

Dr. rer. nat. Heike Hess

Dr. med. dent.

## **Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung und Genetik verschiedener Amelogenesis imperfecta Typen**

Geboren am 20.03.1967 in Worms

Reifeprüfung am 05.06.1986

Studiengang der Fachrichtung Zahnmedizin vom WS 1995 bis WS 2001

Physikum am 01.10.1997 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 19.12.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Mund-Zahn-Kieferheilkunde

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Martin Jean Koch

Die vorliegende Studie sollte einen Beitrag zum Verständnis genetischer dentaler Mineralisationsstörungen leisten, insbesondere der Entstehung der Amelogenesis imperfecta (AI). Der Begriff "Amelogenesis imperfecta" bedeutet wörtlich "fehlerhafte Schmelzbildung" und betrifft in der Regel alle Zähne beider Dentitionen. Klinisch zeichnet sich der anomale Schmelz durch verminderte Härte, Absplitterung unter Kaubelastung und Diskolorationen aus. Der Leidensdruck der Patienten ist mitunter erheblich. Die AI wird phänomenologisch in vier Hauptgruppen eingeteilt, wobei die diagnostischen Kriterien nicht in jedem Fall eindeutig sind. Anwendungsbezogen sollte deshalb untersucht werden, ob sich die verschiedenen Formen der AI mit unterschiedlichen Proteinprofilen assoziieren lassen. Läßt sich ggf. die unterschiedliche Proteomik mit der bestehenden Klassifizierung in Einklang bringen und kann sie damit zur Diagnosesicherung der AI verwendet werden? Als "Proteom" wird hierbei die quantitative Darstellung des gesamten Proteinexpressionsmusters des anomalen Schmelzes bezeichnet. Normaler Schmelz weist einen sehr geringen Proteingehalt auf (typischerweise um 0.4 %), sodaß

die Proteine in den Schmelzstrukturanomalien quasi vor einem "Null-Hintergrund" analysiert werden können.

Das untersuchte Kollektiv setzt sich aus fünf Jungen und sechs Mädchen zusammen (s. Tab. 3.1 - 3.3). Darunter waren sieben Patienten mit einer Amelogenesis imperfecta (AI) Typ 2 (Tab. 3.1) bzw. zwei Patienten mit einer AI Typ III oder IV (Tab. 3.2 - 3.3). Bei den Patienten Sv. G./Sa. G., A. S./St. G., B. K./V. K. und L. F./S. F. handelt es sich um Geschwisterpaare. Das Durchschnittsalter der Probanden lag bei ihrer Erstvorstellung bei 9.1 Jahren (Median 8 Jahre), bei der ersten Überkronung bei 10.4 Jahre (Median 10 Jahre).

Die Problematik genetischer dentaler Mineralisationsstörungen wurde methodisch von vier verschiedenen Gesichtspunkten aus beleuchtet:

- 1.) Zur vergleichenden Proteomanalytik wurden Schmelzproben von AI Typ II, III und IV gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinprofile miteinander verglichen.
- 2.) Die verschiedenen Proteome wurden auch immunologisch durch Western-Blots analysiert.
- 3.) Massenspektroskopische Untersuchungen erlaubten die Identifizierung aminoterminaler Ameloblastin-Fragmente, die charakteristisch für das AI Typ IV-Proteom waren.
- 4.) Dieses Resultat implizierte eine mögliche Rolle von Ameloblastin in der Pathogenese der AI Typ IV, woraufhin eine DNA-Sequenzanalyse des Ameloblastingens eines betroffenen Patienten angefertigt wurde.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden folgende, wesentliche Ergebnisse erhalten:

1. Die AI-Proteome waren komplex und wiesen Polypeptide im Bereich von 250 - 5 kD auf.
2. Probanden, die an demselben Typ der AI erkrankt waren, zeigten nahezu identische Proteome.
3. Zur Durchführung eines intraindividuellen Proteomvergleichs wurden Schmelzproben verschiedener AI Typ II - Zähne, die ihrerseits jeweils Zahngruppen desselben Patienten repräsentierten, untersucht. Es wurden dabei keine signifikanten intraindividuellen

Unterschiede zwischen den komplexen Proteomen verschiedener permanenter AI Typ II - Zähne festgestellt.

4. Ein intertypischer Proteomvergleich offenbarte große Ähnlichkeit zwischen den Proteinprofilen von AI Typ II und III, aber Diskrepanzen zur AI Typ IV.
5. Das AI Typ IV Proteom unterschied sich von anderen Proteomen durch einen erhöhten Proteingehalt und ein vermehrtes Auftreten niedermolekularer Polypeptide im Bereich von 5 kD.
6. Der überwiegende Anteil der AI-Proteome wurde immunologisch als Albumin und dessen Degradationsprodukte identifiziert. Der Nachweis von Albumin in allen AI-Schmelzproben ist im hohen Maße konsistent mit der ubiquitären Präsenz der Plaque, aus der evt. das Albumin stammen könnte, und erklärt ebenso die große intertypische Ähnlichkeit der AI Typ II, III und IV Proteome.
7. Folglich ist auch eine proteomische Klassifizierung der AI-Typen nicht sinnvoll. Lediglich zur Sicherung der Diagnose einer AI Typ IV könnte das Proteinprofil herangezogen werden.
8. Das Sauerstoff-transportierende Hämoglobin kann immunologisch in zwei von sechs untersuchten AI Typ II sowie in sämtlichen Typ III und IV Proteomen nachgewiesen werden. Hämoglobin scheidet somit als Marker für die Differenzierung von AI-Typen aus.
9. Das Hauptschmelzmatrix-Protein Amelogenin ist nicht in den AI Typ II und III Proteomen immunologisch detektierbar. Auch sein Nachweis in Form von Multimeren im AI Typ IV Proteinverband ist nicht vollständig sicher.
10. Zwei der Typ IV spezifischen Peptide konnten massenspektroskopisch als aminoterminaler Ameloblastin-Fragmente, einem endogenen Bestandteil der extrazellulären Schmelzmatrix, identifiziert werden. Außerdem machte ein AI-ähnlicher Phänotyp einer Ameloblastin überexprimierenden transgenen Maus sowie seine chromosomale Lokalisation im *AIH2*-Locus (Chromosom 4q21) Ameloblastin zu einem wichtigen Kandidaten für autosomal dominante Formen der Amelogenesis imperfecta.
11. Durch eine DNA-Sequenzanalyse konnte eine Mutation des Ameloblastingens eines Patienten mit autosomal dominanter Amelogenesis imperfecta Typ IV A (Taurodontismus) ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der AI-Proteomanalyse sowie ihre immunologische Charakterisierung wurden anderen publizierten Schmelzmatrix- sowie AI-Proteinspektren gegenübergestellt.

Gemeinsamkeiten und kontrastierende Resultate wurden herausgearbeitet. Es ergaben sich Diskrepanzen im Hinblick auf den Nachweis von Albumin als ein Hauptbestandteil des AI-Proteoms und dem weitgehenden Fehlen von Amelogenin. Die Proteomik des Zahnschmelzes ist nach den vorliegenden Untersuchungen eine wesentliche Option in der weiteren Erforschung genetisch bedingter Schmelzstrukturanomalien.

Nach Abschluß der Experimente fanden Dong und Mitarbeiter, daß die AI des Typ IVB durch eine Mutation im *DLX3*-Gen verursacht wird (Dong et al., 2005). Diese Publikation ist konsistent mit den Befunden der vorliegenden Arbeit, daß einer autosomal dominanten Amelogenesis imperfecta Typ IV A (Taurodontismus) keine Mutation im Ameloblastingen zugrunde liegt (s. Pkt. 11). Die Analyse des *DLX3*-Gens des hier untersuchten AI Typ IVA-Patienten T. F. wäre eine besonders interessante Fortsetzung dieser Dissertation.