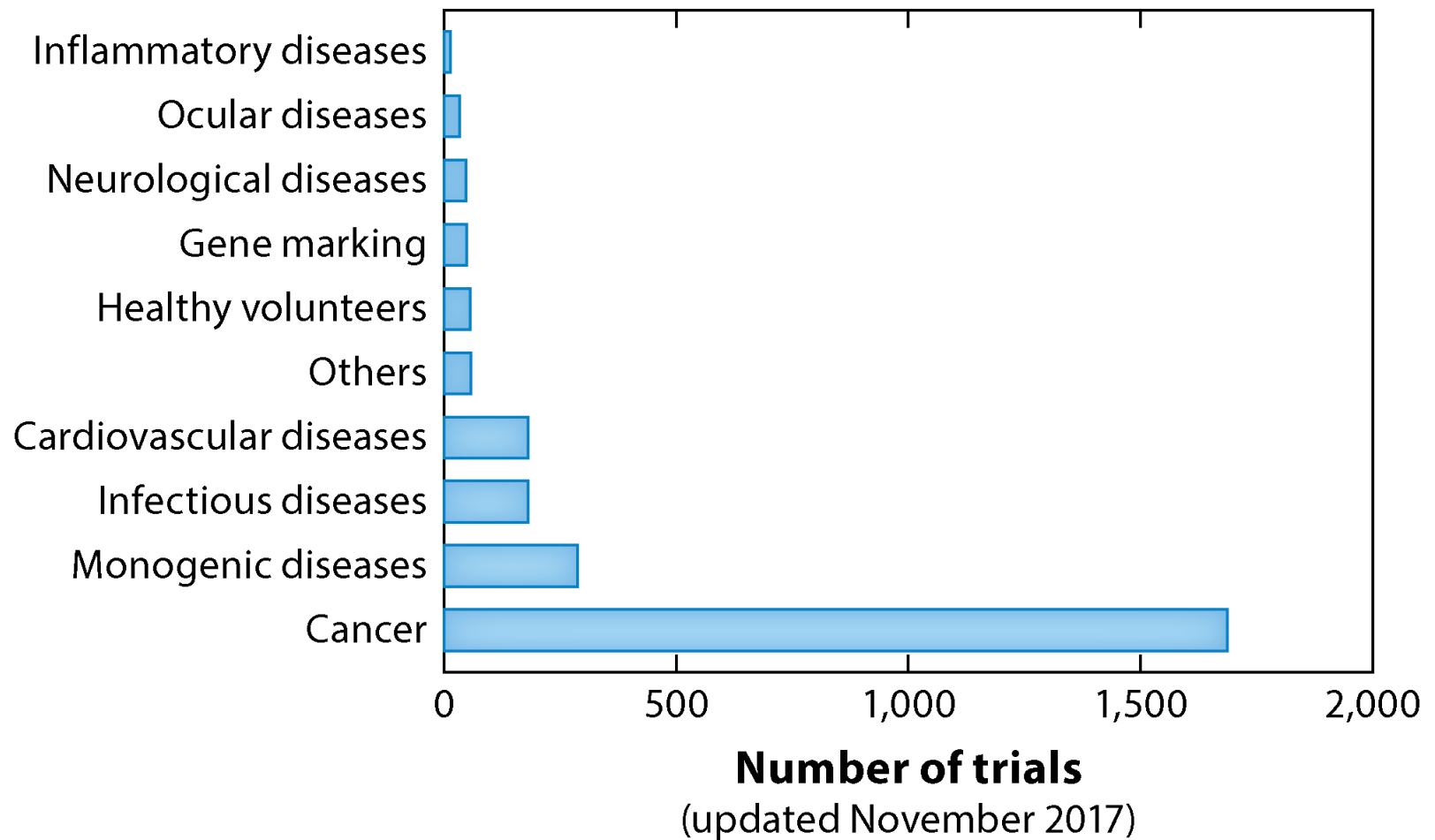


# **Genetika v ZL 3**

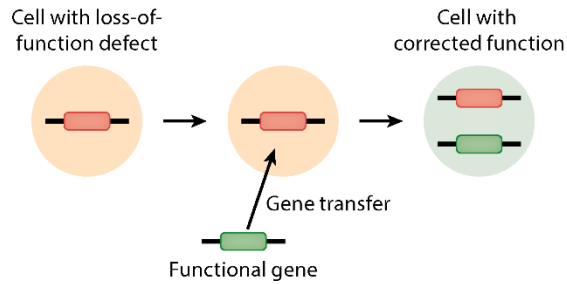
**doc. RNDr. Monika Pávková Goldbergová, Ph.D.**



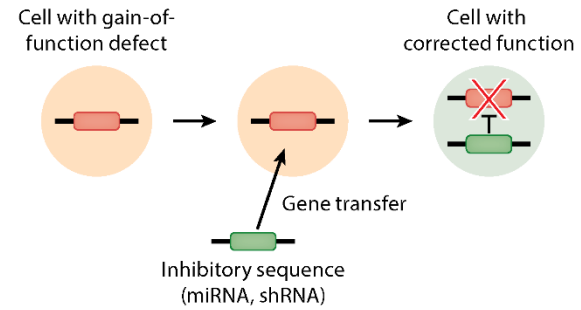
AR Anguela XM, High KA. 2019.  
*Annu. Rev. Med.* 70:273–88

Annual Reviews

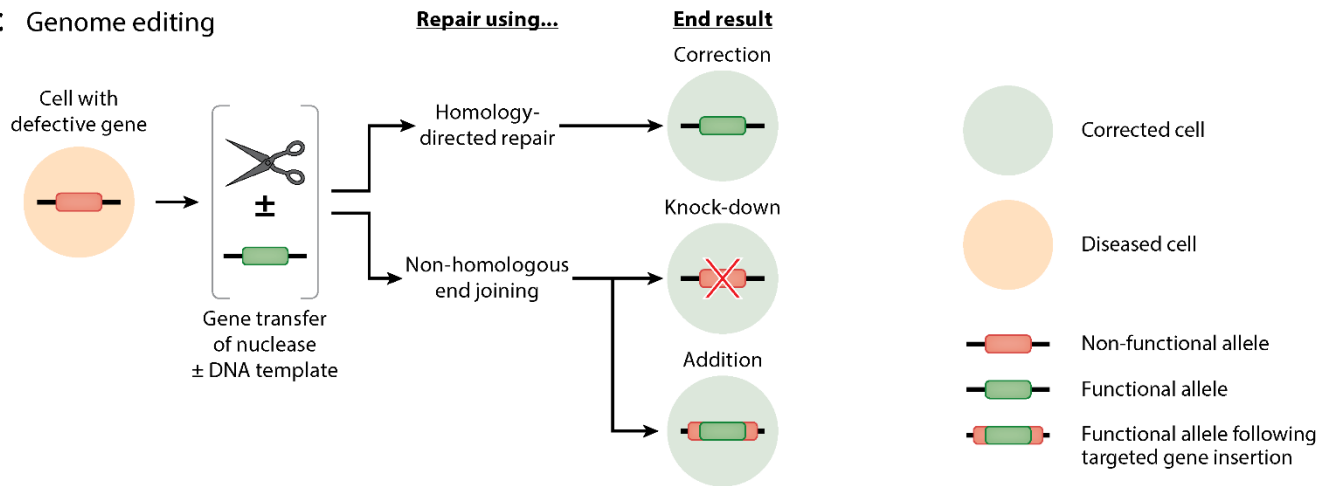
**a Gene augmentation**

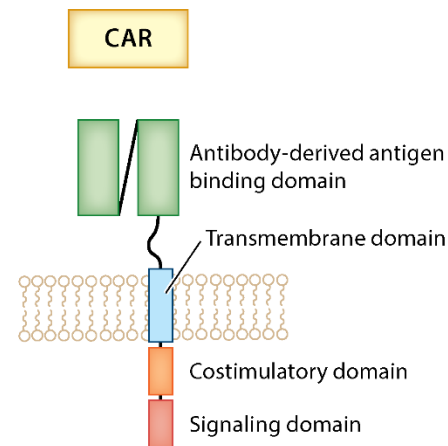
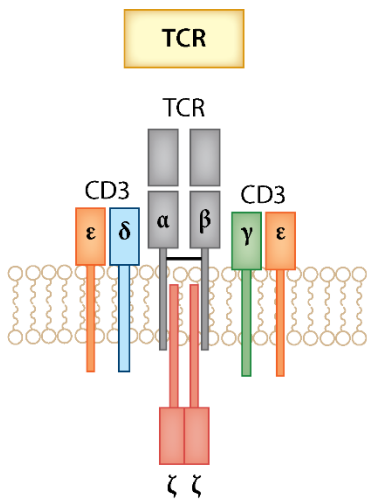


**b Gene suppression**



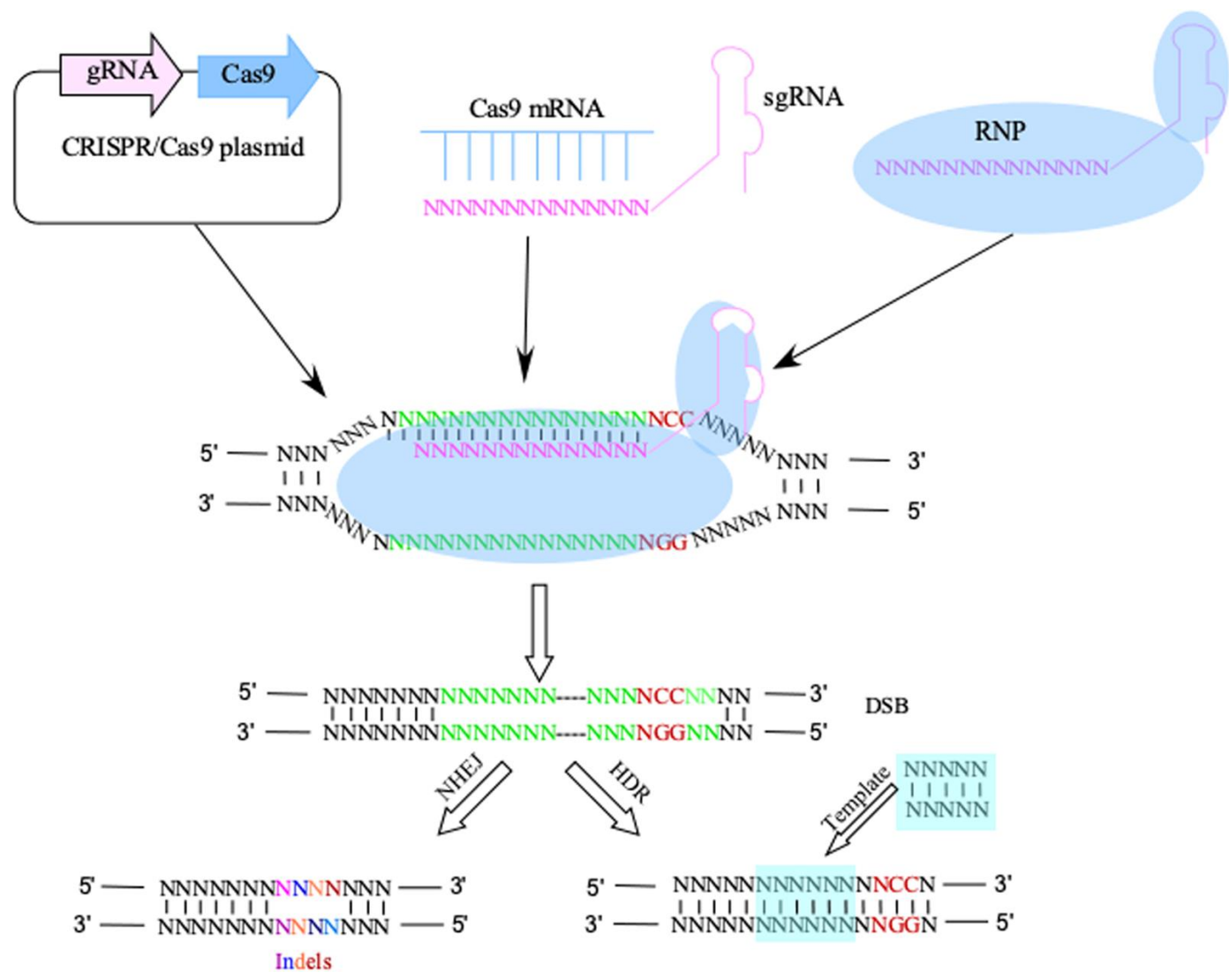
**c Genome editing**





✓	Function through well-understood T cell signaling pathways
✗	MHC-restricted antigen recognition
✗	Cannot target non-protein tumor antigens

✓	Recognize tumor cells independently of the MHC
✓	Can target non-protein surface molecules, like carbohydrates and glycolipids
✗	Only recognize antigens expressed on the cell surface (cannot recognize antigens presented by cells' MHC)



## CRISPR/Cas9 – An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology

Variations	Features	Effects	Advantages	Disadvantages	Applications in cancer research
CRISPR/Cas9	WT Cas9; sgRNA	Double-strand break at the target site	Versatile; effective; stable; easy accessibility	Off-target; PAM limited; different modified alleles	Set up research model; functional gene study; drug target identification
CRISPR/Cas9 Nickase	Mutant Cas9 H840A or D10A; sgRNA	Single-strand break	Convenient; efficient; flexible; precise, scalable; robust	PAM limited; 2 sgRNA for KO	Manipulate epigenetic modifications; Simultaneous activation and repression
CRISPRi	dCas9; repressor peptide; sgRNA	Block transcription elongation or knockdown transcripts	Inducible; reversible; low off-target effects; low toxicity	PAM limited; off-target effects at bidirectional promoters	Genome and transcriptome research; LncRNA knockdown and overexpression
CRISPRa	dCas9; activator peptide; sgRNA	Increase transcription		PAM limited; complicated to deliver the multiple components	

## CRISPR/Cas9 – An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology

Application	Targets	sgRNA design	Vehicle for delivery	Features	Advantages	Disadvantages
Generate cancer model	HSPCs; healthy human organoids	Targeting the model type-related suppressors oncogenes	Pooled lentivirus	Disrupt suppressors or edit oncogenes	Rapid, efficient, and inexpensive	Special delivery techniques; tissue limited
Synergistic gene study	Cells	Targeting optional drug target from database	Lenti-double sgRNA library	Together with deep sequencing	Effective, low cost, innovative approach	Double sgRNA construction; need highly efficient sgRNA; special analysis
Target validation	Drug or anticancer reagent resistant cells	Lentiviral library from Addgene; or optional targets	Plasmid	Identify the target from resistant cells by sequencing	Effective	False-positives
Gene diagnose	Genome	Target sensitive genes	Lentivirus	Together with Cas13a or Cas12a to induce collateral effects	Sensitive, rapid, low cost	Certain template concentration

## Anticancer applications in clinical trials

Applications	Target site	Study phase	Editing strategy	Clinical trials identification
Advanced esophageal cancer	PD-1	Phase II	PD-1 knockout	NCT03081715
Castration resistant prostate cancer	PD-1	Phase I	PD-1 knockout	NCT02867345
Muscle-invasive bladder cancer	PD-1	Phase I	PD-1 knockout	NCT02863913
Metastatic non-small cell lung cancer	PD-1	Phase I	PD-1 knockout	NCT02793856
EBV associated malignancies	PD-1	Phase I Phase II	PD-1 knockout	NCT03044743
Metastatic renal cell carcinoma	PD-1	Phase I	PD-1 knockout	NCT02867332
Relapsed or refractory leukemia and lymphoma	CD19 and CD20 or CD22	Phase I Phase II	Edit CD19 and CD20 or CD22	NCT03398967
Human papillomavirus-related malignant neoplasm	HPV16-E6/E7 HPV18 E6/E7	Phase I	HPV16-E6/E7 or HPV18 E6/E7 knockout	NCT03057912
CD19 + leukemia and lymphoma	TCR B2M	Phase I Phase II	TCR and B2M knockout	NCT03166878
Tumor of the central nervous system	NF1	—	Fix NF1 mutation allele	NCT03332030
Multiple myeloma Melanoma Synovial sarcoma Myxoid/round cell liposarcoma	TCR PD-1	Phase I	TCR and PD-1 knockout	NCT03399448



# GENETIKA ZUBNÍCH TKÁNÍ

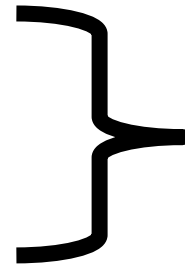
---

# Odontogeneze

- Komplexní série procesů zahrnujících buněčné interakce, diferenciaci, rozvoj unikátní extracelulární matrix a mineralizace
- Je maximálně regulována na molekulární úrovni
  - Terminální diferenciaci specifických buněk
  - epiteliálně-mezenchymální interakce
  - Sekrece specifické extracelulární matrix
  - Kontrolované vyzrání matrix
  - Regulace depozice iontů
  - Mineralizace zubních tkání

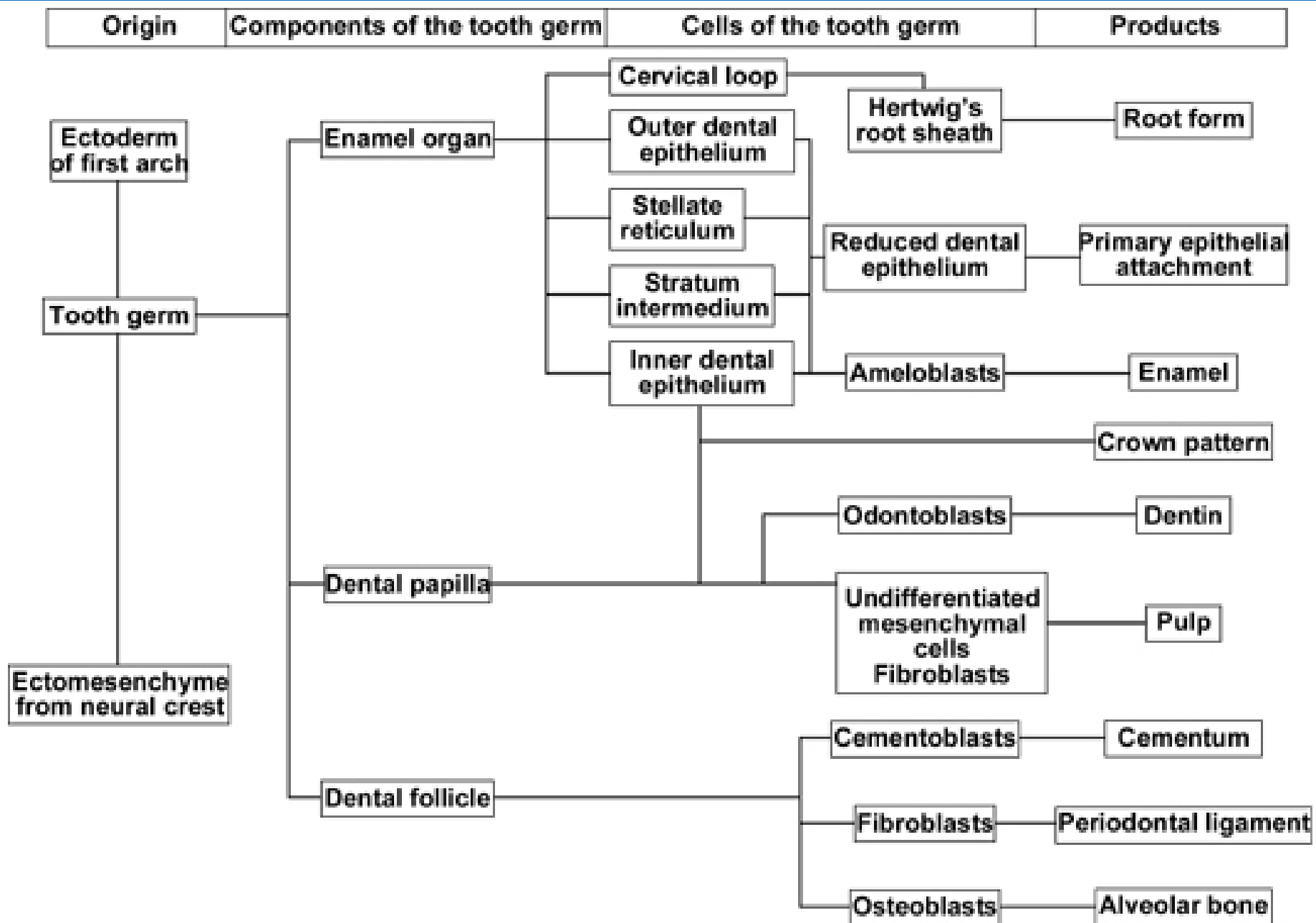
# Vývoj zubů = Odontogeneze

- Orální ektoderm
- Mezoderm
- Buňky neurální lišty



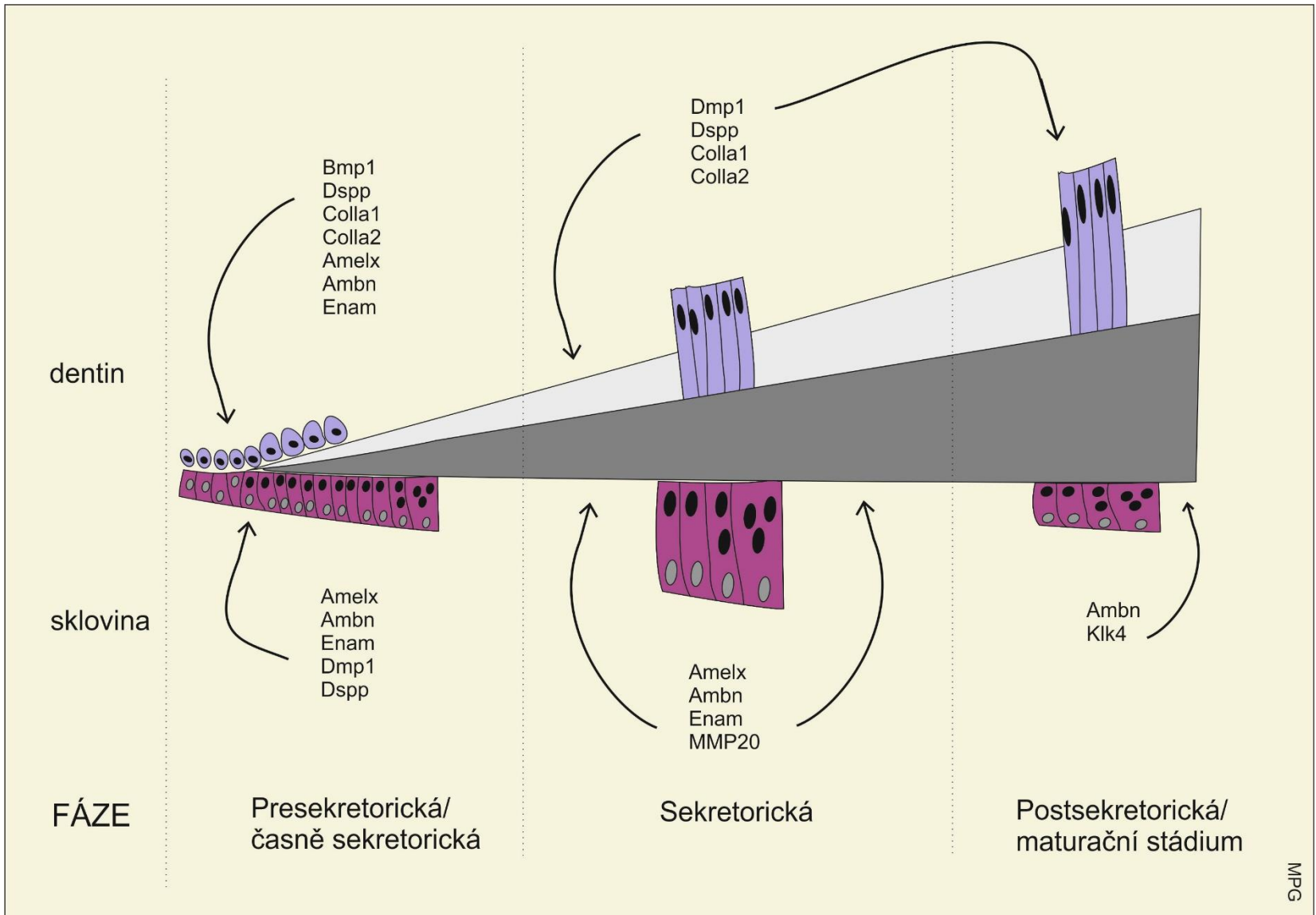
mezenchym  
(ektomezenchym či  
mezektoderm)

- Sklovina vzniká z ektodermu
- Ostatní tkáně z mezenchymu



# Odontoblasty vs. ameloblasty

- Odontoblasty
  - vznik z mezenchymových buněk u vnitřního sklovinného orgánu
  - produkují (pre)dentin
  - Tomesova vlákna
    - cytoplazmatické výběžky zanechané v dentinu
- Ameloblasty
  - z vnitřního sklovinného orgánu
  - *bazální povrch se stává sekrečním*
  - produkce skloviny

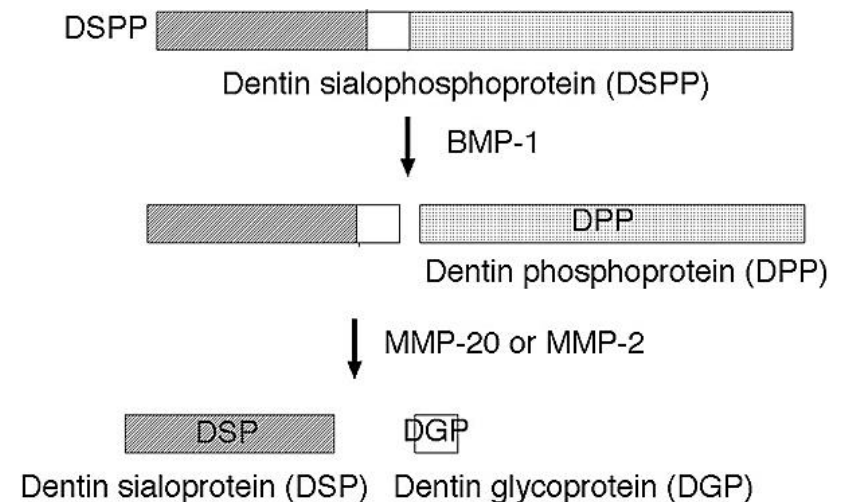


# Dentinogeneze

- začíná diferenciací odontoblastů v hrbolcích budoucích zubů
- Odontoblasty vznikají v průběhu vývoje z okrajových částí dentální papily;
- z její vnitřní části zubní pulpa.
- mírně předchází amelogenezi.

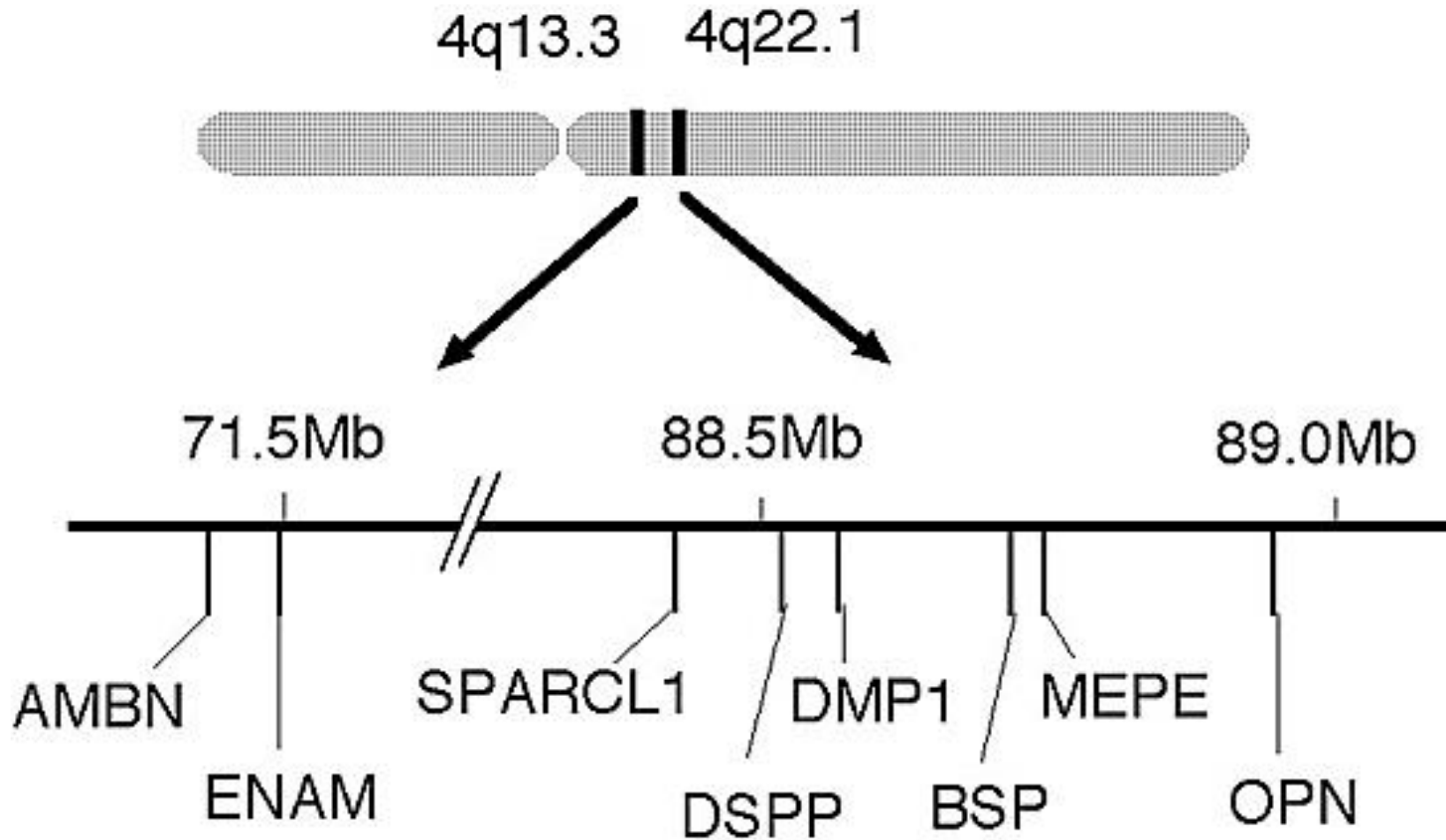
# Komponenty ECM dentinu

- Kolagen typu I
- Kolagen typu III a IV – predentin, není přítomen u normálního dentinu
- Dentální sialofosfoprotein
  - Dentin phosphophoryn
  - Dentin sialoprotein
- Dentin Matrix Protein 1
- Proteoglykany
- Gla proteiny –
  - např. osteokalcin





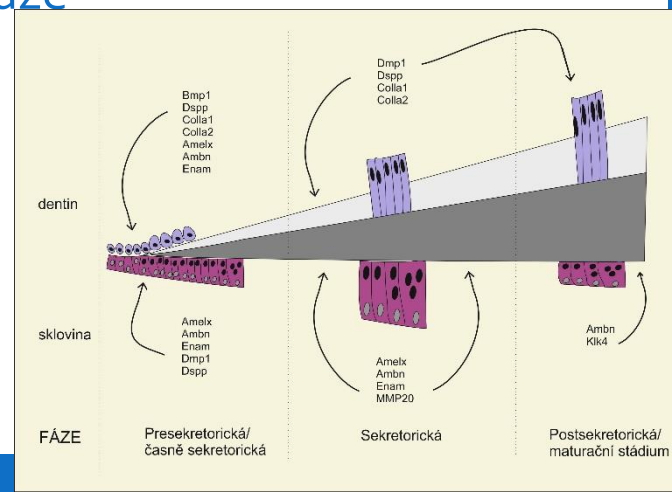
# SIBLING-family genes



SPARCL1: SPARC-like protein 1, DSPP: dentin sialophosphoprotein, DMP1: dentin matrix protein 1, BSP; bone sialoprotein, MEPE: matrix extracellular phosphoglycoprotein, OPN: osteopontin. AMBN: ameloblastin, ENAM: enamelin

# Ameloblasty

- migrace ameloblastů k budoucí pulpě
- sekretují proteiny podle přísně regulované programované genové exprese a načasování
- vytváří extracelulární organickou matrix skloviny - kostru, která sama reguluje iniciaci, růst a tvar anorganických krystalů hydroxyapatitu, které zralou sklovinu vytvářejí
- tloušťka skloviny závisí na délce sekretorické fáze ameloblastů

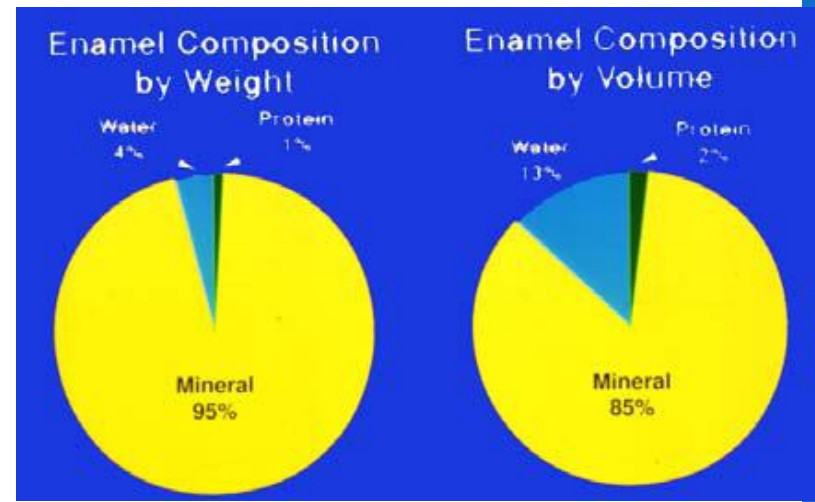


# Faktory ovlivňující amelogenezi

- Výživa
  - Kalcium, fosfáty, proteiny, ...
- Hypoxie
- Hypertermie
- Infekce
- Fyzikální faktory
  - Prostor
  - Trauma
- interakce

# Zrání skloviny

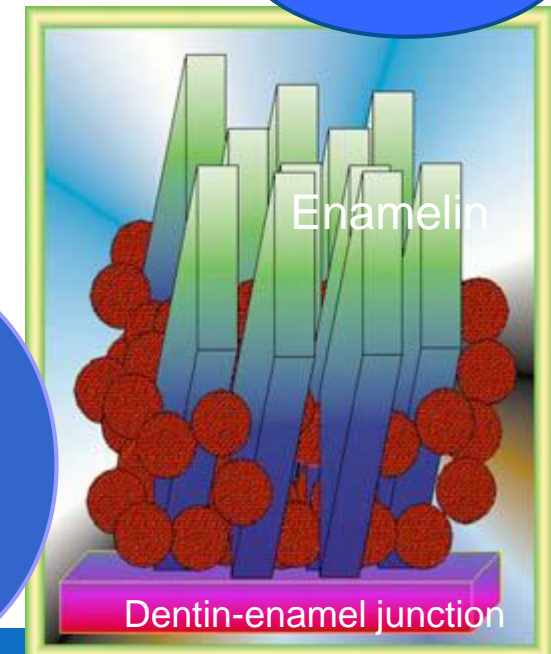
- sekretorická fáze - „zrání“ skloviny“
- završeno ukládáním iontů po stranách krystalitů skloviny a vytlačení zbytků proteinové matrix a tekutin ze struktury.
- rozštěpena a odstraněna téměř všechna matrix organických proteinů a je nahrazena anorganickými krystaly.
- po ukončení sekretorické fáze již nedochází k další tvorbě krystalů ani k prodlužování krystalů již vytvořených
- apoptoza ameloblastů



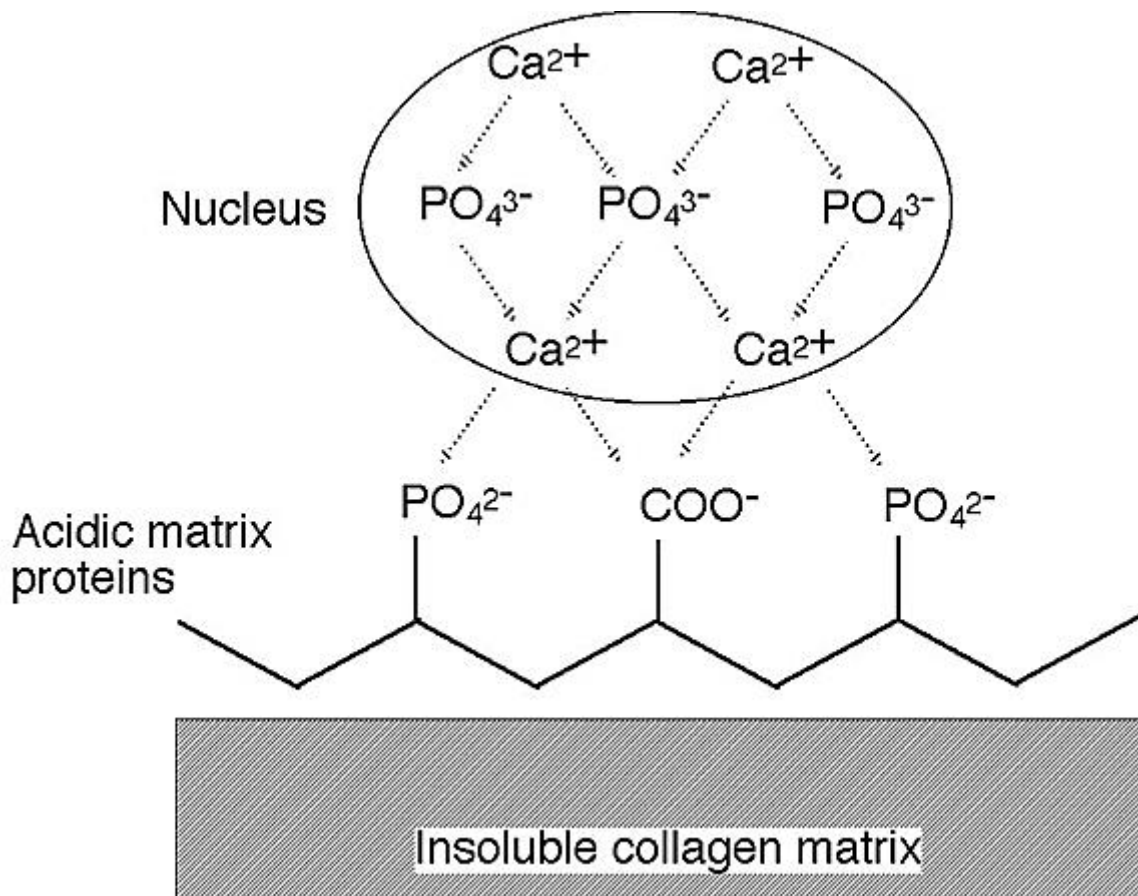
Degradation:  
MMP20, KLK4

Bulk of  
enamel  
matrix:  
**Amelogenin**

Lesser  
components  
Ameloblastin  
Enamelin



# Proteiny a ECM



Nucleation of hydroxyapatite by acidic matrix proteins immobilized on insoluble collagen matrix. Some acidic matrix proteins, e.g. dentin phosphoprotein, have an affinity to collagen. The surface of the insoluble collagen matrix provides loci to reduce interfacial energy for nucleation. Calcium ions are bound to the acidic groups of the acidic proteins, and inorganic phosphates are attracted by the calcium ions. The ionic complex thus formed may constitute a crystal nucleus.

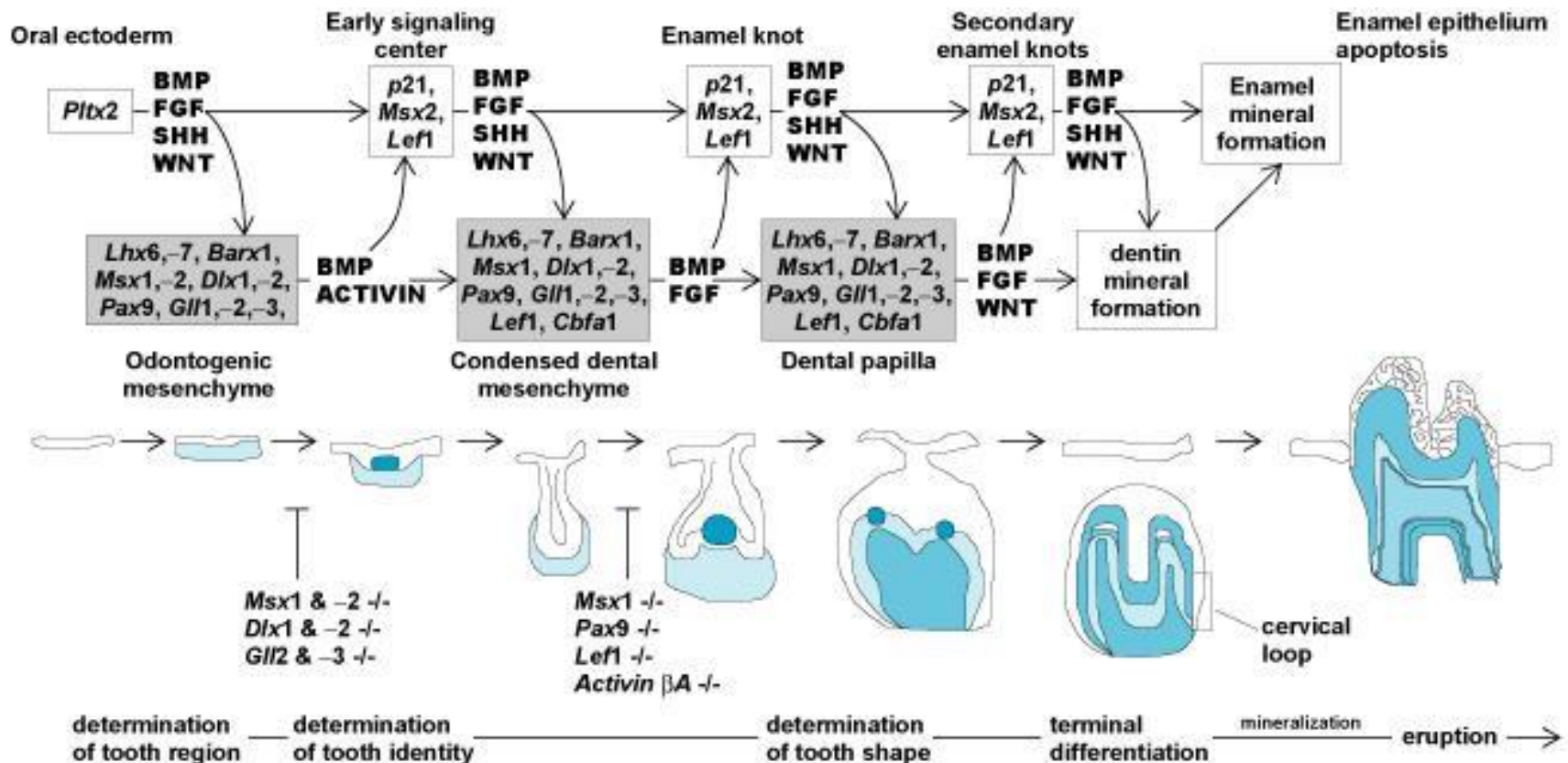
# Molekulární determinanty

- Na vývoji zubu se podílí více než 10000 genů
  - Většina genů podílejících se na odontogenezi jsou exprimovány v jiných tkáních
  - Některé geny jsou specifické pro vývoj zubní tkáně (např. gen pro amelogenin)

# Geny a dráhy

- ⊙ více než 300 genů
- ⊙ mezi signální dráhy řídící vývoj zubů patří dráhy:
  - *TGF beta* (transforming růstový faktor),
  - *FGF* (fibroblastového růstového faktoru),
  - *BMP* (kostní morfogenetický protein),
  - *SHH* (Sonic hedgehog),
  - *Wnt*,
  - *TNF*,
  - *EDA* (Ectodisplasin)

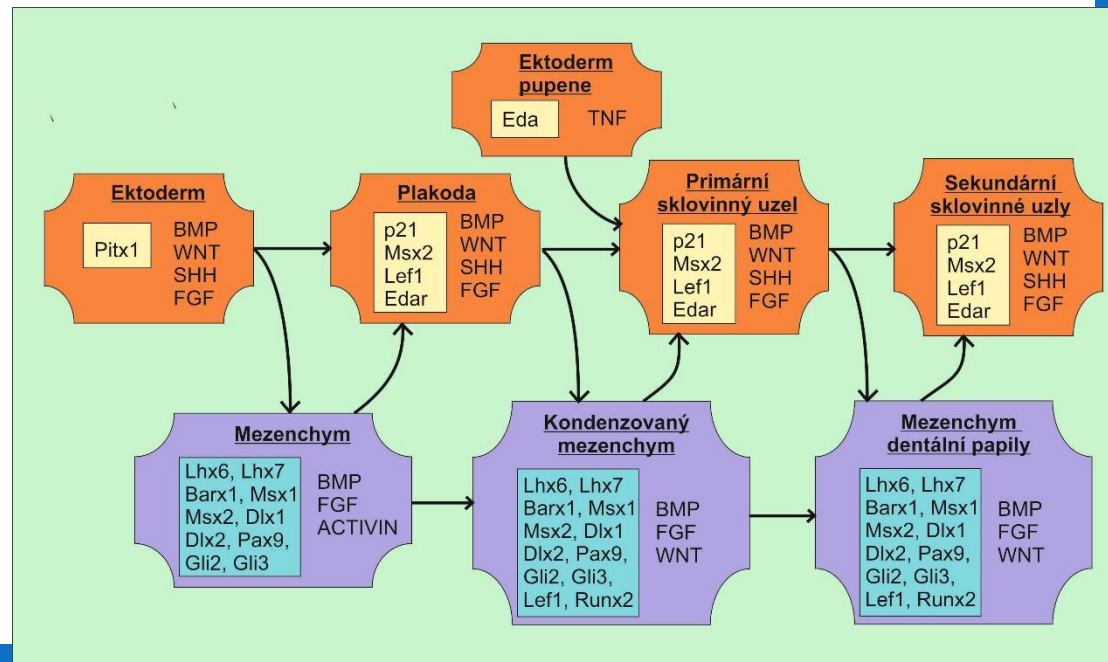
# Geny a dráhy





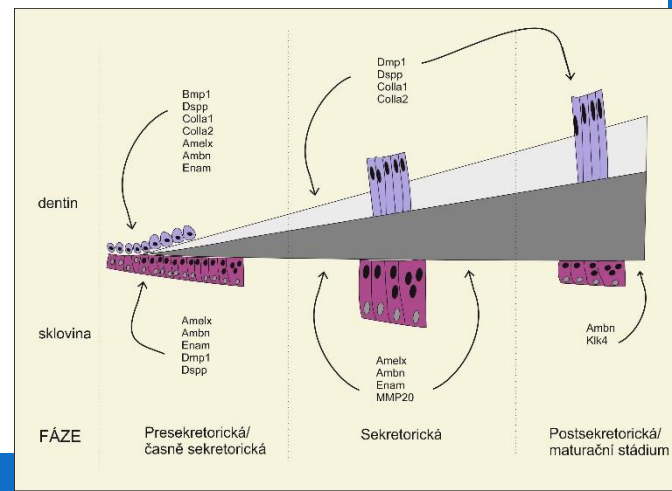
# Regulace genů

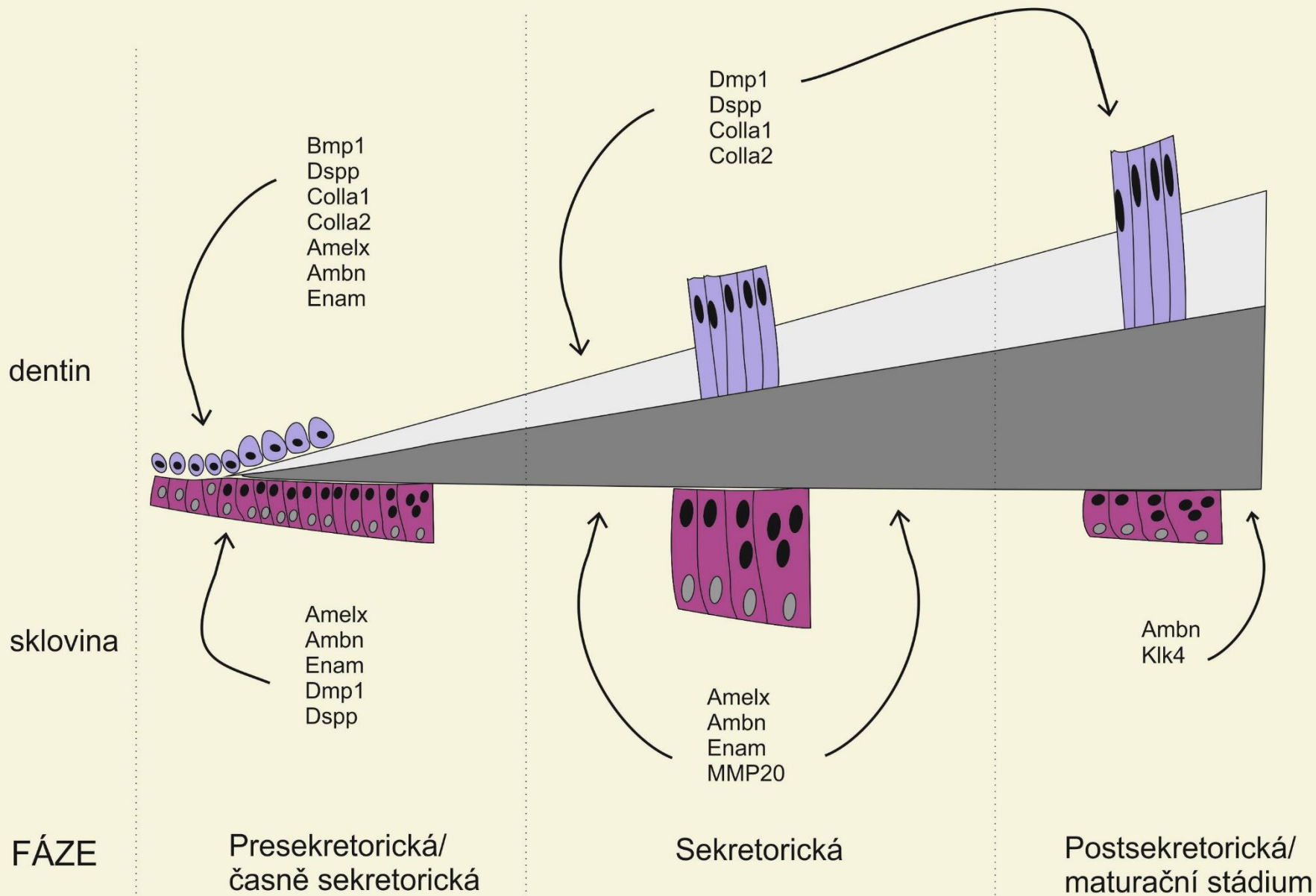
- modulátory signálních drah – např. inhibitory *BMP* a inhibitory *FGF*.
- geny, které se účastní rané fáze vývoje zubu, mají odlišnou funkci v dalších stádiích vývoje.
- multifunkčnost umožňuje indukce nebo regulace odlišnými transkripčními faktory nebo regulátory (*AMBN*, *BGLAP*, *IBSP* a *COLLA2*; *BGLAP*, *COLLA2*; komplex Vitamin D<sub>3</sub>/-VDR-RXR: *CALB1*, *CST6*, *FOXO1*)



# Geny a vývoj skloviny a dentinu

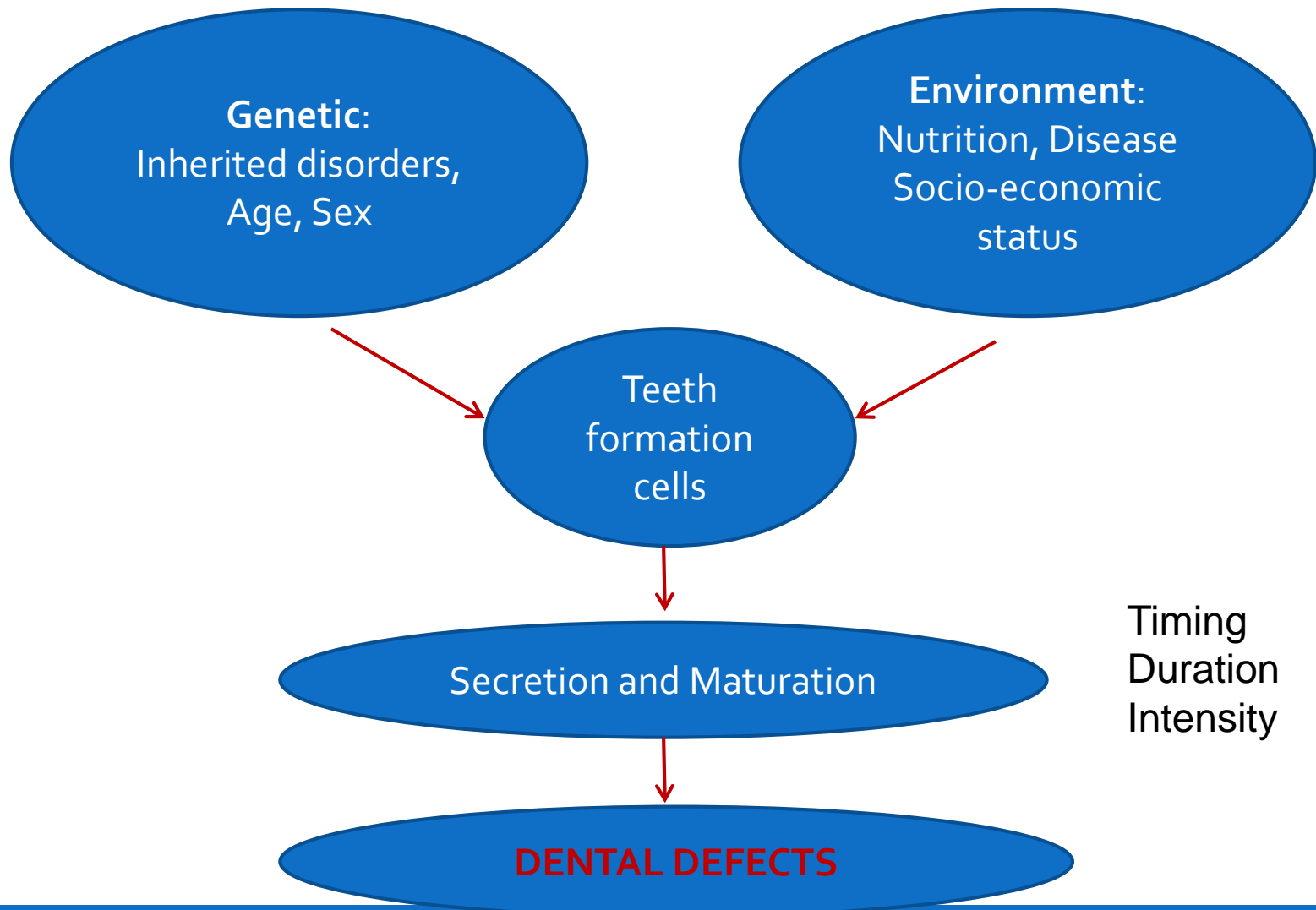
- ⊙ amelogenin, enamelin, ameloblastin, a *MMP20* (matrix metaloproteináza 20) – počátek sekretotické fáze
- ⊙ kalikrein 4 (KLK4), amelotin a odam (apin) – iniciace maturace
- ⊙ *KLK4* a *MMP20* – degradace proteinů vrstvy skloviny
- ⊙ *FAM83H* - sekrece a reabsorpce proteinů skloviny
- ⊙ homeoboxové geny *DLX* (Distal less), přičemž geny *DLX1* a *DLX2* jsou specifické pro vývoj molárů





# Vrozené poruchy tvrdých zubních tkání

# Abnormality - podklad



# Patologie těhotenství

- Syphilis – poruchy vývoje skloviny, soudkovité zuby
- Ionizující záření – anomálie vývoje skloviny
- Užívání léků – změny zabarvení, hypoplasie skloviny
- DM – hypoplasie skloviny

# Choroby tvrdých zubních tkání

## • získané

- abraze
- eroze
- resorpce
- změny zabarvení zubů

## • vrozené

- geneticky podmíněné anomálie:
  - - zubů
  - - skloviny
  - - dentinu

# Vrozené poruchy zubů

- změny velikosti zubů
- změny tvaru zubů
- změny počtu zubů
- anomálie struktury zubů
- poruchy prořezávání



# Zuby předmléčné - dentes praelacteales

- zuby natální (dentes natales) - prořezané již při narození
- neonatální zuby (dentes neonatales) - mezi 1. - 30. dnem po narození.
- Od dentes praelacteales je nutno odlišit předčasně prořezané dočasné zuby - dentitio praecox.

# Změny počtu zubů

- **anodoncie**- úplná absence zubů
- **hypodoncie**- snížený počet zubů, nejčastěji 3.moláry
- **oligodencie** – chybění většího počtu zubů
- **hyperdoncie**- přespočetné zuby, prořezané nebo retinované, hlavně v horní čelisti
- **mesiodens**- v mezeře mezi horními středními řezáky
- **Gardnerův syndrom** - neprořezané přespočetné zuby, polyposa tlustého střeva, osteomy v kostech včetně čelistí, epidermoidní cysty v kůži



Fuze



Hypodoncie

Mesiodens



# Geny a změna počtu zubů

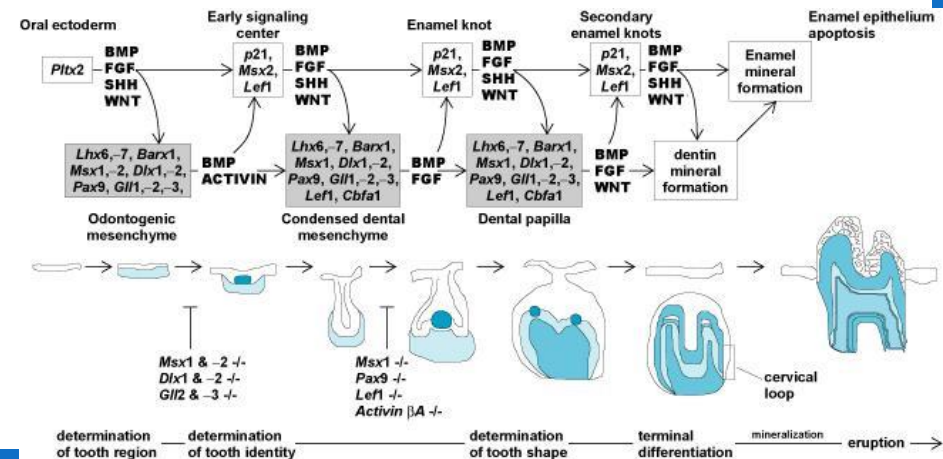
⊙ autozomálně dominantní (AD) nebo autozomálně recesivní (AR) - mutace v exonech genu pro *MSX1* - řídí rozvoj všech epidermálních orgánů

• *MSX-1* - represor

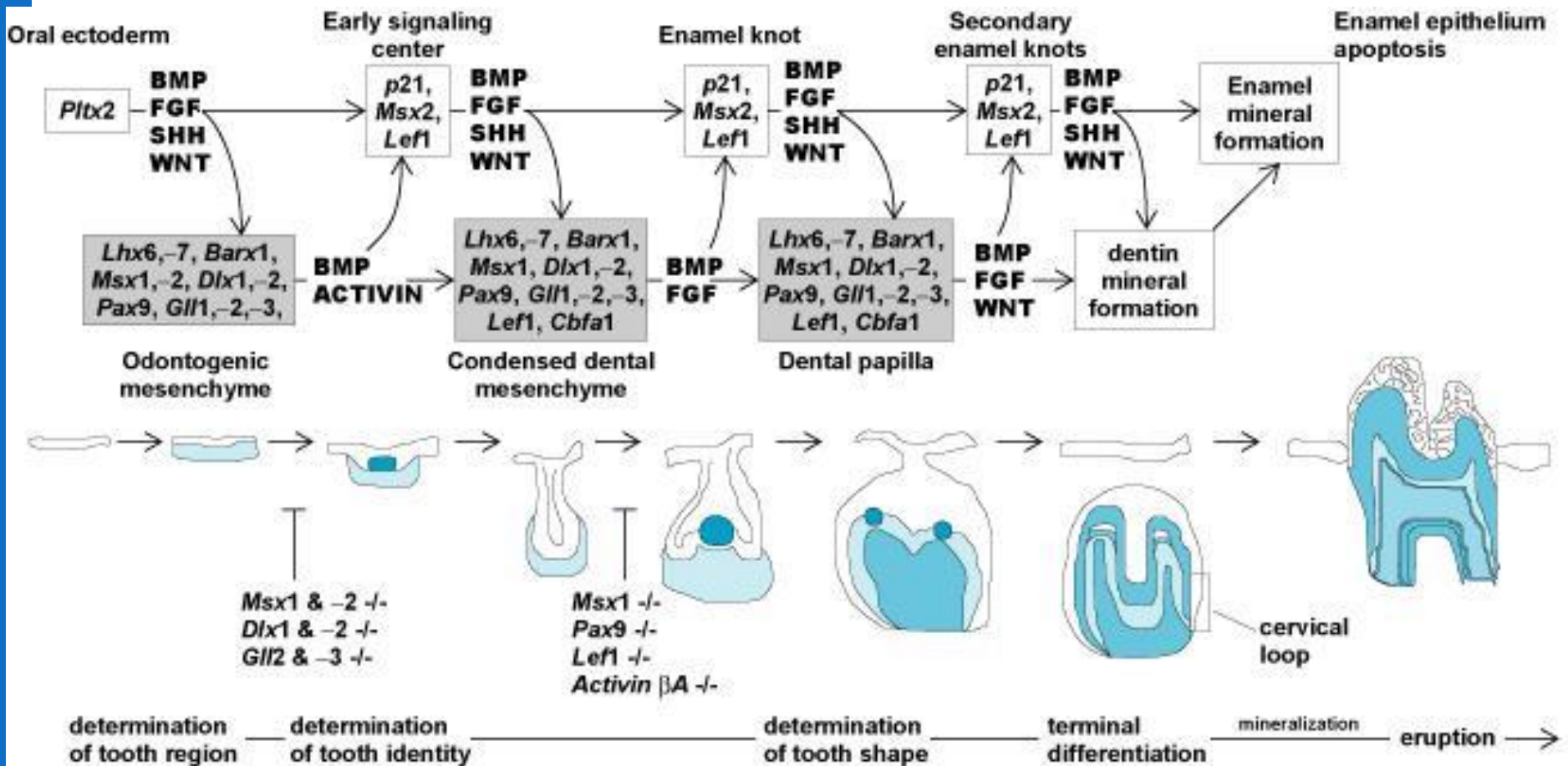
• *PAX-9*

⊙ dojde-li k mutaci *PAX9*, nedochází k aktivaci *MSX1*

⊙ vývoj zubu zastaven ve fázi pupene



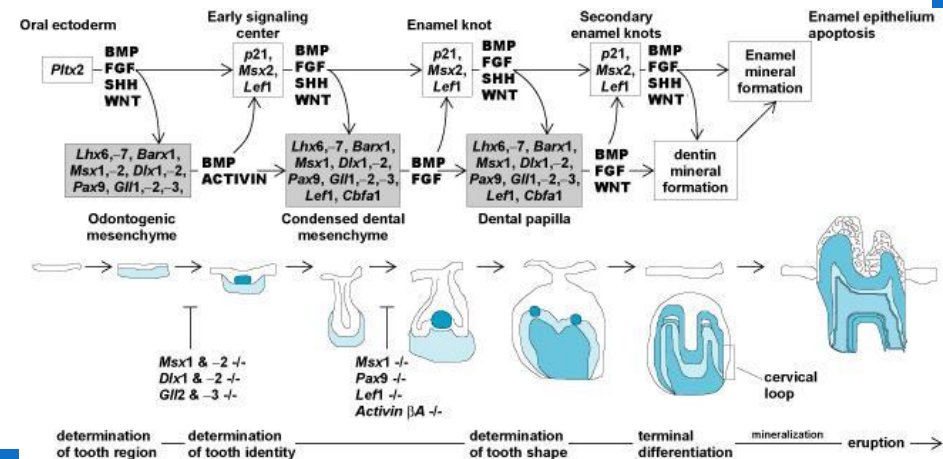
# Geny a změna počtu zubů



# Geny a změna počtu zubů

- *RUNX2* – TF pro diferenciaci osteoblastů - tvorba nadpočetných zubů ve stálé dentici
- *AXIN2* - těžké oligodontie. Dochází k agenezi většiny stálých molárů, premolárů, dolních řezáků a horních postranních řezáků
- *Dlx* (distal-less homeobox) - selhání vývoje zubů a ztrátu horních molárů

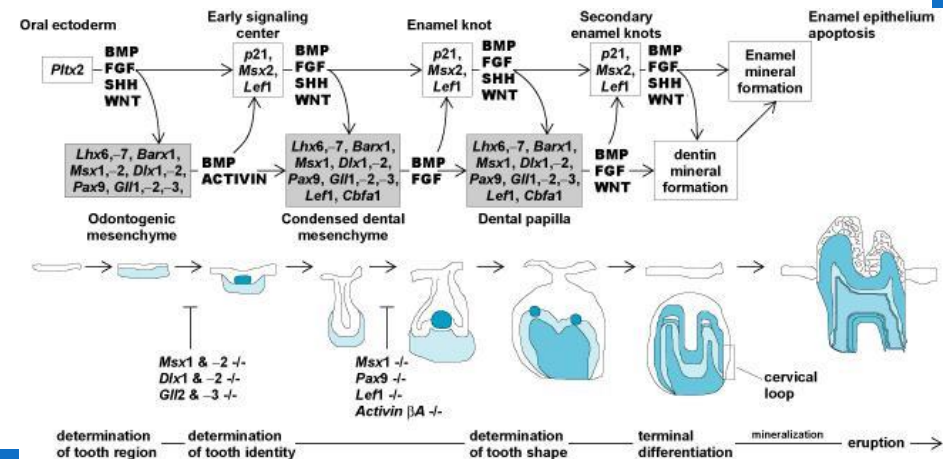
- RUNX-2
- AXIN-2
- DLX



# Geny a abnormality pozice zubů

- Abnormality pozice zubů se často vyskytují spolu s agenezí zubů.
- Předpokládá se, že mutace v genech spojených s agenezí zubů, zejména *MSX1* a *PAX9* by mohly být příčinou i abnormální pozice zubů.

- *MSX-1*
- *PAX-9*



# Změny velikosti zubů

## • mikrodoncie

- generalizovaná – všechny zuby menší (hypofyzární nanismus, Downův syndrom)
- jednotlivý zub (hlavně přespočetný)
- relativní generalizovaná (zuby normální či mírně menší, větší čelist)

## • makrodoncie

- generalizovaná – všechny zuby větší (hypofyzární gigantismus, akromegalie)
- jednotlivý zub
- relativní generalizovaná (zuby normální či mírně větší, menší čelist)

# Změny tvaru zubů

- ⊙ **akcesorní hrbolky**- moláry, řezáky
- ⊙ **akcesorní kořeny**
- ⊙ **čípkovité zuby**-konický tvar korunky
- ⊙ **zdvojený zub**- oddělené korunky a společný kořen s kořenovým kanálkem (geminace, srůsty)
- ⊙ **taurodontia** – abnormálně široké dřevňové dutiny
- ⊙ **dens in dente** - vzniká vchlípením ektodermu zubní korunky do mezodermu pulpy, před kalcifikací tvrdých zubních tkání- vsunutý zub menší do pulpy zubu normálního





# Poruchy prořezávání zubů

- předčasná nebo zpožděná erupce
- retence zubů-hlavně 3.stoličky
- zuby nesprávně vyvinuté nebo atypicky postavené

# Vývojové poruchy zubů

## Dysplasie skloviny

- Hypoplasie – amelogenesis imperfecta
- Hypokalcifikace

## Poruchy tvorby dentinu

- Dentinogenesis imperfecta

## Poruchy zbarvení zubů

- Tetracykliny – žlutavé, žlutohnědé zbarvení, ireversibilní, poruchy mineralizace
- Fluoridy – nadměrná dávka, špinavě šedé skvrny, eroze

# Poruchy struktury zubů

## Amelogenesis imperfecta (AI)

- hereditární porucha tvorby skloviny
- postižena je dočasná i trvalá dentice
- **hypoplastická** – tenká sklovina normální tvrdosti
- zuby se nedotýkají, povrch nerovný, často pigmentace
- **hypomaturační** – sklovina měkká, normálně silná, snadno se odlupuje
- hnědo-žluto-bílo skvrnitá
- **hypokalcifikovaná** – zpočátku normální tloušťka, postupně ubývá, obnažuje se dentin
- měkká, sýrovité konzistence



Hypoplazie skloviny



Hypomineralizace skloviny

# AI a geny

- Dědičnost AI
  - X-vázaná,
  - autosomálně recesivní (AR) nebo
  - autosomálně dominantní (AD).

Geny:

- Autozomálně dominantní
  - AMLEX* (amelogenin),
  - AMBN* (ameloblastin enamel matrix protein),
  - ENAM* (enamelin) a
  - AMTN* (amelotin),
  - FAM83H*,
  - DLX3*
- Autozomálně recesivní
  - MMP20*
  - KLK4*

- *AMELX* tvoří 90 % organické hmoty skloviny a je štěpen enzymem *MMP20* a degradován enzymem *KLK4*.
- *ENAM* tvoří 5 % organické hmoty skloviny;
- *AMBN* je nezbytná pro aktivitu ameloblastů a
- *AMTN* se podílí na zrání skloviny.
- Mutace v jednotlivých genech vede k odlišnostem ve fenotypovém projevu onemocnění.



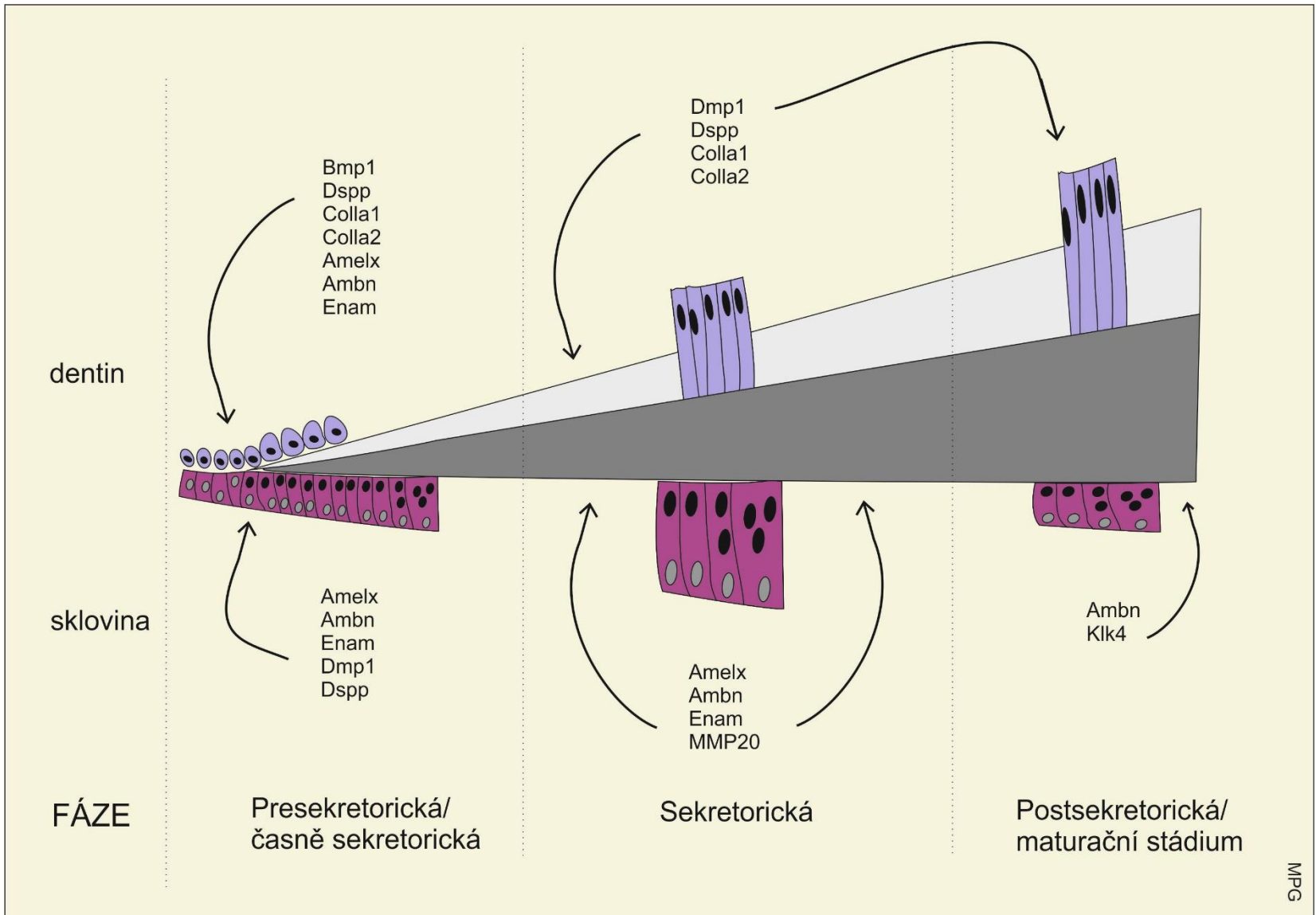
# Amelogenin

- X – vázané formy AI
- Mutace v genu pro amelogenin
- cca.15 mutací
- Mutace g4114delC – delece C
- Frameshift mutace - stop kodon
  - Zkrácený protein
- Zkráceny o 18 AMK



# Další proteiny

- ECM skloviny je komplexní mix mnoha proteinů, z nichž některé pocházejí z ameloblastů (enamelin, ameloblastin)
- Enamelin
- Ameloblastin
- Amelotin
- Amelin
- Tuft protein
- Keratin
- Albumin



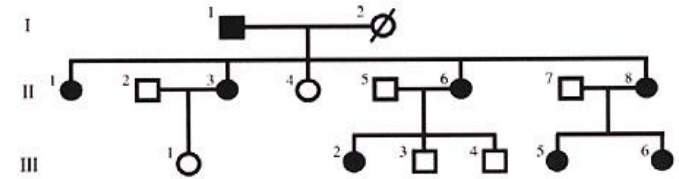
# Enamelin

AD forma AI

- Mutace v genu pro ENAM
- Substituce nukleotidu v exonu 4
  - Stop kodon
  - 52 AMK místo 1142



A



B



C



## Delece nukleotidu

Stop kodon

270 AMK místo 1142





# MMP-20 - Enamelysin

- Autozomálně recesivní AI
- 483 AMK (54kD)
- Exprimován ameloblasty a odontoblasty
- Degraduje amelogenin

# Amelogenesis imperfecta

- Hypoplazie i hypomineralizace
- Autosomálně dominantní hypoplastická hypomaturační AI s taurodontismem



# Poruchy struktury zubů

## ⊙ Dentinogenesis imperfecta

- nedostatečná kalcifikace dentinu, který téměř vyplňuje dřeňovou dutinu
- Zuby jsou šedé, žluté až žlutohnědé- snížená mechanická resistance, dochází rychle k abrazi



# Dentinogenesis imperfecta

autozomálně dominantních klinicky heterogenních poruchy

Klasifikace:

- DGI typu I s asociací s osteogenesis imperfecta (OI),
- DGI typu II bez asociace s OI;
- dysplazie dentinu I (DD I),
- dysplazie dentinu II (DD II).

# Dentinogenesis imperfecta

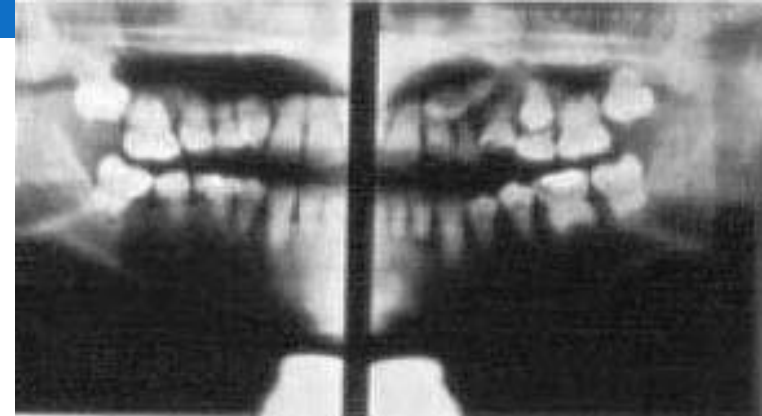
## DGI I

- ⊙ Molekulární defekty související s OI zahrnují mutace v pro-alfa řetězcích kolagenu typu 1 a jsou fenotypově charakterizované zvýšenou fragilitou kostí.
- ⊙ Kolagen typu 1, který je produktem genů *COL1A1* a *COL1A2*.
- ⊙ méně než 10 % případů je onemocnění způsobeno recesivní dědičností danou poruchou genů *CRTAP*, *LEPRE1* a *PPIB*
- ⊙ pohybují se v rozmezí od úplné absence dřene a kořenů až po normálně vyvinutou zubovinu

## DGI II

- ⊙ Přibližně 10% organické hmoty dentinu je tvořeno jinými proteiny než kolagenovými, zejména pak charakteristickými proteiny:
  - dentinových fosfoproteinem (DPP),
  - dentinovým sialoproteinem (DSP) a
  - dentinovým glykoproteinem (DGP).
- ⊙ jsou kodovány chimérickým proteinem *DSPP* (dentinový sialofosfoprotein)
- ⊙ U DGI II je postižen dočasný i trvalý chrup, přičemž postižení primární dentice je mnohem závažnější než postižení sekundární dentice

# Dysplazie dentinu



- ⊙ DD-I
- ⊙ Zuby mají klinicky normální tvar, formu a konzistenci.
- ⊙ RTG - ostré kořeny s konickou apikální konstrikcí.
- ⊙ Dochází k preeruptivní obliteraci pulpy, což vede k pozůstatkům pulpy ve tvaru půlměsíce paralelně s cemento-sklovinným spojením ve stálé dentici a celkové obliteraci pulpy v dočasném chrupu
- ⊙ DD-II
- ⊙ podobají se symptomům u DGI-II, avšak trvalá dentice je buď nedotčena nebo vykazuje mírné radiografické odchylky.
- ⊙ RTG - chybí dočasným zubům dřeň, u stálých zubů je prostor dřeně trychtýřovitý s výrůstky vznikajícími jako patologicky zvápenaté kousky dřeně.
- ⊙ Zubní kořeny v obou denticích jsou normální.

# Ektodermální dysplazie

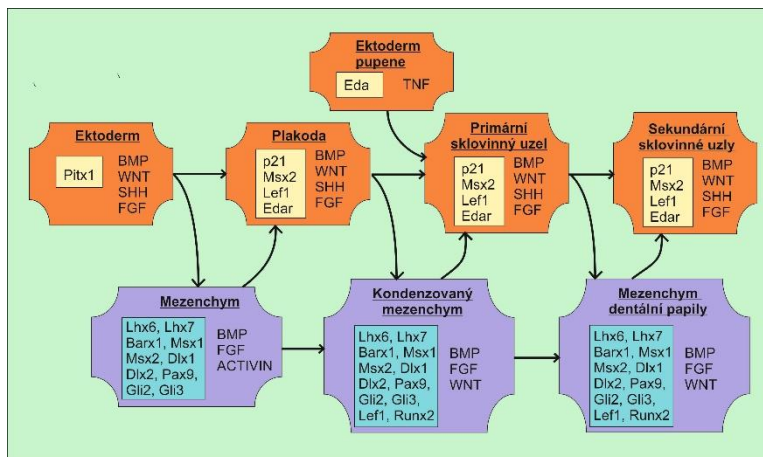
- souhrn 192 poruch
- anomálie v nejméně dvou následujících strukturách pocházejících z ektodermu: vlasy, kůže, nehty a zuby.
- Nejčastější ED jsou X-vázané recesivní hypohydrotická ED

## Hypohydrotická ED

- způsobeno bodovou mutací, delecí nebo translokací v genu pro EDA, který je lokalizovaný na chromozomu X
- není schopen spuštění normálních signálů potřebných pro interakce ektoderm-mezoderm

## Hydrotická ED (Cloustonův syndrom)

- autosomálně dominantní porucha způsobená mutací v genu *GJB6*,
- kóduje protein connexin 30 jako komponentu intracelulárních gap junction



# Molekulární defekty u ED

- První zmínka o genetickém defektu u ED - 1996
- Molekulární defekty byly identifikovány u 10 z 20 ektodermálních dysplazií
  - Hypohidrotic X linked ED
  - Reiger Syndrome
  - Tricho Dento Osseous Syndrome
  - Autosomal Dominant/Recessive ED
  - Clouston ED
  - Incontinentia Pigmenti



# Molekulární defekty u ED

## • X-vázaná hypohidrotická ED

- transmembrane protein (ectodysplasin-A)
- Genetický defekt – abnormální signál ve vztahu interakce ektoderm-mesoderm

## • Autosomálně dominantní a recesivní hypohidrotická ED

- receptor tumor nekrotizujícího faktoru (Downless DL)
- Mutace genu pro *GJB6*
- Riegerův Syndrom
- homeobox geny (RIEG, PITX2)
- Tricho-dento-osseous syndrome
- homeobox gene (DLX3)

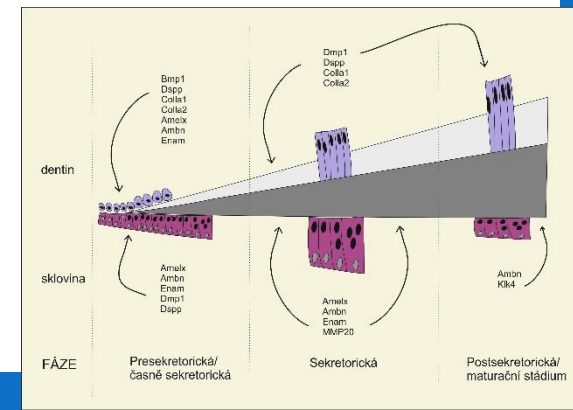
# Další geny a dysplazie

Witkopův syndrom (Tooth-and-nail syndrome; TNS)

- o ojedinelá autosomálně dominantní ektodermální dysplazie
- o manifestuje se defekty nehtových lůžek a hypodoncií s normální funkcí potních žláz a normální strukturou vlasů.
- o mutace typu non sense v genu *MSX1*.

Mutace v genu pro *p63* se podílejí na patogenezi několika syndromů, které zahrnují ektrodaktylii, syndaktylii, ektodermální dysplazie a rozštěpy.

- o Exprese genu *p63* je důležitá pro vývoj všech ektodermálních orgánů včetně zubů



# Syndromy asociované s orofaciálními defekty

- Syndrom Van der Woudeové je **autozomálně dominantní** poruchou, která je charakterizována rozštěpem rtu nebo patra a zřetelnými defekty dolního rtu - gen pro *IRF6* (interferon regulatory factor).
- Crouzonův syndrom je **autozomálně dominantní** poruchou, která je charakterizována předčasným uzavíráním kraniálních švů, maxilární hypoplazií a maxilární pseudo-rozštěpem - s mutacemi v genu pro *FGFR2* a *FGFR3*
- Apertův syndrom je **autozomálně dominantní** genetická porucha, která způsobuje abnormální vývoj lebky - s mutacemi v genu pro *FGFR2*

# Syndromy asociované s orofaciálními defekty II

- ⊙ **Treacher Collinsův syndrom** je charakterizován poruchami struktur odvozených z prvního a druhého branchiálního oblouku: hypoplastická zygoma a mandibula, mikrognacie, coloboma, defekty uší, laterální faciální rozštěp, rozštěp patra. - mutacemi v genu pro *TCOF1*
- ⊙ **Downův syndrom** - nedostatečně vyvinuté obličejové kosti, charakteristický opožděný vývoj a prořezávání zubů (erupcio tarda), chybění zubů a chybné postavení – chromozomální aberace
- ⊙ **Pierre-Robinův syndrom** je **autozomálně recesivní** postižení s heterogenní etiologií. Je však známa i X-vázaná forma poruchy. Jedná se o syndrom charakteristický rozštěpem patra, hypoplastickou mandibulou a hypertrofií jazyka
- ⊙ **Marfanův syndrom** je vzácná **autozomálně dominantní** genetická porucha pojivové tkáně. Charakteristické maxillární/mandibulární retrognacie, mikrognacie, úzké klenuté patro se stěsnanými zuby, a symptomy podobné symptomům u dentinogenesis imperfekta - mutacemi v genu pro fibrillin-1 (*FBN1*). *FBN1*

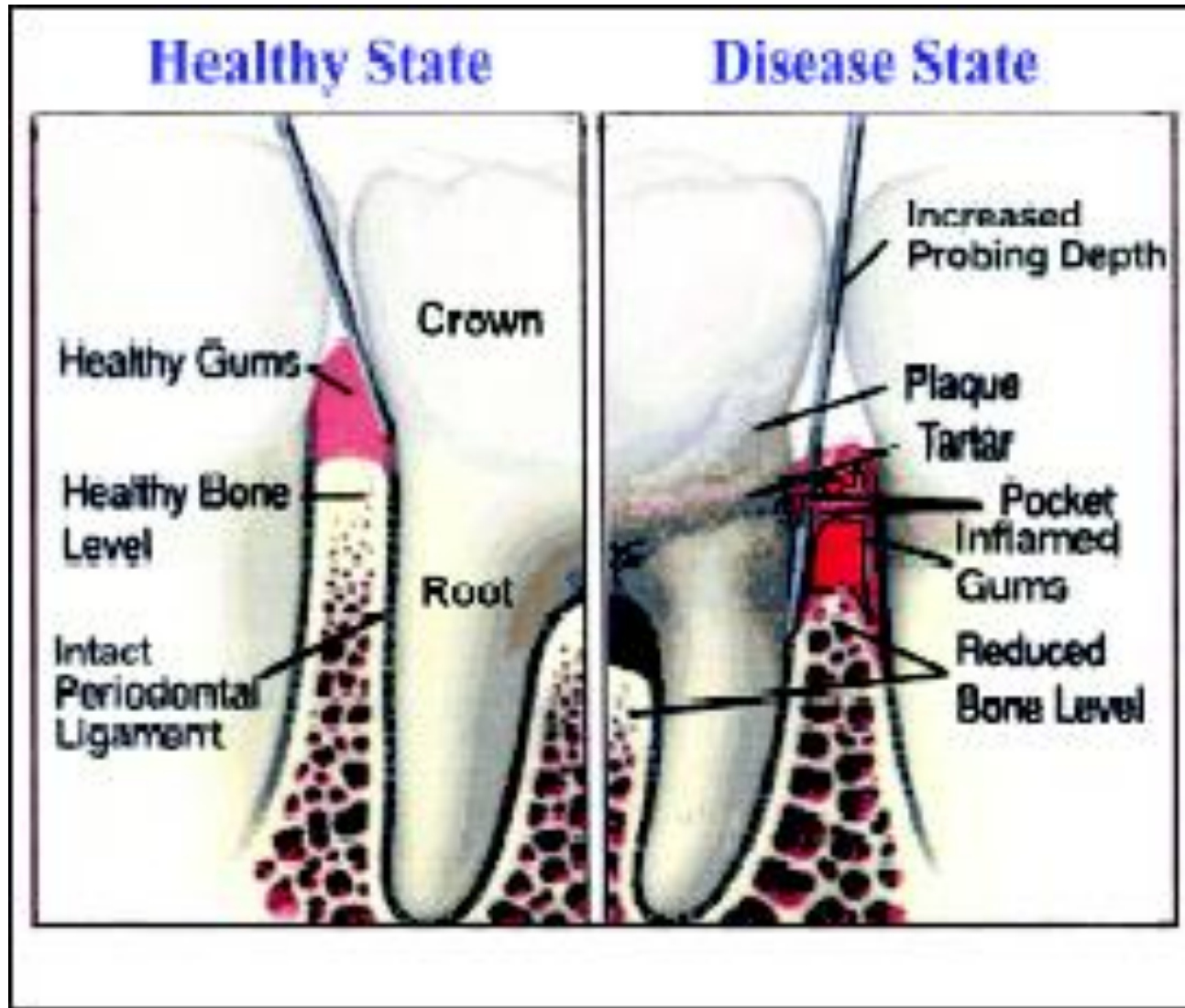
# Zubní kaz (caries dentium)

- dekalifikace tvrdých zubních tkání
- bakterie- *Lactobacillus acidophilus* a nehemolytické streptokoky, které rozkládají cukry zbytků potravy za tvorby organických kyselin způsobujících dekalifikaci-proteolytické enzymy odbourávají organickou složku
- zubní plak-tenký povlak z bakterií, hlenu a deskvamovaných epitelii
- další vlivy-typ potravy, složení slin, pH prostředí
- sklovina dekalifikuje-bělavá křídová skvrna, měkne, vzniká dutina, vyplňuje se zbytky potravy a bakteriemi-další šíření kazu, proces zasáhne dentin, šíří se dentinovými kanálky do hlobky a do šířky až do dřeně a vznikne pulpitis
- Mutace v genech, které způsobují poruchu strukturální tvorby skloviny (**AMLEX, ENAM, KAL4 a MMP20**) vedou k tvorbě skloviny mnohem náchylnější k zubnímu kazu.

# Zubní kaz

- ⊙ onemocnění multifaktoriální-faktory endogenní a exogenní
- ⊙ **predisponující faktory:**
- ⊙ dědičnost- vztah ke kazivosti nebo odolnosti proti kazu
- ⊙ dieta bohatá na sacharidy
- ⊙ obsah fluoru v pitné vodě- zuby odolné proti kazu mají vyšší obsah fluoru v tvrdých tkáních
- ⊙ osobní hygiena-intenzivnější tvorba zubního plaku při nedostatečné hygieně
- ⊙ tvar zubu-zuby s fisurami jsou kazivější

# Zánětlivé postižení parodontu



# PERIODONTAL DISEASE



## Periodontitis

- Advanced gum inflammation
- Bone loss
- Destruction of ligaments

## Gingivitis

- Inflamed Gums



# Monogenní onemocnění

- Jasná demonstrace genetické mutace v jednom lokusu podmiňuje náchylnost k rozvoji periodontitidy.

**TABLE 2****Examples of Syndromic Forms of Periodontitis in Which Inheritance is Mendelian and Due to a Genetic Alteration at a Single Gene Locus**

Condition	Biochemical/Tissue Defect	Inheritance	OMIM
Papillon-Lefèvre syndrome	Cathepsin C	AR	245000
Haim-Munk syndrome	Cathepsin C	AR	245100
Ehlers-Danlos syndrome type 4	Collagen	AD	130050
Ehlers-Danlos syndrome 8	Collagen	AD	130080
Cyclic neutropenia	neutrophil elastase	AD	162800
Chronic familial neutropenia	Defect unknown	AD	162700
Chediak-Higashi syndrome	lysosomal trafficking regulator gene	AR	214500
Congenital disorder of glycosylation type IIc	GDP-fucose transporter-1	AR	266265
Leukocyte adhesion deficiency type 1	Leukocyte chain adhesion molecule CD18	AR	116920

# Papillon LeFevre Syndrom (PLS)



- Klinicky charakterizováno jako:
  - Palmoplantární hyperkeratosa
  - Těžký časný nástup parodontitidy, která vede k předčasné ztrátě primárního a sekundárního chrupu (odlišuje PLS od jiných palmoplantárních keratodermií)
- Prevalence 1/4 miliony
- Bez vztahu k pohlaví

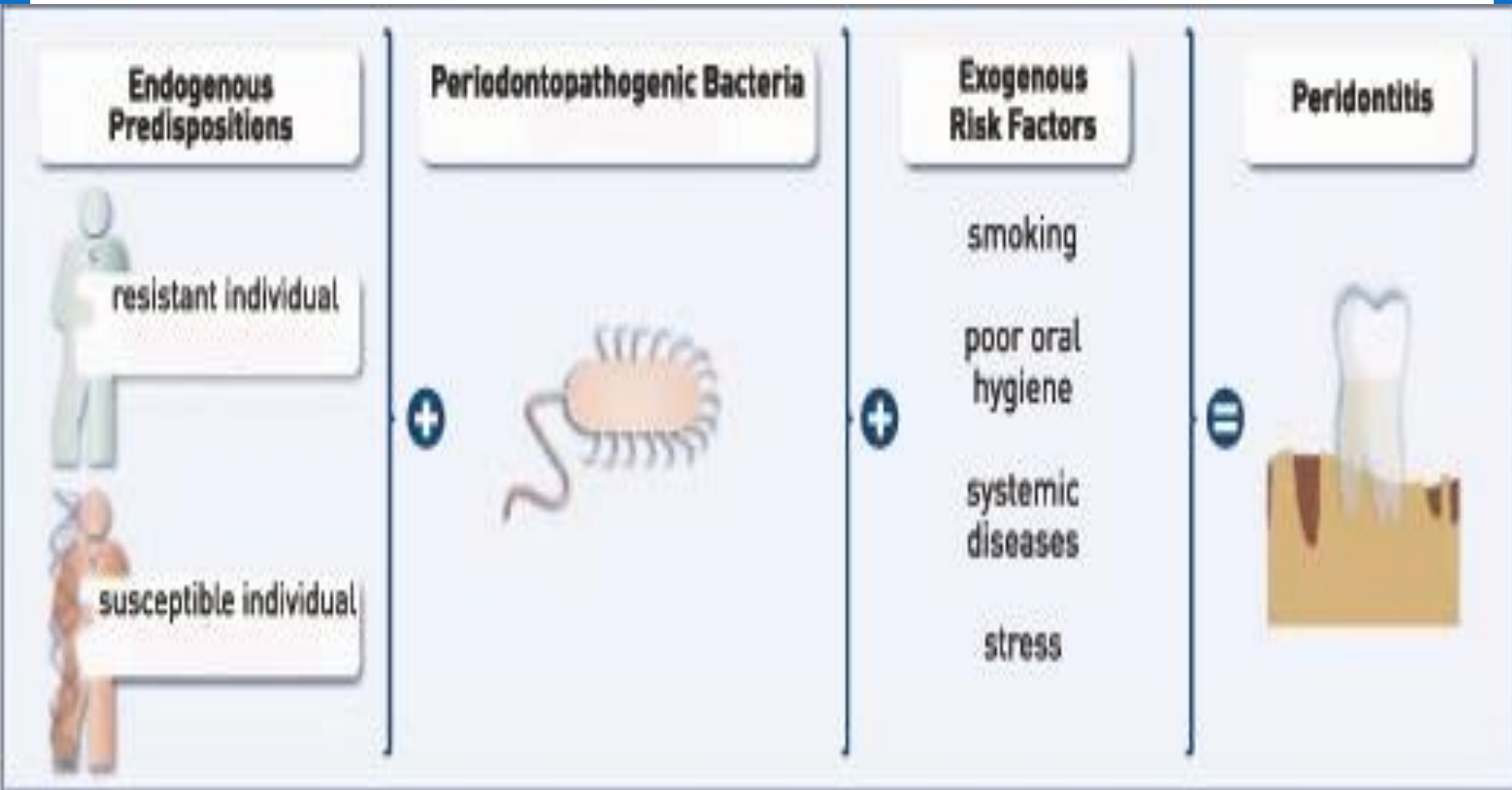
# CTSC gen kodující Katepsin C proteázu

- CTSC gen leží na chromosomu 11q14-Q21; 7 exonů kóduje lysozomální proteázu katepsin C
- Je exprimována ve vysokých hladinách v různých imunitních buňkách, včetně polymorfonukleárních leukocytů, makrofágů a v epiteliálních oblastech běžně postižených PLS, včetně dlaně, plosky, kolena, a ústní keratinizované gingivy (RT-PCR) (Hart et al., 1999).
- Kathepsin C je proteáza, která zpracovává a aktivuje řadu granulárních serinových proteáz důležitých pro imunitní a zánětlivé reakce myeloidních a lymfoidních leukocytů

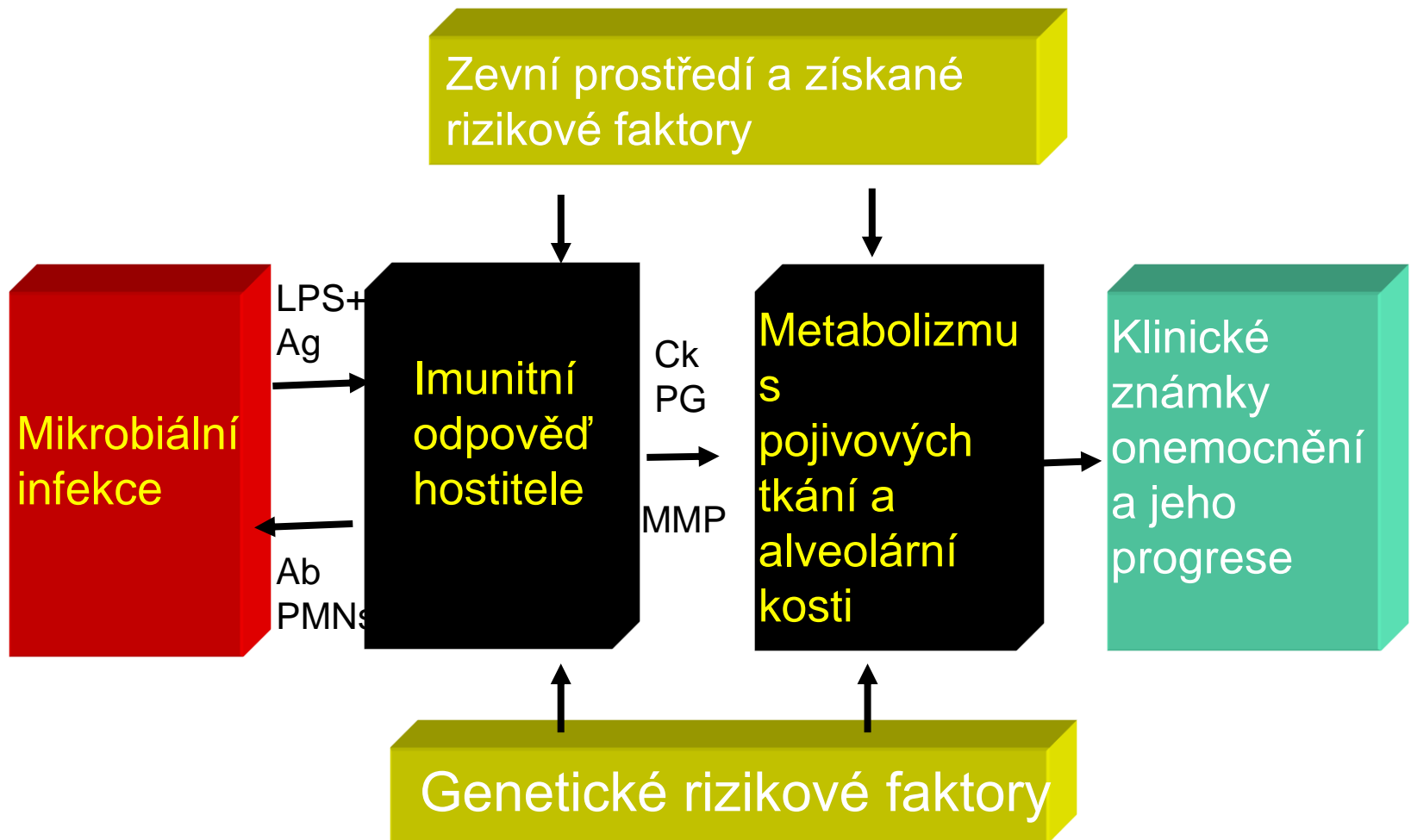
# Mutace v genu pro katepsinu C (CTSC)

- **Exon 1 „nonsense“ mutace (856C→T):** předčasný stop kodon v pozici 286. aminokyseliny
- **Tři mutace v exonu 2:**
  - delece jednoho nukleotidu (2692delA) v kodonu 349: frameshift a předčasný stop kodon,
  - 2 bp delece (2673-2674delCT): stop kodon v pozici aminokyseliny 343,
  - substituce G/A v kodonu 429 (2931G/A): předčasným stop kodon.
- Zkrácený nebo konformačně alterovaný proteinu nemusí být transportován do organely a nemusí být schopen aktivovat protein kinázy
- Jinými slovy, aktivita Katepsinu C u těchto pacientů téměř chybí

# Multifaktoriální onemocnění



# Současná koncepce patogeneze parodontitidy



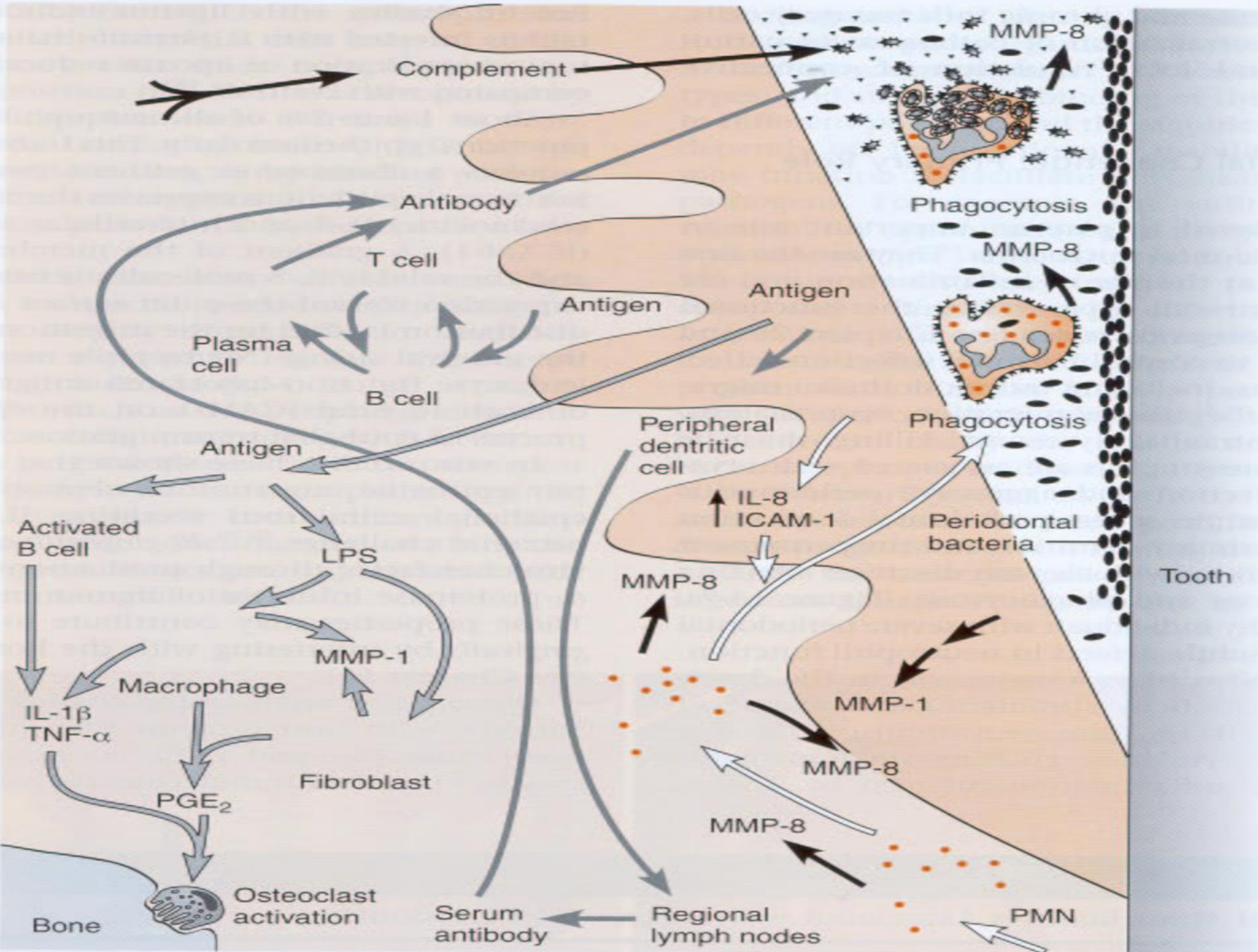
# Únik bakterií před obrannými mechanismy hostitele

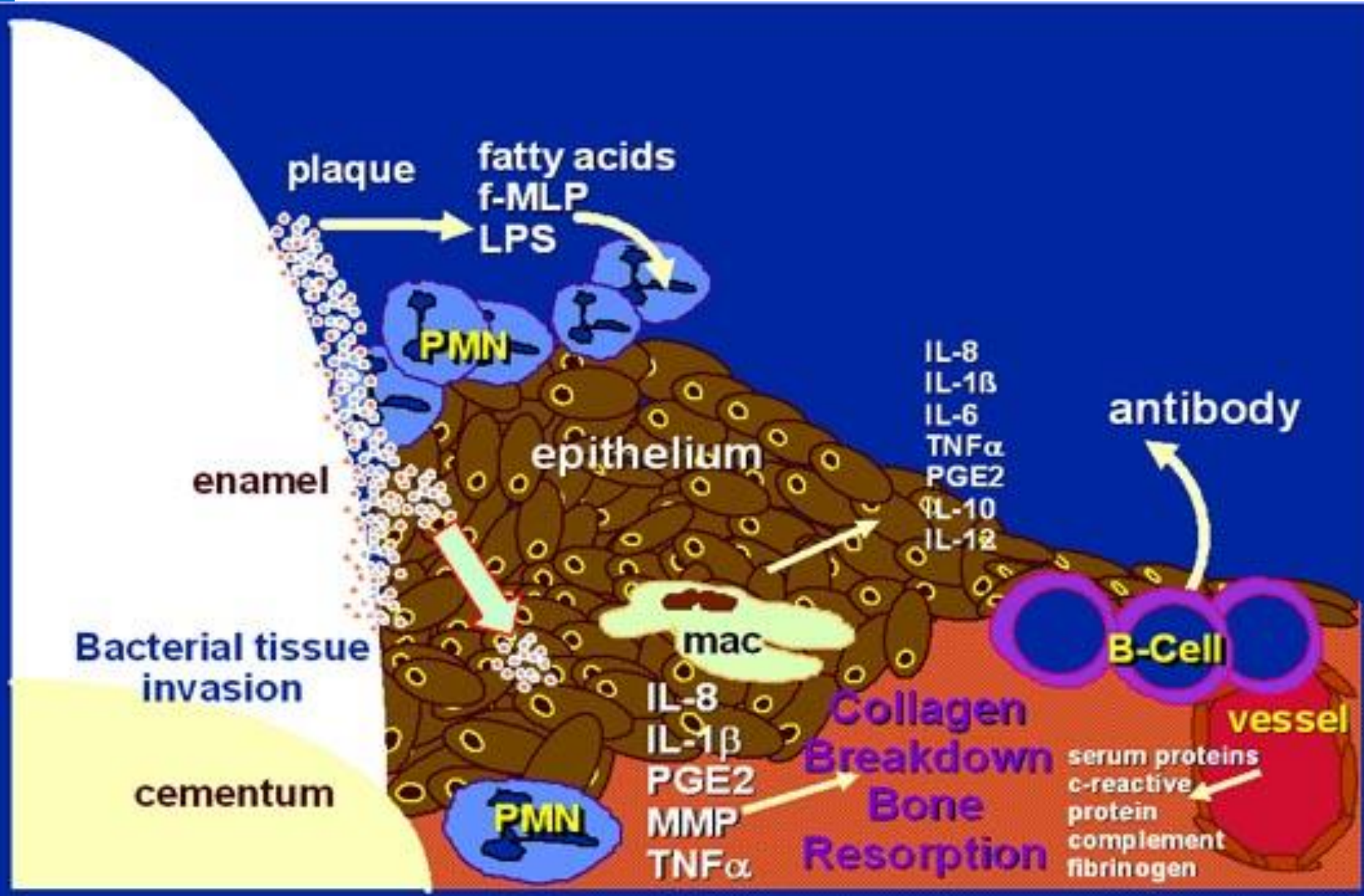
- Mohou tvořit **imunorepelentní látky** odpuzující fagocytózu
- Přítomnost **bakteriální stěny**
  - ztěžuje fagocytózu  
(S. aureus tvoří plazmakoagulázu – umožní obalení fibrinem, což působí antifagocytárně)
  - chrání před účinky komplementu
- **Přežívání v makrofázích**  
(odolná stěna, zábrana splynutí fagolysosomu, zábrana respiračního vzplanutí, přechod z fagosomu do cytoplazmy)
- **Antigenní variabilita** → snižuje účinnost specifické imunity
- **Poškozování imunitního systému hostitele**  
(např. leukocidin S. aureus)



# Reakce organismu na bakteriální infekci

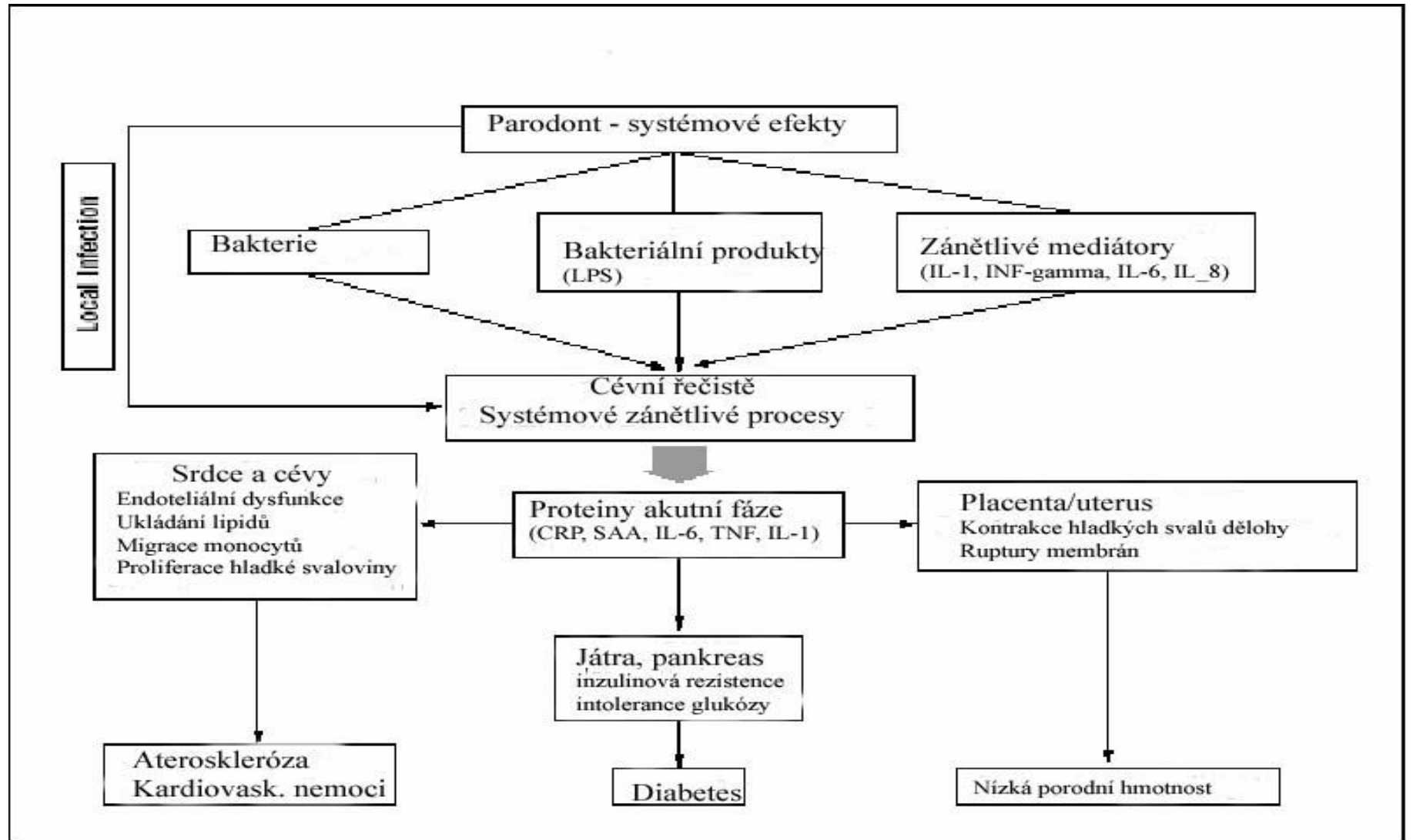
- Branou vstupu → obvykle slizniční povrchy (porušení integrity)
- Osud hostitele závisí na:
  - **obranyschopnosti** (z velké části determinována geneticky)
  - **patogenitě bakterie** (invazivní schopnost, tvorba toxinů, schopnost odolávat obranným mechanismům hostitele)
- neinvazivní** – množí se v místě vstupu do organismu
  - ↙ ohrožují v případě produkce toxinů  
(obranou jsou pouze neutralizační Pt)
- invazivní** – pronikají do organismu (extracelulární x intracelulární)  
(obranou jsou Pt, komplement, fagocytóza vs. makrofágy)
- **velikosti infekční dávky**







# Onemocnění parodontu – lokální problém?



# IL-1 Gene Polymorphisms

- **1997 Kornman et al** – asociace polymorphismů v genu kódujícím IL-1a(-889) a IL-1B(+3953) se závažnějšími formami parodontitidy.
- IL-1 polymorfní klaster (**PST-periodontitis susceptibility trait**) byl asociován se závažností PD pouze u nekuřáků, rozlišil jedince s těžkou parodontitidou od mírného onemocnění.

## Genetic control of IL-1: Genes and Locus of SNPs associated with controlling IL-1 biological activity

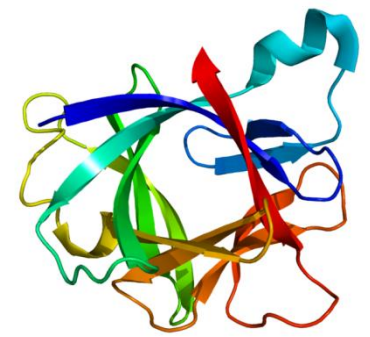
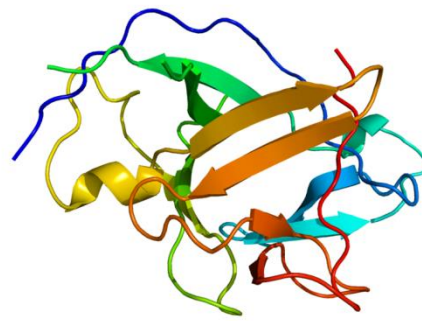
Genes	Polymorphism Locus	Current Locus assessed with test	Controlled product
IL-1A	Allele 2 -889	Allele 2 IL-1A +4845	IL-1 alpha
IL-1B	Allele 2 +3953	Allele 2 IL-1B +3954	IL-1 beta
IL-1RN			Protein receptor antagonist (impedes IL-1 alpha and beta)

**Genetic Susceptibility Test** for periodontitis: tests for the presence of at least one copy of allele 2 at the **IL-1A +4845** loci and at least one copy of allele 2 at the **IL-1B +3954** locus.

*\* IL-1A +4845 is being used because it is easier to identify than IL-1A -889 and it is essentially concordant with it.*

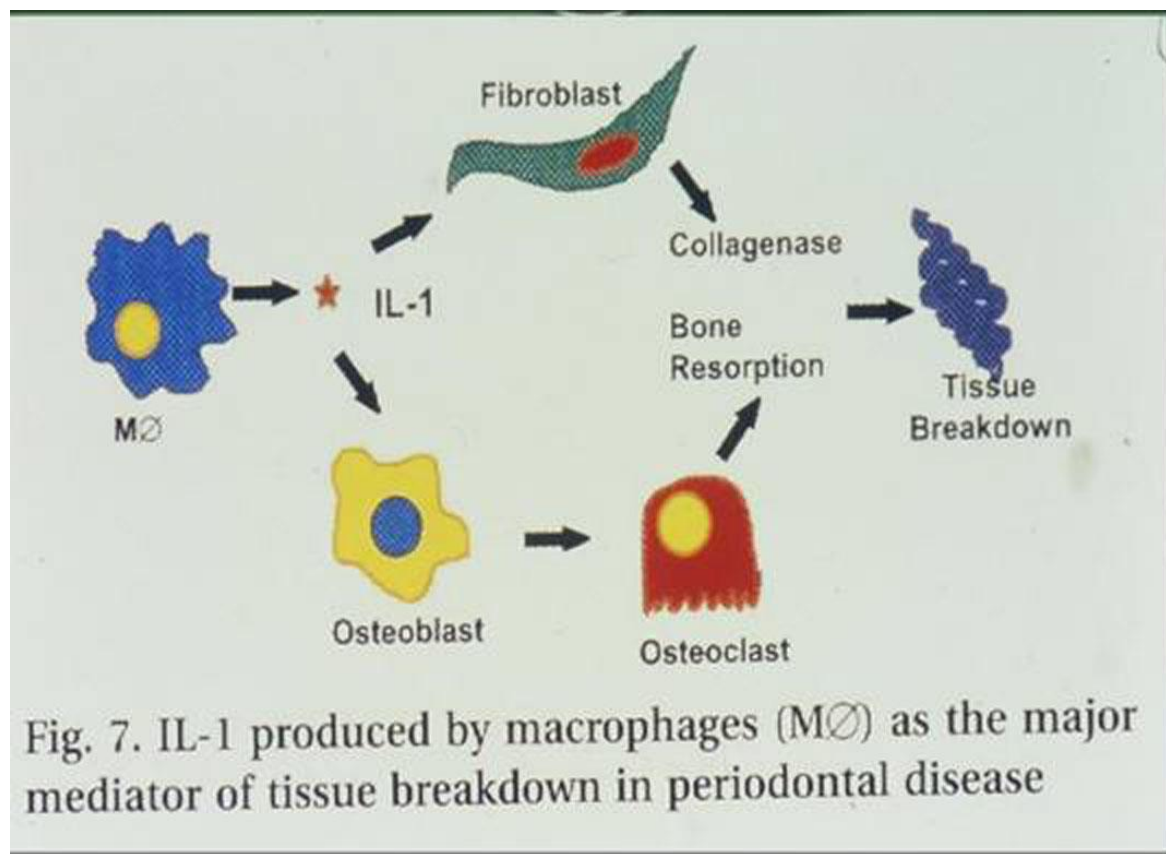
*\*\* IL-1B +3953 has been now renumbered as IL-1B +3954 because the current convention indicates that the numbering of the transcription should begin at +1 instead of zero.*

# Interleukin 1



- Prozánětlivý multifunkční cytokin.
- Umožňuje pronikání zánětlivých buněk do míst infekce
- Podporuje kostní resorption
- Stimuluje uvolňování eikosanoidů (PGE<sub>2</sub>) monocyty a fibroblasty
- Stimuluje uvolňování MMP, která degraduje proteiny ECM.
- Formy IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$

# IL-1 jako modulátor periodontitidy





# +IL-1 genotyp a IL-1 protein

- Konkrétní parodontitidy-asociovaný IL-1 genotyp sestává z varianty v IL-1B genu, který je spojen s vysokými hladinami IL-1 (Poiciot et al 1992)
- Pacienti pozitivní pro sloučený IL-1A (4845) a IL-1B (3954) s parodontitidou-asociovaný genotyp mají vyšší hladiny IL-1B na GCF, ale ne v gingivální tkáni před a po ošetření (Kornmann et al 1999)
- Nositelé alely 2 (-889) u pacientů s chronickou parodontitidou vykazovali téměř čtyřnásobný nárůst hladiny IL-1 (Shirodaria et al., 2000)

# Clinical Significance of IL-1 Genotype

## Bleeding Upon Probing

### **Lang et al. (2000)**

- after periodontal surgery, maintenance patients were monitored for BOP and tested for the candidate genotype.
- no significant relationship between BOP and the candidate polymorphism when the entire study population was evaluated (N=333).
- non-smokers genotype positive demonstrated significantly more bleeding (when compared to non-smokers genotype-negative).

- **Genotype and tooth loss**

McGuire and Nunn (1999)

- Genotype-positive individuals had a 2.7 greater chance than genotype-negative patients of losing a tooth.
- Combined effect of being genotype-positive and heavy smoker increased the odds of tooth loss to 7.7 compared with genotype-negative non-smokers.
- PST can be helpful in treatment planning.

- **Genotype and healing after surgery**  
Zucchelli (2000)

De Sanctis and

- Evaluated the impact of patient's genotype on maintenance of gained clinical attachment after guided tissue regeneration (GTR)
- At base line: no difference between genotype-positive (N=14) and genotype-negative (N=26) with reference to clinical parameters (BOP, PD, and CAL)
- At **one year**: no difference (gain of CAL 5.1 mm vs 5.2 mm; residual PD 6.3 mm vs 6.4 mm)
- At **four years**: genotype positive patients demonstrated a significantly greater loss of clinical attachment (2.3 mm vs 1.0 mm) and increased probing depth (2.2 mm vs 0.8 mm)

- **Periodontal Pathogens**

**Socransky et al (2000)**

Found that the mean counts of specific species were higher in general IL-1 positive genotypes compared to negative subjects. Species detected at higher levels were those frequently detected with periodontal inflammation.

# Prevalence of genotype positive individuals in different ethnic groups

- Frequency of many genetic alleles varies between ethnic groups, therefore, it is necessary to establish allele frequencies in populations before genetic test can be evaluated and used.
- **Caucasians:**
  - 29% of northern european caucasians were genotype positive (Kornman et al., 1997)
- **African Americans:**
  - 14.5% of non-diseased individuals and 8% of patients with localized form of aggressive periodontitis were genotype-positive. (Walker et al., 2000)
- **Chinese:**
  - 2.3% of sample of 132 mod-severe periodontitis cases were genotype-positive (Armitage et al., 2000)
- **Hispanics:**
  - 26% of hispanic individuals with peridontitis were genotype-positive (Lopez et al., 2005)

***Take home message: Dissimilarity in the prevalence of genotypes in different ethnic groups precludes extrapolating data from one group to another.***

# GENETIC RISK DETERMINATION WITH GENOTYPE® PST® PLUS



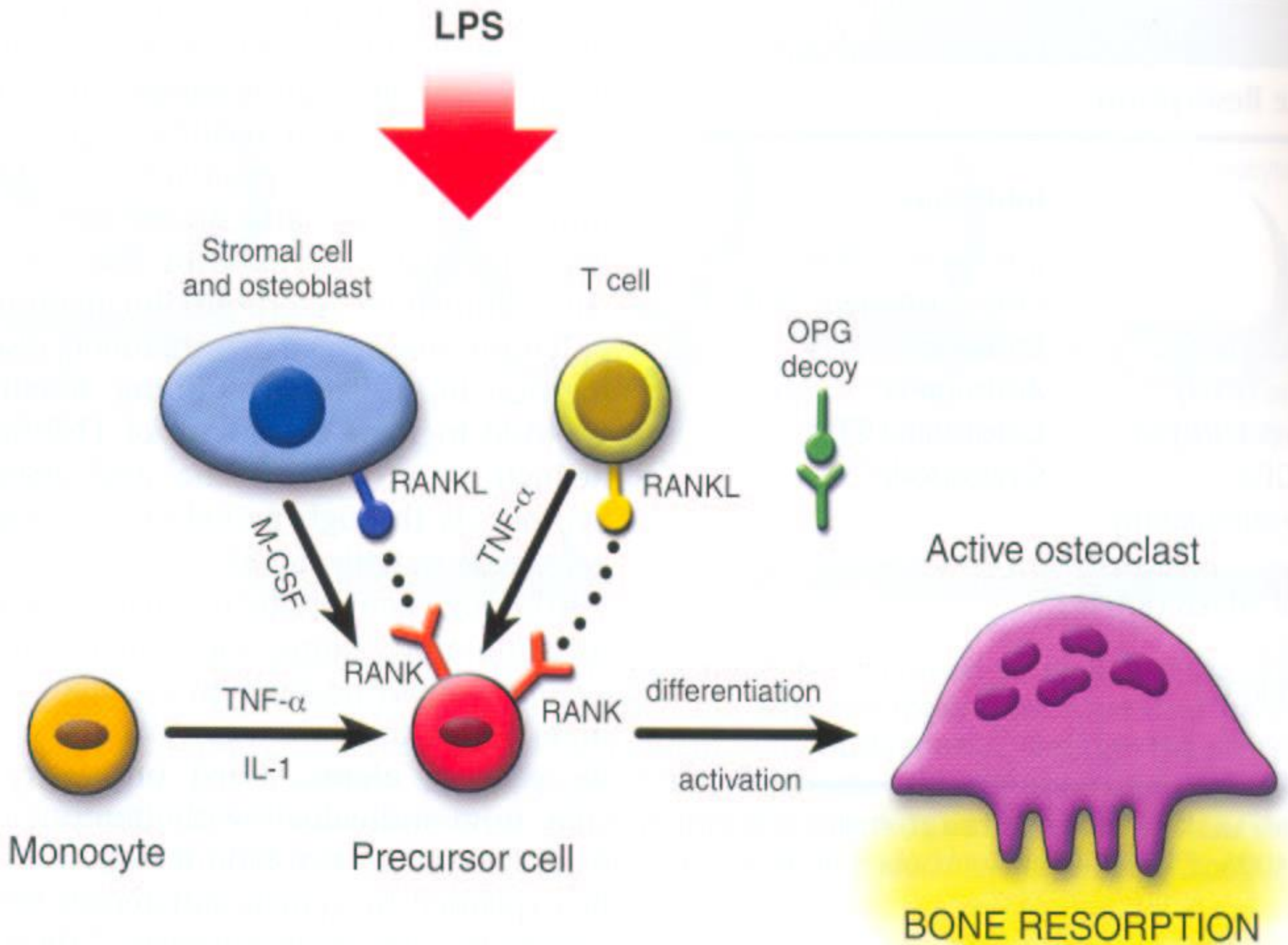
# TLR

- Poprvé popsány jako gen pro typ I transmembránového receptoru
  - důležitá úloha při dorzoventrálním vývoji embrya Drosophily
  - absence tolls vedla i k vážnému **postižení obranyschopnosti** proti plísním a G+ bakteriím
- ⇒ Nalezeny savčí homologa – podobná úloha ???



# TLRs receptory a jejich ligandy u onemocnění parodontu

<b>PRR</b>	<b>PAMP</b>	<b>Periodontal Pathogen</b>
TLR-2	Lipoproteins Atypical LPS Outer membrane proteins Fimbriae Nonendotoxic glycoprotein	<i>Bacteroides forsythus</i> * <i>P. gingivalis</i> , <i>C. ochracea</i> Oral treponemes <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i>
TLR-4	HSP-60 (GroEL) LPS	<i>P. gingivalis</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>F. nucleatum</i>
TLR-9	CpG-containing DNA	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. micros</i>



# Akutní periodontitida (akutní) Periodontitis akutní

- Hyperémie a serózní exsudace
- Hnisání, osteoklastická přestavba kostní tkáně
- 4 fáze
  - ✓ *Periodontální (desmodontální)*
  - ✓ *Endoseální*
  - ✓ *Periotální*
  - ✓ *Submukosní*
- Silná bolestivost ve všech fázích, otoky v pozdějších fázích
- vztah polymorfismů v genech pro *IL1B*, *IL1RN*, *FcyRIIIb*, *VDR* a *TLR4* s agresivním typem parodontitidy.

# Periodontitis - chronická

- ⊙ Sekundárně z akutní periodontitis
- ⊙ Primárně chronická (častější)

## Formy

- ⊙ Cirkumskriptní (granulomatozní)
- ⊙ Granulomatozně progresivní – píštěle (slizniční, kožní)
- ⊙ Difúzní – odbourávána i alveolární kost
- ✓ *Granulační tkán*
- ✓ *Makrofágy*
- ✓ *Možnost tvorby radikulární cysty*

S chronickým typem parodontitidy jsou spojovány polymorfismy v genech pro ***IL1B, IL1RN, IL6, IL10, VDR, CD14, TLR4 a MMP1***.

Meta-analýza publikovaných dat asociovala varianty polymorfismů ***IL1A-889, IL1B 3954, IL1B-511, TNFA-308 a IL6-174*** k agresivní i chronické parodontitidě.

# Nádory čelistních kostí – neodontogenní - benigní

## Osteom

### Exostoza

- ✓Torus palatinus
- ✓Torus mandibularis

**Gardnerův syndrom** (autozomálně dominantní) –  
mnohotné osteomy čelistí, polyposis coli s vysokým  
maligním potenciálem, epidermální cysty, fibromy

**Osteochondrom** – chrupavčitý povrch

### Cemento-osifikující fibrom

- ✓Mandibula, premolárně, molárně
- ✓Fibroblasty, kolagen a kalcifikace – různého stupně
- ✓Pomalu rostoucí, dobře ohraničený

# Nádory čelistních kostí – neodontogenní - benigní

## Obrovskobuněčný (reparativní) granulom

- Spíše hyperplasie, nejasná etiologie
- Mladší jedinci, expanzivní růst, může být destruktivní
- Proliferující dobře vaskularizované stroma s četnými obrovskými buňkami (osteoklasty)
- Prokrvácení a hemosiderin
- **Diferenciální diagnostika** obrovskobuněčných lézí
  - ✓ *Hyperparathyroidismus – zvýšená hladina kalcia*
  - ✓ *Cherubinismus – oboustranná léze*
  - ✓ *Osteoklastom – agresivní růst*
  - ✓ *Aneurymatická kostní cysta – cévní prostory*
  - ✓ *Fibrozní dysplasie - neohraničená*

# Nádory čelistních kostí – neodontogenní - benigní

Hemangiom kosti – vzácný

Melanotický neuroektodermový tumor - progonom

- V dětství
- Vzácný
- Pigmentace

# Nádory čelistních kostí – neodontogenní - maligní

## Osteosarkom

- Vzácny
- Mandibula
- Lepší prognóza než u osteosarkomů dlouhých kostí

## Chondrosarkom

## Ewingův sarkom – PNET

## Mnohotný myelom

- Biopsie kostní dřeně
- ELFO
- Riziko AL amyloidózy
- Makroglosie



# Nádory čelistních kostí – neodontogenní - maligní

## Histiocytosis X (Langerhansovy buňky)

- Solitární eosinofilní granulom
- Mnohotný eosinofilní granulom (a Hand Schüller Christian)
- Letterer-Siwe
- ✓ *Birbekova granula v elektronové mikroskopii*
- ✓ *Zub „floating in the air“ – destrukce kosti v okolí zubu*

## Metastatické nádory

- ✓ *Mléčná žláza*
- ✓ *Plíce*
- ✓ *Prostata*
- ✓ *Thyroidea*

# Patologie čelistního kloubu

## Ankylóza

- Fibróza
- Trauma
- Tumor

## Dyslokace kloubu

- Ehlers Danlosův syndrom, Marfanův syndrom

## Dysfunkce

- „pain dysfunction syndrome“