

## A Frameshift Mutation causes Dentinogenesis Imperfecta Type II

Jiwon Hong, Teo Jeon Shin, Hong-Keun Hyun, Young-Jae Kim, Sang-Hoon Lee, Jung-Wook Kim

*Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Seoul National University*

### Abstract

Dentinogenesis imperfecta type II (DGI-II) is an inherited disorder affecting the dentin matrix and is related to mutations in the dentin sialophosphoprotein (*DSPP*) gene. The protein encoded by the *DSPP* gene undergoes extensive posttranslational modifications. Dentin phosphoprotein (DPP), one of the *DSPP* expressed products, has unique composition with highly repetitive Asp-Ser-Ser amino acid residues and is related to the maturation of dentin mineralization. We aimed to identify mutation in *DSPP*, including the DPP coding region, contributing to inherited dentin defects in a Korean family with DGI-II.

Clinical and radiographic examinations were performed, and all five exons and exon-intron boundaries of the *DSPP* gene were sequenced. Additionally, allele-specific cloning for highly repetitive DPP region was performed. By sequencing and cloning, a heterozygous single nucleotide deletion (c.2688delT) was identified. The identified mutation caused a frameshift in the DPP coding region. This frameshift mutation would introduce hydrophobic amino acids instead of hydrophilic amino acids and would result in a change in the characteristics of DPP.

**Key words :** Dentinogenesis imperfecta, Dentin sialophosphoprotein, Dentin phosphoprotein, Frameshift mutation

### I. 서 론

상아질은 치아의 주요 부분을 구성하는 성분 중 하나로, 치수를 보호하며, 파절과 마모에 저항할 수 있도록 법랑질을 지지하는 중요한 역할을 한다[1]. 따라서, 상아질에 결함이 있는 경우 상아질 자체의 물리적 성질 저하 및 법랑질 기능에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 현재 널리 사용되고 있는 유전성 상아질 형성부전 질환의 분류는 임상적 및 방사선학적 기준에 의하여 다음 5가지로 구분된다[2]. 상아질 형성부전증 제 I 형은 골 형성부전증과 동반되어 나타나며, 상아질 형성부전증 제 II 형과 비슷한 양상을 보이거나, 표현도(expressivity)가 한 환자에서도 다양하게

나타날 수 있다. 상아질 형성부전증 제 II 형은 갈색에서 유백색(opalescent)의 변색, 구근상(bulbous)의 치관 형태 및 치수강의 폐쇄가 나타나며, 제 I 형에 비해 균일한 표현도를 보인다. 상아질 형성부전증 제 III 형은 미국 Maryland 남부와 Brandywine 지방에서 처음 발견되었는데, 넓은 치수강의 각상치(shell teeth)와 심한 마모 및 변색이 특징적이다. 상아질 이형성증 제 I 형은 유치와 영구치의 임상적 치관 모양, 형태, 색조는 정상적이거나, 방사선학적으로 유치에서는 치수강 폐쇄가 나타나고, 영구치에서는 백악법랑질 경계와 평행한 초승달 모양의 위축된 치수강을 가진 짧은 치근을 가진다. 또한, 치아우식 없이 다수의 치근단 방사선 투과상이 나타난다. 상아질 이형성증 제 II 형의 유치 표현형은

Corresponding author : Jung-Wook Kim

Department of Molecular Genetics, Department of Pediatric Dentistry & Dental Research Institute, School of Dentistry, Seoul National University, 101 Daehak-ro, Chongno-gu, Seoul, 03080, Korea

Tel: +82-2-2072-2639 / Fax: +82-2-744-3599 / E-mail: pedoman@snu.ac.kr

Received September 29, 2016 / Revised October 13, 2016 / Accepted October 12, 2016

상아질 형성부전증 제 II 형과 비슷한 형태로 나타나지만, 연구치에서는 대부분 정상적인 형태, 모양, 색조를 보인다. 그러나 방사선학적으로 엉겅퀴 모양(thistle-tube)의 치수강과 치근관의 폐쇄가 관찰된다[1].

여러 유전성 상아질 형성부전 질환 중 상아질 형성부전증 제 II 형은 상염색체 우성 유전 패턴을 보이며, 유병률은 8천 명 중 1명에 이른다고 보고된 바 있다[1]. 지금까지의 연구에 의하면, 유전성 상아질 결함의 원인으로 염색체 4q21.3에 위치한 dentin sialophosphoprotein(DSPP) 유전자의 돌연변이가 보고되었다[1,3-5]. DSPP 유전자 산물은 상아질 비교원질성 단백질(non-collagenous proteins) 중 많은 부분을 차지한다. DSPP에 의해서 발현된 단백질은 광범위한 번역 후 변형(posttranslational modification)이 일어나, 주요한 두 부분으로 나누어지는데, 아미노 말단(N-terminal) 부분은 dentin sialoprotein(DSP)이고, 카르복실기 말단(C-terminal) 부분은 dentin phosphoprotein(DPP)이다[6]. 이 중 DPP는 상아질 비교원질성 단백질의 50% 정도를 차지하며, 칼슘 이온( $Ca^{2+}$ )과 교원질 섬유와 상호작용으로 상아질의 생화학적 석회화(biomineralization) 과정에서 중요한 역할을 한다[6]. 이는 DPP의 aspartic acid(Asp)와 serine(Ser) 아미노산이 반복되는 독특한 구조가 큰 역할을 한다. 전체 아미노산 중 aspartic acid와 serine 아미노산이 85% 이상을 구성하고 있으며, 아미노산의 세 개의 서열(Asp-Ser-Ser)이 고도로 반복되어, phosphorylated form을 형성하여 다른 이온과의 상호작용이 용이해진다. 그러나 DSPP에서 DPP domain의 size는 같은 종이라도 각각 다양하게 나타나며, 사람의 DPP는 770 - 902개의 아미노산으로 다양하게 보고되었다[7,8]. 이러한 변이는 고도로 반복된 서열을 포함한 영역의 다양성 때문이라고 볼 수 있다. 따라서, 이러한 높은 반복 서열과 다형성(polymorphism)으로, DPP 부위의 염기 서열 분석과 돌연변이에 대한 연구는 최근에 이르러야 연구가 시행되었다[8-11].

따라서 본 연구에서는 상아질 형성부전증 제 II 형 한국인 환자의 임상적 및 방사선학적 소견과 DPP 부위를 포함한, DSPP 유전자 염기 서열 분석을 시행하여, 유전성 상아질 형성부전 질환에 관여하는 유전자 돌연변이를 확인하고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 표본

'치아가 태생적으로 안 좋다'라는 주소로 서울대학교 치과병원 소아치과에 내원한 상아질 형성부전증 제 II 형의 12세 여아를 대상으로 하였다. 해당 연구 프로토콜은 서울대학교 치과병

원 Institutional Review Board의 승인 아래 진행하였다. 연구 대상자에게 연구 참여 동의서를 받은 후, 임상적 및 방사선학적 검사를 시행하였으며, 말초 혈액 샘플을 채취하였다. 또한, 인터뷰를 통해 가계도 조사를 시행하였다.

### 2. Primer 제작, 중합효소 연쇄 반응(Polymerase chain reaction, PCR), DNA 염기 서열 분석

채취한 말초 혈액 샘플로부터 QuickGene DNA whole blood kit S와 QuickGene-Mini80 equipment(Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 중합효소 연쇄 반응과 DNA 염기 서열 분석은 이전에 보고된 논문을 참고하여 진행하였다[3,4,12]. DSPP 5개 exon 영역을 증폭하기 위하여 사용한 primer는 다음과 같다. exon 1의 sense 5'-gggatcctaacaacagtgattggt와 antisense 5'-aaatcaaacctggcttcatctttg(248-bp); exon 2의 sense 5'-gatgccccataaccacacc와 antisense 5'-ctccatgacttctggcatt(594-bp); exon 3과 exon 4의 sense 5'-caagcctgtaagaagccact와 antisense 5'-acatggatgcttgcattg(1,490-bp); exon 5의 sense 5'-cctatggcaactttccagt와 antisense 5'-tgtcattgtcatattcccatt(589-bp). 중합효소 연쇄 반응은 HiPi DNA polymerase premix (ElpisBio, Daejeon, Korea)를 이용하여 진행하였다. 증폭된 산물은 PCR Purification Kit(ElpisBio, Daejeon, Korea)를 사용하여 정제한 후, DNA sequencing center(Macrogen, Seoul, Korea)에서 DNA 염기 서열을 분석하였다. 모든 핵산(nucleotide)의 번호(numbering)는 시작 코돈(codon) ATG의 A를 1로 시작하여 계산하였다.

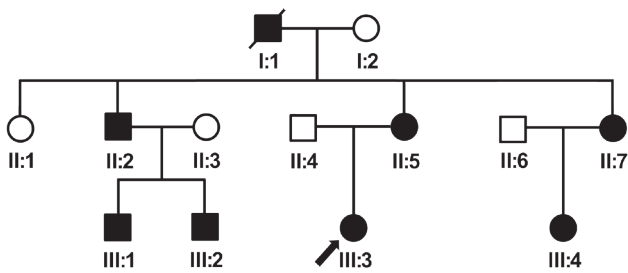
### 3. Allele-specific cloning 및 염기 서열 분석

DPP 영역의 높은 반복 서열로 인하여, 염기 서열 분석이 어려우므로 1.3kb의 3' 부분과 exon 5 영역의 전체 부분인 2.5kb 부분으로 나누어 cloning을 시행하였다. 사용한 primer 염기 서열은 다음과 같다. exon 5의 sense 5'-agtcctatgcaaggatgatcc와 antisense 5'-ctaatcatcactggttgagtgg(2534-bp); exon 5의 sense 5'-gatagcgacagcagcaataga와 antisense 5'-ctaatcatcactggttgagtgg(1353-bp). 증폭된 산물은 Top-cloner PCR cloning kit(Enzymomics, Seoul, Korea)를 이용하여 cloning 하였다. 각 clone의 plasmid DNA는 Plasmid Miniprep Kit(ElpisBio, Daejeon, Korea)를 이용하여 정제한 후, DNA sequencing center(Macrogen, Seoul, Korea)에서 분석한 DNA 염기 서열을 ClustalW2(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)를 이용하여 비교 분석하였다.

### III. 연구 성적

#### 1. 임상적 및 방사선학적 검사 결과

환자(III:3, Fig. 1)는 상아질 형성부전증 제 II 형의 12세 여아로, 조사된 가계도에 의하면 어머니는 환자의 임상적 표현형과 동일한 유전성 상아질 결함을 보이며, 아버지는 정상 치열을 지닌 것으로 조사되었다. 또한 환자의 가족 중 외할아버지, 이모, 외삼촌과 이종사촌에게서 유전성 상아질 결함이 관찰되었으며, 이는 상염색체 우성 유전 패턴이었다(Fig. 1). 임상적 및 방사선학적

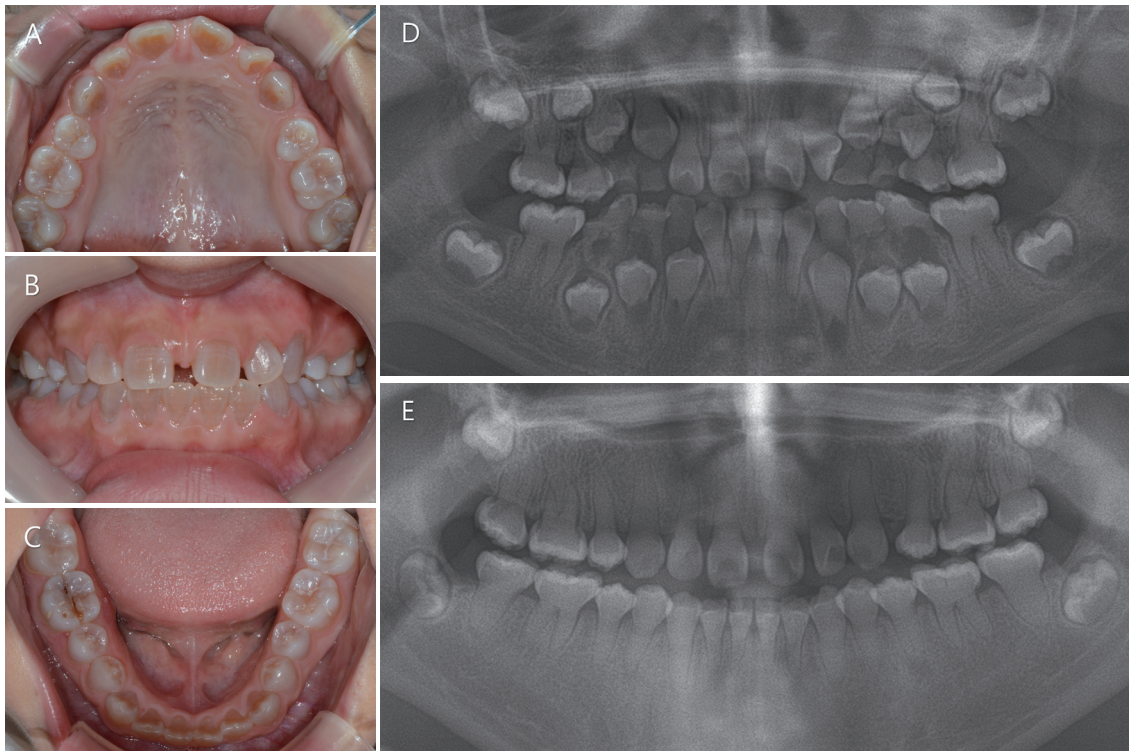


**Fig. 1.** Family pedigree. The arrow indicates proband; filled symbols indicate affected individuals.

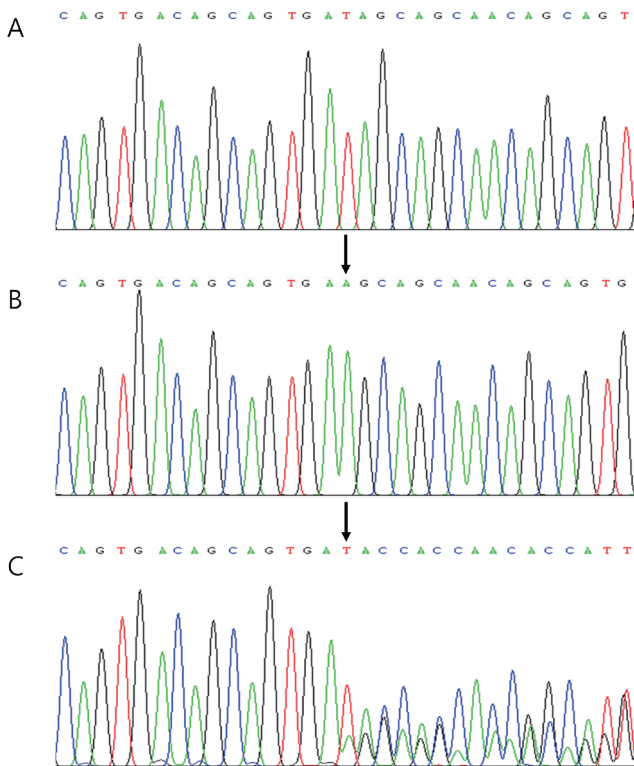
검사 결과 환자의 영구치는 황갈색(amber brown)과 회색조의 변색을 보였고, 구근상 치관 형태의 구치가 관찰되었다. 또한 완전한 치수강의 폐쇄가 관찰되었으며(Fig. 2), 골의 취약성(bone fragility)과 난청(hearing disruption)의 기왕력은 없었다.

#### 2. 유전자 돌연변이 분석 결과

*DSPP* 유전자 exon 부위의 염기 서열 분석 및 DPP 부위의 allele-specific cloning 염기 서열 분석 결과, exon 1 - 4 영역에서는 돌연변이가 관찰되지 않았으나, DPP 영역에서 2688번째 염기인 티민(thymine)이 결실된 것이 확인되었다(c.2688delT, Fig. 3). 발견된 돌연변이는 두 개의 allele 중 한쪽에서만 발견된 이형접합(heterozygous)으로 나타났으며, -1 net frameshift를 일으켜, DPP 영역에서 친수성 아미노산인 serine과 aspartic acid가 소수성 아미노산(alanine, valine, isoleucine 등)으로 치환되었다. Wild type *DSPP*는 1301개 아미노산을 갖는 반면, c.2688delT 돌연변이 대립형질(allele)은 1265개 아미노산으로 구성되며, 이 중 352개의 친수성 아미노산이 돌연변이에 의해 361개 소수성 아미노산으로 치환되었다.



**Fig. 2.** Clinical photographs and panoramic radiographs. (A - C) Clinical photographs of proband at the age of the 12 years. (D) Panoramic radiograph of proband at the age of the 7 years. (E) Panoramic radiograph of proband at the age of the 12 years.



**Fig. 3.** Mutational analysis. (A) DNA sequencing chromatogram of normal allele. (B) DNA sequencing chromatogram of mutated allele (c.2688delT). (C) DNA sequencing chromatogram of direct polymerase chain reaction amplification product. The arrows indicate the location of mutation.

#### IV. 총괄 및 고찰

*DSPP* 유전자 발현 산물 중 하나인 DPP는 친수성 아미노산인 Asp-Ser-Ser이 반복되는 독특한 구조로 phosphorylated form 형성에 용이하다. 이로 인하여, DPP는 peptide backbone에 phosphate와 carboxyl기가 풍부하게 되어 칼슘 이온과의 결합과 교원질 섬유와의 상호작용 및 결정성장 양상을 조절하여 상아질 biomineralization 과정에서 중요한 역할을 한다[13]. 그러나 DPP는 다형성 및 고도로 반복된 서열 때문에, 염기 서열 분석 및 상아질 형성부전증의 원인이 되는 돌연변이를 확인하는 것은 어려운 일로 여겨졌다.

본 연구에서는 유전적 상아질 질환 환자에서 DPP 부위를 포함한 *DSPP* 유전자의 염기 서열 분석을 통하여 유전적 원인을 찾아보고자 하였다. DPP 부위를 포함한, *DSPP*의 1 - 5 exon과 exon-intron 인접 부위의 염기 서열을 분석하였고, 고도 반복 서열을 지닌 DPP 부위는 allele-specific cloning을 이용하여 각

clone 간 비교 분석을 시행하였다. 그 결과, 2688번째 염기인 티민의 결실을 확인하였다(c.2688delT). 이는 -1 net frameshift 돌연변이를 일으켜 상아질 형성부전증 제 II 형을 유발하였다.

*DSPP* 유전자의 exon 1 - 4 부위와 exon 5 부위의 5' 말단 부위는 DPP를 암호화하고 있으며, 5' 말단 부위를 제외한 exon 5의 많은 부분은 DPP를 암호화하고 있다. 따라서 이번 연구에서 발견된 돌연변이의 위치를 고려해 보았을 때, DPP에 변이가 일어난 것을 알 수 있었다.

상아질의 석회화 과정에서 DPP 역할의 정확한 기전에 대해서는 명확히 알려지지 않았으나, 석회화 초기 과정을 조절하는 DSP와는 달리 DPP는 성숙(maturation)과정에 관여하며, 상아질 비교원성 단백질의 절반을 차지하는 만큼 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다[6,14]. 그러나 DPP의 -1 bp frameshift 돌연변이 단백질은 돌연변이가 발견된 부위의 downstream에 위치한 친수성 아미노산이 alanine, valine, isoleucine 등의 소수성 아미노산 잔기로 치환되어, 칼슘 이온과의 결합 및 교원질 섬유와의 특이적 상호작용 능력의 저하를 가져올 것이다. 또한, 돌연변이 단백질의 생화학적 변화는 단백질의 3차원 folding을 방해할 가능성이 있으며, 조면소포체(rough endoplasmic reticulum)의 막(membrane)에서 돌연변이 단백질의 trapping이 일어나 정상적인 수송(transport)이 일어나지 않게 될 수도 있다. 또한, 이형 접합 돌연변이는 haploinsufficiency를 유발하여 정상적으로 합성된 단백질 양의 감소를 초래할 수 있으며, 돌연변이 단백질 자체가 정상적인 DPP 및 상아질 석회화 과정에 관여하는 다양한 물질과의 상호작용을 하여 정상적인 기능에 영향을 줄 수 있다. 이러한 다양한 가능성으로 상아질 biomineralization 과정에서 결함이 나타나 상아질 형성부전증 제 II 형이 유발된 것으로 생각된다.

발견된 돌연변이 유전자는 2011년 Lee 등[4]에 의하여 혈연 관계가 아닌 두 한국인 가족에서 발생한 상아질 형성부전증 제 II 형을 유발하는 돌연변이로 보고되었다. 이들 두 가족의 표현형과 비교 시, 유사한 양상을 보이나, 같은 위치에서 돌연변이가 발생하였음에도 불구하고, 변색 정도에 약간의 차이가 나타났다. 이는 동일한 돌연변이라 할지라도 환경적 차이 및 다른 유전적 배경에 의하여 표현도의 차이가 나타날 수 있음을 의미한다. 또한, 상아질 석회화 과정은 여러 다른 다양한 물질들이 함께 상호작용하여 발생하는 복합적인 과정이기 때문일 수도 있다.

본 연구의 한계점은 유전성 상아질 형성부전 질환을 일으키는 돌연변이 *DSPP* 유전자를 확인하였지만, 변이된 유전자로부터 발현된 단백질의 정확한 생화학적 성질 및 3차원적 구조 변화와 이에 대한 다른 물질과의 명확한 상호작용 기전에 대한 연구가 부족하다는 것이다. 따라서 향후, 상아질 결함의 원인이 되는 돌



연변이 DSPP의 분자병리학적 메커니즘을 규명하기 위한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

## V. 결 론

본 연구에서는 상아질 형성부전증 제 II 형의 한국인 가족에서 DPP domain을 포함한 *DSPP* 유전자 염기 서열 분석 결과, 상염색체 우성 유전 패턴을 보이는 c.2688delT 돌연변이가 확인되었다. 이는 -1 net frameshift 돌연변이를 야기하여 DPP의 친수성 아미노산을 소수성 아미노산으로 치환시켜 DPP의 독특한 생화학적 물성의 변화로 상아질 형성부전증 제 II 형을 일으켰다. 비록 DPP의 명확한 작용기능을 확인할 수는 없었으나, 상아질 형성과정에서 필수적인 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다. 향후 해당 단백질의 상아질 석회화 기전의 명확한 메커니즘에 대한 연구 및 변이된 유전자로부터 발현된 돌연변이 단백질에 대한 분자병리학적 연구가 필요할 것이다.

## References

1. Kim JW, Simmer JP : Hereditary dentin defects. *J Dent Res*, 86:392-399, 2007.
2. Shields ED, Bixler D, el-Kafrawy AM : A proposed classification for heritable human dentine defects with a description of a new entity. *Arch Oral Biol*, 18:543-553, 1973.
3. Kim JW, Nam SH, Simmer JP, et al. : A novel splice acceptor mutation in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II. *Hum Genet*, 115:248-254, 2004.
4. Lee KE, Kang HY, Kim JW, et al. : Novel dentin phosphoprotein frameshift mutations in dentinogenesis imperfecta type II. *Clin Genet*, 79:378-384, 2011.
5. Nieminen P, Papagiannoulis-Lascarides L, Alaluusua S, et al. : Frameshift mutations in dentin phosphoprotein and dependence of dentin disease phenotype on mutation location. *J Bone Miner Res*, 26:873-880, 2011.
6. MacDougall M, Simmons D, Gu TT, 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*, 272:835-842, 1997.
7. Wang SK, Chan HC, Hu JC, et al. : Enamel malformations associated with a defined dentin sialophosphoprotein mutation in two families. *Eur J Oral Sci*, 119:158-167, 2011.
8. Song YL, Wang CN, Bian Z, et al. : Dentin phosphoprotein frameshift mutations in hereditary dentin disorders and their variation patterns in normal human population. *J Med Genet*, 45:457-464, 2008.
9. Lee SK, Lee KE, Kim JW, et al. : A novel mutation in the DSPP gene associated with dentinogenesis imperfecta type II. *J Dent Res*, 88:51-55, 2009.
10. McKnight DA, Simmer JP, Fisher LW, et al. : Overlapping DSPP mutations cause dentin dysplasia and dentinogenesis imperfecta. *J Dent Res*, 87:1108-1111, 2008.
11. Bloch-Zupan A, Huckert M, Dollfus H, et al. : Detection of a Novel DSPP Mutation by NGS in a Population Isolate in Madagascar. *Front physiol*, 7:70, 2016.
12. McKnight DA, Suzanne Hart P, Fisher LW, et al. : A comprehensive analysis of normal variation and disease-causing mutations in the human DSPP gene. *Hum mutat*, 29:1392-1404, 2008.
13. George A, Bannon L, Copeland NG, et al. : The carboxyl-terminal domain of phosphophoryn contains unique extended triplet amino acid repeat sequences forming ordered carboxyl-phosphate interaction ridges that may be essential in the biomineralization process. *J Biol Chem*, 271:32869-32873, 1996.
14. Suzuki S, Sreenath T, Kulkarni AB, et al. : Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol*, 28:221-229, 2009.

국문초록

## 상아질 형성부전증 제 II 형의 원인이 되는 Frameshift 돌연변이

홍지원 · 신터전 · 현홍근 · 김영재 · 이상훈 · 김정욱

서울대학교 치의학대학원 소아치과학교실

상아질 형성부전증 제 II 형은 상아질 기질에 영향을 미치는 유전질환으로 dentin sialophosphoprotein(DSPP)의 돌연변이에 기인한다. DSPP 발현 산물 중 하나인 dentin phosphoprotein(DPP)은 Asp-Ser-Ser 서열이 반복되는 독특한 구조로, 상아질 석회화 성숙 과정에 관여한다. 본 연구는 DPP 영역을 포함한 DSPP 유전자 염기 서열 분석을 통하여 유전성 상아질 결함의 원인이 되는 돌연변이를 확인하고자 하였다.

임상적 및 방사선학적 검사와 DSPP 유전자 염기 서열 분석 및 DPP 영역의 allele-specific cloning을 시행하여 비교 분석한 결과, 2688번 염기인 티민의 결실(c.2688delT)이 확인 되었고, -1 bp frameshift 돌연변이를 야기하였다. 이는 친수성 아미노산을 소수성으로 치환시켜, DPP 특성의 변화 및 상호작용 능력 저하를 일으켜 상아질 형성부전증 제 II 형의 원인으로 작용하였다.

**주요어:** 상아질 형성부전증, Dentin sialophosphoprotein, Dentin phosphoprotein, Frameshift 돌연변이