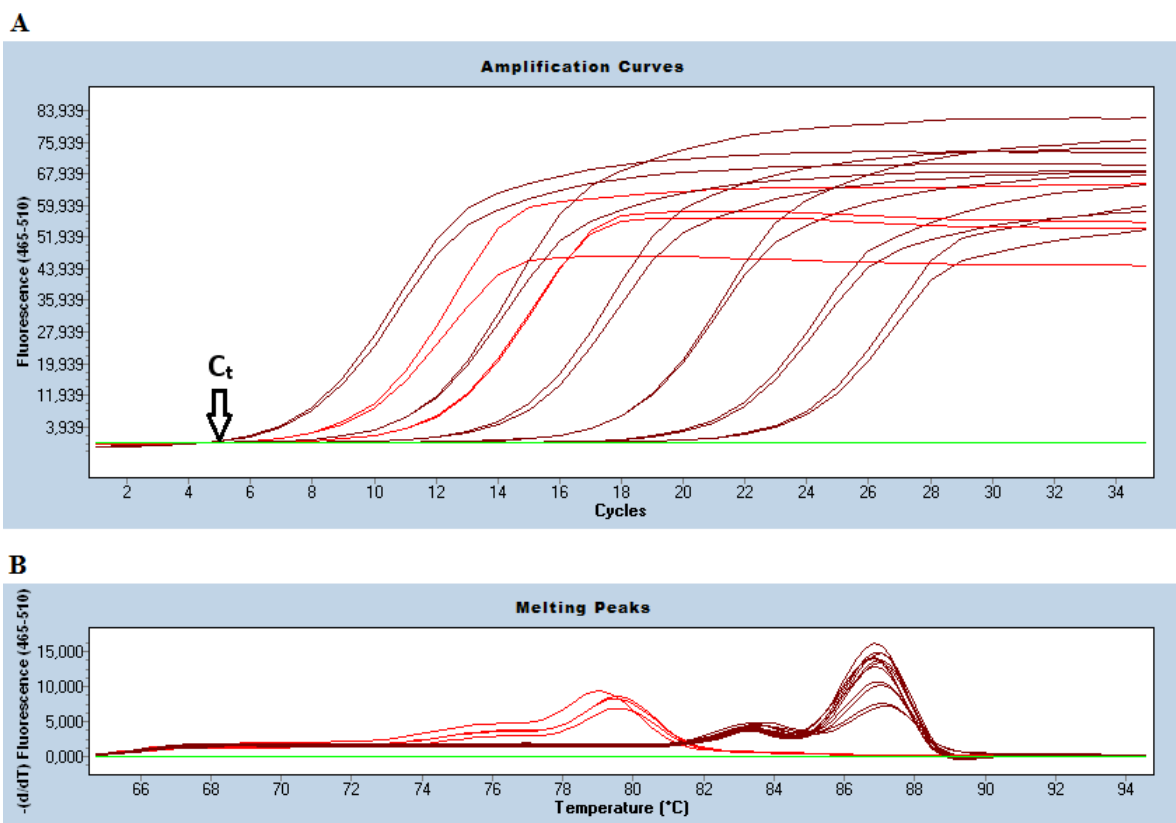
5.1 ANALÝZA KVALITY FRAGMENTACE DNA



Obrázek 13: Ukázka výsledků ověření kvality fragmentace DNA: *A* - Obrázek gelu s vyznačenou průměrnou délkou fragmentů DNA jednotlivých vzorků a délkou fragmentů DNA standardů (25 bp, 1500 bp), *B* – Legenda ke grafu *C*, *C* – Graf fragmentačních profilů jednotlivých vzorků (píky v oblasti 25 bp a 1500 bp značí standardy)

Na *Obrázku 13* jsou zobrazeny výsledky měření kvality fragmentace na přístroji 2200 TapeStation System (Agilent, USA) pro 12 vzorků. V grafu *C* je zaznamenáno rozložení délek fragmentů DNA v rámci jednotlivých vzorků. Výsledky analýzy dokládají úspěšnost fragmentace DNA.

5.2 KVANTITATIVNÍ PCR



Obrázek 14: Ukázka výsledků ověření míry „obohacení“ vzorků

A - Amplifikační křivky, B - Křivky tání

(hnědé křivky - standardy, červené křivky - ředění vzorku, zelená křivka - negativní kontrola)

Na *Obrázku 14* je zobrazena ukázka amplifikačních křivek (*A*) a křivek tání (*B*) pro duplikáty 6 standardů, 2 ředění vzorku (10000x a 50000x) a negativní kontrolu.

Z amplifikačních křivek jsou odečteny C_t hodnoty, jejichž rozptyl v rámci duplikátů by měl být nižší než 0,3 cyklu. C_t hodnoty jsou následně zprůměrovány pro každý duplikát. Je vypočten rozdíl průměrné C_t hodnoty pro dané ředění vzorku a příslušný standard. Následně je účinnost reakce umocněna na hodnotu vypočteného rozdílu a výsledek udává násobek obohacení vzorku.

Křivka tání využívá odlišných teplot tání různých PCR produktů. Ukazuje jak se mění intenzita fluorescence v závislosti na teplotě. Pokud má křivka tání více než jeden vrchol, vznikají při reakci i produkty nespecifické. V uvedeném příkladu vznikají pouze produkty specifické, z toho vyplývá, že C_t hodnoty vzorků z tohoto hlediska nejsou nijak negativně ovlivněny.

5.3 VYHODNOCENÍ DENTÁLNÍ AGENEZE

Tabulka XIV: Přehled fenotypů pacientů s údaji o pohlaví a míře dentální ageneze

Vzorek	Pohlaví	Stálý chrup (kvadranty)																														Poznámka		
		Horní pravý kvadrant (q1)						Horní levý kvadrant (q2)						Dolní pravý kvadrant (q4)						Dolní levý kvadrant (q3)														
		18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	
1	muž	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		O		
2	muž	x									x																						H	
3	žena	x	x		x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		O		
4	muž	x									x	x																					O	
5	žena	x									x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		O		
6	žena										x																						H*	
7	žena										x																						H	
8	žena																																H	
9	muž	x									x	x																					O	
10	muž	x									x																						O	
11	žena										x																						H	
12	žena																																H	
13	muž	x																															H	
14	žena										x																						H	
15	muž										x																						H	
16	žena	x	x		x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	O**		
17	žena	x	x																														H	
18	žena										x																						H	
19	muž										x																						H	
20	žena										x																						H	
21	žena	x																															H	
22	muž	x									x																						H	
23	muž	x																															O	
24	žena	x																															O	
25	žena	x									x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	O; ED		
26	muž																																O	
27	žena																																H	
28	muž	x									x																						O	
29	žena	x									x																						H	
30	žena										x																						H	
31	muž																																H	
Součty agenezí		17	4	1	13	8	9	16	0	0	10	9	8	12	1	6	18	19	8	2	16	4	3	5	10	10	5	4	3	17	2	7	20	267

*hypodoncie 35 - perzistence zubu 75, čípkovité zuby - 1,2,22/**dočasný chrup: dolní čelist - srostlice - 81, 82, 71, 72

H = hypodoncie; O = oligodoncie; ED = ektoodermální dysplazie

V *Tabulce XIV* jsou zaznamenány absence jednotlivých zubů u konkrétních osob spolu se zhodnocením míry dentální ageneze. Ze souboru 31 osob tedy celkem 992 zubů bylo 267 zubů absentujících (26,92 %). Z tohoto počtu 39,33 % tvořila ageneze molárů (105 zubů; včetně třetích molárů), 30,33 % ageneze premolárů (81 zubů), 20,97 % ageneze řezáků (56 zubů) a 9,36 % ageneze špičáků (25 zubů). U 19 osob (61,29 %) byla diagnostikována hypodoncie a u zbylých 12 osob (38,71 %) oligodoncie. U dvou pacientů byly nalezeny anomálie i u dočasného chrupu (vzorek č. 6 a 16). U jednoho pacienta byl navíc diagnostikován syndrom ektodermální dysplazie (vzorek č. 25).

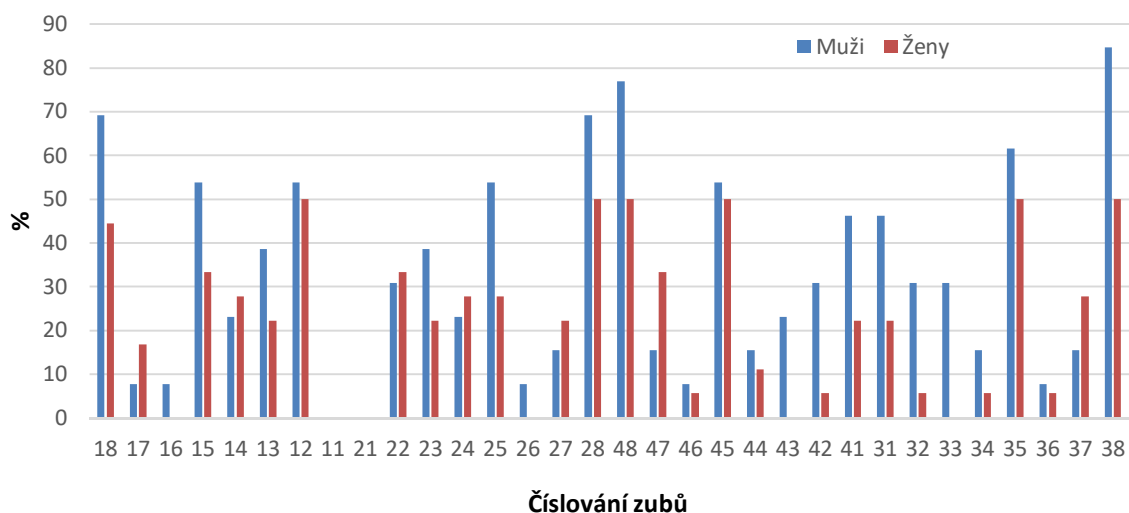
Tabulka XV: Ageneze konkrétních zubů u mužů (13 vzorků)

Ageneze	9	1	1	7	3	5	7	0	0	4	5	3	7	1	2	9
Číslování zubů	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
Ageneze	10	2	1	7	2	3	4	6	6	4	4	2	8	1	2	11

Tabulka XVI: Ageneze konkrétních zubů u žen (18 vzorků)

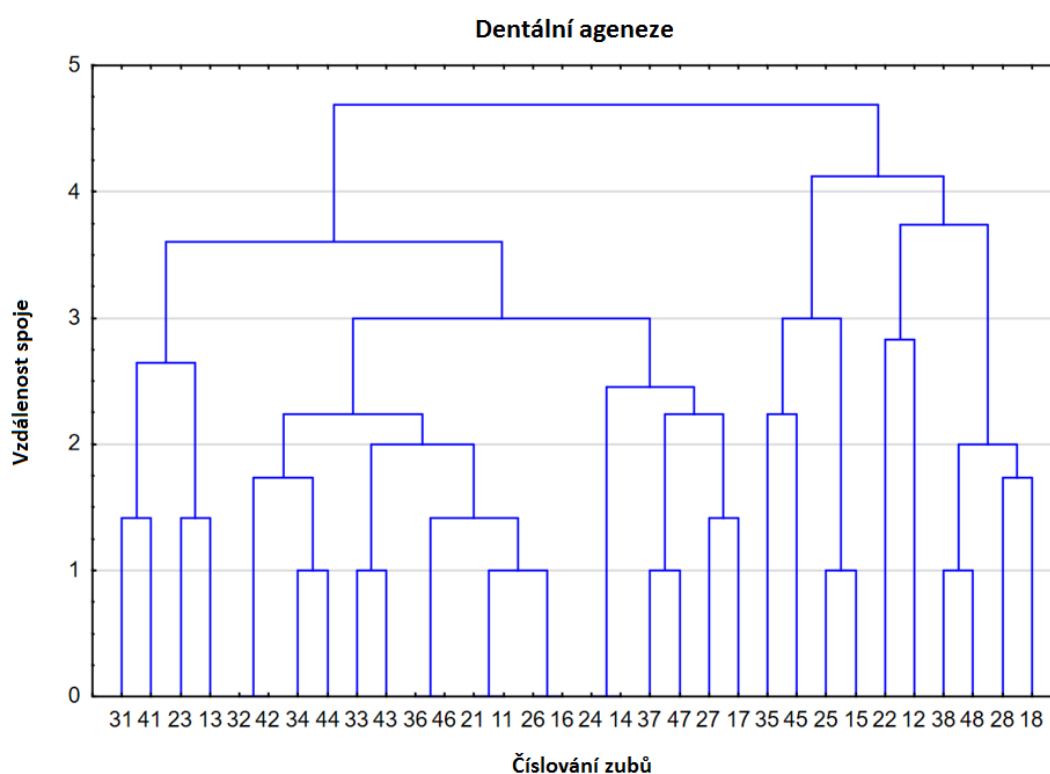
Ageneze	8	3	0	6	5	4	9	0	0	6	4	5	5	0	4	9
Číslování zubů	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
Ageneze	9	6	1	9	2	0	1	4	4	1	0	1	9	1	5	9

Procentuální ageneze



Obrázek 15: Graf procentuální ageneze jednotlivých zubů vztahované na pohlaví

V *Tabulce XV a XVI* jsou uvedeny počty agenezí jednotlivých zubů vztažených na pohlaví. Procentuální srovnání míry absence konkrétních zubů u mužů a žen je pak znázorněno v grafu (viz *Obrázek 15*). Ze získaných údajů vyplývá, že nejčastěji chybějícími zuby jsou třetí moláry, a to u obou pohlaví a ve větší míře u mužů. Druhým nejčastěji absentujícím typem zubu jsou premoláry, jejichž procentuální zastoupení ageneze u mužů je ekvivalentní pro horní i dolní čelist. Oproti tomu u žen převažuje absence premolárů dolní čelisti. Dále je patrná ageneze horního postranního řezáku č. 12 u obou pohlaví a dolních středních řezáků u mužů.



Obrázek 16: *Graf shlukové analýzy dentálních agenezí znázorňující souvislosti mezi absencemi jednotlivých zubů (Euklidovy vzdálenosti, metoda Úplné spojení)*

V programu Statistica 13 (StatSoft, USA) byl vytvořen graf (viz *Obrázek 16*) vyhodnocující vzájemné vztahy mezi absencemi jednotlivých zubů u zkoumaného souboru pacientů. Z grafu je zřejmá bilaterální souměrnost, kdy dochází k agenzi určitého zubu a zároveň jeho protilehlého partnera v jedné z čelistních kostí. Za zmínku stojí i souvislost mezi absencemi třetích molárů, postranních premolárů a horních postranních řezáků. Tato data potvrzují platnost předešlých výsledků.

5.4 SEKVENACE VZORKŮ DNA

Tabulka XVII: Přehled identifikovaných mutací a jejich specifikací

Vzorek	Exon	Pozice mutace na chromozomu [bp]	Reference	Alterace	Genotyp	Rs číslo
1	exon 4	70027876	*	**	***	rs397516665
	exon 4	70027912	A	T	TT	-
	exon 8	70038665	T	G	GG	rs3795170****
2	exon 8	70038665	T	G	GG	rs3795170
3	-	-	-	-	-	-
4	exon 8	70037013	C	T	TT	rs41310621
	exon 8	70038665	T	G	GG	rs3795170
5	exon 8	70038665	T	G	GG	rs3795170
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	exon 8	70038665	T	G	TG	rs3795170
9	exon 8	70038665	T	G	GG	rs3795170
10	exon 8	70038665	T	G	GG	rs3795170
11	exon 8	70037013	C	T	CT	rs41310621
	exon 8	70038665	T	G	GG	rs3795170
12	-	-	-	-	-	-
13	exon 8	70038665	T	G	GG	rs3795170
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	exon 8	70038665	T	G	TG	rs3795170
18	exon 8	70037013	C	T	CT	rs41310621
	exon 8	70038665	T	G	TG	rs3795170
19	-	-	-	-	-	-
20	exon 8	70037030	C	T	CT	rs138107904
	exon 8	70038665	T	G	TG	rs3795170
21	exon 8	70038665	T	G	TG	rs3795170
22	-	-	-	-	-	-
23	exon 8	70038665	T	G	GG	rs3795170
24	-	-	-	-	-	-
25	exon 8	70038665	T	G	TG	rs3795170
26	exon 8	70037349	G	A	AA	rs41305407
27	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-
29	exon 8	70038665	T	G	GG	rs3795170
30	exon 8	70037030	C	T	CT	rs138107904
	exon 8	70038665	T	G	TG	rs3795170
31	exon 8	70037013	C	T	TT	rs41310621
	exon 8	70038665	T	G	GG	rs3795170

*tggaccaatggcctccaggacccaggacctccaggacc/** tggacc/**homozygotní stav inzerčně-deleční mutace (I/D)/ ****rs3795170 = rs17264783

V *Tabulce XVII* je uveden přehled identifikovaných mutací nalezených v exonech genu pro EDA. Důležitým kritériem pro selekci dat byla hloubka pokrytí (depth of coverage), pro kterou byla zvolena minimální hodnota průměru 20. Jednotlivé genotypy byly určeny pomocí programu IGV 2.3.88 (Integrative Genomics Viewer). K identifikovaným mutacím byla přiřazena rs čísla, která byla dohledána v databázi NCBI (The National Center for Biotechnology Information) (URL11). Pouze v jednom případě u mutace g.70027912A>T nebylo nalezeno rs číslo. U pacientů, u kterých nebyla identifikována žádná mutace v exonech genu pro EDA, ačkoli u nich byla diagnostikována dentální ageneze, jsou v buňkách *Tabulky XVII* uvedeny pomlčky. Tento fakt může být způsoben přítomností určité mutace v sekvencích jiných genů, které se podílí na procesu odontogeneze.

Tabulka XVIII: Souhrn identifikovaných mutací

Gen	Exon	Mutace			Počet pacientů	Zastoupení mutace ve zkoumaném souboru [%]
		ID	Rs číslo	Oblast genu*		
EDA	Exon 4	g.70027876-70027918	rs397516665	CDS	1	3,23
		c.A581T	-	CDS	1	3,23
	Exon 8	g.70037349G>A	rs41305407	3'-UTR	1	3,23
		g.70037030C>T	rs138107904	3'-UTR	2	6,45
		g.70037013C>T	rs41310621	3'-UTR	4	12,90
		g.70038665T>G	rs3795170	3'-UTR	18	58,06
	Neidentifikována mutace				13	41,94

*CDS = coding sequence/UTR = untranslated region

Dle *Tabulky XVIII* bylo ve zkoumaném souboru nalezeno celkem 6 mutací. Dvě z nich byly lokalizovány v kódující sekvenci exonu 4 genu pro EDA pouze u jednoho pacienta. První byl homozygotní inzerčně-deleční polymorfismus v pozici g.70027876-70027918 s rizikovou deleční alelou D (rs397516665), která je asociována se ztrátou 36 nukleotidů v pozici 546-581 (c.546_581del36) respektive 185. (Asn) až 196. (Pro) aminokyseliny bez posunu čtecího rámce (URL12). Druhou pak potenciální homozygotní záměna adeninu za thymin v pozici 581 cDNA studovaného genu (bez rs čísla), která nijak neovlivňuje kódování aminokyselin (jako 196. aminokyselina je zachován prolin).

Zbylé 4 mutace byly identifikovány v nekódující 3'-UTR oblasti exonu 8 genu pro EDA. Největší zastoupení zde měla mutace (rs3795170), u které se opakovaně vyskytoval heterozygotní stav nebo homozygotní záměna T/G v pozici 70038665.

nukleotidu gDNA. Druhou nejčastěji přítomnou mutací v daném souboru byla mutace (rs41310621), která byla analyzována jako heterozygotní i homozygotní substituce cytosinu za thymin v místě 70037013. nukleotidu gDNA. Dále byl v 3'-UTR oblasti identifikován heterozygotní stav C/T 70037030. báze (rs138107904) a homozygotní záměna G/A 70037349. báze (rs41305407) gDNA.

Z důvodu malého počtu účastníků studie a velké rozmanitosti kombinací nebylo možné asociovat zjištěné dentální ageneze s jednotlivými mutacemi. Za tímto účelem byl proveden Mann-Whitneyův test (pro mutaci rs3795170 s ohledem na pohlaví) v programu Statistica 13 (StatSoft, USA), jehož výsledné p-hodnoty ($p > 0,05$) nepotvrdily žádné statisticky významné souvislosti mezi analyzovanými daty.

6 DISKUZE

V posledních letech přibývá počet odborných publikací a vědeckých článků zabývajících se tématem dentálních agenezí. Tato studie byla provedena za účelem odhalení role exonů genu pro ectodysplasin A (EDA) v patologii hypodontie zubů trvalého chrupu. Ačkoli zkoumaný vzorek české populace není velmi početný, jeho věková rozmanitost a ekvivalence zastoupení obou pohlaví jsou poměrně slušné.

Podle Larmoura a kol. (2005) se s následky ageneze zubu trvalého chrupu (vyjma třetích molárů) potýká zhruba 2,6 % až 11,3 % obecné populace [90]. Prevalence oligodontie se ve všeobecné populaci pohybuje v rozmezí od 0,14 % do 0,25 % [82], [84], [119].

Dřívější studie se shodují, že nejběžnějším případem je ageneze třetího moláru, následovaná agenezí druhého dolního premoláru, a třetím nejčastěji chybějícím zubem je horní postranní řezák [82], [84], [119], [120]. V České republice je agenezí třetího moláru postiženo 22,5 % obyvatelstva [121]. Tyto údaje korespondují v rámci ageneze jednotlivých typů zubů se získanými výsledky této studie, avšak pro potvrzení konečné platnosti výsledků pro absenci konkrétních zubů by bylo vhodné provést šetření na větším a různorodějším vzorku populace.

Dle mnoha studií realizovaných napříč různými populacemi k jednostrannému výskytu ageneze zubu dochází v menší míře, poměrně typickým případem je bilaterální výskyt dentální ageneze [122]–[124]. Tuto hypotézu podporují i výsledky výzkumu z naší studie.

Dalšími faktory, které hrají roli v prevalenci ageneze zubů jsou pohlaví a kontinenty [84]. Ženy oproti mužům jsou náchylnější ke vzniku dentální ageneze [82], [90], [119]. V Evropě a Austrálii trpí příslušníci obou pohlaví touto poruchou častěji než běloši v Severní Americe [84], [119], [125]. Z našeho výzkumu vyplývá, že muži mají větší sklony k projevům dentální ageneze v porovnání s ženami. Příčinou by mohla být nedostatečná rozsáhlost studovaného souboru pacientů.

Jedním z mnoha genů zapojených do procesu odontogeneze je gen pro ectodysplasin A (EDA). V databázi NCBI je v současné době uvedeno 291 výskytů spojených mutacemi identifikovanými v sekvenci lidského genu pro EDA, které vykazují klinickou signifikanci (URL13).

V této studii byla odhalena pouze jedna klinicky významná mutace (rs397516665) z celkem 6 detekovaných mutací v exonech studovaného genu. Daná mutace je inzerčně-delečního typu a nachází se v sekvenci 4. exonu v pozici g.70027876-70027918. Tato

oblast se podílí na kódování kolagenové subdomény proteinu, jejíž struktura zahrnuje 19 repetitivních Gly-X-Y motivů. Podle databáze NCBI (URL12) byla vyhodnocena jako patogenní deleční alela D, která je asociována se ztrátou 36 nukleotidů v pozici 546-581 (c.546_581del36) respektive 185. (Asn) až 196. (Pro) aminokyseliny bez posunu čtecího rámce. Genotypová manifestace alely D je spojována se syndromem hypohidrotické ektodermální dysplazie.

Výsledky studií Schneidera H. a kol. (2011), Schneidera P. a kol. (2001) a Lexnera a kol. (2008) podporují získaná data [69], [72], [126]. Ve všech třech studiích byla identifikována deleční mutace c.553_588del36 (p.Asn185_Pro196del) v exonu 5 genu pro EDA, která vykazuje nápadnou podobnost s uvedenou inzerčně-deleční mutací. Nutno podotknout, že autoři studií se řídili odlišnou nomenklaturou exonů, v tomto případě nejdelší transkripční varianta EDA-A1 genu pro EDA zahrnuje exony 1a, 3a a 4-9 [71], [109]. Obě mutace zapříčiňují absenci 4 Gly-X-Y motivů proteinu a způsobují zkrácení kolagenové subdomény, které může mít za následek narušení multimerizace proteinu a následně jeho vazby k receptoru [71].

Schneider H. a kol. (2011), jehož výzkum byl založen na skupině 31 mužů ve věku do 57 let s diagnostikovanými příznaky dentální ageneze a hypohidrotické ektodermální dysplazie vázané na chromozom X, ve své studii tuto hypotézu vyvrací a dokládá, že mutace c.553_588del36 neovlivňuje vazbu ligandu k receptoru. Zároveň však autor připouští možnost absence vlastnosti multimerizace proteinu ectodysplasinu A, pokud je deletována sekvence DNA kódující první polovinu kolagenové domény (bez posunu čtecího rámce). Jako příklad uvádí deleční mutaci c.659_676del18 (p.Pro220_Pro225del) nezpůsobující posun čtecího rámce a 2 „missense“ mutace c.G671T (p.Gly224Val) a c.G643A (p.Gly215Arg) pozměňující glycinová rezidua, které pravděpodobně narušují strukturu Gly-X-Y repetitivních a snižují soudržnost kolagenových helixů [126]. Role uvedených delečních mutací (nezpůsobujících posun čtecího rámce) v patogenezi dentální ageneze není zcela jasná.

Potenciální patogenní mutací by mohla být nově objevená substituce adeninu za thymin v pozici 581. nukleotidu cDNA příslušného genu (c.A581T), která se nalézá rovněž v sekvenci DNA kódující kolagenovou doménu ectodysplasinu A. Mutace nemá vliv na kódování příslušné aminokyseliny. Jako 196. aminokyselina zůstává prolin, který je důležitý pro udržování stability kolagenového helixu [127]. Z uvedeného vyplývá, že mutace c.A581T zřejmě nemá negativní efekt na strukturu proteinu. Jelikož se výzkumu neúčastnila kontrolní skupina pacientů, není možná jednoznačná validace zjištěné mutace.

Zbylé 4 mutace byly identifikovány v nekódující 3'-UTR oblasti exonu 8 genu pro EDA. Největší zastoupení zde měla mutace g.70038665T>G (rs3795170), u které se opakovaně vyskytoval heterozygotní stav nebo homozygotní záměna T/G v pozici 70038665. nukleotidu gDNA. Studie zaměřená na analýzu jednonukleotidových mutací zodpovědných za vznik malokluzí I. třídy u 133 studentů čínské národnosti potvrdila okrajově signifikantní korelaci mezi mutací rs3795170 a dentální anomálií konkrétně stěsnáním zubů ($p = 0,047$) [128], které je z genetického hlediska způsobené nepoměrem mezi velikostí zubů a velikostí čelisti [5]. Alela G vykazovala vyšší hodnotu prevalence u jedinců postižených anomálií [128]. V kombinaci s alelou G mutace rs3764746 (g.70038122G>C), pak daný haplotyp GG vykazoval významnou asociaci se stěsnáním zubů ($p = 0,004$). Jedinci nesoucí si ve své genetické výbavě tento haplotyp jsou náchylnější ke vzniku poruchy [128]. Nadměrná exprese EDA-A1 může mít za následek fenotypový projev zahrnující hyperodoncii a abnormální velikost zubů [129]. Spolupůsobení obou mutací na gen pro EDA může vést k odlišné expresi genu, která zapříčiní vznik nadměrně velkých zubů potažmo stěsnání zubů [128].

Druhou nejčastěji přítomnou mutací v daném souboru byla mutace g.70037013C>T (rs41310621), která byla analyzována jako heterozygotní i homozygotní substituce cytosinu za thymin v pozici g.70037013. Dále byl v 3'-UTR oblasti identifikován heterozygotní stav C/T 70037030. báze (rs138107904) a homozygotní záměna G/A 70037349. báze (rs41305407) gDNA. K posledním třem jmenovaným mutacím nejsou dostupné žádné publikace, které by se zabývaly jejich asociací s problémem dentální ageneze či jiné anomálie.

Regulace genové exprese je zprostředkována především nekódujícími oblastmi genomu [130]. 5' a 3' mRNA netranslatované oblasti se účastní mnoha post-transkripčních regulačních pochodů, které kontrolují lokalizaci mRNA, její stabilitu a translační účinnost. Biologická aktivita 3'-UTR je závislá na jejím strukturním složení. Regulace zprostředkovaná 3'-UTR oblastí zahrnuje antisense RNA interakce, RNA-proteinové interakce (zde patří i multiproteinové komplexy), CPEs (cytoplasmic polyadenylation elements) a poly-A konec [130]. K antisense RNA interakcím se řadí interakce zahrnující microRNA (miRNA), 19-25 nukleotidů dlouhé nekódující jednovláčkové RNA, které se váží do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex) a komplementárním navázáním k 3'-UTR oblasti mRNA negativně regulují expresi genů [131]. MiRNA jsou důležité regulační komponenty, které se významnou měrou podílí na řízení signálních drah zapojených do procesu odontogeneze [131]. Z uvedených informací vyplývá, že výše zmíněné mutace identifikované ve 3'-UTR oblasti mRNA mohou narušením struktury

mRNA sehrát klíčovou úlohu v regulaci exprese genu pro EDA a produkci proteinu ectodysplasinu A.

Pro analýzu korelací mezi zjištěnými dentálními agenezemi a nejčastěji detekovanou mutací rs3795170 s ohledem na pohlaví byl proveden Mann-Whitneův test, jehož výsledné p-hodnoty ($p > 0,05$) nepoukázaly na žádnou statisticky signifikantní souvislost mezi získanými údaji. Interpretovat výsledky obdobných analýz týkajících se problematiky dentální ageneze je poměrně složité. Procesu vzniku a vývoje dentice u savců se účastní obrovské množství genů, jejichž početné mutace mohou být potenciálními prekurzory poruchy. Nápomocným řešením by mohlo být obohacení výzkumu o kontrolní skupinu probandů.

Identifikace pouze 6 mutací v genu pro EDA u zkoumaného souboru by mohla být způsobena důsledkem zvolené relativně vysoké průměrné hodnoty hloubky pokrytí, která nepochybně svědčí o kvalitě získaných dat. Systematická analýza relevantních klinických vyšetření a intenzivní screening mutací genu pro EDA u rozsáhlejšího a různorodějšího vzorku populace by mohly v budoucnu významně přispět k odlišení funkčně důležitých mutací zapojených do patogeneze dentálních anomálií.

7 ZÁVĚR

Hypodontie a oligodontie charakterizují míru aberace od fyziologického počtu zubů. Jedná se o dentální ageneze, které se řadí mezi poruchy vývoje dentice. Tyto odchylky mají genetický původ odvozený od mutací v genech, které se účastní vzniku a vývoje zubních zárodků.

Studie potvrdila hypotézu dřívějších výzkumů, že nejběžnějším případem je ageneze třetího moláru, následovaná agenezí druhého dolního premoláru, a třetím nejčastěji chybějícím zubem je horní postranní řezák. Dále bylo zjištěno, že bilaterální výskyt dentální ageneze je poměrně obvyklý jev. Prevalence dentální ageneze v závislosti na pohlaví nekorelovala s uvedenými studiemi. Muži byli více náchylní ke vzniku studované poruchy.

Výzkum zahrnoval probádání vztahu mezi mutacemi exonů genu pro ectodysplasin A a zjištěnými poruchami vývoje lidské dentice. Studovaný soubor zahrnoval 31 osob předškolního a školního věku, z nichž bylo 13 mužského a 18 ženského pohlaví. Výsledky sekvenční analýzy potvrdily přítomnost 6 mutací, které byly lokalizovány ve 4. a 8. exonu genu pro EDA.

Ve čtvrtém exonu genu pro EDA byla identifikována homozygotní inzerčně-deleční mutace v pozici g.70027876-70027918 s patogenní deleční alelou D, která nezpůsobuje posun čtecího rámce. Její lokalizace v sekvenci DNA kódující kolagenovou subdoménu, může mít za následek znemožnění vazby proteinu EDA k receptoru EDAR.

Dále se zde nacházela potenciální homozygotní záměna A/T v pozici 581, která neovlivňuje kódování aminokyselin a zřejmě nemá negativní efekt na strukturu proteinu.

Zbylé mutace byly nalezeny v nekódující 3'-UTR oblasti osmého exonu genu pro EDA. Nejčastějším výskytem byl heterozygotní stav nebo homozygotní záměna T/G v pozici 70038665. nukleotidu gDNA. V dané oblasti byla také identifikována heterozygotní i homozygotní substituce cytosinu za thymin na nukleotidové pozici g.70037013, heterozygotní mutace g.70037030C>T a homozygotní záměna g.70037349G>A. 3'-UTR oblast se účastní mnoha post-transkripčních regulačních pochodů, které kontrolují lokalizaci mRNA, její stabilitu a translační účinnost. Uvedené mutace mohou významně ovlivnit regulaci exprese genu pro EDA. Analýza korelace mezi genotypem a fenotypem nepřinesla žádné signifikantní výsledky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] M. Vokurka a J. Hugo, *Velký lékařský slovník*, 8. vyd. Praha: Maxdorf, 2008.
- [2] A. L. Mescher, *Junqueira's basic histology: text and atlas*, 13. vyd. Singapore: McGraw-Hill Education, 2013.
- [3] T. Dostálová a M. Seydlová, *Stomatologie*, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2008.
- [4] K. Jansová a M. Eber, *Preklinická stomatologie.*, 3. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, 2000.
- [5] T. Weber, *Memorix zubního lékařství*, 2. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006.
- [6] *The Challenge of Oral Disease – A call for global action. The Oral Health Atlas.*, 2. vyd. Ženeva: FDI World Dental Federation, 2015.
- [7] J. Mazánek, *Zubní lékařství: propedeutika*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2014.
- [8] J. Šedý, *Kompendium stomatologie I*, 1. vyd. Praha: Triton, 2012.
- [9] J. Wotke, *Patologie orofaciální oblasti*, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001.
- [10] J. Mazánek a F. Urban, *Stomatologické repetitorium*, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003.
- [11] I. Thesleff, „Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis“, *J. Cell Sci.*, roč. 116, č. 9, s. 1647–1648, 2003.
- [12] J. Mazánek, *Stomatologie: minimum pro praxi*, 1. vyd. Praha: Triton s.r.o., 1999.
- [13] E. Matalova, J. Fleischmannova, P. T. Sharpe, a A. S. Tucker, „Tooth Agensis: from Molecular Genetics to Molecular Dentistry“, *J. Dent. Res.*, roč. 87, č. 7, s. 617–623, 2008.
- [14] D. Lin *et al.*, „Expression survey of genes critical for tooth development in the human embryonic tooth germ“, *Dev. Dyn.*, roč. 236, č. 5, s. 1307–1312, 2007.
- [15] A. Hloušková *et al.*, „Sekvence části genu pro PAX9 a možná spojitost nalezených polymorfizmů s agenezí zubů“, *Ortodoncie*, roč. 23, č. 1, s. 44–51, 2014.
- [16] G. Mues, H. Kapadia, Y. Wang, a R. N. D'Souza, „Genetics and Human Malformations“: *J. Craniofac. Surg.*, roč. 20, č. Suppl 2, s. 1652–1654, 2009.
- [17] Y. D. ZHANG, Z. CHEN, Y. Q. SONG, C. LIU, a Y. P. CHEN, „Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells“, *Cell Res*, roč. 15, č. 5, s. 301–316, 2005.
- [18] I. Thesleff, „The genetic basis of tooth development and dental defects“, *Am. J. Med. Genet. A.*, roč. 140A, č. 23, s. 2530–2535, 2006.

- [19] O. Šerý, P. Krejčí, O. Bonczek, a I. Míšek, „Využití moderních DNA metod ve výzkumu molekulárních příčin hypodontie“, *Ortodoncie*, roč. 22, č. 3, 2013.
- [20] V. Kořínek a R. Sedláček, „Transgenní technologie a laboratorní myši“, *Vesmír*, roč. 91, č. 12, s. 720–721, 2012.
- [21] C. Savage-Dunn, „TGF- β signaling“, *WormBook*, roč. 9, č. 1, 2005.
- [22] E. Passarge, *Color atlas of genetics*, 3rd ed., And updated. Stuttgart ; New York: Thieme, 2007.
- [23] V. A. Botchkarev *et al.*, „Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction“, *Nat. Cell Biol.*, roč. 1, č. 3, s. 158–164, 1999.
- [24] J. Jernvall, T. Aberg, P. Kettunen, S. Keranen, a I. Thesleff, „The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot“, *Development*, roč. 125, č. 2, s. 161, 1998.
- [25] X.-P. Wang, M. Suomalainen, C. J. Jorgez, M. M. Matzuk, S. Werner, a I. Thesleff, „Follistatin Regulates Enamel Patterning in Mouse Incisors by Asymmetrically Inhibiting BMP Signaling and Ameloblast Differentiation“, *Dev. Cell*, roč. 7, č. 5, s. 719–730, 2004.
- [26] S. Vainio, I. Karavanova, A. Jowett, a I. Thesleff, „Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development“, *Cell*, roč. 75, č. 1, s. 45–58, 1993.
- [27] A. S. Tucker, K. L. Matthews, a P. T. Sharpe, „Transformation of Tooth Type Induced by Inhibition of BMP Signaling“, *Science*, roč. 282, č. 5391, s. 1136–1138, 1998.
- [28] M. Bei a R. Maas, „FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development“, *Development*, roč. 125, č. 21, s. 4325–4333, 1998.
- [29] T. Ogawa, H. Kapadia, J. Q. Feng, R. Raghov, H. Peters, a R. N. D’Souza, „Functional Consequences of Interactions between Pax9 and Msx1 Genes in Normal and Abnormal Tooth Development“, *J. Biol. Chem.*, roč. 281, č. 27, s. 18363–18369, 2006.
- [30] N. Chhabra, M. Goswami, a A. Chhabra, „Genetic basis of dental agenesis - molecular genetics patterning clinical dentistry“, *Med. Oral Patol. Oral Cirugia Bucal*, roč. 19, č. 2, s. 112–119, 2014.
- [31] P. Krejčí, J. Fleischmannova, E. Matalová, a I. Míšek, „Molekulární podstata hypodontie. Souborný referát“, *Ortodoncie*, roč. 16, č. 1, s. 33–39, 2007.
- [32] A. Neubüser, H. Peters, R. Balling, a G. R. Martin, „Antagonistic Interactions between FGF and BMP Signaling Pathways: A Mechanism for Positioning the Sites of Tooth Formation“, *Cell*, roč. 90, č. 2, s. 247–255, 1997.
- [33] C. A. Ferguson, A. S. Tucker, L. Christensen, A. L. Lau, M. M. Matzuk, a P. T. Sharpe, „Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition“, *Genes Dev.*, roč. 12, č. 16, s. 2636–2649, 1998.

- [34] C. A. Ferguson *et al.*, „The role of effectors of the activin signalling pathway, activin receptors IIA and IIB, and Smad2, in patterning of tooth development", *Development*, roč. 128, č. 22, s. 4605–4613, 2001.
- [35] M. Tsang a I. B. Dawid, „Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway", *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.*, roč. 2004, č. 228, s. pe17, 2004.
- [36] C. Kowalczyk-Quintas a P. Schneider, „Ectodysplasin A (EDA) – EDA receptor signalling and its pharmacological modulation", *Cytokine Growth Factor Rev.*, roč. 25, č. 2, s. 195–203, 2014.
- [37] J. Jernvall a I. Thesleff, „Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis", *Mech. Dev.*, roč. 92, č. 1, s. 19–29, 2000.
- [38] L. Kramerová, P. Krejčí, E. Míšová, a A. Švecová, „Molekulární a genetické aspekty vzniku nesyndromické ageneze zubů.", *Mol. Genet. Basis Non-Syndr. Tooth Agenesis*, roč. 115, č. 1, s. 4–12, 2015.
- [39] M. Grigoriou, A. S. Tucker, P. T. Sharpe, a V. Pachnis, „Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development", *Development*, roč. 125, č. 11, s. 2063–2074, 1998.
- [40] P. Kettunen a I. Thesleff, „Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis", *Dev. Dyn.*, roč. 211, č. 3, s. 256–268, 1998.
- [41] P. Kettunen, J. Laurikkala, P. Itäranta, S. Vainio, N. Itoh, a I. Thesleff, „Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis", *Dev. Dyn.*, roč. 219, č. 3, s. 322–332, 2000.
- [42] T. R. St.Amand *et al.*, „Antagonistic Signals between BMP4 and FGF8 Define the Expression of Pitx1 and Pitx2 in Mouse Tooth-Forming Anlage", *Dev. Biol.*, roč. 217, č. 2, s. 323–332, 2000.
- [43] J. M. Mason, D. J. Morrison, M. Albert Basson, a J. D. Licht, „Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling", *Trends Cell Biol.*, roč. 16, č. 1, s. 45–54, 2006.
- [44] J. Pereira *et al.*, „Evolutionary Genomics and Adaptive Evolution of the Hedgehog Gene Family (Shh, Ihh and Dhh) in Vertebrates", *PLoS ONE*, roč. 9, č. 12, s. e74132, 2014.
- [45] Y. Lan, S. Jia, a R. Jiang, „Molecular patterning of the mammalian dentition", *Semin. Cell Dev. Biol.*, roč. 25–26, s. 61–70, 2014.
- [46] C. Chiang *et al.*, „Essential Role for Sonic hedgehog during Hair Follicle Morphogenesis", *Dev. Biol.*, roč. 205, č. 1, s. 1–9, 1999.
- [47] D. G. Monroe, M. E. McGee-Lawrence, M. J. Oursler, a J. J. Westendorf, „Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease", *Gene*, roč. 492, č. 1, s. 1–18, 2012.

- [48] J. Huelsken, R. Vogel, B. Erdmann, G. Cotsarelis, a W. Birchmeier, „ β -Catenin Controls Hair Follicle Morphogenesis and Stem Cell Differentiation in the Skin", *Cell*, roč. 105, č. 4, s. 533–545, 2001.
- [49] X. He, M. Semenov, K. Tamai, a X. Zeng, „LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ -catenin signaling: Arrows point the way", *Development*, roč. 131, č. 8, s. 1663–1677, 2004.
- [50] B. T. MacDonald, K. Tamai, a X. He, „Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases", *Dev. Cell*, roč. 17, č. 1, s. 9–26, 2009.
- [51] Y. Ahn, B. W. Sanderson, O. D. Klein, a R. Krumlauf, „Inhibition of Wnt signaling by Wise (Sostdc1) and negative feedback from Shh controls tooth number and patterning", *Development*, roč. 137, č. 19, s. 3221–3231, 2010.
- [52] J. Laurikkala, Y. Kassai, L. Pakkasjärvi, I. Thesleff, a N. Itoh, „Identification of a secreted BMP antagonist, ectodin, integrating BMP, FGF, and SHH signals from the tooth enamel knot", *Dev. Biol.*, roč. 264, č. 1, s. 91–105, 2003.
- [53] T. Andl, S. T. Reddy, T. Gaddapara, a S. E. Millar, „WNT Signals Are Required for the Initiation of Hair Follicle Development", *Dev. Cell*, roč. 2, č. 5, s. 643–653, 2002.
- [54] B. B. Aggarwal, „Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword", *Nat. Rev. Immunol.*, roč. 3, č. 9, s. 745–756, 2003.
- [55] D. J. Headon a P. A. Overbeek, „Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction.", *Nat. Genet.*, roč. 22, č. 4, s. 370–374, 1999.
- [56] D. J. Headon *et al.*, „Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development.", *Nature*, roč. 414, č. 6866, s. 913–916, 2001.
- [57] H. Fujikawa, M. Farooq, A. Fujimoto, M. Ito, a Y. Shimomura, „Functional studies for the TRAF6 mutation associated with hypohidrotic ectodermal dysplasia", *Br. J. Dermatol.*, roč. 168, č. 3, s. 629–633, 2013.
- [58] L. Deng *et al.*, „Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain.", *Cell*, roč. 103, č. 2, s. 351–361, 2000.
- [59] Z. J. Chen, „Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway.", *Nat. Cell Biol.*, roč. 7, č. 8, s. 758–765, 2005.
- [60] W. Yin a Z. Bian, „The Gene Network Underlying Hypodontia", *J. Dent. Res.*, roč. 94, č. 7, s. 878–885, 2015.
- [61] A. Israel, „The IKK Complex, a Central Regulator of NF- B Activation", *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, roč. 2, č. 3, s. a000158, 2010.
- [62] C.-J. Wu, D. B. Conze, T. Li, S. M. Srinivasula, a J. D. Ashwell, „Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected].", *Nat. Cell Biol.*, roč. 8, č. 4, s. 398–406, 2006.
- [63] A. Sadier, L. Viriot, S. Pantalacci, a V. Laudet, „The ectodysplasin pathway: from diseases to adaptations", *Trends Genet.*, roč. 30, č. 1, s. 24–31, 2014.

- [64] J. Laurikkala *et al.*, „TNF Signaling via the Ligand–Receptor Pair Ectodysplasin and Edar Controls the Function of Epithelial Signaling Centers and Is Regulated by Wnt and Activin during Tooth Organogenesis", *Dev. Biol.*, roč. 229, č. 2, s. 443–455, 2001.
- [65] O. Haara *et al.*, „Ectodysplasin regulates activator-inhibitor balance in murine tooth development through Fgf20 signaling", *Development*, roč. 139, č. 17, s. 3189–3199, 2012.
- [66] I. Fliniaux, M. L. Mikkola, S. Lefebvre, a I. Thesleff, „Identification of dkk4 as a target of Eda-A1/Edar pathway reveals an unexpected role of ectodysplasin as inhibitor of Wnt signalling in ectodermal placodes", *Dev. Biol.*, roč. 320, č. 1, s. 60–71, 2008.
- [67] M. Pummila *et al.*, „Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression", *Development*, roč. 134, č. 1, s. 117–125, 2007.
- [68] J. Kere *et al.*, „X–linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein", *Nat. Genet.*, roč. 13, č. 4, s. 409–416, 1996.
- [69] M. Lexner *et al.*, „X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. Genetic and dental findings in 67 Danish patients from 19 families", *Clin. Genet.*, roč. 74, č. 3, s. 252–259, 2008.
- [70] W. Yin, X. Ye, a Z. Bian, „The Second Deletion Mutation in Exon 8 of EDA Gene in an XLHED Pedigree", *Dermatology*, roč. 226, č. 2, s. 105–110, 2013.
- [71] M. Bayes *et al.*, „The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats", *Hum. Mol. Genet.*, roč. 7, č. 11, s. 1661–1669, 1998.
- [72] P. Schneider *et al.*, „Mutations leading to X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia affect three major functional domains in the tumor necrosis factor family member ectodysplasin-A", *J. Biol. Chem.*, roč. 276, č. 22, s. 18819–18827, 2001.
- [73] L. K. Swee *et al.*, „Biological activity of ectodysplasin A is conditioned by its collagen and heparan sulfate proteoglycan-binding domains", *J. Biol. Chem.*, roč. 284, č. 40, s. 27567–27576, 2009.
- [74] S. Sarrazin, W. C. Lamanna, a J. D. Esko, „Heparan Sulfate Proteoglycans", *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, roč. 3, č. 7, s. a004952–a004952, 2011.
- [75] G. I. Mues *et al.*, „From ectodermal dysplasia to selective tooth agenesis", *Am. J. Med. Genet. A.*, roč. 149A, č. 9, s. 2037–2041, 2009.
- [76] J. T. Robinson *et al.*, „Integrative genomics viewer", *Nat. Biotechnol.*, roč. 29, č. 1, s. 24–26, 2011.
- [77] H. Thorvaldsdottir, J. T. Robinson, a J. P. Mesirov, „Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration", *Brief. Bioinform.*, roč. 14, č. 2, s. 178–192, 2012.

- [78] M. Yan *et al.*, „Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors", *Science*, roč. 290, č. 5491, s. 523–527, 2000.
- [79] M. L. Mikkola a I. Thesleff, „Ectodysplasin signaling in development", *Cytokine Growth Factor Rev.*, roč. 14, č. 3–4, s. 211–224, 2003.
- [80] W. Yin, X. Ye, H. Fan, a Z. Bian, „Methylation State of the EDA Gene Promoter in Chinese X-Linked Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia Carriers", *PLoS ONE*, roč. 8, č. 4, s. e62203, 2013.
- [81] L. Kramerová, P. Krejčí, E. Kaplová, a K. Langová, „Ageneze zubů a související poruchy vývoje dentice.", *Tooth Agenesis Assoc. Tooth Dev. Anom.*, roč. 114, č. 1, s. 9–14, 2014.
- [82] H. Vastardis, „The genetics of human tooth agenesis: New discoveries for understanding dental anomalies", *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, roč. 117, č. 6, s. 650–656, 2000.
- [83] F. A. Pasler a H. Visser, *Stomatologická radiologie: kapesní atlas : 798 vyobrazení*, 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2007.
- [84] P. Krejčí, „Hypodontie. Souborný referát", *Ortodoncie*, roč. 15, č. 3, s. 21–29, 2006.
- [85] J. Guliksson, „Tooth morphology in rubella syndrome children", *J Dent Child*, roč. 42, č. 6, s. 479–82, 1975.
- [86] Y. Schalk-van der Weide, W. H. Steen, a F. Bosman, „Distribution of missing teeth and tooth morphology in patients with oligodontia", *ASDC J. Dent. Child.*, roč. 59, č. 2, s. 133–140, 1992.
- [87] K. Axrup *et al.*, „Children with Thalidomide Emrryopathy: Odontological Observations and Aspects", *Acta Odontol. Scand.*, roč. 24, č. 1, s. 3–21, 1966.
- [88] M. Nasman, C.-M. Forsberg, a G. Dahllof, „Long-term dental development in children after treatment for malignant disease", *Eur. J. Orthod.*, roč. 19, č. 2, s. 151–159, 1997.
- [89] A. Maguire *et al.*, „The long-term effects of treatment on the dental condition of children surviving malignant disease", *Cancer*, roč. 60, č. 10, s. 2570–2575, 1987.
- [90] C. J. Larmour, P. A. Mossey, B. S. Thind, A. H. Forgie, a D. R. Stirrups, „Hypodontia-a retrospective review of prevalence and etiology. Part I.", *Quintessence Int.*, roč. 36, č. 4, s. 263–270, 2005.
- [91] S. Arte, P. Nieminen, S. Apajalahti, K. Haavikko, I. Thesleff, a S. Pirinen, „Characteristics of Incisor-Premolar Hypodontia in Families", *J. Dent. Res.*, roč. 80, č. 5, s. 1445–1450, 2001.
- [92] P. J. De Coster, L. A. Marks, L. C. Martens, a A. Huysseune, „Dental agenesis: genetic and clinical perspectives", *J. Oral Pathol. Med.*, roč. 38, č. 1, s. 1–17, 2008.

- [93] M. Ayub, F. Ur-Rehman, M. Yasinzai, a W. Ahmad, „A novel missense mutation in the ectodysplasin-A (EDA) gene underlies X-linked recessive nonsyndromic hypodontia", *Int. J. Dermatol.*, roč. 49, č. 12, s. 1399–1402, 2010.
- [94] B. Bergendal, J. Klar, C. Stecksén-Blicks, J. Norderyd, a N. Dahl, „Isolated oligodontia associated with mutations in EDARADD, AXIN2, MSX1, and PAX9 genes", *Am. J. Med. Genet. A.*, roč. 155, č. 7, s. 1616–1622, 2011.
- [95] D. Han *et al.*, „Novel EDA mutation resulting in X-linked non-syndromic hypodontia and the pattern of EDA-associated isolated tooth agenesis", *Eur. J. Med. Genet.*, roč. 51, č. 6, s. 536–546, 2008.
- [96] R. Tao *et al.*, „A novel missense mutation of the EDA gene in a Mongolian family with congenital hypodontia", *J. Hum. Genet.*, roč. 51, č. 5, s. 498–502, 2006.
- [97] A. Noor *et al.*, „Oligodontia is caused by mutation in LTBP3, the gene encoding latent TGF- β binding protein 3", *Am. J. Hum. Genet.*, roč. 84, č. 4, s. 519–523, 2009.
- [98] S. Ruf, D. Klimas, M. Hönemann, a S. Jabir, „Genetic background of nonsyndromic oligodontia: a systematic review and meta-analysis", *J. Orofac. Orthop.*, roč. 74, č. 4, s. 295–308, 2013.
- [99] S. Song, R. Zhao, H. He, J. Zhang, H. Feng, a L. Lin, „WNT10A variants are associated with non-syndromic tooth agenesis in the general population", *Hum. Genet.*, roč. 133, č. 1, s. 117–124, 2014.
- [100] T. Sarkar, R. Bansal, a P. Das, „Whole Genome Sequencing Reveals Novel Non-Synonymous Mutation in Ectodysplasin A (EDA) Associated with Non-Syndromic X-Linked Dominant Congenital Tooth Agenesis", *PLOS ONE*, roč. 9, č. 9, s. e106811, 2014.
- [101] V. Tallon-Walton, M. Manzanares-Cespedes, P. Carvalho-Lobato, I. Valdivia-Gandur, S. Arte, a P. Nieminen, „Exclusion of PAX9 and MSX1 mutation in six families affected by tooth agenesis. A genetic study and literature review", *Med. Oral Patol. Oral Cirugia Bucal*, roč. 19, č. 3, s. 248–254, 2014.
- [102] D. Bartlett, „Implants for life? A critical review of implant-supported restorations", *J. Dent.*, roč. 35, č. 10, s. 768–772, 2007.
- [103] M. Steigmann, J. Cooke, a H.-L. Wang, „Use of the natural tooth for soft tissue development: a case series", *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, roč. 27, č. 6, s. 603–608, 2007.
- [104] N. Isogawa, T. Terashima, Y. Nakano, J. Kindaichi, Y. Takagi, a Y. Takano, „The induction of enamel and dentin complexes by subcutaneous implantation of reconstructed human and murine tooth germ elements", *Arch. Histol. Cytol.*, roč. 67, č. 1, s. 65–77, 2004.
- [105] D. Herrera-Gimbernat, C. Recio-Lora, D. Torres-Lagares, M. Romero-Ruiz, a J. Gutierrez-Perez, „Current state of dental autotransplantation", *Med. Oral Patol. Oral Cirugia Bucal*, roč. 16, č. 7, s. 948–952, 2011.

- [106] P. Poornima, S. Pai, M. Bajantri, a I. Neena, „Allotransplant to replace avulsed mandibular central incisors using mesiodens", *SRM J. Res. Dent. Sci.*, roč. 6, č. 3, s. 191–193, 2015.
- [107] S. A. C. Modino a P. T. Sharpe, „Tissue engineering of teeth using adult stem cells", *Arch. Oral Biol.*, roč. 50, č. 2, s. 255–258, 2005.
- [108] B. Yang *et al.*, „Tooth root regeneration using dental follicle cell sheets in combination with a dentin matrix - based scaffold", *Biomaterials*, roč. 33, č. 8, s. 2449–2461, 2012.
- [109] A. W. Monreal, J. Zonana, a B. Ferguson, „Identification of a New Splice Form of the EDA1 Gene Permits Detection of Nearly All X-Linked Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia Mutations", *Am. J. Hum. Genet.*, roč. 63, č. 2, s. 380–389, 1998.
- [110] Y. Yang *et al.*, „Novel EDA p.Ile260Ser Mutation Linked to Non-syndromic Hypodontia", *J. Dent. Res.*, roč. 92, č. 6, s. 500–506, 2013.
- [111] M. L. Mikkola, „Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia", *Am. J. Med. Genet. A.*, roč. 149A, č. 9, s. 2031–2036, 2009.
- [112] L. Koubková, B. Vojtěšek, a R. Vyzula, „Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi", *Klin. Onkol.*, roč. 27, č. Suppl 1, s. 61–68, 2014.
- [113] S. Shokralla, J. L. Spall, J. F. Gibson, a M. Hajibabaei, „Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research", *Mol. Ecol.*, roč. 21, č. 8, s. 1794–1805, 2012.
- [114] H. Li a R. Durbin, „Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform", *Bioinformatics*, roč. 25, č. 14, s. 1754–1760, 2009.
- [115] A. M. Bolger, M. Lohse, a B. Usadel, „Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data", *Bioinformatics*, roč. 30, č. 15, s. 2114–2120, 2014.
- [116] H. Li *et al.*, „The Sequence Alignment/Map format and SAMtools", *Bioinformatics*, roč. 25, č. 16, s. 2078–2079, 2009.
- [117] H. Li, „A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data", *Bioinformatics*, roč. 27, č. 21, s. 2987–2993, 2011.
- [118] A. Krejčí, P. Müller, a B. Vojtěšek, „Bioinformatics and Next- generation Sequencing", *Klin. Onkol.*, roč. 28, č. Suppl 2, s. 91–96, 2015.
- [119] B. J. Polder, M. A. Van't Hof, F. P. G. M. Van der Linden, a A. M. Kuijpers-Jagtman, „A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth", *Community Dent. Oral Epidemiol.*, roč. 32, č. 3, s. 217–226, 2004.
- [120] A. Karsten a M. Larson, „The relationship between hypodontia in the second premolar region and heredity of cleft, lip and palate in children with isolated cleft palate", *Swed. Dent. J.*, roč. 28, č. 1, s. 47–52, 2004.
- [121] E. Rozkocová, M. Marková, J. Láník, a J. Zvárová, „Agenesis of third molars in young Czech population", *Prague Med. Rep.*, roč. 105, č. 1, s. 35–52, 2004.

- [122] P. Černochová a L. Izakovičová Hollá, „Výskyt dentálních anomálií u ortodontických pacientů.“, *Preval. Dent. Anom. Orthod. Patients*, roč. 113, č. 4, s. 95–103, 2013.
- [123] E.-M. Andersson, K. B. Feragen, D. Mikalsen, J. Kaul, T. M. Holla, a C. Filip, „Bilateral Hypodontia in Adolescents With Pierre Robin Sequence“, *Cleft Palate Craniofac. J.*, roč. 52, č. 4, s. 452–457, 2015.
- [124] T. Endo, S. Sanpei, A. Komatsuzaki, S. Endo, A. Takakuwa, a K. Oka, „Patterns of tooth agenesis in Japanese subjects with bilateral agenesis of mandibular second premolars“, *Odontology*, roč. 101, č. 2, s. 216–221, 2013.
- [125] C. Flores-Mir, „More women in Europe and Australia have dental agenesis than their counterparts in North America“, *Evid. Based Dent.*, roč. 6, č. 1, s. 22–23, 2005.
- [126] H. Schneider, J. Hammersen, S. Preisler-Adams, K. Huttner, W. Rascher, a A. Bohring, „Sweating ability and genotype in individuals with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia“, *J. Med. Genet.*, roč. 48, č. 6, s. 426–432, 2011.
- [127] B. Brodsky a N. Shah, „Protein motifs. 8. The triple-helix motif in proteins“, *FASEB J.*, roč. 9, č. 15, s. 1537–1546, 1995.
- [128] T. Y. Ting, R. W. K. Wong, a A. B. M. Rabie, „Analysis of genetic polymorphisms in skeletal Class I crowding“, *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, roč. 140, č. 1, s. 9–15, 2011.
- [129] T. Mustonen *et al.*, „Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1“, *Dev. Biol.*, roč. 259, č. 1, s. 123–136, 2003.
- [130] G. Pesole, F. Mignone, C. Gissi, G. Grillo, F. Licciulli, a S. Liuni, „Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions“, *Gene*, roč. 276, č. 1–2, s. 73–81, 2001.
- [131] Y. Jin, C. Wang, S. Cheng, Z. Zhao, a J. Li, „MicroRNA control of tooth formation and eruption“, *Arch. Oral Biol.*, roč. 73, s. 302–310, 2017.

INTERNETOVÉ ZDROJE

- URL1:** <http://www.dentalthailand.com/numbering.html>
- URL2:** <http://bite-it.helsinki.fi>
- URL3:** <http://omim.org/entry>
- URL4:** <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EDA&keywords=eda>
- URL5:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1896>
- URL6:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
- URL7:** <http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>
- URL8:** <http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>
- URL9:** <https://broadinstitute.github.io/picard/>
- URL10:** <https://www.r-project.org/>
- URL11:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- URL12:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/44197/>
- URL13:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=ectodysplasin+a>