

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



Strukturní proteiny uplatňující se v procesu mineralizace zubních tkání savců

Bakalářská práce
Jiří Vymětal

školitel:

RNDr. Jiří Vondrášek, CSc.

Akademie věd České republiky

Ústav organické chemie a biochemie

Centrum biomolekul a komplexních molekulových systémů



Praha 2007

Charles University in Prague
Faculty of Science
Department of Genetics and Microbiology



Structural proteins involved in mineralisation of dental tissues of mammals

Bachelor thesis
Jiří Vymětal

Advisor:

RNDr. Jiří Vondrášek, CSc.

Academy of Sciences of the Czech Republic
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
Center for Biomolecules and Complex Molecular Systems



Prague 2007

Prohlašuji, že tuto práci jsem vypracoval samostatně, s použitím řádně citované literatury a pod vedením svého školitele RNDr. Jiřího Vondráška, CSc.

Jiří Vymětal

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli Dr. J. Vondráškovi, pod jehož vedením tato práce vznikla, za jeho cenné rady a konzultace. Děkuji Dr. I. Slabému, prof. P. Lyngstadaasovi a Dr. A. Spahrovi, kteří mi umožnili podílet se experimentálně na výzkumu ameloblastinu a za jejich kolegiální přístup. Mé díky patří prof. P. Hobzovi a všem pracovníkům Centra biomolekul a komplexních molekulových systému za příjemné prostředí, které zde panuje. V neposlední řadě chci poděkovat doc. J. Forstové za formální garanci této práce.

Abstrakt

Proteiny plní v živých organismech řadu základních úloh. Jednou z nich jsou strukturální funkce, které se podílí na stavbě buněk, ale tvoří i klíčovou součást mezibuněčné hmoty. Mnoho organismů se vyznačuje přítomností mineralizovaných tkání, jejichž mezibuněčná hmota navíc obsahuje krystalickou minerální složku. Typické tkáně savců, které v průběhu vývoje mineralizují jsou kosti, tvořící opěrnou soustavu, zubní sklovina, dentin a zubní cement obsažené v zubech. Dentin a zubní cement svou strukturou, složením a průběhem mineralizace připomínají kostní tkáň i když dosahují vyššího stupně kalcifikace. Zato sklovina představuje zcela unikátní bezbuněčnou strukturu, která se vyznačuje nejvyšším stupněm mineralizace a uspořádanosti ze všech savčích pevných tkání. Na mikroskopické úrovni je sklovina složena z dlouhých jehlicovitých krystalů hydroxyapatitu, které vznikají během biomineralizace sklovinné proteinové extracelulární matrix. Ta je produkována ameloblasty, sklovinnotvornými buňkami, které secernují řadu extracelulárních proteinů — amelogenin, ameloblastin, amelotin, tufelin, amelotin a také proteasy jako enamelysin a kallikrein-4. Tvorba sklovinné mezibuněčné hmoty a její současná mineralizace je komplexní proces, jehož detailní molekulární mechanismy zůstávají přes intenzivní výzkum stále neznámé. Současný model biomineralizace skloviny je založen na strukturální úloze nanosfér, kulovitých agregátů proteinu amelogeninu, které se váží na krystaly hydroxyapatitu, moduluje jejich růst a řídí jejich orientaci. Proteasy jsou nezbytné pro pozdější odstranění proteinové složky a následnou maturaci krystalů. Štěpí však většinu proteinů v krátké době po jejich sekreci. Přesná úloha ostatních proteinů zůstává neznámá i když studium transgenních zvířecích modelů a lidských dědičných chorob svědčí o jejich nezbytnosti. Mezi navržené role, které by mohly zastávat patří regulace nukleace krystalů, stabilizace obsahu vápenatých kationtů a pH v mezibuněčné hmotě a adheze ameloblastů k minerálnímu materiálu. Stále však sílí důkazy o multifunkčnosti a signalizačních vlastnostech amelogeninu a ameloblastinu, které vykazují účinky podobající se růstovým faktorům.

Klíčová slova: ameloblastin; amelogenese; amelogenin; amelotin; biomineralizace; enamelin; enamelysin; kallikrein-4; sklovina; tufelin; zuby.

Abstract

Proteins hold many essential roles in the living organism, one of them is a structural function. Proteins are basic building blocks of a cell as well as extracellular matrix. Inorganic crystalline stuffs contribute frequently to compound of the vertebral extracellular matrix, typical for bones and mineralized tissues of tooth — enamel, dentine and cementum. Dentine and cementum resemble bone in their structure, composition and the way of mineralization. Enamel, on the other hand is unique acellular substance with the highest amount of deposited minerals and larger, more oriented crystals than other hard tissues. Enamel is built from narrow spinlike crystals of hydroxyapatite formed by matrix-mediated biomineralization. Enamel matrix is produced by enamel cells — ameloblasts, secreting number of extracellular proteins — amelogenin, ameloblastin, enamelin, tuftelin, amelotin as well as proteases like enamelysin and kallikrein-4. The detailed molecular mechanism of enamel matrix formation and control of their biomineralization is unknown despite intensive research effort. The contemporary model of enamel mineralization is based on structural role of amelogenin nanospheres. These globular formations comprising amelogenin molecules bind to hydroxyapatite crystals, modulate their growth and drive their orientation. Proteases are necessary for dissolution of protein fraction leading to crystals maturation. However, majority of extracellular proteins are cleaved soon after their secretion. The exact role of other proteins is not known, but their necessity for enamel development is proved by transgenic animals and study of human genetic diseases which affects teeth. Hypothetical function as crystal nucleators, calcium and proton buffers and adhesion molecules for ameloblasts were suggested for enamel proteins. Amelogenin and ameloblastin are nowadays considered as multifunctional molecules with growth factor-like properties of a living cell.

Key words: ameloblastin; amelogenesis; amelogenin; amelotin; biomineralization; enamel; enamelin; enamelysin; kallikrein-4; tooth; tuftelin.

Obsah

Seznam tabulek	9
Seznam obrázků	10
Seznam použitých zkratk	11
Úvod	13
1 Proteiny	14
1.1 Struktura proteinů	14
1.2 Funkce proteinů	15
1.2.1 Modifikace proteinů	16
1.3 Typy proteinů z hlediska funkce	17
2 Strukturální proteiny extracelulární matrix	19
2.1 Kolageny	20
2.2 Glykoproteiny	21
2.2.1 SIBLING	21
2.3 Proteoglykany	23
2.4 Nekolagenní ECM	24
3 Mineralizované zubní tkáň	25
3.1 Sklovina	25
3.2 Dentin	26
3.3 Zubní cement	27

4	Vývoj zubu	29
4.1	Amelogenese	32
4.1.1	Presekreční fáze	32
4.1.2	Sekreční fáze	32
4.1.3	Transiční fáze	33
4.1.4	Maturační fáze	34
5	Proteiny extracelulární matrix skloviny	36
5.1	Amelogenin	37
5.2	Enamelinové proteiny	42
5.2.1	Ameloblastin	42
5.2.2	Tuftelin	46
5.2.3	Enamelin	48
5.2.4	Amelotin	49
5.3	Proteasy	50
5.3.1	Enamelysin	51
5.3.2	Kallikrein-4	52
6	Mineralizace skloviny	55
6.1	Nukleace krystalů	56
6.2	Modulace růstu krystalů	56
6.3	Protonový pufr	56
6.4	Vápníkový pufr	57
	Závěr	59
	Literatura	60
	Příloha	70

Seznam tabulek

1	Přehled kolagenů	20
2	Stručný přehled a charakteristika glykoproteinů ECM	22

Seznam obrázků

1	Strukturální hierarchie proteinů	15
2	Stavba zubu	25
3	Mikrostruktura skloviny	27
4	Stavba dentinu	28
5	Stadium zubního pupene	30
6	Stadium zubní čepičky	30
7	Stadium zubního pohárku	31
8	Aposiční růst	31
9	Sekretující ameloblast	33
10	Secernace extracelulární matrix skloviny	34
11	Ameloblasty maturační fáze	35
12	Alternativní sestřihové produkty amelogeninu	38
13	Degradace amelogeninu	39
14	Nanosféry a mineralizace.	57

Seznam použitých zkratek

AFM	Atomic Force Microscopy
AMELX	Amelogenin X-form
AMELY	Amelogenin Y-form
BSP	Bone Sialoprotein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CD	Circular Dichroism
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CMP	Cartilage Matrix Protein
COMP	Cartilage Oligomeric Protein
DEJ	Dentine Enamel Junction
DLS	Dynamic Light Scattering
DMP1	Dentine Matrix Protein 1
DPP	Dentine Phosphophoryne
DSPP	Dentine Sialophosphoprotein
DSP	Dentine Sialoprotein
ECM	Extracellular matrix
EMSP1	Enamel Matrix Serine Proteinase 1
FACIT	Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices
FTIR	Fourier Transform Infra Red spectroscopy
GAG	Glycosaminoglycan
GPI	Glycophosphatidylinositol
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kDa	kiloDalton
KLK-4	Kallikrein-4
KLK-L1	Kallikrein Like proteinase 1
Lamp1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LP	Link Protein
LRAP	Leucin Rich Amelogenin Peptide
MACIT	Membrane-Associated Collagens with interrupted Triple helices
MEPE	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
MMP-20	Matrix Metalloproteinase 20
nm	nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
OSP	Osteopontin

Pro	Proline
PRSS17	Serine Protease 17
RGD	arginin-glycine-aspartate
RNA	Ribonucleic Acid
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Ser	Serine
SIBLING	Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoprotein
SLPRS	Small Leucin rich repeat Proteoglycans
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein
TEM	Transmission Electron Microscopy
Thr	Threonine
TIP39	Tuftelin Interacting Factor 39kDa
TFIP11	Tuftelin Interacting Protein 11
TRAP	Tyrosin Rich Amelogenin Protein
A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, V, W, Y, X	Standartní kódy aminokyselin dle IUBMB/IUPAC

Úvod

Procesy v živých organismech jsou nepředstavitelné bez účasti proteinů. Zajišťují nejen průběh biochemických reakcí, ale hrají i klíčovou strukturní roli. Proteiny se podílí na stavbě buněk a mezibuněčné hmoty mnohobuněčných organismů, u kterých tak zajišťují integraci buněk do tkání a orgánů. Specifickou funkci zastávají v těle obratlovců mineralizované tkáně, obsahující v mezibuněčné hmotě krystaly anorganických látek. Za regulaci a organizaci jejich vzniku a růstu jsou zodpovědny organické části mezibuněčné hmoty. Jednotlivé mineralizované tkáně se navzájem liší obsahem anorganické složky, tvarem a velikostí krystalů, které se odráží v makroskopických vlastnostech jako je pevnost, tuhost a tvrdost. Nejvíce mineralizovanou a také nejtvrděší tkání v těle obratlovců je zubní sklovina. Obsah anorganických látek v ní značně převyšuje množství organické složky. Nicméně vznikla podobně jako ostatní mineralizované tkáně postupnou kalcifikací proteinové mezibuněčné hmoty. Takto vysoký podíl anorganické složky je dosažen téměř úplnou degradací sklovinných proteinů, které tak uvolní prostor pro další růst krystalů. Přestože maturovaná sklovina téměř žádné proteiny neobsahuje, během jejího vývoje hrají naprosto klíčovou strukturní a organizační roli.

Vývoj zubní skloviny (amelogenesis) je úzce spjat s vývojem dalších dvou mineralizovaných zubních tkání, dentinem a cementem. Přesto však sklovina vykazuje řadu unikátních vlastností, kterými se od nich odlišuje. Nejzásadnějším rozdílem je přítomnost mezibuněčné hmoty zcela jiného charakteru a složení. Proteiny, které jsou ve sklovině v průběhu vývoje obsaženy, a jejich specifické funkce — strukturní, katalytické či signální jsou ústředním tématem této práce.

Tato práce si klade za cíl shrnout dosavadní poznatky o extracelulárních proteinech skloviny — amelogeninu, ameloblastinu, enamelinu, tuftelinu, amelotinu a sklovinných proteasách a jejich funkcích v kontextu amelogenesis a mineralizace. Součástí práce je i příložený, dosud nepublikovaný článek „Towards structural model of Ameloblastin — hard tissue inducing protein”, ve kterém se zabýváme konstrukcí trojrozměrného modelu molekuly ameloblastinu, jeho verifikací a jeho vztahem k vlastnostem a funkcím tohoto glykoproteinu.

Kapitola 1

Proteiny

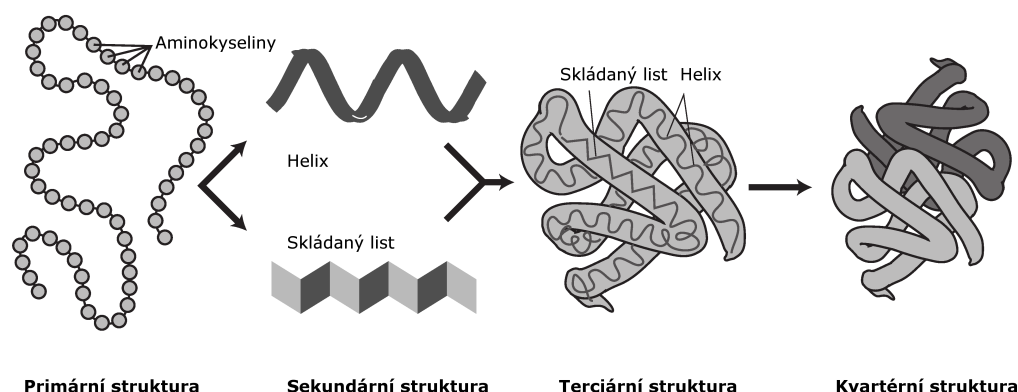
Proteiny představují zcela nepostradatelnou součást buněk, tkání a těl živých organismů. Lze je charakterizovat jako biopolymery tvořené 20 základními L-aminokyselinami. Jejich syntéza probíhá na ribosomu, makromolekulárním útvaru složeném z RNA a proteinů, procesem zvaným translace. Nascentní polypeptidový řetězec je při něm prodlužován na základě informace kódované lineární sekvencí nukleotidů v molekule mRNA. Tento jednoznačný proces je řízen tzv. genetickým kódem, jehož nositelem je aparát transferových RNA a jejich acylas. Uložení, přenos a směr realizace genetické informace jsou popsány centrálním dogmatem molekulární genetiky.

1.1 Struktura proteinů

Všeobecně jsou u proteinů rozeznávány 4 úrovně struktury – primární, sekundární, terciární a kvartérní (viz obr. 1).

Primární strukturu určuje pořadí aminokyselinových zbytků v lineárním řetězci, ve kterém jsou spojeny prostřednictvím peptidické vazby. Ta vzniká kondenzací karboxylové skupiny jedné aminokyseliny s aminoskupinou následující aminokyseliny. Důsledkem tohoto způsobu spojování je topologie peptidového řetězce, který je tvořen kostrou, složenou z uniformních repetitivních motivů peptidové vazby, α -uhlíků a rozdílných aminokyselinových postranních řetězců. S výjimkou glycinu jsou všechny α -aminokyseliny chirální a při ribosomální syntéze jsou využívány výhradně L-formy.

Sekundární struktura proteinu je určena lokální geometrií proteinové kostry, která je v případě strukturovaných úseků stabilizována vodíkovými vazbami mezi karboxylovými kyslíky a amidickými vodíky peptidické vazby různých částí řetězce. Základní prvky sekundární struktury představují α -šroubovice a β -skládaný list. Při detailnější



Obrázek 1: Strukturální hierarchie proteinů (převzato z <http://www.genome.gov>).

klasifikaci lze rozlišovat další typy šroubovic (3_{10} a π šroubovice, levotočivé polyprolinové šroubovice, atd.), paralelní a antiparalelní skládané listy, β -můstky a několik typů vlásenek a obrátek.

Terciární strukturu určuje prostorové uspořádání proteinové kostry společně s konformací postranních řetězců aminokyselinových zbytků. Mezi takto definovanou sekundární a terciární strukturou se nalézají ještě široký prostor pro další definovatelné struktury v podobě skladů sekundárních prvků do různých motivů. Terciární struktura větších proteinů je typicky modulárního charakteru, lze ji rozdělit do navzájem nezávislých oblastí, tzv. strukturálních domén.

Řada proteinů se vyskytuje v podobě multimerů nebo je součástí nadmolekulových funkčních komplexů. Uspořádání podjednotek se v těchto případech označuje jako kvartérní struktura (Lesk, 2001).

Anfinsen postuloval, že primární struktura nese dostatečnou informaci pro složení proteinu do výsledné prostorové struktury, ke kterému dojde za vhodných podmínek samovolně. Struktura proteinu je tedy jednoznačně určena aminokyselinovou sekvencí a podmínkami prostředí (Anfinsen, 1973).

1.2 Funkce proteinů

Obecně lze proteiny rozdělit do kategorií podle následujících principů spojených s jejich funkcí.

Vazba. Proteiny obsahují oblasti, které dokáží specificky vázat jiné molekuly pomocí nekovalentních interakcí.

Katalýza. Proteiny, které jsou vysoce efektivními a specifickými katalyzátory naprosté většiny chemických reakcí probíhajících v živých organismech, se označují jako enzymy. Tato schopnost je dána specifickou vazbou substrátů ve vhodné orientaci a vzdálenosti v reakčním centru. Zároveň jsou v aktivním centru zajištěny takové podmínky, které stabilizují tranzitní stavy intermediátů, a tak usnadňují průběh chemické reakce. Zajišťují též provedení chemické reakce specifickým reakčním mechanismem, acidobazickým, redoxním či radikálovým.

Konformační změny. Struktura proteinů dokáže reagovat změnou konformace na změny prostředí, navázání ligandu či posttranslační modifikace. Tato vlastnost umožňuje regulační a signalizační procesy.

Struktura. Proteiny se aktivně účastní na stavbě vnitrobuněčných struktur a v případě mnohobuněčných organismů i na stavbě mezibuněčné hmoty (Petsko – Ringe, 2004).

1.2.1 Modifikace proteinů

Řada funkcí, které proteiny zastávají, často vyžaduje speciální chemické modifikace aminokyselin, ze kterých jsou proteiny složeny. Mezi nejčastější patří fosforylace serinu, treoninu a tyrosinu, O-glykosylace serinu a treoninu, N-glykosylace asparaginu, hydroxylace prolinu, lysinu a fenylalaninu, methylace, karboxylace, sulfonace, N-acetylace, myristylace, farnesylace, palmitoylace a řada dalších.

Jiný typ modifikace představuje vznik vnitro- či meziřetězcových příčných vazeb, typicky disulfidických můstků mezi dvěma cysteiny. Celá řada různých typů meziřetězcových vazeb, např. prostřednictvím dehydrohydroxylysinorleucinu či desmosinu, je známa z molekul kolagenů a elastinů, kde vznikají kovalentním spojením 2 až 4 aminokyselinových zbytků. Příčné vazby významně ovlivňují stabilitu proteinů a jejich mechanické vlastnosti. Proto jsou často nacházeny u extracelulárních proteinů a proteinů se strukturální funkcí (Kannicht, 2002).

Řada proteinů není syntetizována ve své aktivní podobě, ale ve formě neaktivních prekurzorů. Postranslační modifikace jsou proto častým způsobem jejich aktivace. Specifickým případem je proteolytické štěpení, kdy funkční protein vzniká odštěpením peptidu z prekurzoru pomocí proteasy či autokatalyticky.

1.3 Typy proteinů z hlediska funkce

Podle shora uvedených funkcí lze poté i proteiny dělit do skupin, které sdílejí stejné charakteristiky:

Strukturní. Uplaňují se jako stavební jednotky, podílí se na vzniku, budování a udržování biologických struktur, které zajišťují mechanickou oporu a tvar buněčných kompartmentů, buněk, tkání a těl organismů.

Transportní. Do této skupiny patří nejrůznější přenašeče a transmembránové kanály. Umožňují regulovatelný transport látek směrem z i do buněk a buněčných kompartmentů. U mnohobuněčných organismů zajišťují i transport některých látek skrze extracelulární tekutiny.

Proteiny s katalytickou aktivitou se označují jako enzymy. Podle typu katalyzované chemické reakce norma IUBMB¹ klasifikuje enzymy do 6 hlavních tříd: Oxidoreduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy, isomerazy a ligasy.

Regulační a signalizační umožňují detekci podnětů z vnějšího a vnitřního prostředí, přenos a integraci signálu v signálních kaskádách a vytvoření příslušné odpovědi. Účastní se regulace dějů jako je buněčný cyklus a buněčná komunikace, hormonální regulace a zajištění integrity organismu.

Ochranné a obranné. Tyto funkce zastávají proteiny, které se účastní obranných reakcí vůči patogenům, specifické i nespecifické složky imunitního systému. Ochrannou funkci vykazují proteiny zneškodňující nebezpečné vedlejší produkty metabolismu (např. volné radikály) či škodlivé látky přijaté z vnějšího prostředí.

Zásobní. Proteiny specializované k uskladnění aminokyselin k pozdějšímu využití. Takto lze klasifikovat i proteiny, které jsou při nedostatku živin či prekurzorů odbourávány a metabolizovány přednostně (Koolman – Röhm, 2005).

Vzhledem k zaměření této práce věnujeme pozornost především strukturním proteinům, tak jak byly definovány výše. V tomto pojetí tvoří strukturní proteiny klíčový stavební prvek buněk a těl organismů i některých nebuněčných elementů (např. virů). Podle lokalizace těchto proteinů a struktur, které tvoří, lze strukturní proteiny rozdělit na vnitrobuněčné (intracelulární), mimobuněčné (extracelulární) a membránové. Pro existenci jakéhokoliv buněčného organismu jsou zcela nezbytné proteiny intracelulární a membránové.

¹International Union of Biochemistry and Molecular Biology

Eukaryotické strukturní proteiny lze podle lokalizace dělit na:

Intracelulární strukturní proteiny zajišťují organizaci chromatinu a membránových útvarů, tvoří cytoskelet, určují tvar a zajišťují pohyby buněk, vnitrobuněčný transport, buněčné dělení a plní řadu dalších, pro život nezbytných funkcí.

Membránové proteiny se mohou podle způsobu umístění v membráně dělit na integrální a periferní. Integrální proteiny tvoří trvalou součást membrány, kterou většinou prostupují, zatímco periferní jsou připojeny k membráně prostřednictvím kotvy nepeptidického charakteru (např. mastnou kyselinou nebo isoprenoidem).

Membránové proteiny hrají roli při organizaci membrány a pomáhají formovat její tvar. Významně se podílí na buněčné adhezi, u mnohobuněčných organismů vytváří různé druhy buněčných spojů jako jsou těsné spoje (tight junctions), mezerové spoje (gap junctions), přiléhající adhezní spoje (adherens junctions), desmozomy a hemidesmozomy. Na tyto proteiny se upínají a váží strukturní proteiny cytoskeletu, extracelulární molekuly či molekuly jiné buňky. Často se zároveň jedná o signalizační proteiny, které informaci o specifické adhezi přenášejí do buňky.

Extracelulární proteiny Význam extracelulárních proteinů je výrazně rozdílný u jednobuněčných a mnohobuněčných organismů. Z evolučního hlediska představuje vznik mnohobuněčnosti dramatický skok ve vývoji života, organismus složený z více než jedné buňky vyžaduje novou sadu strukturních proteinů, které by zajistily jeho soudržnost a mechanickou odolnost. Tělo takového organismu je složeno ze dvou frakcí, buněčné složky a mimobuněčné hmoty (extracelulární matrix, ECM). O tomto materiálu a proteinech v něm obsažených pojednává následující kapitola.

Kapitola 2

Strukturní proteiny extracelulární matrix

Strukturní proteiny tvoří extrémně širokou a různorodou skupinu, jak bylo nastíněno v předchozích odstavcích. Proto již v následujících částech vzhledem k tématu práce odhlédneme od obecnosti a zaměříme se pouze na eukaryotické, respektive živočišné, extracelulární proteiny tvořící základní složky mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix, ECM). Mezi další složky ECM patří polysacharidy a anorganické látky, především voda, ale v případě mineralizované ECM mohou být do její struktury zabudovány krystaly minerálních látek, jako jsou fosforečnany a uhličitan vápníku a hořčíku.

Extracelulární matrix je důležitý strukturní prvek orgánů a tkání, tvořící jejich nebuňčnou složku. Tento materiál, syntetizovaný a secernovaný buňkami plní funkci:

1. Stavební a mechanickou. Vyplňuje objem mezi buňkami a umožňuje jejich upevnění. Ohraničuje a vymezuje tkáň, rozkládá sílu, napětí a tlak, které na ni působí, zajišťuje její pevnost, tuhost a elasticitu.
2. Signální a vývojovou. ECM hraje důležitou roli při vývoji organismu, vystavuje signály, které ovlivňují diferenciaci, polarizaci a migraci buněk.
3. Transportní a zásobní. Skrz extracelulární matrix jsou transportovány živiny, plyny a odpadní produkty. Zadržuje také velké množství vody a napomáhá udržovat homeostázi.

V nejhrubším zjednodušení lze pevnou extracelulární matrix podle své architektury rozdělit na dva typy. První z nich jsou basální membrány, která se vyznačují kondenzovanější, síťovitou stavbou a přítomností charakteristickým molekul, jako *kolagen IV*, *lamininy*, *perlekan* a *nidogen*. Basální membránu typicky produkují epiteliální buňky

ve formě tenké vrstvy o mocnosti do 100 nm. Druhý typ představuje intersticiální ECM, která tvoří většinu mezibuněčného pojiva.

Zastoupení a složení ECM je tkáňově specifické, ale téměř vždy obsahuje tři základní biopolymerní složky proteinové povahy, kterými jsou kolageny, nekolagenní glykoproteiny a proteoglykany (Kreis – Vale, 1999).

2.1 Kolageny

Kolageny představují velmi rozsáhlou rodinu extracelulárních strukturních proteinů, které tvoří jednu ze základních složek extracelulární matrix. Všechny kolageny se vyznačují přítomností lineární trojřetězcové struktury složené z podjednotek (α -domén) obsahujících repetice sekvenčního motivu $(\text{Gly X Y})_n$, kde na pozici X a Y může ležet téměř jakákoliv aminokyselina. Nicméně je však na pozici Y často zastoupen prolin nebo hydroxyprolin, případně lysin či hydroxylysin. Počet těchto domén a jejich organizace, případně přítomnost domén jiných, jsou charakteristické znaky jednotlivých podrodin. Kolageny většinou agregují do nadmolekulárních útvarů — fibril, filament nebo síťovitých struktur, které mají zásadní podíl na struktuře a charakteru mezibuněčné hmoty (Olsen – Ninomiya, 1999). Jednotlivé typy kolagenů jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled kolagenů, podle Olsen – Ninomiya (1999).

Rodina	Zahrnuté kolageny	Charakteristika
Fibrilární	I, II, III, V, XI	Tvoří vlákna v pojivových tkáních a mnoha orgánech
FACIT ¹	IX, XII, XIV, XVI, XIX	Tvoří spojovací můstky mezi kolageními fibrilami a ostatními molekulami ECM
S krátkým řetězcem	VIII, X	Skupina kolagenů rozšířená v nejrůznějších tkáních
membránové	IV	Hlavní kolagení složka basálních membrán
Multiplexiny	XV, XVIII	Nefibrilární kolageny obsažené v nejrůznějších tkáních
MACIT ²	XIII, XVII	Transmembránové kolageny, adhezivní buněčné molekuly
Ostatní	VI	Fibrilární, široce rozšířený kolagen tvořící specifický typ mikrofibril
	VII	Fibrilární kolagen tvořící vlákna ukotvující basální membrány

¹ Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices

² Membrane-Associated Collagens with Interrupted Triple helices

2.2 Glykoproteiny

Přestože kolagen tvoří převážnou část proteinů extracelulární matrix a v podstatě celého živočišného těla, důležitou strukturní roli mají i další glykoproteiny. Podílí se na stavbě vláken s různými vlastnostmi (např. elastická), často obsahují mnoho vazebných míst a působí tak jako spojovací články mezi fibrilárními proteiny, proteoglykany, hyaluronanem či buněčnými adhezivními molekulami (Kreis – Vale, 1999). V tabulce 2 je uveden stručný přehled hlavních skupin extracelulárních proteinů.

2.2.1 SIBLING

Zvláštní pozornost nyní věnujme glykoproteinům označovaných souhrně SIBLING (Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoprotein), které se účastní mineralizace tkání. Název této proteinové rodiny pochází ze skutečnosti, že všichni členové obsahují aminokyselinový RGD¹ vazebný motiv pro membránové integriny a podléhají podobným postranslačním modifikacím, jako je N-glykosylace a fosforylace. Geny těchto proteinů vytváří na chromozomu genový klastr a tudíž se předpokládá jejich společný původ (Huq et al., 2005).

BSP (Bone Sialoprotein). Výskyt tohoto proteinu je omezen na kost, mineralizující chrupavky, dentin a zubní cement. Je produkován kostními osteoblasty, osteocyty i osteoklasty. Přesná biologická funkce tohoto proteinu není známa, předpokládá se, že by mohl hrát roli při nukleaci hydroxyapatitových krystalů, minerální složky kosti (Ganss et al., 1999).

Osteopontin (OSP). Tento glykoprotein byl detekován nejen v mineralizovaných tkáních, ale i ostatních tkáních jako ledviny a epitely. Osteopontin je považován za multifunkční protein, přisuzována je mu regulační role při mineralizaci a inhibici růstu krystalů hydroxyapatitu a oxalátů ve vylučovacím ústrojí. Další funkce jsou signální, které probíhají skrze integriny a receptor CD44. Mezi procesy, kterých se osteopontin dále účastní nebo je ovlivňuje, patří regulace aktivity osteoklastů při resorpci kosti, vývojové a regenerační procesy, imunitní reakce a vznik nádorů (Sodek et al., 2000).

Dentin Sialofosfoprotein (DSPP). Produkce tohoto proteinu probíhá především v odontoblastech, buňkách secernujících extracelulární matrix zubního dentinu. DSPP je prekurzorem pro dva další proteiny, které vznikají jeho proteolytickým štěpením.

¹Zkratka z jednopísmenných značek aminokyselin argininu, glycinu a asparagové kyseliny

Tabulka 2: Stručný přehled a charakteristika glykoproteinů ECM, podle Kreis – Vale (1999).

Proteinová rodina	Charakteristika
CMP ¹	Hlavní nekolagenní protein chrupavek, vytváří agregáty s kolagenem.
Elastin	Důležitá složka ECM v pojivových tkáních, které vyžadují vysokou elasticitu. Domény elastinu jsou bohatě kovalentně provázané a snadno se vratně deformují při působení síly.
Fibriny	Hrají důležitou roli při srážení krve, polymerizují do hustých sítí, zakládajících sraženinu. V krvi jsou obsaženy jejich rozpustné prekurzory — fibrinogeny.
Fibronektiny	Vysokohmotnostní proteiny, které zajišťují adhezi buněk. Běžná složka pojivových tkání a krve.
Fibuliny	Široká rodina proteinů podílejících se na stavbě basálních membrán a elastických vláken.
Lamininy	Rodina proteinů tvořících důležitou složku basálních membrán. Tvoří heterotrimery ze 3 různých řetězců.
LP (Link protein)	Metaloprotein vytvářející spoje mezi hyaluronanem a proteoglykany, hojný v chrupavkách.
Muciny	Skupina bohatě glykosylovaných proteinů tvořících gelovité vrstvy, které chrání trávicí a dýchací trakt.
Nectinepsin	Protein příbuzný vitronektinům, obsažený v retině a dalších tkáních.
Netriny	Proteiny příbuzné lamininům se silnými chemotaxickými vlastnostmi pro migrující buňky.
Nidogeny	Významné složky basálních membrán.
Reelin	Glykoprotein uplatňující se při vývoji neurálních struktur.
SIBLING ²	Rodina proteinů obsažených v ECM kostí a mineralizujících tkání.
SPARC ³	Glykoprotein se signalizačními účinky, produkováný během vývojových a remodelačních procesů.
Tenasciny	Rodina adhezních proteinů vyskytujících se v nejrůznějších tkáních.
Thrombospondiny	Rodina glykoproteinů vážících Ca ²⁺ s širokým okruhem funkcí, uplatňují se při embryogenezi, angiogenezi, srážení krve a regeneračních procesech.
Vitronektiny	Adhezivní glykoproteiny vážící heparinové glykosaminoglykany. Jsou obsaženy především v krvi, ale i v ECM různých tkání. Uplatňují se při srážení krve a reakcích komplementu.
Von Willebrandův faktor	Multimerní glykoprotein klíčový pro koagulaci trombocytů, obsažen v krevní plasmě.

¹ Cartilage Matrix Protein² Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoprotein³ Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein

Prvním z nich je dentin fosforyn (DPP), silně kyselý (obsahuje 35% asparagové kyseliny) a bohatě fosforylovaný (45 – 50% fosfoserinu) glykoprotein. Proto také vykazuje vysokou afinitu k Ca^{2+} a je považován za iniciátor mineralizace dentinu. Druhý produkt, dentin sialoprotein (DSP) představuje po kolagenu a DPP třetí nejhojnější protein dentinu. Jeho funkce zůstává neznámá (Butler et al., 1997; MacDougall et al., 1997b).

Dentin Matrix Protein 1 (DMP1). Byl objeven jako produkt odontoblastů (dentinotvorných buněk), ukázalo se však, že je produkován ve všech mineralizujících tkáních. Uplatňuje se při dentinogenezi, vývoji chrupavek a kraniofaciální oblasti, je nezbytný pro vývoj osteocytů. Vzhledem ke své kyselé povaze se může přímo účastnit regulace mineralizace, zároveň se však také váže na buněčný receptor CD44. Pravděpodobně se jedná o multifunkční molekulu, obdobně jako osteopontin (Rios et al., 2005).

MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein). Tento glykoprotein primárně exprimovaný v kostních buňkách a odontoblastech ovlivňuje mineralizaci kostí, přesná funkce však není známa. Současná pozorování odhalují i možnou roli v metabolismu fosfátů (Rowe et al., 2004).

2.3 Proteoglykany

Proteoglykany představují různorodou skupinu proteinů ECM, spojuje je však podobný typ glykosylace. K proteinové složce, která tvoří jádro proteoglykanu, jsou připojeny dlouhé lineární řetězce glykosaminoglykanů (GAG).

Samotné glykosaminoglykany netvoří příliš rozmanité struktury, každý se skládá pouze ze dvou druhů monosacharidů, které se v lineární sekvenci periodicky opakují. Vyjimku činí pouze krátký spojovací segment, jímž se glykosaminoglykan připojuje na jádrový protein. Jednotlivé sacharidy však podléhají různým chemickým modifikacím, které vytváří heterogenitu glykosaminoglykanů. GAG lze dělit podle mateřského polymeru, ze kterého jsou odvozeny, a převažujících modifikací na heparin, heparin sulfát, chondroitin sulfát, dematan sulfát a keratan sulfát. Vyjímečným typem glykosaminoglykanu je *hyaluronan*, který netvoří proteoglykany, není upravován a může dosahovat značné délky.

Klasifikaci proteoglykanů lze pojmut podle typu glykosaminové složky nebo podle příbuznosti jádrového proteinu. Jedno z používaných dělení je následující:

Lektikany. Vyznačují se podobnou doménovou skladbou, N-koncová doména interaguje s hyaluronanem a C-konec tvoří lektinová doména. Na jádrový protein se

váží především řetězce chondroitin sulfátu, v menší míře i keratan sulfátu. Členy této skupiny jsou například *aggrekan*, *versikan*, *neurokan* a *brevican*.

SLPRs (Small Leucin rich repeat Proteoglycans). Jak název napovídá, jedná se o malé proteoglykany, jejichž proteinová složka obsahuje na leucin bohaté repetice. Glykosaminoglykanovou složkou může být chondroitin sulfát, dermatan sulfát nebo keratan sulfát. Do této skupiny se například řadí *dekorin*, *biglykan*, *fibromodulin* a *keratokan*.

Proteoglykany basálních membrán. Přednostně se vykytují v cévních a epiteliálních basálních membránách. Tato skupina zahrnuje *agrin*, *perlekan* a *bamakan*.

Proteoglykany asociované s buněčnou membránou. V rámci těchto proteoglykanů tvoří specifickou skupinu transmembránové heparan sulfátové *syndekany*, které obsahují i malou cytosolickou doménu. Další dobře definovanou rodinu jsou *glypikany*, které jsou s buněčnou membránou spojeny glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvou.

Proteoglykany zastávají řadu různorodých funkcí, které mohou být spojovány s proteinovou i glykosaminoglykanovou složkou. Mezi tyto funkce náleží organizace kolagenní sítě a fibril, vyplnění prostoru v extracelulární matrix, vazba vody, imobilizace difuzních molekul a vazba růstových faktorů. Velmi významnou roli hrají i jejich regulační schopnosti, proteoglykany se účastní regulace aktivity proteas a moduluji reakci buněk na růstové faktory. V neposlední řadě se váží na adhezivní buněčné molekuly a ovlivňují tak přilnavost a interakce buněk s extracelulární matrix i ostatními buňkami. (Iozzo, 1998; Bosman – Stamenkovic, 2003)

2.4 Nokolagenní ECM

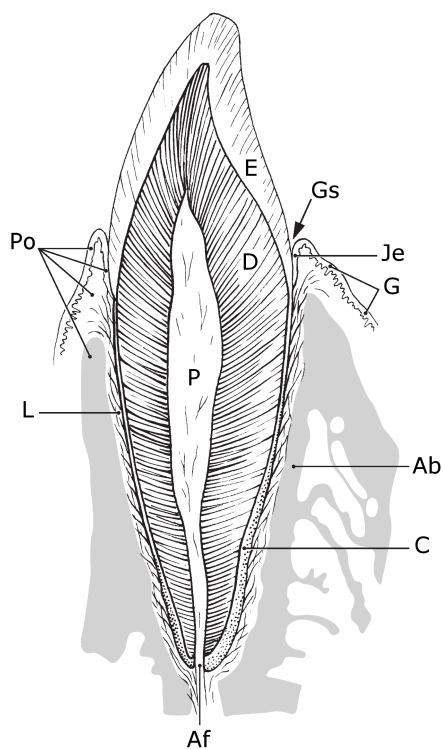
Jak již bylo uvedeno, kolageny tvoří základní složku téměř všech ECM, pomineme-li krevní plasmu. Existuje však významná výjimka, kde se nevyskytují. Tuto jedinečnou nekolagenní hmotu představuje extracelulární matrix vyvíjející se zubní skloviny. V rámci živočišné říše je vyvinuta pouze u obratlovců, a i ti se liší v její struktuře a „vyspělosti“ (Diekwisch et al., 2002).

Savčí sklovina bude ústředním motivem následujících kapitol, které stručně charakterizují její stavbu a tvorbu v rámci zubních tkání. Především však bude věnována pozornost unikátním extracelulárním proteinům účastnících se její mineralizace, což je hlavní téma této práce.

Kapitola 3

Mineralizované zubní tkáně

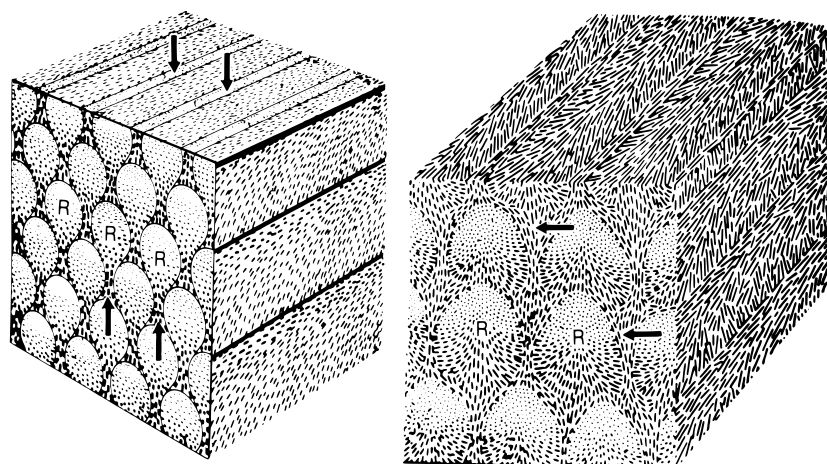
Zuby savců jsou tvořeny třemi druhy mineralizovaných tkání, zubní sklovinou, dentinem (zubovinou) a zubním cementem. Stavbu zuby popisuje obr. 2.



Obrázek 2: Stavba zuby. Na povrchu je zub kryt vrstvou skloviny (E), pod kterou leží vrstva dentinu (D). V centrální části se nachází zubní pulpa (P), zásobená cévami vedoucími skrze apikální otvor (Af). Povrch dentinu je v oblasti kořenu kryt cementem (C), do kterého se upínají vazivová vlákna (L). Pomocí nich je zub ukotven v prostoru alveolární kosti (Ab). S dásní (G) je zub spojen prostřednictvím spojovacího epitelu (Je), který přechází v epitel dásně v oblasti dásňového žlábk (Gs). Tyto podpůrné tkáně se souhrně označují periodontium (Po). Převzato z Feneis – Dauber (2000).

3.1 Sklovina

Sklovina představuje nejtvrďší část těla savců, vyznačuje se nejvyšším stupněm mineralizace a největší velikostí minerálních krystalů ze všech ECM. Přitom se jedná u savců



Obrázek 3: Mikrostruktura skloviny, řezy sklovinou člověka. Patrná jsou sklovinná prismata (R), lišící se od okolní interprismatické substance (označené šipkami) orientací krystalitů. Prismata probíhají jako válcovité útvary celou šířkou skloviny, od dentinosklovinné hranice na rozhraní s dentínem směrem k povrchu zubu. Jejich průběh však není přímočarý, ale naopak velmi komplikovaný, různě se navzájem proplétají a shlukují do svazků. Převzato z Provenza – Seibel (1986).

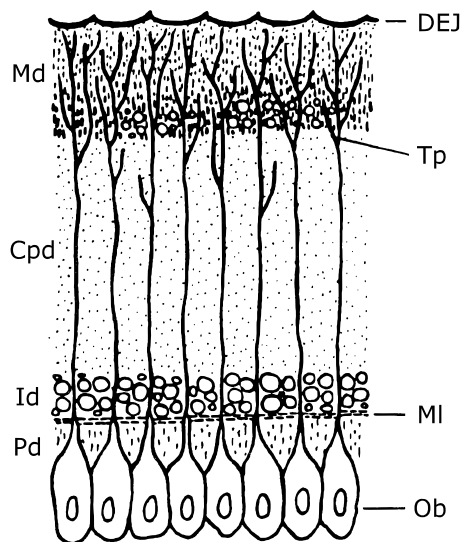
primární. Mechanické stimuly, opotřebení nebo poranění indukují tvorbu sekundárního dentinu, která působí proti těmto vlivům. Na rozdíl od skloviny je dentin živá tkáň schopná reparace a remodelace v závislosti na dlouhodobějších podmínkách.

3.3 Zubní cement

Zubní cement pokrývá povrch zubního kořene a krčku zubu. Představuje nejměkčí a nejméně mineralizovanou ze všech zubních tkání a v mnoha ohledech se podobá kosti. Na rozdíl od ní však neobsahuje cévní kapiláry. Podle přítomnosti buněk se rozlišuje cement bezbuněčný (acelulární) a cement buněčný (celulární), který obsahuje cementocyty. Ty jsou uloženy v komůrkách (lakunách) mineralizované tkáně stejným způsobem jako osteocyty v kosti.

V cementu se nachází četná kolagenová vlákna, obklopená ostatními složkami mezibuněčné hmoty včetně hydroxyapatitových krystalů. Anorganická složka zaujímá přibližně 65% hmotnosti, organický obsah 23 – 26% a zbytek tvoří voda (Provenza – Seibel, 1986).

Hlavním účelem zubního cementu je ukotvení kolagenních vláken periodontálních vazů závěsného systému, která upevňují zub v kosti čelisti.



Obrázek 4: Stavba dentinu. V blízkosti denticoskloviné hranice (DEJ) se nachází vrstva plášťového dentinu (Md), která přechází v nejmocnější vrstvu více mineralizovaného dentinu cirkumpulpaního (Cpd). Odontoblasty (Ob) produkují ve své blízkosti vrstvu nemineralizovaného predentinu (Pd). Jeho mineralizace začíná v zóně označované jako mineralizační linie (MI) a postupně pokračuje přes stadium interdentinu (Id) až na plně mineralizovaný dentin cirkumpulpaní. Odontoblasty leží pouze v nemineralizované části dentinu na hranici se zubní pulpou, do mineralizovaných vrstev však zasahují jejich výběžky — Tomesova vlákna (Tp), která probíhají celou tloušťkou dentinu v trubičkovitých útvarech, dentinových tubulech. Převzato z Malínský (1995).

Kapitola 4

Vývoj zubu

Mineralizace zubních tkání je proces, při kterém probíhá řízená krystalizace minerálu v organické ECM. Zásadní roli zde hraje její proteinová složka, která je secernována specializovanými buňkami — ameloblasty, odontoblasty a cementoblasty. Produkce proteinové ECM a její následná mineralizace probíhá v kontextu vývoje celého zubního orgánu. Aby vyplynuly časové a prostorové souvislosti těchto dějů, bude v následujících kapitolách tento vývoj velmi stručně popsán.

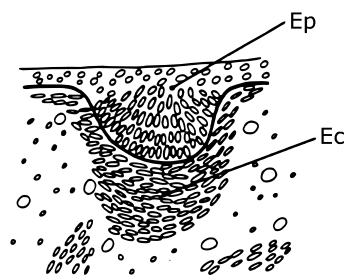
Tvorba zubu začíná již v časném embryonálním vývoji. Podílí se na ní dvě tkáně rozdílného původu a charakteru. První z nich je ektodermální kubický epitel, pokrývající povrch budoucí ústní dutiny. Druhou tkáň představuje ektomesenchym maxilárních a mandibulárních výběžků, budoucí horní a dolní čelisti.

Z pohledu histologie a embryologie lze vývoj zubu rozdělit do 6 fází:

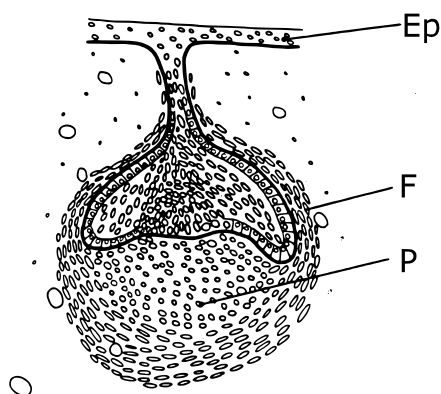
Stadium dentální lišty. Dentální lišta vzniká interakcí mezi ektodermem budoucí ústní dutiny s níže ležícím ektomesenchymem. Buňky ektodermu prolifерují a vytváří ztluštěniny, které se zanořují do ektomesenchymu. Z této primární lišty se vyvíjí zuby dočasného chrupu (dentice). Zuby trvalého chrupu se zakládají ze sekundární dentální lišty, která se tvoří později jako výběžek primární lišty.

Stadium zubního pupene (bud stage). Dentální lišta roste nerovnoměrně, tím se vytváří váčky — pupeny, jejichž pozice odpovídá jednotlivým budoucím zubům. Pupeny jsou tvořeny masou doposud nespecializovaných epiteliárních buněk, viz obr. 5.

Stadium zubní čepičky (cup stage). Růstem zubního pupene se zvětšují mezibuněčné prostory ve vnitřní části. Zároveň inferiorní (směrem k čelistní kosti) část



Obrázek 5: Stadium zubního pupene. Dělicí se epitelové buňky (Ep) dentální laminy prorůstají do níže uloženého ektomesenchymu (Ec). Tvoří se tak váčkovité útvary, základy budoucích zubů. Převzato z Smith – Hall (1993).



Obrázek 6: Stadium zubní čepičky. Dělicí se mesenchymové buňky tvoří dentální papulu (P), která prorůstá do zubní čepičky odvozené z epitelu (E). Mesenchymové buňky v blízkosti čepičky kondensují v dentální váček (F), který ji obklopuje. Převzato z Smith – Hall (1993).

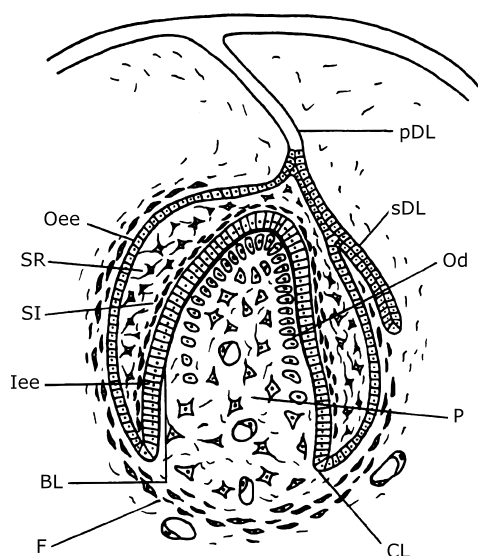
zubního pupene indukuje dělení mesenchymu, který ji obklopuje. Rostoucí mesenchym se začne vtlačovat do zubního pupene a vytvářet v něm prohlubeň, dentální papulu, která dává vznik budoucí zubní pulpě. Viz obr. 6.

Stadium zubního pohárku (bell stage). Dalším růstem a diferenciací zubní čepičky vzniká zubní pohárek, útvar zvonkovité podoby, jehož tvar předurčuje morfologii budoucí zubní korunky. Viz obr. 7. Z epitelových buněk se formuje sklovinný orgán a dochází k diferenciaci buněk zubní papily, ze kterých vznikají dentinotvorné odontoblasty. Do zubní papily začínají prorůstat vyživující krevní kapiláry a zakládá se inervace zubu.

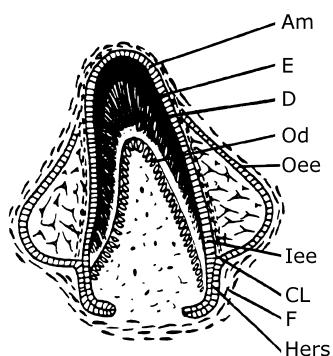
Stadium apozičního růstu a kalcifikace korunky. Tuto fázi zahajuje amelogenese (viz. kapitola 4.1) a dentinogenese, produkce mezibuněčné hmoty ameloblasty a odontoblasty, která začíná v růstových centrech na vrcholu korunky a postupuje směrem ke kořeni, viz obr. 8.

Po ukončení amelogenese se mění ameloblasty v postameloblasty, které vytváří redukovaný sklovinný epitel, složku primární kutikuly, pokrývající a chránící vzniklou sklovinu.

Stadia prořezávání zubů, tvorby kořene a závěsného aparátu probíhají současně. Prořezávání zubů těsně předchází iniciace tvorby zubního kořene. Z cervikální



Obrázek 7: Stadium zubního pohárku. Z epitelových buněk se formuje sklovinný orgán, který je tvořen 4 rozlišitelnými vrstvami buněk. Na vnějším povrchu orgánu se nachází vrstva vnějšího sklovinného epitelu (Oee), který jej téměř obaluje a společně se zubním vakem (F) zastává ochrannou funkci. Na inferiorním konci přechází zkrze cervikální kličku (CL) ve vrstvu vnitřního sklovinného epitelu (Iee). Tato vrstva je tvořena sloupcovitými buňkami označovanými jako preameloblasty, které se později diferencují v ameloblasty. Mezi vnějším a vnitřním sklovinným epitelem se formují dvě rozlišitelné masy buněk. Stratum intermedium (SI) tvoří 2 až 3 buňky mocnou vrstvu přiléhající k vnitřnímu epitelu. Druhou skupinu buněk tvoří řídko uspořádaná pulpa skloviny (SR, stellate reticulum). V blízkosti basální laminy (BL) vnitřního sklovinného epitelu se formuje vrstva preodontoblastů a následně odontoblastů (Od). Z primární dentální lišty (pDL) se odštěpuje sekundární dentální lišta, se které se vyvíjí trvalý chrup. Převzato z Malínský (1995).



Obrázek 8: Aposiční růst. Tvorba skloviny (E) ameloblasty (Am) z vnitřního sklovinného epitelu (Iee) a dentinu (D) odontoblasty (Od) probíhá od vrcholu korunky směrem k budoucímu kořenu. Ten se zakládá v podobě Hertwigovy epitelové kořenové pochvy (Hers) z buněk cervikální kličky (CL). Ze schematu je patrná postupná přestavba sklovinného orgánu a zánik vnějšího sklovinného epitelu (Oee), který tak uvolňuje prostor pro cévní zásobení secernujících buněk. Zubní vak (F). Převzato z Malínský (1995).

kličky na rozhraní vnitřního a vnějšího epitelu sklovinného orgánu se tvoří Hertwigova kořenová epitelová pochva, která určuje tvar budoucího kořene, viz obr. 8. Z ektomesenchymálních buněk přilehlých k Hertwigově kořenové pochvě se diferencují cementoblasty, které se podílí na tvorbě zubního cementu, cementogenesi. Z buněk zubní pulpy se formují odontoblasty produkující dentin kořene, které tak navazují na dentinogenesi korunky.

Ze zbytku vazivového obalu vyvíjejícího se zubu (zubního vaku) se vytváří závěsný aparát, vazivová ozubice. Ta obsahuje četná vazivová vlákna, upínající se v zubním cementu a kostěném lůžku alveol čelistních kostí.

4.1 Amelogenese

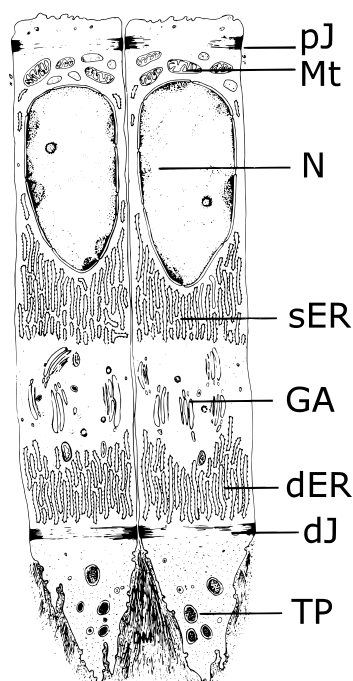
Sklovina vzniká činností specializovaných buněk, ameloblastů. Ameloblasty během sklovinotvorného procesu (amelogenese) procházejí několika stádii, při kterých mění svou morfologii a plní různé funkce.

4.1.1 Presekreční fáze

Prekurzory ameloblastů jsou preameloblasty, nižší sloupcovité buňky odvozené z vnitřního sklovinného epitelu. Diferenciace preameloblastů probíhá současně s diferenciací preodontoblastů a odontoblastů z mesenchymových buněk zubní papily. Oba typy buněk interagují navzájem i s basální laminou, která je odděluje a je nezbytná pro jejich diferenciaci. K její stavbě přispívají oba typy buněk, především však buňky epitelové. Odontoblasty vznikají dříve a jakmile začnou tvořit kolagenní vlákna, predentin a plášťový dentin, tak se basální membrána začíná ztrácet. V tomto okamžiku se preameloblasty mění v sekretující ameloblasty.

4.1.2 Sekreční fáze

Během sekreční fáze se v ameloblastech (viz obr. 9) objevuje množství specifických sekreční granulé, která jsou transportována na sekreční pól buňky, kde splývají s buněčnou membránou a vylévají svůj obsah do mimobuněčného prostoru. Sekrece je započata během tvorby Tomesova výběžku. Materiál vyloučený před jeho zformováním dává vznik tenké vrstvě aprismatické skloviny v oblasti dentinosklovinné hranice. Po vytvoření Tomesova výběžku dochází k sekreci granul na dvou místech, viz obr. 10. Prvím z nich se nalzá na proximální části Tomesova výběžku v blízkosti těla buňky. Zde je do prostoru v sousedství dalších ameloblastů vylučována ECM, která mineralizuje v interprismatickou substanci. Na distálním, vzdálenějším konci Tomesova výběžku je



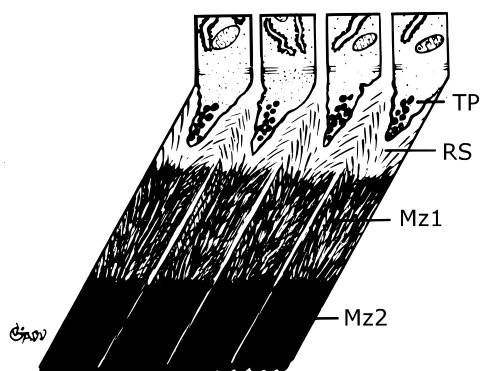
Obrázek 9: Sekretující ameloblast. Během diferenciace ameloblastů dochází k prodloužení buněk a přeuspořádání organel. Tyto změny vedou k polarizaci buňky. Dochází k posílení mezibuněčných spojů vedoucí k vytvoření spojovacího komplexu (terminal web) na proximální (pJ) i distální (dJ) straně buňky. Z distální části ameloblastů se směrem k dentinu formují Tomesovy výběžky (TP), široké pyramidálně tvarované útvary se sekreční funkcí. Sekreční systém tvoří distální endoplasmatické retikulum (dER), navazující na Golgiho aparát (GA) a supranukleární endoplasmatické retikulum (sER) ležící v okolí jádra (N). Dalším typickým znakem je nahromadění mitochondrií (Mt) na proximální straně buňky. Převzato z Provenza – Seibel (1986).

secernována matrix prismatické skloviny. Morfologie Tomesova výběžku určuje velikost a tvar sklovinných prismatic. S přibývajícím množstvím vytvořené mezibuněčné hmoty dochází k posunu ameloblastů směrem od dentinosklovinné hranice. Současně probíhá z opačné strany odsun odontoblastů vlivem vytvořeného predentinu a dentinu.

Během sekreční fáze ameloblasty secernují kromě glykoproteinů také vápenaté kationty a další anorganické ionty, které vytváří zárodky hydroxyapatitových krystalitů. V této fázi mají krystality úzký jehlicovitý tvar a jejich růst probíhá především podélným prodlužováním. Současně v sekreční fázi začíná postupná degradace organické matrix ve starších vrstvách prostřednictvím proteas a zpětná resorbce jejich rozložených složek.

4.1.3 Transiční fáze

Po ukončení sekrece mezibuněčné hmoty dochází k morfologickým změnám ameloblastů. Nejvýraznější z nich je ztráta Tomesova výběžku, která zakončuje sekreční fázi. Poslední takto vyloučený materiál dává vznik povrchové vrstvě aprismatické skloviny. Transiční ameloblasty zmenšují svou výšku a reorganizují buněčné organely. Podstatnými změnami prochází buněčný sekreční aparát, který se znatelně redukuje.



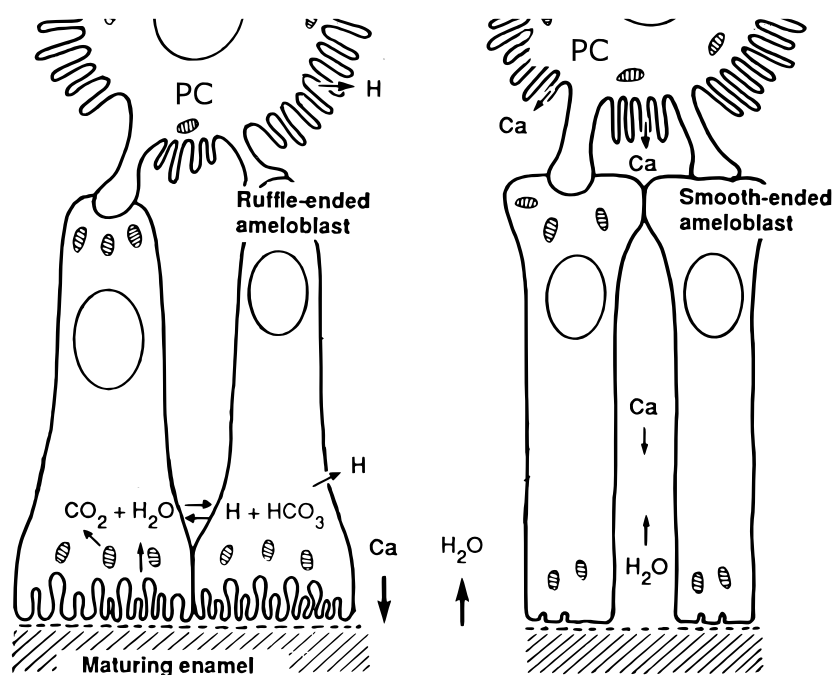
Obrázek 10: Secernace extracelulární matrix skloviny. Složky ECM prismatické skloviny (RS) jsou secernovány z distální části Tomesova výběžku (TP) ameloblastu. Tím, že jedno prisma produkuje většinou jeden ameloblast, je dáno jejich typické uspořádání. Prostor mezi prismaty je vyplněn interprismatickou substancí, secernovanou proximální částí Tomesova výběžku. V poměrně malé vzdálenosti od buněk začíná mineralizace, která probíhá postupně. Vzdálenější a tudíž starší oblasti ECM (Mz2) jsou mineralizovány více než k buňkám přilehlejším (Mz1). Převzato z Provenza – Seibel (1986).

4.1.4 Maturační fáze

Buněčnou reorganizací ameloblasty ztratily svou sekreční schopnost. Typickým znakem buněk v této fázi jsou periodické proměny tvaru membrány na straně přivrácené ke sklovině a změny v poloze těsných spojů, viz obr. 11. Tento fenomén se označuje jako cyklická modulace. V tomto období se vytváří basální membrána mezi ameloblasty a sklovinou, která představuje jedinou mezibuněčnou hmotu produkovanou maturujícími ameloblasty.

V maturující sklovině dochází k odstranění téměř veškerých proteinů díky proteasám, které je rozložily na krátké peptidy. Ameloblasty tyto degradované proteiny zpětně resorbují. Organická složka je tímto způsobem ze skloviny odstraněna, souběžně probíhá i aktivní resorbce vody, které se účastní i ostatní buňky sklovinného orgánu.

Ve sklovině stále stoupá obsah minerální složky, jejíž výdej je v tomto období zvýšen. V tomto prostředí probíhá dokončení mineralizace skloviny. Nevznikají již nové krystality, ale ty stávající zvětšují svou šířku a délku na úkor odstaněné proteinové části ECM.



Obrázek 11: Ameloblasty maturační fáze. Vytváří dva morfologicky odlišné typy, ameloblasty s drsnou membránou (Ruffle-ended ameloblast) a s hladkou membránou (Smooth-ended ameloblast). Tyto typy se liší charakterem buněčné membrány přiléhající k maturující sklovině (Maturing enamel) a polohou těsných spojů. Ameloblasty jsou spojeny s buňkami pulpy sklovinného orgánu (PC) prostřednictvím mezerových spojů. Obrázek zachycuje i toky iontů a vody během maturační fáze. Převzato z Sasaki (1990).

Kapitola 5

Proteiny extracelulární matrix skloviny

Proteinová extracelulární matrix je ve sklovině přítomná do maturační fáze amelogenese. Poté je její množství zásadně zredukováno proteasami, což je zcela nezbytný krok pro dokončení její mineralizace. Zralá sklovina proto obsahuje pouze velmi malé množství organické složky, převážně proteinů.

Z extracelulární matrix mineralizující skloviny byly izolovány proteiny, které se z historických důvodů dělí podle svých biochemických a fyzikálně-chemických vlastností do následujících skupin:

Amelogeniny. Tyto hydrofobní proteiny s neobvykle vysokým obsahem prolinu tvoří největší část proteinové složky nemineralizované skloviny (přibližně 90%). Amelogeniny izolované z extracelulární matrix tvoří různorodou skupinu polypeptidů, přestože jsou produktem exprese jednoho či dvou genů. Toho je dosaženo alternativním sestřihem amelogeninové mRNA a intenzivním proteolytickým štěpením během sekreční i maturační fáze amelogenese.

Enameliny. Tvoří proteinovou frakci skloviny označovanou také jako neamelogeniny (non-amelogenins), což vystihuje jejich odlišnou fyzikálně-chemickou charakteristiku. Jedná se o kyselé proteiny s nízkým izoelektrickým bodem, rovněž bohatými na prolin. Do této skupiny se řadí *ameloblastin*, *enamelin* a *tuftelin*. Lze do ní přiřadit i nově objevený *amelotin*.

Proteasy. Během sekreční a maturační fáze sklovina obsahuje malou, ale nepostradatelnou frakci proteinů s proteolytickou aktivitou, která odpovídá metaloproteasám a serinovým proteasám. Nejhojněji jsou zastoupeny *enamelysin* a *kallikrein-4*.

Ostatní. Ze skloviny byl ve větším množství izolován sérový *albumin* a další sérové proteiny. Zůstává spornou otázkou, zda jsou tyto proteiny přítomny i in vivo, nebo se jedná o kontaminaci během izolace vzorků. Pokud jsou tyto proteiny přirozeně přítomny, nejsou produkty ameloblastů a dostávají se do skloviny z okolních tkání. Sklovina obsahuje také malé množství proteoglykanů, jako je *biglycan*.

5.1 Amelogenin

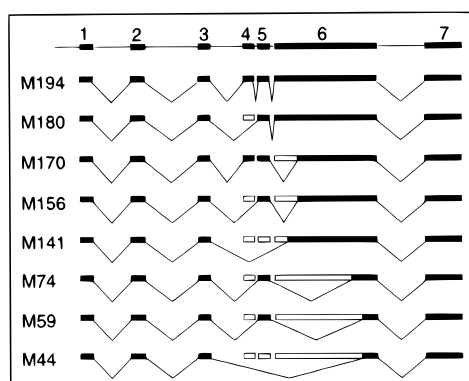
Amelogeniny představují největší část proteinů obsažených v extracelulární matrix skloviny, tvoří více než 90% proteinové složky. Tato amelogeninová frakce obsahuje polypeptidy v rozsahu velikostí 5 – 27 kDa bohaté na aminokyseliny prolin, leucin, histidin a glutamin (Termine et al., 1980).

Celá tato polypeptidová frakce pochází z produktů jednoho genu. Situace je však komplikovanější, protože u některých druhů savců se amelogeninový lokus nachází pouze na pohlavním chromosomu X (forma AMELX), zatímco u primátů a skotu se nachází i na pohlavním chromosomu Y (forma AMELY) (Iwase et al., 2003). V případě člověka jsou u mužů transkribovány geny z obou lokusů, složení amelogeninové frakce proto vykazuje sexuální dimorfismus (Salido et al., 1992).

Sekvenční charakterizace

Dnes jsou známy amelogeninové sekvence získané klonováním a sekvencováním cDNA knihoven skotu (Gibson et al., 1991), člověka (Salido et al., 1992), myši (Lau et al., 1992), potkana (Bonass et al., 1994), vepře (Hu et al., 1996), morčete (nepublikováno), oposuma (Hu et al., 1996), ptakopyska, ježury, kajmana, drápatky (Toyosawa et al., 1998), zlatého křečka (Lyaruu et al., 1998), kozy (nepublikováno), užovky (Ishiyama et al., 1998), skokana (Wang et al., 2005b) a dvou druhů scinkovitých ještěřů (Delgado et al., 2006). Srovnáním těchto sekvencí vyplyne jejich společný profil.

Amelogeninová sekvence obsahuje 3 oblasti, které se liší fyzikálně-chemickým charakterem a mírou konzervace mezi jednotlivými druhy. Hydrofobní N-koncová část, označovaná jako TRAP (Tyrosin Rich Amelogenin Protein), je složena přibližně z 45 aminokyselin a obsahuje 6 – 7 konzervovaných tyrosinových zbytků. Hydrofobní centrální část je složena ze 100 – 130 aminokyselin, z toho zaujímají velkou část prolin, leucin, metionin a glutamin. Tato oblast je bohatá na vnitřní repetice. Na konci sekvence se nachází třetí, krátká C-koncová oblast, která vykazuje hydrofilní charakter. Je označována jako teleopeptid a složena přibližně z 15 aminokyselin (Fincham – Simmer, 1997). Vysokou



Obrázek 12: Alternativní sestřihové produkty amelogeninu. V horní části je schematicky vyobrazena organizace exonů v myším genu pro amelogenin. Jednotlivé produkty jsou kategoričtě pojmenovány dle délky kódované aminokyselinové sekvence. Patrná jsou kryptická sestřihová místa v exonu č. 6. Převzato z (Simmer – Fincham, 1995).

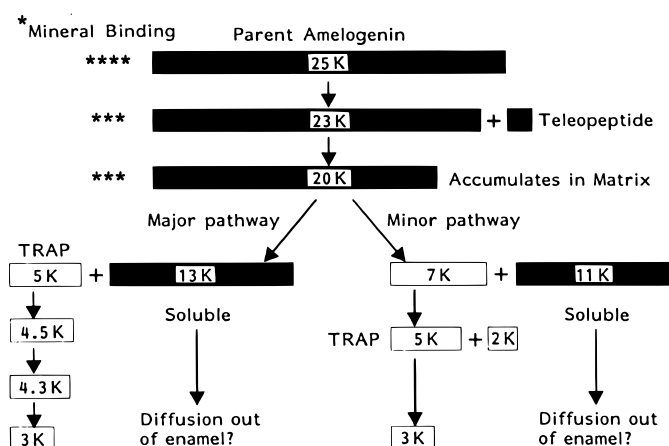
míru konzervace vykazují savčí sekvence v N-koncové a C-koncové části molekuly. Podobný profil uspořádání mají i známé amelogeniny plazů a obojživelníků, i když míra konzervace aminokyselin je nižší (Sire et al., 2006).

Genová organisace

Geny pro amelogenin savců obsahují 7 kódujících exonů. Exony číslované 3, 4 a 5 podléhají alternativnímu sestřihu a rozsáhlý exon č. 6 obsahuje kryptická sestřihová místa, viz obr. 12. Alternativní sestřih vytváří širokou paletu výsledných produktů, které přispívají k heterogenitě amelogeninové frakce v nematurované sklovině, i když jsou produkovány v rozdílných množstvích (Veis, 2003a). Lidské secernující ameloblasty nejvíce produkují AMELX formu obsahující všechny exony s výjimkou č. 4 (80%), následuje forma s delecí exonu č. 3 a č. 4 (16%). Plná forma se všemi exony se vyskytuje s četností 3,5%. Alternativní sestřih genu AMELY u mužů je odlišný, nicméně je rovněž nejvíce zastoupen produkt s delecí exonu č. 4 (Salido et al., 1992). Podobný charakter má i zastoupení jednotlivých mRNA amelogeninu ostatních savčích druhů. Exon č. 4, který schází u převážné většiny transkriptů, kóduje hydrofilní 14-aminokyselinový segment. Jedna z častějších amelogeninových forem, která vzniká delecí exonu č. 4 a velké 5' části exonu č. 6, nese z historických důvodů označení LRAP (Leucin Rich Amelogenin Peptide) (Fincham et al., 1999).

Posttranslační modifikace

U amelogeninu byla zjištěna pouze jediná postranslační modifikace, a to fosforylace na Ser¹⁶. Tato aminokyselinová poloha je velmi konzervovaná a je součástí sekvenčního motivu rozeznávaného kaseinkinasou. Analýzy amelogeninových peptidů izolovaných ze skloviny provedené hmotovou spektroskopií neobjevily glykosylaci ani žádnou další postranslační modifikaci (Fincham – Moradianoldak, 1993). Amelogenin vykazuje schopnost aglutinovat červené krvinky, podobně jako lektiny. Tato neobvyklá vlastnost byla



Obrázek 13: Degradace amelogeninu. Z intaktního amelogeninu (25K) je nejdříve odštěpen teleopeptid za vzniku relativně stabilního fragmentu (20K). Ten je dále štěpen dvěma alternativními cestami, obě však produkují fragmenty s větší rozpustností a TRAP, který se ve sklovině akumuluje. Hvězdičky označují afinitu fragmentu k hydroxyapatitu. Převzato z Robinson et al. (1997).

nalezena u TRAP, ale nikoliv u LRAP. Na základě tohoto rozdílu byl identifikován tyrosylový motiv PYPSTGYEPMGGW vázající N-acetyl-D-glukosamin (Ravindranath et al., 1999).

Sekrece a degradace

Amelogeniny jsou ve velkém míře secernovány ameloblasty v sekreční fázi amelogeneze. Expresse amelogeninových genů však byla zjištěna již v raných fázích odontogeneze u preameloblastů a pokračuje až do maturační fáze amelogeneze (Hu et al., 2001b). Z vyvíjející se skloviny byla izolována celá řada amelogeninových fragmentů, přitom je hlavní secernovaná forma (25 kDa) detekovatelná pouze v úzké vrstvě nově vytvořené ECM. To svědčí o rychlém štěpení molekuly. Za proteasu provádějící tuto činnost je považován enamelysin, který štěpí amelogenin na definovatelných pozicích (Ryu et al., 1999). Prvním odštěpeným fragmentem je hydrofilní teleopeptid. Relativně stabilní složku tvoří 20 kDa fragment, který je dále štěpen na hydrofobní TRAP a více rozpustnou C-koncovou část (Robinson et al., 1997). Schematicky je štěpení vyobrazeno na obr. 13. Na konečném odstranění amelogeninů, ale i dalších extracelulárních proteinů během maturační fáze amelogeneze se podílí především proteasa kallikrein-4 (Bartlett – Simmer, 1999).

Funkce

Nově byla zjištěna exprese amelogeninu odontoblasty v dentinu, jeho přítomnost byla známa již dříve, ale byl považován za produkt ameloblastů (Oida et al., 2002). Dokázána byla sekrece amelogeninu v buňkách apikálního výběžku Hertwigovy epitelové kořenové pochvy během časně cementogeneze (Janones et al., 2005). Překvapivě byla exprese amelogeninu detekována v gliových buňkách mozku a makrofázích, megakaryocytech a hematopoetických buňkách v kostní dřeni (Deutsch et al., 2006). Tyto zjištění posilují důkazy o tom, že amelogenin není pouze strukturní molekula, která tvoří převážnou část extracelulární matrix nematurované skloviny, ale má i funkci signální.

Tuto možnost poprvé jasně formuloval Veis (2003a), kdy predikoval signální funkci alternativním amelogeninovým sestřihovým produktům, především však LRAP. Mezi navržené biologické procesy, kde by se mohla tato signalizace uplatnit, patří epitel-mesenchymatická indukce mezi preodontoblasty a preameloblasty, která hraje roli při jejich diferenciaci. Podobnou roli může amelogenin zastávat i během cementogeneze. Směs amelogeninu a jeho fragmentů představuje hlavní součást Emdogainu, bioaktivního přípravku odvozeného ze sklovinných výtažků. Emdogain je používán v klinické praxi pro své regenerační účinky na měkké i tvrdé tkáně při periodontálních chorobách. Přesný molekulárně-biologický mechanismus jeho účinků je neznámý, není přesně známa ani aktivní složka, která je zodpovědná za účinky tohoto komplexního preparátu (Hammarstrom et al., 1997; Gestrelus et al., 2000).

V současné době byl *in vitro* zdokumentován signifikantní účinek amelogeninu na buňky periodontálního vaziva, který vykazuje charakter růstového faktoru. Na přítomnost amelogeninu buňky reagovaly změnou exprese růstových faktorů BMP (bone morphogenetic protein) a zahájily expresi osteokalcinu a kostního sialoproteinu, dvou proteinů kostní extracelulární matrix (Zeichner-David et al., 2006). Další provedené studie zjistily rozdílný účinek amelogeninů obsahujících či neobsahujících úsek kódovaný exonem č.4. Tyto výsledky ukazují, že účinek závisí nejen na druhu buňky a stadiu diferenciaci, ale i na typu polypeptidu (Lacerda-Pinheiro et al., 2006). Přesné molekulárně-biologické mechanismy, které se podílí na signalizačních funkcích amelogeninu nejsou známy.

Pro nalezení potenciálních interakčních partnerů amelogeninu byl použit kvasinkový dvoj-hybridní systém. Jako nadějný kandidát pro možnou interakci byl identifikován fetuin-A, transmembránový tetraspanin CD64 a biglykan. Fetuin-A je esenciální sérový protein, který inhibuje ektopickou kalcifikaci měkkých tkání. Vzhledem k jeho funkci ve spojitosti s mineralizací je možné, že je hraje určitou roli i při odontogenezi. Biglykan představuje proteoglykan obsažený v kostech, dentinu i sklovině (Wang et al., 2005a).

Kolokalizace amelogeninu s CD64 byla potvrzena experimentálně, společně s dalším integrálním membránovým proteinem Lamp1. Oba se vyskytují na plazmatické mem-

bráně ameloblastů a membráně lysosomů. Tyto proteiny jsou pravděpodobně zapojeny v mechanismu endocytózy amelogeninu či jeho fragmentů zpět do buňky, kde jsou poté lokalizovány v pozdních endosomech a lysosomech. Tento mechanismus se nejspíše uplatňuje v maturační fázi při odstraňování proteinů z extracelulární matrix. Není však vyloučeno, že by mohlo jít i o signální receptory (Shapiro et al., 2007).

V současnosti stále probíhá intenzivní výzkum amelogeninů, které se nyní jeví jako multifunkční molekuly, jejichž význam a funkce patrně přesahuje amelogenesi. Stále zůstává neznámý i přesný mechanismus, jakým amelogeniny jako strukturní proteiny řídí tvorbu a růst hydroxyapatitových krystalitů ve sklovině.

Struktura

Sekundární a terciální struktura intaktního amelogeninu v roztoku byla zkoumána řadou fyzikálních metod jako je CD, NMR a FTIR. Studie amelogeninu provedené pomocí cirkulárního dichroismu (Goto et al., 1993) odhalily, že se molekula amelogeninu skládá ze tří nezávislých jednotek. Zatímco N-koncová doména vykazuje obsah beta struktur, C-koncová doména nevykazuje uspořádanou strukturu. Pro centrální doménu, která obsahuje četné repetice a vyznačuje se specifickým CD spektrem, byl předpovězen strukturní motiv beta spirály. Této struktuře byla také předpovězena schopnost vázat vápenaté kationty, i když neobsahuje nabyté zbytky (Renugopalakrishnan et al., 1989; Goto et al., 1993; Lagunez-Otero et al., 2002; Oobatake et al., 2006). Nedávno byly studovány vazebné schopnosti kompletního amelogeninu a LRAP k vápníku a jejich vliv na sekundární strukturu. Bylo zjištěno, že LRAP narozdíl od kompletního amelogeninu vykazuje konformaci náhodného klubka, a ta není ovlivněna ani vazbou vápenatých kationtů. Afnita obou molekul, kompletního amelogeninu i LRAP k vápníku je za fyziologických podmínek řádově stejná, obě váží 4 – 6 kationtů. (Le et al., 2006).

Zřejmě zásadní vlastností intaktního amelogeninu (plné délky s delecí exonu č.4) je schopnost agregovat a vytvářet kvartérní struktury, nanosféry — kulovité útvary o průměru 18 – 20 nm. Nanosféry byly detekovány *in vitro* za fyziologických podmínek pomocí řady zobrazovacích metod (DLS, AFM, TEM) a jejich existence byla dokázána i *in vivo*. Na stavbě tohoto útvaru se podílí přibližně 100 amelogeninových molekul, které se skládají díky svému hydrofobnímu charakteru a externalizují tak svůj hydrofilní C-koncový teleopeptid do okolního prostředí (Fincham et al., 1995). Předpokládá se, že nanosféry hrají jednu z klíčových rolí při biomineralizaci skloviny. Amelogeninovým nanosférám byla přisouzena funkce organizovat krystality, modulovat jejich růst a zabraňovat jejich splývání (Fincham et al., 1999).

Pomocí rekombinantních amelogeninů byly identifikovány oblasti odpovědné za agregaci. První z nich je N-koncová část označená jako A-doména (zahrnuje aminokyseliny

na pozicích 1 – 42), která je zodpovědná za interakci mezi molekulami a umožňuje jejich sdružování. Druhá, označovaná jako B-doména (aminokyseliny na pozicích 157 – 173) hraje roli ve stabilizaci nanosfér a zabráňuje jejich splývání (Moradian-Oldak et al., 2000). Delece a mutace v těchto oblastech dramaticky mění vlastnosti nanosfér a způsobují defekty ve struktuře skloviny (Paine et al., 2000b).

Skládání amelogeninových nanosfér probíhá postupně, z jednotlivých monomerů se skládají větší celky až do velikosti hexamerů, které mají průměr 4 – 5 nm. V této formě jsou secernovány z buňky do extracelulární matrix, kde probíhá další agregace až do finální velikosti (Brookes et al., 2006). In vitro bylo pozorováno další uspořádávání nanosfér do pravidelných nadstruktur. Ty by mohly hrát roli lešení, které uspořádává krystality a zajišťuje jejich vhodnou vzájemnou orientaci (Du et al., 2005). Schopnost tvořit nanosférám podobné útvary byla pozorována i u LRAP, ovšem až za vyšších koncentrací. Takto tvořené struktury však vykazují odlišné vlastnosti v in vitro experimentech. Na rozdíl od předchozích nanosfér nemají vliv na růst krystalů hydroxyapatitu, a to i přesto, že se na ně váží (Habelitz et al., 2006).

Deficience

Mutace v lidském amelogeninovém genu jsou spojovány s dědičnými defekty skloviny, souhrnně označovanými jako s chromosomem X asociovaná amelogenesis imperfecta. Byla zdokumentována celá řada mutací s různými druhy projevů a závažností (Stephanopoulos et al., 2005). Podobný fenotyp, odpovídající těžké hypoplastické formě amelogenesis imperfecta, byl pozorován u transgenních myší s odstraněným amelogeninovým genem (Gibson et al., 2001). Rovněž byla zkonstruována transgenní myš s deletovaným amelogeninovým genem, který byl nahrazen rekombinantním genem kódujícím LRAP. Také tyto myši se projevovaly hypoplastickým fenotypem skloviny. Lze tedy usuzovat o nenahraditelnosti majoritního amelogeninového polypeptidu či jeho fragmentů při vývoji skloviny (Chen et al., 2003). Transgenní myši postrádající amelogenin nevykazují žádné jiné defekty kromě hypoplasie skloviny, ale nová studie prokázala jejich pomalejší vývoj a růst v porovnání s normálními jedinci (Li et al., 2006).

5.2 Enamelinové proteiny

5.2.1 Ameloblastin

Ameloblastin vystupuje též pod označením amelín a sheatlin, protože tento protein a odpovídající cDNA byly nezávisle identifikovány a sekvencovány třemi vědeckými skupinami z potkaních a prasečích zubních tkání (Krebsbach et al., 1996; Cerny et al.,

1996; Hu et al., 1997b). Sekvencován byl doposud též myší (Simmons et al., 1998), hovězí, lidský (Toyosawa et al., 2000), drápatčí (Shintani et al., 2003) a kajmaní ortholog (Shintani et al., 2002).

Charakterizace

Již dříve však byly zkoumány fragmenty ameloblastinu biochemickými metodami. Peptidy o velikosti 13, 15, 27 a 29 kDa pocházející z C-koncové části proteinu byly izolovány z extraktů nevyzrálé skloviny a byla u nich prokázána schopnost vázat vápenaté kationty (Fukae – Tanabe, 1987a). Rovněž byla izolována frakce peptidů pocházející z N-koncové části ameloblastinu o velikosti 13 – 17 kDa, která vykazovala schopnost tvořit agregáty (Fukae – Tanabe, 1987b).

První charakterizovaná sekvence ameloblastinu pochází z potkaní cDNA knihovny, kde se vyskytuje ve dvou alternativně sestřižených isoformách o délce 422 a 407 aminokyselinových zbytků (Krebsbach et al., 1996), obdobný sestřih byl popsán nebo se předpokládá i u ostatních druhů savců. Lidský ameloblastin je unikátní svým 26 aminokyselinovým insertem v centrální části sekvence, který vznikl vnitřní duplikací exonu v genu ameloblastinu (Toyosawa et al., 2000).

Ameloblastiny vykazují kyselý charakter a vysoký obsah aminokyselin prolinu, leucinu a glycinu. Charakteristická je nepřítomnost cysteinu. Známé savčí sekvence sdílejí značnou sekvenční homologii, konzervovány jsou také tři potenciální sekvenční motivy pro fosforylaci proteinkinasou C, tyrosinkinasou a kaseinkinasou-2 (Toyosawa et al., 2000). Podobnost mezi savčími sekvencemi a sekvencí plazů a obojživelníků je menší. Přitom vyšší homologie dosahuje N-koncový úsek v porovnání se zbytkem sekvence, konzervovány však zůstávají 2 potenciální fosforylační místa (Shintani et al., 2003). Bioinformatická analýza neobjevila u ameloblastinu sekvenční motiv pro N-glykosylaci, experimentálně však byla stanovena poloha O-glykosylace na Thr³⁸⁶ C-koncových fragmentů. Zároveň byla zjištěna přítomnost hydroxylace Pro³⁵⁰ (Yamakoshi et al., 2001). V sekvenci potkaního a myšího ameloblastinu byla identifikována dvě potenciální vazebná místa pro membránové integriny (Cerny et al., 1996), tyto motivy však nejsou zachovány u ostatních druhů. Jejich význam není prokázán.

Deficience

Poloha genu kódujícího ameloblastin v lidském genomu z něj činí vhodného kandidáta pro gen způsobující autosomální dominantní amelogenesis imperfecta, dědičnou chorobu postihujících tvorbu skloviny (MacDougall et al., 1997a; Stephanopoulos et al., 2005), nicméně nebyla prokázána spojitost mutací v ameloblastinu s žádnou formou

amelogenesis imperfecta (Mardh et al., 2001). Známky defektní skloviny byly pozorovány u transgenních myši se zvýšenou expresí ameloblastinu. Takto postižená sklovina vykazuje změnu mikroarchitektury prismatic a interprismatické substance (Paine et al., 2003). Konstrukce ameloblastin-deficientního myšního modelu odhalila, že je ameloblastin nezbytný pro udržení diferenciací ameloblastů v sekreční fázi. U těchto deficientních myši nebyly nalezeny žádné jiné anomálie než nevyvnutá defektní sklovina (hypoplasie) a vysoký výskyt odontogenních nádorů, způsobený deregulací faktorů buněčného cyklu. Na buněčné úrovni došlo k přeměně ameloblastů sekreční fáze na nediferencované epiteliální buňky a jejich proliferaci, která často vyústila v rakovinné bujení. Nápadným znakem byla též ztráta adhezivity ameloblastů ke sklovině (Fukumoto et al., 2004).

Funkce

Výše uvedené výsledky vypovídají o úloze ameloblastinu jako adhezivní molekuly s inhibičním účinkem na buněčné dělení (Fukumoto et al., 2004). Adhezivita sekrečních ameloblastů k ameloblastinu byla experimentálně potvrzena, zatímco presekreční ameloblasty tuto vlastnost nevykazují. Adhezivita buněk k lamininu a fibronektinu basální membrány vykazuje právě opačný vzor. Během sekreční fáze však není basální membrána přítomna a ameloblastin by mohl zastávat její adhezivní roli (Fukumoto et al., 2005).

Z klinického odvětví jsou známy regenerační účinky sklovinných derivátů na periodontium, zubní pulpu a dentin (Hammarstrom et al., 1997; Nakamura et al., 2002). Tyto deriváty kromě majoritní složky amelogeninů obsahují i ameloblastin, jež hraje roli při interakcích ektodermu a mesenchymu, které předchází tvorbě dentinu, skloviny a cementu. Expresí ameloblastinu byla zjištěna během regeneračních procesů při poranění zubní pulpy a dentinu (Spahr et al., 2002). Při aplikaci rekombinantního ameloblastinu do zubů po provedené pulpotomii¹ byla zjištěna signifikantně zvýšená tvorba reparativního dentinu (Nakamura et al., 2006). Vliv ameloblastinu na buňky periodontálního vaziva byl zkoumán in vitro. Buňky vykazovali mírně zvýšenou proliferaci a přilnavost, byla indukována exprese růstového faktoru BMP² a osteokalcinu, proteinu vystupujícím při mineralizaci kostí a dentinu (Zeichner-David et al., 2006).

Otázkou zůstává funkce ameloblastinu jako strukturního proteinu ECM a jeho úloha při mineralizaci. C-koncové polypeptidy o velikosti 13, 15, 27 a 29 kDa vykazují silnou schopnost vázat vápenaté kationty, nebyla však zjištěna afinita k hydroxyapatitu. To je činí možnými kandidáty pro funkci vápníkového pufru, který reguluje a vyrovnává koncentraci vápníku v tkáňovém moku sklovinné ECM (Yamakoshi et al., 2001). Není také

¹Chirurgický zákrok, při kterém je odstraněna zubní pulpa

²Bone Morphogenetic Protein

známa funkce N-koncových fragmentů, které se hromadí v prismatické pochvě. Nadměrná exprese ameloblastinu má za následek změnu mikroarchitektury skloviny (Paine et al., 2003), je tedy možné, že má přímou úlohu při určení morfologie prismatické a interprismatické substance.

Přesný mechanismus účinku ameloblastinu jako signální molekuly a růstového faktoru, stejně jako jeho přesná úloha při mineralizaci zubní skloviny jsou stále neznámé. K tomuto tématu se snaží přispět i náš článek „Towards structural model of Ameloblastin — hard tissue inducing protein”, ve kterém se zabýváme konstrukcí třírozměrného strukturního modelu a jeho vztahem k možným funkcím ameloblastinu — strukturní i signalizační.

Sekrece, lokalizace a degradace

Ameloblastin byl původně identifikován u potkanů jako protein secernovaný ameloblasty v sekreční fázi amelogenese, brzy však byla jeho exprese detekována během presekreční až po pozdní maturační fázi (Lee et al., 1996). Přítomnost ameloblastinové mRNA byla následně prokázána v buňkách Hertwigovy epitelové kořenové pochvy během cementogenese (Fong et al., 1996). Secernace ameloblastinu v raných fázích odontogenese byla zjištěna i u mezenchymálních preodontoblastů a mladých odontoblastů, kde ustává po vytvoření vrstvy plášťového dentinu (Fong et al., 1998). Exprese ameloblastinu odontoblasty se znovu objevuje při opravných procesech vyvolaných traumatickým zásahem (Spahr et al., 2002). Význam ameloblastinu však možná přesahuje roli při vývoji zubních tkání, neboť jeho exprese byla detekována v kostech během embryonálního i postnatálního vývoje obličejové části lebky potkanů (Spahr et al., 2006).

Ameloblasty secernují největší množství ameloblastinu během sekreční fáze, a to ve formě glykoproteinu o velikosti 65 kDa. Tato forma je však záhy degradována na řadu polypeptidů, v neporušené formě se nachází pouze v těsné blízkosti buněk. Vzniklé polypeptidy se liší svým dalším osudem. Stabilnější, pomaleji odbourávané fragmenty jsou odvozeny z N-konce proteinu. Vyskytují v celé šířce skloviny, jejich lokalizace je však omezena na prismatickou pochvu. Polypeptidy odvozené z C-konce jsou degradovány podstatně rychleji a jsou detekovatelné pouze v povrchových vrstvách skloviny. Od předchozí skupiny se odlišují také lokalizací, nacházejí se především v primatech a interprismatické substanci (Uchida et al., 1997; Nanci et al., 1998). Na tomto proteolytickém štěpení ameloblastinu se pravděpodobně podílí proteasa enamelysin, která je hojně produkována během sekreční fáze. V *in vitro* podmínkách štěpí ameloblastin na podobné fragmenty, jaké byly pozorány *in vivo* (Iwata et al., 2007).

Interakce

V případě ameloblastinu nebyla pomocí dvouhybridního systému dokázána interakce s žádnými extracelulárními strukturními proteiny skloviny, ani schopnost tvořit multimery (Paine et al., 1998b), zato byly navrženy potenciální interakce s několika transmembránovými proteiny (Wang et al., 2005a). Tato zjištění však vyžadují další revizi, nadějným kandidátem zůstává CD64, který také vykazoval interakci s amelogeninem. Tyto interakce s CD64 by mohly hrát roli při zpětné internalizaci extracelulárních proteinů ameloblasty během sekreční a maturční fáze (Shapiro et al., 2007).

5.2.2 Tuftelin

Snaha odhalit primární strukturu proteinů enamelinové frakce sklovinné ECM vedla ke sekvencování hovězí ameloblastové cDNA knihovny, při kterém byla nalezena sekvence tuftelinu. Následné imunohistologické detekce odhalily jeho lokalizaci ve vyvíjející se sklovině. Tuftelin je exprimován ameloblasty, a to především v oblasti dentinosklovinné hranice. Na základě úhrného aminokyselinového složení tohoto proteinu byl tuftelin identifikován jako složka histologických vláknitých útvarů nalezených ve zralé sklovině, anglicky označovaných *tufts*. Odtud byl odvozen název tuftelin (Deutsch et al., 1991).

Charakterizace

Dnes je známa též úplná sekvence hovězího genu (Bashir et al., 1997), myšího a prasečího genu (MacDougall et al., 1998) i genu lidského (Deutsch et al., 1998; Mao et al., 2001). Analýzou rozporů mezi sekvencovnými hovězími cDNA bylo odhaleno, že se tuftelin ve sklovině nachází minimálně ve dvou formách (označených A a B isoformy), lišící se různou délkou karboxylového konce. Rovněž byly detekovány nejméně 4 typy mRNA transkriptů vzniklých alternativním sestřihem (Bashir et al., 1997).

Nejdlejší isoforma tuftelinu se skládá z 390 aminokyselin, s bohatým zastoupením prolinu, glutamové a asparagové kyseliny, serinu a glycinu. Molekulová hmotnost před postranslačními úpravami byla odhadnuta na 44 kDa. Z postranslačních úprav se předpokládá glykosylace a fosforylace. Bioinformatická analýza sekvencí tuftelinu navrhla 2 N-glykosylační místa, 5 O-glykosylačních, 10 fosforylačních a nejméně jeden potenciální cysteinový můstek. Rozsáhlé oblasti v C-koncové oblasti proteinu mohou zaujímat konformaci coiled-coil. V sekvenci byl nalezen motiv EF-hand, který představuje potenciální vazebné místo pro vápník. Tyto charakteristiky jsou společné všem známým sekvencím (Mao et al., 2001).

Konzervace aminokyselinových sekvencí je vysoká, lidská sekvence se vyznačuje 88% identitou vzhledem k sekvencím myši a skotu. Evoluční konzervovanost tuftelinu byla potvrzena i experimentálně imunodetekcí prostřednictvím protilátek vůči tuftelinovým fragmentům ve sklovinných extraktech různých obratlovčích druhů, včetně žraloka (Deutsch et al., 1991).

Interakce

Pomocí kvasinkového dvojhybridního systému byla odhalena vzájemná interakce tuftelinových molekul mezi sebou. Pro tuto interakční schopnost je klíčový úsek v blízkosti C-konce (aminokyselinové zbytky 252 až 345) (Paine et al., 1996, 1998b). Obdobnou metodou byly nalezeny další proteiny interagující s tuftelinem, z nichž je nejvíce studován TIP39³ (Paine et al., 1998a). Vazby k TIP39 se účastní ten samý úsek, který je zodpovědný za multimerizaci. Kolokalizace obou proteinů byla dokázána v Tomesově výběžku sekretujících ameloblastů a nově vytvářené ECM (Paine et al., 2000a). V současné době je TIP39 považován za složku sestřihového komplexu s alternativním označením TFIP11 (Wen et al., 2005).

Sekrece

Nezodpovězenou otázkou zůstává sekrece tuftelinu, neboť protein postrádá N-koncovou signální sekvenci nutnou k průchodu majoritní sekreční dráhou. Byly navrženy alternativní možnosti, které předpokládají přítomnost alternativních signálních sekvencí na C-konci. Jiné jsou založeny na pozorování, že ameloblasty postupně odvrhují části buněčné membrány Tomesova výběžku (Paine et al., 2000a).

Funkce

Tradičně byla funkce tuftelinu kladena do vztahu k nukleaci krystalů hydroxyapatitu. Pro tento model svědčí časná exprese tuftelinu a obecně enamelinové frakce, která předchází sekreci amelogeninů. Dále lokalizace v dentinosklovinné hranici, kde růst sklovinných prismatic začíná, a v neposlední řadě kyselá povaha enamelinových proteinů a jejich experimentálně dokázaná afinita k hydroxyapatitu (Deutsch et al., 1995).

Exprese tuftelinu je zahájena ve velmi rané fázi vývoje, ve které se sklovinný orgán nachází ve stadiu pupenu. Jeho transkripty byly detekovány v preameloblastech i predontoblastech. Detekce tuftelinu imunologickými metodami vykazuje pozitivní výsledky až ve stadiu zubního pohárku. Transkripce genu pro tuftelin v časné fázi vývoje, kdy

³Tuftelin-Interacting-Protein o hmotnosti 39 kDa

ještě nedochází ke tvorbě dentinu ani skloviny, nasvědčuje domněnkám, že by tuftelin mohl zastávat více funkcí, např. v signalizaci mezi ektodermem a mesodermem (ZeichnerDavid et al., 1997). Tyto hypotézy podporuje nález exprese tuftelinu i v jiných tkáních, jako jsou ledviny, játra, plíce a varlata, kde se však vyskytuje jako vnitrobuněčný protein (MacDougall et al., 1998). Tyto nálezy byly potvrzeny a rozšířeny i na lidské tkáni (Deutsch et al., 2002). Otázkou zůstává, jakou zde tuftelin zastává funkci a jaká je jeho úloha při mineralizaci zubních tkání.

Přímý vliv na mineralizaci skloviny prokázalo vytvoření transgenní myši s nadměrnou expresí tuftelinu v ameloblastech. Sklovina těchto zvířat vykazovala hrubě pozměněnou strukturu (Luo et al., 2004).

5.2.3 Enamelin

Charakterizace

Enamelin byl poprvé klonován a plně sekvencován z prasečí cDNA knihovny. Jedná se přitom o dosud největší známý protein charakteristický pro ECM vyvíjející se skloviny. Po své sekreci v Tomesově výběžku ameloblastu je ve velmi krátké době proteolyticky rozštěpen na řadu fragmentů, které byly již dříve označeny jako enamelinové proteiny. Neštěpený prasečí enamelin se skládá z 1104 aminokyselin a po postranslační modifikaci se vyznačuje molekulovou hmotností 186 kDa (Hu et al., 1997a).

Dále byly klonovány a charakterizovány enamelinové cDNA myši (Hu et al., 1998) a člověka (Hu et al., 2000a). Není známo, že by u enamelinu probíhal alternativní sestřih. Rovněž byly sekvencovány geny u myši i člověka, přitom se ukázalo, že chromosomální poloha těchto genů leží v blízkosti ameloblastinového lokusu (Hu et al., 2001a).

Expresce, modifikace a degradace

Enamelin je exprimován především v ameloblastech, a to během sekreční, transiční i časně maturační fáze. Expresce enamelinu byla zjištěna i v buňkách Hertwigovy epitelové kořenové pochvy (Fukae et al., 2001). Pomocí EST nalezena i slabá expresce enamelinové mRNA v jiných buněčných typech než náleží zubním tkáním, její významnost však zůstává nejasná (Hu – Yamakoshi, 2003).

Enamelin je bohatě postranslačně modifikován, a to fosforylací (celkem 10 potenciálních míst) a N-glykosylací (5 potenciálních míst). Biochemická charakterizace 32 kDa fragmentu odhalila, že se v něm v těsné blízkosti nalézají 3 rozvětvené glykosidické struktury. Tato nahromadění jsou neobyklá a jejich význam u enamelinu zůstává neznámý. (Yamakoshi et al., 1998).

Nejrozsáhlejší modifikací je však proteolytické štěpení, které je pravděpodobně provedeno enamelysinem (matrixovou metaloproteasou 20). V těsné blízkosti ameloblastů byly detekovány fragmenty o velikosti 155, 142 a 89 kDa, které vznikly odštěpením C-konce původně 186 kDa proteinu. Tyto fragmenty jsou dále štěpeny na menší, jejichž zastoupení roste se stářím sekretované ECM, tedy směrem k dentinoskloviné hranici (Hu et al., 1997a).

Vyjímečný je fragment o velikosti 32 kDa, který již dále není štěpen enamelysinem (Yamakoshi et al., 2006) a naopak se hromadí v prismatické a interprismatické oblasti mineralizující ECM. Tento kyselý 32 kDa enamelinový peptid vykazuje silnou vazbu k hydroxyapatitovým krystalům, což se projevuje inhibicí jejich růstu v roztoku in vitro (Doi et al., 1984). Extrakce jednotlivých fragmentů enamelinu ze skloviny, provedená různými činidly, poukázala na jejich odlišnou fyzikálně-chemickou charakteristiku a patrně i odlišnou lokalizaci (Brookes et al., 2002).

Funkce

Přestože funkce enamelinových fragmentů není známa, lze spekulovat, že díky své rozdílné lokalizaci během vývoje mohou zastávat rozdílné role. Možná funkce 32 kDa enamelinu by mohla souviset s nukleací hydroxyapatitu či modulací růstu jeho krystalitů, jak naznačily experimenty in vitro. Směs 32 kDa enamelinu a amelogeninu projevila silné nukleační schopnosti, zatímco samotný amelogenin spíše inhibiční účinky. Důležitým faktorem zde ovšem byla adsorbce obou proteinů do želatinového gelu, protože oba dva proteiny působí v roztoku silně inhibičně na tvorbu a růst krystalů. (Bouropoulos – Moradian-Oldak, 2004).

Mutace v genu pro enamelin se projevují jako různé formy hypoplastické amelogenesis imperfecta (Hu – Yamakoshi, 2003), což svědčí o nezbytnosti funkčního proteinu pro zdárný vývoj zubní skloviny.

5.2.4 Amelotin

Dopusud posledním objeveným extracelulárním proteinem spjatým se zubní sklovinou je amelotin. Poprvé byl nalezen u myší, kde byla objevena exprese amelotinových mRNA v ameloblastech během maturační fáze amelogenese (Iwasaki et al., 2005).

Charakterizace

Následně byla klonována a sekvencována potkaní a prasečí amelotinová cDNA, připraven rekombinantní protein a provedena imunohistologická lokalizace in situ. Amelotin

byl detekován v basální lamině produkované ameloblasty po ukončení sekreční fáze, v tenké vrstvě přilehlé skloviny a v basální lamině spojovacího epitelu. Navíc byla detekována slabá exprese amelotinové mRNA v ozubicovém vazivu, dásni, brzlíku a plicích (Moffatt et al., 2006).

Sekvence myšího amelotinu je dlouhá 213 aminokyselin a bohatá na prolin, leucin, glutamin a treonin. Hmotnost proteinu byla odhadnuta na 22 kDa. Bioinformatická studie objevila orthology v genomových databázích člověka, šimpanze, makaka, psa a oposuma. Všechny sekvence vykazují relativně vysokou konzervovanost. Naopak nebyly nalezeny odpovídající orthology u ptáků, plazů, obojživelníků a ryb, což je vzhledem k ostatním sklovinným proteinům neobvyklé. Gen pro amelotin byl v genomu člověka lokalizován do blízkosti lokusů ameloblastinu a enamelinu. Z postranlační modifikací byly předpokládány O-glykosylace a fosforylace (Iwasaki et al., 2005; Moffatt et al., 2006).

Funkce

Vzhledem k lokalizaci amelotinu v basální lamině ameloblastů a spojovacího epitelu se nabízí spekulace o potenciální funkci proteinu při adhezi těchto lamin k minerálnímu povrchu skloviny (Moffatt et al., 2006).

5.3 Proteasy

V extracelulární matrix mineralizujících tkání se nalézá řada proteas, enzymů s hydrolytickou aktivitou štepících peptidické vazby. Jejich úkolem jsou specifické úpravy strukturních proteinů, nebo jejich úplné odstranění a degradace během mineralizace ECM. Proteolytická úprava proteinů mezibuněčné hmoty zubní skloviny, amelogeninu, ameloblastinu a enamelinu, následuje bezprostředně po jejich vyloučení secernujícími ameloblasty. Neštěpené proteiny lze nalézt pouze v jejich bezprostřední blízkosti.

Ve starších vrstvách mineralizující matrix se hromadí některé z fragmentů štěpených proteinů. Produkty štěpení jsou později dále degradovány proteasami nebo internalizovány zpět buňkami. Téměř veškerá organická ECM je společně s vodou resorbována během maturační fáze vývoje skloviny.

Proteasy nalezené v zubní sklovině byly charakterizovány podle svých vlastností do rodiny metaloproteas a serinových proteas (Overall – Limeback, 1988). Proteasy tvoří velmi malou část proteinové frakce skloviny, přesto jsou pro její zdárný vývoj nepostradatelné.

Nejhojněji je zastoupena metaloproteasa enamelysin a serinová proteasa kalikrein-4. Obě proteasy zastávají odlišnou funkci, i jejich exprese a sekrece probíhá v odlišných

vývojových fázích mineralizace skloviny (Bartlett – Simmer, 1999).

5.3.1 Enamelysin

Enamelysin je též označován jako matrixová metaloproteasa-20 (MMP-20). Poprvé byl klonován a charakterizován z prasečího sklovinného orgánu (Bartlett et al., 1996), následně z lidských odontoblastů (Llano et al., 1997), myších odontoblastů a ameloblastů (Caterina et al., 2000), hovězích (Den Besten et al., 1998), kajmaních a drápatčích tkání (Shintani et al., 2007)

Charakterizace

Ze systematického hlediska se jedná o endopeptidasu náležící do strukturní rodiny matrixových metaloproteas (MMPs). Ty se vyznačují přítomností zinkového ligandu v aktivním centru, které dále obsahuje katalytický glutamát v lineárním sekvenčním motivu HEXXHXXGXXH (kde X značí libovolnou aminokyselinu). Pro tyto proteasy je typická doménová struktura, sestávající se ze signální N-koncové aminokyselinové sekvence, následuje propeptid, katalytická doména, spojovací linker a nejméně jedna C-koncová doména homologní k hemopexinu⁴.

Trojrozměrná struktura molekuly byla navržena pomocí homologního modelování na základě struktury příbuzné kolagenasy (Bartlett – Simmer, 1999). Pro MMPs byl navržen společný způsob inaktivace proenzymu pomocí cysteinového přepínače (cystein switch), který je tvořen cysteinem v propeptidové doméně interagujícím s atomem zinku katalytického centra. Tím je aktivní centrum enzymu stericky blokováno (Wart – Birkedal-Hansen, 1990). Aktivace peptidasové funkce enamelysinu probíhá autolytickým štěpením, které bylo detekováno in vitro u rekombinantního enzymu. Velikosti takto vzniklých fragmentů se shodují s velikostmi nalezenými ve sklovinných extraktech (Li et al., 1999).

Hmotnost intaktního proenzymu činí 56 kDa (483 aminokyselin), po odštěpení signální sekvence (22 aminokyselin) a propeptidu (85 aminokyselin) činí 42 kDa. Pomocí zymografie byly nalezeny dvě enzymaticky aktivní frakce enamelysinu o hmotnostech 40 a 45 kDa, které se patrně liší ve velikosti C-koncové hemopexinové domény, dané auto-proteolýsou. Enzymatická aktivita enamelysinu je závislá na přítomnosti vápníkových kationtů (Bartlett et al., 1998; Fukae et al., 1998).

⁴Hemopexin je extracelulární protein obsažený v krevní plasmě s vysokou afinitou k hemu (Tolosano – Altruda, 2002).

Expres a funkce

Enamelysin je exprimován ameloblasty sklovinného orgánu a odontoblasty zubní pulpy, a to především v sekreční fázi amelogenese, v pozdějších fázích jeho produkce poklesá (Fukae et al., 1998; Caterina et al., 2000; Nagano et al., 2003). Substrát enzymu představují amelogenin, enamelin a ameloblastin, čemuž nasvědčuje i časová souslednost sekrece těchto proteinů. Enamelysin je považován za hlavní proteasu upravující amelogenin. In vitro bylo potvrzeno štěpení na stejných pozicích, jaké byly pozorovaných in vivo (Ryu et al., 1999). Obdobně bylo dokázáno štěpení prasečího ameloblastinu in vitro, vzniklé fragmenty se shodují s pozorovanými in vivo (Iwata et al., 2007). Byla prokázána rovněž schopnost štěpit aggrekan a COMP⁵ (Stracke et al., 2000), které však nejsou složky skloviny.

Deficience

O nezbytnosti enamelysinu v průběhu zdárné amelogeneze svědčí fenotyp myši s deletovaným genem pro tuto proteasu, který se vyznačuje hypoplastickou, odlupující se sklovinou s defektní strukturou a pozměněnou morfologií sklovinného orgánu v průběhu jeho vývoje (Caterina et al., 2002). S mutacemi lidského genu pro enamelysin je spojována lidská autosomální recesivní hypomaturační amelogenesis imperfecta (Ozdemir et al., 2005), člen skupiny dědičných vývojových defektů skloviny.

5.3.2 Kallikrein-4

Kallikrein-4 (KLK-4) je též známý pod označeními EMSP1 (Enamel Matrix Serine Proteinase 1), prostasa, PRSS17 (Serine Proteinase 17) a KLK-L1 (Kallikrein-Like proteinase 1).

Kallikreinová proteasová rodina

Tkáňové kallikreiny tvoří konzervovanou podrodinu serinových proteas příbuzných trypsinu s obdobným katalytickým mechanismem. V reakčním centru enzymů se nachází katalytická triáda tvořená serinem, histidinem a asparagovou kyselinou, která provádí acidobazické štěpení peptidické vazby. V molekule se dále nachází 10 – 12 pozičně konzervovaných cysteinových zbytků vytvářejících disulfidické můstky. Je známo 15 členů rodiny lidských tkáňových kallikreinů, jejichž geny vytvářejí v lidském genomu kallikreinový lokus na pozici 19q13.3 – q13.4. Myši kallikreinová rodina zahrnuje 24 a prasečí

⁵Cartilage Oligomeric Matrix Protein

13 členů (Fernando et al., 2007). Expres kallikreinů je různorodá, byly detekovány v nejrůznějších tkáních jako je slinivka, ledviny, prostata, slinné žlázy, mléčné žlázy, pokožka, brzlík a nervová tkáň. Účastní se řady fyziologických procesů jako jsou zá-
nětlivé reakce, regulace krevního tlaku, remodelace extracelulární matrix, regulačních a signalizačních pochodů, apoptosy či nádorových invazí (Yousef – Diamandis, 2001; Fernando et al., 2007).

Charakterizace

Kallikrein-4 byl poprvé izolován z prasečí skloviny a charakterizován pomocí SDS-PAGE jako proteasa vyskytující se ve dvou formách o hmotnosti 30 a 34 kDa. Následně byl izolován z prasečí cDNA knihovny a označen jako EMSP1 (Tanabe, 1984). Nezávisle byla cDNA klonována z lidských zubů (Simmer et al., 2000), lidské prostaty (Nelson et al., 1999) a charakterizována myší cDNA (Hu et al., 2000b). Kalikrein-4 je secernován ve formě neaktivního zymogenu, který je aktivován odštěpením signální sekvence a krátkého propeptidu. Aktivní protein má délku 224 aminokyselin.

Prostorová struktura byla nejdříve modelována podle struktury trypsinu (Scully et al., 1998) a nedávno byla získána struktura lidského KLK-4 pomocí rentgenové strukturní analýzy, která odhalila přítomnost vazebného místa pro zinkový kationt. Tato zjištění vysvětlila citlivost KLK-4 na zinkové kationty, které ji inhibují. Znalost podrobné struktury též objasnila necitlivost proteasy k vápenatým kationtům (Debela et al., 2006). KLK-4 štěpí proteiny v pozicích za argininem a lysinem, bylo prokázáno štěpení kolagenů I, IV a fibrinogenu (Obiezu et al., 2006). Experimentálně bylo také potvrzeno štěpení amelogeninu a 32-kDa enamelinu, a to téměř úplné (Yamakoshi et al., 2006).

Expres a funkce

Expres v zubních tkáních probíhá nejdříve v odontoblastech během sekreční fáze, odkud je prostřednictvím buněčných výběžků odontoblastů sekretován do oblasti DEJ, tedy do blízkosti nejstarší vrstvy mineralizující extracelulární matrix. Posléze je masivně secernován ameloblasty během transiční a časné maturační fáze vývoje skloviny (Hu et al., 2000b). Kallikrein-4 je považován za hlavní proteasu, která má na svědomí odstranění organické složky skloviny během její maturace. V tomto období klesá obsah proteinové složky ze 30% na svou konečnou hladinu, a tím umožňuje její další mineralizaci. Deficience a mutace genu kallikreinu-4 působí defekty ve tvorbě zubní skloviny, klinicky recesivní hypomaturační amelogenesis imperfekta. KLK-4 je zcela nezbytný pro její zdárný vývoj (Hart et al., 2004).

Kallikrein-4 hraje významnou roli nejen při vývoji zubních tkání, ale je secernován i prostatickými buňkami do semenné tekutiny, odkud pramení alternativní název prostatasa. Zde hraje roli v regulačním mechanismech, které řídí hustotu ejakulátu (Obiezu et al., 2005).

Kapitola 6

Mineralizace skloviny

Tvorba a růst krystalů jsou ve své podstatě fyzikálně-chemické děje a tato skutečnost musí být zohledněna i při mineralizaci ECM. Z tohoto pohledu jsou na proteiny ECM mineralizující skloviny kladeny další požadavky, které shrne tato kapitola.

Mineralizace skloviny probíhá v dílčích fázích, které zahrnují

1. Secernaci proteinové ECM
2. Nukleaci krystalů
3. Růst a prodlužování krystalů
4. Odstranění proteinové ECM
5. Maturaci krystalů

Všechny tyto procesy probíhají v prostoru vymezeném dentinosklovinnou hranicí a vnitřním sklovinným epitelem, tvořeném ameloblasty. Toto uzavření je nutné pro dosažení přesycené koncentrace minerálních iontů, aby mohlo dojít ke krystalizaci a vzniku pevné fáze hydroxyapatitu a její stabilní existenci. Během amelogenese není, na rozdíl od mineralizace kolagenové ECM, kalcifikována žádná předvytvořená struktura. Secernace a organizace proteinové extracelulární matrix probíhá současně s nukleací krystalů. Na rozdíl od mineralizace v kolagenové ECM dochází k jejímu pozdějšímu odbourání. Není však odstraněna zcela, zlomek proteinové složky zůstává zachován. Zda zde plní nějakou úlohu není jasné. Jedna hypotéza navrhuje, že proteiny takto navázané na hranicích prismatic mohou zabraňovat rozšiřování prasklin v křehké minerální hmotě (Veis, 2003b).

Potenciální funkce strukturních proteinů ECM během amelogenese budou shrnuty v následujících odstavcích.

6.1 Nukleace krystalů

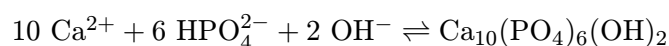
Není známo, jakým způsobem je vznik krystalů regulován, ani kde k němu přesně dochází. Jednotlivé hypotézy lokalizují nukleaci na molekuly dentinosklovinné hranice nebo přímo do prostoru sklovinné ECM. Není vyloučena ani možnost, že krystaly vznikají na buněčné membráně ameloblastů. Jako molekuly řídící a zajišťující nukleaci byly navrženy postupně všechny kyselé enamelinové proteiny, jako je tuftelin, enamelin a ameloblastin.

6.2 Modulace růstu krystalů

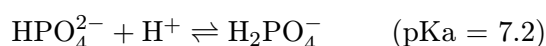
Krystaly hydroxyapatitu rostou ukládáním iontů, které probíhá silně anisotropně. V raných fázích převažuje růst v podélném směru, později během maturace probíhá především v příčném směru. Současný model (viz obr. 14), který se pokouší vysvětlit tento preferenční růst, je založen na amelogeninových nanosférách. Intaktní amelogenin tvoří nanosféry o průměru 20 nm, které se váží na podélnou stranu krystalů. Slouží tak především jako výplň, která zabraňuje splývání krystalů a udržuje jejich stálý rozestup. Amelogenin však podléhá velice brzy proteolytickému štěpení a přichází o hydrofilní teleopeptid. Tyto změny jistě ovlivňují strukturu nanosfér, předpokládá se, že vznikají hydrofobní agregáty stabilizující ECM. Během maturace dochází k masivnímu odbourávání proteinů, kdy jsou amelogeniny štěpeny a resorbovány. Uvolňují tak prostor další mineralizaci v příčném směru (Fincham et al., 1999). Role ostatních proteinů při modulaci růstu krystalů zůstává nejasná.

6.3 Protonový pufr

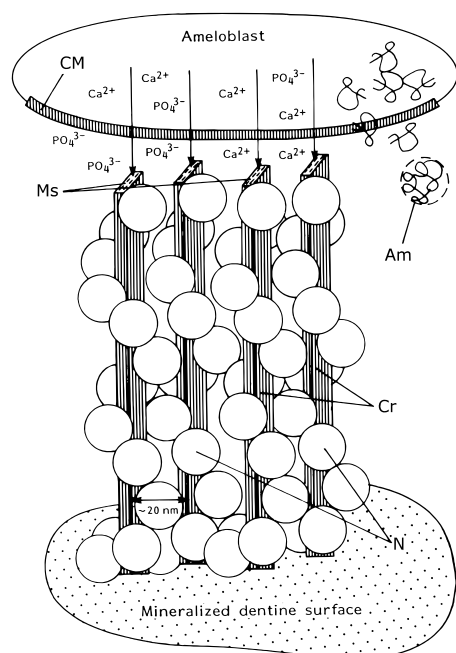
Uvážíme-li chemickou reakci vedoucí ke vzniku hydroxyapatitu, kterou vystihuje rovnice



je zřejmé, že při krystalizaci vzniká velké množství protonů, které je dále navýšeno porušením rovnováhy fosfátových aniontů



Aby mohla probíhat mineralizace výše uvedeným způsobem, je nutné tyto protony odstraňovat. Mechanismus stabilizující hladinu protonů není úplně známý. Pravděpodobně hlavní roli zastává hydrogenuhlíčitánový (bikarbonátový) pufrovací systém, ale zvýšená



Obrázek 14: Nanosféry a mineralizace. Současný model předpokládá růst krystalitů hydroxyapatitu (Cr) modulovaný amelogeninovým nanosférami (N). Nanosféry se formují z jednotlivých amelogeninových molekul (Am) a váží se na krystality, preferenčně na jejich podélné stěny ve směru krystalografické osy a a osy b . Během sekreční fáze amelogenese probíhá růst krystalitů především ve směru krystalografické osy c na příčné stěně krystalu (Ms). Rozestup mezi jednotlivými krystalitami činí 20 nm, což je i přibližná velikost amelogeninových nanosfér. Odbouráváním nanosfér se uvolňuje prostor pro růst ve směru krystalografických os a a b . Převzato z (Fincham – Simmer, 1997).

aktivita enzymu zajišťujících regeneraci hydrogenuhličitanu (anhydrasy) byla zjištěna až během maturační fáze. Nabízí se tak možnost, že by ve funkci pufru během sekreční fáze mohly působit proteiny ECM. V tomto smyslu se uvažuje vzhledem k zastoupení jednotlivých složek především o amelogeninu, případně albuminech (Simmer – Fincham, 1995).

6.4 Vápníkový pufr

Během sekreční fáze se nachází 85% vápenatých kationtů přítomných v ECM nematurované skloviny ve vázaném stavu. Toto množství však podle měřených disociačních konstant obsazuje pouze 25% přístupných vazebných míst. Je zřejmé, že proteinová extracelulární matrix silně pufruje k mineralizaci použitelný obsah vápníku. Účelem takové regulace je pravděpodobně zajistit, aby Ca^{2+} a HPO_4^{2-} krystalovaly do správné pevné fáze — hydroxyapatitu. Tyto ionty totiž mohou tvořit řadu různých krystalových mřížek o jiném sumárním složení, např. CaHPO_4 , $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nebo $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Hydroxyapatit sice představuje termodynamicky nejstabilnější modifikaci, kineticky je však upřednostněn vznik jiných fází (Simmer – Fincham, 1995).

Řada proteinů v ECM nematurované skloviny vykazuje afinitu k vápníku — amelogenin, ameloblastin, enamelin i tuftelin. Je nutné vzít v úvahu zastoupení těchto proteinů i jejich vazebné konstanty. Enamelinové a ameloblastinové fragmenty váží vápník s řá-

dově vyšší afinitou než amelogeniny, avšak jejich zastoupení v extracelulární matrix je také řádově menší (Yamakoshi et al., 2001). Zůstává nezodpovězenou otázkou, zda některý z proteinů plní tuto roli preferenčně či se jedná o globální vlastnost celé ECM.

Závěr

Přestože jsou struktura a vývoj skloviny dobře histologicky a embryologicky popsány, nejsou podrobně známy molekulární mechanismy, které zajišťují a řídí její vznik.

Biominalizace představuje komplikovaný proces zahrnující několik fází, ve kterých organická složka ECM řídí vznik a růst krystalů do specifického tvaru a velikosti. Ačkoliv byly proteiny ECM nematurované skloviny identifikovány a sekvencovány, díky alternativnímu sestřihu a proteolytickému štěpení vytváří během amelogenese napříč sklovinou rozdělení peptidových fragmentů, které se vyvíjí v prostoru i čase.

Přesná biologická funkce u většiny proteinů zůstává neznámá. Současný nanosférový model zdaleka neodpovídá na všechny otázky, které jsou v souvislosti s mineralizací kladeny.

Pokrok v poznání může přinést rozvoj experimentálních metod aplikovaných na tuto problematiku, jako je AFM a NMR s vysokým rozlišením. Tyto metody mohou pomoci v odhalení trojrozměrné struktury molekul a jejich komplexů, včetně jejich vzájemných interakcí a interakcí s hydroxyapatitovými krystaly.

Konečným cílem výzkumu je pochopení vzniku tohoto unikátního mineralizovaného materiálu, jakým sklovina bezesporu je. Těchto poznatků by v budoucnu mohlo být využito nejen na přípravu nové generace odontických náhrad, ale i speciálních kompozitních a keramických materiálů s nejrůznějším použitím.

Literatura

- ANFINSEN, C. B. Principles That Govern Folding of Protein Chains. *Science*. 1973, 181, 4096, s. 223–230. ISSN 0036-8075.
- BARTLETT, J. D. – SIMMER, J. P. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med*. January 1999, 10, 4, s. 425–441.
- BARTLETT, J. D. et al. Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene*. December 1996, 183, 1, s. 123–128. ISSN 0378-1119.
- BARTLETT, J. D. et al. Enamelysin mRNA displays a developmentally defined pattern of expression and encodes a protein which degrades amelogenin. *Connective Tissue Research*. 1998, 39, 1, s. 405–413. ISSN 0300-8207.
- BASHIR, M. M. – ABRAMS, W. R. – ROSENBLOOM, J. Molecular cloning and characterization of the bovine tuftelin gene. *Archives of Oral Biology*. July 1997, 42, 7, s. 489–496.
- BONASS, W. A. et al. Molecular Cloning and DNA Sequence of Rat Amelogenin and a Comparative Analysis of Mammalian Amelogenin Protein Sequence Divergence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. January 1994, 198, 2, s. 755–763.
- BOSMAN, F. T. – STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *Journal of Pathology*. July 2003, 200, 4, s. 423–428. ISSN 0022-3417.
- BOUROPOULOS, N. – MORADIAN-OLDAK, J. Induction of Apatite by the Cooperative Effect of Amelogenin and the 32-kDa Enamelin. *J Dent Res*. April 2004, 83, 4, s. 278–282.
- BROOKES, S. J. et al. Enamelin compartmentalization in developing porcine enamel. *Connective Tissue Research*. April 2002, 43, 2, s. 477–481. ISSN 0300-8207.
- BROOKES, S. J. et al. Intracellular nanosphere subunit assembly as revealed by amelogenin molecular cross-linking studies. *European Journal of Oral Sciences*. 2006, 114, s. 280–284. ISSN 0909-8836.
- BUTLER, W. T. – RITCHIE, H. H. – BRONCKERS, A. L. J. J. Extracellular matrix proteins of dentine. *Dental Enamel Ciba Foundation Symposia*. 1997, 205, s. 107–117. ISSN 0300-5208.
- CATERINA, J. et al. Cloning, characterization, and expression analysis of mouse enamelysin. *J Dent Res*. September 2000, 79, 9, s. 1697–1703.
- CATERINA, J. J. et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. December 2002, 277, 51, s. 49598–49604. ISSN 0021-9258.

- CERNY, R. et al. A novel gene expressed in fiat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *Journal of Bone and Mineral Research*. July 1996, 11, 7, s. 883–891. ISSN 0884-0431.
- CHEN, E. et al. The Small Bovine Amelogenin LRAP Fails to Rescue the Amelogenin Null Phenotype. *Calcified Tissue International*. October 2003, 73, 5, s. 487–495.
- DEBELA, M. et al. Crystal Structures of Human Tissue Kallikrein 4: Activity Modulation by a Specific Zinc Binding Site. *Journal of Molecular Biology*. October 2006, 362, 5, s. 1094–1107.
- DELGADO, S. et al. Cloning, sequencing, and expression of the amelogenin gene in two scincid lizards. *Journal of Dental Research*. February 2006, 85, 2, s. 138–143. ISSN 0022-0345.
- DEN BESTEN, P. K. – PUNZI, J. S. – LI, W. Purification and sequencing of a 21 kDa and 25 kDa bovine enamel metalloproteinase. *European Journal of Oral Sciences*. 1998, 106, s. 345–349. ISSN 0909-8836.
- DEUTSCH, D. et al. Sequencing of bovine enamelin ("tuftelin") a novel acidic enamel protein. *J. Biol. Chem.* August 1991, 266, 24, s. 16021–16028.
- DEUTSCH, D. et al. The Enamelin (tuftelin) Gene. *International Journal of Developmental Biology*. February 1995, 39, 1, s. 135–143. ISSN 0214-6282.
- DEUTSCH, D. et al. Tuftelin—aspects of protein and gene structure. *Eur J Oral Sci*. 1998, 106 Suppl 1.
- DEUTSCH, D. et al. The human tuftelin gene and the expression of tuftelin in mineralizing and nonmineralizing tissues. *Connective Tissue Research*. April 2002, 43, 2, s. 425–434. ISSN 0300-8207.
- DEUTSCH, D. et al. Amelogenin, a major structural protein in mineralizing enamel, is also expressed in soft tissues: brain and cells of the hematopoietic system. *European Journal of Oral Sciences*. 2006, 114, s. 183–189. ISSN 0909-8836.
- DIEKWISCH, T. G. H. et al. Membranes, minerals, and proteins of developing vertebrate enamel. *Microscopy Research and Technique*. December 2002, 59, 5, s. 373–395. ISSN 1059-910X.
- DOI, Y. et al. Inhibition of seeded growth of enamel apatite crystals by amelogenin and enamelin proteins in vitro. *J Dent Res*. February 1984, 63, 2, s. 98–105.
- DU, C. et al. Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons. *Science*. March 2005, 307, 5714, s. 1450–1454. ISSN 0036-8075.
- FENEIS, H. – DAUBER, W. *Pocket Atlas of Human Anatomy: Based on the International Nomenclature*. Thieme, 2000.
- FERNANDO, S. et al. Porcine kallikrein gene family: Genomic structure, mapping, and differential expression analysis. *Genomics*. March 2007, 89, 3, s. 429–438.
- FINCHAM, A. G. – MORADIANOLDAK, J. Amelogenin Post-translational Modifications: Carboxy-Terminal Processing and the Phosphorylation of Bovine and Porcine "TRAP" and "LRAP" Amelogenins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. November 1993, 197, 1, s. 248–255.
- FINCHAM, A. G. – SIMMER, J. P. Amelogenin proteins of developing dental enamel. *Dental Enamel Ciba Foundation Symposia*. 1997, 205, s. 118–134. ISSN 0300-5208.

- FINCHAM, A. G. et al. Evidence for Amelogenin Nanospheres As Functional Components of Secretory-stage Enamel Matrix. *Journal of Structural Biology*. Jul-aug 1995, 115, 1, s. 50–59. ISSN 1047-8477.
- FINCHAM, A. G. – MORADIAN-OLDAK, J. – SIMMER, J. P. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *Journal of Structural Biology*. June 1999, 126, 3, s. 270–299. ISSN 1047-8477.
- FONG, C. D. – SLABY, I. – HAMMARSTROM, L. Amelin: An enamel-related protein, transcribed in the cells of epithelial root sheath. *Journal of Bone and Mineral Research*. July 1996, 11, 7, s. 892–898. ISSN 0884-0431.
- FONG, C. D. et al. Sequential expression of an amelin gene in mesenchymal and epithelial cells during odontogenesis in rats. *European Journal of Oral Sciences*. 1998, 106, s. 324–330. ISSN 0909-8836.
- FUKAE, M. – TANABE, T. ⁴⁵Ca-labeled Proteins Found in Porcine Developing Dental Enamel at an Early Stage of Development. *Adv Dent Res*. December 1987a, 1, 2, s. 261–266.
- FUKAE, M. et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. *J Dent Res*. August 1998, 77, 8, s. 1580–1588.
- FUKAE, M. et al. Immunoblot detection and expression of enamel proteins at the apical portion of the forming root in porcine permanent incisor tooth germs. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2001, 19, 4, s. 236–243. ISSN 0914-8779.
- FUKAE, M. – TANABE, T. Nonamelogenin components of porcine enamel in the protein fraction free from the enamel crystals. *Calcified Tissue International*. September 1987b, 40, 5, s. 286–293.
- FUKUMOTO, S. et al. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *Journal of Cell Biology*. December 2004, 167, 5, s. 973–983. ISSN 0021-9525.
- FUKUMOTO, S. et al. Essential roles of ameloblastin in maintaining ameloblast differentiation and enamel formation. *Cells Tissues Organs*. 2005, 181, 3, s. 189–195. ISSN 1422-6405.
- GANSS, B. – KIM, R. H. – SODEK, J. Bone sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. February 1999, 10, 1, s. 79–98. ISSN 1045-4411.
- GESTRELIUS, S. – LYGSTADAAS, S. P. – HAMMARSTRÅSM, L. Emdogain - periodontal regeneration based on biomimicry. *Clinical Oral Investigations*. June 2000, 4, 2, s. 120–125.
- GIBSON, C. et al. Structure and Expression of the Bovine Amelogenin Gene. *Biochemistry*. January 1991, 30, 4, s. 1075–1079. ISSN 0006-2960.
- GIBSON, C. W. et al. Amelogenin-deficient Mice Display an Amelogenesis Imperfecta Phenotype. *J. Biol. Chem*. August 2001, 276, 34, s. 31871–31875.
- GOTO, Y. et al. Molecular-conformation of Porcine Amelogenin in Solution - 3 Folding Units At the N-terminal, Central, and C-terminal Regions. *Journal of Biochemistry*. January 1993, 113, 1, s. 55–60. ISSN 0021-924X.
- HABELITZ, S. et al. Self-assembly and effect on crystal growth of the leucine-rich amelogenin peptide. *European Journal of Oral Sciences*. 2006, 114, s. 315–319. ISSN 0909-8836.

- HAMMARSTROM, L. – HEIJL, L. – GESTRELIUS, S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *Journal of Clinical Periodontology*. September 1997, 24, 9, s. 669–677. ISSN 0303-6979.
- HART, P. S. et al. Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet*. July 2004, 41, 7, s. 545–549.
- HU, C. C. et al. Cloning, DNA sequence, and alternative splicing of opossum amelogenin mRNAs. *Journal of Dental Research*. October 1996, 75, 10, s. 1728–1734. ISSN 0022-0345.
- HU, C. C. et al. Cloning and characterization of porcine enamelin mRNAs. *J Dent Res*. November 1997a, 76, 11, s. 1720–1729.
- HU, C. C. et al. Sheathlin: cloning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J Dent Res*. February 1997b, 76, 2, s. 648–657.
- HU, C. C. et al. Murine enamelin: cDNA and derived protein sequences. *Connective Tissue Research*. 1998, 39, 1, s. 351–365. ISSN 0300-8207.
- HU, C. C. et al. Cloning human enamelin cDNA, chromosomal localization, and analysis of expression during tooth development. *J Dent Res*. April 2000a, 79, 4, s. 912–919.
- HU, J. C. et al. Localization of EMSP1 expression during tooth formation and cloning of mouse cDNA. *J Dent Res*. January 2000b, 79, 1, s. 70–76.
- HU, J. C. et al. Cloning and characterization of the mouse and human enamelin genes. *J Dent Res*. March 2001a, 80, 3, s. 898–902.
- HU, J. C. C. et al. A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. *European Journal of Oral Sciences*. April 2001b, 109, 2, s. 125–132. ISSN 0909-8836.
- HU, J.-C. – YAMAKOSHI, Y. ENAMELIN AND AUTOSOMAL-DOMINANT AMELOGENESIS IMPERFECTA. *Crit Rev Oral Biol Med*. November 2003, 14, 6, s. 387–398.
- HUQ, N. L. et al. A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4. *Archives of Oral Biology*. July 2005, 50, 7, s. 599–609. ISSN 0003-9969.
- IOZZO, R. V. Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Annual Review of Biochemistry*. 1998, 67, s. 609–652. ISSN 0066-4154.
- ISHIYAMA, M. et al. Amelogenin protein in tooth germs of the snake *Elaphe quadrivirgata*, immunohistochemistry, cloning and cDNA sequence. *Archives of Histology and Cytology*. December 1998, 61, 5, s. 467–474. ISSN 0914-9465.
- IWASAKI, K. et al. Amelotin—a Novel Secreted, Ameloblast-specific Protein. *J Dent Res*. December 2005, 84, 12, s. 1127–1132.
- IWASE, M. et al. The amelogenin loci span an ancient pseudoautosomal boundary in diverse mammalian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. April 2003, 100, 9, s. 5258–5263. ISSN 0027-8424.
- IWATA, T. et al. Processing of Ameloblastin by MMP-20. *J Dent Res*. February 2007, 86, 2, s. 153–157.

- JANONES, D. S. – MASSA, L. F. – ARANA-CHAVEZ, V. E. Immunocytochemical examination of the presence of amelogenin during the root development of rat molars. *Archives of Oral Biology*. May 2005, 50, 5, s. 527–532.
- KANNICHT, C. (Ed.). *Posttranslational Modifications of Proteins*. Humana Press, 2002.
- KOOLMAN, J. – RÖHM, K.-H. *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme, 2005.
- KREBSBACH, P. H. et al. Full-length Sequence, Localization, and Chromosomal Mapping of Ameloblastin. *J. Biol. Chem.* February 1996, 271, 8, s. 4431–4435.
- KREIS, T. – VALE, R. (Ed.). *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins*. A Sambrook & Toozee Publication at Oxford University Press, 1999.
- LACERDA-PINHEIRO, S. et al. Early in vivo and in vitro effects of amelogenin gene splice products on pulp cells. *European Journal of Oral Sciences*. 2006, 114, s. 232–238. ISSN 0909-8836.
- LAGUNEZ-OTERO, J. – DIAZ-VILLASENOR, A. – RENUGOPALAKRISHNAN, V. Specialized biology from tandem beta-turns. *Archives of Medical Research*. May-jun 2002, 33, 3, s. 245–249. ISSN 0188-4409.
- LAU, E. C. et al. Alternative Splicing of the Mouse Amelogenin Primary Rna Transcript Contributes To Amelogenin Heterogeneity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. November 1992, 188, 3, s. 1253–1260. ISSN 0006-291X.
- LE, T. Q. et al. Comparative calcium binding of leucine-rich amelogenin peptide and full-length amelogenin. *European Journal of Oral Sciences*. 2006, 114, s. 320–326. ISSN 0909-8836.
- LEE, S. K. et al. Ameloblastin expression in rat incisors and human tooth germs. *International Journal of Developmental Biology*. December 1996, 40, 6, s. 1141–1150. ISSN 0214-6282.
- LESK, A. *Introduction to protein architecture: The structural biology of proteins*. Oxford University Press, 2001.
- LI, W. et al. Activation of recombinant bovine matrix metalloproteinase-20 and its hydrolysis of two amelogenin oligopeptides. *European Journal of Oral Sciences*. October 1999, 107, 5, s. 352–359. ISSN 0909-8836.
- LI, Y. et al. Comparison of body weight and gene expression in amelogenin null and wild-type mice. *European Journal of Oral Sciences*. 2006, 114, s. 190–193. ISSN 0909-8836.
- LLANO, E. et al. Identification and Structural and Functional Characterization of Human Enamelysin (MMP-20). *Biochemistry*. December 1997, 36, 49, s. 15101–15108. ISSN 0006-2960.
- LUO, W. et al. In vivo overexpression of tuftelin in the enamel organic matrix. *Cells Tissues Organs*. 2004, 177, 4, s. 212–220. ISSN 1422-6405.
- LYARUU, D. M. et al. Derived protein and cDNA sequences of hamster amelogenin. *European Journal of Oral Sciences*. 1998, 106, s. 299–307. ISSN 0909-8836.
- MACDOUGALL, M. et al. Ameloblastin gene (AMBN) maps within the critical region for autosomal dominant amelogenesis imperfecta at chromosome 4q21. *Genomics*. April 1997a, 41, 1, s. 115–118. ISSN 0888-7543.

- MACDOUGALL, M. et al. Cloning, characterization, and tissue expression pattern of mouse tuftelin cDNA. *J Dent Res.* December 1998, 77, 12, s. 1970–1978.
- MACDOUGALL, M. et al. Dentin Phosphoprotein and Dentin Sialoprotein Are Cleavage Products Expressed from a Single Transcript Coded by a Gene on Human Chromosome 4. DENTIN PHOSPHOPROTEIN DNA SEQUENCE DETERMINATION. *J. Biol. Chem.* 1997b, 272, 2, s. 835–842. doi: 10.1074/jbc.272.2.835.
- MALÍNSKÝ, J. *Histologie a embryologie orofaciální oblasti.* Vydavatelství University Palackého, 1995.
- MAO, Z. et al. The human tuftelin gene: cloning and characterization. *Gene.* November 2001, 279, 2, s. 181–196.
- MARDH, C. K. et al. Human ameloblastin gene: genomic organization and mutation analysis in amelogenesis imperfecta patients. *European Journal of Oral Sciences.* February 2001, 109, 1, s. 8–13. ISSN 0909-8836.
- MOFFATT, P. et al. Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium. *Biochemical Journal.* October 2006, 399, s. 37–46. ISSN 0264-6021.
- MORADIAN-OLDAK, J. et al. Self-Assembly Properties of Recombinant Engineered Amelogenin Proteins Analyzed by Dynamic Light Scattering and Atomic Force Microscopy. *Journal of Structural Biology.* July 2000, 131, 1, s. 27–37.
- NAGANO, T. et al. Relative Levels of mRNA Encoding Enamel Proteins in Enamel Organ Epithelia and Odontoblasts. *J Dent Res.* December 2003, 82, 12, s. 982–986.
- NAKAMURA, Y. et al. The induction of reparative dentine by enamel proteins. *International Endodontic Journal.* May 2002, 35, 5, s. 407–417. ISSN 0143-2885.
- NAKAMURA, Y. et al. Ameloblastin fusion protein enhances pulpal healing and dentin formation in porcine teeth. *Calcified Tissue International.* May 2006, 78, 5, s. 278–284. ISSN 0171-967X.
- NANCI, A. et al. Comparative Immunochemical Analyses of the Developmental Expression and Distribution of Ameloblastin and Amelogenin in Rat Incisors. *J. Histochem. Cytochem.* August 1998, 46, 8, s. 911–934.
- NELSON, P. S. et al. Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *PNAS.* March 1999, 96, 6, s. 3114–3119.
- OBIEZU, C. V. et al. Human kallikrein 4: enzymatic activity, inhibition, and degradation of extracellular matrix proteins. *Biological Chemistry.* June 2006, 387, 6, s. 749–759. ISSN 1431-6730.
- OBIEZU, C. V. et al. Human Kallikrein 4: Quantitative Study in Tissues and Evidence for Its Secretion into Biological Fluids. *Clin Chem.* August 2005, 51, 8, s. 1432–1442.
- OIDA, S. et al. Amelogenin gene expression in porcine odontoblasts. *Journal of Dental Research.* February 2002, 81, 2, s. 103–108. ISSN 0022-0345.
- OLSEN, B. – NINOMIYA, Y. *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins,* chapter Collagens, s. 380–408. A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press, 1999.

- OOBATAKE, M. et al. Thermal denaturation of a recombinant mouse amelogenin: Circular dichroism and differential scanning calorimetric studies. *Proteins-structure Function and Bioinformatics*. February 2006, 62, 2, s. 461–469. ISSN 0887-3585.
- OVERALL, C. M. – LIMEBACK, H. Identification and Characterization of Enamel Proteinases Isolated From Developing Enamel - Amelogeninolytic Serine Proteinases Are Associated With Enamel Maturation in Pig. *Biochemical Journal*. December 1988, 256, 3, s. 965–972. ISSN 0264-6021.
- OZDEMIR, D. et al. MMP20 Active-site Mutation in Hypomaturation Amelogenesis Imperfecta. *J Dent Res*. November 2005, 84, 11, s. 1031–1035.
- PAINE, C. T. – PAINE, M. L. – SNEAD, M. L. Identification of tuftelin- and amelogenin-interacting proteins using the yeast two-hybrid system. *Connective Tissue Research*. 1998a, 39, 1, s. 257–267. ISSN 0300-8207.
- PAINE, C. T. et al. A Tuftelin-interacting Protein (TIP39) Localizes to the Apical Secretory Pole of Mouse Ameloblasts. *J. Biol. Chem*. July 2000a, 275, 29, s. 22284–22292.
- PAINE, M. L. – DEUTSCH, D. – SNEAD, M. L. Carboxyl-region of tuftelin mediates self-assembly. *Connective Tissue Research*. 1996, 35, 1, s. 211–&. ISSN 0300-8207.
- PAINE, M. L. et al. Protein-to-protein interactions: criteria defining the assembly of the enamel organic matrix. *J Dent Res*. March 1998b, 77, 3, s. 496–502.
- PAINE, M. L. et al. Enamel Biomineralization Defects Result from Alterations to Amelogenin Self-Assembly,. *Journal of Structural Biology*. December 2000b, 132, 3, s. 191–200.
- PAINE, M. L. et al. A Transgenic Animal Model Resembling Amelogenesis Imperfecta Related to Ameloblastin Overexpression. *J. Biol. Chem*. May 2003, 278, 21, s. 19447–19452.
- PETSKO, G. – RINGE, D. *Protein Structure and Function*. Blackwell Pub., 2004.
- PROVENZA, D. – SEIBEL, W. *Oral histology:Inheritance and development*. Lea & Fabiger, 1986.
- RAVINDRANATH, R. M. – MORADIAN-OLDAK, J. – FINCHAM, A. G. Tyrosyl Motif in Amelogenins Binds N-Acetyl-D-glucosamine. *J. Biol. Chem*. January 1999, 274, 4, s. 2464–2471.
- RENUGOPALAKRISHNAN, V. et al. Tooth Enamel Protein, Amelogenin, Has A Probable Beta-spiral Internal Channel, Gln112-leu138, Within A Single Polypeptide-chain - Preliminary Molecular Mechanics and Dynamics Studies. *Biopolymers*. January 1989, 28, 1, s. 297–303. ISSN 0006-3525.
- RIOS, H. et al. DMP1 is essential for osteocyte formation and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2005, Oct-Dec;5(4), s. 325–7.
- ROBINSON, C. et al. Enamel maturation. *Dental Enamel Ciba Foundation Symposia*. 1997, 205, s. 156–174. ISSN 0300-5208.
- ROWE, P. S. N. et al. MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minihibin. *Bone*. February 2004, 34, 2, s. 303–319. ISSN 8756-3282.
- RYU, O. H. et al. Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. *J Dent Res*. March 1999, 78, 3, s. 743–750.

- SALIDO, E. C. et al. The Human Enamel Protein Gene Amelogenin Is Expressed From Both the X-chromosomes and the Y-chromosomes. *American Journal of Human Genetics*. February 1992, 50, 2, s. 303–316. ISSN 0002-9297.
- SASAKI, T. *Cell Biology of Tooth Enamel Formation*. Karger, 1990.
- SCULLY, J. L. et al. Enamel matrix serine proteinase 1: Stage-specific expression and molecular modeling. *Connective Tissue Research*. 1998, 39, 1, s. 415–426. ISSN 0300-8207.
- SHAPIRO, J. L. et al. Cellular uptake of amelogenin, and its localization to CD63, and Lamp1-positive vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*. January 2007, 64, 2, s. 244–256. ISSN 1420-682X.
- SHINTANI, S. et al. Identification and characterization of ameloblastin gene in a reptile. *Gene*. January 2002, 283, 1, s. 245–254. ISSN 0378-1119.
- SHINTANI, S. et al. Identification and characterization of ameloblastin gene in an amphibian, *Xenopus laevis*. *Gene*. October 2003, 318, s. 125–136. ISSN 0378-1119.
- SHINTANI, S. et al. Identification and characterization of matrix metalloproteinase-20 (MMP20; enamelysin) genes in reptile and amphibian. *Gene*. May 2007, 392, 1-2, s. 89–97.
- SIMMER, J. P. – FINCHAM, A. G. Molecular Mechanisms of Dental Enamel Formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1995, 6, 2, s. 84–108. ISSN 1045-4411.
- SIMMER, J. P. – ZHANG, C. – HU, C. C. Cloning and characterization of the mouse EMSP1 gene. *Journal of Dental Research*. 2000, 79, s. 423–423. ISSN 0022-0345.
- SIMMONS, D. et al. Identification and characterization of a cDNA for mouse ameloblastin. *Connective Tissue Research*. 1998, 39, 1, s. 307–316. ISSN 0300-8207.
- SIRE, J. Y. – DELGADO, S. – GIRONDOT, M. The amelogenin story: origin and evolution. *European Journal of Oral Sciences*. 2006, 114, s. 64–77. ISSN 0909-8836.
- SMITH, M. M. – HALL, B. K. A Developmental Model for Evolution of the Vertebrate Exoskeleton and Teeth - the Role of Cranial and Trunk Neural Crest. *Evolutionary Biology*. 1993, 27, s. 387–448. ISSN 0071-3260.
- SODEK, J. – GANSS, B. – MCKEE, M. D. Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. August 2000, 11, 3, s. 279–303. ISSN 1045-4411.
- SPAHR, A. et al. Expression of amelin and trauma-induced dentin formation. *Clinical Oral Investigations*. March 2002, 6, 1, s. 51–57.
- SPAHR, A. et al. Ameloblastin expression during craniofacial bone formation in rats. *European Journal of Oral Sciences*. December 2006, 114, 6, s. 504–511. ISSN 0909-8836.
- STEPHANOPOULOS, G. – GAREFALAKI, M.-E. – LYROUDIA, K. Genes and Related Proteins Involved in Amelogenesis Imperfecta. *J Dent Res*. December 2005, 84, 12, s. 1117–1126.
- STRACKE, J. O. et al. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *Febs Letters*. July 2000, 478, 1, s. 52–56. ISSN 0014-5793.
- TANABE, T. Purification and characterization of proteolytic enzymes in porcine immature enamel. *Tsurumi U.Dent.J.* 1984, 10, s. 443–452.

- TERMINE, J. et al. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J. Biol. Chem.* October 1980, 255, 20, s. 9760–9768.
- TOLOSANO, E. – ALTRUDA, F. Hemopexin: Structure, function, and regulation. *Dna and Cell Biology.* April 2002, 21, 4, s. 297–306. ISSN 1044-5498.
- TOYOSAWA, S. et al. Identification and characterization of amelogenin genes in monotremes, reptiles, and amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* October 1998, 95, 22, s. 13056–13061. ISSN 0027-8424.
- TOYOSAWA, S. et al. Cloning and characterization of the human ameloblastin gene. *Gene.* October 2000, 256, 1, s. 1–11. ISSN 0378-1119.
- UCHIDA, T. et al. Synthesis, Secretion, Degradation, and Fate of Ameloblastin During the Matrix Formation Stage of the Rat Incisor as Shown by Immunocytochemistry and Immunohistochemistry Using Region-specific Antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* October 1997, 45, 10, s. 1329–1340.
- VEIS, A. Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules. *Cellular and Molecular Life Sciences.* January 2003a, 60, 1, s. 38–55. ISSN 1420-682X.
- VEIS, A. Mineralization in organic matrix frameworks. *Biomaterialization Reviews in Mineralogy & Geochemistry.* 2003b, 54, s. 249–289. ISSN 1529-6466.
- WANG, H. et al. Enamel Matrix Protein Interactions. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2005a, 20, 6, s. 1032–1040.
- WANG, X. P. et al. Amelogenin sequence and enamel biomineralization in *Rana pipiens*. *Journal of Experimental Zoology Part B-molecular and Developmental Evolution* 304b (2). March 2005b, s. 177–186. ISSN 1552-5007.
- WART, H. – BIRKEDAL-HANSEN, H. The Cysteine Switch: A Principle of Regulation of Metalloproteinase Activity with Potential Applicability to the Entire Matrix Metalloproteinase Gene Family. *PNAS.* July 1990, 87, 14, s. 5578–5582.
- WEN, X. et al. Structural organization and cellular localization of tuftelin-interacting protein 11 (TFIP11). *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS).* May 2005, 62, 9, s. 1038–1046.
- YAMAKOSHI, Y. et al. Sites of asparagine-linked oligosaccharides in porcine 32kDa enamelin. *Connective Tissue Research.* 1998, 39, 1, s. 343–350. ISSN 0300-8207.
- YAMAKOSHI, Y. et al. Calcium binding of enamel proteins and their derivatives with emphasis on the calcium-binding domain of porcine sheathlin. *Archives of Oral Biology.* November 2001, 46, 11, s. 1005–1014. ISSN 0003-9969.
- YAMAKOSHI, Y. et al. How do enamelysin and kallikrein 4 process the 32-kDa enamelin? *European Journal of Oral Sciences.* 2006, 114, s. 45–51. ISSN 0909-8836.
- YOUSEF, G. M. – DIAMANDIS, E. P. The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: Structure, Function, and Association to Disease. *Endocr Rev.* April 2001, 22, 2, s. 184–204.
- ZEICHNER-DAVID, M. et al. Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. *European Journal of Oral Sciences.* 2006, 114, s. 244–253. ISSN 0909-8836.

ZEICHNERDAVID, M. et al. Timing of the expression of enamel gene products during mouse tooth development. *International Journal of Developmental Biology*. February 1997, 41, 1, s. 27-38. ISSN 0214-6282.

Příloha

Towards structural model of Ameloblastin — hard tissue inducing protein

Jiří Vymětal, Ivan Slabý, Axel Spahr, Petter Lyngstadas and Jiří Vondrášek

Towards a structural model of Ameloblastin.

Jiří Vymětal^{*}, Ivan Slabý[‡], Axel Spahr[†], Petter Lyngstadas[‡] and Jiří Vondrášek^{*+}

**Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Flemingovo
nam.2, 166 10 Prague 6, Czech republic*

*† Dept. of Operative Dentistry and Periodontology University of Ulm Albert-Einstein-Alle 11,
89081 Ulm, Germany*

*‡ Faculty of Dentistry, Institute of Clinical Dentistry, Department of Biomaterials,
Geitmyrsveien 71, 0455 OSLO, Norway*

+ corresponding author

Jiří Vondrášek

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Flemingovo
nam.2, 166 10 Prague 6, Czech republic*

Tel: +420220410324

Fax: +420220410320

e-mail: jiri.vondrasek@uochb.cas.cz

Abstract

Ameloblastin (Ambn) was originally identified as the tooth specific enamel matrix glycoprotein secreted by ameloblasts. It was shown Ambn to be expressed during the development of mesenchymal dental hard tissue in the trauma-induced reparative dentin and even to be involved in early stages of craniofacial bone formation. To elucidate the biological function of Ambn seems thus to be more and more complicated task. Unfortunately, the native spatial structure fold of the molecule, which could contribute to reveal the ultimate physiological role for ameloblastin, is largely unknown. We performed a detailed bioinformatical analysis of Ambn protein sequence to map its physical-chemical properties and we created ab-initio 3D model of the Ambn molecule by means of advanced molecular modeling techniques. Evaluation of structural stability of Ambn in water and in the 0.5 M Ca²⁺ - water solution was performed by molecular dynamics methods. The modeled molecule of Ambn can be briefly characterized as two-domain protein which, according to the CATH classification, resumes mainly the β fold. A remarkable feature of the protein is its rather large longitudinal size and its non compactness.

Introduction

Ameloblastin (Ambn, also called amelin or sheathlin) was originally identified as the tooth specific enamel matrix glycoprotein secreted by ameloblasts [1-3]. In the recent papers, however, we have clearly shown Ambn to be expressed during the development of mesenchymal dental hard tissue [4], in the trauma-induced reparative dentin[5] and even to be involved in early stages of craniofacial bone formation [6]. To elucidate the biological function of Ambn seems thus to be more and more complicated task. So far, the functions of ameloblastin were implicated into enamel mineralization [7-9], ameloblasts – enamel interactions [2, 10, 11], phosphorylation [12] or, as a signal molecule, in epithelial – mesenchymal interactions [4, 13, 14] including hard tissue inducing properties [15, 16].

The human *Ambn* gene is localized to chromosome 4q21 and contains 13 exons [1, 17]. Ameloblastin-null mice have a severe enamel hypoplasia with a dramatically reduced expression of amelogenin in ameloblasts and develop soft tissue tumors in buccal vestibules of both maxilla and mandibula [11, 18] Moreover, ameloblasts are detached from the enamel matrix forming multiple cell layers of less differentiated epithelial cells. Ambn overexpression in transgenic mice resulted in abnormal enamel crystallite formation and enamel rod morphology [10]. Thus, the genetic data suggest that either loss-of-function or gain-of-function for ameloblastin in the enamel matrix disrupt normal enamel formation probably as a consequence of uncontrolled differentiation of ameloblasts.

Unfortunately, the native spatial structure fold of the molecule, which could contribute to reveal the ultimate physiological role for ameloblastin, is largely unknown. In rats, Ambn is secreted as two corresponding splicing variants (407 and 422 amino acid residues, respectively) after N`terminal signal peptide of 26 amino acid residues is cleaved off. The protein has the pI about 6, is rich in proline, glycine and, leucine and has no cysteine. Proteins

from other species are similar and very conserved in their structures. The human homologue has a unique 26 amino acid residues insert in the middle part of the molecule [19, 20]. A calcium binding domain has been identified by Yamakoshi et al [21] in porcine ameloblastin (sheathlin).

There is obviously no structural template for 3D modeling of Ambn. It is a typical case when fold-recognition methods [22] or other advanced algorithms can be applied [23] to help in building 3D models for proteins bearing no evident sequence similarity to any protein of known structure by identification of structural "templates" compatible with the modeled sequence.

Recently, a new generation of prediction methods appeared, which build hybrid models from fragments [24] either obtained from the experimentally solved protein structures or from the fold-recognition models. The general premise of this approach is that the protein conformation is reasonably well approximated by the distribution of local structures adopted by known, not necessarily homologous, protein structures. The "fragment splicing" methods are very powerful, as the resulting hybrid models are in average more complete and more accurate than the input models. They can also correctly predict the 3D structure of a protein with a completely new fold, which could not be modeled based on any single template.

Major aim of this study is to perform a detailed bioinformatical analysis of Ambn protein sequence to map its physical-chemical properties. For creating *de novo* 3D model of the Ambn molecule by means of molecular modeling techniques, recently developed ROSETTA modeling approach from the Department of Structural Biology, University of Seattle, was employed. Evaluation of structural stability of Ambn in water and in the 0.5 M Ca²⁺ - water solution was performed by molecular dynamics methods.

Methods

Bioinformatical analysis of the AMBN sequence .

Sequence alignment of ameloblastins of different origins

Sequences of the human ameloblastin and ameloblastins of different animal species were obtained from Swiss-Prot and TrEMBL databases at www.expasy.org, namely entries with following accession codes: AMBN_BOVINE (Q9XSX7), AMBN_HUMAN (Q9NP70), AMBN_MOUSE (O55189), AMBN_PIG (Q28989), AMBN_RAT (Q62840), Q6Y4V4_XENLA, Q6Y4V3_XENLA, Q811C6_CAVPO, Q811C5_CAVPO, Q8JIW6_CAICR.

Sequence alignment was performed to reveal similarity of sequences and to identify the conservative regions. Analysis was carried out by program ClustalW [22] hosted at the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Alignments were constructed using default parameters set for protein alignment, namely Protein Gap Open Penalty = 10.0, Protein Gap Extension Penalty = 0.2, Protein matrix = Gonnet, Protein/DNA ENDGAP = -1, Protein/DNA GAPDIST = 4, Matrix Gonnet 250 (version by JiVy).

Physical-Chemical Methods

Regular sequence analysis

Analyses of the sequence for hydrophobic/hydrophilic regions by means of Kyte-Doolittle and Hopp-Woods profiles were performed. Both types of profiles were generated by proteomic tool ProtScale provided by the Swiss Institute of Bioinformatics at <http://www.expasy.org/tools/protscale.html>.

Both methods, Kyle-Doolittle [23] and Hopp-Woods [24] profiles, are based on similar fundamentals. Each amino acid is assigned a value describing hydrophobic/hydrophilic properties resulting from experimental studies. Afterwards, assigned values are repetitively

averaged along protein chain by means of sliding window of a given size. Final output is supposed to reflect local hydrophobicity/hydrophilicity in a protein chain. Hopp and Woods proposed a scale to reveal hydrophilic antigen sites. Kyle and Doolittle suggested more general method in to recognize interior and exterior or membrane-spanning regions.

Analyses were performed using preferred window length of 5 to 9 amino acids residues which is a suitable range to detect potentially exposed and antigenic segments of a protein chain.

Results of both methods were compared in order to estimate reliability of prediction.

Identification of unstructured parts along the sequence of Ambn molecule

Intrinsically unstructured proteins (IUPs) are proteins lacking a fixed three-dimensional structure or containing long disordered regions. The methodology developed by Han et al [25] with the corresponding computer program was applied to identify unstructured regions and their role in the recognition of the Ambn molecule. For prediction of IUPs in the Ambn molecule was used a publicly available DISOPRED2 server at <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred/>. This program generates a sequence profile via PSI-BLAST over a filtered database. The profiles are classified by trained neural network estimating disorder probability.

Secondary Structure Prediction

We utilized several methods for secondary structure prediction in order to obtain supporting data for 3D structure prediction and comparison with physical-chemical analysis described above. Prediction of secondary structure was performed using following methods and servers:

JPRED at <http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>, neural network based prediction method [25]. As a subject for prediction serves consensus sequence created from multiple

alignment, provided by user or automatically generated using PSI-BLAST. JPRED reaches average Q3 score (accuracy for 3-state prediction) of 76.4%,

SOPMA [26, 27] at <http://npsa-pbil.ibcp.fr> ,

GOR4 [27, 28] (at <http://npsa-pbil.ibcp.fr>), based on information theory and Bayesian statistics. GOR4 reaches lower accuracy (Q3 score 65%), because this method does not take alignment of related sequences into account.

PSIPRED [29] at <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> neural network based prediction method, using multiple alignment of related sequences supplied by PSI-BLAST. PSIPRED reaches high accuracy achieving an average Q3 score of 76.5%

Structural model of Ambn

Spatial model of Ambn protein was constructed by ROSETTA server located at the Department of Structural Biology, University of Seattle. ROSETTA provides both *ab initio* and comparative models of protein domains. It uses the ROSETTA fragment insertion method [26] . Domains without a detectable PDB homolog are modeled with the Rosetta *de novo* protocol [27]. Comparative models are built from parent PDBs detected by UW-PDB-BLAST or 3DJury-A1 and aligned by the K*SYNC alignment method [28]. Loop regions are assembled from fragments and optimized to fit the aligned template structure [29]. The procedure is fully automated. After getting the final models, all of them were checked by PROCHECK program to be sure that the geometrical parameters were fully justified.

Molecular simulations of Ambn

Computational analysis by methods of molecular dynamics was performed for Ambn protein in water environment and in water containing Ca²⁺ ions in concentration 20 mM and 40 mM,

respectively. Simulation was performed by Gromacs molecular dynamics package (version 3.3).

Ambn molecular model was solvated by approximately 27000 water molecules (SPC water model) and situated in box with volume 880nm³ under periodic boundary conditions (pbc). Temperature was held at 300K by means of the Berendsen thermostat with coupling constant $\tau=0.1$. Constant pressure was held by Berendsen barostat with coupling constant $\tau=1$ and all atom OPLS-AA/L force field was used. Integration of Newton's equations of motion was performed by the leap-frog algorithm with time step 2 fs. Long-range electrostatics interaction was treated by Fast Particle-Mesh Ewald electrostatics (PME). Overall electric charge of the system was compensated by adding Cl⁻ or Na⁺ ions, respectively.

Resulting trajectories were analyzed using tools from the GROMACS package. Stability of AMBN model molecule was determined by means of the RMSD throughout the simulation. Contacts between amino acids and Ca²⁺ ions in calcium binding sites were searched using VMD (visual molecular dynamics) software [citace JVY].

Results and discussion

sp	055189	AMBN_MOUSE	MSASKIPLFKMKGLILFLSLVKMSLAVPAFPQQPGAQGMAPPGMASLSLE	50
sp	Q62840	AMBN_RAT	MSASKIPLFKMKGLLLFLSLVKMSLAVPAFPQQPGAQGMAPPGMASLSLE	50
tr	Q811C5	Q811C5_CAVPO	MSPSKIPLFKMKDMLFLSLLLKISFAVPAFPQQPGAPNMAPPGMASLSLE	50
sp	Q9XSX7	AMBN_BOVIN	MPALKIPLFKMKDMILILCLLKMSSAVPAFPQQPGIP-----GMASLSLE	45
sp	Q28989	AMBN_PIG	MPALKIPLFKMKDMVLILCLLKMSSAVPAFPQQPGTP-----GVASLSLE	45
sp	Q9NP70	AMBN_HUMAN	MSASKIPLFKMKDLILILCLLEMSFAVPFFPQQSGTP-----GMASLSLE	45
			*.. ***** .:*.:.:.* ** *:*.* * :*****	
sp	055189	AMBN_MOUSE	TMRQLGSLQGLNALSQYSRFGFGKALNSLWLHGLLPPHNSFPWIGPREHE	100
sp	Q62840	AMBN_RAT	TMRQLGSLQGLNALSQYSRFGFGKALNSLWLHGLLPPHNSFPWIGPREHE	100
tr	Q811C5	Q811C5_CAVPO	TMRQLGSLQGLNALSQYSRFGFGKSLNSLWLQGLLPPSSFPWLRPREHE	100
sp	Q9XSX7	AMBN_BOVIN	TMRQLGSLQGLNLSQYSRFGFGKSFNSLWMNGLLPPHSSFPWMRPREHE	95
sp	Q28989	AMBN_PIG	TMRQLGSLQGLNLSQYSRFGFGKSFNSLWMHGLLPPHSSFPQWMRPREHE	95
sp	Q9NP70	AMBN_HUMAN	TMRQLGSLQRLNLSQYSRYGFGKSFNSLWMHGLLPPHSSLPWMRPREHE	95
			***** ** ***** *****:*****:***** .*: *: *****	
sp	055189	AMBN_MOUSE	TQQ-----PSLQPHQPGLKPFLLQPTAATGVQVTPQKPGPQ	135
sp	Q62840	AMBN_RAT	TQQYEYSLPVHPPPLPSQPSLQPHQPGLKPFLLQPTAATGVQVTPQKPGPH	150
tr	Q811C5	Q811C5_CAVPO	TQQYEYSLPVHPPPLPSQPSQPPQPMKHFQQPTATPAIQDTPQKAGPQ	150
sp	Q9XSX7	AMBN_BOVIN	TQQ-----PSLQPPQPGQKPFLLQPTVVVTSMQNAVQKGVQP	130
sp	Q28989	AMBN_PIG	TQQYEYSLPVHPPPLPSQPSLQPPQPGQKPFLLQPTVVVTSIQNPVQKGVQP	145
sp	Q9NP70	AMBN_HUMAN	TQQYEYSLPVHPPPLPSQPSLQPPQPGKPFLLQSAATTNQATALKEALQ	145
			** . : :.* * ** * * * . : . . . * . * * :	
sp	055189	AMBN_MOUSE	PPMHGQLPLQEGELIAPDEPQVAPSENPTPEVPIMDFADPQFP-----	180
sp	Q62840	AMBN_RAT	PPMHGQLPLQEGELIAPDEPQVAPSENPTPEVPIMDFADPQFP-----	195
tr	Q811C5	Q811C5_CAVPO	PPMHRQLPLKDAELPEAHE-QVAPTEMLNPELPLVDFADPQIP-----	194
sp	Q9XSX7	AMBN_BOVIN	PIIYQGHPLQQAEGPMVEQ-QVAPSEKPTTELPGMDFADLQDP-----	174
sp	Q28989	AMBN_PIG	PIIYQGHPLQQVEGPMVQQ-QVAPSEKPEAEPLGLDFADPQDP-----	189
sp	Q9NP70	AMBN_HUMAN	PIIHLGHLPLQEGELPLVQQ-QVAPSDKPPKPELPGVDFADPQGPLSPGM	194
			:: : **:: * . : ***: * . : * * : ***** * * : ..	
sp	055189	AMBN_MOUSE	-----TVFQIARSISRGPMAHNKASAFYPMGFYM	209
sp	Q62840	AMBN_RAT	-----TVFQIAHSLSRGPMAHNKVPTFYPMGFYM	224
tr	Q811C5	Q811C5_CAVPO	-----SVFQIARFVSRVVPQNKPAMLYPMGFYM	223
sp	Q9XSX7	AMBN_BOVIN	-----PMFPIAHLISRGPMQNKPSQLYPIFYV	203
sp	Q28989	AMBN_PIG	-----SMFPIARLISQGPVPQDKPSLYPMGFYM	218
sp	Q9NP70	AMBN_HUMAN	DFPDPQGPLPLGLDFADPQGSTIFQIARLISHGPMQNKQSPLYPMGLYV	244
		 : : * ** : * : * : * : * : * : * : * :	
sp	055189	AMBN_MOUSE	SYGANQLNAPARIGFMSSEEMPERGSPMAYGTLFPRFGGFRQTLRRLNQ	259
sp	Q62840	AMBN_RAT	SYGANQLNAPARIGFMSSEEMPERGSPMAYGTLFPGYGGFRQTLRRLNQ	274
tr	Q811C5	Q811C5_CAVPO	SYGTNQLGG-----RVAPVTYGGLLPLGTGVRHTIRRVQP	258
sp	Q9XSX7	AMBN_BOVIN	TYGANQL-----GGRGDPLOYGAIFPGFGMRPRLGGMPH	238
sp	Q28989	AMBN_PIG	SYGANQLNSPARLIGLSSEEMAGRGGPLAYGAMFPGFGMRPRLGGMPH	268
sp	Q9NP70	AMBN_HUMAN	PFGANQLNAPARLIGMSSEEVAGREDPMAYGAMFPGFGMRPRLGGMPH	294
			. : * : * : * : . . : * * : * : * : * : * : * : :	
sp	055189	AMBN_MOUSE	NSPKGGDFTFVEVDSVSVTKGPEKGE-PEGSPLEQANPGKRENALLSQ	308
sp	Q62840	AMBN_RAT	NSPKGGDFTFVEVDSVSVTKGPEKGE-PEGSPLEQASPKGENALLSQ	323
tr	Q811C5	Q811C5_CAVPO	DPTMAGDFTFLEFDTF-AATKGPEKGEQAGSPLHETKGEDPENAALLSQ	307
sp	Q9XSX7	AMBN_BOVIN	NPDMDGDFTFLEFDSVAATKGPEKGEQAGSPLVPEAHLADPESPALLSE	288
sp	Q28989	AMBN_PIG	NSAKGGDFTFLEFDSVAATKGPEKGEQAGSPLVPEAANTADPESPALFSE	318
sp	Q9NP70	AMBN_HUMAN	NPAMGGDFTFLEFDSVAATKGPEKGEQAGSPLVPEANPDNLENPAFLTE	344
			. : . . *****: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
sp	055189	AMBN_MOUSE	MAPGAHAGLLAFPNDHIPSMARGPAG-QR--LLGVTPAAADPLITPELAE	355
sp	Q62840	AMBN_RAT	MAPGAHAGLLAFPNDHIPNMARGPAG-QR--LLGVTPAAADPLITPELAE	370
tr	Q811C5	Q811C5_CAVPO	IAPGAHTGLFGFPNDNVP SMARGPSG-HRNRPLEVTPVTADPLITPELAE	356
sp	Q9XSX7	AMBN_BOVIN	LAPGALEGLLANPEGNIPNLARGPAGRSRGLRGTTPAAADPLMTPLGLAE	338
sp	Q28989	AMBN_PIG	VASGVLGGLLANPKGIIPNLARGPAGRSRGP-GVTPADADPLMTPLGLAD	367
sp	Q9NP70	AMBN_HUMAN	LEPAPHAGLLALPKDDIPGLRPSGKMKGLP-SVTPAAADPLMTPELAD	393
			: . . * : . * : . : * : . : * : . : * : . : * : . : * : . : * : . : * :	
sp	055189	AMBN_MOUSE	VYETYGADVTTPLGD-GEATMDITMSPDTQQPLLPNGKVVHQP-QVHNAWR	403
sp	Q62840	AMBN_RAT	VYETYGADVTTPLGD-GEATMDITMSPDTQQPPMPGNKVVHQP-QVHNAWR	418
tr	Q811C5	Q811C5_CAVPO	IYETYGGDVTTPLG--EATMETMTPTDTPQTPMGNKVRQPMVHPEWH	403
sp	Q9XSX7	AMBN_BOVIN	VYETYGADETTTTLGLQEE'TTVDSSTATPDTQHTLMPRNKAQQPQIKHDAWH	388
sp	Q28989	AMBN_PIG	AYETYGADETTTTLGLQEEMTMDSTATPYSEHTSMPGNKAQQPQIKRDAWH	417
sp	Q9NP70	AMBN_HUMAN	VYRTYDADMTTSVDFQEEATMDTMAPNSLQTSMPGNKAQEPPEMMDAWH	443
			* . * . * * * * . . * * : * * : * * : . : * * . : * . : * : *	
sp	055189	AMBN_MOUSE	FQEP 407	

sp		Q62840		AMBN_RAT		FQEP	422
tr		Q811C5		Q811C5_CAVPO		FQEP	407
sp		Q9XSX7		AMBN_BOVIN		FQEP	392
sp		Q28989		AMBN_PIG		FQEP	421
sp		Q9NP70		AMBN_HUMAN		FQEP	447

Figure 1. Multiple Alignment of AMBN

Sequence analysis

AMBN alignment of mammalian sequences performed by CLUSTAL W (1.82) is shown on Figure 1. Alignment of mammal sequences reveals high conservation of amino acids at the N-terminal part of Ambn sequence up to the position 98 (in terms of human Ambn). Following 15 amino acid long proline rich region (position 99-113) is subject to alternative splicing and shows also extraordinary high conservation across mammalian sequences. Human Ambn contains the 26 amino acid long extra insert at position 191 to 216.

Physical-chemical properties of the AMBN chain

Both Kyte-Doolittle and Hopp-Woods plots were made with window length of 7 amino acid residues. Kyte-Doolittle plot shows predicted hydrophaticity of the protein segments. Region signaling high predicted hydrophaticity are scored by positive values. Hopp-Woods scale evaluates regions by high predicted antigenic properties as positive values. Obviously, both plots have almost the same shape, but mirrored about zero axis. Regions with high predicted

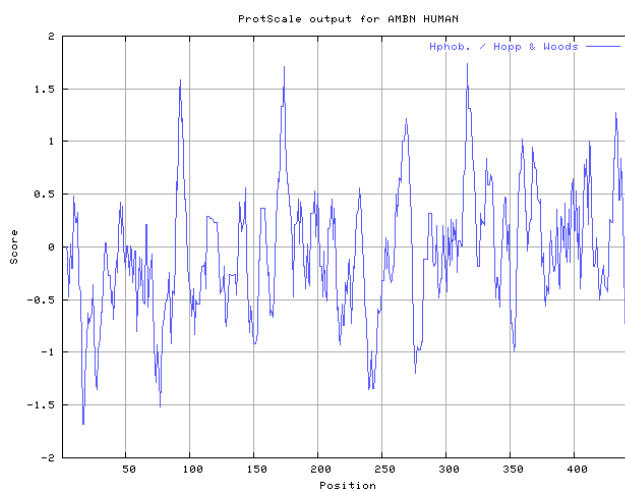
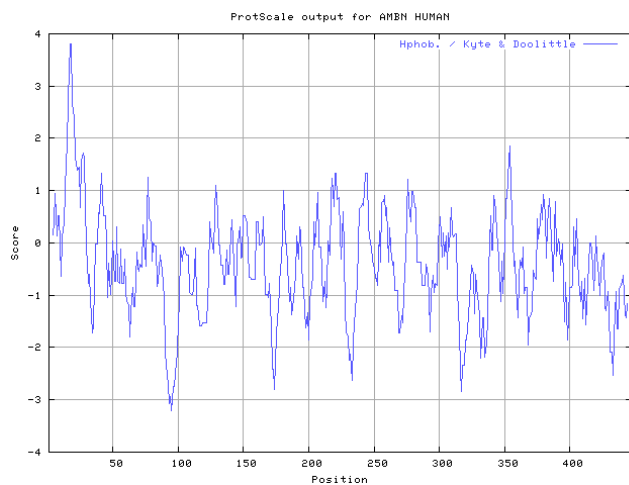


Figure 2. Kyte-Doolittle and Hopp-Woods analysis of the sequence

antigenicity are scored with low values of the hydrophaticity. High values of the Hopp-Woods antigenicity are uniformly distributed in the Ambn sequence. To the high score regions belong RPREHETQQ (position 89-98), PS DKPPKPELP (169-179), SSEEVAGGREDPM (261-273), KGPENEEGGAQ (314-323) and NKAQEP Emm (430-438).

Secondary structure prediction

Three state secondary structure predictions were performed by JPRED, PSIPRED, SOPMA and GOR4 methods. All methods (see Figure 3) unequivocally suggested high alpha helical content in the N-terminal part of the molecule in length of approximately 80 amino acid residues. The rest of the sequence did not show longer secondary motifs and the results of individual methods differed more at these regions. The methods supposed to be more reliable, jpred and psipred, predicted less amount of secondary structures than the others.

	10	20	30	40	50	60	70	
OrigSeq	MSASKIPLFKMKDLILILCLLEMSFAVPFFPQQSGTPGMAASLSLETMRQLGSLQRLNTLSQYSRYGFGKS							70
jpred	-----HHH-HHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHH-----							
psipred	-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHH-----							
sopma	-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----H							
gor4	-----HHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EE							
jpred	FNSLWMHGLLPPHSSLPWMPREHETQQYEYSLPVHPPPLPSQPSLKPQQPGLKPFLLQSAATTNQATAL							140
psipred	HHHHHHH-----EEE-----							
sopma	HHHHHHH-----EEEE-----EHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH							
gor4	E-HHHH-EEE-----EEEEEE-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH							
jpred	KEALQPPIHGLHPLQEGELPLVQQVAPSDKPPKPELPGVDFADPQGPSLPGMDFPDPQGPSLPGLDFA							210
psipred	-----							H
sopma	-----EEE-----EEE-----							
gor4	HHH---EE-----HHHHH-----							
jpred	DPQGSTIFQIARLISHGPMQNKQSPLYPGMLYVPFGANQLNAPARLGIMSSEEVAGGREDPMAYGAMFP							280
psipred	H-----HHHHHHHH-----EEE-----EE-E-----HHHH							
sopma	-----EEEHHHHE-----EEEE-----HHEEE-HHH-----EH-----							
gor4	-----HHHHHHHHHH-----EEEE-----HHHHHHHH-HHHH-----EEEEEE-----							
jpred	GFGGMRPGFEGMPHNPAMGGDFTFLEFDSPVAATKGPENEEGGAQGSMPPEANPDNLENPAFLTELEPAPH							350
psipred	-----EEEE-----HHH-----							
sopma	-----EEEEEE-----EE-----HHHHHHH-----H							
gor4	-----EEE-----HHHHHHH-----H							
jpred	AGLLALPKDDIPGLPRSPSGKMKGLPSVTPAAADPLMTPELADVRYTYDADMTTSVDFQEEATMDTMAP							420
psipred	-----HHHHHH-----E-----E-----HH-----							
sopma	HHHEE-----HHHHHHHHHH-----EEEEEE-----							
gor4	HHHHH-----HHHHHHEEE-----EE-----HHHHHHHHH-----							
jpred	NSLQTSMPGNKAQEPEMMHDAWHFQEP							447
psipred	-----EE-----							
sopma	-----HHHHHHHHHH-----							
gor4	-----HHHHH-EEEE-----							

H helix, E strand

Figure 3. Secondary structure prediction

Tertiary structure prediction and 3D model of Ambn

The results of the ROBRTTA server were clasified by energy content in a hierarchical system. We performed spatial superposition for all the models to quantify regions with a high structural similarity across the obtained models. Based on these criteria we chose the model 1 as the most probable one. The model is shown on Fig.4

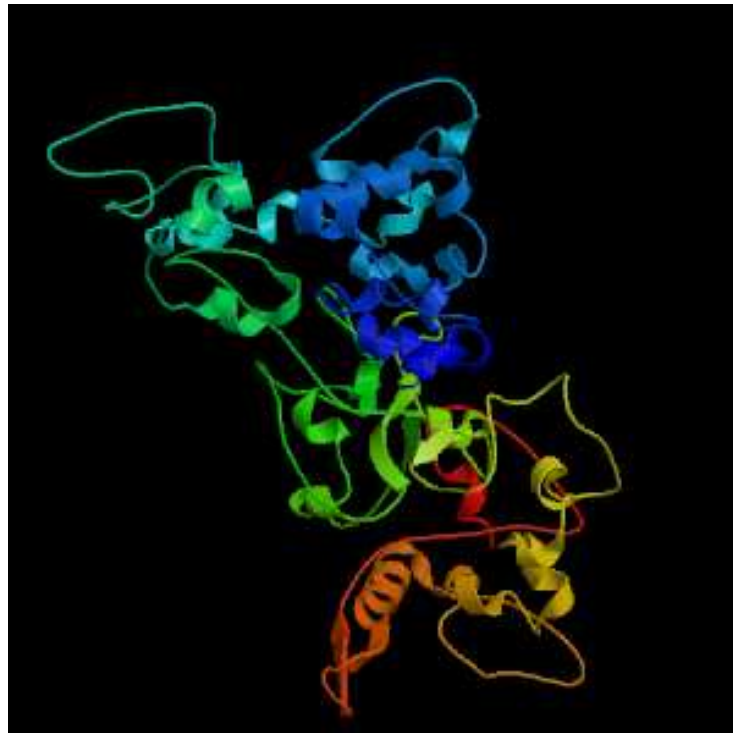


Figure 4. Structural model of Ambn

DISOPRED prediction

DIOSOPRED, the protein disorder prediction server, evaluated following 7 regions as being disordered with a false positive rate threshold of 2% (Fig.5): Region 1: residues 89-104, region

Molecular dynamics simulation of Ambn in solution

The total energy of simulated system converged constantly and the system looks stable from the total energy point of view. A closer inspection of the radius of gyration shows that it decreases notably and monotonously during the whole simulation. The structure shrank and became more compact. It was mainly caused by collapsing of loose loops which showed also a quite large RMSD when comparing the initial structure from ROSETTA model and the structure after 20ns long run. For Ambn the values reached 9.3 Å.

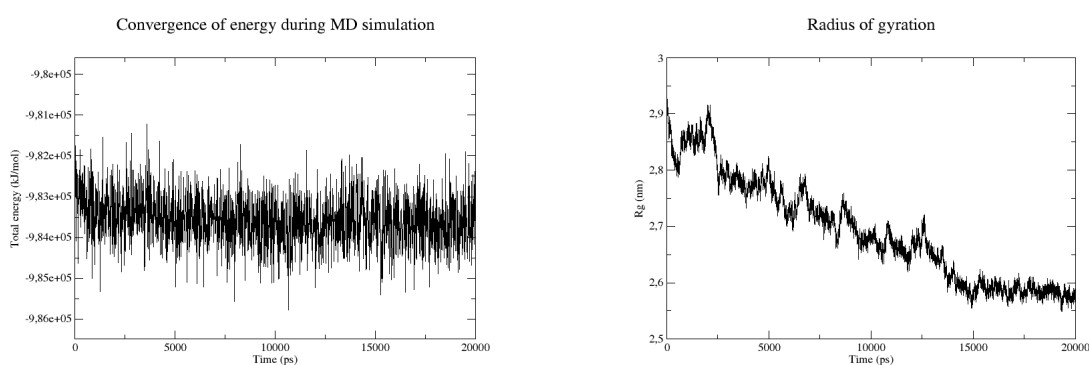


Figure 6. MD simulation of Ambn model without Ca²⁺ divalent cations

A majority of short helices was conserved during the whole MD run. Some of them, however, were unstable and finally disappeared in the fully equilibrated structure after 20ns of MD simulation. The short beta sheet segments situated in protruding loop at the C-terminus also disappeared and the region lacked distinct secondary structure features. The RMSF analysis revealed positions of the most flexible regions of the molecule. All of them were located in loops on the surface exposed to a solvent.

Molecular dynamics simulation of Ambn in solution with Ca²⁺

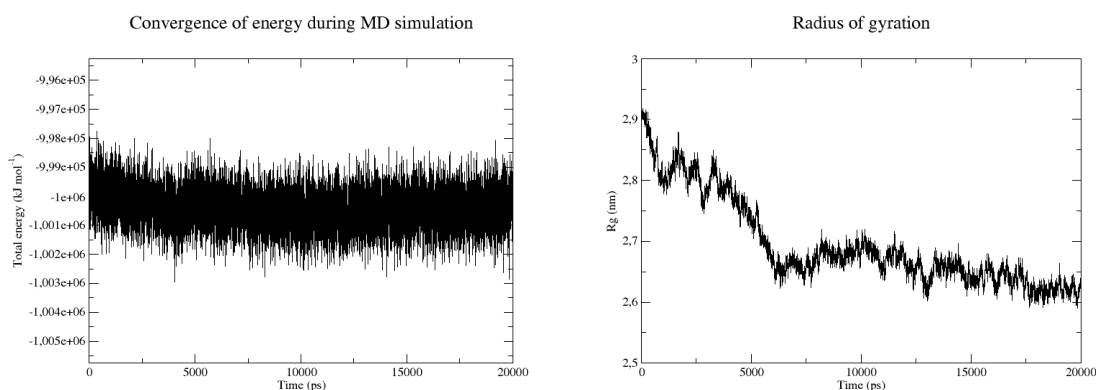


Figure 7. MD simulation of Ambn model with Ca²⁺ divalent cations

In Ca²⁺ solution, when compared to water, the structure of the ROBETTA Ambn model became more compact, as proved indicated by the shape of radius of gyration graph (Fig. 7b), whereas the convergence of energy was about the same (Fig. 7a). The RMSD between initial ROBETTA model and the final structure after 20ns MD run raised to 9.6 Å. There was a structural difference between final structures obtained by MD simulations with and without cations. The comparison of both structures after 20 ns run provided a picture of structurally distinct with the RMSD value of 11.5 Å. Helical content was substantially lower for structure modeled without presence of Ca²⁺. The beta sheets content did not change upon the presence of the Ca²⁺ ions. The appearance of flexible regions was very similar to that in structure of Ambn in Ca²⁺ free solvent. This is not surprising taking into account a nature of those loops and their placement at the surface of the molecule exposed to the solvent.

Calcium binding properties.

Most of the Ca²⁺ ions were bound non specifically by either glutamate or aspartate mostly in the surface region of the C-terminal part of Ambn model. The simulation also revealed one internal site with Ca²⁺ binding capacity at the N-terminal part.

Discussion and Conclusion

The physical chemical properties of the Ambn molecule gives a rough estimate of different regions and their structural context. Most of the regions identified by Kyte-Doolittle or Hopp-Woods analysis were identified with high hydrophaticity coefficient. This result suggests that the identified regions are distributed with a high probablity on the surface of the AMBN molecule and this finding should be confirmed by secondary and tertiary structure prediction. Rather surprising fact is a low occurency of hydrophobic regions. This fact indicate that some parts of the molecule need not to be fully structured. Internally unstructured Proteins (IUPs) play an important role in biology and disease. Identifying disordered regions in protein sequences can provide useful information on protein structure and function, and can assist high-throughput protein structure determination. In a case of Ambn we performed such analysis to get comparison between physical-chemical analysis and prediction of unstructured regions. The results show rather large part of the molecule to be unstructured. This is rather surprising taking into account that Hopp-Woods and Kyte-Doolittle plots show that in both major unstructured parts are rather distinctive regions of different physical-chemical characteristics. On the other hand, the secondary structure prediction results based on the most advanced prediction methods show almost no secondary structural element it the disordered regions 2 and 5.

The modeled molecule of Ambn can be briefly characterized as two-domain protein which, according to the CATH classification, resumes mainly the β fold. A remarkable feature of the protein is its rather large longitudinal size and its non compactness. Such a structural arrangement could point out towards multimeric character of the functional protein or its

massive internal flexibility. The detailed structural and structure derived analysis performed on the model also suggests that there are two major regions which can be involved in binding either a small ligand or a part of protein molecule. The shape of the first binding region characterized by quite a deep binding pocket also raises a question whether Ambn could possess a catalytic activity. Unfortunately a specific catalytic arrangement was not found by search using ProSite server. It does not mean that the molecule can not possess such activity but it is less probable than was expected.

The results of MD simulations also open a question what is the major role of Ca²⁺ divalent cations on the structure or function. Both simulations revealed that structures have tendency to minimize their volume but resulting structures of those with and without Ca²⁺ ions differ significantly. This can not be an artifact of the simulation because repeated simulations of Ambn molecule in water converged to more or less similar structure. We have to conclude that Ca²⁺ cations significantly change structural properties of the molecule either to interact or to bear additional function induced by presence of Ca²⁺ ions. We also found very important difference between two domains of the Ambn molecule. The C terminal part attracts the Ca²⁺ less than the N-terminal part. In this domain the stable Ca²⁺ site were identified.

As follows from the simulation, the Ambn molecule contains quite long stretches of sequence exposed to the solvent which are quite flexible. Amino acid composition of those exposed loops is mostly hydrophilic, making them ideal candidates for interaction or as a signaling sequential epitopes. Almost any of them do not contain secondary structure element. This can suggest a most probable character of possible interactions. This character is to be expected an induced fit making the regions ideal candidates for short peptide synthesis to prove their antigenicity

Although there is not clear how the structural model of Ambn is connected with its function we can conclude that some of the elucidated features of the Ambn molecule can give

us some ideas about the modes of interaction and structural changes inducing different modes of behaviour. It is clear that mapping of all interaction or structural changes upon binding ions or other molecules we will get information about plasticity of the molecule and probably about its another function not necessarily following at this level of our knowledge. For better understanding of the protein function and character the determination of spatial structure of recombinant protein by X-ray or NMR techniques is necessary. Last but not least we also will benefit from comparison of methods used nowadays for tertiary structure prediction and the real structure.

Acknowledgements

This work was supported by grants 203/05/0009 and 203/06/1727 from the Grant Agency of the Czech Republic, and grant LC512 from the Ministry of Education (MSMT) of the Czech Republic. It was also part of research projects Z40550506 and MSM6198959216.

References:

1. Krebsbach, P.H., et al., *Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin - A novel tooth-specific gene*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(8): p. 4431-4435.
2. Cerny, R., et al., *A novel gene expressed in fiat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains*. Journal of Bone and Mineral Research, 1996. **11**(7): p. 883-891.
3. Hu, C.C., et al., *Sheathlin: Cloning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins*. Journal of Dental Research, 1997. **76**(2): p. 648-657.
4. Fong, C.D., et al., *Sequential expression of an amelin gene in mesenchymal and epithelial cells during odontogenesis in rats*. European Journal of Oral Sciences, 1998. **106**: p. 324-330.
5. Spahr, A., et al., *Expression of amelin and trauma-induced dentin formation*. Clinical oral investigations, 2002. **6**(1): p. 51-57.
6. Spahr, A., et al., *Ameloblastin expression during craniofacial bone formation in rats*. European Journal of Oral Sciences, 2006. **114**(6): p. 504-511.
7. Uchida, T., et al., *Synthesis, secretion, degradation, and fate of ameloblastin during the matrix formation stage of the rat incisor as shown by immunocytochemistry and immunochemistry using region-specific antibodies*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1997. **45**(10): p. 1329-1340.
8. Nanci, A., et al., *Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1998. **46**(8): p. 911-934.
9. Brookes, S.J., et al., *Amelin extracellular processing and aggregation during rat incisor amelogenesis*. Archives of Oral Biology, 2001. **46**(3): p. 201-208.
10. Paine, M.L., et al., *A transgenic animal model resembling amelogenesis imperfecta related to ameloblastin overexpression*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(21): p. 19447-19452.
11. Fukumoto, S., et al., *Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts*. Journal of Cell Biology, 2004. **167**(5): p. 973-983.
12. Shintani, S., et al., *Identification and characterization of ameloblastin gene in an amphibian, Xenopus laevis*. Gene, 2003. **318**: p. 125-136.
13. Begue-Kirn, C., et al., *Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation*. European Journal of Oral Sciences, 1998. **106**(5): p. 963-970.
14. Zeichner-David, M., et al., *Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells*. European Journal of Oral Sciences, 2006. **114**: p. 244-253.
15. Fukae, M., et al., *Porcine sheath proteins show periodontal ligament regeneration activity*. European Journal of Oral Sciences, 2006. **114**: p. 212-218.
16. Kanazashi, M., et al., *The 17-kDa sheath protein in enamel proteins induces cementum regeneration in experimental cavities created in a buccal dehiscence model of dogs*. Journal of Periodontal Research, 2006. **41**(3): p. 193-199.
17. Mardh, C.K., et al., *Human ameloblastin gene: genomic organization and mutation analysis in amelogenesis imperfecta patients*. European Journal of Oral Sciences, 2001. **109**(1): p. 8-13.

18. Fukumoto, S., et al., *Essential roles of ameloblastin in maintaining ameloblast differentiation and enamel formation*. *Cells Tissues Organs*, 2005. **181**(3-4): p. 189-195.
19. MacDougall, M., et al., *Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin*. *European Journal of Oral Sciences*, 2000. **108**(4): p. 303-310.
20. Toyosawa, S., et al., *Cloning and characterization of the human ameloblastin gene*. *Gene*, 2000. **256**(1-2): p. 1-11.
21. Yamakoshi, Y., et al., *Calcium binding of enamel proteins and their derivatives with emphasis on the calcium-binding domain of porcine sheathlin*. *Archives of Oral Biology*, 2001. **46**(11): p. 1005-1014.
22. Karplus, K., et al., *Combining local-structure, fold-recognition, and new fold methods for protein structure prediction*. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 2003. **53**(6): p. 491-496.
23. Tomii, K., T. Hirokawa, and C. Motono, *Protein structure prediction using a variety of profile libraries and 3D verification*. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 2005. **61**: p. 114-121.
24. Bujnicki, J.M., *Protein-structure prediction by recombination of fragments*. *Chembiochem*, 2006. **7**(1): p. 19-27.
25. Han, P.F., et al., *Predicting disordered regions in proteins based on decision trees of reduced amino acid composition*. *Journal of Computational Biology*, 2006. **13**(10): p. 1723-1734.
26. Simons, K.T., et al., *Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions*. *Journal of Molecular Biology*, 1997. **268**(1): p. 209-225.
27. Bonneau, R., et al., *De novo prediction of three-dimensional structures for major protein families*. *Journal of Molecular Biology*, 2002. **322**(1): p. 65-78.
28. Chivian, D. and D. Baker, *Homology modeling using parametric alignment ensemble generation with consensus and energy-based model selection*. *Nucleic Acids Research*, 2006. **34**(17).
29. Rohl, C.A., et al., *Modeling structurally variable regions in homologous proteins with rosetta*. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 2004. **55**(3): p. 656-677.