

OTKA nyilvántartási szám: **K-75782**

Témavezető neve: **Dr. Tarján Ildikó**

Téma címe: **Foghiányokat kísérő egyszerű nukleotid polimorfizmusok hypodontiában**

A kutatás időtartama: **2008-2012**

A KUTATÁS EREDMÉNYEI

Hipotézis és a kutatómunka háttere

A veleszületett fogazati rendellenességek közül leggyakrabban a fogcsírahiány, a **hypodontia** fordul elő. Az általunk használt definíció hypodontia egy vagy több maradó fog hiányával, míg ezen belül egy szélsőségesebb anomália, az **oligodontia** hat vagy annál több maradó fog hiányával jellemezhető. A hypodontia a leggyakoribb fogorvosi abnormalitás és a lakosság körülbelül 20%-át érinti világszerte. A foghiány leggyakrabban a harmadik molárisokat érinti. A bölcsességfogon kívüli foghiányok előfordulása változó, 2-54% közötti, a vizsgált populációtól, illetve attól függően, hogy tej vagy maradó fogakról van-e szó. Maradó fogak esetében, az általunk vizsgált magyar populációban mintegy 16%-ban fordul elő. A foghiányok etiológiája komplex, mind genetikai, mind környezeti elemekkel összefüggésbe hozható. A genetikai polimorfizmusok vizsgálata és az állatokon végzett génmutációs kísérletek rámutattak arra, hogy a fogfejlődés számos gén befolyása alatt áll. Bár az egyes tényezők súlyát nem ismerjük, a fogfejlődés bonyolultságát mutatja, hogy az egér odontogenezisének molekuláris tanulmányozása több mint, 300 gén részvételét mutatták ki a fog kifejlődésében. Az eddig elvégzett genetikai vizsgálatok különböző etnikai csoportokban nagyon különböző eredményeket mutattak a hypodontia tekintetében. Ezért is tartottuk fontosnak egy kifejezetten a közép-kelet európai populációt érintő átfogó genetikai-genomikai vizsgálat kivitelezése, amelytől azt várjuk, hogy a hazai populációban a genetikai faktorok szerepére is fény derül.

Vizsgálataink fő célja a gyakori veleszületett fogazati rendellenesség, a fogcsíra hiány genomikai hátterének megismerése volt a magyar populációban. Olyan egyedi nukleotid polimorfizmusokat kerestünk, amelyekről korábban nem tudtuk, hogy a hypodontia rizikótényezői. Ennek eredményeként azt reméltük, hogy a hazai populációra nézve átfogó képet kaphatunk a fogak csírahiányát befolyásoló gének egyszerű nukleotid polimorfizmusairól (SNP), ezen felül új géneket azonosíthatunk, amelyeket korábban nem hoztak összefüggésbe a hypodontia kialakulásával. Várakozásaink szerint mindezek hozzájárulhatnak a fogak számát, formáját és pozícióját meghatározó mechanizmusok megismeréséhez a fogfejlődés során. A genetikai/genomikai háttér felderítése jó alapot szolgáltathat új diagnosztikus módszerek kifejlesztésére és a génterápia megalapozására a szájüregi kórfolyamatok kezelésében.

Fő céljaink a következők voltak:

- 1. Már ismert, a foghiányok kialakulásában feltételezhetően szerepet játszó MSX1 és PAX9 gének egyedi polimorfizmusainak célzott feltérképezése a magyar populációban.**
- 2. Vizsgálataink második, populáció genetikai/genomikai fázisában a fogfejlődésben valószínűsíthetően szerepet több, a fog és fogkörnyéki szövet fehérjéit kódoló és a fogak**

organogenezisében kulcsszerepet játszó gén polimorfizmusait teszteltük nagy mintaszám gazdaságos vizsgálatára lehetőséget adó berendezés segítségével.

3. Mindezekhez kapcsolódtak klinikai vizsgálataink, amelyek közvetlenül vagy közvetve kapcsolódtak a mintagyűjtéshez, illetve sejtbiológiai vizsgálataink, amelyhez a vizsgálati anyagot úgy nyertük, hogy a megfelelő etikai engedélyek birtokában, természetesen a megfelelő klinikai indikáció esetén a páciensekből nemcsak genomikai vizsgálatához szükséges nyálkahártya mintát, de fogak eltávolítása kapcsán nyerhető fogkörnyéki és fogbél szövetmintákat is nyertünk. Ezek a vizsgálatok fontos információkkal egészítik ki vizsgálati eredményeinket.

Elért eredmények, kidolgozott módszerek, eljárások

1. Módszertani megalapozás

A vizsgálatok módszertani megalapozó szakaszában közel 150 páciens mintáit gyűjtöttük, állapot felmérés után nyálkahártya kaparék mintát gyűjtöttünk a genetikai vizsgálatokhoz, a vizsgált személyek DNS-ét izoláltuk. Vizsgálataink korai szakaszában a minták egy része sérültnek bizonyult. A DNS degradáció kivédésére módosítottunk a mintavételi és tárolási protokollon, melyek után a DNS-ek mind felhasználhatóak további vizsgálatokban, mivel a kontrollként alkalmazott konstitutíván expresszálódó génnel, a β -actinnal végzett vizsgálatban mind pozitív eredményt adtak. Polimorfizmus vizsgálatainkat minden esetben az irodalomban már korábban leírt PCR-RFLP kísérleti körülményekhez hasonlóan kezdtük, ezt tekintettük alapnak. Az ellenőrzések során több leírt primer oligonukleotid szekvenciája nem bizonyult pontosnak, ezért azokat a tényleges nukleotid szekvenciának megfelelően megváltoztattuk. Több helyen a PCR reakciók körülményei sem voltak megfelelőek, ezért azokon is változtattunk. Így mindegyik vizsgált polimorfizmus kimutatására alkalmas reakciót optimalizáltunk. Bizonyos esetekben a restrikciós enzimek helyett is más enzimet választottunk, mert azokat alkalmasabbnak, specifikusabbnak találtuk. Minden vizsgált potenciális SNP helyen találtunk mindkét allélváltozatra példát. Az időközben kutatólaboratóriumunkban sikerült beszerezniünk egy StepOne Applied Biosystems valós idejű PCR készüléket, s ennek alkalmazásával folytattuk az „SNP Genotyping” vizsgálatokat. Eredményeink minden esetben megegyeztek a PCR-RFLP-vel kapott eredményekkel, viszont az analízis a készülék segítségével jóval gyorsabbnak és egyszerűbbnek bizonyult.

2. Kidolgozott és alkalmazott módszerek

Szövetminták. Szájnyálkahártya kaparékot gyűjtöttünk 469 páciens-től a Semmelweis Egyetem, a Pécsi, és a Szegedi Orvostudományi Egyetemek Gyermekfogászati és Fogszabályozási Klinikáin. A mintákat -20°C -on tároltuk DNS kivonásig. A tanulmányt a 23/2002 V.9-es humán kísérleteket szabályozó EüM rendelet és a TUKÉB engedélye (#84-258/2008-1018EKU) alapján végeztük. Mintavétel előtt a tanulmányban résztvevő minden beteg-től beteg-tájékoztató áttanulmányozása utáni beleegyező nyilatkozatot kaptunk. A részletes orvosi-fogorvosi vizsgálat kiterjedt az általános orvosi, szájhigiénés és családtörténeti vizsgálatra, valamint panorámaröntgen felvételre. Az elsődleges beválasztási kritérium hipodonciára legalább egy maradandó fog csírahiánya, kraniofaciális elváltozások és egyéb szisztémás betegség nélkül. Ugyanezen kritériumok érvényesültek oligodoncia esetén is, de minimum hat hiányzó fog esetén. A kontroll csoportban egészséges önkéntesek voltak szabályos tej és végleges fogazattal kraniofaciális rendellenességek nélkül. A kontroll csoportban 260, a hipodonciásoknál 192, az oligodonciásoknál 17 személy volt. A résztvevők hiányzó fogainak eloszlását az 1. ábra mutatja.

DNS izolálás és SNP genotipizálás Szájnyálkahártya kaparékból DNS-t izoláltunk Nucleospin Tissue kit segítségével, a gyártó instrukciói alapján. A kivont DNS-t -20°C -on tároltuk. A DNS integritását 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A koncentrációkat Qubit fluorométerrel mértük. Az alléldiszkriminációs tesztek 2 párhuzamossal végeztük Applied Biosystems-Taqman genotipizáló tesztek segítségével StepOne AB Real Time PCR készüléken. A genotipizáló reakciókat $12,5\ \mu\text{l}$ térfogatban végeztük, $3\ \text{ng}$ DNS használatával, $6,25\ \mu\text{l}$ Taqman Universal PCR Master Mix-szel és $0,625\ \mu\text{l}$ Taqman SNP assay-vel. Az eredményeket az AB Stepone software analizálta.

Statisztikai analízis módszertani megalapozása. Excel táblázatkezelővel kiszámoltuk a genotípus eloszlásokat és allélfrekvenciákat. Ellenőriztük a Hardy Weinberg egyensúlytól való eltérést, ahol $p < 0,05$ alatti értékeket vettük szignifikánsnak. Az allél és genotípus egyváltozós asszociációs analíziseket a németországi Helmholtz Humángenetikai Intézet software-ével (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) végeztük. A páros kapcsoltság egyenlőtlenségi és a haplotípus elemzést a Haploview software-rel (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/hap>) végeztük. Bayes-i hálózat alapú többszintű valószínűségi analízist alkalmaztunk, mely lehetővé teszi az asszociációk analízisét különböző absztrakciós szinteken: modell alapú páros valószínűség (direkt asszociáció), változó készletek valószínűsége és releváns változók statisztikai együtt hatásai. Elvégeztük a Bayes-i elemzés eredményét többváltozós statisztikai analízis logisztikai regressziós modellezéssel SPSS programmal is, először változó szelektálásos módszerrel $PIN=0,05$ valószínűségi küszöbvel a változó beválasztáshoz, valamint $POUT=1$ kizáró küszöbvel a változó kivételéhez.

3. A foghiányok megoszlása

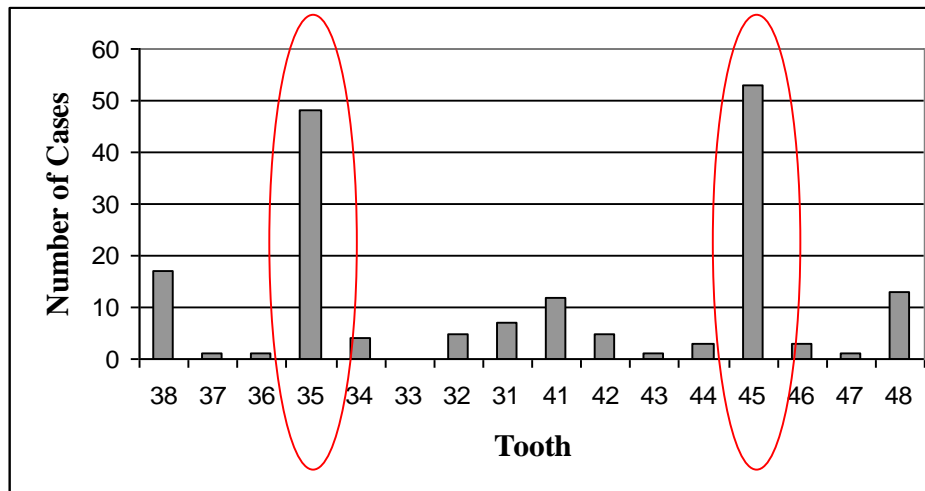
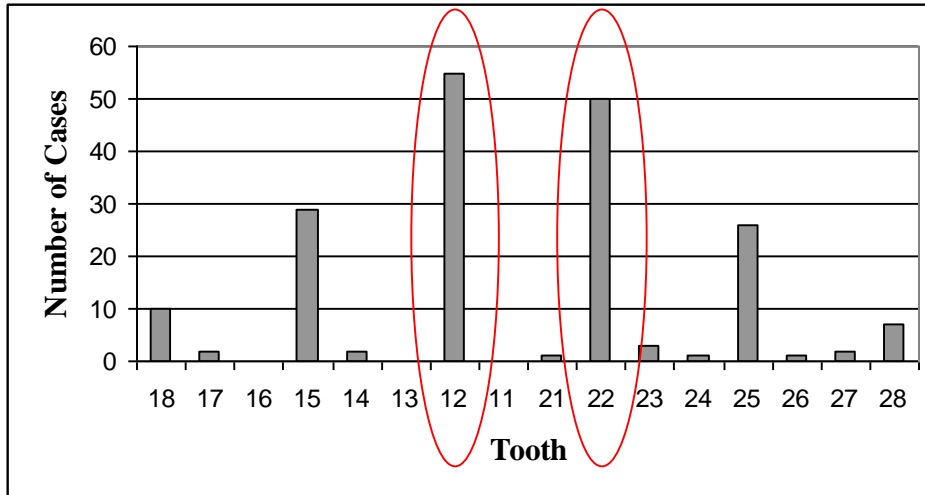
Tanulmányunkban a hypodontia csoportban (192 eset) a hiányzó fogak száma 363 volt. 73 személynek volt egyetlen hiányzó foga (38%), 83 (43%)-nak kettő, 18 (9%)-nak három, 15 (8%)-nak négy és 3 (2%)-nak öt. Egy hiányzó fognál a bal alsó második kisőrlő volt a leggyakoribb. Két hiányzó fognál a hiányzó felső laterális metszők voltak a leggyakoribbak. A hiányzó fogcsoportok a következők voltak csökkenő sorrendben: 105 felső laterális metsző (28,9%), 101 alsó második kisőrlők (27,8%), 55 felső második kisőrlők (15,2%), 30 alsó harmadik őrlő (8,3%) és 19 alsó centrális metsző (5,2%) (1.ábra). 111 (58%) csirahiányos eset volt aszimmetrikus és 81 (42%) szimmetrikus. A hiányzó fogak száma magasabb volt a hátsó szegmensben (kisőrlők és őrlők 224, 62%), mint az elsőben (metszők és szemfogak 139, 38%), kissé több a jobb oldalon, mint a balon (189, 52% és 174, 48% a balon), magasabb a maxillában (189, 52%), mint a mandibulában (174, 48%). A különbségek nem adódtak szignifikánsnak T-tesztel. Az oligodontia előfordulása 8% volt a csirahiányosok között, de a számuk alacsony volt statisztika készítéséhez.

Egy vagy több fog fejlődési hiánya nem szokatlan jelenség. Azonban a hiányzó fogak előfordulása nagy variabilitást mutat a populációk között többféle faktornak köszönhetően, mint a genomikai és környezeti elemek. Egy recens cikk a kaukázusi populációkról 3 és 11 % közé teszi az előfordulási arányokat. Világszerte a legtöbbet hiányzó fogak az alsó második kisőrlők, ezt követi a felső második metszők hiánya. Ez a sorrend fordított a magyar populációban, amint erről régebbi cikkek tanúskodnak, és a jelen tanulmány is megerősíti: az előfordulási gyakoriság felső második metsző>alsó második kisőrlő>felső második kisőrlő>alsó harmadik őrlő>alsó centrális metsző. Ezek az adatok egybeesnek a terminális redukciós elmélettel, mely szerint a hátsó tagok az egyes fogcsoportokban gyakrabban hiányoznak, mint az előző tagok.

Ezért a második kisőrlők, a második metszők és a harmadik őrlők azok, amelyek a leggyakrabban hiányoznak. Ezek az adatok alátámasztják azt az általános szabályt, hogyha

kevés fog hiányzik, a hiányzó csíra a leghátsóbb lesz mindegyik csoportban. Más szempontból nézve az adatok egyeznek a Butler-féle morfológiai mező elmélettel, miszerint az előrébb álló fog stabilabb minden morfológiai csoportban. Minden fejlődési mezőben egy fogcsoportban van egy genetikailag stabil „kulcsfog”, míg a mező végén a fogak kisebb stabilitást mutatnak. Érdekes megjegyezni, hogy a kínai populáció kívülálló a többihez képest a magasabb számú mandibuláris metsző hiányával.

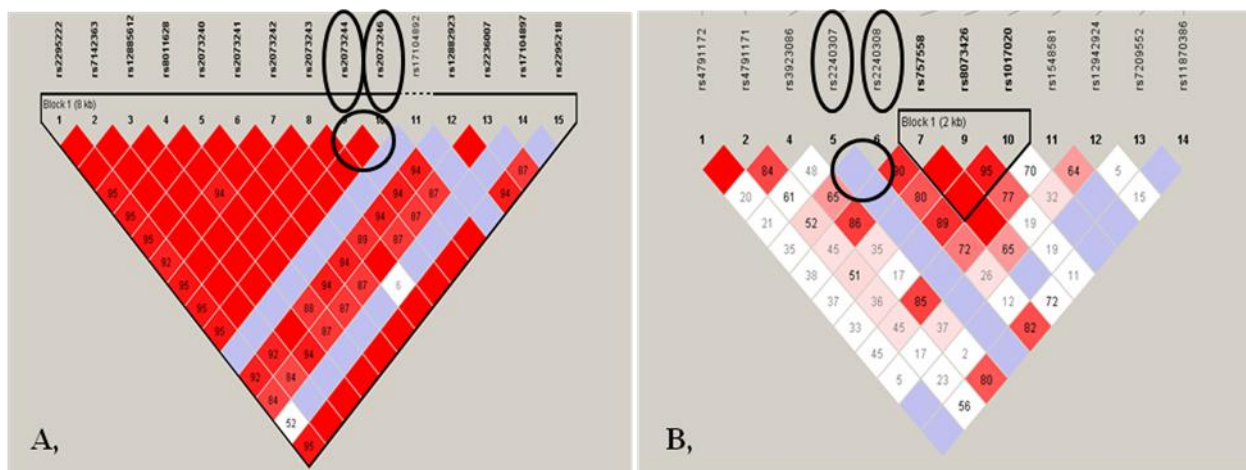
Több korábbi cikk talált magasabb szimmetrikus foghiányt mint asszimmetrikusat, de a magyar populációban mi több asszimmetriát találtunk, magasabb jobb maxilla laterális metsző hiánnyal és több hátsó hiányzó foggal. Továbbá a mi eredményeink egyeznek azokkal a cikkekkel, ahol hasonló jobb és baloldali csírahiány előfordulást írnak le, ellentétben azokkal akik szignifikáns különbséget találtak.



4. A foghiányt potenciálisan befolyásoló egyszerű nukleotid polimorfizmusok előfordulása a magyar populációban

A következő 8 SNP-t vizsgáltuk SNP genotipizáló analízissel: *PAX9* -912 C/T, *PAX9* -1031 A/G, *MSX1*-8755 A/G, *FGFR1*-26190464 T/C, *IRF6*-1149 T/C, *AXIN2*-8150 A/G, *AXIN2*-8434 A/G, és *AXIN2*-30224 C/T. Minden SNP esetén a kontroll csoport Hardy-Weinberg egyensúlyban volt. A hypodontia esetekben a *PAX9*-912, *AXIN2*-8150, és *AXIN2*-8434; oligodontia esetekben *FGFR1*, *AXIN2*-8434, *AXIN2*-30224 nem volt HW egyensúlyban.

A kapcsoltsági egyenlőtlenség (LD) analízis megmutatta, hogy a *PAX9* SNP-k kapcsoltságtartók voltak (2A ábra), míg az *AXIN2* 8150 és 8434 SNP-k nem voltak kapcsoltságtartók (2B ábra). Az *AXIN2* 30224 SNP-t nem tartalmazta a program.



Az allélfrekvenciák Chi² próbával nem adtak szignifikánsan különböző eredményt kontrollok és hipodonciások, illetve kontrollok és oligodonciások között egy SNP-re sem. A genotípus frekvenciák FGFR1, IRF6 és AXIN2 SNPk esetén nem különböztek a vizsgált csoportokban. Másfelől a genotípus frekvenciák szignifikánsan különbözőek voltak domináns és recesszív modell szerint hipodonciában a PAX9-912, $p=0,0128$ (OR=1,672); PAX9-1031, $p=0,0333$ (OR=1,546) és MSX1 $p=0,0143$ (OR=2,553) SNP-kenél a kontrollokhöz képest. Az oligodoncia esetek száma túl kevés volt statisztikai vizsgálathoz. Nem volt szignifikáns különbség férfiak és nők között allél és genotípus frekvencia különbségekben. A Bonferroni korrekcióval számolva 8 SNP esetén (ami a szignifikancia szintet $p<0,05$ -ről $p<0,00625$ -re csökkenti), a fent leírt tendenciák csak marginálisként értékelhetők.

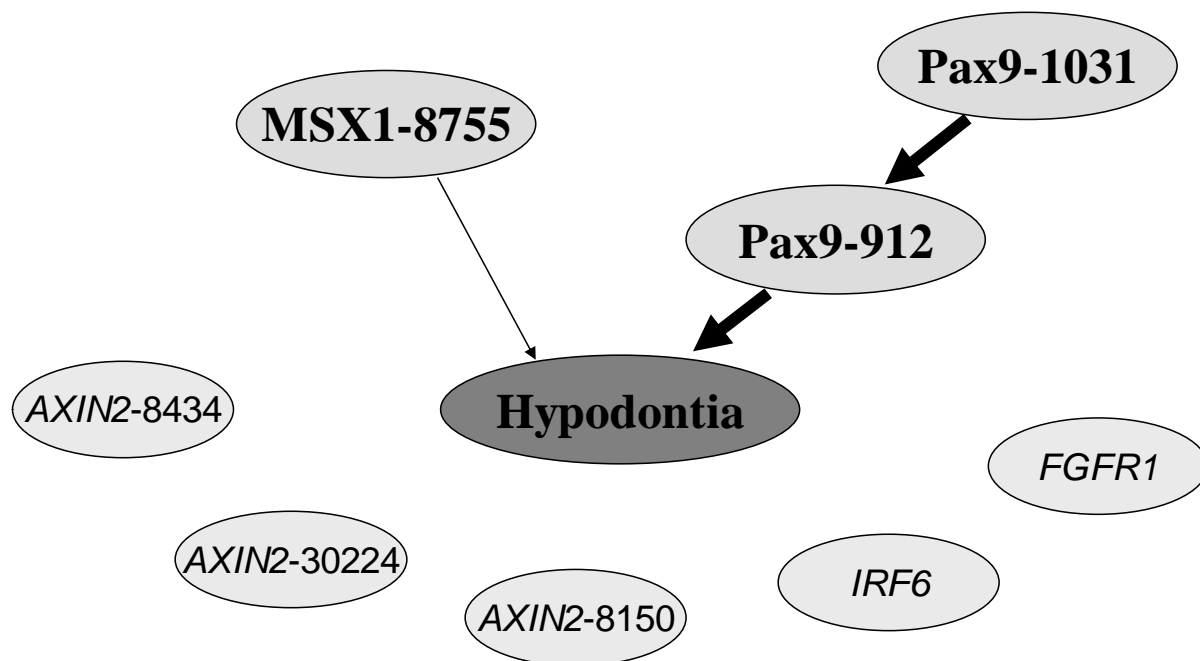
5. Bayes statisztika – a komplexitás megragadása

A hagyományos statisztikák túl szigorú többszörös hipotézis tesztelése miatt, tekintettel a többváltozós kontextusra, egy további statisztikai elemzést végeztünk Bayes statisztikai módszerekkel, hogy a vizsgált SNP-k közötti kölcsönhatásokat megvizsgáljuk. A BN-BMLA elemzés szerint a PAX9 gén 2 SNP-je releváns asszociációt mutatott a hipodonciával (PAX9-912 C/T: rs2073246, $Pr=0,994977$ és PAX9-1031 A/G: rs2073244, $Pr=0,995578$). Ez a valószínűségi érték (Pr) adja a Markov takaróhalmazba való tartozás valószínűségét, ami az adott változó páros modell alapú asszociációs mérése a célváltozóhoz képest (itt a hipodontia). Minél magasabb ez a valószínűségi érték (1-hez közelebbi), annál relevánsabb a változó a célváltozó szempontjából. Ezért mindkét SNP magasan relevánsnak tekinthető. Hasonlóan korábbi tanulmányokhoz, a beteg neme releváns faktor a hipodonciában, ahogy a hozzátartozó esélyek (OR) különböznek férfiak és nők esetén (1,23 és 0,57). Tehát a nemet beválasztottuk kovariánsnak minden modellben.

Továbbá a BN-BMLA elemzés megmutatta, hogy a PAX9 SNP-k statisztikai kapcsolatot mutatnak, aminek a csírahányra együttes hatása van. Ezt logisztikus regresszióval is validáltuk. A BN-BMLA elemzést összevont genotípusokra is elvégeztük (heterozigóta+homozigóta1 és heterozigóta+homozigóta2). Eredményként a PAX9 SNP-k mellé még az MSX1 SNP is asszociációt mutatott a hipodonciával ($Pr=0,81546$) (3. ábra).

A logisztikus regresszió az erős szignifikanciát megerősítette a PAX9-912 és PAX91031 interakcióra, ($\exp(B)=0,002$, C.I.95% [0,00009-0,034], p érték $<0,00002$, és a mérsékeltebb szignifikanciát is MSX1 esetére ($\exp(B)=0,354$, C.I.95%:[0,153-0,817], p érték $<0,01498$).

A Haploview analízis szintén kapcsolatot mutatott a PAX9-1031 és PAX9-912 SNP-k esetén. Az AC, AT, GC haplotípusok gyakoribbá teszik a hipodonciát, a legmagasabb szignifikancia az AT haplotípusra adódott. Az MSX1-PAX9 GT haplotípus marginális szignifikanciájú volt.



6. A genomikai komplexitás értelmezése

A munka fő célja az egyszerű nukleotid polimorfizmusok, mint genetikai/genomikai rizikótényezők azonosítása volt egy veleszületett fogászati rendellenességben, a fogcsírahiányban a magyar populációban. Megvizsgáltunk nyolc esélyes polimorf pozíciót az AXIN2, FGFR1, IRF6, MSX1 és PAX9 géneknél. Ez a genetikai polimorfizmus panel azért lett kiválasztva, mert korábban asszociáltak találták a hipodontiával, vagy a fogfejlődésben fontos molekulákat kódolnak. Mindegyik esetben megtaláltuk a vad és ritka allélt, ahogy azt korábban leírták.

Azt találtuk, hogy a PAX9 SNP-k egyenként csak akkor voltak szignifikánsak hagyományos statisztikával összehasonlítva, ha nem volt Bonferroni korrekció. De ezek együttesen már fontos faktornak bizonyultak hipodontiában, ahogy az erős relevancia kimutatásra használt BN-BMLA elemzés megmutatta. A mi populációnkban a vad TT genotípus PAX9-912 esetén és a vad GG genotípus PAX9-1031 esetén növelte a csírahiányok előfordulását. A PAX9-912 SNP hatása direktebb volt, míg az 1031-es a 912-esen keresztül hatott, az MSX1 gyengébb együttthatónak bizonyult.

A haplotípus szintű elemzés megmutatta, hogy a két PAX9-es SNP kapcsolt és szintén bebizonyította, hogy a PAX9 SNP haplotípusoknak erős relevanciájuk van a hypodontia előfordulásra, míg az egyedi SNP-knek korlátozott.

Az elvégzett Bayes analízis megmutatta, hogy a PAX9 -912 és 1031 triádot ad a beteg állapotával, a PAX9-1031 SNP-nek markáns együttes hatása van a 912-essel együtt, amíg az egyedüli hatása alacsony. Ezt az együttthatást megerősítette a hagyományos statisztika. Tovább az elemzés kimutatta, hogy az MSX1-nek egy hasonlóan erős szinergikus hatása van a PAX9 SNP-kkel (3.ábra). Az IRF6, FGFR1, Axin2 SNP-knek sem egyedül, sem más SNP-kkel együtt nem volt hatása, hozzáátéve, hogy a mintaszám power-je ezen SNP-kre relatív alacsony volt (<0,2).

Az MSX1 és PAX9 kulcs transzkripciós faktorok a korai fogfejlődésben, döntő szerepük van az odontogén mesenchyma fejlődésében. A molekuláris kölcsönhatásuk transzkripciós szinten érvényesül. Bayes-i elemzésünk megerősítette az együttes erős relevanciát PAX9 és MSX1-re (Pr=0,8150). Amint a 3.ábra mutatja, a PAX9-es SNP-k kapcsoltak és erősítették egymást. Mostowska és társai hasonló hatást találtak AXIN2 SNPk esetén, melyek szintén kapcsoltak voltak. Most megerősíthetjük ezt a típusú kölcsönhatást a

kapcsolt PAX9 SNP-k között Bayes-i módszerekkel. Feltételezhetjük, hogy az optimális proteinszerkezet vagy a transzkripciós faktor kötőhely több lépésben torzul, különböző mértékű funkcióvesztéssel, több vagy kevesebb SNP-t kicserélve.

Eredményeink egyeznek Peres-szel, aki ugyanezen PAX9 SNP-knél a genotípus frekvencia különbségeket szignifikánsnak találta kontrollok és hipodonciások között, de komplex hatásokat nem vizsgált. Az ő tanulmányukban a 912-es SNP magasabb szignifikanciát adott mint a mi esetünkben, de az ő csírahiányos csoportja több harmadik őrlő hiányt tartalmazott. A harmadik őrlők hiánya a 8981-es SNP-hez kötött, tehát a 912-es SNP valószínűleg nem egy elsődleges okozó faktor harmadik őrlő agenezisnél, de bizonyos kockázatot jelenhet. Ellenkezőleg egy kínai populációs tanulmány nem talált szignifikáns hatást az 1031-esnél fog csírahiányra, noha másik három SNP-vel együtt haplotípust alkotva csökkentette a csírahiány kockázatát. Más PAX9 SNP-s tanulmányok különféle eredményeket adtak. Emberekben a súlyos fenotípusos elváltozás a kódoló régió mutációjából vagy deléciójából származik.

Tanulmányunk megmutatta, hogy a magyar populációban a ritka GG genotípus MSX1 SNP-nél szignifikánsan növelte a csírahiány előfordulást. Az MSX1-et normálisan a dentális mesenchyma fejezi ki, de nincs jelen a dentális epitheliumban a csíra, sapka, harang stádiumokban. Valószínűleg az MSX1 kódoló régiós mutációi hiányzó kisőrlőkhöz vezetnek elsősorban. Az egyetlen populáció szintű kutatás a Rio de Janeiro-i brazil. Azok az adatok azt sugallják, hogy összefüggés van az MSX1, PAX9 és TGF α (amit az MSX1 és PAX9 szabályoz) között, de további tanulmányok szükségesek a pontos kölcsönhatás megértéséhez ezen faktorok között.

Nem találtunk szignifikáns különbséget FGFR1, IRF6 és AXIN2 esetén. Ezeket az SNP-ket előzőleg mind kapcsoltak találták a fogcsíra hiánnyal. Az IRF6 lókuszt változása hozzájárulhat ritka szindrómákhoz, nem szindrómás hasadékokat és csírahiányt okozhat, elsősorban a metszőknél és a kisőrlőknél. Az FGFR1 szignál út vonal az arcfejlődést szabályozza. Ez egy mutációjánál derült ki, ami autoszomális domináns Kallmann-szindrómát okozott. Az IRF6 mutációk ajak és száypad hasadékokkal és kisőrlő agenezissel kapcsolatosak. Vieira és munkatársai szignifikáns összefüggést találtak az IRF6 génpolimorfizmus és a fogcsírahiány között egy brazil kevert populációban, akik főleg kaukázusi portugál ősökkel rendelkeztek. De nem tudták megismételni ezeket az eredményeket egy ohio-i, USA populációban, akik szintén kaukázusiak, de főleg észak európai eredettel. Hasonlóan az ohioihoz mi sem találtunk összefüggést FGFR1 és IRF6 esetén a magyaroknál, ezzel genetikai heterogenitást feltételezve a különböző kaukázusi populációk között. A mi FGFR ritka allél frekvenciánk hasonló volt az ohio-iakhoz, ahol nem volt hypodontia asszociáció megfigyelhető.

Az axin2 egy állványfehérje, ami a β -catenint foszforilálja, a Wnt-út vonal tagja az embriófejlődésben. Először egy finn oligodonciás családnál találták meg. Egy későbbi közlemény javasolta, hogy az Axin2 polimorf változatok asszociáltak lehetnek a hipo és oligodonciával is. Három új AXIN2 génvariáns lett azonosítva. A c.956+16G és a c.2062T allélok emelt fog agenezis kockázattal jártak. Ezenfelül a c.2062C>T tranzíció megváltoztathatja az exon splice fokozó specifikus kötőhelyeket az SC35 és SF2/ASF fehérje splicing szabályozóknál. A magyar populációban nem találtunk szignifikáns összefüggést a 3 pozíció és a hiányzó fogak között. Ki kell hangsúlyozni, hogy a magyar populáció inkább homozigóta ezekre az SNP-kre. A 30224 ritka allélja sokkal kisebb frekvenciájú a magyar populációban, mint a lengyelben (3 és 13%), még ha a többi frekvenciája hasonló is.

Összefoglalva a PAX9 és MSX1 igen, az IRF6, FGFR1 és AXIN2 SNP nem játszik fontos szerepet a magyar populációban a foghiányok kialakulásában. Adataink alátámasztják a populációs szintű genomikai tanulmányok jelentőségét és bebizonyítják a kockázati

faktor felmérés szükségességét a különböző populációkban. Szintén megerősíti, hogy a Bayes-i elemzés normatív megoldást nyújt a többszörös hipotézis tesztelés korrekciójához, és a Bayes-i hálózat alapú módszerek, főleg a Bayes-i statisztikai keret megengedi az erős relevancia elemzését még többszörös célváltozók és kis mintaszám esetében is.

7. Kiegészítő vizsgálatok eredményei

Szájpad hasadék és foghiány kapcsolata. A fent leírt vizsgálatokon túl egy újabb munkába fogtunk, ami azonban időben már túlnyúlik a jelen pályázaton. Előzetes eredményeink a következők: A szájpad hasadékos esetek genomikai vizsgálata során négy vizsgálati csoportot alkottunk. A hasadékos (50), hasadék+aplasiás (79), aplasiás (43) és ehhez tartozó kontroll (46) mintákat is SNP genotipizáló elemzés alá vetettük a csírahiányosokon a már rendelkezésre álló 8 SNP próbával, PAX9, MSX1, IRF6, FGFR és AXIN2 génekre. 218-as esetszámnál szignifikánsan különbözött a hasadékos és hasadékos+aplasiás betegek MSX1 allélgyakorisága $OR=1,918$, $p=0,0176$, és a **hasadékos és csak aplasiás betegek allélgyakorisága** is közelített a szignifikáns különbséghez, különbözött a genotípus gyakoriság is ugyanezen csoportok között, $OR=0,458$, $p=0,0345$ és $OR=6,674$, $p=0,0488$ sorrendben. FGFR esetén allél és genotípus gyakoriságnál is közelítően szignifikáns különbséget kapunk kontroll és hasadékosok között. A további vizsgált SNP-k esetén a jelenlegi elemszámnál nem találtunk eltérést. Megbízható eredmények eléréséhez további mintagyűjtést és analízist végzünk a jövőben.

Szemfogak hiánya a magyar populációban. Populációs szintű tanulmányunk a maradó szemfog teljes hiányát vizsgálta. Ez az egyik legkritikább fogazati anomália. Előfordulási gyakorisága magasabb az Ázsiai populációnál. Az ide vonatkozó irodalmi adatok hiányossága miatt, célul tűztük ki a maradó szemfog aplasia hazai populáción való vizsgálatát. 4417, 6-8 év közötti egészséges, gyermekfogászati és/vagy fogszabályozási kezelés céljából klinikánkon jelentkező páciens felmérése során 0,29%-os prevalencia volt kimutatható. Ehhez kapcsolódóan részleteiben elemeztük a szemfog aplasia és a tejfog perzisztencia összefüggéseit. Jelenleg ebben a tekintetben további mintagyűjtés folyik.

Korona/gyökérarány és Talon-csücsök populációs szintű vizsgálata. Kutatásokat folytatunk a fog-korona/gyökér arány méretének összehasonlítására magyar német és japán populációkban. Kimutattuk, hogy a férfiak szignifikánsan magasabb korona/gyökér aránnyal rendelkeznek, mint a nők. Ezen tényezőben jelentős különbségek mutatkoznak az egyes nemzeteket reprezentáló populációk között. A különbözőség centrális metszők és a szemfogak esetében a legkifejezettebb. A jelenség háttere **genetikai/genomikai háttere még nem ismert**, de ezek az eredmények az ilyen jellegű vizsgálatok szükségességére mutatnak. Talon-csücsökkel kapcsolatos kutatásaink kapcsán 2-6 éves populáción megvizsgáltuk a tejfogakon a Talon csücsök megjelenését. Megállapítottuk, hogy a Talon-csücsök megjelenése ritka és megjelenése kezelhető záródási problémákhoz vezet. Vizsgálataink ebben a tekintetben is felvetik a jelenség genetikai/genomikai hátterének vizsgálati lehetőségét.

Szöveti és sejt kultúra vizsgálatok – összejt a fogban és fogkörnyéki szövetekben a genomikai variabilitás potenciális szerepe. Vizsgálataink stratégiai célja a fogfejlődésben, s így potenciálisan a fogmegújításban szerepet játszó tényezők felderítése. Ennek tükrében fenti vizsgálataink mellett, az esetek egy kis részében, a klinikai indikációnak megfelelően a bölcsességfogakat távolítottunk el. Ezen eltávolított fogak fogbeléből és a parodontális ligamentumból sikeresen készítettünk sejt kultúrát, melyekben összejt tulajdonságokkal

rendelkező sejtpopulációt is sikerült kimutattunk. Az így nyert, alaphelyzetben fibroblaszt morfológiát mutató kultúrák sikeresen differenciálódnak oszteogén irányba, sőt más sejttípusok felé is. Állatkísérletes eredményeink egyértelműen igazolják, hogy az így sikeresen differenciáltatott humán fogeredetű sejtek oszteogén irányba differenciáltatva befolyásolják az összeintegrációt, neuronális irányban pedig képesek sértett agyterületre beépülni. Ennek kapcsán egy új, háromlépéses neurodifferenciációs protokollt dolgoztunk ki, amelynek eredményeként morfológiai, mind funkcionális bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy a sejtek jelentős része idegi irányba differenciálódott. Ezeket a differenciált sejteket kortikális sértés mellett patkányok agyába juttattuk, s sikerült kimutatnunk, hogy **a beültetett sejtek még négy héttel a beültetés után is kimutathatók mind a progenitor zónákban, mind a sértett cortex területén, s mind hisztokémiai, mind elektrofiziológiai paraméterek alapján funkcionális idegsejtként viselkednek.** Egyértelmű ugyanakkor, hogy az egyes emberi fogeredetű kultúrák, **proliferatív, differenciálódási és regenerációs képessége nagyfokú variabilitást mutat.** Az így felderített különbségek **genomikai hátterét** elkövetkező vizsgálatainkban igyekszünk azonosítani.

Budapest, 2012. december 22.

Dr. Tarján Ildikó
egyetemi tanár
témavezető

Melléklet: a témában írt, az *Acta Odontologica* folyóiratban jelenleg bírálat alatt álló dolgozat



Complex analysis of multiple single nucleotide polymorphisms as putative risk factors of tooth agenesis in the Hungarian population

Journal:	<i>Acta Odontologica Scandinavica</i>
Manuscript ID:	SODE-2012-0467
Manuscript Categories:	Original Article
Date Submitted by the Author:	20-Dec-2012
Complete List of Authors:	<p>Jobbágy-Óvári, Gabriella; Semmelweis University, Department of Oral Biology Páska, Csilla; Semmelweis University, Department of Oral Biology Stiedl, Péter; Semmelweis University, Department of Oral Biology Trimmel, Bálint; Semmelweis University, Department of Oral Biology Hontvári, Dorina; Semmelweis University, Department of Oral Biology Soós, Borbála; Semmelweis University, Department of Prostodontics Hermann, Péter; Semmelweis University, Department of Prostodontics Tóth, Zsuzsanna; Semmelweis University, Department of Conservative Dentistry Kerekes- Máthé, Bernadette; University of Medicine and Pharmacy of Tirgu-Mures, Department of Tooth Morphology and Dental Materials Nagy, Dávid; University of Pecs, Department of Oral and Maxillofacial Surgery; University of Pecs, Department of Dentistry and Maxillofacial Surgery Szántó, Ildikó; University of Pecs, Department of Dentistry and Maxillofacial Surgery Nagy, Ákos; University of Pecs, Department of Dentistry and Maxillofacial Surgery Martonosi, Mihály; University of Szeged, Department of Pedodontics and Orthodontics Nagy, Katalin; University of Szeged, Department of Oral Surgery Hadadi, Éva; Semmelweis University, Department of Genetics, Cell and Immunobiology Szalai, Csaba; Semmelweis University, Department of Genetics, Cell and Immunobiology Hullám, Gábor; University of Technological and Economy, Department of Measurement and Information Systems Temesi, Gergely; University of Technological and Economy, Department of Measurement and Information Systems</p>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	Antal, Péter; University of Technologic and Economy, Department of Measurement and Information Systems Varga, Gabor; Semmelweis University, Department of Oral Biology Tarján, Ildokó; Semmelweis University, Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics
Keywords:	tooth agenesis, single nucleotide polymorphism, hypodontia, Bayesian analysis , risk factor

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review Only

1

2
3 **Complex analysis of multiple single nucleotide polymorphisms as putative risk factors of**
4
5 **tooth agenesis in the Hungarian population**
6

7 G. Jobbágy-Óvári*¹, C. Páska*¹, P. Stiedl¹, B. Trimmel¹, D. Hontvári¹, B. Soós², P.

8
9 Hermann², Z. Tóth³, B. Kerekes-Máthé⁴, D. Nagy⁵, I. Szántó⁵, Á. Nagy⁵, M. Martonosi⁶, K.

10
11 Nagy⁶, É. Hadadi⁷, C. Szalai⁷, G. Hullám⁸, G. Temesi⁸, P. Antal⁸, G. Varga¹, I. Tarján⁹
12
13

14
15
16 **Authors' affiliations:**

17
18 *1 Department of Oral Biology, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

19
20 *2 Department of Prosthodontics, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

21
22 *3 Department of Conservative Dentistry, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

23
24 *4 University of Medicine and Pharmacy of Tirgu-Mures, Romania*

25
26 *5 Department of Dentistry, Oral and Maxillofacial Surgery, University of Pécs, Hungary*

27
28 *6 Department of Pedodontics and Orthodontics, University of Szeged, Hungary*

29
30 *7 Department of Genetics, Cell and Immunobiology, Semmelweis University, Budapest,*
31
32 *Hungary*

33
34
35 *8 Department of Measurement and Information Systems, University of Technological and*
36
37 *Economy, Budapest, Hungary*

38
39
40 *9 Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, Semmelweis University, Budapest,*
41
42 *Hungary*

43
44
45 Corresponding author: Dr. Gábor Varga, Semmelweis University, Department of Oral
46
47 Biology,

48
49 1089 Budapest, Nagyváradi tér 4.

50
51 e-mail: varga.gabor@dent.semmelweis-univ.hu

52
53
54 **Running head:** Complex SNP analysis in hypodontia

2

*These authors contributed equally to the manuscript, therefore, they both should be considered as first authors of this paper

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only

3

Abstract

Objectives: We studied the role of multiple single nucleotide polymorphisms in tooth agenesis in the Hungarian population using a complex approach. **Methods:** Eight SNPs, *PAX9* -912 C/T, *PAX9* -1031 A/G, *MSX1* 3755 A/G, *FGFR1* T/C rs881301, *IRF6* T/C rs764093, *AXIN2*-8150 A/G, *AXIN2*-8434 A/G, and *AXIN2*-30224 C/T were studied in 192 hypodontia and 17 oligodontia cases and in 260 healthy volunteers. Case-control analysis was performed to test both allelic and genotypic associations as well as associations at the level of haplotypes. Multivariate exploratory Bayesian network based multilevel analysis of relevance (BN-BMLA) as well as logistic regression analysis were performed. **Results:** Conventional statistics showed that *PAX9* SNP -912 C/T and the *MSX1* SNP changed the incidence of hypodontia, although after Bonferroni correction for multiple hypothesis testing, the effects were only borderline tendencies. Using a statistical analysis better suited for handling multiple hypotheses, the BN-BMLA, *PAX9* SNPs clearly showed a synergistic effect. This was confirmed by other multivariate analyses and it remained significant after corrections for multiple hypothesis testing ($p < 0.0025$). The *PAX9*-1031-A-*PAX9*-912-T haplotype was the most relevant combination causing hypodontia. Interaction was weaker between *PAX9* and *MSX1*, while other SNPs had no joint effect on hypodontia. **Conclusion:** Our complex analysis shows the important role of *PAX9* and *MSX1* SNPs and of their interactions in tooth agenesis, while *IRF6*, *FGFR1* and *AXIN2* SNPs had no detectable role in the Hungarian population. Our results also reveal that risk factors in hypodontia need to be identified in various populations since there is considerable variability among them.

Keywords: gene polymorphism, SNP, hypodontia, oligodontia, *PAX9*, *MSX1*, *FGFR1*, *IRF6*, *AXIN2*, risk factors

4

Introduction

Among congenital dental disorders *hypodontia* is the most frequent one: approximately 20% of the human population is affected worldwide [1]. The etiology of tooth agenesis is not fully understood, but is presumably related to *both genetic and environmental factors* [2, 3]. The incidence of hypodontia is highly variable. Excluding cases involving wisdom teeth, 2 to 54 percent of people are affected, depending on the population studied [4-6].

Congenital lack of six or more teeth, called oligodontia, is observed in less than 1 percent of the population and found to be highly heritable [7-12].

Gene mutation studies in experimental animals have revealed the importance of a high number of genetic factors in tooth development [13]. The exact weight of the individual components is not known today, but the complexity of tooth formation is underlined by the fact that the differential expression of at least 300 genes has been identified during the study of murine tooth development [14]. However, tooth development in mice is quite different from that in humans, therefore, extrapolation of animal data requires great precaution.

In humans several mutations of the transcription factors *PAX9* and *MSX1* may lead to tooth agenesis. Mutation in the coding region of *PAX9* [13, 15-19] or the deletion of it [18] primarily induce conditions with missing molars. Similar data are also available for *MSX1* [20, 21].

Mutations of fibroblast growth factor receptor 1 (*FGFR1*) are also associated with tooth agenesis, as well as with cleft lip and palate [22]. Likewise, interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene deletions and point mutations also were shown to be risk factors for cleft lip and palate and to be associated with premolar agenesis [3, 23]. It has recently been suggested that mutations of axis inhibition protein 2 (*AXIN2*) may also contribute to these complex anomalies [24, 25]. However, nucleotide changes in the genes *PAX9*, *MSX1*, *FGFR1*, *IRF6*

5

1
2
3 and *AXIN2* present not only as relatively rare mutations resulting in strong phenotypic
4
5 changes as described above, but also as single nucleotide polymorphisms which may
6
7 represent a low to moderate risk for tooth agenesis [3, 26-29]. Nevertheless, SNP studies on
8
9 hypodontia yielded variable results depending on the ethnic groups investigated [3, 5, 19, 25-
10
11 27, 30, 31] and on environmental factors. Therefore it is important to determine which
12
13 polymorphisms act as actual risk factors in a given ethnic group such as, in our case, the
14
15 Hungarian population.
16

17
18 In spite of the well established multigenic origin of tooth agenesis and the relatively large
19
20 number of putative genes and polymorphisms involved, complex data analysis is missing up
21
22 to now. For such a complex approach a Bayesian multivariate exploratory data analysis of
23
24 associations and strong relevance represent a better choice than conventional pairwise
25
26 association analysis with overstringent corrections for multiple hypothesis testing, where
27
28 factors are treated independently. In a complex dependency model, approximation for a joint
29
30 relevance based on independently treated posteriors of targets will yield inaccurate and overly
31
32 cautious results [32-34]. Probabilistic graphical models in the Bayesian statistical framework
33
34 can overcome this problem, especially in the case of complex phenotypes. Bayesian networks
35
36 offer a detailed representation of relevance types, dealing with causal, acausal and multitarget
37
38 aspects. Thus, they offer a solution for the multiple hypothesis testing problem [32, 35, 36].
39
40
41
42

43 In the present work we also used complex statistical analysis, including the Bayesian
44
45 Network based Multilevel Analysis of relevance (BN-BMLA) [34] to gene polymorphisms
46
47 formerly identified as associated to tooth agenesis. Altogether eight polymorphisms of the
48
49 *PAX9*, *MSX1*, *FGFR1*, *IRF6*, *AXIN2* genes were examined in control and tooth agenesis
50
51 groups and subjected to both conventional statistics and Bayesian Multilevel Analysis (BN-
52
53 BMLA). We expected to identify multiple SNPs as risk factors in the Hungarian population
54
55 and also to get an insight into their hierarchical arrangement.
56
57
58
59
60

6

Materials and methods

Tissue samples

Oral mucosal scrapings were collected from 469 patients at the Departments of Pedodontics and Orthodontics at Semmelweis University, University of Pécs and University of Szeged. Samples were frozen at -20 °C until use for DNA extraction. The study was performed in conformity with the national law (23/2002 V.9 EüM) on human experimentation and with the permission of the National Ethical Committee (#84-258/2008-1018EKU). Before sample collection, fully informed written consent was received from each individual participating in the study. A detailed medical and dental examination included general health, oral hygiene and family history, and also a panoramic X-ray examination. The primary criteria for hypodontia (Hyp) were at least one missing adult tooth germ, lack of craniofacial malformation and of any systemic disease. Criteria were the same for Oligodontia (Oli), but at least 6 missing teeth. The control group (Con) involved healthy volunteers with regular deciduous and adult denture without any craniofacial abnormalities. There were 260 persons in the control, 192 persons in the hypodontia and 17 persons in the oligodontia groups. The clinical and demographic data of participants are displayed in **Table I** and the distribution of missing teeth in the sample population is presented in **Figure 1**.

DNA isolation

DNA was isolated from oral mucosal scrapings using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA was stored at -20 °C. Integrity of the DNA was checked by electrophoresis on 1 % agarose gel and concentrations were measured using a Qubit fluorometer (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, California).

SNP Genotyping

7

Allelic discrimination assays were performed in 2 replicates on a StepOne Real Time PCR using Taqman SNP Genotyping assays (Applied Biosystems- Life Technologies, Carlsbad, California). SNP data are described in **Table II**. Genotyping reactions were performed in a final volume of 12.5 μ l, with the reaction containing 3 ng genomic DNA, 6.25 μ l 2x Taqman Universal PCR Master Mix and 0.625 μ l 20x Taqman SNP assay. Results were analyzed using the StepOne software (Applied Biosystems- Life Technologies, Carlsbad, California).

Statistical analysis

Genotype distribution and the allelic frequencies (Con, Hyp and Oli) were calculated. Deviation of the observed genotypes from the Hardy–Weinberg equilibrium were tested, while P values <0.05 were accepted as significant. Allelic and genotypic univariate association analyses were performed with the statistical software package of the Helmholtz Institute of Human Genetics, München, Germany (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Pairwise linkage disequilibrium and haplotype analysis were determined using the Haploview software (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/hap>). We applied a Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance (BN-BMLA), which enables the analysis of associations at different abstraction levels: model-based pairwise relevance (direct association), relevance of variable sets, and statistical interactions of relevant variables [34]. Results of the Bayesian multivariate statistical analysis were also confirmed with logistic regression modeling performed with SPSS using the forward variable selection method, and PIN=0.05 as the probability threshold for variable entry, and POUT=0.1 as the threshold of removing a variable from the model.

8

Results

In our study the number of missing teeth in the hypodontia group (192 cases) was 363. There were 73 (38%) persons with one missing tooth, 83 (43%) with two teeth, 18 (9%) with three, 15 (8%) with four and 3 (2%) with five. Of single missing teeth, the left lower second premolar tooth was the most frequent. Of double missing teeth, missing upper lateral incisors were the most frequent combination. The frequencies of missing tooth groups were the following, in decreasing order: 105 upper lateral incisors (28.9%), 101 lower second premolars (27.8%), 55 upper second premolars (15.2%), 30 lower third molars (8.3%) and 19 lower central incisors (5.2%) (**Figure 1**). 111 (58%) of agenesis cases were asymmetric and 81 (42%) were symmetric. The prevalence of missing teeth was higher in the posterior segment (premolars and molars 224, 62%) than in the anterior segment (incisors and canines 139, 38%), slightly higher on the right side (189, 52% vs. 174, 48% on the left), and higher in the maxilla (189, 52%) than in the mandible (174, 48%). However, differences were not significant by T-test. The prevalence of oligodontia was calculated to be 8% of the agenesis cases, however, their number (17) was too low for statistical analysis.

Single nucleotide polymorphisms

Control (Con), hypodontia (Hyp) and oligodontia (Oli) groups were examined for the following eight SNPs: *PAX9* -912 C/T, *PAX9* -1031 A/G, *MSX1*-8755 A/G, *FGFR1*-26190464 T/C, *IRF6*-1149 T/C, *AXIN2*-8150 A/G, *AXIN2*-8434 A/G, and *AXIN2*-30224 C/T by SNP Genotyping analysis. Control populations were in Hardy Weinberg (HW) equilibrium for all studied SNPs. Of the hypodontia cases *PAX9*-912, *AXIN2*-8150 and *AXIN2*-8434, and of the oligodontia cases *FGFR1*, *AXIN2*-8434 and *AXIN2*-30224 were not in HW equilibrium.

9

1
2
3 Linkage disequilibrium (LD) analysis showed that only the *PAX9* SNPs were in LD (**Figure 2**
4
5 **A**), whereas the *AXIN2* 8150 and 8434 SNPs were not in LD (**Figure 2 B**). The *AXIN2*
6
7 30224 SNP was not handled by the database.

9
10 Allelic frequencies compared by Chi-square test were not significantly different
11
12 between controls and Hyp or Oli cases for any SNPs. Genotype frequencies of *FGFR1*, *IRF6*
13
14 and *AXIN2* SNPs did not differ in the investigated groups. On the other hand, genotype
15
16 frequencies were significantly different under dominant and recessive models in hypodontia
17
18 for *PAX9*-912, $p=0.0128$, (OR=1.672); *PAX9*-1031, $p=0.0333$, (OR=1.546); and *MSX1*,
19
20 $p=0.0143$, (OR=2.553) SNPs compared to control (**Table III**). The number of Oli patients was
21
22 too small for any statistical consideration. There were no significant differences in allelic
23
24 frequencies or in genotypes between male and female controls or cases either. When
25
26 calculating the Bonferroni correction for the 8 SNPs (resulting in a decrease of acceptable
27
28 significance level from $p<0.05$ to $p<0.00625$) all the above described tendencies can be
29
30 interpreted as trends only.
31
32

33 34 35 36 Bayesian statistics

37
38 Because of the overly stringent handling of multiple hypothesis testing by
39
40 conventional tools, particularly in a multivariate context, an additional statistical analysis was
41
42 performed by Bayesian statistical methods, to identify interactions among the investigated
43
44 SNPs. According to BN-BMLA analysis, the two SNPs of *PAX9* gene (*PAX9* -912 C/T:
45
46 rs2073246, Pr= 0.994977 and *PAX9* -1031 A/G: rs2073244, Pr= 0.995578) showed relevant
47
48 association with hypodontia. This probability value (Pr) reflects the Markov blanket
49
50 membership probability, which is a pairwise model-based association measure of a given
51
52 variable with respect to the target variable (i.e. hypodontia in this case) (for theoretical details
53
54 see [32, 34]. The higher this probability value is (i.e. closer to 1) the more relevant the
55
56
57
58
59
60

10

1
2
3 variable is with respect to the target variable. Therefore, both of these SNPs are considered as
4
5 highly relevant. Similarly to previous studies, gender seemed to be a relevant factor with
6
7 respect to hypodontia, as the corresponding odds were remarkably different in case of males
8
9 and females (1.23 and 0.57, respectively). Consequently, gender was included as a covariate
10
11 in all models.
12

13
14 Furthermore, the BN-BMLA analysis also shows that *PAX9* SNPs form a statistical
15
16 interaction having a joint effect on tooth agenesis. This was validated with logistic regression.
17
18 The BN-BMLA analysis was also performed with merged genotypes
19
20 (heterozygote+homozygote1 and heterozygote+homozygote 2). As a result, in addition to
21
22 *PAX9* SNPs, the *MSXI* A/G SNP has also been found to show association with hypodontia
23
24 ($Pr=0.81546$) (**Figure 3**).
25
26

27
28 Logistic regression analysis (**Table IV**) confirmed the strong significance of the
29
30 interaction of *PAX9* -912 C/T and *PAX9* -1031 A/G ($\exp(B)=0.002$, C.I.95%: [0.00009-
31
32 0.034], $p\text{-value} < 0.00002$), and also the moderate significance of *MSXI* A/G ($\exp(B)=0.354$,
33
34 C.I.95%: [0.153-0.817], $p\text{-value} < 0.01498$).
35

36
37 Haploview analysis also showed interaction between *PAX9* -1031 and *PAX9* -912
38
39 SNPs. AC, AT, GC haplotype renders hypodontia more frequent, the significance value was
40
41 the highest for the AT haplotype. *MSXI* - *PAX9* GT haplotype frequency was only borderline
42
43 significant (**Table V**).
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

The developmental absence of one or more teeth is not an uncommon phenomenon. But the prevalence of developmental missing teeth in the permanent dentition shows great variations between populations due to multiple factors, such as genomic and environmental elements. A recent report concerning the Caucasian population recorded prevalence rates of hypodontia between 3 and 11% [37]. The most often missing teeth worldwide are the lower second premolars followed by the upper second incisors [38-45]. This order is reversed in the Hungarian population as reported previously [46] and also confirmed in the present study: the order of prevalence of agenesis is upper second incisor > lower second premolar > upper second premolar > lower third molar > lower central incisor. All of these data are in line with the terminal reduction theory [47], which suggests that the reduction of the distal element of a tooth group occurs more frequently than that of a mesially placed teeth. Therefore, the second premolars, the upper second incisors and the third molars are the most often absent [39, 46, 48]. These findings are also in accordance with the general rule: if only one or a few teeth are missing, the missing germ ordinarily will be the most distal tooth of any given type [49-51]. From another point of view, the data correlate with Butler's field theory which states that the most mesially situated tooth is the most stable in each morphological class. In each developmental field in a tooth group, there is a genetically stable 'key tooth', while at the end of the field, the teeth show less stability [52, 53]. It is interesting to note that the Chinese population is an outlier compared to others with their highest number of missing mandibular incisors [54].

A number of previous investigations found symmetrical hypodontia to be more frequent than asymmetrical [39, 41-43, 55]. But in the Hungarian population we found an asymmetrical prevalence, with right maxillary lateral incisor agenesis and more missing posterior teeth. Furthermore, our results are in line with most previous findings about similar

12

1
2
3 frequencies at the right and left sides and in different [5, 39-41, 43, 45, 56], but not with other
4
5 papers which report significant differences in this respect [57, 58].
6

7 The main purpose of our study was to identify single nucleotide polymorphisms as
8
9 genetic/genomic risk factors in tooth agenesis, a congenital dental disorder in the Hungarian
10
11 population. We investigated eight different potential polymorphic positions in the *AXIN2*,
12
13 *FGFR1*, *IRF6*, *MSX1* and *PAX9* genes. This particular panel of genetic polymorphisms was
14
15 selected because they had either been associated previously with hypodontia [3, 26] or these
16
17 genes have already been shown to code important molecules in the process of tooth agenesis
18
19 [14, 20]. Indeed, in all cases we could demonstrate the existence of wild type and rare alleles
20
21 as suggested before [15, 26].
22
23

24
25 We found that the differences in the genotype frequencies of *PAX9* -912 C/T (rs
26
27 2073246) and -1031 A/G SNPs (rs 2073244) were significant individually between controls
28
29 and agenesis cases only when compared by traditional statistics without Bonferroni
30
31 correction. But they are jointly important factors for hypodontia as indicated by the BN-
32
33 BMLA method used for the analysis of strong relevance. In our population, the major TT
34
35 genotype for *PAX9*-912 and the major GG genotype for *PAX9*-1031 increased the incidence
36
37 of tooth agenesis. The effect of the -912 SNP was more direct on hypodontia while the -1031
38
39 SNP acted through the -912 SNP, while *MSX1* seemed to be a weaker contributor.
40
41

42
43 The haplotype level analysis performed by Haploview indicated that the two *PAX9*
44
45 SNPs are linked (**Table V**) and also provided evidence that *PAX9* SNPs haplotypes have a
46
47 strong effect on hypodontia prevalence, whereas single SNPs have a limited one.
48

49
50 The performed Bayesian statistical analysis also showed that the *PAX9* -912 and -1031
51
52 formed a triade with patients' state, revealing that Pax9-1031 SNP had a marked joint effect
53
54 together with the -912 SNP, while its individual effect was only weak (**Figure 3**). This
55
56 interaction was confirmed by traditional statistics. In addition, the analysis showed that the
57
58
59
60

13

1
2
3 *MSX1* SNP is similarly strongly relevant with potential synergistic effect with *PAX9* SNPs
4
5 (**Figure 3**). *IRF6*, *FGFR1* and *AXIN2* SNPs were not associated to hypodontia, neither alone,
6
7 nor together with other SNPs, although the power of the sample size for these SNPs was
8
9 relatively low (<0.2).

10
11 *MSX1* and *PAX9* proteins are key transcription factors in the early dental development
12
13 having a crucial role in the formation of odontogenic mesenchyme [59]. Their molecular
14
15 interaction is at the level of the transcription [21, 60]. Our Bayesian multivariate analysis also
16
17 confirmed the joint strong relevance of *PAX9* and *MSX1* ($P=0.8150$). As **Figure 3** shows,
18
19 *PAX9* SNPs were in linkage and they intensified each others' effect. Mostowska et al. [24]
20
21 found a similar effect between *AXIN2* SNPs, which were also in linkage with each other. Now
22
23 we could confirm this type of interaction between linked *PAX9* SNPs by Bayesian methods.
24
25 We can hypothesize a multistep distortion of the optimal protein structure, or transcription
26
27 factor binding site with various grades of loss of function, substituting more or less SNPs.
28
29

30
31
32 Our results are in concordance with Peres [26], who found genotype frequencies of
33
34 both *PAX9* -912 and -1031 SNPs significantly different between controls and tooth agenesis
35
36 patients, but they did not investigate complex effects. In their study the -912 SNP variation
37
38 yielded more significant differences than in our case, but their tooth agenesis group included
39
40 mostly third molar hypodontia. The third molar hypodontia is thought to be linked to the 8981
41
42 SNP (rs4904210) [61], so the -912 SNP is probably not a primary causative factor for third
43
44 molar agenesis, but it may still represent a certain level of risk. On the contrary, an
45
46 investigation in Chinese population found no significant effect of -1031 rs2073244 on tooth
47
48 agenesis, although when grouped together with three other *PAX9* SNPs (rs 2073245,
49
50 2073247, 4904210), an AGGC haplotype was found to decrease the risk of tooth agenesis
51
52 [54]. Studies with other *PAX9* SNPs yielded variable results [61-64]. In humans severe
53
54
55
56
57
58
59
60

14

1
2
3 phenotype changes result from the mutation of the coding region of *PAX9* gene [13, 15-19] or
4
5 from the deletion of *PAX9* [18].
6

7
8 Our study shows that in the Hungarian population the minor GG genotype for *MSXI*-
9
10 3755 SNP significantly increased the incidence of tooth agenesis. *MSXI* is normally
11
12 expressed in dental mesenchyme, but it is not present in the dental epithelium during the
13
14 development of bud cap and the bell stages of tooth development [29, 65, 66]. Most probably,
15
16 mutations in the coding region of *MSXI* primarily lead to missing premolars [20]. The only
17
18 population level study in this respect was carried out in Rio de Janeiro, Brazil. Those data
19
20 suggest that there is a relationship between missing teeth and the genes *MSXI*, *PAX9* and
21
22 *TGFA* (which is actually regulated by *MSXI* and *PAX9*), but further studies are needed to
23
24 understand the exact relationship between these factors [20].
25
26

27
28 We found no significant difference in *FGFR1* (rs 881301), *IRF6* (rs 764093) and
29
30 *AXIN2* SNPs (rs 2240308, rs 2240307, rs 35415678). These SNPs were all previously found
31
32 to be associated to tooth agenesis [3, 24]. The *IRF6* gene locus appears to contribute to rare
33
34 syndromes, non-syndromic oral clefts, and tooth agenesis, preferentially incisors and
35
36 premolars [3, 67, 68]. The *FGFR1* signaling pathway regulates facial development evidenced
37
38 by its mutation, which causes the autosomal dominant Kallmann syndrome [22]. *IRF6*
39
40 mutations appear to be associated with cleft lip and palate and with premolar agenesis [3].
41
42 Viera and his coworkers found a significant association between *IRF6* (rs17015215, rs7802),
43
44 *FGFR1* (rs881301) gene polymorphisms and tooth agenesis in an admixed population from
45
46 Brazil which is predominantly Caucasian with Portuguese ancestry [3]. But they could not
47
48 replicate these findings in a population from Ohio, USA, which is also of Caucasian origin,
49
50 but predominantly involving descendants of Northern Europeans [3]. Similar to the Ohio
51
52 population, we did not find a significant association between *IRF6* (rs764093) and *FGFR1*
53
54 (rs881301) SNPs and tooth agenesis in Hungarians, suggesting genomic heterogeneity among
55
56
57
58
59
60

15

1
2
3 different Caucasian population. Our *FGFR* rare allele frequency (38 %) was similar to that of
4
5 the Ohio population (39 %), in which no association with hypodontia was observed either [3].
6

7
8 *AXIN2* is a scaffold protein, which phosphorylates β -catenin, a member of the Wnt
9
10 pathway of embryonic development. First it was found to be associated with a Finnish
11
12 oligodontia family [24]. A later finding suggested that *AXIN2* polymorphic variants may be
13
14 associated with both hypodontia and oligodontia [24]. Three novel *AXIN2* gene variants were
15
16 identified (c.956+16A>G, c.1060-17C>T and c.2062C>T). Individuals carrying the
17
18 c.956+16G and c.2062T alleles exhibited an increased risk of tooth agenesis. Moreover, the
19
20 c.2062C>T transition may change exon splice enhancer-specific binding sites of the protein
21
22 splicing regulators SC35 and SF2/ASF [24]. In the Hungarian population, we found no
23
24 significant association between *AXIN2* markers in positions 8150 (rs 2240308), 8434 (rs
25
26 2240307), 30224 (rs35415678) and missing tooth. We have to emphasize though that the
27
28 Hungarian population seems to be homozygous for this SNP. The rare allele frequency for
29
30 *AXIN2* 30224 C/T (rs 35415678) was much lower in the Hungarian population than in the
31
32 Polish one (3 % and 13 %, respectively), even though the frequencies of the other two *AXIN2*
33
34 SNPs were similar.
35
36
37

38
39 In conclusion, among the investigated single nucleotide polymorphisms *PAX9* and
40
41 *MSXI* but not *IRF6*, *FGFR1* and *AXIN2* SNPs seem to have an important role in tooth
42
43 agenesis in the Hungarian population. Our data also reveal the importance of population level
44
45 genomic studies and provide evidence for the necessity of risk factor evaluation in different
46
47 populations. It also confirmed that Bayesian multivariate analysis provides a normative
48
49 solution for the correction of multiple hypothesis testing, and Bayesian network based
50
51 methods, particularly in the Bayesian statistical framework, allow the analysis of strong
52
53 relevance even in the case of multiple target variables and small sample size.
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgements

Supported by the Hungarian Scientific Research Fund OTKA-75782, TAMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0001, TAMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0013 and NKTH TECH_08-A1/2-2008-0120 (Genagrid).

For Peer Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table and figure captions:

Table I: The demographic characteristics of participants

Table II: Major data about the 8 analyzed SNPs

Table III: Genotype distribution and allele frequencies in hypodontia (Hyp) and control (Con) group

Table IV. Logistic regression analysis of merged genotypes

Table V: Haploview analysis of *PAX9* -912 - *PAX9* -1031 and *PAX9* -912-*MSX1* haplotypes

Figure 1: Distribution of tooth agenesis in upper and lower jaw of the hypodontic individuals.

The most frequently missing teeth were the upper lateral incisors in the maxilla, followed by the second premolars in the mandible and the second premolars in the maxilla.

Figure 2: Pairwise linkage disequilibrium (LD) analysis of *PAX9* and *AXIN2* SNPs. A)

Pairwise linkage disequilibrium (LD) among *PAX9* SNPs (rs2073246 and rs2073244). B) No pairwise linkage disequilibrium (LD) among *AXIN2* SNPs (rs2240308 and rs2240307). The numbers in the break-even points are the D' values

Figure 3: A potential dependency model in hypodontia. Three SNPs in 2 genes were found

relevant in connection with hypodontia phenotype. The thickness of the visible arrows demonstrate the strength of their effect on the development of tooth agenesis. The two Pax9 SNPs together (the major TT genotype for Pax9-912 and the major GG genotype for Pax9-1031) have stronger relevance, than e.g. Msx1-8755 or Pax9-912 alone. The Pax9-1031 SNP has no individual effect, but through the PAX9-912 together they are intensifying each others influence. At our sample number the remaining 5 SNPs were not associated (neither calculating the conventional, nor the BN-BMLA statistical approaches) to hypodontia in the Hungarian population.

References

- [1] Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000;117:650-6.
- [2] Mostowska A, Kobiela A, Trzeciak WH. Molecular basis of non-syndromic tooth agenesis: mutations of *MSX1* and *PAX9* reflect their role in patterning human dentition. *Eur J Oral Sci.* 2003;111:365-70.
- [3] Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa AR, Lidral AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) and fibroblast growth factor receptor 1 (*FGFR1*) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet A.* 2007;143:538-45.
- [4] Hunstadbraten K. Hypodontia in the permanent dentition. *ASDC J Dent Child.* 1973;40:115-7.
- [5] Endo T, Ozoe R, Kubota M, Akiyama M, Shimooka S. A survey of hypodontia in Japanese orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;129:29-35.
- [6] Lidral AC, Reising BC. The role of *MSX1* in human tooth agenesis. *J Dent Res.* 2002;81:274-8.
- [7] Gabris K, Tarjan I, Csiki P, Konrad F, Szadeczky B, Rozsa N. [Prevalence of congenital hypodontia in the permanent dentition and its treatment]. *Fogorv Sz.* 2001;94:137-40.
- [8] Polder BJ, Van't Hof MA, Van der Linden FP, Kuijpers-Jagtman AM. A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004;32:217-26.
- [9] Nieminen P. Genetic basis of tooth agenesis. *Journal of experimental zoology Part B, Molecular and developmental evolution.* 2009;312B:320-42.
- [10] Bergendal B, Norderyd J, Bagesund M, Holst A. Signs and symptoms from ectodermal organs in young Swedish individuals with oligodontia. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children.* 2006;16:320-6.
- [11] Schalk-van der Weide Y, Beemer FA, Faber JA, Bosman F. Symptomatology of patients with oligodontia. *Journal of oral rehabilitation.* 1994;21:247-61.
- [12] van den Boogaard MJ, Creton M, Bronkhorst Y, van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D, et al. Mutations in *WNT10A* are present in more than half of isolated hypodontia cases. *Journal of medical genetics.* 2012;49:327-31.
- [13] Frazier-Bowers SA, Guo DC, Cavender A, Xue L, Evans B, King T, et al. A novel mutation in human *PAX9* causes molar oligodontia. *J Dent Res.* 2002;81:129-33.
- [14] Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 2003;116:1647-8.
- [15] Jumlongras D, Lin JY, Chapra A, Seidman CE, Seidman JG, Maas RL, et al. A novel missense mutation in the paired domain of *PAX9* causes non-syndromic oligodontia. *Hum Genet.* 2004;114:242-9.
- [16] Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI. Mutation of *PAX9* is associated with oligodontia. *Nat Genet.* 2000;24:18-9.
- [17] Nieminen P, Arte S, Tanner D, Paulin L, Alaluusua S, Thesleff I, et al. Identification of a nonsense mutation in the *PAX9* gene in molar oligodontia. *Eur J Hum Genet.* 2001;9:743-6.
- [18] Das P, Stockton DW, Bauer C, Shaffer LG, D'Souza RN, Wright T, et al. Haploinsufficiency of *PAX9* is associated with autosomal dominant hypodontia. *Hum Genet.* 2002;110:371-6.
- [19] Lammi L, Halonen K, Pirinen S, Thesleff I, Arte S, Nieminen P. A missense mutation in *PAX9* in a family with distinct phenotype of oligodontia. *Eur J Hum Genet.* 2003;11:866-71.
- [20] Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray JC. *MSX1*, *PAX9*, and *TGFA* contribute to tooth agenesis in humans. *J Dent Res.* 2004;83:723-7.
- [21] Ogawa T, Kapadia H, Feng JQ, Raghov R, Peters H, D'Souza RN. Functional consequences of interactions between *Pax9* and *Msx1* genes in normal and abnormal tooth development. *J Biol Chem.* 2006;281:18363-9.

- 1
2
3 [22] Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, et al.
4 Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat*
5 *Genet.* 2003;33:463-5.
- 6 [23] Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, et al.
7 Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet.*
8 2002;32:285-9.
- 9 [24] Mostowska A, Biedziak B, Jagodzinski PP. Axis inhibition protein 2 (AXIN2)
10 polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis. *J Hum Genet.* 2006;51:262-
11 6.
- 12 [25] Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, et al. Mutations in
13 AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet.*
14 2004;74:1043-50.
- 15 [26] Peres RC, Scarel-Caminaga RM, do Espirito Santo AR, Line SR. Association between
16 PAX-9 promoter polymorphisms and hypodontia in humans. *Arch Oral Biol.* 2005;50:861-71.
- 17 [27] Mostowska A, Biedziak B, Trzeciak WH. A novel c.581C>T transition localized in a
18 highly conserved homeobox sequence of MSX1: is it responsible for oligodontia? *J Appl*
19 *Genet.* 2006;47:159-64.
- 20 [28] Wang J, Jian F, Chen J, Wang H, Lin Y, Yang Z, et al. Sequence analysis of PAX9,
21 MSX1 and AXIN2 genes in a Chinese oligodontia family. *Arch Oral Biol.* 2011;56:1027-34.
- 22 [29] Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Parent-of-origin effects for MSX1 in a Chilean
23 population with nonsyndromic cleft lip/palate. *American journal of medical genetics Part A.*
24 2010;152A:2011-6.
- 25 [30] De Coster PJ, Marks LA, Martens LC, Huysseune A. Dental agenesis: genetic and
26 clinical perspectives. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the*
27 *International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.*
28 2009;38:1-17.
- 29 [31] Matalova E, Fleischmannova J, Sharpe PT, Tucker AS. Tooth agenesis: from
30 molecular genetics to molecular dentistry. *J Dent Res.* 2008;87:617-23.
- 31 [32] Ungvari I, Hullam G, Antal P, Kiszal PS, Gezsi A, Hadadi E, et al. Evaluation of a
32 partial genome screening of two asthma susceptibility regions using bayesian network based
33 bayesian multilevel analysis of relevance. *PLoS One.* 2012;7:e33573.
- 34 [33] Stephens M, Balding DJ. Bayesian statistical methods for genetic association studies.
35 *Nat Rev Genet.* 2009;10:681-90.
- 36 [34] Antal P, Millinghoffer A, Hullám G, Szalai C, Falus A, editors. *A Bayesian View of*
37 *Challenges in Feature Selection: Feature Aggregation, Multiple Targets, Redundancy and*
38 *Interaction. Workshop on New challenges for feature selection in data mining and knowledge*
39 *discovery, ECML PKDD 2008; Antwerpen, Belgium.*
- 40 [35] Baurley JW, Conti DV, Gauderman WJ, Thomas DC. Discovery of complex pathways
41 from observational data. *Statistics in medicine.* 2010;29:1998-2011.
- 42 [36] Chen GK, Thomas DC. Using biological knowledge to discover higher order
43 interactions in genetic association studies. *Genetic epidemiology.* 2010;34:863-78.
- 44 [37] Larmour CJ, Mossey PA, Thind BS, Forgie AH, Stirrups DR. Hypodontia--a
45 retrospective review of prevalence and etiology. Part I. *Quintessence international.*
46 2005;36:263-70.
- 47 [38] Ajami BA, Shabzendedar M, Mehrjerdian M. Prevalence of hypodontia in nine- to
48 fourteen-year-old children who attended the Mashhad School of Dentistry. *Indian J Dent Res.*
49 2010;21:549-51.
- 50 [39] Muller TP, Hill IN, Peterson AC, Blayney JR. A survey of congenitally missing
51 permanent teeth. *J Am Dent Assoc.* 1970;81:101-7.
- 52 [40] Rolling S, Poulsen S. Oligodontia in Danish schoolchildren. *Acta Odontol Scand.*
53 2001;59:111-2.
- 54 [41] Rolling S. Hypodontia of permanent teeth in Danish schoolchildren. *Scand J Dent Res.*
55 1980;88:365-9.
- 56 [42] Salama FS, Abdel-Megid FY. Hypodontia of primary and permanent teeth in a sample
57 of Saudi children. *Egypt Dent J.* 1994;40:625-32.
- 58 [43] Silva Meza R. Radiographic assessment of congenitally missing teeth in orthodontic
59 patients. *Int J Paediatr Dent.* 2003;13:112-6.
- 60

- 1
2
3 [44] Ng'ang'a RN, Ng'ang'a PM. Hypodontia of permanent teeth in a Kenyan population. East African medical journal. 2001;78:200-3.
- 4 [45] Aasheim B, Ogaard B. Hypodontia in 9-year-old Norwegians related to need of
5 orthodontic treatment. Scandinavian journal of dental research. 1993;101:257-60.
- 6 [46] Gabris K, Fabian G, Kaan M, Rozsa N, Tarjan I. Prevalence of hypodontia and
7 hyperdontia in paedodontic and orthodontic patients in Budapest. Community Dent Health.
8 2006;23:80-2.
- 9 [47] de Beer GR. Embryos and ancestors. Oxford: Clarendon Press; 1951. p. 58-59.
- 10 [48] Brook AH. A unifying aetiological explanation for anomalies of human tooth number
11 and size. Arch Oral Biol. 1984;29:373-8.
- 12 [49] Schalk-van der Weide Y, Bosman F. Tooth size in relatives of individuals with
13 oligodontia. Arch Oral Biol. 1996;41:469-72.
- 14 [50] Jorgenson RJ. Clinician's view of hypodontia. J Am Dent Assoc. 1980;101:283-6.
- 15 [51] Fekonja A. Hypodontia in orthodontically treated children. European journal of
16 orthodontics. 2005;27:457-60.
- 17 [52] Dahlberg AA. The changing dentition of man . Journal of the American Dental
18 Association. 1945;32:676-90.
- 19 [53] Butler PM, editor. Studies of the mammalian dentition. Proceedings of the Zoological
20 Society of London; 1939.
- 21 [54] Pan Y, Wang L, Ma J, Zhang W, Wang M, Zhong W, et al. PAX9 polymorphisms and
22 susceptibility to sporadic tooth agenesis: a case-control study in southeast China. Eur J Oral
23 Sci. 2008;116:98-103.
- 24 [55] Endo T, Ozoe R, Yoshino S, Shimooka S. Hypodontia patterns and variations in
25 craniofacial morphology in Japanese orthodontic patients. Angle Orthod. 2006;76:996-1003.
- 26 [56] Dolder E. Deficient dentition. Statistical survey . Dental Record. 1937;57:142-43.
- 27 [57] Nordgarden H, Jensen JL, Storhaug K. Reported prevalence of congenitally missing
28 teeth in two Norwegian counties. Community Dent Health. 2002;19:258-61.
- 29 [58] Rosenzweig KA, Garbarski D. Numerical aberrations in the permanent teeth of grade
30 school children in Jerusalem. Am J Phys Anthropol. 1965;23:277-83.
- 31 [59] Miletich I, Sharpe PT. Normal and abnormal dental development. Human molecular
32 genetics. 2003;12 Spec No 1:R69-73.
- 33 [60] Nakatomi M, Wang XP, Key D, Lund JJ, Turbe-Doan A, Kist R, et al. Genetic
34 interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth
35 morphogenesis. Dev Biol. 2010;340:438-49.
- 36 [61] Pereira TV, Salzano FM, Mostowska A, Trzeciak WH, Ruiz-Linares A, Chies JA, et
37 al. Natural selection and molecular evolution in primate PAX9 gene, a major determinant of
38 tooth development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:5676-81.
- 39 [62] Pawlowska E, Janik-Papis K, Wisniewska-Jarosinska M, Szczepanska J, Blasiak J.
40 Mutations in the human homeobox MSX1 gene in the congenital lack of permanent teeth.
41 Tohoku J Exp Med. 2009;217:307-12.
- 42 [63] Paixao-Cortes VR, Braga T, Salzano FM, Mundstock K, Mundstock CA, Bortolini
43 MC. PAX9 and MSX1 transcription factor genes in non-syndromic dental agenesis. Arch Oral
44 Biol. 2011;56:337-44.
- 45 [64] Bianch FJ, de Oliveira TF, Saito CB, Peres RC, Line SR. Association between
46 polymorphism in the promoter region (G/C-915) of PAX9 gene and third molar agenesis.
47 Journal of applied oral science : revista FOB. 2007;15:382-6.
- 48 [65] Mackenzie IC, Rittman G, Gao Z, Leigh I, Lane EB. Patterns of cytokeratin
49 expression in human gingival epithelia. J Periodontal Res. 1991;26:468-78.
- 50 [66] Huang YQ, Ma J, Ma M, Deng Y, Li YD, Ren HW, et al. Association between MSX1
51 variants and oral clefts in Han Chinese in western China. DNA and cell biology.
52 2011;30:1057-61.
- 53 [67] Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. J Dent Res. 2008;87:119-
54 25.
- 55 [68] Vieira AR, Seymen F, Patir A, Menezes R. Evidence of linkage disequilibrium
56 between polymorphisms at the IRF6 locus and isolate tooth agenesis, in a Turkish population.
57 Arch Oral Biol. 2008;53:780-4.
- 58
59
60

Table I: The demographic characteristics of participants

Family characteristic	Hypodontia group (Hyp) N (%)	Oligodontia group (Oli) N (%)	Control group (Con) N (%)
Total number	192	17	260
Gender distribution			
Male	84 (44 %)	8 (47 %)	69 (27 %)
Female	108 (56 %)	9 (53 %)	191 (73 %)
Age (mean + SD)	18.9 ±7.7	21 ±6.1	26.2±13.4

Table II: Major data about the 8 analyzed SNPs

Gene	dbSNP Major/minor allele (position)	rs number	TaqMan SNP Assay ID
FGFR1	T/C (26190464)	rs 881301	C__8844845_10
IRF6	T/C (1149)	rs 764093	C__2500195_10
MSX1	A/G (3755, 8755)	rs 12532	C__26933394_10
PAX9	C/T (-912, 8221)	rs 2073246	C__11921290_10
PAX9	A/G (-1031, 8102)	rs 2073244	C__11921292
AXIN2	A/G (-148, 8150)	rs 2240308	C__2577354_1_
AXIN2	A/G (-432, 8434)	rs 2240307	C__25471570_10
AXIN2	C/T (-2062, 30224)	rs 35415678	C__60544507_10

Table III: Genotype distribution and allele frequencies in hypodontia (Hyp) and control (Con) group

Polymorphism	Control (n=260) N,%	Hypodontia (n=192) N,%	Oligodontia (n=17) N,%	Genotypes	Statistical Analysis (Hypodontia) Genotypes	Alleles
PAX9-912 C/T						
C/C	98 (38%)	51 (27%)	7 (41%)	C/C vs.C/T & .T/T	C/C & C/T vs. T/T	C vs. T
C/T	121 (46%)	111 (58%)	9 (53%)	$\chi^2=6.19$	$\chi^2=0.0$	$\chi^2=2.75$
T/T	41 (16%)	30 (15%)	1 (6%)	P=0.0128*	P=0.9668	P=0.0974
				OR=1,672 (1,114-2,512)	OR=1.011 (0.605-1.688)	OR=1.254 (0.959-1.638)
C	317 (61%)	213 (55%)	23 (68%)			
T	203 (39%)	171 (45%)	11 (32%)			
PAX9-1031 A/G						
A/A	98 (38%)	54 (28%)	7 (41%)	A/A vs. A/G&G/G	A/A&A/G vs. G/G	A vs. G
A/G	121 (46%)	106 (55%)	9 (53%)	$\chi^2=4.53$	$\chi^2=0.07$	$\chi^2=2.5$
G/G	41 (16%)	32 (17%)	1 (6%)	P=0.0333*	P=0.7977	P=0.1142
				OR=1.546 (1.034-)	OR=0.936 (0.565-1.551)	OR=1.241 (0.949-1.621)
A	317 (61%)	214 (56%)	23 (68%)			
G	203 (39%)	170 (44%)	11 (32%)			
MSX1 8755 A/G						
A/A	120 (46%)	98 (51%)	7 (41%)	A/A vs. A/G&G/G	A/A&A/G vs. G/G	A vs. G
A/G	111 (43%)	85 (44%)	8 (47%)	$\chi^2=0.9793$	$\chi^2=6.00$	$\chi^2=3.38$
G/G	29 (11%)	9 (5%)	2 (12%)	P=0.3224	P=0.0143*	P=0.0658
				OR=1.208 (0.831-1.755)	OR=2.553 (1.179-5.528)	OR=0.761 (0.569-1.018)
A	351 (67%)	281 (73%)	22 (65%)			
G	169 (33%)	103 (27%)	12 (35%)			
FGFR1 T/C						
T/T	95 (37%)	75 (40%)	7 (44%)	C/C vs. C/T&T/T	C/C&C/T vs.T/T	C vs. T
C/T	117 (45%)	85 (45%)	6 (37%)	$\chi^2=0.61$	$\chi^2=0.42$	$\chi^2=0.77$
C/C	47 (18%)	29 (15%)	3 (19%)	P=0.4350	P=0.5177	P=0.3800
				OR=1.223 (0.737-2.029)	OR=0.88 (0.599-1.295)	OR=1.129 (0.861-1.482)
T	307 (59%)	235 (62%)	20 (63%)			
C	211 (41%)	143 (38%)	12 (37%)			
IRF6 1149 T/C						

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

T/T	189 (73%)	141 (74%)	14 (82%)	T/T vs. T/C&C/C	T/T&T/C vs. C/C	T vs. C
T/C	61 (24%)	45 (24%)	3 (18%)	$\chi^2=0.04$	$\chi^2=0.27$	$\chi^2=0.13$
C/C	9 (3%)	5 (2%)	0 (0%)	P=0.8404	P=0.6047	P=0.7223
				OR=0.957 (0.627-1.462)	OR=1.339 (0.442-4.062)	OR=0.935 (0.644-1.357)
T	439 (85%)	327 (86%)	31 (91%)			
C	79 (15%)	55 (14%)	3 (9%)			
AXIN2-8150 A/G						
A/A	65 (25%)	45 (23%)	7 (41%)	A/A vs. A/G&G/G	A/A&A/G vs. G/G	A vs. G
A/G	142 (55%)	115 (60%)	7 (41%)	$\chi^2=0.15$	$\chi^2=1.00$	$\chi^2=0.1$
G/G	53 (20%)	32 (17%)	3 (18%)	P=0.7019	P=0.3173	P=0.7483
				OR=1.089 (0.704-1.684)	OR=1.28 (0.788-2.079)	OR=0.958 (0.735-1.247)
A	272 (52%)	205 (53%)	21 (62%)			
G	248 (48%)	179 (47%)	13 (38%)			
AXIN2-8434 A/G						
A/A	252 (97%)	189 (98.5%)	17 (100%)	A/A vs. A/G&G/G	A/A&A/G vs. G/G	A vs. G
A/G	8 (3%)	2 (1%)	0 (0%)	$\chi^2=1.07$	$\chi^2=1.36$	$\chi^2=0.42$
G/G	0 (0%)	1 (0.5%)	0 (0%)	P=0.3016	P=0.2440	P=0.5188
				OR=0.500 (0.131-1.91)	OR=0.245 (0.01-6.048)	OR=0.674 (0.201-2.254)
A	512 (98.5%)	380 (99%)	34 (100%)			
G	8 (1.5%)	4 (1%)	0 (0%)			
AXIN2-30224 C/T						
C/C	239 (92%)	179 (94%)	16 (100%)	T/T vs. C/T&C/C	T/T&C/T vs. C/C	T vs. C
C/T	20 (7.5%)	12 (6%)	0 (0%)	$\chi^2=0.74$	$\chi^2=0.52$	$\chi^2=0.72$
T/T	1 (0.5%)	0 (0%)	0 (0%)	P=0.3908	P=0.4697	P=0.3960
				OR=2.214 (0.09-54.641)	OR=0.763 (0.366-1.592)	OR=1.362 (0.666-2.788)
C	498 (96%)	370 (97%)	32 (100%)			
T	22 (4%)	12 (3%)	0 (0%)			

P value was calculated by Chi-square test at 95% confidence interval
OR=Odds Ratio (Confidence Interval)

Table IV: Logistic regression analysis of merged genotypes.

	p-value	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)	
			Lower	Upper
PAX9 -912 C/T (dom)	0.01017	15.402	1.914	123.963
PAX9 -1031 A/G (dom)	0.00624	17.390	2.246	134.630
MSX1 A/G (rec)	0.01498	.354	.153	.817
PAX9 -1031 A/G by PAX9 -912 C/T (dom)	0.00002	.002	.000	.034

C.I. :confidence interval

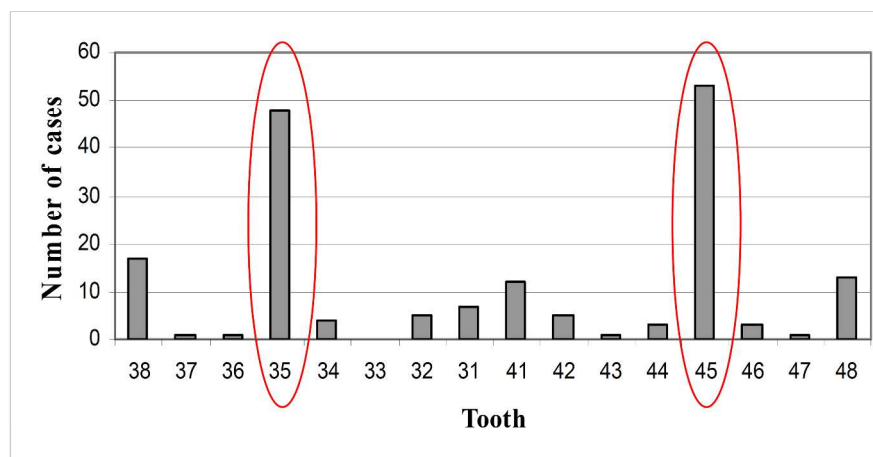
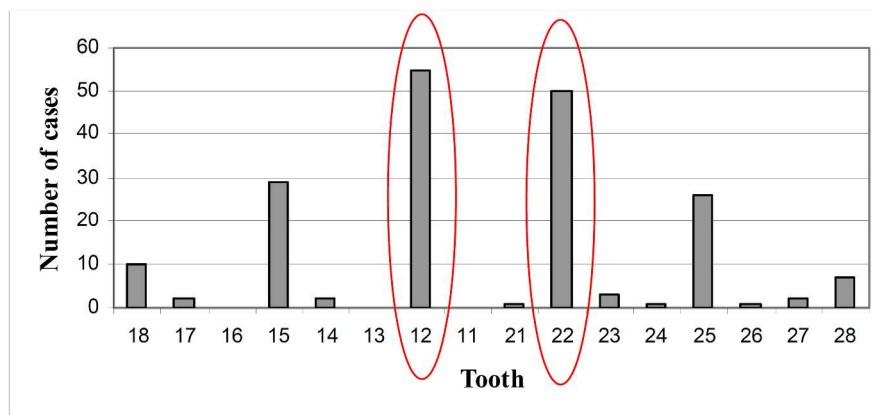
(rec): recessive model (heterozygote+homozygote1)

(dom):a dominant model (heterozygote+homozygote 2).

Table V: Haploview analysis of *PAX9 -912 - PAX9 -1031* and *PAX9 -912-MSX1* haplotypes

PAX9 -1031(A/G) + PAX9 -912(C/T)						
Haplotype Associations						
Blocks	Frequency	Case Ratio	Control Ratio	χ^2	p value	Permutation p-value
AC	0.289	85.7 : 302.3	176.3 : 343.7	15.104	0.0001	0.0045
AT	0.041	33.3 : 354.7	3.7 : 516.3	35.192	2.99E-09	0.00E+00
GC	0.033	26.3 : 361.7	3.7 : 516.3	25.576	4.25E-07	0.0001
GT	0.638	242.7 : 145.3	336.3 : 183.7	0.432	0.5112	0.9671
MSX1 8755 (A/G) + PAX9 -912(C/T)						
Haplotype Associations						
Blocks	Frequency	Case Ratio	Control Ratio	χ^2	p value	Permutation p-value
AC	0.094	32.3 : 355.7	53.0 : 467.0	0.902	0.3423	0.7345
AT	0.231	84.7 : 303.3	125.0 : 395.0	0.615	0.4329	0.8315
GC	0.228	79.7 : 308.3	127.0 : 393.0	1.913	0.1666	0.4623
GT	0.448	191.3 : 196.7	215.0 : 305.0	5.704	0.0169**	0.065*

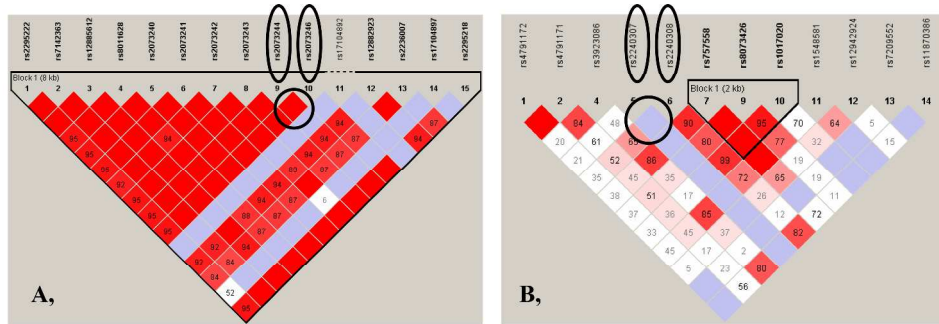
** : significant



Distribution of tooth agenesis in upper and lower jaw of the hypodontic individuals.

The most frequently missing teeth were the upper lateral incisors in the maxilla, followed by the second premolars in the mandible and the second premolars in the maxilla.

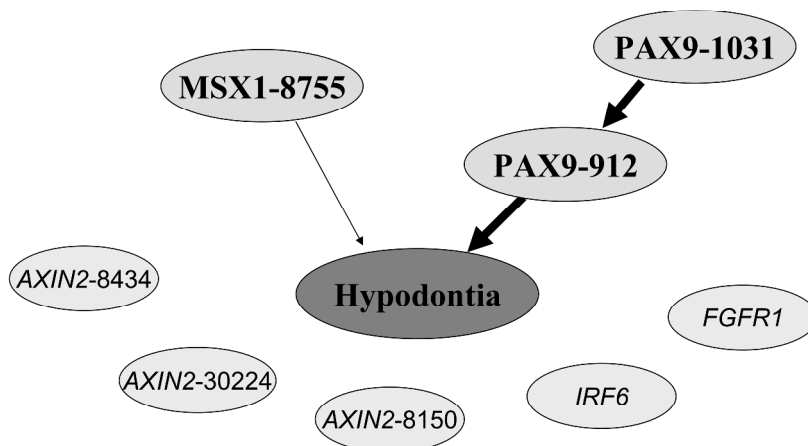
146x164mm (600 x 600 DPI)



Pairwise linkage disequilibrium (LD) analysis of PAX9 and AXIN2 SNPs.

- A)** Pairwise linkage disequilibrium (LD) among PAX9 SNPs (rs2073246 and rs2073244).
- B)** No pairwise linkage disequilibrium (LD) among AXIN2 SNPs (rs2240308 and rs2240307). The numbers in the break-even points are the D' values

2626x1005mm (72 x 72 DPI)



A potential dependency model in hypodontia.

Three SNPs in 2 genes were found relevant in connection with hypodontia phenotype. The thickness of the visible arrows demonstrate the strength of their effect on the development of tooth agenesis. The two Pax9 SNPs together (the major TT genotype for Pax9-912 and the major GG genotype for Pax9-1031) have stronger relevance, than e.g. Msx1-8755 or Pax9-912 alone. The Pax9-1031 SNP has no individual effect, but through the PAX9-912 together they are intensifying each others influence. At our sample number the remaining 5 SNPs were not associated (neither calculating the conventional, nor the BN-BMLA statistical approaches) to hypodontia in the Hungarian population.

2555x1760mm (72 x 72 DPI)