

## Role of non-collagenous proteins for dentine formation and mineralization. Part 2. II DMP1 and DSPP from SIBLING family in dentinogenesis

### Znaczenie białek niekolagenowych dla rozwoju i mineralizacji zębiny. Cz. II. Białka DMP1 i DSPP z rodziny SIBLING i ich kluczowa rola w procesie dentinogenezy

*Anna Klimaszewska<sup>1</sup>, Iwona Ordyniec-Kwaśnica<sup>1</sup>,  
Monika Sakowicz-Burkiewicz<sup>2</sup>, Izabela Maciejewska<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Protetyki Stomatologicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny  
Chair and Department of Dental Prosthetics, Medical University of Gdańsk  
Head: dr hab. Z. Bereznowski, prof. nadzw. GUMed

<sup>2</sup> Zakład Medycyny Molekularnej, Gdański Uniwersytet Medyczny  
Department of Molecular Medicine Medical University of Gdańsk  
Kierownik: prof. T. Pawełczyk

---

---

#### KEY WORDS:

SIBLING, DMP1, DSPP, DSP, DPP, dentine mineralization

---

---

---

---

#### HASŁA INDEKSOWE:

SIBLING, DMP1, DSPP, DSP, DPP, mineralizacja zębiny

---

---

#### Summary

*Molecular analysis of dentine formation and mineralization indicates the key role of SIBLING (Smal Integrin-Binding Ligand) proteins, which involves both temporal and spatial control of signaling processes as well as the direct implication of these proteins in the physical formation of the extracellular matrix of dentine. The SIBLING family consists of six proteins encoded in humans on the long arm of the chromosome 4q. The SIBLING family members are: dentine sialoprotein (DSPP), bone sialoprotein (BSP), dentine matrix protein-1 (DMP1), osteopontin (OPN), matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) and enamelin (ENAM). Analysis of sequences of the SIBLINGs' genes, confirmed their origin from the same ancient gene, which was replicated in the process of evolution. Despite the similarity of their molecular structure, SIBLING proteins show different biochemical*

#### Streszczenie

*Analiza molekularna procesu powstawania i mineralizacji zębiny wskazuje na kluczową rolę białek z rodziny SIBLING (Smal Integrin-Binding Ligand), która polega zarówno na czasowo-przestrzennym sterowaniu procesów sygnalizacyjnych, jak również bezpośredniej implikacji tych białek w fizyczne tworzenie zewnątrzkomórkowej macierzy zębiny. Rodzinę SIBLING tworzy sześć białek, kodowanych przez geny zlokalizowane na długim ramieniu chromosomu 4q<sup>13-2</sup>: – białko sialofosforowe zębiny (DSPP), – białko sialowe kości (BSP), – białko macierzy zębinowej-1 (DMP1), – osteopontyna (OPN), – białko fosfogliokozylowe macierzy zębinowej (MEPE) oraz enamelina (ENAM). Analiza sekwencji genów kodujących białka SIBLING, pomimo różnic w strukturze pierwszorzędowej, wskazuje na wspólne pochodzenie z jednego pierwotnego genu, który w procesie ewolucji uległ powieleniu.*

properties. This paper is focused on the DSPP and DMP1 proteins, which seem to be the most important factors for dentine mineralization. It has been proved by the fact that mutations in the DSPP sequence result in a significant failure of dentine mineralization manifested by phenotype of dentinogenesis imperfecta type II and/or dentine dysplasia type II. Eventually, it leads to the early loss of both deciduous and permanent teeth. Similarly, the complete or partial lack of DMP1 expression results in disorders in dentine formation and mineralization.

Białka te charakteryzują się podobieństwem w budowie molekularnej, jednakże wykazują różne, często skrajnie odmienne właściwości biochemiczne. Tę część cyklu publikacji autorzy poświęcili białkom DSPP i DMP1, uważanym za najbardziej kluczowe dla procesu mineralizacji zębiny. Bezpośrednim dowodem potwierdzającym istotę ich funkcji jest fakt, że mutacje w sekwencji kodującej białko DSPP skutkują dramatycznym pogorszeniem stopnia mineralizacji zębiny objawiającym się fenotypem dentinogenesis imperfecta typu II i/lub dysplazją zębiny typu II, co w konsekwencji wiąże się z wczesną utratą zarówno uzębienia mlecznego, jak i stałego. Natomiast całkowity brak ekspresji DMP1, lub modyfikacje ekspresji tego genu powodują zaburzenia w procesie odontogenezy i mineralizacji zębiny.

## Dentine matrix protein 1 – DMP1

DMP1 was discovered when cloning a rat's odontoblast's library, and originally was considered as a dentine-specific protein.<sup>1</sup> Further studies demonstrated the presence of a significant content of DMP1 in bone.<sup>2,3</sup> Additionally, trace amount of DMP1 was detected in soft tissues like the liver, the brain, skeletal muscles, kidneys, the pancreas and salivary glands.<sup>4,5</sup> DMP1 consists of 451 amino acids (aa) in humans and 473aa in rats.<sup>1</sup> The aminoacid sequence of DMP1 consists of substantial amount of serine (22%), glutamic acid (15%) and aspartic acid (13%) residues, which determines the acidic nature of this protein.<sup>1</sup> The structure of DMP1 is directly related to its role in hydroxyapatite nucleation and subsequent dentine and bone mineralization.

DMP1 is present in the dentine and bone extracellular matrix (ECM) in four forms: 1) full-length protein, 2) N-terminal fragment (37kDa), 3) C-terminal fragment (57kDa) and 4) N-terminal proteoglycan at the N-terminal fragment called DMP1-PG.<sup>6,7</sup>

## Białko Macierzy Zębiny 1 – DMP1

DMP1 pierwotnie uważane było za białko specyficzne wyłącznie dla zębiny, gdyż zostało odkryte dzięki sklonowaniu cDNA pochodzącego z odontoblasta szczura<sup>1</sup>. Kolejne badania wykazały obecność znaczącej większej ilości DMP1 w tkance kostnej<sup>2,3</sup> oraz śladowe ilości DMP1 w tkankach miękkich, w tym w wątrobie, mózgu, mięśniach, nerkach, trzustce i śliniankach.<sup>4,5</sup> DMP1 jest zbudowane z 451 aminokwasów u człowieka i 473 u szczura.<sup>1</sup> W większości sekwencję aminokwasową DMP1 tworzą reszty seryny (22%), kwasu glutaminowego (15%) i kwasu asparaginowego (13%), co decyduje o kwaśnym charakterze tego białka.<sup>1</sup> Ta wiodąca obecność kwaśnych aminokwasów w strukturze DMP1 jest bezpośrednio związana z jego rolą w procesie nukleacji kryształów hydroksyapatytów oraz późniejszej mineralizacji zębiny i kości.

DMP1 zostało zidentyfikowane w macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) zębiny i kości w czterech postaciach: 1) białka o pełnej długości, 2) fragmentu N-końcowego (37kDa), 3) fragmentu C-końcowego (57kDa) oraz 4) formy

At the 74-75 position (serine-glycine) the DMP1-PG bonds the chain of glycosaminoglycan (GAG) consisting of 4-chondroitin sulfate (C4S).<sup>8,9</sup> This is a strongly conservative site in different species, which suggests that the presence of the GAG chain is critical for the biological function of DMP1-PG.<sup>8,9</sup> Some authors speculate that DMP1-PG inhibits, or significantly slows down, the mineral nucleation and dentine mineralization. Thus, at the same time it controls the rate of dentine mineralization.<sup>10</sup>

Yet, the enzyme responsible for cutting the native DMP1 into individual fragments has not been identified. *Qin* et al. attribute this role to the endopeptidase encoded by the PHEX gene.<sup>11</sup> However, *Martin* et al. claim that PHEX endopeptidase binds to DMP1 and protects the ASARM (acidicserine and aspartaterichmotif) domain from proteolysis,<sup>12</sup> since the ASARM sequence is located on the DMP1 C-terminal fragment and has inhibiting impact on mineralization.

Extensive research on proteins derived from DMP1 (37kDa, 57kDa, DMP1-PG fragments) revealed that individual fragments significantly differ in biochemical structure, which directly influences their function in the dentine extracellular matrix.<sup>11</sup> Immunohistochemical studies have shown, that N-terminal fragment is mainly present in the unmineralized predentine, while the C-terminal fragment is predominantly present in mineralized dentine.<sup>13,14</sup>

Subsequent *in vitro* studies revealed that the native full-length DMP1 and C-terminal fragment promote mineralization, while the N-terminal fragment is considered as both a promoter<sup>15</sup> and inhibitor of mineralization, which depends on the moment of dentinogenesis.<sup>16</sup> Interestingly, there is presence of C-terminal fragment in the odontoblast's nucleus, which indicates that apart from the promineralized function, this fragment also acts as a transcription factor. This is confirmed by the presence of NLS sequence

proteoglikanu fragmentu N-końcowego, który został nazwany DMP1-PG.<sup>6,7</sup>

DMP1-PG połączony jest z łańcuchem glikozaminoglikanów (GAG) zawierającym siarczan-4-chondroityny (C4S) w lokalizacji seryna-glicyna, w pozycji 74-75.<sup>8,9</sup> Jest to silnie konserwatywna sekwencja u różnych gatunków, co nasuwa przypuszczenie, iż łańcuch GAG ma kluczowe znaczenie dla biologicznej funkcji DMP1-PG.<sup>8,9</sup> Przypuszcza się, że DMP1-PG hamuje lub znacząco spowalnia proces nukleacji kryształu minerału, a w następnym minieralizację zębiny *in situ*, kontrolując tym samym tempo mineralizacji tkanki.<sup>10</sup>

Do tej pory nie zidentyfikowano enzymu odpowiedzialnego za podział natywnego DMP1 na poszczególne fragmenty. *Qin* i wsp. przypisują tę rolę endopeptydazie kodowanej przez gen *PHEX*,<sup>11</sup> jednak *Martin* i wsp. twierdzą, że endopeptydaza *PHEX* łączy się z DMP1 i chroni domenę ASARM (acidicserine and aspartaterichmotif) przed proteolizą.<sup>12</sup> Jednocześnie, ci sami autorzy wykazali, że sekwencja ASARM znajduje się na C-końcowym fragmencie białka DMP1 i ma hamujący wpływ na proces mineralizacji.

Intensywne badania nad białkami potomnymi DMP1 (fragmenty 37kDa, 57kDa, DMP1-PG) wykazały, że poszczególne fragmenty znacząco różnią się budową biochemiczną, co może bezpośrednio wpływać na funkcję, jaką pełnią w macierzy zewnątrzkomórkowej zębiny.<sup>11</sup> Badania immunohistochemiczne wykazały, że fragment N-końcowy jest zlokalizowany głównie w niezmineralizowanej przębinnie, podczas gdy fragment C-końcowy występuje przeważnie w zębinnie zmineralizowanej.<sup>13,14</sup>

Kolejne badania *in vitro* wykazały, iż macierzyste białko DMP1 o pełnej długości oraz pochodny fragment C-końcowy aktywują nukleację kryształu minerału, podczas gdy fragmentowi N-końcowemu przypisuje się zarówno rolę promotora,<sup>15</sup> jak i inhibitora procesu mineralizacji i jest to zależne od momentu dentinogenezy.<sup>16</sup>

in the C-terminal fragment of DMP1, which is responsible for the DMP1 transporting to the nucleus.<sup>17-20</sup>

*Narayanan* et al. showed that the C-terminal fragment of DMP1 directly binds to the *DSPP* promoter and thus leads the expression of the *DSPP* gene.<sup>17,18</sup> The process occurs in the early stages of odontoblast development (preodontoblast stage), while the further expression of *DSPP* is DMP1 independent.<sup>17-20</sup>

The DMP1 role in the dentine mineralization has been demonstrated with the DMP1 knock-out and transgenic mice where the complete absence or modification of DMP1 expression resulted in odontogenesis disruption and dentine hypomineralization, disrupted predentine maturation or disordered dentine tubular structure.<sup>21,22</sup>

In a more extensive immunohistochemical study *Martini* et al. compared the amount of *DSPP* and DMP1 in the decayed reparative dentine versus healthy dentine of teeth removed for orthodontic reasons.<sup>22</sup>

Authors showed the increased concentration of the proteins in decayed teeth compared to analogous location of healthy teeth.<sup>22</sup>

Based on these observations the authors suggest that odontoblasts respond to a harmful stimulus producing a protective barrier observed as a layer of highly mineralized reparative dentine showing an increased quantity of DMP1 and *DSPP*.<sup>22</sup>

Interestingly, in the sclerotic dentine the DMP1 level was significantly lower (37%) than that of *DSPP* (73%) in the examined sclerotic dentine, which raises speculations that the function of both proteins and their progeny may be different in sclerotic dentine versus primary dentine.<sup>22</sup>

The preliminary studies of *Padovano* et al. on the peptide derived from the DMP1 C-terminal fragment showed that the synthesized peptide promoted remineralization of the demineralized dentine by direct binding to the type I collagen,

Niezwyczajnie ciekawym pozostaje fakt obecności fragmentu C-końcowego w jądrze komórkowym odontoblasta, co sugeruje, że poza funkcją promineralizacyjną fragment C-końcowy białka DMP1 w trakcie dojrzewania odontoblasta pełni rolę czynnika transkrypcyjnego. Potwierdza to również obecność w C-końcowym fragmencie DMP1, sekwencji NLS (nuclearlocationsequence), która odpowiada za transport DMP1 do jądra komórkowego.<sup>17-20</sup>

Badania *Narayanan* i wsp. wykazały, iż C-końcowy fragment DMP1 inicjuje proces ekspresji genu *DSPP*, przyłączając się do jego promotora genu.<sup>17,18</sup> Proces zachodzi w początkowych stadiach rozwoju odontoblasta (etap preodontoblasta), natomiast dalsza ekspresja *DSPP* jest już niezależna od DMP1.<sup>17-20</sup>

Istotę funkcji DMP1 dla procesu mineralizacji zębiny wykazano w badaniach przeprowadzonych na myszach knock-out (z wyciszonym genem *DMP1*) oraz transgenicznym. Stwierdzono, iż całkowity brak ekspresji genu *DMP1*, lub modyfikacje ekspresji tego genu powodują zaburzenia w procesie odontogenezy i mineralizacji zębiny w postaci hipomineralizacji, zaburzeń dojrzewania przedzębiny oraz zmian w strukturze kanalikowej zębiny.<sup>21,22</sup>

Rozszerzając badania nad rolą DMP1 oraz *DSPP* dla mineralizacji zębiny, *Martini* i wsp. porównali ilość obu białek w zębinie reparacyjnej zębów zniszczonych próchnicą z ilością obu białek w zębinie zębów zdrowych, usuniętych ze wskazań ortodontycznych.<sup>22</sup> Metodą immunohistochemiczną autorzy wykazali zagęszczenie lokalizacji białek w rejonach zębiny zębów dotkniętych próchnicą, w porównaniu do analogicznych obszarów zębiny zębów zdrowych.<sup>22</sup> Na podstawie poczynionych obserwacji autorzy sugerują, iż odontoblasty w odpowiedzi na szkodliwy bodziec wytwarzają barierę ochronną w postaci silnie zmineralizowanej zębiny reparacyjnej, a zwiększona ilość białek DMP1 oraz *DSPP* zapewnia bezpośredni wzrost stopnia mineralizacji nowopowstałej

exposure of acidic prosthetic groups, and thus subsequent stimulation of crystal nucleation.<sup>23</sup> These studies are still continued for the purpose of creating a new biomaterial, which can be used for demineralized dentine therapy.

### Dentine Sialophosphoprotein – DSPP

The DSPP protein has been identified as a dentine-specific marker since it is expressed in dentine at a 400-fold higher level than at any other tissue.<sup>24</sup> It is built of 1301 aminoacids in humans and has an isoelectric point  $pI = 3.4$ .<sup>40,41</sup> During post-translational modification DSPP is subdivided into three active proteins: dentine sialoprotein (DSP), formed from a N-terminal fragment of native DSPP, dentine phosphoprotein (DPP) as a C-terminal fragment of native DSPP, and proteoglycan form (DGP) whose sequence is contained between those of DSP and DPP.<sup>6,7</sup>

Despite the common origin, DSP and DPP have different biochemical properties and thus different biological functions.<sup>27</sup> In the mineralized dentine, the level of DPP vs. DSP is 10:1, which might indicate that DSP is faster degraded in the dentine extracellular matrix.<sup>27</sup> Both the DSP and DPP are bulky in the dentine extracellular matrix, while the inactive form of native DSPP was identified there only in a trace amount.<sup>28</sup> Huang et al. have demonstrated that similarly to the fragments originated from the native DMP1, the DSP and DPP are present in a different area of the predentine/dentine complex: while the DSP is localized mainly in predentine, the DPP is present in the mineralized dentine.<sup>6,7</sup>

### Dentine Sialoprotein (DSP)

DSP was discovered by Butler and coworkers in 1981. It is the second most abundant non-collagenous protein in dentine (5-8%).<sup>29</sup> DSP was also found in the proteoglycan form containing the 6-chondroitin sulphate sugar

zębiny reparacyjnej.<sup>22</sup> Uwagę należy również zwrócić na fakt, iż poziom DMP1 był zdecydowanie niższy (37%) w porównaniu do DSPP (73%) w badanej zębiny sklerotycznej, co rodzi spekulacje, iż funkcja obu białek i ich produktów potomnych może być odmienna w zębiny sklerotycznej *versus* zębina pierwotna.<sup>22</sup>

Z wstępnych wyników badań *Padovano* i wsp. dotyczących peptydu, będącego pochodną C-końcowego fragmentu DMP1 wynika, że zsyntetyzowany peptyd wykazywał właściwości promujące remineralizację zdeminiarowanej zębiny, poprzez przyłączanie się do włókien kolagenu typu I, ekspozycję kwaśnych grup prostetycznych i następczą stymulację nukleacji kryształu minerału.<sup>23</sup> Badania te są kontynuowane celem stworzenia biomateriału mogącego posłużyć do leczenia zdeminiarowanej zębiny.

### Białko sialofosforowe zębiny – DSPP

Białko DSPP uznane zostało za marker specyficzny dla zębiny, gdyż ulega ekspresji w zębiny na poziomie około 400-krotnie wyższym, niż w jakiegokolwiek innej tkance.<sup>24</sup> U ludzi jest ono zbudowane z 1301 aminokwasów, a jego punkt izoelektryczny ocenia się na  $pI=3,4$ .<sup>40,41</sup> W wyniku modyfikacji potranslacyjnych DSPP ulega podziałowi na trzy aktywne biologicznie białka potomne: – białko sialowe zębiny (DSP) stanowiące N-końcowy fragment natywnego DSPP, – białko fosforowe zębiny (DPP) stanowiące C-końcowy fragment natywnego DSPP oraz – forma proteoglikanu (DGP), którego sekwencja zawarta jest w części sekwencji pośredniej pomiędzy DSP i DPP.<sup>6,7</sup>

Pomimo wspólnego pochodzenia od jednego białka macierzystego, DSP i DPP mają odmienne właściwości biochemiczne, a w konsekwencji również odmienne funkcje.<sup>27</sup> W zminiaryzowanej zębiny stosunek DPP do DSP wynosi 10:1, co świadczy o szybszej degradacji DSP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej.<sup>27</sup> Zarówno DSP, jak i DPP występują obficie

chain.<sup>30,31</sup> 26.9% of the DSP's residues are carbohydrate and 9% is composed of the sialic acid, glutamine, asparagine, serine and glycine.<sup>30,31</sup>

Generally biochemical properties of DSP are slightly similar to other SIBLING sialoproteins like BSP, DMP1, OPN.

Immunohistochemical studies have shown the presence of the DSP in odontoblasts, predentine and dentine,<sup>30</sup> and the highest DSP content was recorded in predentine. It is likely that the immunohistochemical detection of DSP in odontoblasts might result from the interaction of the anti-DSP antibody with the sequence of a native DSPP at its DSP fragment but not separated DSP.

Right after synthesis and posttranslational modification, the native DSPP is secreted out via Tome's process of the odontoblast into its surrounding milieu at the mineralization front and is cut into two daughter proteins DSP and DPP.<sup>33</sup> BMP-1 (bone morphogenic protein 1) and MEP1A (endopeptidase 2) are speculated to be responsible for the division.<sup>33-35</sup> Then, DSP and DSP-PG become degraded with MMP 20 (metalloproteinase 20); however, the mechanism of DPP degradation *in vivo* is not known yet except observation by *Tsuchiya* et al. who proved that the MEP1B degrades DPP proportionally to falling  $Ca^{2+}$  concentration.<sup>34</sup>

The accumulation of DSP in predentine is directly associated with its function. *Suzuki* et al. showed that dentine sialoprotein only initiates the mineralization process,<sup>36</sup> while later on the role of DSP is very limited.<sup>37</sup> Thus, it is conceivable that DSP is a regulatory protein which regulates very early stages of dentinogenesis,<sup>37</sup> but does not participate in dentine maturation.<sup>36</sup> Such observations are confirmed by the fact that DSP is not present except the narrow zone adjacent to the Tome's fiber.<sup>38</sup> Interestingly, several studies reported the temporary presence of DSP in immature preameloblasts,<sup>39,40</sup> which suggests the

w macierzy zewnątrzkomórkowej odontoblasta, podczas gdy nieaktywna forma natywnego DSPP została wykryta jedynie w śladowej ilości.<sup>28</sup> *Huang* i wsp. wykazali, że podobnie jak fragmenty potomne białka DMP1, białka DSP i DPP są obecne w odmiennych obszarach kompleksu przęzbina/zęzbina. DSP znajduje się głównie w przęzbini, a DPP w zmineralizowanej zęzbini.<sup>6,7</sup>

### Białko sialowe zębiny – DSP

DSP, które stanowi 5-8% niekolagenowych białek zębiny, zostało odkryte przez *Butlera* i wsp. w 1981 roku. Jest drugim najczęściej występującym niekolagenowym białkiem zębiny.<sup>29</sup> Występuje również w formie proteoglikanu, a jego łańcuch cukrowy zawiera siarczan-6-chondroityny.<sup>30,31</sup> DSP zawiera 26,9% reszt węglowodanowych i 9% kwasu sialowego oraz glutaminę, asparaginę, serynę i glicynę.<sup>30,31</sup> Ogólne właściwości DSP są w nieznanym stopniu podobne do innych białek sialowych rodziny SIBLING, w tym BSP, DMP1, OPN.

Badania immunohistochemiczne wykazały obecność DSP w odontoblastach, przęzbini i zęzbini,<sup>30</sup> z czego największą ilość DSP odnotowano w przęzbini. Immunohistochemiczna identyfikacja świadcząca o obecności DSP w odontoblastach jest w znamienitej części efektem przyłączenia przeciwciała przeciwko DSP do natywnej cząsteczki DSPP, zawierającej sekwencję DSP, a nie do wybiórczej cząsteczki potomnej DSP. Uważa się bowiem, że bezpośrednio po translacji i modyfikacjach potranslacyjnych cząsteczka DSPP jest wydzielana przez włókno Tomesa do przestrzeni zewnątrzkomórkowej odontoblasta na tzw. froncie mineralizacji, gdzie ulega podziałowi na dwa białka potomne DSP i DPP.<sup>33</sup>

Bezpośrednio po syntezie, w ramach modyfikacji potranslacyjnych natywne DSPP ulega podziałowi na DSP, DSP-PG oraz DPP. Za podział odpowiedzialne są enzymy BMP-1

participation of DSP in amelogenesis and/or enamel-dentine junction formation.<sup>8</sup> The trace amounts of DSP were also observed in the root cementum, alveolar bone, long bones and soft tissues,<sup>4</sup> but the role of DSP in these tissues has not been recognized yet.

Mutations in its sequence result in decrease of dentine mineralization described as *dentinogenesis imperfecta* type II.

### Dentine phosphoprotein – DPP

DPP represents about 50% of the dentine non-collagen proteins and also is the most bulky protein (next to type I collagen), found in the dentine organic matrix.<sup>41</sup> DPP consists of 839 amino acids and is the most acidic protein detected in humans.<sup>42</sup> The DPP's biochemical properties are the result of large quantities of serine residues (about 310) and aspartic acid (about 155).<sup>27</sup> The isoelectric point for the DPP was estimated at pI = 1.1.<sup>42</sup> Authors who postulate the intracellular division of the native DSP have suggested that the DPP is secreted by the odontoblast's processes directly at the mineralization front, which means the area of the transition of predentine into dentine.<sup>30,32,43</sup> During odontoblast's commitment and dentine formation, the level of DPP increases and is maintained in the dentine matrix at a high level.<sup>44</sup>

The DPP is polyanionic due to its acidic properties, which means it has a strong affinity to Ca<sup>2+</sup>, which is reflected in promotion of mineral crystal nucleation and growth.<sup>45</sup>

The spatial structure of the DPP resembles a ribbon with the peptide core and outwardly, two parallel rows of phosphate residues.<sup>46</sup> Milan et al. demonstrated *in vitro* that the DPP initiates the mineralization process only after its direct binding to the collagen fibers, whereas without interaction with the collagen DPP inhibits mineralization.<sup>47</sup> The connection comes through the binding of hydrophobic domains in the DPP sequence

(białko morfogeniczne kości 1) oraz MEP1A (endopeptydaza 2).<sup>33-35</sup> Kolejno, DSP oraz DSP-PG ulegają degradacji z udziałem MMP 20 (metaloproteinaza 20), natomiast mechanizm rozpadu DPP *in vivo* nie został jeszcze poznany, z wyjątkiem obserwacji Tsuchiya i wsp., którzy udowodnili, iż MEP1B przystępuje do degradacji DPP proporcjonalnie do spadającego w otaczającym milieu stężenia wolnych jonów wapnia.<sup>34</sup>

Nagromadzenie białka DSP w przębinie jest bezpośrednio związane z jej funkcją. Badania Suzuki i wsp., dowodzą, że białko sialowe zębiny inicjuje proces mineralizacji zębiny,<sup>36</sup> podczas gdy w późniejszym etapie dentinogenezy DSP ma jedynie ograniczony wpływ na formowanie i wzrost kryształów hydroksyapatytów.<sup>37</sup> Uważa się, że DSP pełni zatem rolę białka regulatorowego inicjując proces dentinogenezy na bardzo wczesnym etapie rozwoju,<sup>37</sup> nie uczestniczy natomiast w procesie dojrzewania zębiny.<sup>36</sup> Ten schemat aktywności DSP potwierdzają obserwacje braku obecności DSP w zębinie zmineralizowanej z wyjątkiem wąskiej strefy graniczącej bezpośrednio z włóknem Tomesa.<sup>38</sup> Ciekawe wydają się również doniesienia o tymczasowej obecności DSP w niedojrzałych preameloblastach,<sup>39,40</sup> co sugeruje możliwość udziału DSP w procesie amelogenezy i/lub tworzenia połączenia szkliwno-zębinowego.<sup>8</sup> Dodatkowo, śladowe ilości DSP wykazano w cemencie korzeniowym, kości wyrostka zębodołowego, kościach długich, a także tkankach miękkich,<sup>4</sup> jednak funkcja DSP w tych tkankach nie została jak dotąd zdefiniowana.

Mutacje w sekwencji kodującej białko sialowe zębiny skutkują spadkiem stopnia jej mineralizacji, a także powstawaniem fenotypu *dentinogenesis imperfecta* typu II.

### Białko fosforowe zębiny – DPP

Stanowi około 50% białek niekolagenowych zębiny i jest po kolagienie typu I białkiem

to the hydrophobic internal domains of the collagen.<sup>48</sup> Consequently, a three-dimensional protein is formed where the Ca<sup>2+</sup> ions are attached to the acidic domains, and thus the crystal nucleation is initiated. However, more sophisticated research has shown that DPP's effect on dentine mineralization is not clear, and depends on the protein concentration *in situ*.<sup>50</sup> It turned out that low concentrations of the DPP promote mineralization process, while its too high concentration slows the growth of hydroxyapatite crystals in this way modulating the crystal shape and size.<sup>50</sup> It proves that the fluctuating changes in the DPP expression specifically "control" the progress of dentine mineralization preventing dentine from "over-hardening".<sup>36</sup> The importance of the DPP's role for dentine mineralization is confirmed by the fact that mutations in sequence encoding *DSPP* result in developmental defects of dentine visible as type II dentine dysplasia and/or *dentinogenesis imperfecta* type II.<sup>51-53</sup>

## Conclusion

Lots of data indicate that the DSPP and its daughter proteins the DSP and DPP are the most important proteins for the proper dentine development and mineralization. That confirms the phenotype of *dentinogenesis imperfecta* type II and/or dentine dysplasia type II, observed as a result of mutations which occur in the *DSPP* sequence.

The DMP1 protein is also important for the proper dentine mineralization. This protein plays the double role of an activator and inhibitor of dentine mineralization, and also a transcription factor that positively regulates *DSPP* gene expression.

Specifically differentiated profile of DSPP and DMP1 expression and localization during dentine formation allows for the precise coordination of dentinogenesis.

najobficiej występującym w organicznej macierzy zębiny.<sup>41</sup> DPP jest zbudowane z 839 aminokwasów i jest najbardziej kwaśnym poznanym białkiem ludzkiego organizmu.<sup>42</sup> Właściwości biochemiczne DPP wynikają z wysokiej zawartości reszt seryny (ok. 310) i kwasu asparaginowego (ok. 155).<sup>27</sup> Punkt izoelektryczny dla DPP oceniono na pI=1,1.<sup>42</sup> Autorzy uznający teorię wewnątrzkomórkowego podziału natywnego białka DSPP sugerują, że DPP jest wydzielane przez wypustki odontoblastów bezpośrednio na froncie mineralizacji tj. w okolicy przejścia przezębiny w zębinę.<sup>30,32,43</sup> W trakcie rozwoju i dojrzewania odontoblastów poziom ekspresji *DPP* wzrasta i jest utrzymywany na stałym wysokim poziomie w macierzy zębiny.<sup>44</sup>

Białko DPP dzięki swojej silnej kwaśności jest polianionowe, co oznacza, że ma duże powinowactwo do wiązania jonów wapnia, sprzyjając tym samym nukleacji minerału i dalszemu wzrostowi kryształu.<sup>45</sup>

Struktura przestrzenna DPP kształtem przypomina wstęgę, gdzie peptyd tworzy rdzeń, na zewnątrz którego skierowane są równoległe dwa rzędy reszt fosforanowych.<sup>46</sup> Milan i wsp. w badaniach *in vitro* wykazali, że DPP inicjuje proces mineralizacji jedynie po bezpośrednim związaniu z włóknami kolagenu, natomiast brak interakcji z kolagenem sprawia, że DPP mineralizację hamuje.<sup>47</sup> Do połączenia dochodzi poprzez związanie hydrofobowych domen w sekwencji DPP z hydrofobowymi domenami struktury wewnętrznej kolagenu.<sup>48</sup> W konsekwencji powstaje trójwymiarowa struktura reszt fosforanowych i karboksylowych, co po przyłączeniu w tych domenach jonów wapnia obecnych w środowisku, zapoczątkowuje nukleację i wzrost kryształów minerału.<sup>49</sup> Bardziej szczegółowe badania wykazały, że wpływ DPP na mineralizację zębiny nie jest jednoznaczny i zależy od stężenia białka *in situ*.<sup>50</sup> Okazało się, że w niskich stężeniach DPP sprzyja mineralizacji, podczas gdy jego zbyt



duże stężenie spowalnia wzrost kryształów hydroksyapatytu, modulując tym samym ich kształt i wielkość.<sup>50</sup> Dowodzi to, iż fluktuacyjne zmiany poziomu stężenia białka DPP swoiście „kontrolują” postęp procesu mineralizacji zębiny, zapobiegając jej nadmiernemu twardnieniu.<sup>36</sup> Bezpośrednim dowodem na znaczenie roli DPP dla mineralizacji zębiny jest fakt, iż mutacje w obrębie sekwencji genu kodującego białko DSPP, skutkują powstawaniem wad rozwojowych w postaci dysplazji zębiny typu II i/lub *dentinogenesis imperfecta* typu II.<sup>51-53</sup>

## Podsumowanie

Liczne dane wskazują, że białko DSPP oraz jego potomne DSP i DPP są najbardziej

istotnymi białkami dla prawidłowego przebiegu procesu mineralizacji zębiny. Potwierdzają to obserwacje fenotypu powstającego w wyniku mutacji w obrębie sekwencji genu *DSPP*, które skutkują powstawaniem wad rozwojowych opisanych jako dysplazja zębiny typu II i/lub *dentinogenesis imperfecta* typu II.

Równie istotnym dla prawidłowego przebiegu procesu mineralizacji zębiny wydaje się białko DMP1, które pełni zarówno rolę aktywatora, jak i inhibitora procesu mineralizacji zębiny, a także jest czynnikiem transkrypcyjnym inicjującym ekspresję *DSPP*.

Zróżnicowany profil poziomu ekspresji i lokalizacji białek DSPP i DMP1 w trakcie tworzenia zębiny pozwala na precyzyjną koordynację przebiegu dentinogenezy.

## References / Piśmiennictwo

1. George A, Sabsay B, Simonian PA, Veis A: Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *J Biol Chem* 1993; 268: 12624-12630.
2. Hirst KL, Ibaraki-O'Connor K, Dixon MJ: Cloning and expression analysis of the bovine dentin matrix acidic phosphoprotein gene. *J Dent Res* 1997; 76: 754-760.
3. MacDougall M, Gu TT, Luan X, Simmons D, Chen J: Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein 1: spatial expression in mineralized tissues. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 422-431.
4. Ogburke KU, Fisher LW: Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in salivary glands. *J Dent Res* 2004; 83: 664-670.
5. Prasad M, Zhu Q, Sun Y, Wan X, Kulkarni A, Boskey A, Feng JQ, Qin C: Expression in dentin sialophosphoprotein in non-mineralized tissues. *J Histochem Cytochem* 2011; 59: 1009-1021.
6. Huang B, Sun Y, Maciejewska I, Qin D, Peng T, McIntyre B, Wygant J, Butler WT, Qin C: Distribution of Sibling Proteins in the Organic and Inorganic Phases of Rat Dentin and Bone. *Eur J Oral Sci* 2008; 116(2): 104-112.
7. Huang B, Maciejewska I, Sun Y, Peng T, Qin D, Lu Y, Bonewald L, Butler WT, Feng J, Qin C: Identification of Full-Length Dentin Matrix Protein 1 in Dentin and Bone. *Calcif Tissue Int* 2008; 82(5): 401-310.
8. Qin C, Baba O, Butler WT: Post-Translational Modifications of Sibling Proteins and Their Roles in Osteogenesis and Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 3: 126-136.
9. Qin C, Brunn JC, Cook RC, Orkiszewski RS, Malone JP, Veis A, Butler WT: Evidence for the Proteolytic Processing of Dentin Matrix Protein 1. Identification and Characterization of Processed Fragments and Cleavage Sites. *J Biol Chem* 2003; 278: 34700-8.
10. Gericke A, Qin C, Sun Y, Redfern R, Redfern T, Fujimoto Y, Taleb H, Butler WT, Boskey AL:

- Different forms of DMP1 play distinct roles in mineralization. *J Dent Res* 2010; 89: 355-359.
11. Qin C, Huang B, Wygant JN, McIntyre BW, McDonald CH, Cook RG, Butler WT: A chondroitin sulfate chain attached to the bone dentin matrix protein 1 NH2-terminal fragment. *J Biol Chem* 2006; 281: 8034-8040.
  12. Martin A, David V, Laurence JS, Schwarz PM, Lafer M, Hedge A-M, Rowe PSN: Degradation of MEPE, DMP1 and release of SIBLING ASARM-peptides (minhibins): ASARM-peptide(s) are directly responsible for defective mineralization in HYP. *Endocrinology* 2008; 149: 1757-1772.
  13. Maciejewska I, Cowan C, Svoboda K, Butler WT, D'Souza R, Qin C: NH2-terminal and COOH-terminal fragments of dentin matrix protein 1(DMP1) localize differently in the compartments of dentin and growth plate of bone. *J Histochem Cytochem* 2009a; 57: 155-166.
  14. Maciejewska I, Qin D, Huang B, Sun Y, Mues G, Svoboda K, Bonewald L, Butler WT, Feng IQ, Qin C: Distinct compartmentalization of dentin matrix protein 1 fragments in mineralized tissues and cells. *Cell Tissues Organs*. 2009b; 189: 186-191.
  15. Gajjerman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A: Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J Biol Chem* 2007; 282: 1193-1204.
  16. Gericke A, Qin C, Sun Y, Redfern R, Redfern T, Fujimoto Y, Taleb H, Butler WT, Boskey AL: Different forms of DMP1 play distinct roles in mineralization. *J Dent Res* 2010; 89: 355-359.
  17. Narayanan K, Ramachandran A, Hao J, He G, Park KW, Cho M, George A: Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca<sup>2+</sup> store. *J Biol Chem* 2003; 278: 17500-17508.
  18. Narayanan K, Gajjerman S, Ramachandran A, Hao J, George A: Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *J Biol Chem* 2006; 281: 19064-19071.
  19. Lu Y, Ye L, Yu S, Zhang S, Xie Y, McKee MD, Li YC, Kong J, Eick JD, Dallas SL, Feng JQ: Rescue of Odontogenesis in Dmp1-Deficient Mice by Targeted Re-Expression of Dmp1 Reveals Roles for Dmp1 in Early Odontogenesis and Dentin Apposition in Vivo. *Dev Biol* 2007; 303(1): 191-201.
  20. Silvent J, Sire J-Y, Delgado S: The dentin matrix acidic phosphoprotein 1(DMP1) in the light of mammalian evolution. *J Mol Evol* 2013; 76: 59-70.
  21. Ye L, M MacDougall, S Zhang, Y Xie, J Zhang, Z Li, Y Lu, Y Mishina, JQ Feng: Deletion of Dentin Matrix Protein-1 Leads to a Partial Failure of Maturation of Predentin into Dentin, Hypomineralization, and Expanded Cavities of Pulp and Root Canal During Postnatal Tooth Development. *J Biol Chem* 2004; 279: 19141-8.
  22. Martini D, A Trire, L Breschi, A Mazzoni, G Teti, M Falconi, A Ruggeri Jr: Dentin Matrix Protein 1 and Dentin Sialophosphoprotein in Human Sound and Carious Teeth: An Immunohistochemical and Colorimetric Assay. *Eur J Histochem* 2013; 57(4): E32.
  23. Padovano JD, S Ravindran, PT Snee, A Ramachandran, AK Bedran-Russo, A George: Dmp1-Derived Peptides Promote Remineralization of Human Dentin. *J Dent Res* 2015; 94(4): 608-614.
  24. 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.
  25. Jain A, Karadag A, Fisher LW, Fedarko NS: Structural requirements for bone sialoprotein binding and modulation of matrix metalloproteinase-2. *Biochemistry* 2009; 47: 10162-10170.

26. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Fisher LW: Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *FASED J* 2004; 18: 734-736.
27. Prasad M, Butler WT, Qin C: Dentin Sialophosphoprotein in Biomineralization. *Connect Tissue Res* 2010; 51: 404-417.
28. Sun Y, Lu Y, Chen S, Prasad M, Wang X, Zhu Q, Zhang J, Ball H, Feng J, Butler WT, Qin C: Key proteolytic cleavage site and full-length form of DSPP. *J Dent Res* 2010; 85: 498-503.
29. Yamakoshi Y, Lu Y, Hu JC, Kim J, Iwata T, Kobayashi K, Nagano T, Yamakoshi F, Hu Y, Fukae M, Simmer JP: Porcine dentin sialophosphoprotein length polymorphisms, glycosylation, phosphorylation and stability. *J Biol Chem* 2008; 283: 14835-14844.
30. Yamakoshi Y: Dentin sialophosphoprotein (DSPP) and dentin. *J Oral Biosci* 2008; 50(1): 33-44.
31. Butler WT, Bhowm M, Brunn JC, D'Souza RN, Farach-Carson MC, Happonen RP, Schrohenloher RE, Seyer JM, Someman MJ, Foster PA, et al.: Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDal dentin sialoprotein (DSP). *Matrix* 1992; 12(5): 343-351.
32. Weinstock M, Leblond CP: Radioautographic visualization of the deposition of a phosphoprotein at the mineralization front in the dentin of the rat incisors. *J Cell Biol* 1973; 56: 838-845.
33. Steiglitz BM, Ayala M, Narayanan K, George A, Greenspan DS: Bone morphogenetic protein-1\ Tolloid- like proteinases process dentin matrix protein- 1. *J Biol Chem* 2004; 279: 980-986.
34. Tsuchiya S, Simmer J, Hu JC, Richardson AS, Yamakoshi F, Yamakoshi Y: Astacin proteases cleave dentin sialophosphoprotein (Dsp) to generate dentin phosphoprotein (Dpp). *J Bone Miner Res* 2011; 26(1): 220-228.
35. Yamakoshi Y: Dentinogenesis and dentin sialophosphoprotein (DSPP). *J Oral Biosci* 2009; 51(3): 134.
36. Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Muller R, Goldberg M, Kulkari AB: Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol* 2009; 28: 221-229.
37. Boskey AL, Spevak M, Tan S, Doty B, Butler WT: Dentin Sialoprotein (Dsp) Has Limited Effects on in Vitro Apatite Formation and Growth. *Calcif Tissue Int* 2000; 67: 472-478.
38. Butler WT, Ritchie H: The Nature and Functional Significance of Dentin Extracellular Matrix Proteins. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 169-179.
39. Bronckers AL, D'Souza RN, Butler WT, Lyaruu DM, van Dijk S, Gay S, Woltgens JH: Dentin sialoprotein: biosynthesis and developmental appearance in rat tooth germs in comparison with amelogenins, osteocalcin and collagen type I. *Cell and Tissue Res* 1993; 272: 237-247m.
40. D'Souza RN, Bachman T, Bumgardner KM, Butler WT, Litz M: Characterisation of cellular responses involved in reparative dentinogenesis. *J Dent Res* 1995; 74: 702-709.
41. Dickinson IR, Dimuzo MT, Volpin D, Ananthanarayanan S, Veis A: The extraction of phosphoproteins from bovine dentin. *Calcif Tissue Res* 1975; 19(1): 51-61.
42. Jonsson M, Fredriksson S: Isoelectric focusing of the phosphoprotein of rat incisor dentin in ampholine and acid pH gradients. Evidence for carrier amphocyte- protein complex. *J Chromat* 1978; 157: 234-242.
43. MacDougall M, Zeichner-David M, Slavkin HC: Production and characterization of antibodies against murine dentin phosphoprotein. *Biochem J* 1985; 232: 493-500.
44. Hao J, Zou B, Nayaranan K, George A: Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation. *Bone* 2004; 34: 921-932.

45. *Zanetti M, de Bernard- Jontell M, Linde A*: Ca<sup>2+</sup> binding studies of phosphoprotein from rat-incisor dentin. *Eur J Biochem* 1981; 113: 541-545.
46. *Zhu Q, Sun Y, Prasad M, Wang X, Yamoah AK, Li Y*: Glycosaminoglycans chain of dentin sialoprotein proteoglycan. *J Dent Res* 2010; 89: 808-812.
47. *Milan AM, Sugars RV, Embery G, Waddington RJ*: Modulation of collagen fibrillogenesis by dentinal proteoglycans. *Calcif Tissue Int* 2005; 76: 127-135.
48. *Boskey AL*: Biomineralization: An Overview. *Connect Tissue Res* 2003; 44: 5-9.
49. *Stetler-Stevenson WG, Veis A*: Type I collagen shows a specific binding affinity for bovine dentin phosphoryn. *Calcif Tissue Int* 1996; 38: 135-141.
50. *Butler WT, Brunn JC, Qin C*: Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 2003; 44 Suppl 1: 171-178.
51. *Maciejewska I, Chomik E*: Hereditary Dentine Diseases Resulting from Mutations in Dspp Gene. *J Dent* 2012; 40(7): 542-548.
52. *McKnight DA, Simmer JP, Hart PS, Hart TC, Fisher LW*: Overlapping DSPP mutations cause dentin dysplasia and dentinogenesis imperfecta. *J Dent Res* 2008a; 87: 1108-1111.
53. *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 human DSPP gene. *Hum Mutat* 2008b; 29: 1392-1404.

Zaakceptowano do druku: 3.07.2017 r.

Adres autorów: 80-208 Gdańsk, ul. E. Orzeszkowej 18.

© Zarząd Główny PTS 2017.