

ANALIZA MOLEKULARNA WRODZONYCH ZABURZEŃ BUDOWY ZĘBINY O CHARAKTERZE DENTINOGENESIS IMPERFECTA I DYSPLAZJI ZĘBINY – PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

MOLECULAR ANALYSIS OF HEREDITARY
DENTINE DISEASES – REVIEW ARTICLE

Izabela MACIEJEWSKA¹, Ewa CHOMIK¹, Tadeusz PAWEŁCZYK²

¹Katedra i Zakład Protetyki Stomatologicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

²Zakład Medycyny Molekularnej, Gdański Uniwersytet Medyczny

Streszczenie: Sialofosfoproteina zębiny (DSPP) jest niekolagenowym białkiem budującym organiczną macierz zębiny. DSPP po kolagenie typu I jest najobfitszym białkiem zębiny i jednocześnie uznane zostało za białko markerowe, gdyż jego synteza w zębinie jest setki razy wyższa, aniżeli w jakichkolwiek innych tkankach organizmu, również w kości. W wyniku potranslacyjnej modyfikacji białko DSPP ulega rozszczepieniu na białka pochodne: sialoproteinę zębiny (DSP), fosfoproteinę zębiny (DPP) oraz proteoglikan-DSP (DSP-PG). Badania wskazują, że wszystkie białka pochodne DSPP są bezpośrednio zaangażowane w proces dentinogenezy. Dotychczas opisano około 30 mutacji odpowiedzialnych za powstanie wrodzonych zaburzeń zębiny o charakterze *dentinogenesis imperfecta* typu II/III (DGI) oraz dysplazji zębiny (DD). Jednocześnie stwierdzono, że wszystkie mutacje dotyczą genu kodującego białko DSPP, zlokalizowanego u człowieka na chromosomie 4q22.1. W zależności od lokalizacji mutacji może ona dotyczyć rejonu kodującego peptyd sygnalizacyjny, białko DSP lub DPP, jednak obserwowany klinicznie fenotyp będący efektem tych mutacji cechuje relatywnie duża jednorodność. Jednocześnie, identyczne mutacje w obrębie genu DSPP powodują u jednych pacjentów objawy kliniczne DGI-II, a u innych DD. Z powyższego wynika, że obserwowany fenotyp nie zależy jedynie od konkretnej mutacji, lecz może być istotnie modyfikowany przez czynniki środowiskowe. W oparciu o najnowsze doniesienia naukowe z zakresu analizy molekularnej genu DSPP upacjentów z DGI-II oraz DD, autorzy podjęli próbę usystematyzowania obecnej wiedzy na temat korelacji mutacji w genie DSPP oraz prezentowanym klinicznie fenotypem.

Słowa kluczowe: DSPP, dentinogenesis imperfecta, dysplazja zębiny

Summary: Dentin sialophosphoprotein (DSPP) is the most abundant, non-collagenous protein building dentin. DSPP has been considered to be tooth-specific, because its concentration in dentin is significantly higher than in any other tissues including bone. After translation, the native, full-length DSPP is cleaved into 3 daughter proteins with distinct properties namely; dentin sialoprotein (DSP), phosphoprotein (DPP) and glycoprotein DSP-PG, which are conformed to directly mediate the dentin formation and maturation. To date, about 30 mutations in the human DSPP gene (4q22.1) have been reported. Most of them are responsible for the hereditary dentin disorders: dentinogenesis imperfecta type II/III (DGI) and/or dentin dysplasia (DD). Depending on the localization at the DSPP sequence, so far identified mutations affect the DSPP sequences coding the signal peptide, DSP and/or DPP. Although the phenotypes of both DGI type II and DD are similar, the clinical features presented at individuals may differ significantly. Moreover for some reasons, the same mutation within the DSPP gene, result in the phenotype of DGI-II or DD. Thus possibly, the final phenotype depends not only on the particular mutation, but may be significantly modified by environmental factors. This review tries to gather and evaluate the most significant and outstanding results of molecular analysis of the reported mutations in the DSPP gene. Additionally, authors tried to establish the potential direct correlation between the type and localization of the specific mutation and the phenotype presented clinically.

Key words: DSPP, dentinogenesis imperfecta, dentin dysplasia

WSTĘP

Formowanie zębiny (dentinogeneza) jest efektem czasowo-przestrzennych zmian w sekrecji organicznych komponentów zewnątrzkomórkowej macierzy, która w kolejnych etapach ulega mineralizacji. Cały proces jest regulowany przez komórki zębinotwórcze zwane odontoblastami. Zębina jest najobfitszą tkanką zęba, której stopień mineralizacji w dojrzałym zębie wynosi około 70%. Pozostałe 30% składu zębiny stanowi część organiczna (20%) oraz woda (10%). Część organiczną macierzy zębiny w znamienitej przewodzie buduje kolagen typu I [11, 12] oraz liczne białka niekolagenowe, w tym: sialoproteina (DSP), fosfoproteina (DPP) oraz glikoproteina zębiny (DGP). Wszystkie trzy wymienione białka powstają w wyniku potranslacyjnych modyfikacji białka macierzystego – sialofosfoproteiny zębiny (DSPP), jak dotąd jedyne białko uznane za specyficzne (tzw. markerowe białko zębiny). Stwierdzono bowiem, iż DSPP występuje w zębinie w stężeniu około 400-krotnie większym niż w kościach oraz licznych tkankach miękkich (płuca, ślinianki, nerki) [34].

Ludzkie białko DSPP składa się z 1301 aminokwasów (aa) i podlega modyfikacjom potranslacyjnym polegającym na cięciu przez enzym BMP1, czego wynikiem są trzy białka potomne wydzielane przez komórkę do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [28, 39]. Białka te charakteryzują się skrajnie różnymi właściwościami biochemicznymi. Pierwsze białko pochodne – DSP – zbudowane jest z 16-374 aa macierzystego DSPP, podlega zarówno N- jak i O-glikozytacji przyłączając wybiórczo 6-siarczan chondroityny [46]. Szczegółowa analiza wła-

ściwości DSP wykazała, że u różnych gatunków białko to przyjmuje odmienną strukturę przestrzenną oraz znacząco różni się masą cząsteczkową [8, 9, 35, 38, 45]. Wynika to głównie z faktu współwystępowania dwóch form DSP tj. białka nieglikozylowanego i proteoglikanu DSP-PG oraz zdolności DSP do tworzenia dimerów [35, 38, 45]. Pomimo, iż struktura DSP była bardzo szczegółowo badana to rola białka w mineralizacji zębiny nie została dotąd precyzyjnie określona, jednak fosforylacja oraz glikozylacja DSP i DSP-PG sugeruje, iż obydwie formy białka pośredniczą w procesie mineralizacji zębiny [25, 37, 44]. Ponadto ustalono, iż łańcuch cukrowy obecny w DSP-PG bierze bezpośredni udział w konwersji przębiny w zębinę [32]. Sekwencja kolejnego białka potomnego zwanego DPP rozpoczyna się od sekwencji DDPN i przeciętnie liczy około 500 aminokwasów. Istnieją znaczące różnice w całkowitej długości sekwencji aminokwasowej DPP jednak różnice te uznaje się za efekt polimorfizmu [21, 33, 46, 48]. Niespotykanie wysoka zawartość reszt kwasu asparaginowego i glutaminowego oraz seryny nadaje białku DPP silnie hydrofilny oraz kwaśny charakter, a jego punkt izoelektryczny wynosi 1,1. W wyniku modyfikacji potranslacyjnych duża ilość reszt seryny zlokalizowanych głównie w okolicy C-końcowego białka DPP, ulega intensywnej fosforylacji i tworzy specyficzne, repetytywne sekwencje (DSS)_n oraz (DS)_n. Niezwykle interesująca wydaje się konformacja przestrzenna białka DPP, ponieważ rdzeń białkowy DPP tworzy strukturę przypominającą wstęgę na obrzeżach której gromadzą się grupy fosforanowe, co w konsekwencji ułatwia wiązanie wolnych jonów wapniowych znajdujących się w otaczającym środowisku [16]. DPP tuż po powstaniu w odontoblastach, jest transportowane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej gdzie zostaje w budowane do siatki kolagenowej, a następnie uczestniczy w nukleacji kryształów apatytu i mineralizacji zębiny [10, 25, 36]. Zaobserwowano, że DPP działa promineralizująco jedynie w niskich stężeniach, podczas gdy wysokie stężenia białka hamują mineralizację [7].

Gen kodujący DSPP liczy 8343 pary zasad, zlokalizowany jest na chromosomie 4q22.1 i składa się z 5 eksonów i 4 intronów [25]. Podobnie jak w innych genach kodujących białka z rodziny SIBLING, pierwszy ekson genu DSPP jest eksonem niekodującym, natomiast ekson drugi koduje sekwencję peptydu sygnalizacyjnego oraz trzech pierwszych aminokwasów białka DSP. Sekwencja DSP jest kodowana w eksonie trzecim i czwartym oraz w niewielkiej ilości w eksonie piątym, podczas gdy całość sekwencji białka DPP kodowana jest w eksonie piątym [14, 15]. Sekwencja kodująca C-końcowe białka DPP jest wysoko repetytywna i zawiera około 200 repetytywnych sekwencji 9-nukleotydowych kodujących powtórzenia SSD [5, 30]. Sekwencja ta wykazuje wysoki stopień polimorfizmu.

Celem pracy jest opis najnowszych doniesień naukowych dotyczących molekularnej analizy genu DSPP u osób dotkniętych izolowanym zespołem *dentinogenesis imperfecta* typu II/III i/lub dysplazją zębiny wraz z podjęciem próby połączenia poszczególnych mutacji z prezentowanym klinicznie fenotypem. W pracy

wykorzystano 50 najnowszych oraz najbardziej istotnych doniesień naukowych dotyczących analizy molekularnej genu DSPP u osób wykazujących izolowany fenotyp *dentinogenesis imperfecta* typu II/III oraz dysplazji zębiny.

FENOTYP *DENTINOGENESIS IMPERFECTA* TYPU II/III ORAZ DYSPLAZJI ZĘBINY

Dane z piśmiennictwa dotyczące analizy molekularnej genomu osób obciążonych izolowanym fenotypem o charakterze *dentinogenesis imperfecta* typu II/III i/lub dysplazją zębiny dowodzą, że jedynie mutacje w genie DSPP są przyczyną obserwowanego klinicznie fenotypu. Obydwie jednostki chorobowe należą do tzw. rzadkich wad genetycznych i pojawiają się z częstotliwością 1:8000 noworodków [43]. W przypadku *dentinogenesis imperfecta* typu II/III cechy obserwowane klinicznie dotyczą zarówno uzębienia stałego jak i mlecznego oraz objawiają się opalizująco żółtym, błękitnym bądź bursztynowym zabarwieniem zębiny będącym efektem jej zaburzonej mineralizacji. Upośledzenie mineralizacji zębiny skutkuje obniżeniem jej właściwości amortyzacyjnych, co w konsekwencji prowadzi do odpryskiwania pokrywającego ją szkliwa i następnie szybkiego ścierania zębów. Beczłkowate zęby w badaniu radiologicznym wykazują zwężenie obwodu szyjek zębowych, obliterację komór zęba i kanałów korzeniowych [1, 26] oraz skrócenie i zwężenie korzeni zębów. Odmienność fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu III polega na obecności tzw. zębów muszelnikowych o szerokiej komorze i kanałach korzeniowych [6, 13]. Zbliżone cechy obserwowane są u osób z dysplazją zębiny, jednak dotyczą one głównie uzębienia mlecznego, podczas gdy uzębienie stałe wykazuje jedynie niewielkie zmiany koloru zębów bez zaznaczonych cech morfologiczno-histologicznych, z wyjątkiem części występujących zębiniaków [4, 21, 26]. W ostatnim czasie zwrócono uwagę na fakt, iż obydwie jednostki chorobowe tj. *dentinogenesis imperfecta* typu II/III oraz dysplazja zębiny zostały pierwotnie sklasyfikowane jedynie na podstawie różnic w fenotypie, bez dogłębnej analizy molekularnej czynników genetycznych odpowiedzialnych za wystąpienie obu wad i zaproponowano traktowanie obu jednostek jako jednej wady z różnym stopniem penetracji [5, 21]. Jednocześnie wyzwaniem stało się powiązanie poszczególnych mutacji w genie DSPP z obserwowanym fenotypem.

MUTACJE W GENIE *DSPP* W ODNIESIENIU DO FENOTYPU

Dotychczas opisano około 30 mutacji w genie DSPP. Część z opisanych mutacji pozostaje tzw. mutacjami utajonymi bez obserwowanych objawów klinicznych, co w dużym procencie wiąże się z degeneracją kodu genetycznego oraz

pojawieniem się insercji i delecji, nie skutkujących przesunięciem ramki odczytu [33]. Wśród mutacji genu DSPP można wyodrębnić te zlokalizowane w sekwencjach kodujących: peptyd sygnalizacyjny, białko DSP oraz białko DPP (tab. 1 i 2). Ciekawym pozostaje fakt, iż mutacje opisane w sekwencjach kodujących peptyd sygnalizacyjny oraz białko DSP mają charakter transwersji i/lub translacji, natomiast mutacje w sekwencji kodującej DPP to delecje bądź insercje skutkujące przesunięciem ramki odczytu.

MUTACJE W SEKWENCJI KODUJĄCEJ PEPTYD SYGNALIZACYJNY

Dotychczas opisano dwie mutacje w sekwencji kodującej peptyd sygnalizacyjny [27, 36]. Pierwsza mutacja objawiająca się klinicznie fenotypem dysplazji zębiny polegała na transwersji T>G w kodonie 6, co skutkowało zamianą Y na D [36]. Druga o charakterze *dentinogenesis imperfecta* typu II spowodowana była tranzycją C>T w kodonie 15 czego efektem była zamiana A w V [27]. Analizując potencjalne losy białka DSPP z mutacją obecną w sekwencji peptydu sygnalizacyjnego nasuwa się sugestia, iż w zmutowanym DSPP dochodzi do zaburzeń transportu białka do retikulum endoplazmatycznego, bądź białko zostaje „uwięzione” w błonie retikulum i staje się tzw. białkiem błonowym. Dalszym efektem zahamowanego transportu jest brak modyfikacji potranslacyjnych i następcza degradacja białka w cytozolu, a w przypadku uwięzienia białka w błonie retikulum – ograniczona dostępność białek pochodnych DSPP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a następnie zaburzona mineralizacja zębiny. Zahamowanie transportu zmutowanego białka DSPP uznano za przyczynę powstania fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II oraz III będącego efektem zamiany C>A, C>T w kodonie 49 oraz transwersji G>T w kodonie 52. Zamiana cytozyny na adeninę i/lub tyminę skutkuje, na poziomie białkowym, zamianą P w pozycji 17 odpowiednio na T lub S [17, 44, 50], natomiast zamiana guaniny na tyminę powoduje zamianę V na F w pozycji 18 [18, 20, 37, 44]. Biorąc pod uwagę fakt, iż zarówno ostatnie aminokwasy w peptydzie sygnalizacyjnym jak i treonina oraz walina w pozycjach 17 i 18 zawierają sekwencję odcięcia peptydu sygnalizacyjnego, istnieje prawdopodobieństwo, że mutacja typu SNP w tym rejonie spowoduje zaburzenie modyfikacji białka z następczym zahamowaniem zewnątrzkomórkowego transportu białka DSPP, czego dowodzi fakt, iż wszelkie mutacje skutkujące zamianą pierwszych trzech aminokwasów w sekwencji kodującej DSP klinicznie objawiają się izolowanym fenotypem *dentinogenesis imperfecta* typu II [3, 19, 20, 22, 27, 37, 44]. Obserwowane cechy kliniczne dotyczą głównie zaburzeń w zabarwieniu zarówno uzębienia mlecznego jak i stałego oraz nadmiernego ścierania zębów z towarzyszącą obliteracją komór miąższu [49].

TABELA 1. Mutacje w obrębie peptydu sygnałowego DSPP, kodującej sekwencji DSP. *PS – peptyd sygnałowy
 TABLE 1. Mutations within the: - signal peptide of DSPP, - DSP code. *PS – signal peptide

Rasa		Rodzaj mutacji	cDNA	Aminokwas	Przewidywana zamiana w białku	Sekwencja	Ekson/ intron	Fenotyp	Cyt		
Kaukaska/ Niemiecka		Zmiana sensu	c.16T>G	Pro17Thr	p.Y6D	TAT>GAT	Ekson 2	DD-II	36		
										Mutacje w PS*	
Środkowo- Amerykańska		Zmiana sensu	c.15C>T	Ala15Val	p.A15V	GCC>GTC	Ekson 2	DGI-II	27		
										Mutacje w PS*	
Brandywine triracial isolate/ Chińska		Zmiana sensu	c.49C>T	Pro17Ser	p.P17S	CCA>TCA	Ekson 2	DGI-II	17 50		
										Mutacje w PS*	
Chińska		Zmiana sensu	c.49C>A	Pro17Thr	p.P17T	CCA>ACA	Ekson 2	DGI-II z utratą słuchu	44		
										Mutacje w PS*	
Chińska	Zmiana sensu	c.52G>T	Val18Phe	p.V18F	GTT>TTT	Ekson 3	DGI-II z utratą słuchu	44			
									Kaukaska	c.52G>T	
										Fińska	g.1197G>T
											Koreańska/ Chińska

TABELA 1. Mutacje w obrębie peptydu sygnałowego DSPP, kodującej sekwencji DSP. *PS – peptyd sygnałowy
 TABLE 1. Mutations within the: - signal peptide of DSPP, - DSP code. *PS – signal peptide

Rasa		Rodzaj mutacji	cDNA	Aminokwas	Przewidywana zamiana w białku	Sekwencja	Ekson/ intron	Fenotyp	Cyt
Koreańska	Zmiana sensu	Mutacja sekwencji kodującej składanie mRNA	c.53T>A	Val18Asp	p.V18D	GTC>GAC	Ekson 3	DGI-II	24
			g.1198T>A						
Chińska	Nonsensowna	Mutacja sekwencji kodującej składanie mRNA	c.133C>T	Gln45 STOP	p.Q45X	CAG>TAG	Ekson 3	DGI-II	37
			c.3658C>T						49
Szwedzka	Zmiana sensu	Mutacja sekwencji kodującej składanie mRNA	c.68A>T	Arg68Trp	p.R68W	AGG>TGG	Ekson 4	DGI-II	27
Koreańska	Mutacja sekwencji kodującej składanie mRNA	Mutacja sekwencji kodującej składanie mRNA	g.1188C>G IVS2-3C>G	-	p.V18_Q45del	CAG>GAG	Intron 2	DGI-II	19
Mongolska	Mutacja sekwencji kodującej składanie mRNA	Mutacja sekwencji kodującej składanie mRNA	IVS3+3A>G	-	-	GTAAT>GTGT	Intron 3	DGI-II	3
Chińska	Mutacja sekwencji kodującej składanie mRNA, pominięcie eksonu 3	Mutacja sekwencji kodującej składanie mRNA, pominięcie eksonu 3	c.135+1G>A	-	p.V18_Q45del	TACACGg/a	Intron 3	DGI-II	44
			c.135+1G>T						30
Kaukaska						TACACGg/t			

TABELA 2. Mutacje w obrębie peptydu sygnałowego DSPP, kodującej sekwencji DPP
 TABLE 2. Mutations within the: – signal peptide of DSPP, – DPP code

Rasa	Rodzaj mutacji	cDNA	Przewidywana zamiana w białku	Ekson	Fenotyp	Cyt
Brandywine Isolate/ USA	Insercja/delecja	c.3599_3634del36bp		Ekson 5	DGI-III	32
		c.3715_3716ins18bp				
Kaukaska	Przesunięcie ramki odczytu	c.1870delTCAG	p.S624TfsX687	Ekson 5	DD-II	30
		c.1918delTCAG	p.S640TfsX671		DGI-II	
		c.2272delA	p.S758AfsX554			
		c.2525delG	p.S842TfsX471			
Grecka	Przesunięcie ramki odczytu	c.1918delTCAG	p.S640TfsX671	Ekson 5	DD-II	33
Kaukaska/ Fińska	Przesunięcie ramki odczytu	c.2063delA	-	Ekson 5	DD-II	33
		c.3582del10bp			DGI-III	
Koreańska	Przesunięcie ramki odczytu	c.2688delT	-	Ekson 5	DGI-II	23
		c.3560delG				
Kaukaska/ Fińska	Przesunięcie ramki odczytu	g.3599del134bp	-	Ekson 5	DGI-III	18
		g.3715ins2bp				
Nie odnotowano	Przesunięcie ramki odczytu	c.3141delC	-	Ekson 5	DD-II	31

MUTACJE W SEKWENCJI KODUJĄCEJ BIAŁKO DSP

Oddzielną grupą mutacji skutkujących fenotypem *dentinogenesis imperfecta* typu II/III bądź dysplazją zębiny są dwie opisane mutacje zlokalizowane w kodonach 133 oraz 135 sekwencji genu kodującej białko DSP [30, 37, 44, 49]. W kodonie 133 zaobserwowano tranzycję C>T skutkującą zamianą kodonu dla G w kodon stop. W konsekwencji dochodzi do przedwczesnego zatrzymania translacji i powstania skróconego białka DSP [37]. W badaniu klinicznym obserwowano zredukowaną ilość kanalików zębinowych o nieregularnym przebiegu oraz nagromadzenie amorficznych tworów wypełniających kanaliki zębinowe. Mutacja zidentyfikowana w obrębie kodonu 135 polega na tranzycji G>A, co skutkuje zmianą sekwencji determinującej alternatywne składanie mRNA w intronie 3. W konsekwencji dochodziło do utraty całego eksonu 3 [44]. Tę samą mutację, skutkującą utratą eksonu 3 opisała McKnight i wsp. [30]. Dokładna analiza sekwencji zmutowanego DNA wykazała, iż w opisanej mutacji dochodzi do utraty części akceptorowej po stronie 5' eksonu 4 przy jednoczesnym braku alternatywnej sekwencji akceptorowej na odcinku 50 nukleotydów. Wszystkie opisane mutacje dotyczące sekwencji kodującej białko DSP w sekwencji genu DSPP skutkują obrazem klinicznym *dentinogenesis imperfecta* typu II, jednak wciąż brakuje szczegółowych danych wykazujących jednoznacznie rolę DSP w procesie tworzenia zębiny. Dotychczas wykazano, że DSP pośredniczy jedynie we wczesnych fazach mineralizacji zębiny, a w formie proteoglikanu bierze udział w transformacji przęzębiny w zębinę poprzez czasowo-przestrzenną modyfikację ułożenia włókien kolagenowych [32, 42]. Obserwacje powyższe pozwalają przypuszczać, że funkcja DSP w formowaniu zębiny nie może być zbalansowana przez jakiegokolwiek inne białko niekolagenowe.

MUTACJE W SEKWENCJI KODUJĄCEJ BIAŁKO DPP

Najnowsze wyniki badań naukowych wskazują, że za fenotyp o charakterze *dentinogenesis imperfecta* typu II/III odpowiedzialne są również mutacje występujące w eksonie 5 genu DSPP, który koduje sekwencję białka DPP [18, 30, 32]. Specyficzną cechą mutacji zlokalizowanych w tej niezwykle repetytywnej części sekwencji genu DSPP (około 200 powtórzeń 3-nukleotydowych sekwencji) jest fakt, iż mają one charakter delekcji i/lub insercji z przesunięciem ramki odczytu. Mutacje w część 3' genu DSPP zostały najobszerniej opisane przez McKnight i wsp. [30, 31]. Autorzy opisali 5 różnych mutacji skutkujących przesunięciem ramki odczytu w obszarze repetytywnych powtórzeń sekwencji kodujących hydrofilne i silnie fosforylowane aminokwasy SSD. Przesunięcia ramki odczytu skutkowały powstaniem dłuższej na około 500 do 600 aminokwasowej sekwencji

zbudowanej z aminokwasów hydrofobowych, głównie alaniny i waliny oraz izoleucyny. W konsekwencji probanci, u których wykryto ten rodzaj mutacji, prezentowali cechy kliniczne wad izolowanych *dentinogenesis imperfecta* typu II oraz dysplazji zębiny. Ciekawym wydaje się fakt, iż osoby, u których wykryto zamianę dłuższej sekwencji prezentowały słabiej wyrażony fenotyp tj. dysplazję zębiny, podczas gdy zamiana mniejszej ilości aminokwasów skutkowałą bardziej nasilonym fenotypem *dentinogenesis imperfecta* typu II. Dotychczas zjawisko to tłumaczono istnieniem polimorfizmów i haplotypów [30, 31], skutkujących powstawaniem różnego stosunku ilościowego białka produkowanego z transkryptu dominującego allelu, bez względu na to czy jest on zdrowy czy zmutowany. Jednak w najnowszym doniesieniu von Marschall i wsp. [29] autorzy sugerują, iż przyczyną zjawiska może być szeroko rozumiane zaburzenie transportu zmutowanego białka przez szorstkie retikulum endoplazmatyczne, co w konsekwencji rzutuje również na transport niezmienionego białka powstałego na transkrypcie prawidłowego allelu.

Niezwykle wysoka zawartość repetytywnych sekwencji zlokalizowanych w 3' końcowym fragmencie genu DSPP, jak również duża ilość haplotypów i polimorfizm genu, przyczyniają się do trudności w dokładnym sekwencjonowaniu eksonu 5. Jednak rozwijające się techniki badawcze, w tym możliwość klonowania wybranych fragmentów, pozwoliły na uzyskanie nowych danych świadczących o licznych mutacjach na 3' końcu genu DSPP. Mutacje te mają charakter delecji bądź insercji przebiegających z przesunięciem ramki odczytu. Nieminen i wsp. [33] po przebadaniu probantów z 12 niespokrewnionych rodzin wykazali, iż powodujące przesunięcie ramki odczytu delecje, które zlokalizowane są bliżej 5' końca sekwencji kodującej białko DPP, wykazują słabsze cechy uszkodzenia uzębienia stałego w obrazie klinicznym aniżeli mutacje tego samego typu zlokalizowane bliżej 3' końca. Jednocześnie ta sama grupa badawcza wykazała proporcjonalną zależność stopnia penetracji wady do ilości nukleotydów ulegających delecji, przy czym w przypadku delecji 3 nukleotydów wszystkie mutacje wykazywały cechy mutacji „utajonej”.

PODSUMOWANIE

Pomimo zastosowania coraz doskonalszych metod badawczych sekwencjonowanie genu DSPP, a tym samym jego dokładna analiza molekularna wciąż pozostaje wyzwaniem dla badaczy. Wydaje się, że w chwili obecnej ustalenie bezpośredniej korelacji pomiędzy daną mutacją i prezentowanym klinicznie fenotypem nie jest możliwe. Pomimo iż fenotyp określany jako *dentinogenesis imperfecta* typu II/III oraz dysplazja zębiny posiada wiele cech wspólnych, to w prezento-

wanych cechach klinicznych istnieje duża zmienność osobnicza objawiająca się różnicami w kolorystyce uszkodzonych zębów (od błękitnych poprzez bursztynowe do ciemnobrązowych), obecności zębiniaków czy częstości zapalenia tkanek okołowierzchołkowych. Nasuwa to przypuszczenie, że obserwowany fenotyp nie zależy jedynie od konkretnej mutacji lecz może być w znaczący sposób modyfikowany przez czynniki środowiskowe [2]. Najnowsze doniesienia von Marshall i Fishera wskazują, że zmutowane białko DSPP ulega wstępnej agregacji w szorstkim retikulum endoplazmatycznym, a w konsekwencji nie podlega modyfikacjom potranslacyjnym i nie jest transportowane do macierzy zewnątrzkomórkowej. W zamian ulega szybkiej degradacji w cytoplazmie odontoblasta, co w konsekwencji skutkuje zaburzeniami w mineralizacji zębiny [29]. Jak dotąd nie są znane losy białka DSPP, w którym doszło do mutacji w sekwencji kodującej peptyd sygnalizacyjny. Można zatem jedynie spekulować, iż białko takie w ogóle nie podlega translacji na skutek zaburzenia tworzenia kompleksu rybosom-receptor SRP (białko rozpoznające sekwencję sygnałną). Jak dotąd najdokładniej udało się wytłumaczyć powstawanie zaburzeń mineralizacji zębiny o fenotypie *dentinogenesis imperfecta* typu II/III oraz dysplazji zębiny, będących skutkiem delecji bądź insercji w 3' końcowym genu DSPP, skutkujących przesunięciem ramki odczytu. Wydaje się logicznym, iż zamiana znaczącej ilości ulegających fosforylacji hydrofilnych aminokwasów, a tym samym prezentujących grupy PO_4^{3-} wiążące jony wapniowe, na aminokwasy hydrofobowe prowadzi w linii prostej do zaburzeń procesu mineralizacji.

Skrupulatna analiza doniesień dotyczących molekularnych czynników przyczynowych wad izolowanych o charakterze *dentinogenesis imperfecta* typu II/III oraz dysplazji zębiny wskazuje, iż istnieje znacząca luka w zrozumieniu przyczyn powstawania tej jednostki chorobowej. Dlatego istotnym wydaje się nie tylko konieczność poszukiwania nowych probantów ale również kontynuowanie badań podstawowych, które pozwolą jednoznacznie ocenić losy specyficznie zmutowanego białka DSPP w organellach komórkowych odontoblasta.

LITERATURA

- [1] ACEVEDO AC, SANTOS LJ, PAULA LM, DONG J, MACDOUGALL M. Phenotype characterization and DSPP mutational analysis of three Brazilian dentinogenesis imperfecta type II families. *Cells Tissues Organs* 2009; **189**: 230-236.
- [2] ATAR M, KORPERICH EJ. Systemic disorders and their influence on the development of dental hard tissues. A literature review. *J Dent* 2010; **38**: 296-306.
- [3] BAI H, AGULA H, WU Q, ZHOU W, SUN Y. A novel DSPP mutation causes dentinogenesis imperfecta type II in a large Mongolian family. *BMC Med Genet* 2010; **11**: 23.
- [4] BARRON MJ, McDONNELL ST, MACKIE I, DIXON MJ. Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet J Rare Dis* 2008; **3**: 31.

- [5] BEATTIE ML, KIM JW, GONG SG, MURDOCH-KINCH CA, SIMMER JP, HU JCC. Phenotypic variation in dentinogenesis imperfecta/dentin dysplasia linked to 4q21. *J Dent Res* 2006; **85**: 329-333.
- [6] BIXLER D, CONNEALLY PM, CHRISTEN G. Dentinogenesis imperfecta: genetic variations in asix-generation family. *J Dent Res* 1969; **48**: 1196-1199.
- [7] BOSKEY A, SPEVAK L, TAN M, DOTY SB, BUTLER WT. Dentin Sialoprotein (DSP) has limited effects on in vitro apatite formation and growth. *Calcif Tissue Int* 2000; **67**: 472-478.
- [8] BUTLER WT, BHOWN M, DIMUZIO MT, LINDE A. Noncollagenous proteins of dentin. Isolation and partial characterization of rat dentin proteins and proteoglycans using athree-step preparative method. *Coll Relat Res* 1981; **2**: 187-199.
- [9] BUTLER WT. Dentin extracellular matrix and dentinogenesis. *Oper Dent* 1992; **Suppl 5**: 18-23.
- [10] BUTLER WT, RITCHIE HH, BRONCKERS AL. Extracellular matrix proteins of dentine. *Ciba Found Symp* 1997; **205**: 107-115.
- [11] BUTLER WT. Dentin matrix proteins. *European J Oral Sci* 1998; **106** (Suppl 1): 204-210.
- [12] BUTLER WT. Macromolecules of extracellular matrix: determination of selective structures and their functional significance. *Connect Tissue Res* 2008; **49**: 383-390.
- [13] DONG J, GU T, JEFFORDS L, MACDOUGALL M. Dentin phosphoprotein compound mutation in dentin sialophosphoprotein causes dentinogenesis imperfecta type III. *Am J Med Genet A* 2005; **132A**: 305-309.
- [14] FEDARKO NS, JAIN A, KARADAG A, FISHER LW. Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *FASEB J* 2004; **18**: 734-736.
- [15] FISHER LW, FEDARKO NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 2003; **44** (Suppl 1): 33-40.
- [16] GEORGE A, BANNON L, SABSAY B, DILLON JW, MALONE J, VEIS A, JENKINS NA, GILBERT DJ, COPELAND NG. The carboxyl-terminal domain of phosphophoryn contains unique extended triplet amino acid repeat sequences forming ordered carboxyl-phosphate interaction ridges that may be essential in the biomineralization process. *J Biol Chem* 1996; **271**: 32869-32873.
- [17] HART PS, HART TC. Disorders of human dentin. *Cells Tissues Organs* 2007; **186**: 70-77.
- [18] HOLAPPA H, NIEMINEN P, TOLVA P, LUKINMAA PL, ALALUUSUA S. Splicing site mutations in dentin sialophosphoprotein causing dentinogenesis imperfecta type II. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**: 381-384.
- [19] KIM JW, NAM SH, JANG KT, LEE SH, KIM CC, HAHN SH. A novel splice acceptor mutation in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II. *Hum Genet* 2004; **115**: 248-254.
- [20] KIM JW, HU JCC, LEE J, MOON SK, KIM YJ, JANG KT, LEE SH, KIM CC, HAHN SH, SIMMER JP. Mutational hot spot in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II. *Hum Genet* 2005; **116**: 186-191.
- [21] KIM JW, SIMMER JP. Hereditary dentin defects. *J Dent Res* 2007; **86**: 392-399.
- [22] LEE SK, HU JC, LEE KE, SIMMER JP, KIM JW. A dentin sialophosphoprotein mutation that partially disrupts splice acceptor site causes type II dentin dysplasia. *J Endod* 2008; **34**: 1470-1473.
- [23] LEE KE, KANG HY, LEE SK, YOO SH, LEE JC, HWANG YH. Novel dentin phosphoprotein frameshift mutations in dentinogenesis imperfecta type II. *Clin Genet* 2011; **79**: 378-384.
- [24] LEE SK, LEE KE, HWANG YH, KIDA M, TSUTSUMI T, ARIGA T. Identification of the DSPP mutation in a new kindred and phenotype-genotype correlation. *Oral Dis* 2011; **17**: 314-319.
- [25] MACDOUGALL M, SIMMONS D, LUAN X, GU TT, DUPONT BR. Assignment of dentin sialophosphoprotein (DSPP) to the critical DGI 2 locus on human chromosome 4 band q21.3 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1997; **79**: 121-122.
- [26] MACDOUGALL M, DONG J, ACEVEDO AC. Molecular basis of human dentin diseases. *Am J Med Genet* 2006; **140**: 2536-2546.
- [27] MALMGREN B, LINDSKOG S, ELGADI A, NORGREN S. Clinical, histopathologic, and genetic investigation in two large families with dentinogenesis imperfecta type II. *Hum Genet* 2004; **114**: 491-498.
- [28] VON MARSCHALL Z, FISHER LW. Dentin sialophosphoprotein (DSPP) is cleaved into its two natural dentin matrix products by three isoforms of bone morphogenetic protein-1 (BMP1). *Matrix Biol* 2010; **29**: 295-303.

- [29] VON MARSHALL Z, MOK S, PHILLIPS MD, MCKNIGHT DA, FISHER LW. Rough endoplasmic reticulum (rER) trafficking errors by different classes of mutant DSPP cause the dominant negative effects in both dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia by entrapping normal DSPP. *J Bone Miner Res* 2012; **27**: 1309-1321
- [30] MCKNIGHT DA, HART PS, HART TC, HARTSFIELD JK, WILSON A, WRIGHT JT, FISHER LW. A comprehensive analysis of normal variation and disease-causing mutations in the human DSPP gene. *Hum Mutat* 2008; **29**: 1392-1404.
- [31] MCKNIGHT DA, SIMMER JP, HART PS, HART TC, FISHER LW. Overlapping DSPP mutations cause dentin dysplasia and dentinogenesis imperfecta. *J Dent Res* 2008; **87**: 1108-11.
- [32] MILAN AM, SUGARS RV, EMBERY G, WADDINGTON RJ. Modulation of collagen fibrillogenesis by dentinal proteoglycans. *Calcif Tissue Int* 2005; **76**: 127-135.
- [33] NIEMINEN P, PAPAGIANNOULIS-LASCARIDES L, WALTIMO-SIREN J, OLLILA P, KARJALAINEN S, ARTE S, VEERKAMP J, WALTON V, KUSTNER EC, SILTANEN T, HOLAPPA H, LUKINMAA PL, ALALUUSUA S. Frameshift mutations in dentin phosphoprotein and dependence of dentin disease phenotype on mutation location. *J Bone Miner Res* 2011; **26**: 873-880.
- [34] QIN C. The expression of dentin sialoprotein gene in bone. *J Dent Res* 2002; **81**: 392-394.
- [35] QIN C, BABA O, BUTLER WT. Post-translational modifications of SIBLING proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; **15**: 126-136.
- [36] RAJPAR MH, KOCH MJ, DAVIES RM, MELLODY KT, KIELTY CM, DIXON MJ. Mutation of the signal peptide region of the bicistronic gene DSPP affects translocation to the endoplasmic reticulum and results in defective dentine biomineralization. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 2559-2565.
- [37] SONG Y, WANG C, PENG B, YE X, ZHAO G, FAN M, FU Q, BIAN Z. Phenotypes and genotypes in 2 DGI families with different DSPP mutations. *Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 2006; **102**: 360-374
- [38] SUGARS RV, OLSSON ML, WADDINGTON RJ, WENDEL M. Substitution of bovine dentine sialoprotein with chondroitin sulfate glycosaminoglycan chains. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**: 89-92.
- [39] SUZUKI S. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol* 2009; **28**: 221-229.
- [40] TSUCHIYA S, SIMMER JP, HU JC, RICHARDSON AS, YAMAKOSHI F, YAMAKOSHI S. Astacin proteases cleave dentin sialophosphoprotein (DSPP) to generate dentin phosphoprotein (DPP). *J Bone Miner Res* 2011; **26**: 220-228.
- [41] VEIS ABiomineralization: on the trail of the phosphate. Part II: phosphophoryn, the DMPs, and more. *J Dent Res* 2004; **83**: 6-10.
- [42] WADDINGTON RJ, HALL RC, EMBERY G, LLOYD DM. Changing profiles of proteoglycans in the transition of predentine to dentine. *Matrix Biol* 2003; **22**: 153-161.
- [43] WITKOP CJ, MACLEAN PJ, SCHMIDT JL. Medical and dental findings in the Brandywine isolate. *Ala J Med Sci* 1966; **3**: 382-403.
- [44] XIAO S, YU C, CHOU X, YUAN W, WANG Y, BU L, FU G, QIAN M, YANG J, SHI Y, HU L, HAN B, WANG Z, HUANG W, LIU J, CHEN Z, ZHAO G, KONG X. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet* 2001; **27**: 201-204.
- [45] YAMAKOSHI Y, HU JCC, FUKAE M, TAKANORI I, KIM JW, ZHANG H, SIMMER JP. Porcine dentin sialoprotein is a proteoglycan with glycosaminoglycan chains containing chondroitin 6-sulfate. *J Biol Chem* 2005; **280**: 1552-1560.
- [46] YAMAKOSHI Y, HU JC, FUKAE M, ZHANG H, SIMMER JP. Dentin glycoprotein: the protein in the middle of the dentin sialophosphoprotein chimera. *J Biol Chem* 2005; **280**: 17472-17479.
- [47] YAMAKOSHI Y. Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) and Dentin. *J Oral Biosci* 2008; **50**: 33-44.
- [48] YAMAKOSHI Y. Dentinogenesis and Dentin Sialophosphoprotein (DSPP). *J Oral Biosci* 2009; **51**: 134.
- [49] ZHANG X, ZHAO J, LI C, GAO S, QIU C, LIU P, WU G, QIANG B, LO W, SHEN Y. DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. *Nat Genet* 2001; **27**: 151-152.

- [50] ZHANG X, CHEN L, LIU J, ZHAO Z, QU E, WANG X, CHANG W, XU C, WANG Q, LIU M. A novel DSPP mutation is associated with type II dentinogenesis imperfecta in a Chinese family. *BMC Med Genet* 2007; **8**: 52-57.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 26.06.2012

Przyjęto: 12.07.2012

Izabela Maciejewska

Katedra i Zakład Protetyki Stomatologicznej

Gdański Uniwersytet Medyczny

ul. E. Orzeszkowej 18, 80-208 Gdańsk

tel.: (58) 349 21 59

fax: (58) 349 21 50

e.mail: izabelam@gumed.edu.pl