

Aus dem Lehrstuhl für Bioinformatik
des Theodor-Boveri-Instituts
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Dandekar

Erstellung eines genregulatorischen Netzwerkes zur Simulation der Entstehung von Zahnhartsubstanz

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
David Thelen
aus Kempen

Würzburg, Mai 2019



Referent: Prof. Dr. med. Thomas Dandekar

Korreferent: Prof. Dr. Jürgen Groll

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Mai 2020

Der Promovend ist Zahnarzt.

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Überblick.....	1
2 Einführung in die Genregulation und Netzwerke der Odontogenese.....	3
2.1 Grundlegende Signaltransduktionswege des Netzwerkes.....	3
2.1.1 <i>Apoptosis</i> (Apoptose)	4
2.1.2 <i>Cell Cycle</i> (Zellzyklus)	4
2.1.3 <i>Hedgehog signaling pathway</i> (Hedgehog-Signalweg)	5
2.1.4 <i>MAPK signaling pathway</i> (MAP-Kinase-Weg)	5
2.1.5 <i>mTOR signaling pathway</i> (mTOR-Signalweg).....	6
2.1.6 <i>Notch signaling pathway</i> (Notch-Signalweg)	7
2.1.7 <i>TGFbeta signaling pathway</i> (TGF- β -Signalweg)	7
2.1.8 <i>Wnt signaling pathway</i> (Wnt-Signalweg).....	8
2.2 Das zahnspezifische Netzwerk	9
2.3 Die Odontogenese	10
2.3.1 Ameloblasten.....	14
2.3.2 Zahnspezifische Gene/Proteine allgemein.....	15
2.3.3 Zahnspezifische Gene/Proteine im Netzwerk	20
2.3.4 <i>Secretory Calcium-binding Phosphoproteins</i>	22
2.3.5 Weitere Schmelzmatrixproteine	25
2.3.6 Dentinmatrixproteine.....	26
3 Material und Methoden	28
3.1 <i>Jimena</i>	28
3.1.1 Funktionsweise	28
3.2 Simulation.....	31
3.3 Graphische Darstellung	32
4 Etablierung eines Netzwerkes der Odontogenese	33
4.1 Erstellung des Stammbnetzwerkes	33
4.2 Implementierung der zahnspezifischen Gene.....	40
4.2.1 String Database.....	41
4.2.2 Proteinspezifische Domänen.....	41
4.2.3 <i>Enrichr</i>	42

4.3	Das genregulatorische Netzwerk.....	54
4.3.1	Bestimmung zentraler Gene.....	54
4.4	Netzwerksimulation	57
4.4.1	Berechnung der stabilen Zustände.....	57
4.4.2	Betrachtung der <i>healthy states</i>	59
4.5	Genaktivität im GEO-Datensatz.....	61
4.6	Auswertung	65
5	Diskussion	68
5.1	Einordnung	68
5.2	Medizinische Implikationen und zukünftige Entwicklung.....	70
5.3	Fazit.....	74
	Abbildungsverzeichnis.....	77
	Tabellenverzeichnis.....	79
	Literaturverzeichnis	82
	Anhang	101
	Danksagung	XIII

Abkürzungsverzeichnis

AMBN	Ameloblastin
AMELX	Amelogenin X
AMELY	Amelogenin Y
AMTN	Amelotin
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i> = knochenmorphogenetisches Protein
ChEA	<i>ChIP [Chromatin Immunoprecipitation] Enrichment Analysis</i>
CPU	Central Processing Unit
CTNNB1	β-Catenin
DGP	Deutsche Gesellschaft für Parodontologie
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DSPP	Dentinsialophosphoprotein
EC	aus embryonalen Stammzellen ausdifferen- zierte Epithelzellen
ECPA	Vergleich Epithelzellen – präsekretorische Ameloblasten
ECSA	Vergleich Epithelzellen – sekretorische Amelo- blasten
EKR 1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ENAM	Enamelin
engl.	englisch
<i>et al.</i>	et alii
ExpAkt	Expressions-Aktivierung
ExpHem	Expressions-Hemmung
Fa.	Firma
GB	Gigabyte
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GF	<i>Growth Factor</i> = Wachstumsfaktor

GHz	Gigahertz
GLA	γ -Carboxyglutaminsäure
GRN	<i>Gene Regulatory Network</i> = Genregulatorisches Netzwerk
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
GSK-3	Glycogensynthase-Kinase 3
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IniAkt	Initiale Aktivierung
IniHem	Initiale Hemmung
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia Of Genes And Genomes</i>
<i>logFC</i>	<i>Logarithmic Fold Change</i>
MAP(-Kinase)	<i>Mitogen-Activated Protein(-Kinase)</i>
MIH	Molaren-Incisiven-Hypomineralisation
MMP20	Matrix Metalloproteinase 20, Enamelysin
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin
mTORC1	Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1
mTORC2	Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 2
nm	Nanometer
NCPs	<i>noncollagenous proteins</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> = Nervenwachstumsfaktor
NICD	<i>Notch Intracellular Domain</i>
<i>p.value</i>	<i>probability value</i> = p-Wert, Signifikanzwert
PA	Fetale präsekretorische Ameloblasten aus Incisivi
PASA	Vergleich präsekretorische Ameloblasten – sekretorische Ameloblasten
PC	Personal Computer
PCP	<i>Planar Cell Polarity</i>
PIKK	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase</i>
RAM	Random Access Memory
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>

s	Sekunde
SA	Fetale sekretorische Ameloblasten aus Incisivi
SCPPs	<i>Secretory Calcium-binding Phosphoproteins</i>
SekAkt	Aktivierung Sekretion
SekHem	Hemmung Sekretion
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>
SQUAD	<i>Spectrum-based Quality Adaptation for Dynamic Adaptive Streaming over HTTP</i>
SS	<i>stable state</i>
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
syn.	synonym
t	Zeit
TGF- β / TGFbeta	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TOR	<i>Target of Rapamycin</i>
TRANSFAC	<i>TRANScriptioN FACtor database</i>
μm	Mikrometer

1 Überblick

Die Zahnentwicklung (Odontogenese) beim Menschen stellt einen hochkomplexen Prozess dar, der eine genaue Abstimmung der beteiligten Zellgewebe untereinander und eine präzise Regulation der Gene und Genprodukte innerhalb der Zellen selbst einfordert.^[1] Das besondere Merkmal der Zähne sind die beiden Zahnhartsubstanzen, welche die Zähne zu einem so effektiven Teil unseres Kauapparates machen: Das innen gelegene, die Zahnpulpa umgebende, in seiner Zusammensetzung knochenähnliche Dentin sowie der Zahnschmelz, der die äußere Ummantelung des sichtbaren Zahnanteils bildet und die härteste Substanz des menschlichen Körpers darstellt.^[2-4] Auch wenn über die genaue Entstehungsgeschichte der Odontogenese noch Uneinigkeit in der Forschung herrscht, ist der Erfolg des „Konzeptes Zahn“ über einen Zeitraum von mehr als 400 Millionen Jahren evolutionärer Entwicklung unbestritten.^[5,6]

Aus diesem Grund lohnen sich auch die genauere Betrachtung und die Erlangung eines tiefer greifenden Verständnisses der Mechanismen, die der Ausformung der Zähne zugrunde liegen. In der vorliegenden Arbeit soll dieses Verständnis durch einen bioinformatischen Ansatz ausgeweitet werden: Durch die Erstellung eines genregulatorischen Netzwerkes (GRN) sollen die intrazellulären Vorgänge während der Entstehung von Zahnhartsubstanz, wie sie in den darauf spezialisierten Zellen ablaufen, nachempfunden werden. Durch die Simulation verschiedener Szenarien sollen Hinweise darauf geliefert werden, welche intrazellulären Signalketten besonderen Einfluss auf die Odontogenese besitzen.

Zunächst wird hierfür ein ganz basales Modell für allgemeingültige zelluläre Vorgänge beim Menschen entwickelt. Als erster Schritt soll also ein genregulatorisches Netzwerk erstellt werden, welches dazu befähigt ist, „Grundmechanismen“ einer funktionsfähigen menschlichen Körperzelle darzustellen. Aufbauend darauf soll dann eine Verknüpfung dieses Netzwerkes mit zahnspezifischen Proteinen realisiert werden. Hierfür sollen Interaktionen ausgesuchter zahnspezifischer Proteine mit Proteinen des „Stammnetzwerkes“ recherchiert und die Verbindungen (Aktivierung/Hemmung der letztendlichen Expression der zahnspezifischen Proteine) in das Netzwerk implementiert werden. Bei den zahnspezifischen Proteinen handelt es sich um solche Proteine, bei denen eine Aktivität

direkt mit der Bildung von Zahnhartsubstanz konnotiert ist. Dieses Gesamtnetzwerk kann dann bei einer Simulation mithilfe des Simulationstools *Jimena* auf seine stabilen Zustände (= *stable states*) hin untersucht werden.^[7,8] Dies soll ermöglichen, für verschiedene Zustände eine Aussage darüber treffen zu können, ob es zu einer Aktivierung bzw. Expression der für die Zahnentwicklung essentiellen Proteine und damit zu einer potenziellen Zahnbildung kommt oder nicht. Ableitend daraus soll dann das Maß des Einflusses einzelner Signalwege auf die Zahnentwicklung diskutiert und beurteilt werden.

Im abschließenden Teil soll neben einer Einordnung der Arbeitsergebnisse im Kontext des aktuellen Forschungsstandes bewertet werden, welchen Stellenwert biochemische Erkenntnisse über Proteininteraktionen zum heutigen Zeitpunkt bereits in der Zahnmedizin besitzen. Außerdem soll erörtert werden, ob und in wieweit durch gezielte Forschung das zukünftige Verständnis physiologischer und pathologischer Vorgänge bei der Odontogenese auch im Hinblick auf Therapiemöglichkeiten im Bereich regenerativer Zahnmedizin verbessert werden kann.

2 Einführung in die Genregulation und Netzwerke der Odontogenese

Um ein grundlegendes Netzwerk zu generieren, welches die wichtigsten Signalwege einer undifferenzierten Zelle miteinschließt, wurden zunächst acht Signalwege ausgewählt, die auf sich verschiedene Kriterien miteinander vereinen:

- Essentiell für die regelhafte Funktion und/oder Entwicklung der Zelle,
- ubiquitäres Vorkommen in menschlichen Stammzellen,
- hoher Konservierungsgrad der beteiligten Proteine über viele Spezies hinweg als Hinweis auf hohen Bedeutungsgrad für Zellfunktionalität
- anerkannt lückenlos erforschte Signalkaskade,
- Überschneiden der beteiligten Proteine mit anderen Signalwegen bzw. Interaktion dieser,
- Proteininteraktionen finden vornehmlich im gleichen Zellkompartiment (Cytosol) statt
- Signalweg ist durch äußere Faktoren (z. B. Botenstoffe) steuerbar

Als Quelle für die verwendeten Signalwege diente in erster Linie die Online-Datenbank **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)**, welcher detaillierte und verifizierte Proteininteraktionsnetzwerke zu entnehmen sind, zusätzlich wurde externe Literatur zur Ergänzung der Daten genutzt.^[9]

2.1 Grundlegende Signaltransduktionswege des Netzwerkes

Nach den oben genannten Kriterien wurden acht Signaltransduktionswege als Grundlage für die Erstellung des Netzwerkes ausgewählt, welche an dieser Stelle kurz vorgestellt werden sollen:

2.1.1 Apoptosis (Apoptose)

Die einzelnen Zellen vielzelliger Organismen müssen, um ein koordiniertes Zusammenspiel zur Funktionserhaltung des Gesamtorganismus zu garantieren, einer strengen Regulierung unterliegen. Dies beinhaltet nicht nur die genaue Steuerung einer möglichen Zellteilung, sondern beinhaltet auch die Einleitung eines gezielten Zellsterbens von beispielsweise vorgeschädigten Zellen. Die damit verbundene Signalkaskade, die im Gegensatz zum Zelltod durch Nekrose einen „geordneten“ Untergang der Zelle zur Folge hat, ist in jeder Körperzelle abrufbar und wird Apoptose genannt.^[10] Der apoptotische Vorgang kann dabei auf zwei verschiedene Wege ausgelöst werden, welche auch Differenzen in den mit ihnen verbundenen Signalkaskaden aufweisen: Zum einen kann die Apoptose über den sogenannten intrinsischen Weg erfolgen, der durch interne Signale der Zelle selbst, beispielsweise bei irreparabler DNA-Schädigung oder zu starkem oxidativen Stress ausgelöst wird. Zum anderen kann die Einleitung der Apoptose mittels des extrinsischen, das heißt durch äußere Signale herbeigeführten Weges hervorgerufen werden. Dieser wird durch Ligandenbindung an sogenannte „Todesrezeptoren“ der TNF-Rezeptorfamilie in der Zellmembran verursacht.^[11] Beide Wege führen letztendlich zur Aktivierung von proteolytischen und DNA-abbauenden Enzymen (Caspasen und DNasen), welche lebenswichtige zelluläre Bestandteile abbauen und die anschließende Phagozytose der Zellreste durch körpereigene Fresszellen erleichtern.^[10,12]

2.1.2 Cell Cycle (Zellzyklus)

Die Signalkaskade, die der möglichen Teilung einer dazu befähigten Zelle in zwei identische Tochterzellen zugrunde liegt, ist der sogenannte Zellzyklus. Bei höheren Lebewesen sind unter anderem adulte Stammzellen zu einer solchen Teilung in der Lage - aus den entstehenden Tochterzellen entwickeln sich schließlich durch Ausdifferenzierung die auf bestimmte physiologische Funktionen spezialisierten Zellen, wie beispielsweise Epithel- oder Nervenzellen. Auch bei dem in vier Phasen eingeteilten Zellzyklus handelt es sich um ein streng reguliertes System, da es bei unkontrollierten Zellteilungen zur Überwucherung des betroffenen Zelltyps und damit zu einer Tumorentstehung kommen

könnte.^[10,13] Die vier Phasen, G₁-Phase (Zellwachstum, Protein- und Nucleotidsynthese), S-Phase (DNA-Replikation), G₂-Phase (Vorbereitung auf Zellteilung) und Mitose (Zellteilung), laufen also nur bei einer gesunden Zelle kontrolliert ab, stimuliert durch Wachstumsfaktoren. Bei Zellen, bei denen keine weitere Teilung mehr vorgesehen ist, folgt nach der Synthetisierung der benötigten Zellbestandteile in der G₁-Phase die G₀-Phase (Ruhephase), die nicht mehr Bestandteil des Zellzyklus ist. Wichtig ist außerdem zu erwähnen, dass bei registrierten Fehlfunktionen im Ablauf des Zellzyklus dessen Anhalten erzwungen (sog. Arrest) und bei Unumkehrbarkeit dieser Schädigung die Apoptose der betroffenen Zelle eingeleitet wird.^[10]

2.1.3 Hedgehog signaling pathway (Hedgehog-Signalweg)

Der Hedgehog-Signalweg ist ein Zelloberflächenrezeptor-verbundener Signalweg, der für die Steuerung von Zellstrukturierung und Zellproliferation zuständig ist.^[14] Der Hedgehog-Signalweg spielt dabei vor allem in der Embryonalentwicklung eine herausragende Rolle, reguliert aber auch die Homöostase in adulten Stammzellen. Überfunktionen werden als Risiko für Tumorerkrankungen angesehen, angeborene Mutationen führen zum Auftreten schwerer Krankheitsbilder.^[15] Neuere Forschungen ergeben aber auch Hinweise auf direkte Einflüsse der Signalkaskade auf den Zellstoffwechsel.^[16] Das *Hedgehog*-Gen ist hochkonserviert und tritt bei Wirbeltieren in drei orthologen Varianten auf - *sonic*, *indian* und *desert hedgehog* -, wobei im Rahmen dieser Arbeit nur die vereinfachte Version des Sonic-Hedgehog-Signalweges betrachtet werden soll, da dieser auch die wichtigste Rolle in der Zellentwicklung einnimmt.^[17]

2.1.4 MAPK signaling pathway (MAP-Kinase-Weg)

Bei **Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)** handelt es sich um eine Reihe hochkonservierter Serin/Threonin-Kinasen, welche namensgebender Bestandteil mehrstufiger Signaltransduktionskaskaden sind, die an einer Vielzahl grundlegender wie unterschied-

licher zellulärer Prozesse direkt oder indirekt beteiligt sind. Dazu zählen etwa Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Reaktionen auf biochemischen Stress, Einleitung apoptotischer Vorgänge oder auch die Steuerung von Zellwanderungen.^[11] Dabei gelten vor allem die Familien der durch extrazelluläre Signale regulierten MAPK (ERK1/2), sowie die C-Jun-N-terminalen Kinasen 1 bis 3 (JNK1-3) und p38 (α , β , γ , und δ) als die am besten erforschten und finden Eingang in das Netzwerk.^[18]

Grundsätzlich handelt es sich bei den MAP-Kinase-Wegen um dreistufige Phosphorylierungskaskaden, die es unter anderem ermöglichen, gleichzeitig eintreffende Signale aus verschiedenen Quellen verstärkend zu verarbeiten und an verschiedenen subzellulären Orten wirksam zu werden – es handelt sich also praktisch nicht um unabhängige Systeme, sondern um ein einziges unter sich abgestimmtes Netzwerk.^[19,20]

2.1.5 mTOR signaling pathway (mTOR-Signalweg)

Bei mTOR (für *mechanistic* [früher: *mammalian*] *Target of Rapamycin*) handelt es sich um eine atypische Serin/Threonin-Kinase aus der Familie der PIKKs (*Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*).^[11,21,22] Sie hat unter anderem Einfluss auf Vorgänge beim Zellwachstum, der Proliferation und Motilität, sowie auf Gentranskription und Proteinsynthese;^[23] Versuche an Mäusen konnten zeigen, dass ein Knockout des mTOR-Gens einen intrauterinen Tod zur Folge hat.^[24] Dabei stellt mTOR die Säugetier-spezifische Variante des in allen Eukaryonten vorkommenden TOR-Proteins dar, welches beim Menschen in zwei verschiedenen Komplexen vorliegt: mTORC1 und mTORC2 (*mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 bzw. 2*).^[11,25]

mTORC1 fällt dabei die Rolle eines Wachstumsregulators zu, der sensibel ist für die Einflüsse von Wachstumsfaktoren, verfügbaren Ressourcen sowie zellulärem Stress und entsprechend über darauf vermittelte Signale anabole Prozesse wie mRNA-Translation oder Lipidsynthese anstößt.^[11] mTORC2, das deutlich weniger auf die Wirkung von Rapamycin anspricht als mTORC1, ist in der Lage, zelluläres Überleben (durch Akt-Aktivierung) ebenso zu steuern wie Ionentransporte und cytoskelettale Prozesse.^[11,26]

2.1.6 Notch signaling pathway (Notch-Signalweg)

Auch beim Notch-Signalweg handelt es sich um einen hoch konservierten Signaltransduktionsweg in Vielzellern. Er ist sowohl in embryonalem als auch in adultem Gewebe in wichtige Zellfunktionen wie Proliferation und Differenzierung involviert und Störungen seines regulären Ablaufes können eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Tumoren und anderen Krankheiten einnehmen.^[11,27,28] Beim Menschen sind vier transmembranäre Notch-Rezeptoren bekannt, deren Aktivierung eine Abspaltung einer intrazellulären Domäne (*Notch intracellular domain* = NICD) und deren Weitertransport in den Nucleus bewirkt. Dort interagiert diese dann mit Transkriptionsfaktoren und nimmt dadurch Einfluss auf die Genexpression und reguliert so zum Beispiel nachgeschaltete Signalwege.^[27,29,30]

2.1.7 TGFbeta signaling pathway (TGF-β-Signalweg)

Das im Folgenden als TGF-β (*Transforming growth factor beta*) bezeichnete Protein steht für die drei humanen Isoformen TGF-β1, TGF-β2 und TGF-β3, welche wiederum Mitglieder der nach ihnen benannten TGF-β-Superfamilie darstellen. Zu dieser Superfamilie gehören unter anderem Aktvine, Inhibine und die knochenmorphogenetischen Proteine (BMPs), die zum Großteil durch charakteristische Cystein-Reste gekennzeichnet sind.^[31,32] Die mit ihnen konnotierten, hoch konservierten Signalkaskaden wirken auf Zellwachstum, -differenzierung und -entwicklung sowie eine Reihe weiterer biologischer Systeme ein.^[11,33] Auch beim TGF-β-Signalweg spielen Serin/Threonin-Kinasen als Ligandenakzeptoren in der Zellmembran und damit als Ausgangspunkte für die intrazelluläre Kaskade eine zentrale Rolle. Eine Weiterleitung der Informationen zu schlussendlich regulatorischen Vorgängen im Zellkern findet in hohem Maße über die SMAD-Proteine statt, wobei SMAD2 und SMAD3 für die Transduktionen im TGF-β/Aktivin-Signalweg zuständig sind und SMAD1/5/9¹ für jene des BMP-Signalweges.^[9,11,34,35] Das Tumorsupp-

¹ Bei SMAD8 und SMAD9 handelt es sich um dasselbe Protein. Im Rahmen dieser Arbeit wird stets SMAD9 verwendet, da seine Verwendung gebräuchlicher scheint.^[230]

ressoren SMAD4 ist in der Lage, andere SMAD-Proteine komplexartig zu binden und ihren Transport in den Zellkern zu ermöglichen, SMAD6 und SMAD7 wirken wiederum inhibitorisch auf die Signalkaskaden.^[11,36]

Über den *TGF-beta receptor type 2* finden außerdem im Rahmen des TGF- β -Signalweges auch SMAD-unabhängige Signaltransduktionen statt, diese finden dann direkten Einfluss auf den MAP-Kinase-Weg.^[11,34]

2.1.8 Wnt signaling pathway (Wnt-Signalweg)

Dem ebenfalls hoch konservierten Wnt-Signalweg wird eine entscheidende Bedeutung bei der Vermittlung kontinuierlicher Erneuerungsvorgänge in menschlichen Geweben wie Epithelien der Haut und des Darms oder im Rahmen der Hämatopoese zugeschrieben. Die Aktivierung der hydrophoben WNT-Proteine, die zu einer derzeit 19 bekannte Mitglieder zählenden Familie von Glykoproteinen gehören, findet dabei in der Mikroumgebung von Zellen, also durch direkte Zellnachbarn statt.^[33,37–39] Die WNT-vermittelten Signale nehmen maßgeblichen Einfluss auf die Zellanordnung und damit auf die räumliche Ausformung des Gesamtorganismus, spielen also auch während der gesamten Embryonalentwicklung eine zentrale Rolle.^[40]

Es existieren mehrere Varianten des Wnt-Signalweges, die größtenteils unabhängig voneinander ablaufen: Die Bindung der WNT-Liganden an die transmembranären *Frizzled* (FZD)- und LRP-Rezeptoren führt beim sogenannten „kanonischen“ Wnt-Signalweg zu einer Reihe von Komplexbildungen, an deren Ende zunächst die Stabilisierung von β -Catenin (CTNNB1) – das im Ruhezustand einer Ubiquitinierung und damit stetigem Abbau unterliegt – und dessen Translokation in den Zellkern stehen. Hier finden dann die Bindung an Transkriptionsfaktoren der LEF1-/TCF-Familie und die darauffolgende Aktivierung entsprechender Zielgene statt.^[37,41]

Die alternativen oder auch „nichtkanonischen“, β -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalwege zielen neben der Genregulierung auch auf Modifikationen des Cytoskeletts ab.

Hierbei erforscht sind der *Planar Cell Polarity (PCP) Pathway* sowie der *WNT/Ca²⁺-Pathway*, der von WNT5 angesteuert wird und die Calciumfreisetzung am endoplasmatischen Retikulum mitreguliert.^[37,42,43]

2.2 Das zahnspezifische Netzwerk

Die in Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** aufgeführten Signalkaskaden dienen als Grundbausteine einer funktionierenden Zelle und können zum einen miteinander verknüpft und zum anderen einfach durch weitere bekannte und verifizierte Proteininteraktionen ergänzt werden.

Die Signalkaskaden wurden zum Teil gekürzt, um zunächst nur die grundlegenden Abläufe im Hauptnetzwerk darzustellen, was vor allem der Übersicht dienen und zudem die Rechenzeiten bei Simulationen verringern soll. Die Verknüpfung der einzelnen Signalwege zu einem großen Netzwerk entsteht somit über ihre gemeinsam beteiligten Proteine.

Das so generierte Grundnetzwerk stellt somit also den „Rohbau“ einer Zelle dar, noch ohne expliziten Bezug zu einer zahnspezifischen Zelle. Es entsteht hierbei also ein sogenanntes genregulatorisches Netzwerk (GRN, *gene regulatory network*), eine informati-sche Annäherung an die hochkomplexen biologischen Vorgänge innerhalb einer Zelle. Ein solches Modell kann mit den zum heutigen Zeitpunkt verfügbaren Mitteln immer nur eine Annäherung an die tatsächlichen Abläufe sein, da es entweder nicht alle beeinflus-senden Faktoren in Betracht ziehen kann – dies reicht beispielsweise von Umweltein-flüssen und Krankheiten über Prozessierungsvorgänge bis hin zu zellindividuellen Unter-schieden – oder die genauen Zusammenhänge zu komplex oder schlicht noch nicht ge-nau genug erforscht sind.^[44–47]

Als Fernziel soll dann später überprüft werden, an welcher Stelle zahnspezifische Proteine mit den an diesen Grundmechanismen beteiligten Proteinen wechselwirken. In die-sem Fall soll das Netzwerk die Entstehung von Zahnhartsubstanz simulieren können, was im menschlichen Körper nur durch zwei Zelltypen bewerkstelligt werden kann: Ameloblasten (syn.: Adamantoblasten, Enameloblasten), die für die Bildung des Zahnschmelzes (*Enamelum*) zuständig sind, und Odontoblasten, die das Dentin produzieren. Um die

im Folgenden erwähnten Stadien der Zahnausreifung nachvollziehen zu können, soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die Zahnentwicklung (Odontogenese) gegeben werden.^[48] Da in dieser Arbeit ein Hauptaugenmerk auf die Schmelzbildung durch Ameloblasten gelegt ist und um der Thematik nicht zu ausführlich zu begegnen, wird im Folgenden vor allem die Entwicklung dieses Zelltypus betrachtet.

2.3 Die Odontogenese

Über alle Wirbeltiere hinweg sind Zähne stets nach dem gleichen Grundprinzip aufgebaut: Eine innere *Pulpa*, die Blutgefäße und Nervenfasern enthält, wird nach außen hin von zwei weiteren Schichten umschlossen. Die innere, direkt an die Pulpa grenzende Schicht besteht aus mineralisiertem, jedoch von Zellausläufern durchzogenem Hartgewebe, sogenanntem *Dentin*. Diesem liegt im Bereich der Zahnkrone der äußere Zahnschmelz (*Enamelum*) auf, der nahezu vollständig mineralisiert (und somit anorganisch) ist und beim Menschen die härteste Körpersubstanz darstellt.^[49]

Der Mensch ist *diphyodont*, bildet also zwei Zahngenerationen aus, wobei die Entwicklung der Zähne mit dem Entstehen der Milchzähne bereits im zweiten Embryonalmonat einsetzt und mit der vollständigen Ausreifung und anschließenden Eruption des dritten Molars im Alter von bis zu 25 Jahren endet. Die im Folgenden getätigten Aussagen zu den Zeitpunkten der Zahnentwicklung beziehen sich auf die Milchzähne, die embryologischen Vorgänge sind jedoch auf die Zähne der permanenten Dentition übertragbar.^[50,51]

Aus der anfänglich entstehenden Zahnleiste bilden sich ab der sechsten Embryonalwoche Schmelzknospen aus, die aus Zellen des Ektoderms des ersten Pharyngealbogens und dem Neuralleistenmesenchym hervorgehen. Der ektomesenchymale Anteil bildet im weiteren Verlauf die Zahnpapille, aus der später Dentin und Pulpa hervorgehen sowie das Zahnsäckchen, den Vorläufer des Zahnhalteapparats. Aus dem ektodermalen Schmelzorgan entwickeln sich die Ameloblasten.^[52-54]

Auf die Ausbildung der Schmelzknospen folgen mit der zunehmenden Organisation der beteiligten Zellen weitere histologisch gut abgrenzbare Stadien: Zunächst das Kappenstadium (9. - 14. Embryonalwoche), das von einer starken Proliferation der ektomesenchymalen Zellen gekennzeichnet ist, bei der sich eine aus zwei Blättern bestehende Zahnkappe herausbildet, die zunehmend von fibrösem Bindegewebe – dem Zahnsäckchen – eingeschlossen wird. Es folgt von der 14. bis 21. Woche das Glockenstadium, in dem auch hauptsächlich die Ausdifferenzierung der Ameloblasten und Odontoblasten stattfindet.^[51,55]

Das nun glockenförmige Schmelzorgan beinhaltet die Schmelzpulpa und ist an seiner konkaven Unterseite durch die Zellen des inneren Schmelzepithels begrenzt, den späteren (Prä-)Ameloblasten. Die Form des inneren Schmelzepithels gibt auch die spätere Morphologie des jeweiligen Zahnes vor. Im Hohlraum der „Glocke“ bildet sich währenddessen die Zahnpapille aus. Aus ihr entstehen in unmittelbarer Nachbarschaft zum inneren Schmelzepithel aus einem Band mesenchymaler Zellen die Prä-Odontoblasten (solange Amelo- und Odontoblasten nicht mit der Produktion von Schmelz beziehungsweise Dentin begonnen und ihre hochprismatische Endform eingenommen haben, wird ihnen noch der Zusatz „Prä-“ vorangestellt).^[53,56]

Im aus histologischer Sicht letzten Stadium, dem Kronen- oder Reifestadium, wird nun in einem von wechselseitigen Induktionen bestimmten Prozess auch Zahnhartsubstanz gebildet. Die Basalmembran des Schmelzorgans, die (Prä-)Ameloblasten und (Prä-)Odontoblasten voneinander trennt, verdickt sich zunächst durch retikuläre Fasern (dann Membrana praeformativa genannt) und bildet sich im vierten Entwicklungsmonat wieder zurück, was den Beginn der Bildung von Kollagenfibrillen durch die Odontoblasten provoziert, des sogenannten Prädentins. Obwohl der Beginn der Differenzierung der Ameloblasten derer der Odontoblasten zeitlich zunächst vorausgeht, induziert erst die vorige Prädentinbildung und dessen anschließende Verkalkung die Sezernierung von Schmelzmatrix.^[53,55,56]

Durch die fortwährende Sezernierung von Schmelz und Dentin zwischen den jeweiligen Zelllagen kommt es zu einer immer weiteren Entfernung der Zellkörper der Odonto- und Ameloblasten voneinander. Während der Schmelz dabei zellfrei verbleibt, hinterlassen

die Odontoblasten in den von ihnen produzierten Dentinregionen dünne Zellausläufer, die sogenannten Tomes-Fasern, die in Dentinkanälchen eingeschlossen und zeitlebens in der Lage sind, weiteres Dentin zu produzieren.^[53,55,56] Streng genommen nehmen die Zellkörper der Odontoblasten dabei die äußerste Schicht der Pulpa ein, während das von ihnen sezernierte Prädentin die innerste Schicht der Dentinummantelung darstellt.^[5]

Das Ende des Schmelzorgans bildet die zervikale Schlinge, von der an die Hertwigsche Epithelscheide die „Gussform“ für das Dentin apikal der Krone, das Wurzeldentin, bildet. Sie erzeugt hier entsprechend zum Schmelzorgan den Induktionsreiz zur Dentinbildung, ist aber lückenhaft und ermöglicht so den Kontakt von Wurzeldentin zu den Mesenchymzellen des Zahnsäckchens, was wiederum für diese den Induktionsreiz für die Bildung von Teilen des Zahnhalteapparates – Zement und Desmodont – darstellt. Die gesamte Mineralisierung der Zähne beginnt stets an deren koronalsten Punkt, endet also an der Wurzelspitze und ist erst zwei bis drei Jahre nach der Zahneruption in die Mundhöhle abgeschlossen.^[53,55]



Abbildung 1: Histologisches Schnittpräparat eines fetalen Ratten-Incisivus, Kronenstadium (HE-Färbung). Legende: A – Mundhöhle; B – Mundhöhlenepithel; C – Knochen; D – Schmelzorgan; E – Zahnschmelz; F – Dentin; G – (frühe) Pulpa; H – skelettaler Muskel. Die im Bereich des Rechtecks befindlichen Strukturen werden in Abbildung 2 genauer betrachtet.^[57]

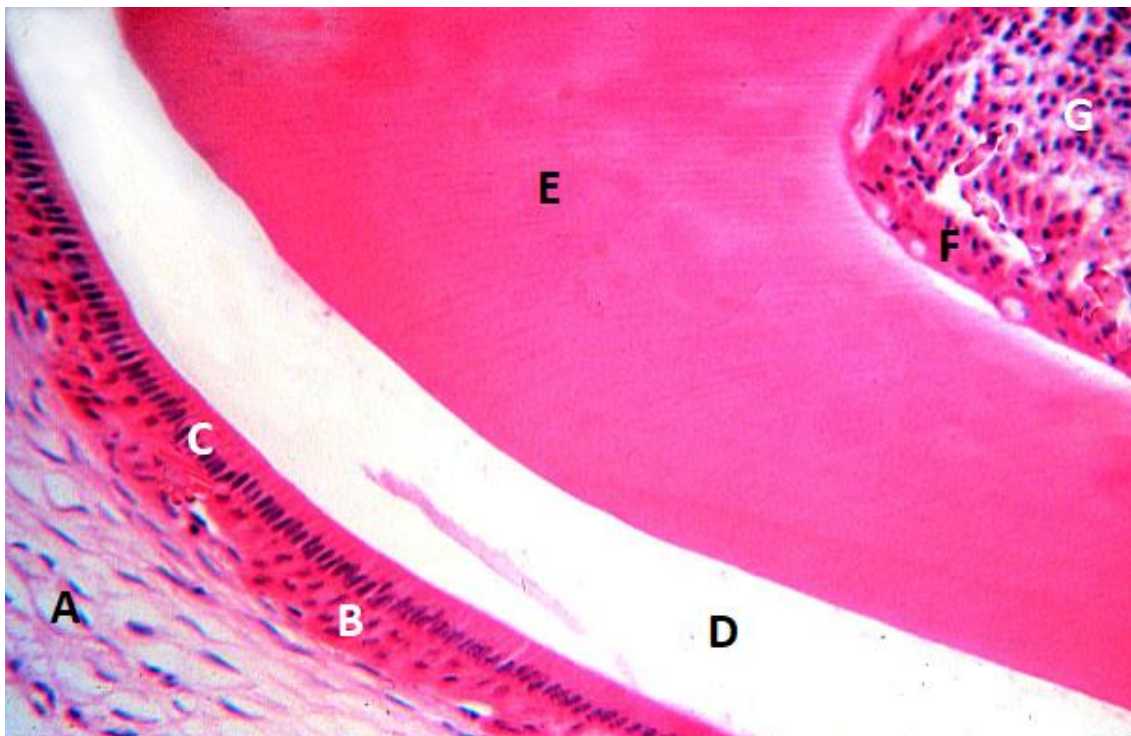


Abbildung 2: Vergrößerter Ausschnitt eines histologischen Präparates entsprechend des rechteckigen Abschnittes in Abbildung 1. Legende: A – Stratum reticulare; B – Stratum intermedium; C – Ameloblasten; D – Zahnschmelz; E – Dentin; F – Odontoblasten; G – (frühe) Pulpa.^[57,58] Histologisches Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung durch D. W. Vaughan, PhD, Boston University School of Medicine.^[59]

2.3.1 Ameloblasten

Die Ameloblasten zeigen im Laufe ihres Lebens verschiedene Reifezustände: Zunächst liegen sie als kuboide, noch teilungsfähige Zellen im inneren Schmelzepithel vor, bevor sie als Reaktion auf den distalen Kontakt zum Ektomesenchym der Zahnpapille und des Prädentins zu Prä-Ameloblasten differenzieren. Auf der anderen, proximalen Seite der Ameloblasten liegt das drei bis vier Zellreihen dünne Stratum intermedium, dessen Zellen reich an alkalischer Phosphatase sind. Während Mitochondrien und Zellkern in dieser Phase der Zellverlängerung zur proximalen Zellseite wandern, kann anhand des stark vergrößerten rauen endoplasmatischen Retikulums auf eine gesteigerte Proteinbiosynthese geschlossen werden.^[5,60]

Es folgt das Zwischenstadium als präsekretorische Ameloblasten, währenddessen sich auch die distal gelegene Basallamina auflöst. Die Ameloblasten sind dabei untereinander an ihren Polen durch dichte Schlussleistennetze verbunden. Einige cytoplasmatische Ausläufer stellen den Kontakt zu Odontoblastenfortsätzen oder bereits sezerniertem Prädentin her, was als auslösender Faktor für die weitere Differenzierung angesehen wird.^[5]

Die sezernierenden oder sekretorischen Ameloblasten transportieren schließlich die am rauen endoplasmatischen Retikulum produzierten Schmelzmatrixproteine in abgeschwämmten, bis zu 1,5 µm großen Vesikeln zum distalen Ende der Zellen. Während in der allerersten Phase der Sekretion der auch mit hohen Ca^{2+} -Konzentrationen ausgestatteten Granula diese auf der gesamten distalen Oberfläche der Ameloblasten stattfindet, bilden die Zellen darauffolgend einen einseitig mit Membranen durchsetzten Tomes-Fortsatz aus. Durch diese Einstülpungen findet im reifen sekretorischen Ameloblast dann die ekkrine Vesikelsekretion statt. Dabei werden nicht nur aufbauende Schmelzmatrixproteine ausgeschieden, die Tomes-Fortsätze steuern unter anderem durch resorptive Vorgänge auch Form, Größe und Anordnung der Schmelzprismen.^[5,61]

Im Laufe der Zeit kommt es neben einer Verkürzung der Ameloblasten auch zu einem Funktionswandel: Während etwa die Hälfte der Ameloblasten durch Apoptose zugrunde geht, führen die verbliebenen Zellen zur weiteren Schmelzreifung eine Rückresorption

fast der gesamten organischen Matrix durch. Dabei sinkt deren Anteil am Gesamtgewicht schließlich von 30 Prozent zu Beginn auf nur noch ein Prozent zum Abschluss der Schmelzreifung. Es kommt zu einer Rückbildung der Tomes-Fortsätze und einer Verkürzung der Zellkörper sowie rhythmischen Wechseln zwischen resorptiven Phasen und solchen, in denen Phosphat- und Calciumionen sezerniert werden.^[5,56,62]

Zuletzt erreichen die dann inaktiven Ameloblasten wieder ihre kuboide Form, vom Schmelz trennt sie eine amorphe Proteinschicht. Nach der drei bis sechs Jahre andauernden Schmelzreifungsphase, in der der Schmelz seine endgültige Härte verliehen bekommt, bedeckt nur noch ein reduziertes Schmelzepithel als Rest des Schmelzorgans die Zahnkrone. Beim Durchbruch des Zahnes geht es nahezu vollständig unter, aus seinen Randbereichen geht jedoch das Saumepithel der Gingiva hervor.^[5,53]

2.3.2 Zahnspezifische Gene/Proteine allgemein

Die Bildung der Zahnhartsubstanz durch Amelo- und Odontoblasten ist mit verschiedenen Proteinen assoziiert, die als mehr oder weniger zahnspezifisch gelten. Um eine möglichst genaue Annäherung des Netzwerkes an die zellulären Vorgänge bei der Entwicklung eines Zahnhartsubstanz-produzierenden Zelltyps herzustellen, sollte zunächst einmal festgestellt werden, welche der in der Literatur beschriebenen Proteine als geeignet für eine Implementierung in das Netzwerk angesehen werden können.

Auch hier gilt es, verschiedenen Kriterien zu beachten: Zunächst sollte das Protein eine möglichst hohe Spezifität zu Amelo- bzw. Odontoblasten besitzen, um so sicher zu gehen, dass eine Expression des Proteins auch mit einer hohen Wahrscheinlichkeit die Ausreifung der Zelle mit Bildung von Schmelz bzw. Dentin widerspiegelt. So könnte anhand eines Proteins, das zwar bei der Ausreifung von dentalen Zellen aber eben auch in anderen Zelltypen, wie Osteoblasten oder gar ubiquitär vorkommt, keine verlässliche Aussage über dessen Rolle bei der Ausreifung der Zellen und Bildung von Zahnhartsubstanz getätigt werden.

Im besten Falle ist das entsprechende Protein auch messbarer Bestandteil der organischen Extrazellulärmatrix des Zahnes. Zuletzt sollte eine bestätigte Interaktion der gesuchten Proteine zu den im Ursprungsnetzwerk verwendeten Proteinen herstellbar sein, um auch die entsprechende Verbindung und mögliche Simulation der zellulären Vorgänge mit dem „Endergebnis“ einer Zahnhartsubstanzbildung zu garantieren. Allerdings könnte auch ein – sofern ausreichend in der Literatur bestätigter – negativer oder positiver Regulator der Zahnentwicklung sinnvoll in das Netzwerk eingebaut werden.

Um die geeigneten Proteine zu finden, wurde zunächst eine Liste von Proteinen erstellt, die als mögliche Kandidaten in Frage kommen. Aus dieser Liste sollte dann eine Auswahl derjenigen Proteine erfolgen, welche den oben genannten Kriterien am besten entsprechen. Um diese Liste zu erstellen und geeignete Proteine identifizierbar zu machen, wurden verschiedene Ansatzpunkte gewählt, die im Folgenden beschrieben sind.

2.3.2.1 Gene Ontology Project

Der erste Ansatzpunkt für die Vorauswahl stützte sich auf Online-Datenbanken, aus denen Annotationen der humanen Proteine zu entnehmen sind. Hier wurde gezielt nach Proteinen mit explizit zahnspezifischem Bezug gesucht. Als umfangreiche Quelle diente hier die Datenbank des *Gene Ontology (GO) projects*, in der auch Annotationen verschiedener anderer Datenbanken geprüft und zusammengeführt werden.^[63,64] Die Datenbank stellt dabei gewisse ontologische Klassen („*terms*“) zur Verfügung, die biologische Vorgänge bezeichnen und denen die jeweils daran beteiligten Gene bzw. Genprodukte zugeordnet werden. Dies erleichtert die Suche nach an der Zahnentwicklung beteiligten Proteinen.

Dabei wurden nur menschlichen Proteine aus solchen *terms* betrachtet, die nicht allein mit der Zahnentwicklung im Allgemeinen, sondern im Speziellen mit der Ausbildung von Zahnhartsubstanz konnotiert sind: *amelogenesis*, *dentinogenesis*, *enamel mineralization*, *positive regulation of enamel mineralization*, *regulation of enamel mineralization* und *structural constituent of tooth enamel*. Diese Auswahl schließt 29 verschiedene Gene ein, die in der folgenden Tabelle mit dazugehörigem Genprodukt und den ihnen zugeordneten ontologischen Klassen kurz vorgestellt werden.

Gen	Genprodukt	Ontologische Klasse [AmiGo]
AMBN	Ameloblastin	<i>structural constituent of tooth enamel</i>
AMELX	Amelogenin, X-linked	<i>enamel mineralization</i> <i>structural constituent of tooth enamel</i> <i>tooth mineralization</i>
AMELY	Amelogenin, Y-linked	<i>structural constituent of tooth enamel</i> <i>tooth mineralization</i>
AMTN	Amelotin	<i>positive regulation of enamel mineralization</i>
ATF2	<i>Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2</i>	<i>amelogenesis</i>
CNNM4	<i>Metal transporter CNNM4</i>	<i>enamel mineralization</i>
COL1A1	Kollagen Typ I, alpha I	<i>tooth mineralization</i>
CSF3R	Rezeptor des Granulocyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (G-CSF)	<i>amelogenesis</i>
DMP1	<i>Dentin matrix acidic phosphoprotein 1</i>	<i>regulation of enamel mineralization</i>
ENAM	Enamelin	<i>amelogenesis</i> <i>positive regulation of enamel mineralization</i> <i>structural constituent of tooth enamel</i>
FAM20A	Pseudokinase FAM20A	<i>enamel mineralization</i>
FAM20C	Extrazelluläre Serin/Threonin-Proteinkinase FAM20C	<i>enamel mineralization</i> <i>dentinogenesis</i>
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>	<i>enamel mineralization</i>
HTRA1	Serinprotease HTRA1	<i>dentinogenesis</i>
ITGA6	Integrin α -6 = CD49f	<i>amelogenesis</i>
ITGB4	Integrin β -4	<i>amelogenesis</i>
KLK4	Kallikrein-related peptidase 4	<i>amelogenesis</i>
MMP20	Matrix-Metalloprotease 20	<i>amelogenesis</i> <i>regulation of enamel mineralization</i>
MSX2	<i>Homeobox protein MSX-2</i>	<i>enamel mineralization</i>
NECTIN1	<i>Nectin-1</i>	<i>enamel mineralization</i>
PERP	<i>p53 apoptosis effector related to PMP-22</i>	<i>amelogenesis</i>
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha) = NR1C1	<i>enamel mineralization</i>
SLC24A4	<i>Sodium/potassium/calcium exchanger 4</i>	<i>amelogenesis</i>
SLC34A1	<i>Sodium-dependent phosphate transport protein 2A</i>	<i>dentinogenesis</i>
STATH	Statherin	<i>structural constituent of tooth enamel</i>
STIM1	<i>Stromal interaction molecule 1</i>	<i>enamel mineralization</i>
TBX1	<i>T-box transcription factor TBX1</i>	<i>enamel mineralization</i>
TUFT1	Tuftelin	<i>structural constituent of tooth enamel</i>
WDR72	<i>WD repeat-containing protein 72</i>	<i>enamel mineralization</i>

Tabelle 1: Auswahl der für die Ausbildung von Zahnhartsubstanz zuständigen Gene, mit Genprodukt und der ontologischen Klasse (nach: AmiGo 2, 27.07.2017).^[65] Im Deutschen gebräuchliche Genprodukt-Bezeichnungen wurden entsprechend eingesetzt.

2.3.2.2 Dentalpathologisch assoziierte Genmutationen

Ein weiterer Weg, die Relevanz von Genen bzw. Proteinen für eine gesunde Zahntwicklung zu beurteilen, besteht darin, die Folgen auftretender Mutationen innerhalb der entsprechenden Sequenzen zu betrachten. Treten nachfolgend Störungen der Zahnhartsubstanzbildung, insbesondere Formen von Amelogenesis imperfecta oder Dentinogenesis imperfecta, auf, kann dies ein starker Hinweis für eine Involvierung der in der mutierten Gensequenz codierten Proteine in die Entstehung der Zahnhartsubstanz sein. In der folgenden Tabelle sind daher durch Forschergruppen identifizierte Genmutationen und die daraus resultierenden phänotypischen Krankheitsbilder aufgezeigt. Bei den vielfach in den Quellen angegebenen Website *OMIM.org* (*Online Mendelian Inheritance in Man*) handelt es sich um eine Webpräsenz der Johns-Hopkins-Universität in Baltimore, Maryland. OMIM.org katalogisiert humane Gene und mit diesen assoziierte phänotypische Ausprägungen infolge monogenetischer Erkrankungen.^[66]

Gen	Genprodukt	UniProt [hsa] ^[63]	Folge bei Mutation	Quelle
ACPT	<i>Testicular acid phosphatase</i>	Q9BZG2	Amelogenesis imperfecta Typ IJ	Seymen <i>et al.</i> 2016 ^[67] <i>OMIM.org</i>
AMBN	Ameloblastin	Q9NP70	Amelogenesis imperfecta Typ IF	MacDougall <i>et al.</i> 1997 ^[68] Poulter <i>et al.</i> 2014 ^[69] <i>OMIM.org</i>
AMELX	Amelogenin, X-linked	Q99217	Amelogenesis imperfecta Typ IE	Lagerström <i>et al.</i> 1991 ^[70] Hu <i>et al.</i> 2012 ^[71] <i>OMIM.org</i>
AMTN	Amelotin	F1T0L8	Amelogenesis imperfecta (bei Exondeletion)	Iwasaki <i>et al.</i> 2005 ^[72] Smith <i>et al.</i> 2016 ^[73]
C4orf26	<i>Uncharacterized protein C4orf26</i>	Q17RF5	Amelogenesis imperfecta Typ IIA4	Parry <i>et al.</i> 2012 ^[74] <i>OMIM.org</i>
DLX3	<i>Homeobox protein DLX-3</i>	O60479	Hypoplasien und Taurodontismen im Rahmen des TDO (<i>Tricho-Dento-Osseous Syndrome</i>)	Price <i>et al.</i> 1998 ^[75] <i>OMIM.org</i>
DSPP	Dentin-Sialophosphoprotein	Q9NZW4	Dentinogenesis imperfecta	Xiao <i>et al.</i> 2001 ^[76] Zhang <i>et al.</i> 2001 ^[77] Li <i>et al.</i> 2017 ^[78]
ENAM	Enamelin	Q9NRM1	Amelogenesis imperfecta Typ IB Amelogenesis imperfecta Typ IC	Mårdh <i>et al.</i> 2002 ^[79] Hart <i>et al.</i> 2003 ^[80] Rajpar <i>et al.</i> 2001 ^[81] <i>OMIM.org</i>
FAM83H	<i>Uncharacterized protein FAM83H</i>	Q6ZRV2	Amelogenesis imperfecta Typ III (bei Gen-Knockout <i>Mus musculus</i>)	Kim <i>et al.</i> 2008 ^[82] Wang <i>et al.</i> 2016 ^[83]
GPR68	<i>Ovarian cancer G-protein coupled receptor 1</i>	Q15743	Amelogenesis imperfecta Typ IIA6	Parry <i>et al.</i> 2016 ^[84] <i>OMIM.org</i>
ITGB6	Integrin β -6	P18564	Amelogenesis imperfecta Typ IH	Poulter <i>et al.</i> 2014 ^[85] <i>OMIM.org</i>
KLK4	<i>Kallikrein-related peptidase 4</i>	Q9Y5K2	Amelogenesis imperfecta Typ IIA1	Hart <i>et al.</i> 2004 ^[86] <i>OMIM.org</i>
LAMB3	Laminin β -3	Q13751	Amelogenesis imperfecta Typ IA Epidermolysis bullosa	Poulter <i>et al.</i> 2014 ^[87] <i>OMIM.org</i>
MMP20	Matrix-Metalloprotease 20 = Enamelysin	O60882	Amelogenesis imperfecta Typ IIA1	Kim <i>et al.</i> 2005 ^[88] Tanimoto <i>et al.</i> 2008 ^[89] <i>OMIM.org</i>
SLC24A4	<i>Sodium/potassium/calcium exchanger 4</i>	Q8NFF2	Amelogenesis imperfecta Typ IIA5	Wang <i>et al.</i> 2014 ^[91]
WDR72	<i>WD repeat-containing protein 72</i>	Q3MJ13	Amelogenesis imperfecta Typ IC	El-Sayed <i>et al.</i> 2011 ^[92] <i>OMIM.org</i>

Tabelle 2: Tabellarische Auflistung solcher Gene, bei denen im Falle einer Genmutation pathologische Veränderungen der Zahnhartsubstanz nachweisbar sind. Die Namen der Genprodukte sind den genannten Quellen oder UniProt.org entnommen.^[67,68,77–86,69,87–91,70–76]

2.3.3 Zahnspezifische Gene/Proteine im Netzwerk

Die in den beiden Tabellen in 2.3.2 aufgeführten Gene stellen somit eine Vorauswahl dar, aus der fünf bis zehn geeignete Proteine für den Einbau in das Netzwerk ausgewählt werden sollen.

Die Auswahl der in das Netzwerk zu integrierenden zahnspezifischen Gene/Genprodukte unterlag hierbei bestimmten Kriterien, denen diese möglichst umfangreich entsprechen sollten. Zu diesen Kriterien zählen:

- Exprimierung des Gens ist auf den Zahnapparat/die Zahnentwicklung begrenzt oder umfasst nur wenige andere Gewebe
- Hinreichende Forschungsergebnisse belegen stimmig die Rolle des Gens und seines Produktes bei der Zahnentwicklung
- Das Gen bzw. sein Genprodukt haben eine fördernde Wirkung auf die Zahnentwicklung
- Das Genprodukt ist während oder nach der Zahnentwicklung in der Zahnhartsubstanz nachweisbar

Um beurteilen zu können, welche der in Frage kommenden Gene/Proteine diesen Kriterien am ehesten entsprechen, soll im Folgenden deren Rolle in der Zahnentwicklung nach aktuellem Stand der Forschung betrachtet werden.

Der Anteil des organischen Materials an der Gesamtmasse des Schmelzes verändert sich im Laufe der Zahnentwicklung stark. Da am Ende der Zahnentwicklung der Zahnschmelz zellfrei verbleibt, bildet die extrazelluläre Proteinmatrix dessen noch verbleibenden organischen Anteil. Dieser vermindert sich von 30 Gewichtsprozent zu Beginn der Zahnentwicklung zu nur noch einem Gewichtsprozent beim ausgereiften Zahn, während der mineralisierte Anteil von 32 auf 95 Gewichtsprozent ansteigt (der restliche Gewichtsanteil wird durch Wasser gebildet).^[53,62]

Die extrazelluläre Proteinmatrix enthält sogenannte Schmelzmatrixproteine und Proteasen, die maßgeblich für die Strukturierung des Schmelzes zuständig sind.^[92] Die bis-

her am besten erforschten Vertreter der Proteasen sind dabei die Matrix-Metalloprotease 20 (MMP20), auch Enamelysin genannt, und die Serinprotease *Kallikrein-related peptidase 4* (KLK4). Sie werden zu verschiedenen Zeiten der Zahnentwicklung unterschiedlich stark exprimiert und bewirken die Ausreifung (MMP20) oder Degradation (KLK4) der Schmelzmatrixproteine auf dem Weg zum vollentwickelten Zahn.^[93] Die mit den bei der Mutation der entsprechenden Gene assoziiert auftretenden Schmelzfehlbildungen (siehe Tabelle 2) sind also vermutlich auf Porositäten aufgrund der mangelhaften Schmelzausreifung z. B. durch Prozessierung oder dem Fehlen eines koordinierten Abbaus der eigentlich regelhaft gebildeten Schmelzmatrixproteine zurückzuführen.^[94,95] Diese Eigenschaften der Proteasen als quasi „sekundäre“ Strukturproteine sprechen gegen eine Einbeziehung dieser beiden Gene in das Netzwerk.

Betrachtet man die Gene und deren Produkte aus der Vorauswahl weiter unter den oben genannten Aspekten, kristallisieren sich vor allem die Schmelzmatrixproteine als besonders geeignet heraus. Das Verhalten vieler anderer „Kandidaten“ ist zum jetzigen Zeitpunkt häufig noch nicht gut genug untersucht (z. B. C4orf26, FAM83H, WDR72) oder es handelt sich um Proteine, die auch an anderen Stellen des Körpers wichtige Rollen einnehmen und damit dem Kriterium der Zahnspezifität widersprechen (z. B. der Rezeptor des Granulocyten-Kolonie-stimulierenden Faktors [CSF3R] oder die Integrine).^[96–98] Dies zeigt sich beispielsweise auch an den durch Mutationen verursachten Erkrankungen, die dann wie im Falle von DLX3 (*Tricho-Dento-Osseous Syndrome*) oder bei Laminin β -3 (Epidermolysis bullosa) nicht nur die Zahnbildung, sondern auch andere Körperstrukturen erfassen.^[75,99] Die Gründe zur Auswahl oder dem Verzicht einiger Proteine sind außerdem Teil weiterer Abschnitte dieses Kapitels.

Somit sind jene Proteine in den Fokus gerückt, die auch im ausgereiften Zahn noch in der Zahnhartsubstanz nachweisbar sind und als extrazelluläre Proteine nach bisherigen Erkenntnissen direkt und maßgeblich an der Steuerung des Wachstums des anorganischen Anteils beteiligt sind. Zu diesen Schmelzmatrixproteinen wird an dieser Stelle nicht das im Speichel vorkommende Statherin gezählt, welches in der Datenbank des *Gene Ontology Consortiums* zwar als Schmelzbestandteil (*Structural constituent of tooth*

enamel) geführt wird, wohl aber nur einen untergeordneten Einfluss auf die Schmelzbildung besitzt. Durch Aufrechterhaltung einer hohen Ca^{2+} -Konzentration im Speichel bewirkt es eine erleichterte Remineralisation von bereits durchgebrochenen Zähnen in der Mundhöhle, eine Beteiligung an der embryonalen Zahnbildung ist jedoch bisher nicht nachgewiesen.^[65,100,101]

2.3.4 Secretory Calcium-binding Phosphoproteins

Die Schmelzmatrixproteine, die der Familie der SCPPs (*Secretory Calcium-binding Phosphoproteins*) angehören, können wiederum in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die Amelogenine, die etwa 90 Prozent des organischen Schmelzanteils bilden und die heterogene Gruppe der Nicht-Amelogenine, die den restlichen Anteil ausmachen.^[102,103] An dieser Stelle will jedoch erwähnt sein, dass zumindest für Amelogenin, Ameloblastin und Enamelin Hinweise auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung auszumachen sind.^[104]

2.3.4.1 Amelogenine

Amelogenin stellt das Genprodukt der homologen Gene *AMELX* und *AMELY* dar.^[105] Sie befinden sich je auf den Geschlechtschromosomen X und Y, was etwa in der Kriminologie auch erfolgreich bei einer Geschlechteridentifikation nutzbar gemacht werden kann, da nur Männer das entsprechende Allel für *AMELY* besitzen.^[106–108] Dies erklärt allerdings vermutlich auch eine höhere Anfälligkeit von Jungen und Männern für stärkere Ausprägungen der Amelogenesis imperfecta, da bei einer Schädigung des bei ihnen nur einfach vorhandenen *AMELX*-Gens die Amelogenin-Produktion über das dafür weniger potente *AMELY*-Gen nicht adäquat aufrechterhalten werden kann, während bei Frauen eine X-Chromosom-Inaktivierung betroffener Allele das Ausmaß der Zahnschädigung stärker begrenzt werden kann.^[109–111] Durch das zweifache Vorhandensein des *AMELX*-Gens bei Frauen könnte außerdem eine Erklärung für deren geringere Anfälligkeit für erosive Schmelzdefekte gefunden sein.^[112] Die Heterogenität der Amelogenine rührt jedoch nicht nur von deren Ursprung aus zwei verschiedenen Genen, sondern auch von

der variantenreichen Prozessierung des Genproduktes, unter anderem durch alternatives Spleißen.^[113,114]

Amelogenine aggregieren zu sogenannten Nanosphären, im Durchmesser 15-20 nm großen molekularen Superstrukturen, und sind so in der Lage, an das hydrophile Hydroxylapatit zu binden, wodurch sie im Laufe der Schmelzreifung auf unterschiedliche Weisen das Kristallwachstum beeinflussen. Bisherigen Erkenntnissen zufolge steuert beispielsweise zu Beginn der Schmelzbildung der C-Terminus die Wachstumsrichtung der Hydroxylapatitkristalle, wird dann aber proteolytisch abgebaut und das Dicken- und Längenzwachstum der Kristalle wird mehr und mehr gefördert.^[115-117] Dies wird durch Untersuchungen an AMELX-Knockout-Mäusen durch Gibson *et al.* (2001) unterstützt, bei denen die gemessene Schmelzdicke nur noch weniger als zehn Prozent derer des Wildtyps betrug.^[118]

2.3.4.2 Nicht-Amelogenine

Die Mitglieder der Familie der Nicht-Amelogenine, früher auch allgemein als *Enameline* bezeichnet, sind bisher nicht einheitlich festgeschrieben. An dieser Stelle sollen somit nur die für diese Arbeit relevanten Proteine vorgestellt werden.^{2[102,119]} Da die Amelogenine wie erwähnt zwar den Großteil der Gesamtmasse der Schmelzmatrixproteine ausmachen, gleichzeitig aber nur für fünf bis zehn Prozent aller Fälle von Amelogenesis imperfecta verantwortlich sind, ist die Bedeutung der Nicht-Amelogenine für eine regelhafte Zahnentwicklung nicht zu unterschätzen.^[120]

2.3.4.2.1 Enamelin

Enamelin nimmt etwa einen Anteil von einem bis fünf Prozent der Gesamtmenge der Schmelzproteine ein und ist ebenfalls essentiell für eine regelrechte Zahnentwicklung.

² Mittlerweile ist mit *Enamelin* beim Menschen nur noch das Genprodukt des *ENAM*-Gens gemeint.^[174] Durch die Entdeckung von immer weiteren an der Schmelzbildung beteiligten Proteinen in den letzten Jahrzehnten ist die Gruppe der Nicht-Amelogenine stetig angewachsen und entsprechend unscharf umrissen.

So sind nicht nur diverse Fälle von autosomal-dominanter Amelogenesis imperfecta mit assoziiertem Auftreten von ENAM-Mutationen beim Menschen dokumentiert, in Laborversuchen an entsprechenden Knockout-Mäusen blieb die Schmelzbildung bei den Tieren sogar nahezu vollständig aus.^[102,121,122] Weitere Studien an Mäusen zeigten besonders große Ausmaße der Schädigungen im Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze.^[123] An porkinen Proben konnte gezeigt werden, dass die verhältnismäßig großen Enamelin-Moleküle kurz nach ihrer Sezernierung durch die Matrix-Metalloprotease 20 gespalten werden. Der abgespaltene C-Terminus reichert sich daraufhin an der Mineralisationsfront des Schmelzes an, während sich das mit 32 kDa größte Spaltprodukt des Enamelins in der gesamten Schmelzmatrix verteilt.^[121,124]

2.3.4.2.2 Ameloblastin

Ameloblastin stellt den verbreitetsten Vertreter der Gruppe der Nicht-Amelogenine. Es findet sich vor allem in der zellnahen Außenschicht des Schmelzes und weniger in dessen tieferen Bereichen und wird in hohem Maße in der sekretorischen Phase der Ameloblasten exprimiert.^[125,126] Fukumoto *et al.* (2004, 2006) konnten beobachten, dass es bei AMBN-Null-Mäusen zu erheblichen Störungen der Ameloblasten-Interaktion mit der umgebenden Extrazellulärmatrix sowie zu unkontrollierten Teilungen der Zellen mit Tumorausbildungen kommt.^[126,127] Umgekehrt konnte Ameloblastin auch eine proliferationshemmende Wirkung auf Epithelzellen der Gingiva nachgewiesen werden.^[128,129] Ob die vielfältig dokumentierten Fälle von AMBN-assoziiertes Amelogenesis imperfecta ihre Ursache in der Beeinträchtigung der Ameloblasten-Adhäsion haben oder Ameloblastin auch direkt die Schmelzkristallbildung beeinflusst, konnte bisher nicht wissenschaftlich geklärt werden.^[68,69,102,130]

2.3.4.2.3 Amelotin

Amelotin wurde erstmals 2005 von einer kanadischen Forschergruppe als Ameloblasten-spezifisches Protein identifiziert und wird in erster Linie während der Reifungsphase exprimiert.^[72] Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass der untersuchte Schmelz

beim Gen-Knockout von AMTN im Mausmodell eine erhöhte Anfälligkeit für Schmelzsprünge und -chipping aufwies.^[131] Des Weiteren wiesen Lacruz *et al.* (2012) nach, dass eine forcierte AMTN-Überexpression keinen signifikanten Einfluss auf die Expressionsmuster anderer wichtiger Schmelzmatrixproteine wie Amelogenin oder Ameloblastin zeigte, in dieser Versuchsreihe wurden außerdem eine Ausdünnung der Schmelzschicht und deutliche Unregelmäßigkeiten in der Kristallstruktur nachgewiesen. Die Bestimmung der genauen Rolle von Amelotin in der Zahnentwicklung bedarf jedoch noch weiterer Forschungen.^[132]

2.3.5 Weitere Schmelzmatrixproteine

Einige weitere Moleküle wurden bei der Auswahl der Gene bzw. Genprodukte im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Eignung untersucht, haben aber aus verschiedenen Gründen zunächst keinen Eingang in das endgültige Netzwerk gefunden. So ist beispielsweise die fördernde Wirkung von FAM20A und FAM20C auf Mineralisation und die Differenzierung von Amelo- und Odontoblasten hinreichend belegt, jedoch herrscht noch weitestgehend Unklarheit über ihre Regulationsweisen.^[133–135] Außerdem deuten die schwerwiegenden Auswirkungen auf den Gesamtorganismus bei Mutationen des entsprechenden Gens (Raine-Syndrom) sowie Tierversuche auf eine die Grenzen der Zahnentwicklung überschreitende Bedeutung von FAM20C hin, die große Teile der Knochenentwicklung miteinschließt.^[136,137]

Auch über die genaue Funktionsweise des hoch konservierten Glykoproteins Tuftelin, welches schon im Frühstadium der Schmelzbildung von den Ameloblasten exprimiert wird und bis über die Reifungsphase hinaus im Schmelz verbleibt, herrscht noch weitestgehend Unklarheit.^[138–141] Sein entscheidender Einfluss auf eine geregelte Zahnbildung gilt als gesichert, Expressionsdaten aus Weichgeweben und aus Tumorzellen beispielsweise des Pankreas lassen aber ebenfalls auf Regulationsmechanismen außerhalb der Odontogenese schließen.^[139,142]

2.3.6 Dentinmatrixproteine

Dadurch, dass das Dentin nach Abschluss der Zahnentwicklung von Odontoblastenfortsätzen durchzogen und zu lebenslanger reizbedingter Neubildung durch diese befähigt ist, stellt sich dessen Proteinstruktur deutlich komplexer dar. 90 Prozent der Proteinmatrix ausgereiften Dentins werden durch kollagene Fasern der Typen I, V und VI gebildet, die Gruppe der nichtkollagenen Proteine (*noncollagenous proteins, NCPs*) setzt sich unter anderem aus Phosphoproteinen, Matrix-Gla-Proteinen (u. a. Osteopontin) und Proteoglykanen zusammen.^[5,143] Dabei muss erwähnt werden, dass hier primäres, also ursprünglich und regelhaft gebildetes Dentin gemeint ist, dessen Zusammensetzung sich von der des reaktiv auf äußere Reize gebildeten Tertiärdentins noch einmal unterscheidet.^[144] Die im Vergleich zur Schmelzbildung deutlich komplexeren Wechselwirkungen, die die Bildung von Dentin durch Odontoblasten bedingen und somit eine Darstellbarkeit in einem Netzwerk erschweren, führen dazu, dass im Rahmen dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf Ameloblasten und ihre Entwicklung und Fähigkeit zur Schmelzbildung gelegt wird.

2.3.6.1 DSPP (dentin sialophosphoprotein)

Beim *dentin sialophosphoprotein* handelt es sich um ein Protein, dessen Relevanz vor allem bei der Entwicklung der anderen Zahnhartsubstanz der Säugetiere, des Dentins, untersucht ist. So sind diverse Fälle von Mutationen des *DSPP*-Gens dokumentiert, die mit dem Auftreten von *Dentinogenesis imperfecta* korrelieren.^[145] Das DSPP-Protein wird als Propeptid exprimiert und von BMP1 in DSP (= [*mature*] *dentin sialoprotein*) und DPP (= *dentin phosphoprotein*) gespalten.^{3[146–148]} Versuche an Mäusen weisen darauf hin, dass es bei Schädigungen des DSPP-Gens zu Störungen in der Differenzierung der dentinbildenden Odontoblasten kommt.^[147] DPP, auch *Phosphophoryn* genannt, ist stark sauer und dient als Phosphat-Trägermolekül, was ihm eine hohe Fähigkeit zur Bindung von Calciumionen verleiht, die in Form von Hydroxylapatit den Hauptbestandteil

³ Yamakoshi *et al.* (2005) konnten außerdem *Dentin Glycoprotein* (DGP) als Spaltprodukt des DSPP-Propeptids nachweisen, über dessen genauere Rolle in der Zahnentwicklung existieren jedoch zum jetzigen Zeitpunkt keine Ergebnisse.^[231]

der Zahnhartsubstanzen bilden.^[149–151] Diese Bindungsfähigkeit legt eine Mediatorfunktion von Phosphophoryn bei der Biomineralisation nahe und damit dessen Haupteinfluss in der Reifungsphase des Dentins, während DSP wohl besonders in der Initiationsphase der Dentinausbildung eine Rolle spielt.^[152,153] Hypothesen über eine mögliche Fähigkeit des Proteins zur Interaktion mit Integrinen und interzellulärer Signalweiterleitung über eine RGD-Sequenz des Phosphophoryn-Moleküls bedürfen noch genauer Erforschung.^[154] Ritchie *et al.* (1997) sowie MacDougall *et al.* (1998) konnten zeigen, dass DSPP auch in Prä-Ameloblasten exprimiert wird und schreiben ihm eine mögliche Rolle bei der initialen Schmelzkristallbildung zu.^[155,156]

3 Material und Methoden

3.1 *Jimena*

Bei *Jimena* (Karl et Dandekar 2013, 2015) handelt es sich um ein *Java*-basiertes Framework, welches die Möglichkeit bietet, Simulationen von Genregulationsnetzwerken durchzuführen. *Jimena* ist in der Lage, eingespeiste *.graphml*-Dateien als boolesche Netzwerke zu interpretieren und das mögliche Verhalten der beteiligten Knoten in einem Aktivator-Inhibitor-Modell zu simulieren.^[7,8,157] Die *.graphml*-Dateiformen der Diagramme werden zuvor über das Visualisierungsprogramm *yEd* (Version 3.17.2, © *yWorks GmbH*) erstellt.^[158] Verwendet wurde *Java* Version 8, Update 151, © Oracle 2017.

3.1.1 Funktionsweise

Jimena ist unter anderem dazu entwickelt worden, Netzwerke auf ihre möglichen stabilen Zustände hin zu untersuchen, bietet aber auch weitere Möglichkeiten, wie dynamische Netzwerksimulationen. Dazu übernimmt *Jimena* im *.graphml*-Format dargestellte boolesche Netzwerke, indem es die in *yEd* dargestellten Knoten mit den ihnen zugeordneten Beschriftungen als Netzwerkknoten überträgt. Der *yEd*-Standardpfeil („*standard arrow tip*“) wird als Aktivierung zwischen zwei Knoten in Pfeilrichtung übersetzt, jegliche andere Pfeilform entsprechend als Inhibierung interpretiert. Somit entsprechen die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Netzwerke den von *Jimena* gestellten Anforderungen (siehe Kapitel 4.1).^[157]

Jimena ist dabei in der Lage, schnell und effektiv Simulationen auch an größeren, besonders an skalenfreien Netzwerken – zu denen biologische Netzwerke in der Regel zählen – durchzuführen.^[7,159,160] Dies geschieht unter der Verwendung sogenannter boolescher Bäume („*Boolean trees*“), wobei Knoten ohne eingehende Verbindung die „Blätter“ („*leaves*“), solche ohne Ausgang die „Wurzeln“ („*roots*“) dieser Bäume darstellen. Die dazwischenliegenden Knoten werden als *gates* bezeichnet und stellen jeweils die Gesamtheit der auf sie eingehenden Werte dar. Die Werte der *roots* als Endpunkte der

Ketten geben schließlich den Wert der booleschen Funktion des jeweiligen Baumes wieder.^[7]

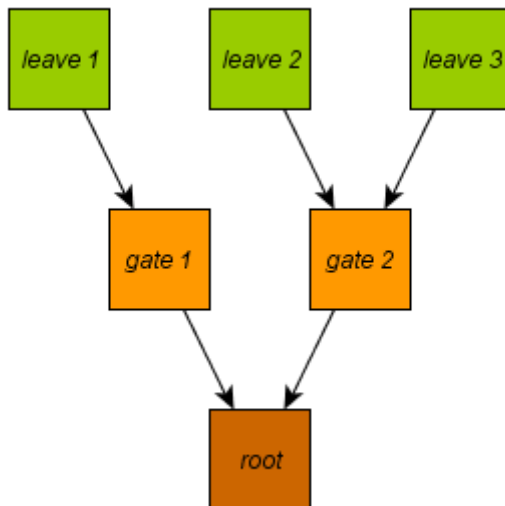


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines booleschen Baumes (nach Karl et Dandekar, 2013).^[7]

3.1.1.1 Berechnung stabiler Zustände

Die Verwendung der booleschen Bäume erleichtert außerdem die Nutzung binärer Entscheidungsdiagramme, auf deren Grundlage das Netzwerk auf sogenannte stabile Zustände (*stable [steady] states, SS*) hin untersucht werden kann. Beim *stable state* handelt es sich um einen Zustand, bei dem sich die Knotenvariablen eines Systems im Rahmen einer Simulation nach einer Zeit t (*transient state*) auf jeweils feste Werte eingependelt haben. Ein System kann nach der Zeit t (in *Jimena: simulated time*) einen oder mehrere mögliche stabile Zustände besitzen oder aber auch keinen stabilen Zustand erreichen (das Gesamtsystem befände sich in einem *unstable state*).^[7,161]

Es existieren dabei zwei Möglichkeiten, *stable states* zu berechnen: Über diskrete oder kontinuierliche Modellierung. Bei der diskret oder auch Logik-basiert genannten Modellierung werden für die Variablen allgemein nur Werte einer begrenzten Zahlenmenge angenommen. Im konkreten Fall eines genregulatorischen Netzwerkes wären diese

etwa die Werte 0 und 1, wobei „0“ einer Abwesenheit oder Inaktivität des Gens/Genprodukts entspräche und „1“ seiner Expression bzw. Aktivität. Hierbei ergibt sich das Problem, dass die Betrachtung der Gene/Genprodukte als entweder vollständig aktiv oder komplett inaktiv die biologische Wirklichkeit nur mangelhaft wiedergibt und somit leicht zu einem Informationsverlust führen kann. Diskrete Modelle erlauben somit zwar vor allem bei kleineren Netzwerken häufig grundsätzliche qualitative Aussagen, spiegeln aber mitunter nur unzureichend die biologischen Verhaltensweisen komplexer Netzwerke mit abgestuften molekularen Konzentrationen wider.^[44,162–164]

Diese durch den Einsatz von diskreten Modellierungen entstehenden Ungenauigkeiten, die wie im vorliegenden Fall minimiert werden sollten, umgehen die kontinuierlichen Modelle. Bei diesen können die Knoten Werte innerhalb eines bestimmten Intervalls $[x,y]$ einnehmen, was auch eine abgestufte Betrachtung der Ausgabewerte erlaubt.^[162] Dazu werden im Falle der genregulatorischen Netzwerke initiale Zufallsvariablen aus dem Intervall $[0,1]$ verwendet, die dann als Ausgangspunkte für eine Bestimmung möglichst vieler *stable states* (dann ebenfalls mit Werten zwischen 0 und 1) dienen. Die Möglichkeit zu interpolieren, das heißt für die einzelnen Knoten des Netzwerkes Werte auch zwischen 0 und 1 anzunehmen, macht *Jimena* zu einem besonders geeigneten Werkzeug für die Simulation semiquantitativer Modelle.^[7,165]

Jimena nutzt bei der Berechnung solcher Netzwerksimulationen Methoden der diskreten und kontinuierlichen Modellierung als Grundlage und erreicht so wesentlich kürzere Rechenzeiten als vorgehende vergleichbare Anwendungen.⁴ Da eine größere Anzahl initialer Variablen bzw. ablaufender Rechenprozesse auch eine höhere Wahrscheinlichkeit des Auffindens von stabilen Zuständen bergen, ziehen ausgiebigere Rechenleistungen und -zeiten auch effizientere Identifikationen der möglichen stabilen Zustände nach sich.^[7]

⁴ *Jimena* bietet eine Auswahl verschiedener Simulationsmethoden, bei der verwendeten Methode handelt es sich um die dynamische Simulation auf der Grundlage von SQUAD, bei der eine diskrete Simulation einer kontinuierlichen Simulation vorgeschaltet ist.^[167]

3.1.1.2 Berechnung von *centralities*

Eine weitere Funktion des Programmes, das im Rahmen dieser Arbeit Anwendung findet, ist die Möglichkeit zur Berechnung sogenannter *node centralities*. Die *centrality* wird durch einen Zahlenwert wiedergegeben und bezieht sich auf einzelne Knoten. Der Wert gibt Auskunft darüber, welche Wertigkeit der entsprechende Knoten im Kontext des Gesamtnetzwerkes hat. Allgemein ist es so, dass ein größerer Wert einer *node centrality* mit einer gewichtigeren Rolle des einzelnen Knotens im Gesamtnetzwerk korreliert. Das heißt also, dass im Falle von Knoten, die eine besonders hohe *centrality* besitzen, eine Aktivität bzw. Inaktivität entsprechend großen Einfluss auf die Aktivitätsmuster anderer Knoten und damit auf das Gesamtnetzwerk besitzt.^[8,166]

In *Jimena* wird die *centrality* der Einzelknoten auf drei Arten bestimmt: Die *total control centrality* quantifiziert den Einfluss möglicher Mutationen einzelner Knoten und soll dazu dienen, mögliche pharmakologische Angriffspunkte oder Gene mit onkogenem Potenzial zu identifizieren. Bei der *dynamic control centrality* werden solchen Knoten hohe Werte zugerechnet, die als Schaltstellen bei der Weiterleitung von Signalen in Signalkaskaden dienen. Die *value control centrality* misst hingegen den direkten Einfluss des Knotenwertes auf das Gesamtnetzwerk.^[8]

In dem in dieser Arbeit analysierten Netzwerk werden ebenfalls Berechnungen der *value control centrality* sowie der *dynamic control centrality* als qualitative Parameter vorgenommen. Sie sollen der Bestimmung von denjenigen Knoten dienen, deren Einzelbetrachtung eine möglichst große Aussagekraft für das Verhalten des Gesamtnetzwerkes während eines stabilen Zustandes zulässt.

3.2 Simulation

Das fertiggestellte Netzwerk kann als *.graphml*-Datei in *Jimena* hochgeladen werden. Über die Analyse-Funktion des Tools kann man das Programm dann dazu nutzen, stabile Zustände des Systems zu berechnen. Dabei ist es möglich, die Dauer der Rechenzeit in

Sekunden zu bestimmen. Für das vorliegende Netzwerk reicht eine Simulationszeit von 1000 Sekunden aus, um ein zuverlässiges Ergebnis für die Ermittlung der möglichen stabilen Zustände zu generieren. Die gewählte Simulationsmethode basiert auf der SQUAD-Software. Nach Abschluss der Berechnung gibt das Programm eine Tabelle der errechneten stabilen Zustände aus, bei der jedem beteiligten Knoten ein Wert zwischen 0 und 1 zugeordnet ist. Dieser repräsentiert die Aktivität des jeweiligen Knotens im entsprechenden *stable state*, wobei 1 für eine Aktivität steht und 0 für Inaktivität.^[167] Die vollständige Tabelle aller errechneten stabilen Zustände ist dem Anhang zu entnehmen.

Betriebssystem	Windows 10 Enterprise, Microsoft Corporation 2017
Prozessor	Intel® Core™ i5-4570 CPU @ 3.20 GHz
Installierter Arbeitsspeicher (RAM)	8,00 GB
Systemtyp	64-Bit-Betriebssystem, x64-basierter Prozessor

Tabelle 3: Grundlegende Systeminformationen des verwendeten PCs.

3.3 Graphische Darstellung

Zur besseren Visualisierung größerer Datenmengen wurden im Verlauf der Arbeit zwei Heatmaps erstellt, die einen schnellen Überblick über die Ausprägungen der erhobenen Daten ermöglichen sollen. Dies wurde unter Verwendung entsprechender *R*-Scripte ermöglicht, die dem Anhang zu entnehmen sind. Durch Einspeisung der Daten in Textform erstellte Heatmaps können mithilfe dieser Programme zunächst in *RStudio* visualisiert und anschließend als Grafikdatei (*.png*-Format) gespeichert werden.^[168]

4 Etablierung eines Netzwerkes der Odontogenese

Ziel der Arbeit soll es nun also sein, ein Gesamtnetzwerk zu erstellen, welches auf Grundlage der acht beschriebenen Signaltransduktionswege Apoptose, Zellzyklus, Hedgehog-Signalweg, MAP-Kinase-Weg, mTOR-Signalweg, Notch-Signalweg, TGF- β -Signalweg und Wnt-Signalweg eine Art „Grundzustand“ einer gesunden Zelle widerspiegeln soll. Durch die Ergänzung dieses Netzwerkes mit den zahnspezifischen Proteinen AMBN, AMELX, AMELY, DSPP und ENAM soll nun in starker Vereinfachung die Simulation der zellulären Interaktionen im Sinne eines genregulatorischen Netzwerkes bei der Schmelzbildung durch Ameloblasten ermöglicht werden.

4.1 Erstellung des Stammnetzwerkes

Zur Erstellung des Stammnetzwerkes wurden in erster Linie zunächst die jeweiligen Netzwerke der KEGG-Datenbank übernommen, die dort der Unterkategorie KEGG PATHWAYS zu entnehmen sind.^[169] Zur Vermeidung einer mühseligeren manuellen Übertragung der Netzwerke von der KEGG-Datenbank in das für die späteren Simulationen benötigte Format diente hier das von Wrodek *et al.* (2011) entwickelte und durch die Universität Tübingen zur Verfügung gestellte Tool *KEGGtranslator*. Es erlaubt die einfache Extrahierung eines in KEGG PATHWAYS dargestellten Signalweges in einem gewünschten Ausgabeformat, in diesem Falle die Ausgabe im *.graphml*-Format.^[170,171] Die Wiedergabe des Netzwerkes im *.graphml*-Format ist notwendig, da eine spätere Netzwerksimulation durch das *Java*-basierte Tool *Jimena* vorgesehen ist, worauf genauer im Abschnitt 3.1 „Jimena“ eingegangen wird.

Nach erfolgreicher Übertragung der einzelnen Netzwerke stehen diese nun für die geforderten Ansprüche offen. Da am Ende eine Zusammenführung zu einem großen Gesamtnetzwerk vorgesehen ist, welches eine gewisse Übersichtlichkeit behalten soll (zudem steigt mit der Anzahl der verwendeten Knoten auch die benötigte Rechenlaufzeit bei der Simulation) sind diverse Anpassungen der Einzelnetzwerke nötig. Beispiele für Anpassungen dieser Art sind in Abbildung 4 und Abbildung 5 dargestellt. So wurden etwa

für den Simulationsablauf nicht relevante Knoten beziehungsweise Interaktionen aus den Netzwerken entfernt. Im Falle der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Netzwerke fand eine erste Reduzierung der Netzwerkgröße zunächst an den Einzelnetzwerken statt. Nach der Zusammenführung der aus KEGG gewonnenen Einzelnetzwerke zum vorläufigen Gesamtnetzwerk wurden nachfolgend an diesem nochmals erhebliche Reduzierungen vorgenommen. Im Zuge dessen wurden außerdem nach Zusammentragung aller Netzwerke die auftretenden Doppelungen durch gleiche, in mehreren Signalwegen vorkommende Verbindungen entfernt beziehungsweise sich überschneidende Knoten zusammengeführt. So ist beispielsweise im MAP-Kinase-Weg zu Beginn der Signalkaskade der Knoten „GF“ (*growth factors* = Wachstumsfaktoren) aufgeführt, der also nicht nur für ein bestimmtes Protein steht, sondern eine ganze Proteingruppe miteinschließt. In diesem Fall wurde dieser Knoten mit dem Knoten „NGF“ (*nerve growth factor* = Nervenwachstumsfaktor), der als *survival factor* auf die Apoptose Einfluss nimmt, zusammengeführt, da er explizit als Teil des GF-Knotens verstanden wird.

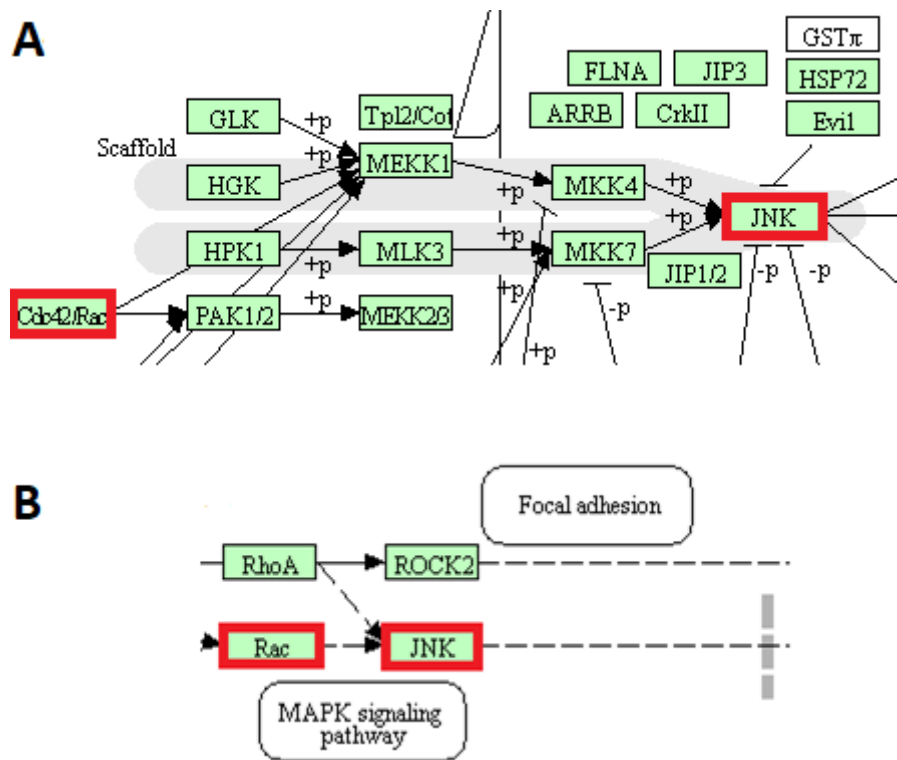


Abbildung 4: Ausschnitte des MAP-Kinase-Weges (A) sowie Wnt-Signalweges (B) aus der KEGG Database. Die Verbindung von Rac zu JNK (rot markiert) ist in beiden Signalwegen vorhanden, jedoch im Wnt-Signalweg nur verkürzt aufgeführt. Um Komplikationen bei der Erstellung des Stammbaumnetzwerkes im Zuge der Zusammenführung der Netzwerke zu vermeiden, wird bei der endgültigen Version die Verbindung zwischen Rac und JNK im Wnt-Signalweg gekappt, da sie durch die (ausführlichere) Verbindung im MAP-Kinase-Weg erhalten bleibt.^[9]

Weitere Anpassungen sind der Darstellungsweise bei KEGG geschuldet. Abbildung 5 zeigt beispielsweise einen Ausschnitt aus dem KEGG-Signalweg *Apoptosis*. Die unter *Cleavage of substrates* aufgeführten Knoten sind für die Aufrechterhaltung regulärer Zellfunktionen zuständig, ihre im Apoptose-Signalweg beschriebene Hemmung durch GZMB, CASP3, CASP6 und CASP7 führt jedoch zu den durch gestrichelte Pfeile zugeordneten Effekten auf die Zellen und somit zum (programmierten) Zelltod. In diesem Fall würde also der gestrichelte Pfeil in der Übertragung auf das letztlich verwendete Netzwerk als hemmende Interaktion übertragen werden.

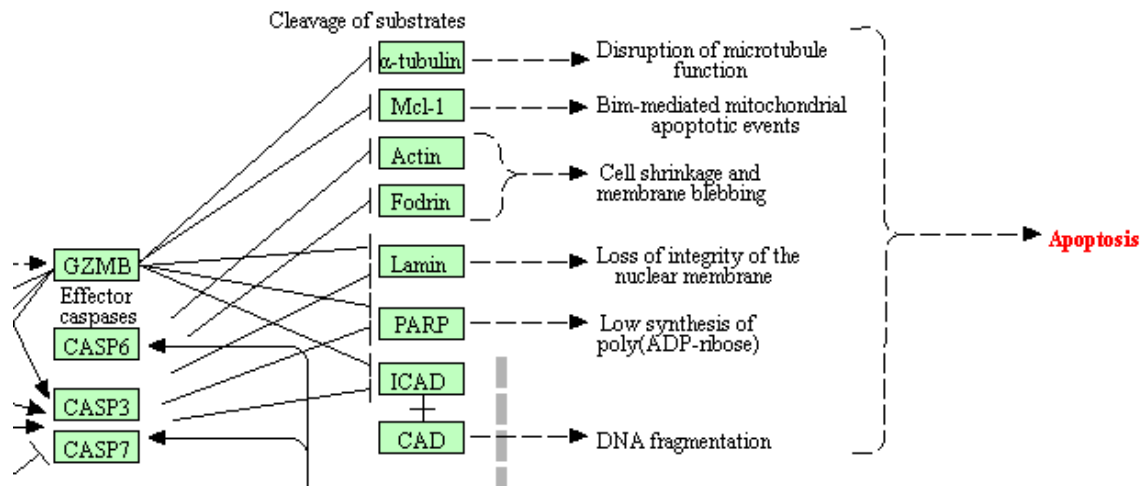


Abbildung 5: Ausschnitt des Apoptose-Signalweges aus der KEGG Database.^[9] Die „hemmenden“ Verknüpfungen zu den beteiligten Genen in Richtung jener der Apoptose vorgeschalteten Knoten wurden für das Netzwerk als „aktivierende“ Interaktion auf den Knoten „apoptosis“ übertragen. Im endgültigen Netzwerk sind die Caspasen außerdem unter dem Knoten CASPs zusammengeführt. Die in der Grafik gezeigten Verknüpfungen stellen sich im endgültigen Netzwerk also als [CASPs] - [activation] - [apoptosis] dar.

Ziel ist es, ein auf wesentliche Zusammenhänge konzentriertes Gesamtnetzwerk unter Erhalt der wichtigsten Interaktionen zu schaffen. Dabei wird das Zusammenwirken zwischen den beteiligten Proteinen auf die Varianten *activation* (Aktivierung) und *inhibition* (Hemmung) reduziert. Das Aufbauprinzip des Netzwerkes ist einfach: Die einzelnen Moleküle, zumeist Gene/Genprodukte, stellen die Knoten (*nodes*) des Netzwerkes dar. Nur in der Endstrecke des Netzwerkes repräsentieren Knoten in vier Fällen nicht eines oder mehrere Gene/Genprodukte, sondern stehen für zelluläre Vorgänge (*apoptosis, ecm-mineralisation, G1 phase, S phase*). Die Interaktionen zwischen zwei Knoten werden durch zwei unterschiedliche verbindende Elemente dargestellt: Ein grüner, spitzer Pfeil steht für eine Aktivierung in Pfeilrichtung, eine rote Verbindung mit abgeplatteter Spitze für eine Hemmung (siehe Abbildung 6Abbildung 6).

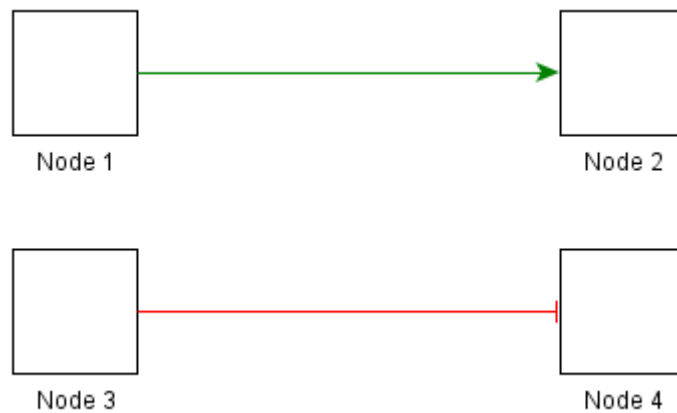


Abbildung 6: Schematische Darstellung aktivierender und hemmender Interaktionen zwischen zwei Knoten. Der grüne Pfeil steht für eine aktivierende Wirkung von Knoten 1 auf Knoten 2, der rote Pfeil markiert eine hemmende Wirkung von Knoten 3 auf Knoten 4.

Um eine Grundlage für eine spätere automatisierte Netzwerkgenerierung zu schaffen, erfolgten eine Übertragung der also zunächst im *.graphml*-Format vorliegenden Signalwege bzw. Einzelnetzwerke in ein Textformat und die Zusammenführung zu einer Interaktionsliste. Die Interaktionsliste der beteiligten Proteine, geordnet nach dem jeweiligen ursprünglichen Netzwerk sowie die zugrundeliegenden KEGG-Einzelnetzwerke sind dem Anhang zu entnehmen. Als Beispiele sind in Abbildung 7 die bereits stark vereinfachte Version des Wnt-Signalweges zu sehen sowie in Tabelle 4 die daraus abzuleitende Interaktionsliste.

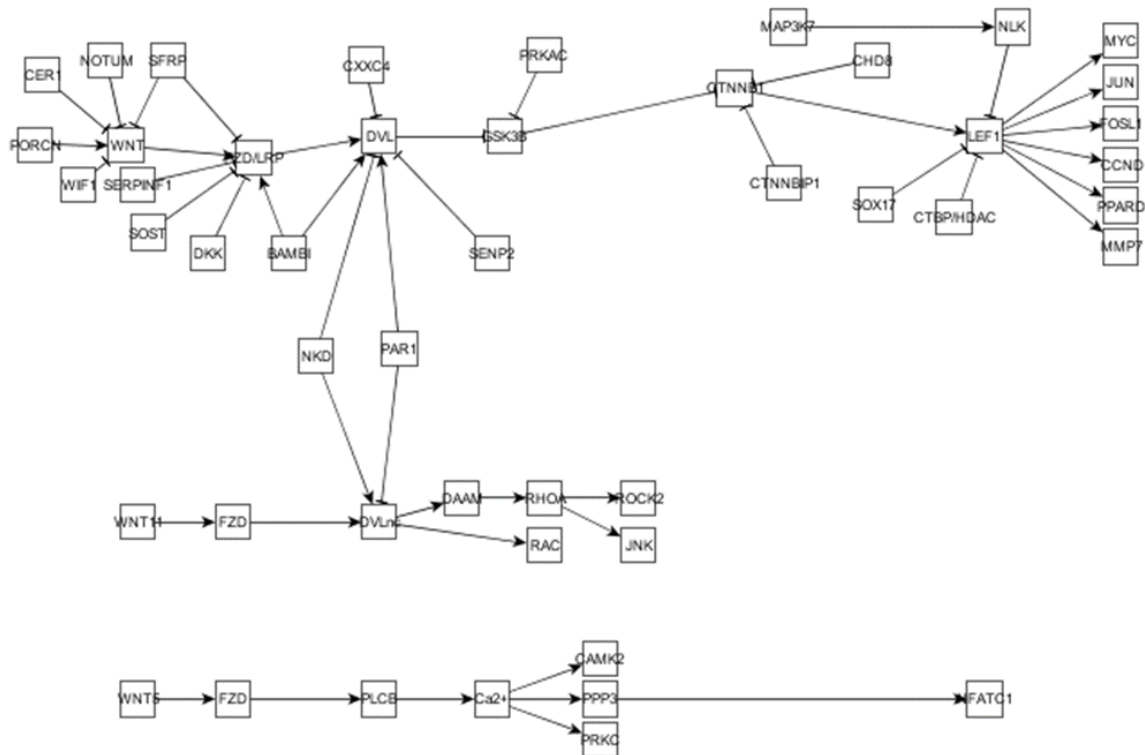


Abbildung 7: Wnt-Signalweg nach primärer Entfernung nicht relevanter Knoten und Interaktionen. Der vollständige, ursprüngliche Signalweg ist der KEGG-Datenbank zu entnehmen (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).^[9] Weitere Reduktionen erfolgten nach Abgleich mit den anderen Netzwerken und insbesondere nach der Zusammenführung der Knoten zum Gesamtnetzwerk.

<i>node 1</i>	<i>interaction</i>	<i>node 2</i>
BAMBI	activation	DVL
BAMBI	activation	FZD/LRP
Ca2+	activation	CAMK2
Ca2+	activation	PPP3
Ca2+	activation	PRKC
CER1	inhibition	WNT
CHD8	inhibition	CTNNB1
CTBP/HDAC	inhibition	LEF1
CTNNB1	activation	LEF1
CTNNBIP1	inhibition	CTNNB1
CXXC4	inhibition	DVL
DAAM	activation	RHOA
DKK	inhibition	FZD/LRP
DVL	inhibition	GSK3B
DVLnc	activation	DAAM
DVLnc	activation	RAC1
FZD	activation	DVLnc
FZD	activation	PLCB
FZD/LRP	activation	DVL
GSK3B	inhibition	CTNNB1
LEF1	activation	CCND
LEF1	activation	FOSL1
LEF1	activation	JUN
LEF1	activation	MMP7
LEF1	activation	MYC

<i>node 1</i>	<i>interaction</i>	<i>node 2</i>
LEF1	activation	PPARD
MAP3K7	activation	NLK
NKD	inhibition	DVL
NKD	activation	DVLnc
NLK	inhibition	LEF1
NOTUM	inhibition	WNT
PAR1	activation	DVL
PAR1	inhibition	DVLnc
PLCB	activation	Ca2+
PORCN	activation	WNT
PPP3	activation	NFATC1
PRKAC	inhibition	GSK3B
RAC1	activation	JNK
RHOA	activation	JNK
RHOA	activation	ROCK2
SENP2	inhibition	DVL
SERPINF1	inhibition	FZD/LRP
SFRP	inhibition	FZD/LRP
SFRP	inhibition	WNT
SOST	inhibition	FZD/LRP
SOX17	inhibition	LEF1
WIF1	inhibition	WNT
WNT	activation	FZD/LRP
WNT5	activation	FZD
WNT11	activation	FZD

Tabelle 4: Interaktionsliste des vereinfachten Wnt-Signalweges in Abbildung 7. Der ersten Spalte („node 1“) ist das jeweils vorgeschaltete Gen zu entnehmen, die dritte Spalte gibt das von diesem Gen bzw. dessen Genprodukt angesteuerte Ziel an. Spalte 2 („interaction“) gibt Auskunft, ob es sich um eine Aktivierung (activation) oder Hemmung (inhibition) handelt.

Die so gewonnenen Interaktionslisten der einzelnen Netzwerke können nun als Ausgangspunkte für die Zusammenführung der Einzelnetzwerke zu einem Gesamtnetzwerk genutzt werden: Mithilfe eines in Kooperation mit Martin Kaltdorf entwickelten *Perl*-Scripts (*txt_to_graphml.pl*, siehe Anhang) ist es nun möglich, aus der als *.txt*-Datei vorliegenden Aufstellung ein im *.graphml*-Format dargestelltes Knotennetzwerk zu generieren. Somit können Veränderungen in der Interaktionsliste sofort auf ein durch *Jimena* auslesbares Format übertragen werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, in einer Art Baukastenprinzip beliebige Kombinationen der Einzelnetzwerke zu größeren Netzwerken

zusammenzuführen oder zusätzliche Netzwerke in ein bereits bestehendes Gesamtnetzwerk zu implementieren. Auch ist es natürlich möglich, weitere relevante Verbindungen, zum Beispiel aus neuen wissenschaftlichen Veröffentlichungen auf diese Weise einfach in das Netzwerk zu integrieren, wie es auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Gesamtnetzwerk geschehen ist. Die gesamte Interaktionsliste inklusive der zugrundeliegenden Quellen ist dem Anhang zu entnehmen.

<i>node 1</i>	<i>interaction</i>	<i>node 2</i>	<i>source 1</i>	<i>source 2</i>	<i>source 3</i>
MAP3K5	activation	MAP2K3,6	Apoptosis		
MAP3K7	activation	IKBKB	MAPKinase		
MAP3K7	activation	NLK	MAPKinase	Wnt	
MDM2	inhibition	TP53	Cell Cycle	Levine2006	Oren1999
MDM2	inhibition	RB1	Cell Cycle		
MEF2C	activation	Smad/Dlx5	Chen2012		
MEF2C	activation	RUNX2	Kawane2014		

Tabelle 5: Beispielhafter Ausschnitt aus der Interaktionsliste des Gesamtnetzwerkes. Ist die jeweilige Interaktion der KEGG-Datenbank und damit einem oder mehreren ihrer Signalwege entnommen, ist die Quellenangabe orange unterlegt, externe Quellen sind blau unterlegt.

4.2 Implementierung der zahnspezifischen Gene

Nach genauer Betrachtung der in Kapitel 2.3 vorgestellten Gene wird es als sinnvoll angesehen, diejenigen Gene in das Netzwerk zu implementieren, die den in 2.3.3 genannten Kriterien am umfassendsten entsprechen. Dies gilt für die Gene AMBN, AMELX, AMELY, AMTN, DSPP und ENAM. Für diese sechs Gene soll im Folgenden eine geeignete Möglichkeit gefunden werden, eine Integration in das bestehende Stammbaumnetzwerk zu realisieren.

4.2.1 String Database

Als letzter Schritt zur Vervollständigung des Netzwerkes muss abschließend noch eine Verbindung der ausgewählten zahnspezifischen Gene zu den bereits im Grundnetzwerk vorkommenden Elementen hergestellt werden. Als am nächsten liegender Ansatz diene hier die Recherche in bioinformatischen Interaktionsdatenbanken. Hier bietet sich die umfangreiche *STRING-Datenbank* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*; <https://string-db.org/>) an, in der Informationen der Datenbanken *BioCarta*, *BioCyc*, *Gene Ontology*, *KEGG* und *Reactome* zusammengeführt sind. Das Prinzip der *STRING database*, die vom *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) und der Universität Zürich betrieben wird, ist einfach: Man gibt eines oder mehrere Gene/Proteine und den dazugehörigen Organismus an, worauf *STRING* aus den Informationen der oben genannten Datenbanken die Interaktionen des ausgewählten Genes/Proteins mit anderen Genen/Proteinen extrahiert und diese in Form eines Knotennetzwerkes darstellt. Die farblich markierten Verbindungen zwischen zwei Genen/Proteinen stehen für deren Zusammenwirken, dessen Art und Qualität durch die jeweilige Farbe und einen individuell errechneten *Score* angegeben werden. Diverse Kriterien sind hier durch den User selbst modifizierbar. Zudem liefert *STRING* die zu einer Proteininteraktion gehörige Literaturquelle und somit eine Überprüfungsmöglichkeit der grafischen Darstellung.^[172]

Die Suche nach verwendbaren Interaktionen, die einen Zusammenhang zwischen den zahnspezifischen Proteinen und dem Netzwerk herstellen könnten, führte jedoch zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis, was wohl vor allem der zum jetzigen Zeitpunkt noch wenig ausgeprägten experimentellen Forschungsarbeit zu den betroffenen Proteinen geschuldet ist.

4.2.2 Proteinspezifische Domänen

Als zweiter Ansatz wurde versucht, über die proteinspezifischen Domänen Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen zu ziehen. Proteindomänen sind spezifische Teilbereiche der Aminosäuresequenz eines Proteins mit stabiler Faltungsstruktur, die charakteristisch für

Proteine oder Proteinfamilien sind und Hinweise auf deren Funktion und Gesamtstruktur geben können.^[173] Die Untersuchung der entsprechenden Domänen erfolgte in zwei Schritten: Da die Domänen eines Proteins wie erwähnt aus ihrer Aminosäuresequenz ablesbar sind, wurden diese zur Überprüfung auf Domänen aus der *Uniprot*-Datenbank (<http://www.uniprot.org/>) entnommen und durch das vom EMBL in Heidelberg zur Verfügung gestellte Online-Tool SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) eingelesen. Es analysiert gegebene Nucleotid- oder Aminosäuresequenzen hinsichtlich des Vorkommens bekannter Domänen.^[174,175] Auch hier konnten jedoch keine weiterführenden Erkenntnisse gewonnen werden, da in den untersuchten Proteinen keine Sequenzen ausfindig gemacht werden konnten, die Hinweise auf ein eventuelles Bindungsverhalten ergaben.

4.2.3 Enrichr

Eine dritte Möglichkeit, Verbindungen von AMBN, AMELX, AMELY, AMTN, DSPP und ENAM zum Grundnetzwerk zu finden, bietet die Datenbank *Enrichr*. Sie wird vom *Ma'ayan Laboratory* der New Yorker *Icahn School of Medicine at Mount Sinai* betrieben und stellt durch *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) gewonnene Daten zur Verfügung.^[176]

Die *Gene Set Enrichment Analysis* stellt eine Methode dar, die ursprünglich dazu entwickelt wurde, anhand des Vergleichens von Expressionsprofilen gesunder und kranker Individuen dort überrepräsentierte Gen- oder Proteinklassen zu identifizieren und somit Rückschlüsse auf die Ursprünge von Erkrankungen zu ziehen: Da davon ausgegangen wird, dass häufig nicht Funktionsänderungen einzelner Gene, sondern ganzer Gruppen von Genen beziehungsweise Proteinen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung bestimmter Krankheiten (oder zumindest eine Prädisposition für die Ausprägung dieser Krankheiten) darstellen, werden beim Vergleich der Expressionsprofile besonders solche Gene betrachtet, die bei der Analyse der Microarrays die stärkste Veränderung im Vergleich zum gesunden Phänotyp aufweisen. Relativ gesehen erhöhte Werte bezogen zur

Kontrollgruppe weisen dann auf eine Überexprimierung der Gengruppe im Krankheitsfall hin, niedrigere Werte hingegen auf eine verminderte Expression, wobei nicht nur die Richtung, sondern auch die Dimension der Veränderung Berücksichtigung finden sollte. Auch die Effekte künstlich herbeigeführter Gene-Knockouts auf das Expressionsprofil können auf diese Weise betrachtet und ausgewertet werden. Ein „anreichern“ (engl.: *enrich*) verschiedener Gene in einer Gruppe kann dann als Hinweis auf deren funktionelle Zusammenhänge dienen.^[176,177]

Enrichr bietet nun eine Plattform, von welcher, direkt oder ausgehend von einzelnen Genen, Zugriff auf verschiedene Zusammenstellungen, sogenannte *gene set libraries*, erfolgen kann. Diese *gene set libraries* werden über die GSEA oder Weiterentwicklungen dieser erstellt und dienen dazu, die Funktion der zusammengehörigen Gengruppen darzustellen. Als Grundlage dienen hierbei externe Sequenzdaten. So können mit ihrer Hilfe einem Gen die dazugehörigen Signalwege oder seine regulierenden Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden.^[176]

Bei *Enrichr* sind die *gene set libraries* dabei in insgesamt acht Kategorien eingeteilt:

- *Transcription*: Zielgene können ihren zugehörigen (*enriched*) Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden
- *Pathways*: Gene können den Signalwegen zugeordnet werden, an denen sie beteiligt sind
- *Ontologies*: Enthält Datenbanken für die Zuordnung der Gene u. a. zu entsprechenden Zellkompartimenten und Geweben
- *Disease/Drugs*: Enthält *gene set libraries*, die die veränderte Expression der Gene bei Erkrankungen oder bei der Behandlung der Gewebe mit Wirkstoffen beschreiben
- *Cell Types*: Enthält *gene set libraries*, die die veränderte Expression der Gene in verschiedenen Zelltypen (auch Krebszellen) beschreiben
- *Misc[ellaneous]*: zusätzliche *gene set libraries*, u. a. zur Zuordnung der entsprechenden Genloci
- *Crowd*: diverse, durch *Crowdsourcing* generierte *gene set libraries*
- *Legacy*: Ermöglicht den Zugriff auf frühere Versionen von *gene set libraries*^[176,178]

Von diesen Kategorien bieten die *gene set libraries*, die in der Kategorie *Transcription* eingeordnet sind, den vielversprechendsten Ansatz, um eine Verbindung zwischen den zahn-spezifischen Proteinen und dem Rest des Netzwerkes herstellen zu können. Dabei sollen Transkriptionsfaktoren, die bereits Bestandteil des Netzwerkes sind, betrachtet werden. Deren in den *Enrichr*-Datenbanken dokumentierten aktivierenden oder hemmenden Einflüsse sollen dann dazu dienen, entsprechende Querverbindungen zu zahn-spezifischen Proteinen herauszustellen und somit einen Einbau der entsprechenden Gene in das Netzwerk zu ermöglichen.

Besonders geeignet zeigen sich hierbei zwei Datenbanken: *ChEA 2016* sowie *TRANSFAC and JASPAR PWMs*, die sowohl jeweils einen großen Umfang aufweisen (*ChEA 2016*: 645 Transkriptionsfaktoren, 49238 Gene; *TRANSFAC and JASPAR PWMs*: 326 Transkriptionsfaktoren, 27884 Gene, Stand 13.07.2017) als auch die gleiche Form der Information zur

Verfügung stellen, nämlich die Fähigkeit der Bindung eines Transkriptionsfaktors an die Promotorregion eines gesuchten Gens.

Die *ChEA 2016*-Datenbank wird dabei vom *Ma'ayan Laboratory* selbst, aufbauend auf Daten von Lachmann *et al.* (2010) kuratiert und in regelmäßigen Abständen mit neuen Updates über die *Enrichr*-Plattform zur Verfügung gestellt.^[178,179]

Bei *TRANSFAC* und *JASPAR PWM* handelt es sich um zwei unabhängige externe Datenbanken, auf die mittels *Enrichr* zugegriffen werden kann und deren Daten zu einer *gene set library* zusammengefasst sind.^[176,180,181]

Somit kann über *Enrichr* eine Rückwärtssuche der in Frage kommenden Transkriptionsfaktoren der vorliegenden Gene durchgeführt werden. Da die reine Information einer Bindung an die Promotorregion eines Gens jedoch noch nichts über den Einfluss des Transkriptionsfaktors auf dessen Expression aussagt, bedarf es einer weiteren Quelle, von welcher man auf die Art des Bindungsverhaltens schließen kann.

An dieser Stelle eignet sich ein *gene expression omnibus data set*, kurz GEO-Datensatz, der Genexpressionsdaten von zahnspezifischen Zellen (idealerweise Ameloblasten) und aus embryonalen Stammzellen ausdifferenzierter, nicht-dentaler Epithelzellen zur Verfügung stellt, um anhand dieser das Bindungsverhalten, das sich von den *Enrichr*-Daten ableiten lässt, noch einmal zu überprüfen. Aus dem Abgleich des Expressionsverhaltens der in Frage kommenden zahnspezifischen Gene mit dem Verhalten der jeweils in den *gene set libraries* zugeordneten Transkriptionsfaktoren kann man auf deren vermutliche Interaktion folgern.

Bei GEO-Datensätzen handelt es sich vornehmlich um frei online zugängliche Gensequenzierungsdaten.^[182] In der für die Katalogisierung der GEO-Datensätze verantwortlichen Datenbank des US-amerikanischen *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) steht derzeit nur ein geeigneter Datensatz zur Verfügung. In den von Zhang *et* Zheng (2016) erhobenen Daten (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; GEO accession: GSE75954) werden vier verschiedene menschliche Zelltypen in je drei Zelllinien betrachtet:

- Aus embryonalen Stammzellen ausdifferenzierte Epithelzellen (EC)
- Fetale präsekretorische Ameloblasten aus Incisivi (PA)
- Fetale sekretorische Ameloblasten aus Incisivi (SA)
- Fetale orale Epithelzellen^[183,184]

Für die Auswertung sind in diesem Falle nur die Expressionsdaten der zahnbildenden Zellen, also der Ameloblasten, sowie die der aus embryonalen Stammzellen hervorgegangenen Epithelzellen vonnöten, die Daten der fetalen oralen Epithelzellen sind nicht von Bedeutung. Die Expressionsdaten der Epithelzellen aus embryonalen Stammzellen sollen die „Ausgangswerte“ zu den Werten der fetalen Ameloblasten darstellen. Diese dienen dann als Referenz zu den in den Expressionsprofilen der Ameloblasten auftretenden Unterschieden. Nur der Vergleich zu einer nicht-zahnspezifischen Zelle ermöglicht es, aus den Expressionsdaten Informationen über das mögliche Zusammenspiel der Gene bei der Zahnentwicklung zu ziehen. In diesem Fall ist sogar eine zweizeitige Untersuchung des Verlaufs der Genexpression möglich, da von einem Zelltyp, den Ameloblasten, Expressionsdaten zu verschiedenen Zeitpunkten seiner Entwicklung abrufbar sind.

Um nun eine Aussage darüber treffen zu können, ob die ausgewählten Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die entsprechenden Gene haben, vergleicht man deren Verhalten: Über die Website des NCBI lassen sich über das Tool *GEO2R* individuelle Analysen der GEO-Datensätze durchführen. Die untersuchten Zelllinien werden durch NCBI als Rohdaten zur Verfügung gestellt, *GEO2R* ermöglicht es, mehrere Zelllinien bzw. Grup-

pen von Zelllinien miteinander zu vergleichen. Man erhält unter anderem einen logarithmischen *Fold Change (logFC)*, der angibt, wie sich die Expression der untersuchten Gene zueinander verhält (Logarithmus zur Basis 2) – es ergeben sich also immer relative und keine absoluten Werte, was die Notwendigkeit erklärt, die Epithelzellen aus Stammzellen als Vergleichsgruppe zu nutzen, da nur so eine sinngebende Betrachtung der verschiedenen Zelltypen vorgenommen werden kann.^[184,185]

Für die vorliegende Arbeit erfolgte eine Analyse der GEO-Datensätze demnach auf drei Weisen:

- Vergleich Epithelzellen – präsekretorische Ameloblasten (ECPA)
- Vergleich Epithelzellen – sekretorische Ameloblasten (ECSA)
- Vergleich präsekretorische Ameloblasten – sekretorische Ameloblasten (PASA)

Hierbei wurden jeweils alle drei Zelllinien eines Typs mit denen des anderen Typs gemeinsam verglichen, um eventuellen statistischen Schwankungen innerhalb einer Zelllinie entgegenzuwirken bzw. zu minimieren. Im weiteren Verlauf dient auch der Vergleich der präsekretorischen zu den sekretorischen Ameloblasten nur noch als Kontrollwert, da er sich aus den ersten beiden Werten herleiten lässt und somit keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn verspricht.

Die Datenausgabe der GEO-Analyse erfolgt im *.txt*-Format. Mithilfe eines speziell für diesen Zweck konzipierten Programmes (*parseGEO2R.pl*, dem Anhang zu entnehmen), ist es möglich, aus den Genexpressionsdaten (> 30.000 Gene) nur gewünschte Werte ausgesuchter Gene zu extrahieren.^[183] Für die Auswertung im Rahmen dieser Arbeit ist dies neben dem bereits erwähnten „*logFC*“ die Angabe „*p.value*“, welche Auskunft über die Signifikanz der erhaltenen Werte gibt.^[184] Die jeweiligen Gene, deren Expressionsdaten ausgegeben werden sollen, werden hierzu ebenfalls im *.txt*-Format aufgelistet (in *parseGEO2R.pl* als „*protlist*“ bezeichnet). Diese Liste wird durch *parseGEO2R.pl* ausgelesen, anschließend gibt das Programm die gesuchten Gene und ihre jeweiligen *logFC*- und *p.value*-Werte aus. Dies erspart ein mühseliges manuelles Auslesen der Expressionsdaten.

Die durch die Recherche in *Enrichr* erstellten Aufstellungen der Transkriptionsfaktoren für jedes der zahnspezifischen Gene (s. Anhang) und das dazugehörige zahnspezifische Protein selbst dienen schließlich als Vorlagen für die verschiedenen *protlists*. Als Ergebnis erhält man dann die eben diesen zugeordneten Werte aus dem GEO-Datensatz. Der für die Auswertung maßgebliche Wert ist der logarithmische *Fold Change*. Dieser muss, um aus ihm eine signifikante Aussage ableiten zu können, mindestens 1 betragen (beziehungsweise im negativen Bereich unter -1 liegen) sollte. So verkleinert sich die Anzahl der in Frage kommenden Transkriptionsfaktoren auf 5-9 pro zahnspezifischem Protein.

Betrachtet man die über *Enrichr* vorausgewählten Transkriptionsfaktoren parallel zu den ihnen zugeordneten Genen, kann man von deren Verhalten auf die Art ihrer Beeinflussung der Zielgene schließen:

Richtwerte logFC	Interpretation / Funktion Transkriptionsfaktor	Kürzel
ECPA > 1 (0.6), ECSA > 1 (0.6)	TF bedingt dauerhafte Aktivierung der Expression des zahnspezifischen Proteins ----- → Expressions-Aktivierung	ExpAkt
ECPA < -1 (-0.6), ECSA < -1 (-0.6)	TF bedingt dauerhafte Hemmung der Expression des zahnspezifischen Proteins (Expression findet in Datenset statt, da TF niedrig exprimiert) ----- → Expressions-Hemmung	ExpHem
ECPA >1, ECSA < 0.6	TF ist bei Initiation der Differenzierung zum Präameloblasten beteiligt, jedoch nicht bei Initiation/Aufrechterhaltung der sekretorischen Phase ----- → Initiale Aktivierung	IniAkt
ECPA <-1, ECSA > -0.6	TF hat hemmenden Einfluss auf Differenzierung zum Präameloblasten, beeinflusst sekretorische Phase jedoch nicht ----- → Initiale Hemmung	IniHem
ECPA <0.6, ECSA > 1	TF ist für die Initiation/Aufrechterhaltung der sekretorischen Phase nötig, jedoch nicht für die Differenzierung zum Präameloblasten ----- →Aktivierung Sekretion	SekAkt
ECPA > -0.6, ECSA < -1	TF hat keinen Einfluss auf Differenzierung zum Präameloblasten, hemmt jedoch sekretorische Phase ----- → Hemmung Sekretion	SekHem

Tabelle 6: Kategorisierungsschema der Transkriptionsfaktoren. Die Werte in Klammern besagen, dass, falls einer der beiden Werte 1/-1 über- bzw. unterschreitet, auch eine Über- bzw. Unterschreitung von 0.6/-0.6 eine entsprechende Einordnung in die zugeordnete Kategorie zulässt, um eine größere Zahl an Genen in eine der Kategorien einordnen zu können.

Tabelle 6 sind die Kategorien zu entnehmen, nach denen die Einordnung der Transkriptionsfaktoren entsprechend ihrer Art der Beeinflussung erfolgt. Sollte ein Transkriptionsfaktor in keinem der beiden Messbereiche einen Wert > 1 bzw. < -1 aufweisen, werden die Hinweise auf eine regulierende Wirkung auf das Zielgen als zu schwach angesehen und er kommt nicht mehr für einen Einbau in das Netzwerk in Frage. In der nachfolgenden Tabelle sind die so gefilterten und kategorisierten Gene aufgeführt:

zahnspezif. Gen	Gen / TF	ECPA [logFC]	ECSA [logFC]	Wirkung
AMBN	AMBN	6,867417	9,130868	ExpAkt
	ETS1	-2,598416	-1,8699457	ExpHem
	TP63	2,739219	3,320679	ExpAkt
	TBX5	-1,8660867	-1,400205	ExpHem
	GATA3	-2,9816743	-2,713734	ExpHem
	CTCF	-0,6331573	-1,010548	ExpHem
	PBX1	-1,429361	-1,8240863	ExpHem
	RARB	-2,842207	-3,3768683	ExpHem
AMELX	AMELX	7,0270053	7,775412	ExpAkt
	HMGA1_1	-1,3146027	-1,256438	IniHem
	HMGA1_2	-1,6471327	-0,2570093	ExpHem
	HMGA1_3	-0,4621283	-1,5863887	SekHem
	JUN	1,2199753	0,8543783	ExpAkt
	LEF1	-0,9512787	-1,3979907	ExpHem
	PITX2	1,688759	0,8022063	ExpAkt
	RUNX2	0,295757	1,041942	SekAkt
	SMAD2_1	-1,114411	0,017969	IniHem
AMELY	AMELY	0,740464	1,1789993	ExpAkt
	BRCA1	-0,635205	-1,750359	ExpHem
	LEF1	-0,9512787	-1,3979907	ExpHem
	SMARCA2	1,2988947	0,549414	IniAkt
	TP63	2,739219	3,320679	ExpAkt
AMTN	AMTN	0,0257487	1,8440153	SekAkt
	PITX2	1,688759	0,8022063	ExpAkt
	TFAP2C	-1,1763457	-0,9504063	ExpHem
	TP63	2,739219	3,320679	ExpAkt
DSPP	DSPP	2,4433087	5,663729	ExpAkt
	JUN	1,2199753	0,8543783	ExpAkt
	MEIS1	-1,2451497	-2,849225	ExpHem
	PPARG	-1,6881983	-1,698027	ExpHem
	RUNX2	0,295757	1,041942	SekAkt
ENAM	ENAM	5,0076963	8,4382103	ExpAkt
	CBX5	-0,68146	-1,2896033	ExpHem
	GATA3	-2,9816743	-2,713734	ExpHem
	HOXA5	-1,483809	-1,2409543	ExpHem
	JUN	1,2199753	0,8543783	ExpAkt
	LEF1	-0,9512787	-1,3979907	ExpHem
	SMARCA2	1,2988947	0,549414	IniAkt

zahnspezif. Gen
logFC > 1
logFC < -1
Mus musculus

Tabelle 7: Zahnspezifische Gene (gelb) und potenziell assoziierte Transkriptionsfaktoren (TF), bei denen eine Interaktion vermutet werden kann. Zugeordnet findet sich jeweils die aus den Expressionsdaten abgeleitete Art der Interaktion (siehe Tabelle 6). Werte > 1 sind grün markiert, Werte < -1 rot. Transkriptionsfaktoren, deren experimentelle Grundlage der Enrich-Daten durch Versuche an Mäusen erstellt wurden, sind blau markiert (Zugriff Enrich: 13.07.2017).

Um nun mithilfe der ausgewählten Transkriptionsfaktoren eine sinnvolle Ergänzung des Netzwerkes herzustellen, müssen diese zunächst selbst in das Netzwerk integriert werden, um wiederum ihre Interaktion mit dem zahnspezifischen Gen im Netzwerk einzubauen. Diejenigen Interaktionen, bei denen in den *Enrichr*-Datenbanken der Nachweis eines Zusammenwirkens bisher lediglich bei Mäusen erbracht worden ist, werden im Verlauf dieser Arbeit zunächst ausgeklammert.

Problemlos ist die Implementierung der Interaktionen bei solchen Transkriptionsfaktoren möglich, die bereits Bestandteil der zugrundeliegenden Signaltransduktionskaskaden und damit des Ursprungsnetzwerkes sind. Hier muss nur der aktivierende bzw. hemmende Einfluss des Transkriptionsfaktors auf die Expression des entsprechenden Zielgenes ergänzt werden. Dies gilt für JUN (bei AMELX, DSPP und ENAM) und LEF1 (bei AMELX, AMELY und ENAM).

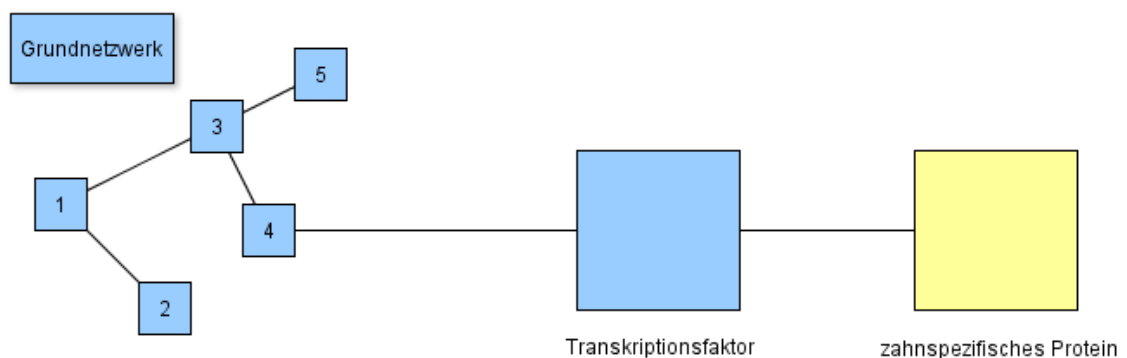


Abbildung 8: Implementierung in das Grundnetzwerk, Möglichkeit 1 – der Transkriptionsfaktor, welcher die Verknüpfung zum zahnspezifischen Protein ermöglicht, ist bereits Bestandteil des ursprünglichen Netzwerkes. Somit muss nur das zahnspezifische Gen selbst entsprechend integriert werden.

Transkriptionsfaktor	Interaktion	Zielgen
JUN	aktiviert	AMELX
JUN	aktiviert	DSPP
JUN	aktiviert	ENAM
LEF1	hemmt	AMELX
LEF1	hemmt	AMELY
LEF1	hemmt	ENAM

Tabelle 8: Transkriptionsfaktor–Zielgen–Interaktionen, die direkt aus den Enrichr-Datenbanken und dem Grundnetzwerk ableitbar sind (Zugriff Enrichr: 13.07.2017).

Bei den anderen Transkriptionsfaktoren wurde untersucht, ob sich über die „Zwischenstation“ einer weiteren wissenschaftlich belegten Proteininteraktion ebenfalls eine Implementierung der Transkriptionsfaktor-Zielgen-Interaktionen in das Netzwerk erreichen lassen. Der Transkriptionsfaktor wäre in diesem Falle also nicht ursprünglicher Bestandteil des Grundnetzwerkes, jedoch direkt mit einem der daran beteiligten Proteine verbunden.

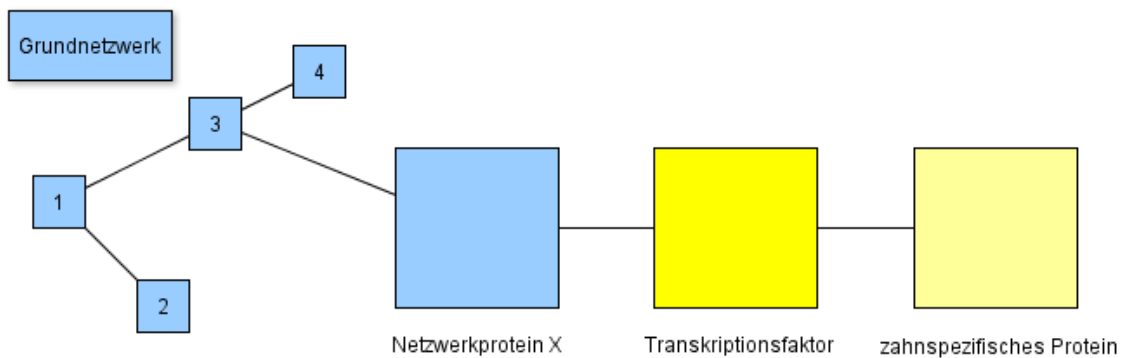


Abbildung 9: Implementierung in das Grundnetzwerk, Möglichkeit 2 – der Transkriptionsfaktor, welcher die Verknüpfung zum zahnspezifischen Protein ermöglicht, ist nicht direkter Bestandteil des ursprünglichen Netzwerkes. Er interagiert jedoch wiederum mit einem Protein X des Netzwerkes, was eine Verknüpfung des zahnspezifischen Proteins möglich macht.

Als Bezugsquelle für die Knüpfung einer solchen Bindung diene auch an dieser Stelle die Datenbank der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Eine dort belegte Interaktion konnte ausschließlich für ETS1 (AMBN) bestimmt werden, welches einer Aktivierung durch ERK1/2 unterliegt und beispielsweise im Ras-Signalweg von Bedeutung ist.^[186]

Gen in Grundnetzwerk	Interaktion 1	Transkriptionsfaktor	Interaktion 2	Zielgen
ERK1/2	aktiviert	ETS1	aktiviert	AMBN

Tabelle 9: Der Transkriptionsfaktor ETS1 wird durch ERK1/2 aktiviert und aktiviert wiederum AMBN (Zugriff Enrichr: 13.07.2017).

Im Falle von AMTN (Amelotin) konnte nach derzeitigem Forschungsstand und den genutzten Methoden keine Interaktion identifiziert werden, die zum jetzigen Zeitpunkt eine Implementierung in das Netzwerk ermöglichen würde. Die letztendlich als Knoten in das Netzwerk integrierten zahnspezifischen Proteine sind also AMBN, AMELX, AMELY, ENAM und DSPP.

Zielgen	Uniprot ID Zielgen	Transkriptionsfaktor	Uniprot ID Transkriptionsfaktor	Datenbank	
				ChEA 2016	TRANSFAC and JASPAR
AMBN	Q9NP70	ETS1	P14921	+	+
AMELX	Q99217	JUN	P05412	+	-
AMELX	Q99217	LEF1	Q9UJU2	-	+
AMELY	Q99218	LEF1	Q9UJU2	-	+
DSPP	Q9NZW4	JUN	P97474	+	-
ENAM	Q9NRM1	JUN	P97474	+	-
ENAM	Q9NRM1	LEF1	Q9UJU2	-	+

Tabelle 10: Die miteinander im Gesamtnetzwerk über ihre Interaktionen assoziierten Transkriptionsfaktoren und zahnspezifischen Zielgene mit Zuordnung der entsprechenden Datenbank. Zur erleichterten Zuordnung sind den Zielgenen und Transkriptionsfaktoren noch ihre jeweiligen Uniprot-Identifikationsnummern angefügt (Zugriff Enrichr: 13.07.2017).^[174,178–181]

4.3 Das genregulatorische Netzwerk

Die in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Interaktionen können nun also mit dem in Kapitel 4.1 beschriebenen Stammnetzwerk verknüpft werden. Insgesamt besteht das vollständige Netzwerk nun aus 155 Knoten, die durch 322 Interaktionen miteinander verknüpft sind. 233 der Interaktionen sind dabei der KEGG-Datenbank entnommen (zum Teil durch weitere Quellen gestützt), 82 über weiterführende Literatur, sieben der Verknüpfungen ergeben sich aus den Erkenntnissen durch *Enrichr* und dem GEO-Datensatz. Die gesamte Interaktionsliste mit detaillierter Aufführung der jeweiligen Quellen sowie das vollständige genregulatorische Netzwerk im *.graphml*-Format sind im Anhang zu finden.

4.3.1 Bestimmung zentraler Gene

Da das Netzwerk aus 155 Einzelknoten besteht, erscheint eine ausführliche Auswertung jedes einzelnen Knotens wenig sinnvoll. Es sollen im Rahmen der Auswertung deshalb nur einige wenige Knoten ausgewählt werden, über deren Ausgabewerte wiederum eine möglichst exakte Aussage über den Zustand des Gesamtnetzwerkes gemacht werden kann. Diese repräsentativen Knoten sollen hier jeweils das Aktivitätsniveau von sieben der acht beschriebenen Signalwege wiedergeben. Da die beteiligten Proteine des Notch-Signalweges im Gesamtnetzwerk eine untergeordnete Rolle spielen, kann dieser im Folgenden für die weitere Analyse vernachlässigt werden. Durch die Bestimmung zentraler Gene soll eine Möglichkeit geschaffen werden, durch Betrachtung eines ausgewählten Teiles der Daten eine gute Übersicht über den gesamten simulierten Netzwerkzustand zu erhalten.

Die Bestimmung der geeigneten repräsentativen Knoten wird über die in *Jimena* implementierte *centrality*-Funktion (siehe Abschnitt 3.1.1.2) erleichtert. In Tabelle 11 sind die für die jeweiligen Signalwege repräsentativen Gene mit ihrem jeweiligen Wert der *dynamic centrality* aufgeführt. Des Weiteren sind dort die diesen als äquivalent zuzuordnenden Gene aus dem GEO-Datensatz von Zhang *et* Zheng (2016) eingefügt.^[183]

Gen (in Netzwerk)	Dynamic Centrality	Signalweg	Gen (Äquivalent in GEO-Datensatz)
ACVR1/BMP2	0,1070055	TGFBeta	ACVR1 = activin A receptor type 1
CCNE/CDK2	0,112205209	Cell Cycle	CCNE1 = cyclin E1
CTNNB1	0,041510111	WNT	CTNNB1 = catenin beta 1
ERK1/2	0,133020481	MAPKinase	MAPK1 = mitogen-activated protein kinase 1
JNK	0,057356517	MAPKinase	MAPK8 = mitogen-activated protein kinase 8
mTORC1	0,153697691	mTor	MTOR = mechanistic target of rapamycin
SHH	2,22E-23	Hedgehog	SHH = sonic hedgehog
TP53	0,079482917	Apoptosis	TP53 = tumor protein p53

Tabelle 11: Zentrale Gene der einzelnen Signalkaskaden und der Wert ihrer dynamic centrality. Die Bezeichnungen der Gene im Netzwerk stimmen nicht immer vollständig mit jenen im GEO-Datensatz überein, daher wird zusätzlich das jeweilige Äquivalent aufgeführt.

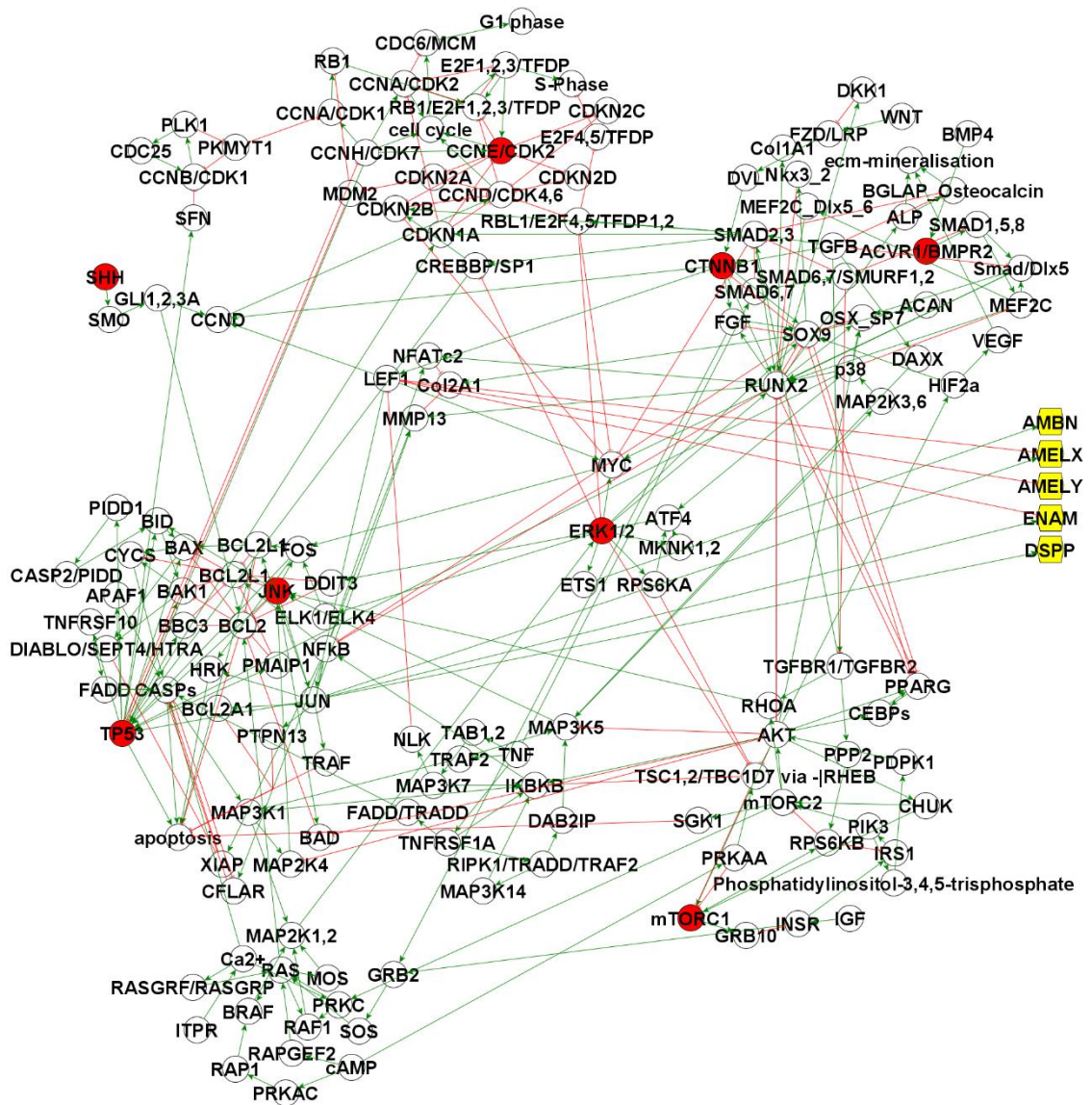


Abbildung 10: Das genregulatorische Netzwerk der Odontogenese in der Gesamtübersicht. Die Knoten der zahn-spezifischen Proteine sind gelb, die Knoten der zentralen Gene rot markiert. Grüne Verbindungspfeile repräsentieren eine Aktivierung in Pfeilrichtung, rote Verbindungspfeile eine entsprechende Hemmung.

4.4 Netzwerksimulation

4.4.1 Berechnung der stabilen Zustände

Die Berechnung der stabilen Zustände für das Gesamtnetzwerk durch *Jimena* bei einer Rechenzeit von 1000 Sekunden konnte insgesamt sechs *stable states* liefern. Eine genaue Auflistung der errechneten stabilen Zustände mit allen beteiligten Knoten befindet sich im Anhang. Wie bereits erwähnt, sollen zur Analyse der stabilen Zustände nur einige ausgewählte Gene betrachtet werden. Neben den zentralen Genen sind dies auch die in das Netzwerk implementierten zahnspezifischen Proteine Ameloblastin, Amelogenin X und Y, Enamelin sowie DSPP. Zusätzlich werden auch die Transkriptionsfaktoren RUNX2 und SOX9 hervorgehoben, denen jeweils eine tragende Rolle bei der Knochenbildung zugeschrieben wird.^[187–189]

zahnspezifische Gene	SS001	SS002	SS003	SS004	SS005	SS006
AMBN	0,99997142	0,99992759	5,469E-07	0,99992758	1,0287E-07	1,2613E-07
AMELX	0,9933617	0,99315868	1,2109E-06	0,99315861	3,7203E-07	5,923E-07
AMELY	1	1	1	1	1	1
DSPP	0,9933617	0,99315868	1,2109E-06	0,99315861	3,7204E-07	5,923E-07
ENAM	0,9933617	0,99315868	1,2109E-06	0,99315861	3,7203E-07	5,923E-07
zentrale Gene	SS001	SS002	SS003	SS004	SS005	SS006
ACVR1/BMPR2	1,5198E-17	8,7674E-18	7,5918E-14	5,065E-18	6,8463E-14	2,8298E-16
CCNE/CDK2	3,2421E-06	0,94595196	0,94595234	0,94595195	0,94595234	0,94595234
CTNNB1	4,9885E-18	4,8079E-17	9,0601E-13	2,0103E-17	1,8636E-12	1,1528E-14
ERK1/2	0,97659982	0,94633963	2,0023E-06	0,94633793	1,4058E-07	1,8608E-07
JUN	0,87108399	0,86842542	1,3847E-06	0,86842507	3,1511E-07	4,372E-07
mTORC1	2,1159E-14	2,9983E-14	8,3352E-11	1,6175E-14	2,8488E-10	2,1438E-13
RUNX2	0,01898828	0,01899241	2,7663E-07	0,01899261	3,1732E-08	9,4451E-08
SHH	2,0514E-18	1,6942E-18	5,8366E-15	1,4203E-18	6,3163E-15	6,1599E-17
SOX9	0,73608262	0,7166972	2,677E-07	0,71669335	3,2012E-08	1,2226E-07
TP53	0,97779653	9,1602E-06	5,8148E-06	9,1602E-06	5,8148E-06	5,8148E-06

Tabelle 12: Die sechs stabilen Zustände des Netzwerkes, berechnet durch *Jimena* ($t = 1000$ s). Zur besseren Übersicht sind nur die Werte der zahnspezifischen Gene sowie der zentralen Gene aufgeführt. Alle Werte liegen zwischen 0 und 1, hohe Werte repräsentieren entsprechend hohe Aktivitätsniveaus.

Zur übersichtlichen Darstellung der Daten ist außerdem eine Heatmap erstellt worden (Abbildung 11), die eine Bewertung der Aktivitätsniveaus der Gene in den einzelnen *stable states* erleichtert.

Stable states with tooth-specific and central genes

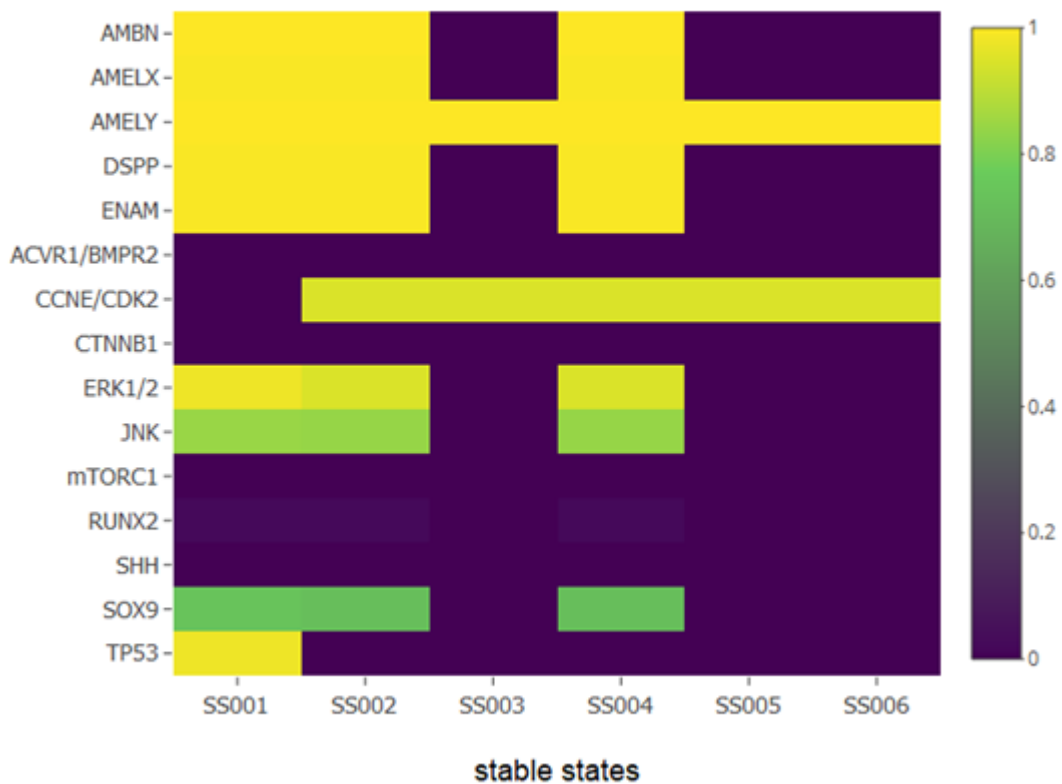


Abbildung 11: Heatmap zur Darstellung der sechs stable states und der jeweiligen Aktivität ausgewählter Gene. Der Farbskala rechts ist das Aktivitätsniveau des jeweiligen Gens abzuleiten, wobei grüne und gelbe Felder für ein hohes bzw. sehr hohes Aktivitätsniveau stehen. Bei SS001, SS002 und SS004 handelt es sich demnach um *healthy states*.

Nun können diese sechs stabilen Zustände einzeln betrachtet und das Verhalten der jeweiligen Aktivitätsniveaus der entsprechenden Gene ausgewertet werden. Wie Abbildung 11 zu entnehmen ist, weisen von den sechs errechneten *stable states* drei Zustände sehr hohe Aktivitätsniveaus für alle fünf zahnspezifischen Gene aus (SS001, SS002 und SS004). In der anderen Hälfte zeigt nur AMELY einen hohen Wert. Da für eine Produktion von Zahnhartsubstanz durch einen gesunden Ameloblasten die Aktivität aller fünf zahnspezifischen Gene als notwendig angenommen wird, können SS001, SS002 und SS004 als *healthy states* bezeichnet werden.

4.4.2 Betrachtung der *healthy states*

Die *stable states* SS001, SS002 und SS004 entsprechen im Rahmen der Simulation demnach denjenigen Zuständen, bei denen die Aktivität der „vorgeschalteten“ Gene (und damit Signalwege) im Netzwerk die passenden Voraussetzungen für die Aktivierung der zahn-spezifischen Gene bilden. Bei diesen, als *healthy states* bezeichneten Zuständen soll nun eine genauere Betrachtung vorgenommen werden.

Vergleicht man zunächst die aufgeführten Ausgabewerte der *healthy states* untereinander, fällt auf, dass innerhalb der betrachteten Gene nur minimale Unterschiede zwischen den stabilen Zuständen SS002 und SS004 bestehen. Weitet man nun die Analyse dieser beiden stabilen Zustände auf alle berechneten Werte aus, stellt man fest, dass sich die beiden Zustände nur in wenigen Werten so stark unterscheiden, dass sich daraus verschiedene Aktivitätsmuster der betreffenden Gene ableiten ließen. Bei allen diesen Werten hält es sich zudem um Gene, die ausschließlich innerhalb des Zellzyklus eine Rolle spielen und nur wenig Einfluss auf das Gesamtnetzwerk haben. Letzteres spiegelt sich durch niedrige Werte bei der Berechnung der entsprechenden *centralities* durch *Jimena* wider. Aufgrund dieser Faktoren werden die stabilen Zustände SS002 und SS004 im Folgenden gemeinschaftlich betrachtet.

Knoten	SS002	SS004	Value Centrality	Dynamic Centrality	Quelle
CCNA/CDK1	8,3157E-17	0,999999958	4,17E-21	0,01082727	Cell Cycle
CCNB/CDK1	6,5165E-17	0,999999875	7,75731E-23	6,25E-25	Cell Cycle
CDC25	1,6332E-16	1	9,51959E-24	3,85E-06	Cell Cycle
PKMYT1	1	1,41663E-10	2,26E-22	6,97E-11	Cell Cycle
PLK1	1,0294E-16	0,999999996	1,61E-03	0,00713073	Cell Cycle
RB1	5,5576E-18	9,97123E-06	4,52E-19	9,11E-11	Cell Cycle

Tabelle 13: Gegenüberstellung derjenigen Knoten, bei denen innerhalb von SS002 und SS004 maßgebliche Unterschiede bestehen. Sämtliche Knoten spielen ausschließlich innerhalb des Zellzyklus eine Rolle und weisen niedrige centrality-Werte auf.

Stellt man nun die *healthy states* SS001 und SS002/SS004 gegenüber, zeigen sich dort viele Ähnlichkeiten im Bereich der jeweiligen Aktivitätsniveaus, bei einigen zentralen

Genen lassen sich wiederum Abweichungen beobachten. Niedrige Aktivität zeigen sowohl in SS001 als auch SS002/SS004 die Knoten ACVR1/BMP2 (zentrales Gen des TGF- β -Signalweges), CTNNB [WNT], mTORC1 [mTOR], RUNX2 und SHH [Hedgehog].

Hohe Aktivitäten werden in der Simulation den zentralen Genen des MAP-Kinase-Weges, ERK1/2 und JNK, sowie SOX9 zugeschrieben. In SS001 liegen im Falle von ERK1/2 und JNK die Werte jeweils ein wenig höher als in SS002/SS004.

Größere Unterschiede zwischen den errechneten *healthy states* zeigen sich bei zwei der wichtigen Knoten: TP53 [Apoptose] weist in SS001 einen Wert von ≈ 0.9778 auf (TP53 in SS002/SS004 $\approx 9,1602 \cdot 10^{-6}$). Demgegenüber beträgt in SS002/SS004 der Wert für CCNE/CDK2 [Zellzyklus] $\approx 0,9460$, während in SS001 dieser Knoten einen deutlich niedrigeren Wert aufweist (CCNE/CDK2 $\approx 3,2420 \cdot 10^{-6}$).

Betrachtet man die Aktivität der zentralen und zahnspezifischen Gene bei den simulierten *healthy states* also im Gesamten, können daraus für das Netzwerk verschiedene Aussagen abgeleitet werden:

1. Eine Aktivität von ERK1/2 und JNK ist für die Entstehung eines *healthy states* unabdingbar. Dem MAP-Kinase-Signalweg, in den ERK1/2 und JNK eingebettet sind, wäre also eine besondere Bedeutung für die Entstehung von Zahnhartsubstanz zuzuschreiben.
2. ACVR1/BMP2, CTNNB, mTORC1 und SHH spielen im Netzwerk bei der Bildung eines *healthy states* eine untergeordnete Rolle. Dies würde damit auch für die korrespondierenden Signalwege TGF- β , WNT, mTOR und den Hedgehog-Signalweg gelten.
3. Die Aktivität von SOX9 ist zentraler Bestandteil der Schmelzbildung, während die Aktivität von RUNX2 zu vernachlässigen ist.
4. Sowohl für eine Aktivität des Zellzyklus (CCNE/CDK2) bei Inaktivität des apoptotischen Signalweges (TP53) als auch für das umgekehrte Szenario lassen sich *healthy states* simulieren.

4.5 Genaktivität im GEO-Datensatz

Zur Einordnung der Ergebnisse der Simulation ist es sinnvoll, den Ergebnissen der Netzwerksimulation Daten aus empirischen Erhebungen aus der Praxis entgegenzusetzen. Somit kann eine Referenz für die errechneten Aktivitätsniveaus einzelner Genprodukte durch bereits experimentell nachweisbare Daten geschaffen werden. Dazu soll die Aktivität der zahnspezifischen Proteine und der zentralen Gene im GEO-Datensatz von Zhang *et* Zheng (2016) betrachtet werden. Mithilfe einer Heatmap kann hier jeweils die relative Aktivität dieser Gene von präsekretorischen (PA) und sekretorischen (SA) Ameloblasten im Vergleich zu aus Stammzellen differenzierten Epithelzellen (EC) sichtbar gemacht und gegenübergestellt werden. Zu beachten ist dabei, dass es sich, bedingt durch die Auswertungsmethodik, um relative Werte handelt – ein negativer [positiver] Zahlenwert lässt also nicht unbedingt auf eine niedrige [erhöhte] Gesamtaktivität des Gens schließen, sondern nur auf eine im Vergleich zur Genaktivität der Epithelzelle reduzierte [gesteigerte] Aktivität. Die im Netzwerk vertretenen Knoten ACVR1/BMP2, CCNE/CDK2 und mTORC1 sind nicht in dieser Form im Rahmen des GEO-Datensatzes aufgezeichnet. In diesen Fällen wurden aus dem GEO-Datensatz die Zahlen der Gene mit der jeweils größten Entsprechung übernommen: ACVR1 für ACVR1/BMP2, CCNE1 für CCNE/CDK2, MAPK1 für ERK1/2 und MTOR für mTORC1 (siehe Tabelle 11).

tooth-specific genes	epithelial cells - presecretory ameloblasts [logFC]	epithelial cells - secretory ameloblasts [logFC]
AMBN	9,130868	6,867417
AMELX	7,775412	7,0270053
AMELY	1,1789993	0,740464
DSPP	5,663729	2,4433087
ENAM	8,4382103	5,0076963
central genes	epithelial cells - presecretory ameloblasts [logFC]	epithelial cells - secretory ameloblasts [logFC]
ACVR1	0,5172663	0,7718303
CCNE1	-1,712674	-2,173896
CTNNB1	0,4648633	0,6017833
JNK	0,164295	-0,078636
MAPK1	-0,4825417	-0,189367
MTOR	-1,264537	-1,1698367
RUNX2	0,295757	1,041942
SHH	1,1265167	1,2238327
SOX9	0,097826	0,2215513
TP53	-0,8807553	-1,2729863

Tabelle 14: Ausgewählte Gene des GEO-Datensatzes von Zhang et Zheng (2016).^[183] Ein Wert von 0 würde bedeuten, dass im Vergleich zur epithelialen Zelle keine Veränderung der Genexpression des entsprechenden Genes stattgefunden hätte. Negative Werte bedeuten eine verringerte Expression, positive Werte repräsentieren einen Anstieg.

Setzt man die berechneten Werte grafisch um, ergibt sich das in Abbildung 12 gezeigte Bild. Zur besseren Übersicht werden die Daten dort in einer Heatmap darstellbar gemacht.

Gene expression of tooth-specific and central genes

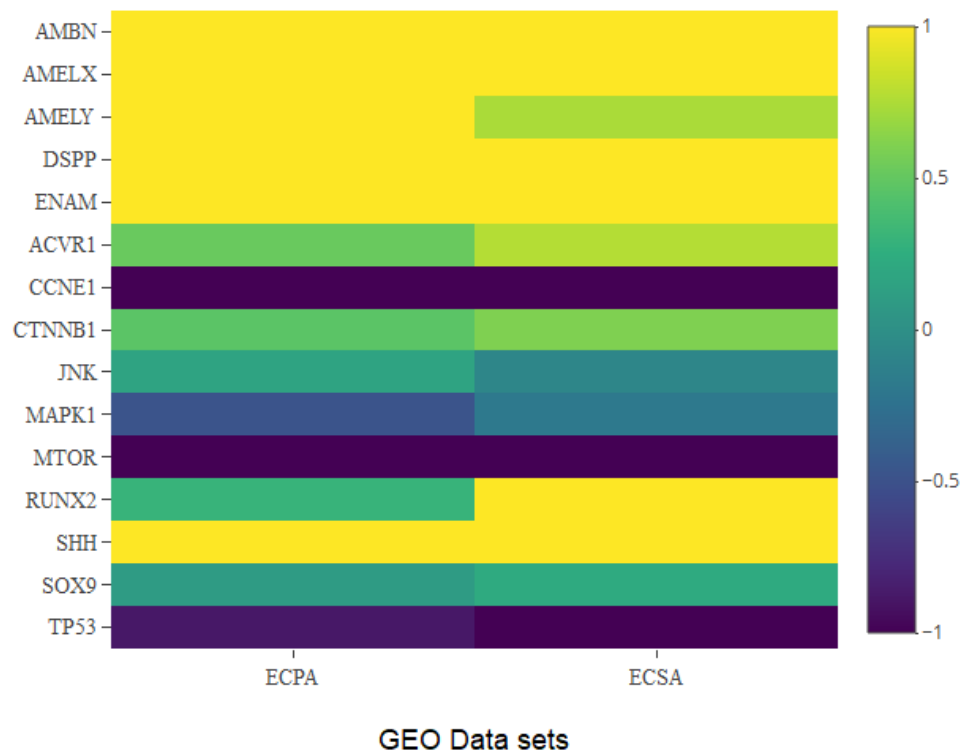


Abbildung 12: Heatmap zur Darstellung der Genaktivität der zahnspezifischen Gene und der zentralen Gene. Werte >1 und <-1 wurden zur besseren Übersicht auf die Werte 1 bzw. -1 nivelliert. ECPA = Vergleich Epithelzellen – präsekretorische Ameloblasten; ECSA = Vergleich Epithelzellen – sekretorische Ameloblasten.

Mithilfe von Tabelle 14 und

Abbildung 12 lassen sich verschiedene Aussagen über das Verhalten der Ameloblasten in der präsekretorischen und sekretorischen Phase ableiten. Zunächst ist bei allen im Vorfeld als für die regelhafte Schmelzbildung unabdingbar identifizierten Proteine des Netzwerkes ein Anstieg für beide Stadien der Ameloblasten zu verzeichnen und unterstreicht somit die Bedeutung der ausgewählten Gene in der Zahnreifung. Dieser Anstieg fällt für AMBN, AMELX, DSPP und ENAM mit einem \log_{FC} -Wert > 5 in der präsekretorischen Phase besonders deutlich aus. Im Falle von AMELY ist ein weniger ausgeprägter Anstieg zu beobachten. Bei allen zahnspezifischen Genen ist festzustellen, dass ihre Expression zur sekretorischen Phase wieder etwas abfällt, jedoch im deutlich positiven Be-

reich verbleibt. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass bis dorthin schon eine wirksame Menge der entsprechenden Proteine gebildet wurde und diese nun ihren extrazellulären Bestimmungsort bei gedrosselter Nachproduktion finden können. Der vergleichsweise geringe Anstieg der AMELY-Expression könnte durch seine im Vergleich zu AMELX untergeordnete Rolle erklärt werden – zum einen ist AMELY nur im Genom männlicher Probanden aufzuweisen, zum anderen nimmt AMELX bei der Entstehung gesunden Schmelzes vermutlich die dominierende Funktion ein.

Bei den anderen betrachteten Genen des GEO-Datensatzes fallen die Änderungen weniger deutlich aus. Gesteigerte Aktivität lässt sich bei ACVR1, CTNNB1, RUNX2, SHH und SOX9 feststellen, bei CCNE1, MTOR und TP53 werden für die Ameloblasten in beiden Reifestadien verringerte Werte verzeichnet. Im Falle von JNK zeigt sich für den präsekretorischen Ameloblasten ein geringfügiger Anstieg, in der sekretorischen Phase ist der Wert dann verringert.

4.6 Auswertung

Im Folgenden sollen nun eine Auswertung und Gegenüberstellung der Daten aus der Netzwerksimulation und jenen des GEO-Datensatzes erfolgen. Um dies zu erleichtern, ist in Tabelle 15 das Verhalten der beteiligten zentralen und zahnspezifischen Gene vereinfacht dargestellt.

Signalweg	Knoten	Netzwerksimulation		GEO Data Set	
		SS001	SS002/SS004	ECPA	ECSA
Apoptose	TP53	++	o	↘	↓
Cell Cycle	CCNE/CDK2 (CCNE1)	o	++	↓	↓
Hedgehog	SHH	o	o	↑	↑
MAPKinase	ERK1/2 (MAPK1)	++	++	↘	→
	JNK	++	++	→	→
mTor	mTORC1 (MTOR)	o	o	↓	↓
RUNX2	RUNX2	+	+	→	↑
SOX9	SOX9	++	++	→	→
TGFbeta	ACVR1(/BMPR2)	o	o	↗	↗
WNT	CTNNB1	o	o	↗	↗
zahnspez. Gene	AMBN	++	++	↑	↑
	AMELX	++	++	↑	↑
	AMELY	++	++	↑	↗
	DSPP	++	++	↑	↑
	ENAM	++	++	↑	↑

Tabelle 15: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Netzwerk-Simulation und der Werte aus dem GEO-Datensatz von Zhang et Zheng (2016).^[183] Die ausgewählten Gene sind ihren Signalwegen zugeordnet. Die Symbole repräsentieren das Verhalten der jeweiligen Gene in den Systemen: „++“ steht für eine hohe Aktivität ($>0,5$), „+“ für eine geringe Aktivität ($>0,01$), „o“ für eine Aktivität vernachlässigbarer Größe ($<0,01$). Den Pfeilsymbolen sind folgende Werte zuzuordnen: „↑“ $\logFC > 1$; „↗“ $\logFC 0,3-1$; „→“ $\logFC (-0,3) - 0,3$; „↘“ $\logFC (-0,3) - (-1)$; „↓“ $\logFC < (-1)$.

Zunächst soll hier jedoch nochmal auf die gegensätzlichen Verhaltensweisen der errechneten *healthy states* eingegangen werden. Während die starke Aktivität von TP53 in SS001 bei gleichzeitig verminderter Aktivität von CCNE/CDK2 für eine vermehrte Apoptose bei gedrosseltem Ablauf des Zellzyklus sprechen würde, zeigt SS002/SS004 für diese beiden Gene ein genau umgekehrtes Muster.

Bei diesen zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnissen ist zu bedenken, dass Ameloblasten im Gegensatz zu Odontoblasten vom Beginn ihrer Differenzierung bis zum Zahndurchbruch diverse phänotypische und funktionelle Stadien durchlaufen. Diese Komplexität der damit verbundenen intrazellulären Vorgänge erschwert die Analyse eines Genexpressionsprofils. Des Weiteren konnte im Tierversuch unter anderem nachgewiesen werden, dass etwa ein Viertel der Ameloblasten im Zuge dieser Übergangsphasen durch Apoptose zugrunde geht.^[190] Die apoptotischen Vorgänge während der Reifungsphase lassen sich jedoch mit den Ergebnissen der Simulation in Einklang bringen, bei der mit SS001 ebenfalls ein stabiler Zustand errechnet werden konnte, welcher apoptotische Vorgänge miteinschließt. Dies könnte also bedeuten, dass sowohl SS001 als auch SS002/SS004 in der Natur parallel innerhalb des gleichen Zelltypus vorkommende Verhaltensweisen widerspiegeln und SS001 damit jenen Anteil der Ameloblasten repräsentiert, der den kontrollierten Zelltod durchläuft.

Betrachtet man nun die Expressionsdaten des GEO-Datensatzes von Zhang *et al.* (2016) gegenüber den Daten der Simulation, lassen sich im Verhalten der einzelnen Gene einige Gemeinsamkeiten, jedoch auch Unterschiede feststellen.^[183]

Zunächst einmal zeigen sich wie erwartet in den Expressionsdaten analog zu den *healthy states* für alle fünf zahnspezifischen Gene stark erhöhte Werte. In den Expressionsdaten lassen sich außerdem drei zentrale Gene festmachen, deren Expressionsrate im Vergleich zur epithelialen Zelle in den (prä-)sekretorischen Ameloblasten signifikant abfällt: TP53, CCNE1 und MTOR. Dies würde für ein herunterreguliertes Abfließen der Signalwege Apoptose, Zellzyklus und mTor-Signalweg sprechen. Während Apoptose und Zellzyklus in SS001 und SS002/SS004 wie bereits erwähnt verschiedene starke Aktivitäten zeigen, ist die Aktivität des mTORC1-Knotens in allen *healthy states* sehr niedrig.

SOX9 sowie die MAP-Kinase-assoziierten Gene MAPK1 und JNK weisen im GEO-Datensatz keine ausgeprägte Veränderung ihres Expressionsverhaltens auf. Demgegenüber steht eine starke Aktivität der dazu äquivalenten Knoten SOX9, ERK1/2 und JNK im Netzwerk. An dieser Stelle sei jedoch noch einmal erwähnt, dass die Expressionsdaten des GEO-Datensatzes keine Absolutwerte darstellen, sondern nur die verhältnismäßige Ak-

tivität der Ameloblastenzellen gegenüber der als „Richtwert“ genutzten Epithelzelle dienen. Demnach könnte also eine bereits hohe Aktivität des MAP-Kinase-Signalweges in der Epithelzelle eine ebenfalls hohe Aktivität in den Ameloblasten verschleiern. Dieser Effekt gilt – auch in umgekehrter Form – selbstverständlich auch für alle anderen Expressionsdaten des Datensatzes.

Der Transkriptionsfaktor RUNX2 weist in der Netzwerksimulation eine moderate Aktivität auf, in den Expressionsdaten ist für die präsekretorische Phase ein leicht positiver, für die sekretorische Phase ein ausgeprägter Anstieg zu verzeichnen. RUNX2 ist ein maßgeblicher regulativer Faktor bei der Knochenbildung und steuert die Expression der Knochenmatrixproteine.^[191] Die vorgenannten Beobachtungen könnten daneben also ein Hinweis auf eine Rolle bei der Zahnentwicklung darstellen.

Die Aktivität des Hedgehog-Signalweges wird im Netzwerk wie im GEO-Datensatz durch SHH repräsentiert. Während bei den *healthy states* keine hohen Werte für diesen Knoten berechnet wurden, verzeichnet SHH im GEO-Datensatz den höchsten Anstieg aller zentralen Gene. Auch im Falle des TGF- β - und WNT-Signalweges stehen den niedrigen Werten der Knoten im Netzwerk ansteigende Aktivitäten der korrespondierenden Gene im Datensatz gegenüber.

5 Diskussion

5.1 Einordnung

Mit der vorliegenden Arbeit ist es – unter Berücksichtigung der zu erwähnenden Hürden – erstmalig gelungen, ein grundlegendes bioinformatisches Modell der humanen Schmelzreifung zu erstellen. Die Erarbeitung des genregulatorischen Netzwerkes mithilfe der Datenbanken, ausgewählter wissenschaftlicher Publikationen sowie durch die Validierung der resultierenden Netzwerke anhand des GEO-Datensatzes von Zhang *et* Zheng (2016) stellen ein Novum in der Zahnmedizin dar. Aufbauend darauf wird es in Zukunft durch weitere Hinzuziehung valider Daten möglich sein, ein zunehmend exakteres Abbild der intrazellulären Vorgänge bei der menschlichen Zahnbildung zu erschaffen.

Natürlich ist es nur zu einem gewissen Grad möglich, die Netzwerksimulation dafür zu nutzen, um aus ihr direkte Erkenntnisse für die realen Abläufe während der Schmelzbildung abzuleiten. Dies liegt zum einen daran, dass in Ermangelung weitergehender experimentalbiologischer Nachweise zum heutigen Zeitpunkt noch nicht davon ausgegangen werden kann, dass alle im Organismus stattfindenden Proteininteraktionen (und damit Verschaltungen der Knoten) nachgewiesen werden konnten. Zudem müssen einige Interaktionen, welche bereits im Tiermodell beobachtet werden konnten, noch für humane Zellen verifiziert werden. So konnte etwa, wie dargestellt, im Falle des Schmelzmatrixproteins Amelotin zum jetzigen Zeitpunkt die Eingliederung eines entsprechenden Knotens in das Netzwerk aufgrund mangelnder Anhaltspunkte durch wissenschaftliche Vorarbeiten noch nicht erreicht werden. Nachdem die erstmalige Implementierung zahnspezifischer Gene in ein tragbares Grundnetzwerk erfolgreich gestaltet werden konnte, können in einem nächsten Schritt die geschaffenen Interaktionen in Laborversuchen nachvollziehbar ergründet werden. Auf diese Weise können sich der bioinformatische und der empirische Ansatz gegenseitig Auftrieb geben.

Zu beachten ist, dass das genregulatorische Netzwerkes, so wie es in dieser Arbeit verwendet wird, keine externen Einflüsse auf die Zelle berücksichtigt: Während der

Schmelzreifung kommt es im menschlichen Körper zu einer ständigen äußeren Beeinflussung des Systems, beispielsweise durch interzelluläre Signale oder Umweltfaktoren. Das nun vorliegende genregulatorische Netzwerk ist gegen diese durch seine Abgeschlossenheit geschützt – das bedeutet einerseits zwar, dass das stabile Netzwerk nachvollziehbare Simulationen durchlaufen kann, es kann andererseits nicht ausgeschlossen werden, dass ein möglicherweise mitentscheidender Faktor der Schmelzreifung ausgeklammert wird. Dies ist jedoch ausdrücklich kein Nachteil des Netzwerkes. Im Gegenteil – kennt man die Ansatzpunkte exogener Faktoren auf die Proteine innerhalb der Zelle, kann man sie mit wenig Aufwand in das bestehende Netzwerk integrieren und durch einen erneuten Durchlauf der Simulation mit *Jimena* nach wenigen Minuten erfahren, wie sich das *Outcome* beispielsweise hinsichtlich der Entstehung stabiler Zustände verändert. Dies ist ein maßgeblicher Vorteil gegenüber dem Vorgehen im Labor, wo Versuchsreihen deutlich längere Arbeitszeiten erfordern. Auch hier gilt natürlich, dass ideale Ergebnisse in einer Zusammenarbeit zwischen beiden Forschungsbereichen zu erwarten sind: Durch „Vorsimulationen“ *in silico* können spätere Ergebnisse *in vitro* und *in vivo* besser prognostizierbar gemacht und umgekehrt Resultate aus dem Labor wiederum in das genregulatorische Netzwerk eingepflegt werden. Eine Kooperation dieser Art, hier zwischen den Lehrstühlen für Tissue Engineering und Bioinformatik der Universität Würzburg, konnte durch eine Arbeitsgruppe um Göttlich *et al.* (2018) bereits erfolgreich realisiert werden. Das in diesem Rahmen geschaffene *in-vitro*-Tumorgewebemodell in Kombination mit einem *in-silico*-Tool war in der Lage, die Vorhersage von Arzneimittelwirkungen und die Stratifikation von Patienten bei Lungenkrebs signifikant zu verbessern.^[192]

Die Forschung der letzten Jahre zeigt darüber hinaus in verschiedenen Feldern in vielfältiger Weise, dass durch die Analyse genregulatorischer Netzwerke entscheidende Erkenntnisse gewonnen werden können. Dies gilt beispielsweise für die Ergründung der Prozesse während des Zellwachstums oder auch der Untersuchung intrazellulärer Reaktionsmechanismen auf Umweltreize.^[193] Ihr potenzieller Nutzen geht aber weit darüber hinaus: Etwa die Möglichkeit, mithilfe der bioinformatischen Modelle „Minimalzustände“ zu definieren, also zu berechnen, welche Voraussetzungen (z. B. eine Menge an Ausgangsprodukten) ein Netzwerk benötigt, um eine gewisse „Ausbeute“ zu erzielen.

Diese Art von Optimierung wäre möglicherweise für die Agrarforschung im Bereich der Ertragssteigerung in der Ernte von Interesse.^[165,193,194] Ein weiteres Beispiel erfolgreicher Anwendung von Netzwerksimulationen zeigten Naseem *et al.* (2012). In ihrer Arbeit konnten auf Grundlage boolescher Netzwerke Vorhersagen über die molekularen Abwehrmechanismen von *Arabidopsis* gegenüber Pflanzenpathogenen (*Pseudomonas syringae*) getroffen werden.^[195] Stratmann *et al.* (2014) konnten erfolgreich Tumormodelle etablieren, in denen Netzwerke für gezielte Therapien nutzbar gemacht wurden (*targeted therapy*).^[196] Auch die über die dynamische Simulation genregulatorischer Netzwerke erreichbare Identifikation genutzter Stoffwechselwege, beispielsweise bestimmter Bakterien in Abgrenzung zum menschlichen Organismus, könnte dazu in der Lage sein, neue Anstöße bei der Produktion antibiotischer Medikamente zu geben, wie bereits Cecil *et al.* (2015) anhand multiresistenter Staphylokokken-Stämme zeigen konnten.^[197]

Um eine wissenschaftliche Wertschöpfung aus den Netzwerken zu ziehen, ist es unabdingbar, die Qualität der genregulatorischen Netzwerke zu maximieren. Dafür ist eine stetige Angleichung der implementierten Netzwerkelemente an experimentalbiologisch gewonnene Erkenntnisse erforderlich. Nur so kann erreicht werden, dass sich die Simulation nach und nach immer näher an die tatsächlichen zellulären Vorgänge angleicht. Durch diese, als *iterativ* bezeichnete Methodik kann die Wertigkeit des Netzwerkes immer weiter erhöht und der daraus ableitbare Erkenntnisgewinn gesteigert werden. *Ji-mena* bietet dem Benutzer hier das ideale Werkzeug, da es die Möglichkeit bietet, die Auswirkungen auch kleinerer Veränderungen im Netzwerk in kurzer Zeit darstellbar zu machen.^[165]

5.2 Medizinische Implikationen und zukünftige Entwicklung

Dentale Karies in bleibenden Zähnen gilt mit geschätzt rund 2,4 Milliarden Betroffenen als die meistverbreitete Krankheit weltweit.^[198] Die Prävalenz der hereditären Schmelzbildungsstörung Amelogenesis imperfecta wird mit bis zu 1:700 (Sundell *et al.*, 1985)

angegeben.^[199] Allein aus diesen Gründen ist es sinnvoll, sich sowohl mit der Morphogenese natürlicher Zahnhartsubstanz als auch mit der Prävention ihrer Schädigung und dem möglichen Ersatz von bereits verloren gegangenem Zahnmaterial zu beschäftigen. Während sich diese Arbeit insbesondere auf die Entstehung von Zahnhartsubstanz – speziell von Schmelz durch Ameloblasten – fokussiert, könnten durch ein tiefergreifendes Verständnis der Vorgänge, die der Zahnentwicklung zugrunde liegen, auch Erkenntnisse hervorgebracht werden, die dem Schutz angegriffener Zahnhartsubstanz im Mund eines Patienten dienen könnten.

Gerade im Hinblick auf die vorliegende Arbeit hervorzuheben sind die Erkenntnisse der Arbeitsgruppe von Järvinen *et al.* (2006), die die Genexpression von Mäuse-Incisivi untersuchte, welche ein Nager-typisches lebenslanges Wachstum aufweisen (Hypselodontie). In den Untersuchungen konnten Hinweise gefunden werden, dass eine Aktivierung des Wnt-/ β -Catenin-Signalweges zu einer gesteigerten Induktion des regenerativen Zahnwachstums führen könnte.^[200,201] Andere Studien bei Mäusen konnten außerdem zeigen, dass durch eine Herunterregulierung der Wnt-Signalkaskade etwa durch Überexpression des Inhibitors *Dkk1* oder Hemmung des Aktivators *Lef1* die Ausbildung von Zähnen schon in frühen Stadien unterbrochen wird.^[202,203] Diese und weitere Forschungsergebnisse legen die erhöhte Wichtigkeit einzelner Gene beziehungsweise Signalwege bei der Odontogenese nahe, wie sie im Rahmen eines Netzwerkes darstellbar und durch experimentelle Überprüfung nachweisbar gemacht werden können.

Bereits 2011 konnte durch eine Gruppe japanischer Wissenschaftler (Oshima *et al.* 2011) von der erfolgreichen Transplantation eines biotechnisch aus Stammzellen erzeugten Zahnes bei der Maus berichtet werden. Die Forscher trennten Zahnkeime in ihre epithelialen und mesenchymalen Bestandteile auf und fügten sie *in vitro* zusammen. Die gezüchteten Zahnkeime wurden zunächst in die subrenale Kapsel der Maus übertragen. Der dort entstehende Zahn wurde nach 60 Tagen in eine Extraktionsalveole der Maus transplantiert, woraufhin sich der Zahn funktionsfähig in das umgebende Gewebe integrierte.^[204] Ono *et al.* (2017) konnten ebenfalls erfolgreich funktionsfähiges Zahnge- webe etablieren, sie platzierten die nach gleicher Methode geschaffenen Zahnkeime di-

rekt in den Unterkieferknochen der Tiere.^[205] Der Vision eines vollständig funktionsfähigen und transplantierbaren menschlichen Zahnes „aus dem Labor“ ist auf diese Weise ein Stück näher gerückt worden; der Weg dahin ist aufgrund des komplexen Aufbau eines menschlichen Zahnes sowie des umgebenden Zahnhalteapparates und nicht zuletzt der medizinischen Risiken und des hohen technischen Aufwands eine mit heutigen Mitteln noch nicht zu bewerkstellende Aufgabe.^[206,207]

Neben dem Prinzip, Zähne völlig neu zu erschaffen, existieren weitere Ansätze, die die Stimulation von Regenerationsmechanismen am bereits vorhandenen Zahn versprechen. Neves *et al.* konnten 2017 in einer Studie zeigen, dass durch die Implantation von mit Tideglusib getränkten Kollagenschwämmen in Dentinkavitäten bei Mäusen selbstständig ein erneuter Verschluss des Loches mit neugebildetem Dentin nach sechs Wochen erreicht werden konnte.^[208] Bei Tideglusib handelt es sich um einen GSK-3-Antagonisten, der zunächst in mehreren Medikamentenversuchen in der Alzheimertherapie (Phase II) Anwendung gefunden hatte, dort jedoch keine signifikante Effekte aufweisen konnte.^[209–211] GSK-3 (Glykogensynthase-Kinase 3) selbst hemmt im Organismus regelmäßig durch seine Aktivität unter anderem den Ablauf des Wnt-Signalweges durch fortlaufende Phosphorylierung von β -Catenin.^[212,213]

Auch an diesen Beispielen lässt sich somit zeigen, dass die Erforschung der molekularen Grundlagen der Zahnentstehung und der beteiligten Proteine langfristig auf Möglichkeiten klinischer Therapien weisen können. Hier ist zu erwähnen, dass die ursprüngliche Zielsetzung der vorliegenden Dissertationsarbeit darin bestand, über eine bioinformatische Herangehensweise die strukturellen und molekularen Grundlagen der Zahnbildung des Menschen im Kontrast zur Zahnbildung der Haifische darzulegen. Angeregt wurde dieser Forschungsansatz durch die zeitgleich von Mercedes Hof am Institut für Bioinformatik durchgeführten Projekte zur Entwicklung der Haifische.^[214] Während der Mensch (durch den Ersatz des Milchgebisses im Kindesalter) nur einen Zahnwechsel durchläuft (*Diphyodontie*), bilden die als *polyphyodont* bezeichneten Haifische zeitlebens nachwachsende Zahngenerationen aus, wobei ausgefallene Zähne stetig durch entsprechende Nachfolger ersetzt werden können (ugs. „Revolvergebiss“).^[215,216]

Der Zielpunkt des Arbeitsansatzes lautete, herauszufinden, ob unter gewissen Umständen eine Übertragbarkeit des Regenerationspotenzials der Haifischzähne auf die menschliche Dentition zu erwarten sei. Die Erforschung der Odontogenese der Haifische und die damit verbundene Identifikation der für diese Art der Zahnbildung verantwortlichen genetischen Grundvoraussetzungen stecken jedoch noch in den Anfängen.^[217] Im Verlaufe einer vergleichenden Erarbeitung eines aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes der Zahnentwicklung des Menschen und der Haifische konnten wir außerdem feststellen, dass die molekulargenetischen und letztendlich morphologisch-strukturellen Unterschiede der Zähne zwischen den Spezies bedeutend sind. Obwohl sich das „Grundkonzept Zahn“ erfolgreich über die Jahrtausende der Evolution bewährt hat, hat die Spezialisierung des Kauorgans auf die Ansprüche seiner Anwender tiefe Spuren in deren genetischen Profil hinterlassen. Somit wurde von einer weiteren Vertiefung dieser Thematik zunächst abgesehen, da eine Betrachtung dieses grundsätzlich sehr interessanten Ansatzes zum heutigen Stand der Forschung noch nicht sinnvoll erschien.^[218]

Im Forschungsfeld der regenerativen Zahnheilkunde gibt es jedoch schon einige erfolgreiche Anwendungsbeispiele aus der Praxis zu berichten: In einer vielbeachteten Studie konnten Hammarström *et al.* 1997 nach langjährigen Forschungsarbeiten erstmals nachweisen, dass das externe Auftragen von Schmelzmatrixproteinen regenerative Auswirkungen auf dentales Gewebe haben kann.^[219,220] Das auf dieser Grundlage entwickelte Gel-Präparat Emdogain® (Fa. Straumann) findet bereits seit den 1990er Jahren im Rahmen der chirurgischen Parodontaltherapie erfolgreich Anwendung. Es enthält gereinigte und gefriergetrocknete Schmelzmatrixproteine (v. a. Amelogenin), die aus porkinen Schmelzorganen extrahiert werden und soll die Regeneration des Wurzelzements bei der Behandlung vertikaler Knochendefekte unterstützen.^[221,222] Die Wirksamkeit von Emdogain® bei entsprechender Indikation ist durch Studien belegt und seine Anwendung wird durch eine gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) empfohlen.^[222,223] Untersuchungen weisen in diesem Zusammenhang auf wundheilungsfördernde Effekte der enthaltenen Schmelzmatrixproteine infolge einer durch diese ausgelösten Stimulierung von Osteo-, Zemento- und Fibroblasten hin, wobei die genauen Mechanismen dahinter noch weiterer Forschung bedürfen.^[224–226]

Eine exaktere Identifizierung der an der Zahnentstehung beteiligten Gene könnte nicht zuletzt auch die Vorhersage und Zuordnung hereditärer Bildungsstörungen von Zahnhartsubstanz erleichtern. Die Ätiologie etwa der Amelogenesis imperfecta oder der Dentinogenesis imperfecta könnte genauer entschlüsselt werden, vor allem da bisherige Erkenntnisse ein vielfältiges Ursachenbild für die entsprechenden Fehlbildungen zeichnen (vgl. Tabelle 2, Kapitel 2.3.2.2). Auch bei der in den letzten Jahren immer häufiger auftretenden Molaren-Incisiven-Hypomineralisation (MIH), einer schwerwiegenden Störung der Zahnhartsubstanzbildung, wird zumindest eine genetische Prädisposition im Entstehungsprozess der vermutet.^[227,228] In der Zukunft wären solche Erkenntnisse außerdem auch im Hinblick auf mögliche Gentherapien von Bedeutung.

5.3 Fazit

Das im Rahmen dieser Arbeit erstellte genregulatorische Netzwerk kann naturgemäß nur eine Annäherung an die Komplexität der tatsächlichen zellulären Vorgänge hervorbringen. Dies liegt zum einen darin begründet, dass die Simulation vom gewählten Modellansatz her nur die Vorgänge innerhalb einer einzigen Zelle darstellen kann. Interaktionen mit direkten Zellnachbarn und extrazelluläre Signale durch Botenstoffe, sowie Umweltfaktoren und schwankende Nährstoffversorgung, wie sie im echten Organismus eine Rolle spielen, fanden im Modell (noch) keine Berücksichtigung.

Als wichtigster Beitrag der vorliegenden Arbeit ist in erster Linie anzusehen, dass es erstmalig überhaupt gelungen ist, ein genregulatorisches Netzwerk zu erschaffen, welches der Nachbildung der intrazellulären Vorgänge während der Zahnreifung dient. Als zentrale Schritte auf dem Weg der Netzwerkgenerierung stehen hier in erster Linie die Identifikation und Implementierung von AMELX, AMELY, AMBN, DSPP und ENAM. Die Konstruktion eines Netzwerkes, die Herleitung von Interaktionspartnern für diese fünf zahnspezifischen Proteine und die damit ermöglichte Simulation der Bildung von Zahnhartsubstanz konnten somit nachvollziehbar realisiert werden.

Die Entschlüsselung der zugrundeliegenden Signalkaskaden und der direkt oder indirekt beteiligten Interaktionspartner ist die essentielle Voraussetzung jedweder therapeutischen Strategien. Es ist wünschenswert, dass die Herausarbeitung dieser fünf Gene als Grundpfeiler der Zahnhartsubstanzbildung dazu beitragen kann, solche therapeutischen Strategien erfolgreich zu entwickeln.

Es konnten in der Simulation des Netzwerkes sechs stabile Zustände identifiziert werden, von denen drei aktivierte Zustände für die Bildung von Zahnhartsubstanz darstellen. Bei der Gegenüberstellung des Verhaltens der Netzwerkknoten der errechneten *healthy states* mit den Genaktivitäten des einzigen zurzeit zur Amelogenese verfügbaren GEO-Datensatzes von Zhang *et* Zheng (2016) beschränken sich die Übereinstimmungen vor allem auf die zahnspezifischen Gene. Das Ziel einer Erweiterung des Netzwerkes muss sein, dass die simulierten Zustände auch weitere komplexe Prozesse in der Zelle noch besser nachbilden können, wie Differenzierung, Apoptose oder metabolische Zustände.

Um ein tiefer greifendes Verständnis der intrazellulären Vorgänge bei der Entstehung von Zahnhartsubstanz zu erreichen, sind dabei in jedem Falle solide wissenschaftliche Daten wichtig. Dies schließt nicht nur die Interaktionen bereits bekannter Moleküle und Transkriptionsfaktoren mit ein, sondern erfordert auch das Aufspüren und die Einordnung bisher wenig erforschter beteiligter Gene. Beispielsweise sind im Falle von ODAM und FAM20C regulatorische Funktionen bei der Schmelzbildung bekannt, über deren genaue Rolle aber kann bisher nur spekuliert werden.^[134,229]

Auch wenn noch nicht alle Komponenten der Zahnentwicklung Berücksichtigung im Modell finden können, bietet diese Arbeit dabei einen Ansatzpunkt, sich erstmals mittels eines bioinformatischen Ansatzes den molekularen Vorgängen während der menschlichen Odontogenese anzunähern. Somit ist dies ein weiterer Schritt zur Ergründung der hochkomplexen menschlichen Entwicklungsbiologie mithilfe eines genregulatorischen Netzwerkes.

Mehr Daten aus der experimentellen Biologie bilden dabei der Grundstein für die Erstellung komplexerer (und damit qualitativ hochwertiger) genregulatorischer Netzwerke. Nur durch ein enges kooperatives Wechselspiel zwischen bioinformatischer Simulation

und empirischem Nachweis im Labor können Synergien entstehen, die im Ergebnis beiden Seiten nützen – zu Netzwerken, die zunehmend präzise die zelluläre Wirklichkeit wiedergeben können.

Hierbei bietet nicht nur das Gebiet der Zahnentwicklung noch großes Forschungspotenzial – die Fortschritte, die in diesem Bereich in den letzten Jahren gemacht wurden, lassen darauf hoffen, dass mithilfe bereits gewonnener und zukünftiger Erkenntnisse die Möglichkeiten (zahn-)medizinischer Behandlungsstrategien umfassend erweitert werden können.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Histologisches Schnittpräparat eines fetalen Ratten-Incisivus, Kronenstadium (HE-Färbung). Legende: A – Mundhöhle; B – Mundhöhlenepithel; C – Knochen; D – Schmelzorgan; E – Zahnschmelz; F – Dentin; G – (frühe) Pulpa; H – skelettaler Muskel. Die im Bereich des Rechtecks befindlichen Strukturen werden in Abbildung 2 genauer betrachtet.^[57] 13
- Abbildung 2: Vergrößerter Ausschnitt eines histologischen Präparates entsprechend des rechteckigen Abschnittes in Abbildung 1. Legende: A – stratum reticulare; B – stratum intermedium; C – Ameloblasten; D – Zahnschmelz; E – Dentin; F – Odontoblasten; G – (frühe) Pulpa.^[57,58] Histologisches Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung durch D. W. Vaughan, PhD, *Boston University School of Medicine*.^[59] 13
- Abbildung 3: Schematische Darstellung eines booleschen Baumes (nach Karl *et Dandekar*, 2013).^[7] 29
- Abbildung 4: Ausschnitte des MAP-Kinase-Weges (A) sowie Wnt-Signalweges (B) aus der KEGG Database. Die Verbindung von Rac zu JNK (rot markiert) ist in beiden Signalwegen vorhanden, jedoch im Wnt-Signalweg nur verkürzt aufgeführt. Um Komplikationen bei der Erstellung des Stammbaumnetzwerkes im Zuge der Zusammenführung der Netzwerke zu vermeiden, wird bei der endgültigen Version die Verbindung zwischen Rac und JNK im Wnt-Signalweg gekappt, da sie durch die (ausführlichere) Verbindung im MAP-Kinase-Weg erhalten bleibt.^[9] 35
- Abbildung 5: Ausschnitt des Apoptose-Signalweges aus der KEGG Database.^[9] Die „hemmenden“ Verknüpfungen zu den beteiligten Genen in Richtung jener der Apoptose vorgeschalteten Knoten wurden für das Netzwerk als „aktivierende“ Interaktion auf den Knoten „apoptosis“ übertragen. Im endgültigen Netzwerk sind die Caspasen außerdem unter dem Knoten CASPs zusammengeführt. Die in der Grafik gezeigten Verknüpfungen stellen sich im endgültigen Netzwerk also als [CASPs] - [activation] - [apoptosis] dar. 36
- Abbildung 6: Schematische Darstellung aktivierender und hemmender Interaktionen zwischen zwei Knoten. Der grüne Pfeil steht für eine aktivierende Wirkung von Knoten 1 auf Knoten 2, der rote Pfeil markiert eine hemmende Wirkung von Knoten 3 auf Knoten 4. 37
- Abbildung 7: Wnt-Signalweg nach primärer Entfernung nicht relevanter Knoten und Interaktionen. Der vollständige, ursprüngliche Signalweg ist der KEGG-Datenbank zu entnehmen (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).^[9] Weitere Reduktionen erfolgten nach Abgleich mit den anderen Netzwerken und insbesondere nach der Zusammenführung der Knoten zum Gesamtnetzwerk. 38
- Abbildung 8: Implementierung in das Grundnetzwerk, Möglichkeit 1 – der Transkriptionsfaktor, welcher die Verknüpfung zum zahnspezifischen Protein ermöglicht, ist bereits Bestandteil des ursprünglichen Netzwerkes.

Somit muss nur das zahnspezifische Gen selbst entsprechend integriert werden.	51
Abbildung 9: Implementierung in das Grundnetzwerk, Möglichkeit 2 – der Transkriptionsfaktor, welcher die Verknüpfung zum zahnspezifischen Protein ermöglicht, ist nicht direkter Bestandteil des ursprünglichen Netzwerkes. Er interagiert jedoch wiederum mit einem Protein X des Netzwerkes, was eine Verknüpfung des zahnspezifischen Proteins möglich macht.	52
Abbildung 10: Das genregulatorische Netzwerk der Odontogenese in der Gesamtübersicht. Die Knoten der zahnspezifischen Proteine sind gelb, die Knoten der zentralen Gene rot markiert. Grüne Verbindungspfeile repräsentieren eine Aktivierung in Pfeilrichtung, rote Verbindungspfeile eine entsprechende Hemmung.	56
Abbildung 11: Heatmap zur Darstellung der sechs <i>stable states</i> und der jeweiligen Aktivität ausgewählter Gene. Der Farbskala rechts ist das Aktivitätsniveau des jeweiligen Gens abzuleiten, wobei grüne und gelbe Felder für ein hohes bzw. sehr hohes Aktivitätsniveau stehen. Bei SS001, SS002 und SS004 handelt es sich demnach um <i>healthy states</i>	58
Abbildung 12: Heatmap zur Darstellung der Genaktivität der zahnspezifischen Gene und der zentralen Gene. Werte >1 und <-1 wurden zur besseren Übersicht auf die Werte 1 bzw. -1 nivelliert. ECPA = Vergleich Epithelzellen – präsekretorische Ameloblasten; ECSA = Vergleich Epithelzellen – sekretorische Ameloblasten.	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl der für die Ausbildung von Zahnhartsubstanz zuständigen Gene, mit Genprodukt und der ontologischen Klasse (nach: AmiGo 2, 27.07.2017). ^[65] Im Deutschen gebräuchliche Genprodukt-Bezeichnungen wurden entsprechend eingesetzt.	17
Tabelle 2: Tabellarische Auflistung solcher Gene, bei denen im Falle einer Genmutation pathologische Veränderungen der Zahnhartsubstanz nachweisbar sind. Die Namen der Genprodukte sind den genannten Quellen oder UniProt.org entnommen. ^[67–91]	19
Tabelle 3: Grundlegende Systeminformationen des verwendeten PCs.....	32
Tabelle 4: Interaktionsliste des vereinfachten Wnt-Signalweges in Abbildung 7. Der ersten Spalte („ <i>node 1</i> “) ist das jeweils vorgeschaltete Gen zu entnehmen, die dritte Spalte gibt das von diesem Gen bzw. dessen Genprodukt angesteuerte Ziel an. Spalte 2 („ <i>interaction</i> “) gibt Auskunft, ob es sich um eine Aktivierung (<i>activation</i>) oder Hemmung (<i>inhibition</i>) handelt.	39
Tabelle 5: Beispielhafter Ausschnitt aus der Interaktionsliste des Gesamtnetzwerkes. Ist die jeweilige Interaktion der KEGG-Datenbank und damit einem oder mehrerer ihrer Signalwege entnommen, ist die Quellenangabe orange unterlegt, externe Quellen sind blau unterlegt.	40
Tabelle 6: Kategorisierungsschema der Transkriptionsfaktoren. Die Werte in Klammern besagen, dass, falls einer der beiden Werte 1/-1 über- bzw. unterschreitet, auch eine Über- bzw. Unterschreitung von 0.6/-0.6 eine entsprechende Einordnung in die zugeordnete Kategorie zulässt, um eine größere Zahl an Genen in eine der Kategorien einordnen zu können.	49
Tabelle 7: Zahnspezifische Gene (gelb) und potenziell assoziierte Transkriptionsfaktoren (TF), bei denen eine Interaktion vermutet werden kann. Zugeordnet findet sich jeweils die aus den Expressionsdaten abgeleitete Art der Interaktion (siehe Tabelle 6). Werte > 1 sind grün markiert, Werte < -1 rot. Transkriptionsfaktoren, deren experimentelle Grundlage der Enrichr-Daten durch Versuche an Mäusen erstellt wurden, sind blau markiert (Zugriff Enrichr: 13.07.2017).....	50
Tabelle 8: Transkriptionsfaktor–Zielgen–Interaktionen, die direkt aus den Enrichr-Datenbanken und dem Grundnetzwerk ableitbar sind (Zugriff Enrichr: 13.07.2017).....	52
Tabelle 9: Der Transkriptionsfaktor ETS1 wird durch ERK1/2 aktiviert und aktiviert wiederum AMBN (Zugriff Enrichr: 13.07.2017).....	53
Tabelle 10: Die miteinander im Gesamtnetzwerk über ihre Interaktionen assoziierten Transkriptionsfaktoren und zahnspezifischen Zielgene mit Zuordnung der entsprechenden Datenbank. Zur erleichterten Zuordnung sind den Zielgenen und Transkriptionsfaktoren noch ihre jeweiligen <i>Uniprot</i> -Identifikationsnummern angefügt (Zugriff Enrichr: 13.07.2017). ^[174,178–181]	53

Tabelle 11: Zentrale Gene der einzelnen Signalkaskaden und der Wert ihrer *dynamic centrality*. Die Bezeichnungen der Gene im Netzwerk stimmen nicht immer vollständig mit jenen im GEO-Datensatz überein, daher wird zusätzlich das jeweilige Äquivalent aufgeführt..... 55

Tabelle 12: Die sechs stabilen Zustände des Netzwerkes, berechnet durch Jimena (t = 1000 s). Zur besseren Übersicht sind nur die Werte der zahnspezifischen Gene sowie der zentralen Gene aufgeführt. Alle Werte liegen zwischen 0 und 1, hohe Werte repräsentieren entsprechend hohe Aktivitätsniveaus. 57

Tabelle 13: Gegenüberstellung derjenigen Knoten, bei denen innerhalb von SS002 und SS004 maßgebliche Unterschiede bestehen. Sämtliche Knoten spielen ausschließlich innerhalb des Zellzyklus eine Rolle und weisen niedrige *centrality*-Werte auf..... 59

Tabelle 14: Ausgewählte Gene des GEO-Datensatzes von Zhang et Zheng (2016).^[183] Ein Wert von 0 würde bedeuten, dass im Vergleich zur epithelialen Zelle keine Veränderung der Genexpression des entsprechenden Genes stattgefunden hätte. Negative Werte bedeuten eine verringerte Expression, positive Werte repräsentieren einen Anstieg. 62

Tabelle 15: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Netzwerk-Simulation und der Werte aus dem GEO-Datensatz von Zhang et Zheng (2016).^[183] Die ausgewählten Gene sind ihren Signalwegen zugeordnet. Die Symbole repräsentieren das Verhalten der jeweiligen Gene in den Systemen: „++“ steht für eine hohe Aktivität (>0,5), „+“ für eine geringe Aktivität (>0,01), „o“ für eine Aktivität vernachlässigbarer Größe (<0,01). Den Pfeilsymbolen sind folgende Werte zuzuordnen: „↑“ $\logFC > 1$; „↗“ $\logFC 0,3-1$; „→“ $\logFC (-0,3) - 0,3$; „↘“ $\logFC (-0,3) - (-1)$; „↓“ $\logFC < (-1)$ 65



Literaturverzeichnis

1. Cobourne, M.T. The Genetic Control of Early Odontogenesis. *British Journal of Orthodontics* Taylor & Francis: 1999, 26(1), 21–28 10.1093/ortho/26.1.21.
2. Lacruz, R.S.; Habelitz, S.; Wright, J.T.; Paine, M.L. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiological Reviews* 2017, 97(3), 939–993 10.1152/physrev.00030.2016.
3. Aumüller, G.; Aust, G.; Conrad, A.; Engele, J.; Kirsch, J. *Duale Reihe Anatomie*; A. Bob, K. Bob, Eds.; 3rd ed. Thieme: Stuttgart, 2014, 10.1055/b-0034-100799.
4. Currey, J.D. *Bones: Structure and Mechanics*; Princeton University Press: 2013.
5. Radlanski, R.J. *Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie*; R.J. Radlanski, Ed.; 1st ed. Quintessenz-Verlag: Berlin, 2011.
6. Smith, M.M.; Coates, M.I. Evolutionary origins of the vertebrate dentition: phylogenetic patterns and developmental evolution. *European journal of oral sciences* 1998, 106 Suppl, 482–500.
7. Karl, S.; Dandekar, T. Jimena: efficient computing and system state identification for genetic regulatory networks. *BMC bioinformatics* BioMed Central: 2013, 14, 306 10.1186/1471-2105-14-306.
8. Karl, S.; Dandekar, T.; Lemke, N.; Cao, X.; Clemens, T.L. Convergence behaviour and Control in Non-Linear Biological Networks. *Scientific Reports* Nature Publishing Group: 2015, 5(1), 9746 10.1038/srep09746.
9. Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M.; Sato, Y.; Morishima, K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research* 2017, 45(D1), D353–D361 10.1093/nar/gkw1092.
10. Heinrich, P.C.; Löffler, G. *Biochemie und Pathobiochemie*; Springer Berlin Heidelberg: 2014.
11. *Cell Signaling Technology*; Robert A. Weinberg *CST Guide: Pathways & Protocols*; 1st ed. Cell Signaling Technology: Danvers, 2015.
12. Erwig, L.-P.; Henson, P.M. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation* Nature Publishing Group: 2008, 15(2), 243–250 10.1038/sj.cdd.4402184.
13. Hartwell, Leland H., and M.B.K. Cell Cycle Control and Cancer. *Science*, no. 5192 1994, 266, 1821–1828.
14. Zugasti, O.; Rajan, J.; Kuwabara, P.E. The function and expansion of the Patched- and Hedgehog-related homologs in *C. elegans*. *Genome research* Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2005, 15(10), 1402–10 10.1101/gr.3935405.
15. Briscoe, J.; Théron, P.P. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013, 14(7), 418–431 10.1038/nrm3598.
16. Teperino, R.; Amann, S.; Bayer, M.; McGee, S.L.; Loipetzberger, A.; Connor, T.; et

- al. Hedgehog Partial Agonism Drives Warburg-like Metabolism in Muscle and Brown Fat. *Cell* 2012, 151(2), 414–426 10.1016/j.cell.2012.09.021.
17. McMahon, A.P.; Ingham, P.W.; Tabin, C.J. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Current topics in developmental biology* 2003, 53, 1–114.
 18. Cargnello, M.; Roux, P.P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR American Society for Microbiology (ASM)*: 2011, 75(1), 50–83 10.1128/MMBR.00031-10.
 19. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular biology of the cell*; Garland Science: 2002.
 20. Cobb, M.H. MAP kinase pathways. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 1999, 71(3–4), 479–500 10.1016/S0079-6107(98)00056-X.
 21. Harris, T.E.; Lawrence, J.C. TOR Signaling. *Science Signaling* 2003, 2003(212).
 22. Lamming, D.W.; Ye, L.; Sabatini, D.M.; Baur, J.A. Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics. *The Journal of clinical investigation American Society for Clinical Investigation*: 2013, 123(3), 980–9 10.1172/JCI64099.
 23. Zarogoulidis, P.; Lampaki, S.; Turner, J.F.; Huang, H.; Kakolyris, S.; Syrigos, K.; et al. mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review (Review). *Oncology letters Spandidos Publications*: 2014, 8(6), 2367–2370 10.3892/ol.2014.2608.
 24. Gangloff, Y.-G.; Mueller, M.; Dann, S.G.; Svoboda, P.; Sticker, M.; Spetz, J.-F.; et al. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Molecular and cellular biology American Society for Microbiology*: 2004, 24(21), 9508–16 10.1128/MCB.24.21.9508-9516.2004.
 25. Loewith, R.; Jacinto, E.; Wullschleger, S.; Lorberg, A.; Crespo, J.L.; Bonenfant, D.; et al. Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Molecular Cell* 2002, 10(3), 457–468 10.1016/S1097-2765(02)00636-6.
 26. Schreiber, K.H.; Ortiz, D.; Academia, E.C.; Anies, A.C.; Liao, C.-Y.; Kennedy, B.K. Rapamycin-mediated mTORC2 inhibition is determined by the relative expression of FK506-binding proteins. *Aging cell Wiley-Blackwell*: 2015, 14(2), 265–73 10.1111/accel.12313.
 27. Yuan, X.; Wu, H.; Xu, H.; Xiong, H.; Chu, Q.; Yu, S.; et al. Notch signaling: An emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Letters* 2015, 369(1), 20–27 10.1016/j.canlet.2015.07.048.
 28. Ranganathan, P.; Weaver, K.L.; Capobianco, A.J. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nature Reviews Cancer Nature Publishing Group*: 2011, 11(5), 338–351 10.1038/nrc3035.
 29. Capaccione, K.M.; Pine, S.R. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis* 2013, 34(7), 1420–1430 10.1093/carcin/bgt127.

30. Niessen, K.; Fu, Y.; Chang, L.; Hoodless, P.A.; McFadden, D.; Karsan, A. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *The Journal of Cell Biology* 2008, 182(2), 315–325 10.1083/jcb.200710067.
31. Miyazawa, K.; Shinozaki, M.; Hara, T.; Furuya, T.; Miyazono, K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes to Cells* Blackwell Science Ltd: 2002, 7(12), 1191–1204 10.1046/j.1365-2443.2002.00599.x.
32. Yokoyama-Kobayashi, M.; Saeki, M.; Sekine, S.; Kato, S. Human cDNA Encoding a Novel TGF-beta Superfamily Protein Highly Expressed in Placental. *J. Biochem* 1997, 122, 622–626.
33. Adamska, M.; Degnan, S.M.; Green, K.M.; Adamski, M.; Craigie, A.; Larroux, C.; et al. Wnt and TGF-beta expression in the sponge *Amphimedon queenslandica* and the origin of metazoan embryonic patterning. *PloS one Public Library of Science*: 2007, 2(10), e1031 10.1371/journal.pone.0001031.
34. Kanehisa, M. KEGG PATHWAY: TGF-beta signaling pathway - Homo sapiens (human). 2014, 1 papers3://publication/uuid/B7B0746A-7417-4E98-8564-1B21CF6C63E5 [Jul 25 2017].
35. Heldin, C.-H.; Miyazono, K.; ten Dijke, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997, 390(6659), 465–471 10.1038/37284.
36. Miyaki, M.; Kuroki, T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, 306(4), 799–804 10.1016/S0006-291X(03)01066-0.
37. Ganten, D.; Aretz, S. *Grundlagen der Molekularen Medizin*; D. Ganten, K. Ruckpaul, Eds.; 3., überar Springer: Heidelberg, 2008, 10.1007/978-3-540-69414-4.
38. Komiya, Y.; Habas, R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* Taylor & Francis: 2008, 4(2), 68–75.
39. Clevers, H.; Loh, K.M.; Nusse, R. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 2014, 346(6205).
40. Loh, K.M.; Van Amerongen, R.E.; Nusse, R. *Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals*. 2016, 10.1016/j.devcel.2016.08.011.
41. Doenecke, D.; Koolman, J.; Fuchs, G.; Gerok, W. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*; 3rd ed. Thieme: 2005, 10.1186/bcr2577.
42. Kohn, A.D.; Moon, R.T. Wnt and calcium signaling: beta-Catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 2005, 38(3–4), 439–446 10.1016/j.ceca.2005.06.022.
43. De, A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2011, 43(10), 745–756 10.1093/abbs/gmr079.
44. Robeva, R.; Hodge, T. *Mathematical Concepts and Methods in Modern Biology*; Elsevier Science: 2013, 10.1016/B978-0-12-415780-4.00001-6.

45. Macneil, L.T.; Walhout, A.J.M. Gene regulatory networks and the role of robustness and stochasticity in the control of gene expression. *Genome research* Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2011, 21(5), 645–57 10.1101/gr.097378.109.
46. Hecker, M.; Lambeck, S.; Toepfer, S.; van Someren, E.; Guthke, R. Gene regulatory network inference: Data integration in dynamic models—A review. *Biosystems* 2009, 96(1), 86–103 10.1016/j.biosystems.2008.12.004.
47. Bernot, G.; Comet, J.-P.; Richard, A.; Chaves, M.; Gouzé, J.-L.; Dayan, F. Modeling and Analysis of Gene Regulatory Networks. In *Modeling in Computational Biology and Biomedicine*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013, 47–80 10.1007/978-3-642-31208-3_2.
48. Reitemeier, B. Einführung in die Zahnmedizin; B. Reitemeier, N. Schwenzer, M. Ehrenfeld, Eds.; 1st ed. Thieme: Stuttgart New York, 2006.
49. Lawn, B.R.; Lee, J.J.-W.; Chai, H. Teeth: Among Nature’s Most Durable Biocomposites. *Annual Review of Materials Research* Annual Reviews : 2010, 40(1), 55–75 10.1146/annurev-matsci-070909-104537.
50. Hertwig, O. Die Elemente der Entwicklungslehre des Menschen und der Wirbeltiere: Anleitung und Repetitorium für Studierende und Ärzte; G. Fischer: Jena, 1915.
51. Gängler, P.; Hoffmann, T.; Willershausen, B.; Schwenzer, N.; Ehrenfeld, M. Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie; M. Ehrenfeld, P. Gängler, T. Hoffmann, N. Schwenzer, B. Willershausen, Eds.; 3rd ed. Georg Thieme Verlag: 2010.
52. Ulfig, N. Kurzlehrbuch Embryologie 9 Tabellen; N. Ulfig, Ed.; 2nd ed. Thieme: Stuttgart New York, 2009.
53. Lüllmann-Rauch, R. Taschenlehrbuch Histologie; 3rd ed. Thieme: 2012, 10.1055/b-002-11371.
54. Thesleff, I.; Tummers, M. Tooth organogenesis and regeneration; Harvard Stem Cell Institute: 2008, 10.3824/STEMBOOK.1.37.1.
55. Schumacher, G.H.; Schmidt, H.; Richter, W. Anatomie und Biochemie Der Zähne; H. Schmidt, Ed.; 3rd ed. G. Fischer: Stuttgart New York, 1983.
56. Schwarzbach, H.; Stachniss, V.; Steiniger, B. Mikroskopische Anatomie der Zähne und des Parodonts; B. Steiniger, H. Schwarzbach, V. Stachniss, Eds.; 1st ed. Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 2010.
57. Knoche, H. Lehrbuch der Histologie : Cytologie Histologie Mikroskopische Anatomie; Springer Berlin Heidelberg: 1979.
58. Klimm, W.; Gäbler, S. Endodontologie : Grundlagen und Praxis; Dt. Zahnärzte-Verl. DÄV: 2003.
59. Vaughan, D.W. A learning system in histology : CD-ROM and guide; Oxford University Press: 2002.

60. He, P.; Zhang, Y.; Kim, S.O.; Radlanski, R.J.; Butcher, K.; Schneider, R.A.; et al. Ameloblast differentiation in the human developing tooth: effects of extracellular matrices. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology NIH Public Access*: 2010, 29(5), 411–9 10.1016/j.matbio.2010.03.001.
61. Sasaki, T. Tracer, cytochemical, and freeze-fracture study on the mechanisms whereby secretory ameloblasts absorb exogenous proteins. *Acta anatomica* 1984, 118(1), 23–33.
62. Glick, P.L. Patterns of Enamel Maturation. *J Dent Res* 1979, 58, 883–892.
63. Consortium, T.G.O. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Research Riva del Garda, Italy*: 2015, 43(D1), D1049–D1056 10.1093/nar/gku1179.
64. Ashburner, M.; Ball, C.A.; Blake, J.A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J.M.; et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics Nature Publishing Group*: 2000, 25(1), 25–29 10.1038/75556.
65. Carbon, S.; Ireland, A.; Mungall, C.J.; Shu, S.; Marshall, B.; Lewis, S. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE* 2009, 25(2), 288–289 10.1093/bioinformatics/btn615.
66. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, M. Online Mendelian Inheritance in Man. 2018, <https://omim.org/> [Sep 5 2018].
67. Seymen, F.; Kim, Y.J.; Lee, Y.J.; Kang, J.; Kim, T.-H.; Choi, H.; et al. Recessive Mutations in ACPT, Encoding Testicular Acid Phosphatase, Cause Hypoplastic Amelogenesis Imperfecta; 2016, 10.1016/j.ajhg.2016.09.018.
68. MacDougall, M.; DuPont, B.R.; Simmons, D.; Reus, B.; Krebsbach, P.; Kärrman, C.; et al. Ameloblastin Gene (AMBN) Maps within the Critical Region for Autosomal Dominant Amelogenesis Imperfecta at Chromosome 4q21; 1997, 10.1006/geno.1997.4643.
69. Poulter, J.A.; Murillo, G.; Brookes, S.J.; Smith, C.E.L.; Parry, D.A.; Silva, S.; et al. Deletion of ameloblastin exon 6 is associated with amelogenesis imperfecta. *Human molecular genetics Oxford University Press*: 2014, 23(20), 5317–24 10.1093/hmg/ddu247.
70. Lagerström, M.; Dahl, N.; Nakahori, Y.; Nakagome, Y.; Bäckman, B.; Landegren, U.; et al. A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics* 1991, 10(4), 971–5.
71. Hu, J.C.-C.; Chan, H.-C.; Simmer, S.G.; Seymen, F.; Richardson, A.S.; Hu, Y.; et al. Amelogenesis imperfecta in two families with defined AMELX deletions in ARHGAP6. *PLoS one Public Library of Science*: 2012, 7(12), e52052 10.1371/journal.pone.0052052.
72. Iwasaki, K.; Bajenova, E.; Somogyi-Ganss, E.; Miller, M.; Nguyen, V.; Nourkeyhani, H.; et al. Amelotin - a Novel Secreted, Ameloblast-specific Protein. *Journal of Dental Research SAGE Publications*: 2005, 84(12), 1127–1132

- 10.1177/154405910508401207.
73. Smith, C.E.L.; Murillo, G.; Brookes, S.J.; Poulter, J.A.; Silva, S.; Kirkham, J.; et al. Deletion of amelotin exons 3–6 is associated with amelogenesis imperfecta. *Human Molecular Genetics* 2016, 25(16), 3578–3587 10.1093/hmg/ddw203.
74. Parry, D.A.; Brookes, S.J.; Logan, C. V; Poulter, J.A.; El-Sayed, W.; Al-Bahlani, S.; et al. Mutations in C4orf26, encoding a peptide with in vitro hydroxyapatite crystal nucleation and growth activity, cause amelogenesis imperfecta. *American journal of human genetics Elsevier*: 2012, 91(3), 565–71 10.1016/j.ajhg.2012.07.020.
75. Price, J.A.; Bowden, D.W.; Wright, J.T.; Pettenati, M.J.; Hart, T.C. Identification of a mutation in DLX3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. *Human molecular genetics* 1998, 7(3), 563–9.
76. Xiao, S.; Yu, C.; Chou, X.; Yuan, W.; Wang, Y.; Bu, L.; et al. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nature Genetics* 2001, 27(2), 201–204 10.1038/84848.
77. Zhang, X.; Zhao, J.; Li, C.; Gao, S.; Qiu, C.; Liu, P.; et al. DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. *Nature Genetics* 2001, 27(2), 151–152 10.1038/84765.
78. Li, F.; Liu, Y.; Liu, H.; Yang, J.; Zhang, F.; Feng, H. Phenotype and genotype analyses in seven families with dentinogenesis imperfecta or dentin dysplasia. *Oral Diseases* 2017, 23(3), 360–366 10.1111/odi.12621.
79. Mårdh, C.K.; Bäckman, B.; Holmgren, G.; Hu, J.C.-C.; Simmer, J.P.; Forsman-Semb, K. A nonsense mutation in the enamelin gene causes local hypoplastic autosomal dominant amelogenesis imperfecta (AIH2). *Human molecular genetics* 2002, 11(9), 1069–74.
80. Hart, T.C.; Hart, P.S.; Gorry, M.C.; Michalec, M.D.; Ryu, O.H.; Uygur, C.; et al. Novel ENAM mutation responsible for autosomal recessive amelogenesis imperfecta and localised enamel defects. *Journal of medical genetics* 2003, 40(12), 900–6.
81. Rajpar, M.H.; Harley, K.; Laing, C.; Davies, R.M.; Dixon, M.J. Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Human Molecular Genetics Oxford University Press*: 2001, 10(16), 1673–1677 10.1093/hmg/10.16.1673.
82. Kim, J.-W.; Lee, S.-K.; Lee, Z.H.; Park, J.-C.; Lee, K.-E.; Lee, M.-H.; et al. FAM83H Mutations in Families with Autosomal-Dominant Hypocalcified Amelogenesis Imperfecta; 2008, 10.1016/j.ajhg.2007.09.020.
83. Wang, S.-K.; Hu, Y.; Yang, J.; Smith, C.E.; Richardson, A.S.; Yamakoshi, Y.; et al. *Fam83h* null mice support a neomorphic mechanism for human ADHCAI. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2016, 4(1), 46–67 10.1002/mgg3.178.
84. Parry, D.A.; Smith, C.E.L.; El-Sayed, W.; Poulter, J.A.; Shore, R.C.; Logan, C. V; et al. Mutations in the pH-Sensing G-protein-Coupled Receptor GPR68 Cause Amelogenesis Imperfecta. *American journal of human genetics Elsevier*: 2016, 99(4), 984–990 10.1016/j.ajhg.2016.08.020.

85. Poulter, J.A.; Brookes, S.J.; Shore, R.C.; Smith, C.E.L.; Abi Farraj, L.; Kirkham, J.; et al. A missense mutation in ITGB6 causes pitted hypomineralized amelogenesis imperfecta. *Human Molecular Genetics* 2014, 23(8), 2189–2197 10.1093/hmg/ddt616.
86. Hart, P.S.; Hart, T.C.; Michalec, M.D.; Ryu, O.H.; Simmons, D.; Hong, S.; et al. Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *Journal of medical genetics* 2004, 41(7), 545–9 10.1136/jmg.2003.017657.
87. Poulter, J.A.; El-Sayed, W.; Shore, R.C.; Kirkham, J.; Inglehearn, C.F.; Mighell, A.J. Whole-exome sequencing, without prior linkage, identifies a mutation in LAMB3 as a cause of dominant hypoplastic amelogenesis imperfecta. *European Journal of Human Genetics* 2014, 22(1), 132–135 10.1038/ejhg.2013.76.
88. Kim, J.-W.; Simmer, J.P.; Hart, T.C.; Hart, P.S.; Ramaswami, M.D.; Bartlett, J.D.; et al. MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet* 2005, 42, 271–275 10.1136/jmg.2004.024505.
89. Tanimoto, K.; Le, T.; Zhu, L.; Witkowska, H.E.; Robinson, S.; Hall, S.; et al. Reduced amelogenin-MMP20 interactions in amelogenesis imperfecta. *Journal of dental research NIH Public Access*: 2008, 87(5), 451–5 10.1177/154405910808700516.
90. Wang, S.; Choi, M.; Richardson, A.S.; Reid, B.M.; Seymen, F.; Yildirim, M.; et al. STIM1 and SLC24A4 Are Critical for Enamel Maturation. *Journal of dental research International Association for Dental Research*: 2014, 93(7 Suppl), 94S-100S 10.1177/0022034514527971.
91. El-Sayed, W.; Shore, R.C.; Parry, D.A.; Inglehearn, C.F.; Mighell, A.J. Hypomaturation Amelogenesis Imperfecta due to WDR72 Mutations: A Novel Mutation and Ultrastructural Analyses of Deciduous Teeth. *Cells Tissues Organs* 2011, 194(1), 60–66 10.1159/000322036.
92. Moradian-Oldak, J. Protein-mediated enamel mineralization. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 2012, 17, 1996–2023.
93. Smith, C.E.; Richardson, A.S.; Hu, Y.; Bartlett, J.D.; Hu, J.C.-C.; Simmer, J.P. Effect of Kallikrein 4 Loss on Enamel Mineralization. *Journal of Biological Chemistry* 2011, 286(20), 18149–18160 10.1074/jbc.M110.194258.
94. Lu, Y.; Papagerakis, P.; Yamakoshi, Y.; Hu, J.C.-C.; Bartlett, J.D.; Simmer, J.P. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biological Chemistry* 2008, 389(6), 695–700 10.1515/BC.2008.080.
95. Caterina, J.J.; Skobe, Z.; Shi, J.; Ding, Y.; Simmer, J.P.; Birkedal-Hansen, H.; et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *The Journal of biological chemistry American Society for Biochemistry and Molecular Biology*: 2002, 277(51), 49598–604 10.1074/jbc.M209100200.
96. Zeidler, C.; Welte, K. Kostmann syndrome and severe congenital neutropenia. *Seminars in hematology* 2002, 39(2), 82–8.

97. Aho, S.; Uitto, J. Direct Interaction between the Intracellular Domains of Bullous Pemphigoid Antigen 2 (BP180) and β 4 Integrin, Hemidesmosomal Components of Basal Keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, 243(3), 694–699 10.1006/bbrc.1998.8162.
98. Munger, J.S.; Huang, X.; Kawakatsu, H.; Griffiths, M.J.; Dalton, S.L.; Wu, J.; et al. A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis: The Integrin α v β 6 Binds and Activates Latent TGF β 1. *Cell* 1999, 96(3), 319–328 10.1016/S0092-8674(00)80545-0.
99. Pulkkinen, L.; Christiano, A.M.; Gerecke, D.; Wagman, D.W.; Burgeson, R.E.; Pittelkow, M.R.; et al. A Homozygous Nonsense Mutation in the β 3 Chain Gene of Laminin 5 (LAMB3) in Herlitz Junctional Epidermolysis Bullosa; 1994, 10.1006/geno.1994.1627.
100. Douglas, W.H.; Reeh, E.S.; Ramasubbu, N.; Raj, P.A.; Bhandary, K.K.; Levine, M.J. Statherin: A major boundary lubricant of human saliva. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991, 180(1), 91–97 10.1016/S0006-291X(05)81259-8.
101. Shaw, W.J. Solid-state NMR studies of proteins immobilized on inorganic surfaces. *Solid state nuclear magnetic resonance NIH Public Access*: 2015, 70, 1–14 10.1016/j.ssnmr.2014.10.003.
102. Saxena, C.; Saxena, K.; Bhakhar, V.; Vidya, M.; Ghanchi, M.; Jani, D. An Overview of Enamel Matrix Proteins. *International Journal of Preventive and Clinical Dental Research* 2005, 3(1), 79–84 10.5005/jp-journals-10052-0018.
103. Kawasaki, K.; Weiss, K.M. Mineralized tissue and vertebrate evolution: The secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, 100(7), 4060–4065 10.1073/pnas.0638023100.
104. Sire, J.-Y.; Delgado, S.; Girondot, M. The amelogenin story: origin and evolution. *European Journal of Oral Sciences* 2006, 114(s1), 64–77 10.1111/j.1600-0722.2006.00297.x.
105. Nakahori, Y.; Takenaka, O.; Nakagome, Y. A human X-Y homologous region encodes amelogenin. *Genomics* 1991, 9(2), 264–9.
106. Álvarez-Sandoval, B.A.; Manzanilla, L.R.; Montiel, R. Sex determination in highly fragmented human DNA by high-resolution melting (HRM) analysis. *PloS one Public Library of Science*: 2014, 9(8), e104629 10.1371/journal.pone.0104629.
107. Masuyama, K.; Shojo, H.; Nakanishi, H.; Inokuchi, S.; Adachi, N.; Umetsu, K. Sex Determination from Fragmented and Degenerated DNA by Amplified Product-Length Polymorphism Bidirectional SNP Analysis of Amelogenin and SRY Genes. *PLOS ONE D. Hoon Shin, Ed.; Public Library of Science*: 2017, 12(1), e0169348 10.1371/journal.pone.0169348.
108. Simmer, J.P.; Hu, J.C. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *Journal of dental education* 2001, 65(9), 896–905.

109. Wright, J.T. The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfecta. *American journal of medical genetics. Part A NIH Public Access*: 2006, 140(23), 2547–55 10.1002/ajmg.a.31358.
110. Hu, J.C.-C.; Chan, H.-C.; Simmer, S.G.; Seymen, F.; Richardson, A.S.; Hu, Y.; et al. Amelogenesis imperfecta in two families with defined AMELX deletions in ARHGAP6. *PloS one Public Library of Science*: 2012, 7(12), e52052 10.1371/journal.pone.0052052.
111. Taylor, A.L.; Haze-Filderman, A.; Blumenfeld, A.; Shay, B.; Dafni, L.; Rosenfeld, E.; et al. High yield of biologically active recombinant human amelogenin using the baculovirus expression system. *Protein Expression and Purification* 2006, 45(1), 43–53 10.1016/j.pep.2005.05.010.
112. Uhlen, M.-M.; Stenhagen, K.R.; Dizak, P.M.; Holme, B.; Mulic, A.; Tveit, A.B.; et al. Genetic variation may explain why females are less susceptible to dental erosion. *European Journal of Oral Sciences* 2016, 124(5), 426–432 10.1111/eos.12297.
113. Bartlett, J.D.; Ball, R.L.; Kawai, T.; Tye, C.E.; Tsuchiya, M.; Simmer, J.P. Origin, splicing, and expression of rodent amelogenin exon 8. *Journal of dental research NIH Public Access*: 2006, 85(10), 894–9 10.1177/154405910608501004.
114. Ribeiro, A.; Line, R.P. The enamel organic matrix : structure and function. *Braz J Oral Sci* 2005, 4(13), 716–724.
115. Bansal, A.K.; Shetty, D.C.; Bindal, R.; Pathak, A. Amelogenin: A novel protein with diverse applications in genetic and molecular profiling. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP Medknow Publications*: 2012, 16(3), 395–9 10.4103/0973-029X.102495.
116. Margolis, H.C.; Beniash, E.; Fowler, C.E. Role of Macromolecular Assembly of Enamel Matrix Proteins in Enamel Formation. *Journal of Dental Research SAGE Publications*: 2006, 85(9), 775–793 10.1177/154405910608500902.
117. Fincham, A.G.; Moradian-Oldak, J.; Diekwisch, T.G.H.; Lyaruu, D.M.; Wright, J.T.; Bringas, P.; et al. Evidence for Amelogenin Nanospheres as Functional Components of Secretory-Stage Enamel Matrix. *Journal of Structural Biology* 1995, 115(1), 50–59 10.1006/jsbi.1995.1029.
118. Gibson, C.W.; Yuan, Z.A.; Hall, B.; Longenecker, G.; Chen, E.; Thyagarajan, T.; et al. Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *The Journal of biological chemistry American Society for Biochemistry and Molecular Biology*: 2001, 276(34), 31871–5 10.1074/jbc.M104624200.
119. Termine, J.D.; Belcourt, A.B.; Christner, P.J.; Conn, K.M.; Nysten, M.U. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *The Journal of biological chemistry* 1980, 255(20), 9760–8.
120. Chan, H.-C.; Estrella, N.M.R.P.; Milkovich, R.N.; Kim, J.-W.; Simmer, J.P.; Hu, J.C.-C. Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds. *European journal of oral sciences NIH Public Access*: 2011, 119 Suppl(Suppl 1), 311–23 10.1111/j.1600-0722.2011.00857.x.

121. Al-Hashimi, N.; Sire, J.-Y.; Delgado, S. Evolutionary Analysis of Mammalian Enamelin, The Largest Enamel Protein, Supports a Crucial Role for the 32-kDa Peptide and Reveals Selective Adaptation in Rodents and Primates. *Journal of Molecular Evolution* Springer-Verlag: 2009, 69(6), 635–656 10.1007/s00239-009-9302-x.
122. Hu, J.C.-C.; Hu, Y.; Smith, C.E.; McKee, M.D.; Wright, J.T.; Yamakoshi, Y.; et al. Enamel defects and ameloblast-specific expression in Enam knock-out/lacZ knock-in mice. *The Journal of biological chemistry American Society for Biochemistry and Molecular Biology*: 2008, 283(16), 10858–71 10.1074/jbc.M710565200.
123. Siddiqui, S.; Al-Jawad, M. Enamelin Directs Crystallite Organization at the Enamel-Dentine Junction. *Journal of Dental Research* SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA: 2016, 95(5), 580–587 10.1177/0022034516632745.
124. Hu, J.C.-C.; Hu, Y.; Lu, Y.; Smith, C.E.; Lertlam, R.; Wright, J.T.; et al. Enamelin is critical for ameloblast integrity and enamel ultrastructure formation. *PloS one Public Library of Science*: 2014, 9(3), e89303 10.1371/journal.pone.0089303.
125. Nanci, A.; Zalzal, S.; Lavoie, P.; Kunikata, M.; Chen, W.-Y.; Krebsbach, P.H.; et al. Comparative Immunochemical Analyses of the Developmental Expression and Distribution of Ameloblastin and Amelogenin in Rat Incisors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA: 1998, 46(8), 911–934 10.1177/002215549804600806.
126. Fukumoto, S.; Kiba, T.; Hall, B.; Iehara, N.; Nakamura, T.; Longenecker, G.; et al. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *The Journal of cell biology* The Rockefeller University Press: 2004, 167(5), 973–83 10.1083/jcb.200409077.
127. Fukumoto, S.; Yamada, A.; Nonaka, K.; Yamada, Y. Essential Roles of Ameloblastin in Maintaining Ameloblast Differentiation and Enamel Formation. *Cells Tissues Organs* 2006, 181(3–4), 189–195 10.1159/000091380.
128. Saito, N.; Ariyoshi, W.; Okinaga, T.; Kamegawa, M.; Matsukizono, M.; Akebiyama, Y.; et al. Inhibitory effects of ameloblastin on epithelial cell proliferation. *Archives of Oral Biology* 2014, 59(8), 835–840 10.1016/j.archoralbio.2014.05.010.
129. Kuramitsu-Fujimoto, S.; Ariyoshi, W.; Saito, N.; Okinaga, T.; Kamo, M.; Ishisaki, A.; et al. Novel biological activity of ameloblastin in enamel matrix derivative. *Journal of applied oral science : revista FOB Bauru School of Dentistry*: 2015, 23(1), 49–55 10.1590/1678-775720140291.
130. Lu, X.; Ito, Y.; Kulkarni, A.; Gibson, C.; Luan, X.; Diekwisch, T.G.H. Ameloblastin-rich enamel matrix favors short and randomly oriented apatite crystals. *European Journal of Oral Sciences* 2011, 119, 254–260 10.1111/j.1600-0722.2011.00905.x.
131. Nakayama, Y.; Holcroft, J.; Ganss, B. Enamel Hypomineralization and Structural Defects in Amelotin-deficient Mice. *Journal of Dental Research* SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA: 2015, 94(5), 697–705 10.1177/0022034514566214.

132. Lacruz, R.S.; Nakayama, Y.; Holcroft, J.; Nguyen, V.; Somogyi-Ganss, E.; Snead, M.L.; et al. Targeted overexpression of amelotin disrupts the microstructure of dental enamel. *PLoS one Public Library of Science*: 2012, 7(4), e35200 10.1371/journal.pone.0035200.
133. Cui, J.; Xiao, J.; Tagliabracci, V.S.; Wen, J.; Rahdar, M.; Dixon, J.E.; et al. A secretory kinase complex regulates extracellular protein phosphorylation. *eLife eLife Sciences Publications Limited*: 2015, 4, e06120 10.7554/eLife.06120.
134. Du, E.-X.; Wang, X.-F.; Yang, W.-C.; Kaback, D.; Yee, S.-P.; Qin, C.-L.; et al. Characterization of Fam20C expression in odontogenesis and osteogenesis using transgenic mice. *International Journal of Oral Science* 2014, 7(2), 89–94 10.1038/ijos.2014.67.
135. Wang, X.; Hao, J.; Xie, Y.; Sun, Y.; Hernandez, B.; Yamoah, A.K.; et al. Expression of FAM20C in the osteogenesis and odontogenesis of mouse. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society Histochemical Society*: 2010, 58(11), 957–67 10.1369/jhc.2010.956565.
136. Simpson, M.A.; Hsu, R.; Keir, L.S.; Hao, J.; Sivapalan, G.; Ernst, L.M.; et al. Mutations in FAM20C Are Associated with Lethal Osteosclerotic Bone Dysplasia (Raine Syndrome), Highlighting a Crucial Molecule in Bone Development. *The American Journal of Human Genetics* 2007, 81(5), 906–912 10.1086/522240.
137. Tagliabracci, V.S.; Wiley, S.E.; Guo, X.; Pinna, L.A.; Pagliarini, D.J.; Dixon Correspondence, J.E.; et al. A Single Kinase Generates the Majority of the Secreted Phosphoproteome. *Cell* 2015, 161, 1619–1632 10.1016/j.cell.2015.05.028.
138. Deutsch, D.; Palmon, A.; Dafni, L.; Mao, Z.; Leytin, V.; Young, M.; et al. Tuftelin - aspects of protein and gene structure. *European Journal of Oral Sciences* 1998, 106(S1), 315–323 10.1111/j.1600-0722.1998.tb02192.x.
139. Deutsch, D.; Leiser, Y.; Shay, B.; Fermon, E.; Taylor, A.; Rosenfeld, E.; et al. The Human Tuftelin Gene and the Expression of Tuftelin in Mineralizing and Nonmineralizing Tissues. *Connective Tissue Research Taylor & Francis*: 2002, 43(2–3), 425–434 10.1080/03008200290001186.
140. Delgado, S.; Deutsch, D.; Sire, J.Y. Evolutionary Analysis of the Mammalian Tuftelin Sequence Reveals Features of Functional Importance. *Journal of Molecular Evolution Springer US*: 2017, 84(4), 214–224 10.1007/s00239-017-9789-5.
141. Satchell, P.G.; Shuler, C.F.; Diekwisch, T.G.H. True enamel covering in teeth of the Australian lungfish *Neoceratodus forsteri*. *Cell and Tissue Research Springer-Verlag*: 2000, 299(1), 27–37 10.1007/s004419900132.
142. Zhou, B.; Zhan, H.; Tin, L.; Liu, S.; Xu, J.; Dong, Y.; et al. TUFT1 regulates metastasis of pancreatic cancer through HIF1-Snail pathway induced epithelial-mesenchymal transition. *Cancer letters* 2016, 382(1), 11–20 10.1016/j.canlet.2016.08.017.
143. Linde, A. Dentin matrix proteins: Composition and possible functions in

- calcification. *The Anatomical Record* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 1989, 224(2), 154–166 10.1002/ar.1092240206.
144. Cajazeira Aguiar, M.; Arana-Chavez, V.E. Ultrastructural and immunocytochemical analyses of osteopontin in reactionary and reparative dentine formed after extrusion of upper rat incisors. *Journal of Anatomy* 2007, 210(4), 418–427 10.1111/j.1469-7580.2007.00708.x.
145. Li, F.; Liu, Y.; Liu, H.; Yang, J.; Zhang, F.; Feng, H. Phenotype and genotype analyses in seven families with dentinogenesis imperfecta or dentin dysplasia. *Oral Diseases* 2017, 23(3), 360–366 10.1111/odi.12621.
146. Ritchie, H.H.; Yee, C.T.; Tang, X.; Dong, Z.; Fuller, R.S. DSP-PP Precursor Protein Cleavage by Tolloid-Related-1 Protein and by Bone Morphogenetic Protein-1. *PLoS ONE* E.A. Permyakov, Ed.; 2012, 7(7), e41110 10.1371/journal.pone.0041110.
147. Guo, S.; Lim, D.; Dong, Z.; Saunders, T.L.; Ma, P.X.; Marcelo, C.L.; et al. Dentin sialophosphoprotein: a regulatory protein for dental pulp stem cell identity and fate. *Stem cells and development* Mary Ann Liebert, Inc.: 2014, 23(23), 2883–94 10.1089/scd.2014.0066.
148. von Marschall, Z.; Fisher, L.W. Dentin sialophosphoprotein (DSPP) is cleaved into its two natural dentin matrix products by three isoforms of bone morphogenetic protein-1 (BMP1). *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* NIH Public Access: 2010, 29(4), 295–303 10.1016/j.matbio.2010.01.002.
149. Sabsay, B.; Stetler-Stevenson, W.G.; Lechner, J.H.; Veis, A. Domain structure and sequence distribution in dentin phosphophoryn. *The Biochemical journal* 1991, 276 (Pt 3, 699–707.
150. Veis, A. Phosphoproteins from teeth and bone. *Ciba Foundation symposium* 1988, 136, 161–77.
151. Lehmann, K.M.; Hellwig, E.; Wenz, H.J. *Zahnärztliche Propädeutik: Einführung in die Zahnheilkunde; mit 34 Tabellen*; 11th ed. Deutscher Zahnärzte Verlag Köln: 2009.
152. He, G.; Ramachandran, A.; Dahl, T.; George, S.; Schultz, D.; Cookson, D.; et al. Phosphorylation of phosphophoryn is crucial for its function as a mediator of biomineralization. *The Journal of biological chemistry* American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 2005, 280(39), 33109–14 10.1074/jbc.M500159200.
153. Suzuki, S.; Sreenath, T.; Haruyama, N.; Honeycutt, C.; Terse, A.; Cho, A.; et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* NIH Public Access: 2009, 28(4), 221–9 10.1016/j.matbio.2009.03.006.
154. Eapen, A.; Ramachandran, A.; George, A. Dentin phosphoprotein (DPP) activates integrin-mediated anchorage-dependent signals in undifferentiated mesenchymal cells. *The Journal of biological chemistry* American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 2012, 287(8), 5211–24

- 10.1074/jbc.M111.290080.
155. Ritchie, H.H.; Berry, J.E.; Somerman, M.J.; Hanks, C.T.; Bronckers, A.L.J.J.; Hotton, D.; et al. Dentin sialoprotein (DSP) transcripts: developmentally-sustained expression in odontoblasts and transient expression in pre-ameloblasts. *European Journal of Oral Sciences* Blackwell Publishing Ltd: 1997, 105(5P1), 405–413 10.1111/j.1600-0722.1997.tb02137.x.
156. Macdougall, M.; Nydegger, J.; Gu, T.T.; Simmons, D.; Luan, X.; Cavender, A.; et al. Developmental Regulation of Dentin Sialophosphoprotein during Ameloblast Differentiation: A Potential Enamel Matrix Nucleator. *Connective Tissue Research* Taylor & Francis: 1998, 39(1–3), 25–37 10.3109/03008209809023909.
157. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, L. für B.; Dandekar, T. Lehrstuhl für Bioinformatik: Jimena. n.d., <http://www.bioinfo.biozentrum.uni-wuerzburg.de/computing/jimena> [Jul 19 2017].
158. yWorks GmbH yEd; yWorks GmbH: Tübingen, 2016.
159. Oltvai, Z.N.; Barabási, A.-L.; Jeong, H.; Tombor, B.; Albert, R. The large-scale organization of metabolic networks. *Nature* Nature Publishing Group: 2000, 407(6804), 651–654 10.1038/35036627.
160. Wagner, A.; Fell, D.A. The small world inside large metabolic networks. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 2001, 268(1478).
161. Antunes, R.; González, V.A.; Walsh, K. Identification of Repetitive Processes at Steady- and Unsteadystate: Transfer Function. 23rd Annual Conference of the International Group for Lean Construction 2015, (August), 793–802 10.13140/RG.2.1.4193.7364.
162. Karlebach, G.; Shamir, R. Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group: 2008, 9(10), 770–780 10.1038/nrm2503.
163. Siebert, H. *Logic-based Modeling in Systems Biology* FU Berlin: 2011.
164. de Jong, H. Modeling and Simulation of Genetic Regulatory Systems: A Literature Review. *Journal of Computational Biology* 2002, 9(1), 67–103 10.1089/10665270252833208.
165. Dandekar, T.; Kunz, M. *Bioinformatik*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2017, 10.1007/978-3-662-54698-7.
166. Freeman, L.C. Centrality in social networks conceptual clarification. *Social Networks* North-Holland: 1978, 1(3), 215–239 10.1016/0378-8733(78)90021-7.
167. Di Cara, A.; Garg, A.; De Micheli, G.; Xenarios, I.; Mendoza, L. Dynamic simulation of regulatory networks using SQUAD. *BMC bioinformatics* BioMed Central: 2007, 8, 462 10.1186/1471-2105-8-462.
168. RStudio Team *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc.; Boston, MA, 2017.

169. Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 2000, 28(1), 27–30.
170. Wrzodek, C. Inference and integration of biochemical networks with multilayered omics data; Hut: 2013.
171. Wrzodek, C.; Drager, A.; Zell, A. KEGGtranslator: visualizing and converting the KEGG PATHWAY database to various formats. *Bioinformatics* 2011, 27(16), 2314–2315 10.1093/bioinformatics/btr377.
172. Szklarczyk, D.; Morris, J.H.; Cook, H.; Kuhn, M.; Wyder, S.; Simonovic, M.; et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research Oxford University Press*: 2017, 45(D1), D362–D368 10.1093/nar/gkw937.
173. Richardson, J.S. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Advances in protein chemistry* 1981, 34, 167–339.
174. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research Oxford University Press*: 2017, 45(D1), D158–D169 10.1093/nar/gkw1099.
175. Letunic, I.; Doerks, T.; Bork, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic acids research Oxford University Press*: 2015, 43(Database issue), D257-60 10.1093/nar/gku949.
176. Chen, E.Y.; Tan, C.M.; Kou, Y.; Duan, Q.; Wang, Z.; Meirelles, G.V.; et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics BioMed Central*: 2013, 14, 128 10.1186/1471-2105-14-128.
177. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America National Academy of Sciences*: 2005, 102(43), 15545–50 10.1073/pnas.0506580102.
178. Kuleshov, M. V.; Jones, M.R.; Rouillard, A.D.; Fernandez, N.F.; Duan, Q.; Wang, Z.; et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research* 2016, 44(W1), W90–W97 10.1093/nar/gkw377.
179. Lachmann, A.; Xu, H.; Krishnan, J.; Berger, S.I.; Mazloom, A.R.; Ma'ayan, A. ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments. *Bioinformatics (Oxford, England) Oxford University Press*: 2010, 26(19), 2438–44 10.1093/bioinformatics/btq466.
180. Mathelier, A.; Fornes, O.; Arenillas, D.J.; Chen, C.-Y.; Denay, G.; Lee, J.; et al. JASPAR 2016: a major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research Oxford University Press*: 2016, 44(D1), D110-5 10.1093/nar/gkv1176.
181. Matys, V.; Kel-Margoulis, O. V.; Fricke, E.; Liebich, I.; Land, S.; Barre-Dirrie, A.; et al. TRANSFAC and its module TRANScmpel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic acids research Oxford University Press*: 2006, 34(Database issue), D108-10 10.1093/nar/gkj143.

182. Tanya Barrett, P.D. The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition. Gene Expression Omnibus (GEO); J. McEntyre, J. Ostell, Eds.; 2nd ed. National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD), 2013.
183. Zhang, Y.; Zheng, L. GEO Accession viewer, Series GSE75954. 2016, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE75954> [Aug 14 2017].
184. Barrett, T.; Wilhite, S.E.; Ledoux, P.; Evangelista, C.; Kim, I.F.; Tomashevsky, M.; et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Research Oxford University Press*: 2013, 41(D1), D991–D995 10.1093/nar/gks1193.
185. Edgar, R.; Domrachev, M.; Lash, A.E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research* 2002, 30(1), 207–10.
186. Kanehisa, M.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research* 2016, 44(D1), D457–D462 10.1093/nar/gkv1070.
187. Stöckl, S.; Göttl, C.; Grifka, J.; Grässel, S. Sox9 Modulates proliferation and expression of osteogenic markers of adipose-derived stem cells (ASC). *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology Karger Publishers*: 2013, 31(4–5), 703–17 10.1159/000350089.
188. Hattori, T.; Muller, C.; Gebhard, S.; Bauer, E.; Pausch, F.; Schlund, B.; et al. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development* 2010, 137(6), 901–911 10.1242/dev.045203.
189. Wysokinski, D.; Pawlowska, E.; Blasiak, J. RUNX2: A Master Bone Growth Regulator That May Be Involved in the DNA Damage Response. *DNA and Cell Biology* 2015, 34(5), 305–315 10.1089/dna.2014.2688.
190. Joseph, B.K.; Harbrow, D.J.; Sugerman, P.B.; Smid, J.R.; Savage, N.W.; Young, W.G. Ameloblast apoptosis and IGF-1 receptor expression in the continuously erupting rat incisor model. *APOPTOSIS Kluwer Academic Publishers*: 1999, 4(6), 441–447 10.1023/A:1009600409421.
191. Komori, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell and Tissue Research Springer-Verlag*: 2010, 339(1), 189–195 10.1007/s00441-009-0832-8.
192. Göttlich, C.; Kunz, M.; Zapp, C.; Nietzer, S.L.; Walles, H.; Dandekar, T.; et al. A combined tissue-engineered in silico signature tool patient stratification in lung cancer. *Molecular Oncology John Wiley & Sons, Ltd*: 2018, 12(8), 1264–1285 10.1002/1878-0261.12323.
193. Banf, M.; Rhee, S. inference of gene regulatory networks michael banf 2016. pdf. Y. Computational inference of gene regulatory networks: Approaches, limitations and opportunities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms Elsevier*: 2017, 1860(1), 41–52 10.1016/J.BBAGRM.2016.09.003.

194. Schuster, S.; Fell, D.A.; Dandekar, T. A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nature Biotechnology* 2000, 18(3), 326–332 10.1038/73786.
195. Naseem, M.; Philippi, N.; Hussain, A.; Wangorsch, G.; Ahmed, N.; Dandekar, T. Integrated Systems View on Networking by Hormones in Arabidopsis Immunity Reveals Multiple Crosstalk for Cytokinin. *The Plant Cell* 2012, 24(5), 1793–1814 10.1105/tpc.112.098335.
196. Stratmann, A.T.; Fecher, D.; Wangorsch, G.; Göttlich, C.; Walles, T.; Walles, H.; et al. Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean *in silico* model. *Molecular Oncology* 2014, 8(2), 351–365 10.1016/j.molonc.2013.11.009.
197. Cecil, A.; Ohlsen, K.; Menzel, T.; François, P.; Schrenzel, J.; Fischer, A.; et al. Modelling antibiotic and cytotoxic isoquinoline effects in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and mammalian cells. *International Journal of Medical Microbiology Urban & Fischer*: 2015, 305(1), 96–109 10.1016/J.IJMM.2014.11.006.
198. Kassebaum, N.J.; Bernabé, E.; Dahiya, M.; Bhandari, B.; Murray, C.J.L.; Marcenes, W. Global Burden of Untreated Caries. *Journal of Dental Research SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA*: 2015, 94(5), 650–658 10.1177/0022034515573272.
199. Sundell, S.; Koch, G. Hereditary amelogenesis imperfecta. I. Epidemiology and clinical classification in a Swedish child population. *Swedish dental journal* 1985, 9(4), 157–69.
200. Järvinen, E.; Salazar-Ciudad, I.; Birchmeier, W.; Taketo, M.M.; Jernvall, J.; Thesleff, I. Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/beta-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103(49), 18627–32 10.1073/pnas.0607289103.
201. Tapaltsyán, V.; Eronen, J.T.; Lawing, A.M.; Sharir, A.; Janis, C.; Jernvall, J.; et al. Continuously growing rodent molars result from a predictable quantitative evolutionary change over 50 million years. *Cell reports NIH Public Access*: 2015, 11(5), 673–80 10.1016/j.celrep.2015.03.064.
202. Andl, T.; Reddy, S.T.; Gaddapara, T.; Millar, S.E. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Developmental cell* 2002, 2(5), 643–53.
203. van Genderen, C.; Okamura, R.M.; Fariñas, I.; Quo, R.G.; Parslow, T.G.; Bruhn, L.; et al. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes & development* 1994, 8(22), 2691–703.
204. Oshima, M.; Mizuno, M.; Imamura, A.; Ogawa, M.; Yasukawa, M.; Yamazaki, H.; et al. Functional Tooth Regeneration Using a Bioengineered Tooth Unit as a Mature Organ Replacement Regenerative Therapy. *PLoS ONE W.-C. Chin, Ed.*; 2011, 6(7), e21531 10.1371/journal.pone.0021531.

205. Ono, M.; Oshima, M.; Ogawa, M.; Sonoyama, W.; Hara, E.S.; Oida, Y.; et al. Practical whole-tooth restoration utilizing autologous bioengineered tooth germ transplantation in a postnatal canine model. *Scientific Reports Nature Publishing Group*: 2017, 7(1), 44522 10.1038/srep44522.
206. Snead, M.L. Whole-tooth regeneration: it takes a village of scientists, clinicians, and patients. *Journal of dental education NIH Public Access*: 2008, 72(8), 903–11.
207. Oshima, M.; Tsuji, T. Whole Tooth Regeneration as a Future Dental Treatment. Springer, Cham: 2015, 255–269 10.1007/978-3-319-22345-2_14.
208. Neves, V.C.M.; Babb, R.; Chandrasekaran, D.; Sharpe, P.T. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. *Scientific reports Nature Publishing Group*: 2017, 7, 39654 10.1038/srep39654.
209. del Ser, T.; Steinwachs, K.C.; Gertz, H.J.; Andrés, M. V; Gómez-Carrillo, B.; Medina, M.; et al. Treatment of Alzheimer’s disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study. *Journal of Alzheimer’s disease : JAD* 2013, 33(1), 205–15 10.3233/JAD-2012-120805.
210. Tolosa, E.; Litvan, I.; Höglinger, G.U.; Burn, D.; Lees, A.; Andrés, M. V.; et al. A phase 2 trial of the GSK-3 inhibitor tideglusib in progressive supranuclear palsy. *Movement Disorders* 2014, 29(4), 470–478 10.1002/mds.25824.
211. Lovestone, S.; Boada, M.; Dubois, B.; Hüll, M.; Rinne, J.O.; Huppertz, H.-J.; et al. A Phase II Trial of Tideglusib in Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease IOS Press*: 2015, 45(1), 75–88 10.3233/JAD-141959.
212. Sato, N.; Meijer, L.; Skaltsounis, L.; Greengard, P.; Brivanlou, A.H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine* 2004, 10(1), 55–63 10.1038/nm979.
213. MacDonald, B.T.; Tamai, K.; He, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell NIH Public Access*: 2009, 17(1), 9–26 10.1016/j.devcel.2009.06.016.
214. Hof, M.; Dahlke, R.I.; Dandekar, T.; Kaldorf, M.; Beck, L.A.. A non-invasive manual method for the assessment of pregnancy in female *Scyliorhinus canicula* catsharks. *Mediterranean Marine Science* 2018, 19(1), 201 10.12681/mms.13838.
215. Sire, J.-Y.; Davit-Beal, T.; Delgado, S.; Van Der Heyden, C.; Huysseune, A. First-generation teeth in nonmammalian lineages: Evidence for a conserved ancestral character?. *Microscopy Research and Technique* 2002, 59(5), 408–434 10.1002/jemt.10220.
216. Peyer, B. Die Zähne: Ihr Ursprung, ihre Geschichte und ihre Aufgabe; Springer Berlin Heidelberg: Berlin Göttingen Heidelberg, 1963.
217. Rasch, L.J.; Martin, K.J.; Cooper, R.L.; Metscher, B.D.; Underwood, C.J.; Fraser, G.J. An ancient dental gene set governs development and continuous regeneration of teeth in sharks. *Developmental Biology Elsevier*: 2016, 415(2), 347–370

- 10.1016/j.ydbio.2016.01.038.
218. Enax, J.; Prymak, O.; Raabe, D.; Epple, M. Structure, composition, and mechanical properties of shark teeth. *Journal of Structural Biology* 2012, 178(3), 290–299 10.1016/j.jsb.2012.03.012.
219. Hammarström, L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *Journal of clinical periodontology* 1997, 24(9 Pt 2), 658–68.
220. Hammarstrom, L.; Heijl, L.; Gestrelus, S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *Journal of Clinical Periodontology Munksgaard International Publishers: 1997*, 24(9), 669–677 10.1111/j.1600-051X.1997.tb00248.x.
221. Maycock, J.; Wood, S.R.; Brookes, S.J.; Shore, R.C.; Robinson, C.; Kirkham, J. Characterization of a Procine Amelogenin Preparation, EMDOGAIN, a Biological Treatment for Periodontal Disease. *Connective Tissue Research Taylor & Francis: 2002*, 43(2–3), 472–476 10.1080/03008200290000880.
222. Jepsen, S.; Heinz, B.; Wachtel, H. Gemeinsame Stellungnahme der DGP/DGZMK Thema: Regenerative Therapie mit einem Schmelzmatrixprotein (Emdogain®); Düsseldorf, 2000.
223. Wolf, H.F.; Rateitschak, E.M.; Rateitschak, K.H. Parodontologie - Band 1 von Farbatlant der Zahnmedizin; 3., vollst Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 2004.
224. He, J.; Jiang, J.; Safavi, K.E.; Spångberg, L.S.W.; Zhu, Q. Emdogain promotes osteoblast proliferation and differentiation and stimulates osteoprotegerin expression. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 2004, 97(2), 239–245 10.1016/j.tripleo.2003.10.005.
225. Rincon, J.C.; Haase, H.R.; Bartold, P.M. Effect of Emdogain on human periodontal fibroblasts in an in vitro wound-healing model. *Journal of periodontal research* 2003, 38(3), 290–5.
226. Kunimatsu, R.; Yoshimi, Y.; Hirose, N.; Awada, T.; Miyauchi, M.; Takata, T.; et al. The C-terminus of amelogenin enhances osteogenic differentiation of human cementoblast lineage cells. *Journal of Periodontal Research* 2017, 52(2), 218–224 10.1111/jre.12384.
227. Jeremias, F.; Pierri, R.A.G.; Souza, J.F.; Fragelli, C.M.B.; Restrepo, M.; Finoti, L.S.; et al. Family-Based Genetic Association for Molar-Incisor Hypomineralization. *Caries Research* 2016, 50(3), 310–318 10.1159/000445726.
228. Allazzam, S.M.; Alaki, S.M.; El Meligy, O.A.S. Molar incisor hypomineralization, prevalence, and etiology. *International journal of dentistry Hindawi: 2014*, 2014, 234508 10.1155/2014/234508.
229. Lee, H.-K.; Lee, D.-S.; Ryoo, H.-M.; Park, J.-T.; Park, S.-J.; Bae, H.-S.; et al. The odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) cooperates with RUNX2 and modulates enamel mineralization via regulation of MMP-20. *Journal of Cellular Biochemistry Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 2010*, 111(3),

- 755–767 10.1002/jcb.22766.
230. Tsukamoto, S.; Mizuta, T.; Fujimoto, M.; Ohte, S.; Osawa, K.; Miyamoto, a; et al. Smad9 is a new type of transcriptional regulator in bone morphogenetic protein signaling. *Scientific reports* 2014, 4, 7596 10.1038/srep07596.
231. Yamakoshi, Y.; Hu, J.C.-C.; Fukae, M.; Zhang, H.; Simmer, J.P. Dentin glycoprotein: the protein in the middle of the dentin sialophosphoprotein chimera. *The Journal of biological chemistry American Society for Biochemistry and Molecular Biology*: 2005, 280(17), 17472–9 10.1074/jbc.M413220200.

Anhang

Der Anhang befindet sich in digitaler Form auf dem beiliegenden Datenträger. Im Folgenden sind die übergreifenden Ordner und ihre Inhalte in tabellarischer Form kurz dargestellt:

- Abbildungen und Tabellen
 - Abbildungen und Tabellen, die in der Dissertation dargestellt sind
- Enrichr
 - Für die Recherche in *Enrichr* verwendete Dateien
- GEOData
 - Vollständiger GEO-Datensatz von Zhang et Zheng sowie reduzierte Version der netzwerkrelevanten Gene
- Grafiken
 - .graphml-Dateien als Grundlage für selbst erstellte Abbildungen sowie Originalbilder zu den Abbildungen 1 und 2
- Heatmap GEOData
 - Zugrundeliegende Daten und Programme zur Erstellung von Abbildung 12
- Heatmap *stable states*
 - Zugrundeliegende Daten und Programme zur Erstellung von Abbildung 11
- Netzwerk
 - Zugrundeliegende Daten und Programme zur Generierung des genregulatorischen Netzwerkes



Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle in erster Linie Prof. Dr. Thomas Dandekar, dem Leiter des Institutes für Bioinformatik der Universität Würzburg, der das spannende Zusammenwirken der Zahnmedizin und der Bioinformatik nicht nur überhaupt erst ermöglichte, sondern mich auch während der Bearbeitung meiner Dissertation stets als vertrauensvoller Ansprechpartner und Ideengeber zu unterstützen wusste. Es würde mich außerordentlich freuen, wenn meine Ansätze in Zukunft von weiteren Zahnmedizinern und Bioinformatikern aufgegriffen würden und so die für mich persönlich in Form und Inhalt erfreuliche Zusammenarbeit dieser beiden Disziplinen eine Fortsetzung fände.

Mein weiterer Dank gilt Martin Kaltdorf, der mir ebenfalls im Rahmen meiner Tätigkeit am Institut eine außergewöhnliche und zuverlässige Unterstützung war.