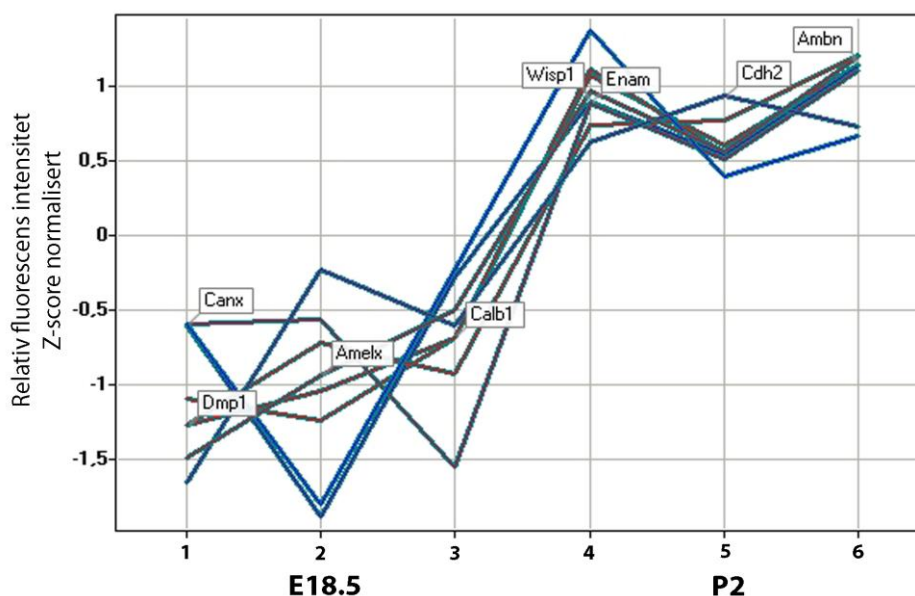


GENEKSJESJON I TANNANLEGG HOS MUS



Prosjektoppgave av:
Øyvind Trøen Arnesen og Trine Gylseth Bergsdal
Det odontologiske fakultet
Universitetet i Oslo

Veileder:
Amer Sehic



Oslo, vår 2009

Innholdsfortegnelse

Innledning

Del 1 Litteraturstudie

Generelt om tannutvikling
Molekylær regulering
Tannutvikling hos mus
Dentinogenese
Dentinets mikroskopiske struktur
Amelogenese
Emaljens mikroskopiske struktur
Tannmorfologi

Del 2 Metodebeskrivelse

Mikromatriser
Real-Time RT-PCR

Referanser Del 1 og Del 2

Del 3 Artikkel

”Genekspresjon i tannanlegg hos mus”

Innledning

Februar 2008 oppsøkte vi professor Harald Osmundsen ved Institutt for oral biologi med et ønske om å jobbe som sommerstipendiater ved fakultetet og få et innblikk i basalforskning. Dette førte til at vi fikk delta på et prosjekt innen kraniofacial biologi: genekspresjon under tannutvikling, sommeren 2008. I denne perioden fikk undertegnede en grundig innføring i alle aspekter i et forskningsprosjekt; fra planleggingsfasen, via mikrodisseksjon av tannanlegg og isolering av mRNA, til fremstillingen av mikromatriser og til slutt bearbeidelse av resultatene med bioinformatikk.

Tannen er et organ med opprinnelse fra ektoderm og mesenchym, og den blir ofte brukt som en modell for å studere epiteliale-mesenchymale interaksjoner. I vår oppgave ønsker vi å belyse variasjoner i genekspresjon på to utviklingsstadier i odontogenesen. Tannanlegg fra CD-1 mus ble mikrodissekert en dag før (E18,5) og to dager etter fødsel (P2).

Første del av oppgaven er en litteraturstudie over tannutvikling, amelogenese, emaljestruktur og tannmorfologi. I del to gir vi en metodebeskrivelse av mikromatriser og PCR. Del tre er skrevet i artikkelform, og oppsummerer resultatene av vår forskning på genekspresjon.

Vi vil rette en stor takk til vår veileder Amer Sehic. Hans engasjement og veiledning har vært avgjørende for forskningsprosessen og for skriving av prosjektoppgaven.

Vi ønsker også å takke Bente Gehrken for god opplæring på laboratoriet samt Randi Furuseth Klinge for innspill til litteraturstudien.

Del I

Tannutvikling

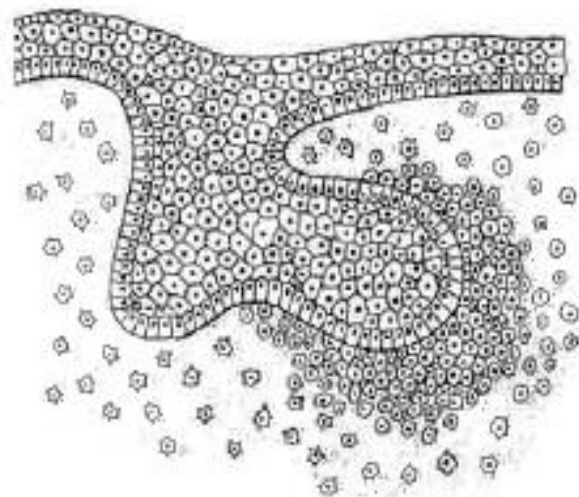
Generelt om tannutvikling

Tannutviklingen er en kompleks/resiprok interaksjon mellom oralt epitel og mesenchym og kan deles i tre overlappende faser: initiering, morfogenese og histogenese. Under initieringsfasen blir plassen til de fremtidige tennene etablert ved en innvaginering av oralt epitel kalt tannlist. Under morfogenese blir formen på tannen bestemt ved en kombinasjon av celleproliferasjon og cellebevegelse. Under histogenesen fullføres tanndannelsen med både mineralisert og ikke mineralisert vev.

De første histologiske tegn til tannutvikling er kondensering av mesenchymalt vev og tilstedeværelsen av kapillære nettverk under oralt epitel. Etter hvert blir det orale epitelet tykkere og det dannes et epitelbånd, som gir opphav til vestibulærlist og tannlist. Tidlige stadier av tannanleggene vil senere vises som en serie fortykkelser på tannlisten. Den videre tannutviklingen klassifiseres i tre stadier: knopp-, hette- og klokkestadiet.

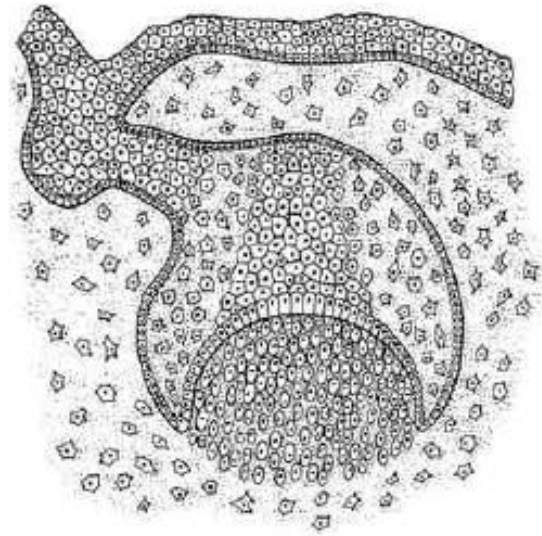
Knoppstadiet:

Emaljeorganet er lite differensiert og omgitt av mesenchym. Sentralt i emaljeorganet ligger emaljeknuten. Dette er en samling av ikke-proliferende epitelceller, som fungerer som et signalsenter for morfogenesen. I senere stadier vil emaljeknuten regulere kusevekst ved dannelsen av sekundære emaljeknuter



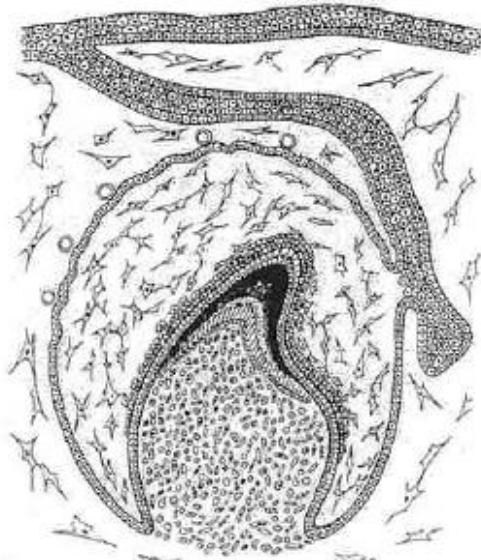
Hettestadiet:

Dentalorganet innvagnerer slik at det danner en slags hettestruktur. Man kan begynne å se forskjell på celler sentralt i dentalorganet og celler mer perifert; sistnevnte utvikler seg til indre- og ytre dentalepitel. Sent i dette stadiet vil cellene sentralt bevege seg fra hverandre og gi opphav til stellate reticulum. Mesenchymet under indre dentalepitel kalles tannpapillen, mens mesenchymet som omgir tannanlegget kalles tannfollikkel.

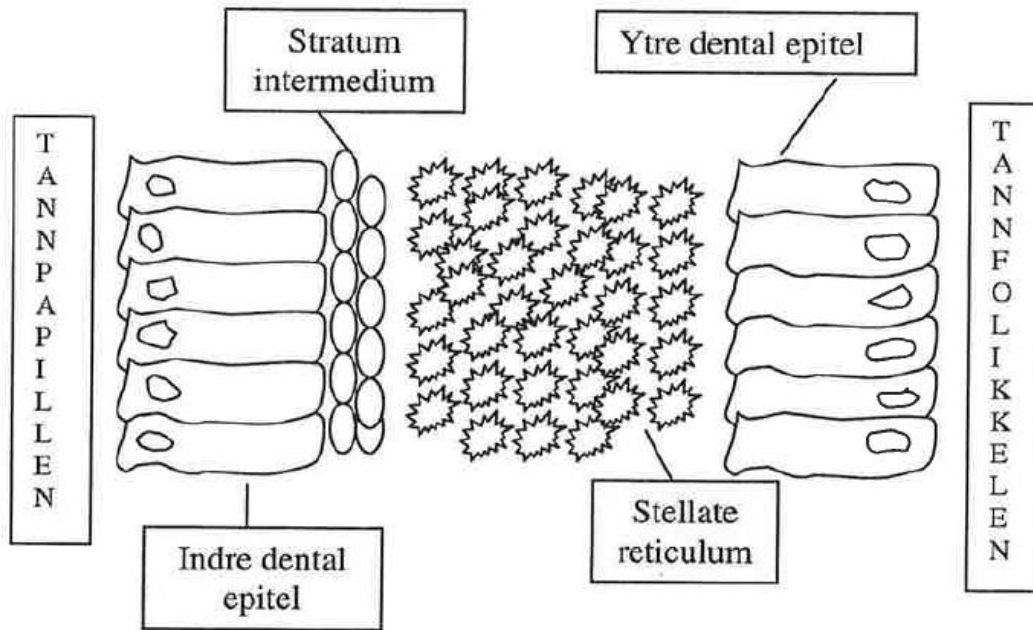


Klokkestadiet:

Dentalorganet fortsetter å differensiere og har nå form av en klokke. Indre dentalepitel gir en grov skisse av den fremtidige kroneformen. Tannlisten brytes ned og emaljeorganet mister forbindelsen med oralt epitel. Under dette stadiet skjer viktige utviklingsendringer.



Gjennom disse endringene, som kalles histodifferensiering, vil massen av like epitelceller omdannes til morfologisk og funksjonelt distinkte komponenter. Dentalorganet har fire lag: ytre dentalepitel, stellate reticulum, stratum intermedium og indre dentalepitel. Mellom indre dentalepitel og underliggende mesenchym vil det skje en resiprok interaksjon der preameloblaster påvirker mesenchymale celler i tannpapillen til å differensiere til odontoblaster. Odontoblastene starter så dannelsen av predentin, noe som vil påvirke ameloblastene til å danne emalje.



Cellene i sentrum av dentalorganet vil fortsette å skille ut og produsere glykosaminoglykaner inn i extracellulær rommet. Dette vil dra mer vann inn i dentalorganet slik at volumet øker. Cellene her vil ikke skilles fra hverandre da de er festet med desmosomer og vil derfor få et stjerneformet utseende, *stellate reticulum*. Cellene i periferien har fått en kubisk form og utgjør ytre dentalepitel. De cellene som er nærmest dentalpapillen blir litt mer sylindriske og kalles *indre dentalepitel*. Mellom indre dentalepitel og stellate reticulum finnes det noen celler som har høy aktivitet av alkalisk fosfatase. Disse kalles *stratum intermedium*. Selv om disse cellene histologisk er forskjellige fra cellene i det indre dentalepitelet, betraktes disse to likevel som en funksjonell enhet da de står for dannelsen av emaljten.

Etter hvert sees også en fortykkelse i indre dentalepitelet som kalles *emaljtenote*, som indikerer hvor første dannelse av hårdvev vil finne sted. Man har registrert ekspresjon av vekst-og transkripsjonsfatorer i dette området som er assosiert med de stedene hvor de fremtidige kuspene vil dannes. Rett under det indre dentalepitelet finnes en cellefri sone. På dette stadiet kan cellene i tannpapillen beskrives som udifferensierte mesenchymale celler. Tannfollikel skiller seg fra tannpapillen ved at det er mye mer kollagen i ekstracellulær rommet mellom follikulær fibroblaster.

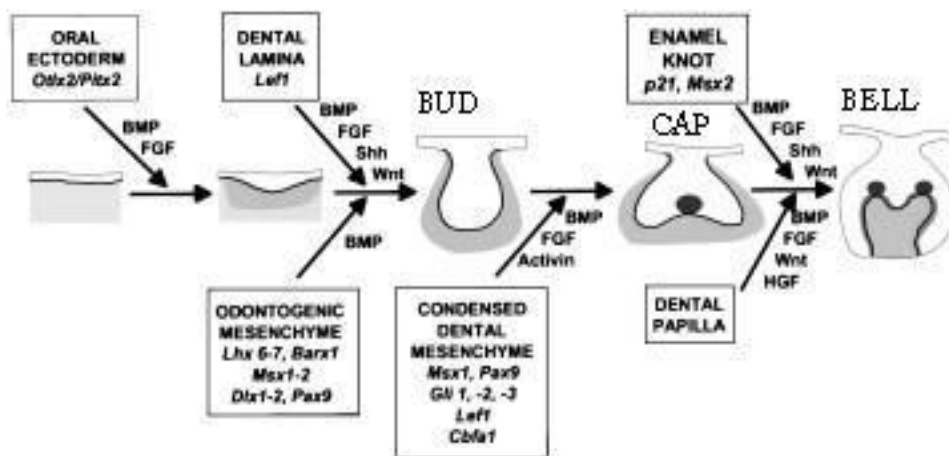
Blodkar finnes i dentalfollikelen og grener fra disse trer inn i tannpapillen under hettestadiet. Dentalorganet er avaskulært. Etter hvert ser man at dentalorganet/stellate reticulum kollapser. Cellene i det indre dentalepitelet inneholder svært mye glykogen som bidrar med energi etter at blodforsyningen er borte. Innervasjonen av tannanlegget skjer under

knopp-hette stadiet, men nervene trer ikke inn i tannpapillen før dentinogenesen starter. Dentalorganet blir ikke innervert.

Molekylær regulering

Tannen er en velegnet modell for å studere organutvikling med celleproliferasjon, celledifferensiering og celleinteraksjon, samt syntese, sekresjon, organisering og mineralisering av ekstracellulære matriser (ECM).

Forskning på mus har vist at ved de første morfologiske tegn på tannutvikling vil potensialet for tanndannelse være på bestemte områder i oral ektoderm. Etter hvert vil det odontogene potensialet gå fra epitelet til mesenchymet som vil kunne indusere videre tanndannelse. Når emaljeknuten er dannet vil denne overta som signalsenter for odontogenesen.



De mest studerte signalmolekylene som medierer epitelial-mesenchymal interaksjon under tannutvikling hører til fire hovedfamilier: bone morphogenetic protein (BMP), fibroblast growth factor (FGF), hedgehog (Hh) og Wnt. FGF-8 og BMP-4 er tidlige signaler i oral ektoderm (knoppstadiet), som påvirker underliggende mesenchym. FGF-8 induserer tanndannelse, mens BMP-4 bestemmer tanntype. I knoppstadiet er signalmolekyler fra alle de fire signalmolekylfamiliene uttrykt i epitelet. Når dentalt mesenchym kondenserer vil det uttrykke signaler som påvirker epitelet som så folder seg og utvikles til hette- og så

klokkestadiet. I molarer vil det i sekundære emaljeknuter uttrykkes FGF-4 og dette regulerer sannsynligvis initiering og vekst av kuspene. Sonic hegdehog (Shh) koder for et signalpeptid som er til stede i oralt epitel før invaginering og i epitelet gjennom hele tannutviklingen. Studier demonstrerer at Shh regulerer vekst og bestemmer formen på tannen. Shh er ikke essensielt for differensiering av ameloblaster eller odontoblaster.

Viktige transkripsjonsfaktorer som er en del av signaliseringsnettverket under tannutvikling inkluderer Msx1,2, Pax9, Lef1, Dlx 1,2, Gli1,2 og Cbfa1. Transgene museeksprimentar har vist at ikke-funksjonelle transkripsjonsfaktorer resulterer i stans i morfogenesen.

Tannutvikling hos mus

En mus har totalt 16 tenner, 2 incisiver og 6 molarer i hver kjeve. Første molar er størst og utvikles først, fulgt av andre og deretter tredje. Utvikling av molarene i overkjeven skjer 12-24 timer etter underkjeven. Vi vil videre omtale utviklingen av molarene i underkjeven.

Før fødsel:

Alderen til museembryoene angis her i dager etter befrukning. Dannelsen av en vaginalplugg regnes for embryonal dag 0.5 (E0,5).

Før dag 12 er det ingen tegn til differensiering av dental lamina. På dag 12 ser man de første tegn på odonotogenesen med stratifisering av oralt epitel langs de fremtidige kjevekammene. Både oralt ektoderm og underliggende mesoderm viser et stort antall mitoser.

Dag 13: dentalelamina blir tykkere og lengre hovedsaklig på grunn av økt celledeling. Underliggende mesodermale celler begynner å aggregere.

Dag 14: første molar er i knoppstadiet. Emaljeorganer for første molar i over- og underkjeven sees. Dentallamina vokser ytterligere i anterior/posterior retning. Dannelsen av ben starter i kjeven.

Dag 15: første molar er i hettestadiet. Mesodermale celler initierer dannelsen av dentalpapillen. Vaskulære elementer, stellate reticulum og indre og ytre dentalepitel sees.

Dag 16: celleproliferasjon i indre og ytre dental epitel øker størrelsen av første molars emaljeorgan. Proliferasjon av celler i dentalpapillen. Andre molar er i knoppstadiet.

Dag 17: vekst av første molars emaljeorgan. Stratum intermedium sees. Andre molar er i hettestadiet. En øy av epitel som senere vil delta i rotdannelsen sees.

Dag 18: første molar er i klokkestadiet, og man ser begynnende dannelse av kuspemønster og emalje-dentingrense. Ytre dentalepitel reduseres i tykkelse, mens indre dentalepitel fortsetter celledelingen.

Dag 19/20: kronemønster/form er nesten ferdigdannet for første molar. Cytodifferensiering av ameloblaster starter på kuspetoppene. Noen celler på kuspetoppene vil ikke differensieres til ameloblaster, noe som fører til emaljefrie områder. Celler fra dentalpapillen differensieres til odontoblaster, som begynner dannelse av predentin.

Etter fødsel:

Dag 21-22: kronemønster/form er ferdigdannet for første molar. Ameloblaster begynner dannelse av emaljematrix på kuspene. Differensiering av ameloblaster og odontoblaster fortsetter ned langs kuspene. Kalsifisering av predentin på kuspetoppene. Forbindelsen mellom tannanlegg og dentallamina er brutt. Dentinogenese begynner i andre molar.

Dag 23-24: kronen i første molar er dekket av ett lag dentin og ett lag emaljematrix (med unntak av emaljefrie områder). Andre molar er på samme stadium som første molar ved dag 21/22. Tredje molar er i knoppstadiet en gang mellom dag 24 og 26.

Dag 25-30: All emaljematrix er skilt ut i første molar, og dentindannelse minker størrelsen av pulpakammeret i kronen. Emaljemodning, rotdannelse og erupsjon for første molar begynner på dag 30. Andre molar fortsetter dannelse av dentin og emaljematrix. Tredje molar er i klokkestadiet.

Dag 31-35: Emaljedannelse, modning og erupsjon fortsetter for første- og begynner for andre molar. Bindevevsinvasjon initierer formasjon av periodontale fibre i første molar. Emaljematrix dannes i tredje molar.

Dag 36-40: Første molar er fullstendig frembrutt, har dannet primærdentin og er nesten ferdig rotutviklet. Sementdannelse starter. Andre molar erupterer. Tredje molar begynner emaljemodning, rotdannelse og erupsjon.

Dag 41-45: første og andre molar er i funksjonell okklusjon. Røttene på disse tennene oppnår full lengde.

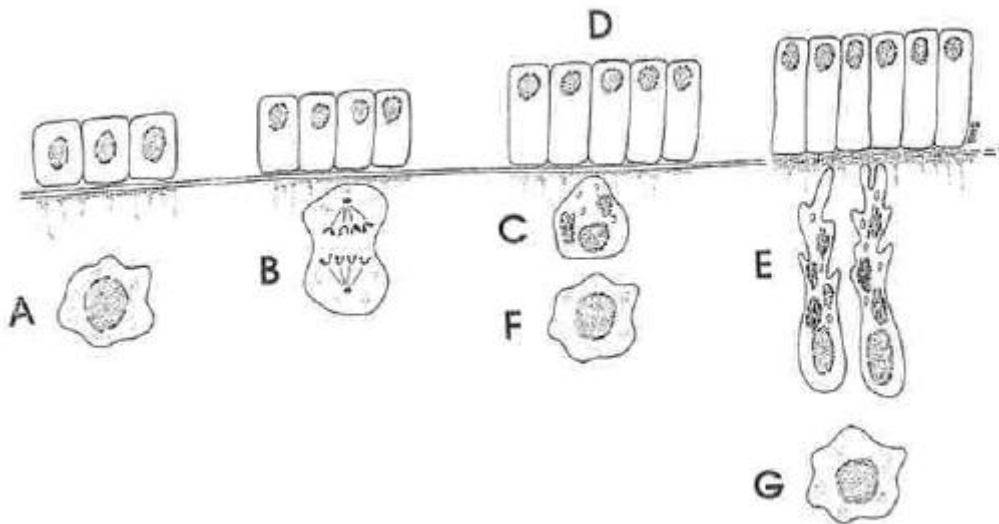
Dag 46-50: funksjonell okklusjon for tredje molar.

Dentinogenese

Dentindannelsen starter i klokkestadiet og fortsetter til kronen er ferdigutviklet, mens rotentin fortsetter å dannes også etter at tannen har brutt frem. Odontoblastene differensieres fra ektomesenchymale celler i tannpapillen og er ansvarlige for dentinogenesen.

Før dentinogenesen starter, er cellene i indre dentalepitel korte og sylindriske og deler seg med stor hastighet mens tannanlegget vokser. På dette stadiet er disse cellene skilt fra tannpapillen med basal lamina og en cellefri sone. Når celledelingen i indre dentalepitel stopper blir cellene mer sylindriske og kjernen vandrer bort fra tannpapillen. Ektomesenchymale celler utvikler seg til odontoblaster. Den cellefrie sonen forsvinner og odontoblastene starter utskillelsen av en organisk matrise som senere blir mineralisert. Odontoblastene beveger seg bort fra emaljedentingrensen og det dannes en odontoblastutløper som gir opphav til dentinkanaler.

Figuren under viser utviklingen av cellene nærmest indre dentalepitel som gir opphav til odontoblaster og subodontoblaster. Det hevdes at subodontoblastene er celler som mangler kun det siste signalet for å differensiere til odontoblaster. Subodontoblastene er aktive ved dannelse av reparativt tertiærdentin.



Dentinogenesisen deles i primær, sekundær og tertiær. Primærdentin dannes før tannens frembrudd, sekundærdentin etter frembruddet, og tertiærdentin dannes som reaksjon på en skade under irriterte dentinkanaler.

Dentinets mikroskopiske struktur

Av dentinets vekt utgjør uorganisk materiale 70 %, organisk materiale 20 % og vann 10 %. Uorganisk materiale består av hydroksyapatitkrytaller, mens kollagen og grunnsstans utgjør den organiske delen.

De første 150 μm som dannes kalles kappedentin, mens resten kalles sirkumpulpalt dentin. I kappedentinet er kollagenfibrene tykke og står perpendikulært på basallamina. I sirkumpulpalt dentin er kollagenfibrene tynne og mer spredt.

Dentin inneholder kanaler som går fra den pulpale overflate til emalje-dentin- og sement-dentin-grensen. Dentinkanalene inneholder odontoblastutløpere, nerver, kollagen, albumin, transferrin, glykoproteiner og proteoglykaner. Kanalenes forløp i cervicale deler av tannen er i s-form, mens de i rotdelen er tilnærmet horisontale. I den koronale delen av tannen er kanalene flere per mm^2 og større i omkrets mens i den apikale delen er det flere kanaler med mindre omkrets. Nerver finnes ikke i alle dentinkanaler, og heller ikke overalt i tannen.

Dentin i kanalene kalles peritubulærdentin og er mer mineralisert enn resten av dentinet. Dentinet mellom kanalene kalles intertubulært dentin og inneholder mer kollagen. Mellom

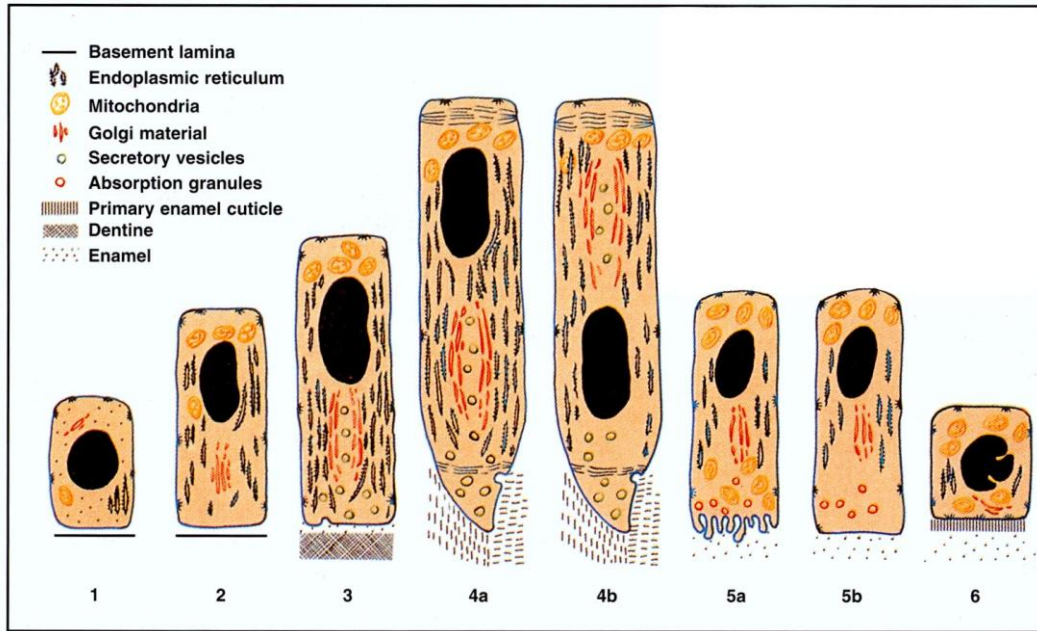
odontoblastutløperen og peritubulærdentin er det en tynn organisk hypomineralisert hinne, lamina limitans. Mellom denne hinnen og odontoblastutløperen er det en periodontoblastisk spalte med vevsvæske.

Den delen av dentinet som til enhver tid er nærmest odontoblastene er ikke mineralisert og kalles predentin.

Amelogenese

Emaljedannelsen starter tidlig i klokkestadiet. Den starter på kuspetsoppene og brer seg mot emaljedentingrensen, og hver ameloblast går gjennom samme livssyklus før emaljedannelsen er ferdig. Ameloblastene vil være på forskjellige stadier i syklusen avhengig av hvor de befinner seg i indre dentalepitel. Utviklingen til ameloblasten deles i fem hovedstadier, presekretorisk (1), sekretorisk (2), overgangs (3), modnings (4) og post-modnings stadium (5).

Figuren under viser hvordan ameloblastene forandres gjennom de ulike stadiene i en livssyklus. Cellene i det indre dentalepitelet (1) starter sin differensiering ved den fremtidige emaljedentingrensen ved kuspetsoppene. Deretter blir cellene mer sylindriske (2), og cellekjernen flyttes bort fra dentinet. Sekrerende organeller dannes, og cellene starter sin sekresjon (3) av emaljekomponenter. Ameloblastene beveger seg vekk fra emaljedentingrensen og den sekretoriske enden blir til det som kalles den Tomske prosess (4a). Krystallene dannes fra begge sider av prosessen. I denne fasen skiller man mellom ameloblastene som har kjernen høyt (4a) og de som har den lavt (4b). Mot slutten av den sekretoriske fasen har de fleste cellene en lavtliggende kjerne. Når den fulle tykkelsen av emaljen er dannet, mister ameloblastene sin Tomske prosess (5a). Opptil 50 % av ameloblastene vil deretter dø og bli fagocyttert av de gjennværende. Modningsfasen varer 2-3 ganger lengre enn den sekretoriske. Under modningsfasen er det en gjentagende modulering av cellemorfologi mellom en glatt (5b) og en ru (5a) overflate mot emaljen. Når modningsfasen er over, vil cellenes høyde reduseres (6).



Presekretorisk stadium

Dette stadiet inkluderer alle aktiviteter til den fremtidige ameloblasten før den begynner utskilling av emaljematrise. Hovedkomponentene er differensiering av preameloblaster og dannelse og påfølgende resorpsjon av basallamina. Indre dentalepitel skilles fra underliggende mesenchym av basallamina, som blir den fremtidige emaljedentingrensen. Når odontoplastene er differensiert, vil basallamina forsvinne og predentin dannes.

Sekretorisk stadium

Dette stadiet starter med dannelsen av et tynt lag emaljematrise, og ameloblastene starter tilbaketrekkingen fra emaljedentingrensen. Når ameloblastene går inn i den sekretoriske fasen vil det skje en aggregering av vesikler i ameloblastene mot emaljedentingrensen. Materialet i vesiklene består hovedsakelig av emalje proteiner. Ameloblastene starter utskillelsen av emalje proteiner når mineraliseringen av dentin starter. Hovedproteinene er amelogenin (80-90%), ameloblastin (5-10%), enamelin (1-5%) og tuftelin. Hydroxyapatittkrystaller i den nydannede matrisen sees nesten øyeblikkelig. Den sekretoriske fasen slutter når emaljematrisen er ferdig utskilt. De Tomske prosesser forsvinner og et tynt lag aprismatisk emalje dannes på overflaten.

Emaljeproteiner:

Amelogenin (Amelx): Amelogeningenet hos mennesker er lokalisert på både på X- (AMELX: locus Xp22.3-p22.1) og Y-kromosomet (AMLY: locus Yp11). Begge genene inneholder 7 exoner. Hos menn dominerer X-kromosomderivert Amelogenin. Den biologiske funksjonen til Amelx er ikke fullstendig kartlagt, men en rekke funksjoner er foreslått: signaltransduksjonsfunksjon under tannutvikling, emaljemetrise- og kappedentinarkitektur, ionetransport og regulering av apatittkrystallvekst under emaljemineralisering. Amelx er også involvert i cementogenesen ved å hindre abnormal resorpsjon av cement. De spiller også en rolle i periodontal regenerering ved at de har celle-adhesiv effekt. I human tannutvikling vil en delesjonsmutasjon i AMELX-genet føre til defekter i emaljen, noe som manifesterer seg som amelogenesis imperfekta.

Forsøk med Amelx knock-out mus viser abnormale tenner fra to ukers alder, med kritthvite missfarginger. Mikroradiografi avslører frakturer av incisiver og molarer, og scanning elektron mikroskopianalyse indikerer uorganisert hypoplastisk emalje. Disse forsøkene avslører at Amelx ikke er nødvendig for initiering av mineralkrystallformasjon, men at de styrer organisering av krystallmønster og emaljetykkelse.

Ameloblastin (Ambn): et tannspesifikt glykoprotein som uttrykkes av differensierende ameloblaster. Menneskets Ambn gen er lokalisert på kromosom 4q21 og inneholder 13 exoner. Immunologisk identifisering av Ambn under sekretorisk amelogenese viser en ameloblastinfordeling i emaljematrisen som følger ameloblastene, noe som resulterer i ett fiskenettmønster. Ambn finnes også i den Tomske prosessen.

Høye nivåer av ameloblastin uttrykkes på sekretorisk stadium og avtar på modningsstadiet. Ambn er et celleadhesjonsmolekyl essensielt for amelogenese, og spiller en rolle i opprettholdelse av differensiering av ameloblaster i sekretorisk stadium ved å binde seg til disse og hemme proliferasjon. I forsøk med ameloblastin knock-out mus, vil dentalt epitel differensieres til emaljeutskillende ameloblaster, men cellene løsner fra matrisen i sekretorisk stadium og mister sin polaritet. Mutante ameloblaster prolifererer og akkumulerer, og det blir produsert abnormal og ustrukturert mineralisert matrise. Ameloblastin uttrykkes også forbigående i dentinmatrisen og Hertwigs rotepitel, men rollen i cement- og dentinformasjon er ikke klarlagt.

Tuftelin: utskilles kort tid etter amelogenin og har muligens en rolle i initiering av mineraliseringen.

Enamelin: intakt enamelin finnes kun ved mineraliseringsfronten, noe som tyder på at proteinet deltar i regulering av lengdeveksten av krystallene. Enamelingen er også av betydning i etiologien av amelogenesis imperfecta.

Overgangsstadium

Utskillingen av emaljemetrise opphører. Antall ameloblaster reduseres med 50% ved apoptose. I siste del av dette stadiet danner ameloblastene en ny basallamina over den umodne emaljen.

Modningsstadium

Modning involverer fjernelse av vann og emaljeproteiner, hovedsakelig amelogenin. Kalsium- og fosfationer adderes til de voksende krystallene, slik at de vokser i både lengde og bredde. Proteininnholdet i matrisen reduseres til 1%, i motsetning til 30% i sekresjonsstadiet.

Postmodningsstadium

Ameloblastene avflates og et 1µm tykt proteinlag skiller cellene fra emaljen. De andre lagene i emaljeorganet smelter sammen med den omliggende dentale follikkelen og danner det reduserte emaljeepitel, som beskytter emaljen.

Emaljens mikroskopiske struktur

Det er observert tre ulike emaljekonfigurasjoner i musemolarer:

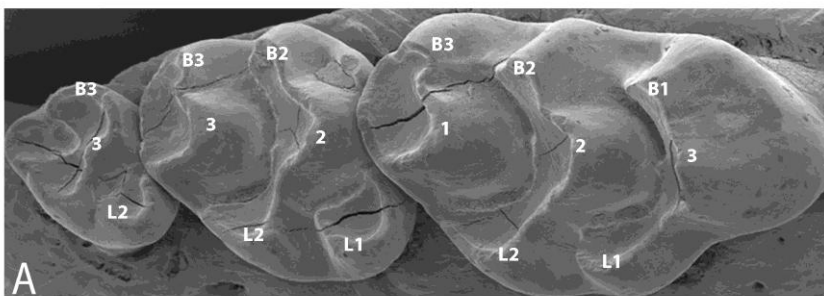
1. kryssende prizmer i indre emalje og parallelle prizmer i ytre emalje.
2. kun parallelle prizmer.
3. aprismatisk emalje

Den mest vanlige konfigurasjonen er kryssende prizmer i indre halvdel til 2/3 av emaljetykkelsen, mens det er parallelle prizmer i ytre 1/3. Prismene i alternerende rader er inklinert i motsatt retning, dvs. mesialt og lateralt. De motsatt rettede prismene i to naborekker vil således krysse hverandre (prismedekussing). Når prismene når ytre emalje, blir alle parallelle med hverandre og inklinerer okklusalt. Prismene når ikke helt til overflaten slik at

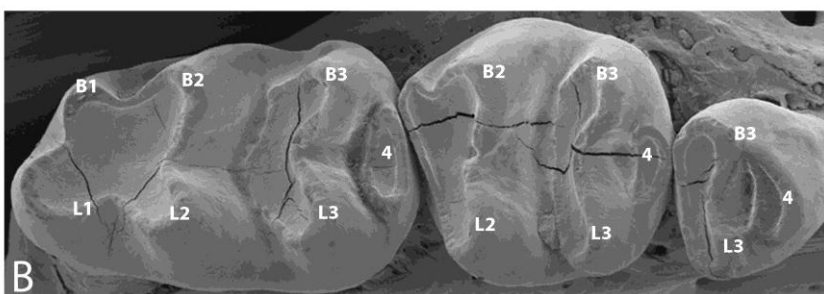
det superfisielle laget i den ytre emaljen er aprismatisk. Mot emaljesementgrensen minker tykkelsen av parallelle emaljeprismer. De kryssende prismene ser ut til å være fraværende på kuspene, og i bunnen av furene. Aprismatisk emalje dekker distale del av kuspene i maxilla og mesiale del av kuspene i mandibelen. Det er også observert aprismatisk emalje nær de emaljefrie områdene. Ameloblastene skiller ut organisk matrise både fra skulderen og fra den Tomske prosess. Dette gjør at det dannes krystaller med ulik orientering i emaljen, interprismer og prismer. Interprismer dannes fra ameloblastenes skulder, mens prismer dannes fra den Tomske prosess. De Tomske prosessene danner fordypninger i emaljeoverflaten.

Tanmorfologi

Molarer i maxilla (Figur A) har 3 rader med kuspener: lingualt (L1, L2), buccalt (B1, B2, B3) og sentralt (1, 2, 3). Kuspene er tippet i distal retning. Kuspene skiller av to overfladiske furer, som er orientert mesiodistalt i tillegg til dype mesiale konvekse furer som går buccolingualt. Første og andre molar har 3 røtter, tredje har enten 2 eller 3 røtter.



Kuspene er tippet mesialt, unntatt de to mesiale kuspene (L1 og B1) på første molar. Første og andre molar har 2 røtter, og tredje har fra 1 til 3 røtter. I både maxilla og mandibula viser molarene lignende morfologi, der andre molar ligner distale 2/3 av første molar og tredje molar ligner distale 1/2 av andre molar.



I mandibula (Figur B) danner kuspene 2 rader, lingualt (L1, L2) og buccalt (B1, B2, B3). De skiller av overfladiske furer som går mesiodistalt og av dype mesiale konvekse furer, som går buccolingualt.

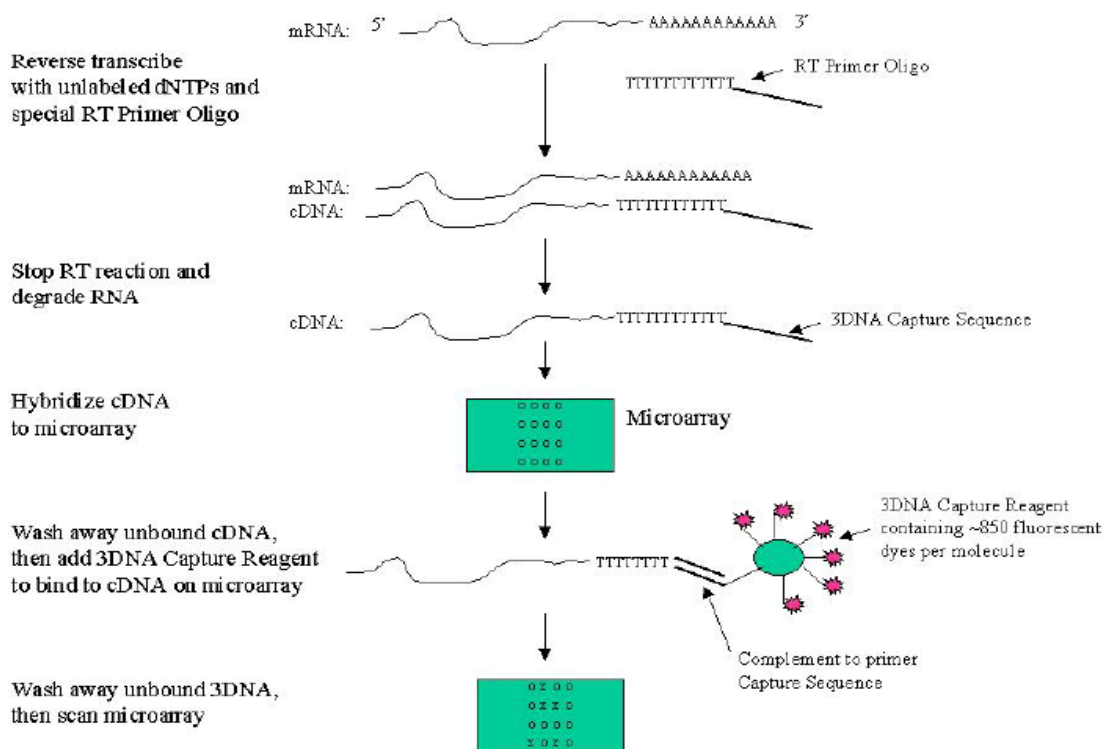
Del II

Metoder

Mikromatriser

Mikromatriser inneholder tusenvis av immobiliserte DNA-sekvenser organisert på et område på størrelse med et objektglass. Mikromatriser kan brukes til å analysere tilstedeværelse av genvariasjon eller mutasjon eller for å avgjøre mRNAs produksjonsmønster. Tusenvis av gener/mRNA kan analyseres samtidig. For genekspresjonsanalyse vil mRNA fra en celletype konverteres til cDNA. cDNA-miksen påføres en glassplate eller en membran som inneholder tusenvis av DNA prober. Hver probe korresponderer til et bestemt gen. cDNA i prøven vil så hybridiseres til probene. Til slutt tilsettes fluoriserende substrater som bindes til de allerede hybridiserte cDNA. Mengden fluoriserende farge som bindes til hver probe er et mål på mengden mRNA i prøven.

Microarray Detection with 3DNA™ Reagents



Bildeanalyse av mikromatriser

Etter hybridisering er scanning av matrisen og ekstrahering av rådata det første trinnet i dataanalysen. Prosessen består av: skanning, maskering, segmentering og ekstraksjon av nettfluorescensverdier.

Skanning

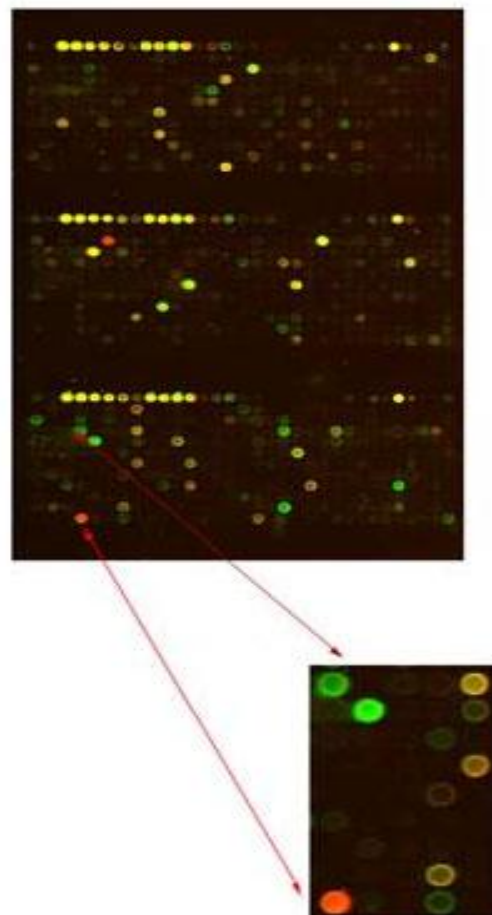
For å eksitere matrisene brukes en skanner med to lasere som eksiterer ved forskjellig bølgelengde (543nm og 633nm). De fluoriserende substratene cyanid 3 (Cy3) og cyanid 5 (Cy5) kan brukes til merking av cDNA. Cy3 og Cy5 emitterer ved bølgelengder på henholdsvis 565nm og 665nm. Skanningen av rådataene gir to TIFF-filer. Bildene viser aktiviteten til genene i begge prøvene. Cy3 gir grønn farge, mens Cy5 gir rød farge. Ut fra de to TIFF-filene kan det lages et komposittbilde. Hvert punkt representerer et bestemt gen. Oppregulerte gener representeres ved sterk fluorescens av Cy3 (grønn) og/eller Cy5(rød). Er genene likt uttrykt i de to prøvene vil punktet bli gult/oransje.

Maskering

Denne prosessen gir en lokalisering av hvert punkt på matrisen, slik at hvert gens identitet kan bli fastlagt.

Segmentering

Dette skiller fluorescens fra punktene (forgrunnsintensiteten) fra ”bakgrunnsstøy”. For å oppnå et bilde med høy kvalitet stilles det flere krav: trinnene i matriskonstruksjonen, RNA ekstraksjon, merkingen og hybridiseringen må være utført korrekt. For det andre er skanningparameterne avgjørende. Når kravene er oppfylt vil det gi konsistente punkter med høy fluorescensintensitet i forhold til bakgrunn.



Kvantitering

Dette gjøres ved å trekke bakgrunnsintensiteten fra forgrunnsintensiteten. Man ser da fluorescensintensiteten for Cy3 og Cy5 for hvert punkt. Forholdet mellom disse forteller om forskjellen i genekspresjon i de to prøvene.

Tallbehandling

Fluorescensdata fra bildeanalysen bearbeides for å fjerne punkter med svake signaler og normaliseres før en videre analyse. Fluorescenssignalene bør også log-transformeres. Vanligvis utføres normaliseringen ved hjelp av z-score analyse, som er den klassiske måten for å standardisere data mellom ulike eksperimenter og tillate sammenligning av ulike mikromatriser.

Analyse av genekspresjon

Det bør alltid lages replikater i mikromatriseeksperimenter. Dette er nødvendig for å tilpasse variasjon i genekspresjon til statistiske kalkuleringer. T-test/ANOVA analyse kan brukes for å analysere variansen mellom grupper av gener.

K-means klustering er en metode som brukes for å gruppere genene i grupper basert på likhet i ekspresjonsmønster. På denne måten kan man fokusere på et begrenset antall gener.

Bioinformatikk

Det finnes flere dataprogrammer som gir muligheter for bearbeidelse og tolkning av resultatene fra mikromatriser. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) er et av disse programmene og gir forskere tilgang til den mest oppdaterte kunnskapen om gener, medikamenter, kjemikalier, proteinfamilier, normale cellulære og sykdoms prosesser, og signalerings- og metabolske prosesser. Dette programmet gir mulighet til å få en rask oversikt over egne data og å sammenligne/samordne egne resultater med eksisterende kunnskap innen ditt forskningsområde. Til forskning på genekspresjon brukes programmet til å gruppere gener etter funksjon for raskt å kunne analysere datamaterialet.

Real-Time RT Polymerase Chain Reaction (PCR)

RT-PCR er en teknikk som anvendes til detektering og kvantitering av mRNA. mRNA blir først revers transkribert til cDNA. Primere som passer til en bestemt DNA sekvens tilsettes og DNA denatureres for deretter å kjøles ned slik at primer kan binde seg. DNA polymerase og deoksyribonukleosidtrifosfater initierer syntesen av to nye kjeder som er komplementært til det DNAet man ønsket å amplifisere. Når en replikasjonssyklus er avsluttet varmes DNA igjen og syklusen repeteres.

Ved bruk av Real-Time PCR kan man samle fluorescenssignaler fra en eller flere PCR reaksjoner. Kvantitative Real-Time PCR omdanner fluorescenssignaler fra hver reaksjon til en numerisk verdi for hver prøve. Det finnes to metoder for å merke prøven. Man kan enten farge DNA med fluoriserende farge eller man kan bruke en fluoriserende, sekvensspesifikk probe. Økningen i fluorescens er direkte proporsjonal med amplifisert produkt under PCR-syklusene.

Referanser

(Del I og Del II)

- Torres-Quintana, Gaete, Hernandez, Farias, Lobos (2005). Ameloblastin and Amelogenin Expression in Postnatal Developing Mouse Molars. *Journal of Science*, Vol. 47, No. 1: 27-34
- Berkovitz, Holland, Moxham (2002). *Oral Anatomy, Histology and embryology*. Third Edition. Mosby.
- Champe, Hervey, Ferrier (2008). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. Fourth Edition. Wolters Kluwer/ Lippincott, Williams, Wilkins.
- Cheadle, Vawter, Freed, Becker (2003). Analysis of microarray data using Z score transformation. *Journal of molecular diagnostics* 5(2):73-81
- Cho, Lee, Cai, Lee, Kim, Ohsima, Jung (2007). The Primary Enamel Knot Determines the Position of the First Buccal Cusp in Developing Mice Molars. *Differentiation* 75:441-451.
- Cohn (1957). Development of the Molar Teeth in the Albino Mouse. *American Journal of Anatomy* Sep;101(2):295-319
- Dassule, Lewis, Bei, Maas, McMahon (2000). Sonic Hedgehog Regulates Growth and Morphogenesis of the Tooth. *Development* 127:4775-4785
- Dorak (2006). *Real-time PCR*. Taylor & Francis Group.
- Hamadeh, Bushel, Paules, Afshari (2001). Discovery in toxicology: mediation by gene expression array technology. *Journal of biomolecular and molecular toxicology* 15(5):231-242

- Kapadia, Mues, D'Souza (2007). Genes Affecting Tooth Morphogenesis. *Orthod Craniofac Res* 10:105-113.

- Leung, Cavalieri (2003). Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends in Genetics* Vol. 19. No 11:649-659

- Lyngstadaas, Møinichen, Risnes (1998). Crown Morphology, Enamel Distribution and Enamel Structure in Mouse Molars. *The Anatomical Record* 250:268-280.

- Torres-Quintana, Gaete, Hernandez, Farias, Lobos (2005). Molecular Regulation of Tooth Development. *Bone* Vol. 25. No 1:123-125.

- Mjør, Fejerskov (1986): *Human Oral Embryology and Histology*. 1. utg.

- Nadiri, Kuchler-Bopp, Perrin-Schmitt, Lesot (2006). Expression Patterns of Receptors for Bone Morphogenetic Proteins in the Developing Mouse Molar. *Cell Tissue Res* 324: 33–40

- Thesleff, Åberg (1999). Molecular Regulation of Tooth Development. *Bone* Vol. 25, No. 1 July 1999:123–125

- http://media.biocompare.com/bcimages/techart/Brinkmann_Cdnamastertaq_fig3.jpg

Del III

Genekspresjon i tannanlegg hos mus

Øyvind T. Arnesen, Trine G. Bergsdal, Amer Sehic

Institutt for Oral Biologi, Det odontologiske fakultet, Universitetet i Oslo, Postboks 1052 Blindern, 0316 Oslo, Norge.

Abstrakt

For å belyse utviklingsmessige forskjeller under tannutvikling har vi sammenlignet to ulike stadier i utviklingen av første molar i underkjeven hos mus; en dag før (E18.5) og to dager etter fødsel (P2). Forskjeller i genekspresjon mellom E18.5 og P2 ble belyst ved hjelp av mikromatriser, og validering av mikromatrisedata ble utført med RT-PCR. Totalt viste 1217 gener signifikant forskjell ($P < 0.05$) i ekspresjonsnivå mellom disse to tidspunktene. Av disse viste 678 gener høyere ekspresjon ved P2, mens gjenværende 539 gener viste lavere ekspresjon. Gener som koder for emaljeproteinene (Amelx, Ambn og Enam) viste høyere ekspresjon ved P2 hvilket faller sammen med at dannelsen av emalje starter etter fødsel. Av disse viste Amelx høyest økning i ekspresjon (2000-fold) mellom disse to tidspunktene. Bioinformatikkanalyse i Ingenuity Pathway Analysis foreslo at flest gener som viste signifikant høyere ekspresjon ved P2 var assosiert med cellebevegelse, cellulær vekst og proliferering, cellulær ansamling og organisering, og celle-til-celle signalisering og interaksjon. På dette tidspunktet starter dentin- og emaljedannelsen og interaksjoner mellom ektomesenchym og mesoderm er avgjørende for hårdvevsdannelsen. Slike data er viktige når man retter oppmerksomheten mot gener, eller cellulære aktiviteter, hvilke også er av betydning for å øke vår forståelse om disse gener og deres rolle under odontogenesen.

Introduksjon

Tannen er en velegnet modell for å studere organutvikling med celleproliferasjon, celledifferensiering og celleinteraksjon, samt syntese, sekresjon, organisering og mineralisering av ekstracellulære matriser (ECM). Under tidlig utvikling deler ektodermalderivererte organer en rekke felles signalmolekyler og morfologiske kjennetegn, for deretter å gjennomgå egne spesifikke utviklingsprogrammer (1;2). Tannutvikling

er en kontinuerlig prosess og kan deles inn i initiering-, knopp-, hette-, og klokkestadiet (3). I mus starter tannutviklingen ved embryonal dag 11.5 (E11.5) med en fortykkelse av dentalt epitel, mens mineralisering av dentin og emalje i første molar starter ved postnatal dag 0 (P0) (4). En komplisert flertrinnsprosess av genekspresjon er involvert i tidlige stadier av tannutviklingen (5). Så langt er omkring

1300 gener og/eller proteiner påvist under odontogenesen ved hjelp av mikromatriser/immunhistokjemi/in situ hybridisering (6). Studier med knock-out mus har identifisert en rekke gener som regulerer tannutvikling og morfologi (7). For eksempel vil manglende ekspresjon av Lef-1 (8) eller p63 (9;10) stoppe tannutviklingen tidlig. Manglende ekspresjon av Msx1 eller Pax9 resulterer i arrestasjon av tannanlegget ved knoppstadiet (11;12), mens manglende ekspresjon av Runx2/Cbfa1 eller Sp3 inhiberer cytodifferensiering av ameloblaster og/eller odontoblaster (13;14). Shh er nødvendig for normal vekst og morfogenese, men er ikke essensiell for cytodifferensiering av ameloplast- og odontoplast populasjoner (15). Ameloplastin og amelogenin knock-out mus utvikler omfattende emaljehypoplasier med abnormal differensiering av ameloblaster (16;17).

Tannanlegg fra mus kan isoleres på ulike tidspunkter i utviklingen, både på fosterstadiet og etter fødsel. Musemolarer er derfor godt egnet til å studere genekspresjon under tannutvikling. For å kartlegge genekspresjonen kan forskjellige metoder som mikromatriser, real-time RT-PCR og in situ hybridisering brukes. I en kombinasjon med bioinformatikk gir disse metodene en forståelse av hvordan endringer i genekspresjon kan kontrollere differensiering og morfogenese. En bedre innsikt i genekspresjon samt ulike signalsekvenser i tannanlegget vil hjelpe vår forståelse for cellulære fenomener som ligger til grunn under odontogenesen. For å belyse utviklingsmessige forskjeller under tannutvikling har vi sammenlignet to ulike stadier i utviklingen av første molar i underkjeven hos mus; en dag før (E18.5) og to dager etter fødsel (P2).

Materiale og metode

Forsøksdyr

Dyrestallen hadde 12 timers lys og 12 timers mørke, med en temperatur på 21°C og med en relativ fuktighet på 60%.

Vann og fôr ble gitt *ad libitum*. Dyrene ble holdt i henhold til norsk "Lov om fremstilling og bruk av genmodifiserte organismer" fra 1994.

Tannanlegg ble isolert fra CD-1 mus; fra embryoer ved embryonal dag 18 (E18.5) og fra nyfødte ved postnatal dag 2 (P2). Vaginalplugg indikerer dag 0.5 (E0.5). De drektige musene ble avlivet ved nakkedislokering, og de nyfødte ved dekapitasjon. Embryoene og de avkappede hodene ble umiddelbart lagt i en løsning med RNAlater (Ambion inc., TX, USA). Høyre sides første molar i underkjeven ble mikrodisekert fra minst 5 fenotypiske embryoer (E18.5) og fra minst 5 fenotypiske nyfødte mus (P2). Mikrodiseksjonen ble utført i RNAlater, fortynnet 1:4 i PBS, og tannanleggene ble deretter overført til ufortynnet RNAlater™.

Isolasjon av RNA fra tannanlegg

Total RNA ble ekstrahert fra tannanleggene med Qiagen RNA Mini-kit™. Dette ga minst en RNA fraksjon med ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀ og OD₂₆₀/OD₂₃₀ på henholdsvis 1.8 og 2.0. Kvaliteten til isolert RNA ble vurdert ved å bruke Agilent-Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Alle løsningene hadde RIN-verdier høyere enn 8.5. Nanodrop ND-1000 spektrofotometer ble brukt til å bestemme konsentrasjonen i løsningen med rent RNA.

Mikromatriser: Analyse av mRNA

Mikromatriser fra NTNU Microarray Core Facility, Trondheim, Norge, hadde blitt printet ved hjelp av Operon v. 3 oligo sett (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Mikromatrisene ble utført i triplikater både for E18.5 og P2. cDNA syntese, merking og hybridisering ble utført med Cy3 og Cy5 merking, ved bruk av Genisphere 3DNA Array 900™ (Genisphere, PA, USA). cDNA fra tannanleggene fra E18.5 og P2 ble merket med henholdsvis Cy3 og Cy5. Hver slide ble hybridisert med cDNA med utgangspunkt i 1.0 µg RNA. Mikromatrisene ble skannet i en Packard

Bioscience Scanarray Lite Microarray skanner (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, inc.). Fluorescenssignalene ble kvantitert med Scanarray Express V.2,2™ (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, inc.). Fluorescensdataene ble deretter analysert i Spotfire™ Functional Genomics v.8 (Spotfire, MA, USA).

Validering av mikromatrisedata ved bruk av Real-Time RT-PCR

Ekspresjonen til ni utvalgte gener (Ambn, Amlx, Enam, Clu, Rgs3, Vldlr, Fdps, Lamc2 og Krt2-6a) ble også kontrollert med Real-Time kvantitativ RT-PCR. Primere ble designet ved bruk av Primer3 (18). cDNA ble syntetisert av oligo-dT priming ved hjelp av First Strand Synthesis Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany). Real-Time PCR ble utført ved bruk av Stratagene Mx 4000 PCR System (CA, USA) og qPCR Core Kit (Eurogentec, Seraing, Belgium). RNA isolert fra minst fem fenotypiske tannanlegg ved E18.5 og P2, ble brukt i analysen.

For å få en oversikt over endringen i ekspresjonen over tid for gener som koder for emaljeproteiner ble det også isolert RNA fra E17.5, P0 og P6. Hver analyse ble utført i tekniske og biologiske triplikater. Statistisk evaluering av signifikansen for forskjellene mellom målte Ct-verdier ble utført ved bruk av REST 2005 programmet (19).

Statistisk analyse

Statistisk analyse av mikromatrisedata ble utført på data fra triplikater som ble kombinert til et datasett. Gener som viste nettfluorescensverdier på mindre enn 300 i begge kanaler ble ikke inkludert i den videre analysen. Videre, "False discovery rate" (FDR) fra Benjamini et al (20) ble brukt for å korrigere gruppen av selekterte gener for falske positive. Bakgrunnsstøy ble trukket fra medianverdier av fluorescensintensiteten og dette ble omdannet til en log₂-skala. Videre ble log₂-verdiene z-score normalisert. Spotfire programmet ble så brukt til å lage en

ANOVA-fil som ga en oversikt over gener med signifikante forskjeller i ekspresjonsnivå ($P < 0.05$) mellom E18.5 og P2.

Bioinformatikkanalyse

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ble benyttet for å påvise signifikante assosiasjoner mellom gener som uttrykker endring i ekspresjon mellom E18.5 og P2 og ulike molekulære og cellulære funksjoner. Signaliserings- og metabolske nettverk ble også studert.

Resultater

Endringer i genekspresjon under utvikling av første molar i underkjeven

Ved å bruke ANOVA funksjonen i Spotfire var det mulig å identifisere gener som viste signifikante forskjeller ($P < 0.05$) i ekspresjonsnivå ved E18.5 og P2. Totalt viste 1217 gener signifikant forskjell i ekspresjon mellom E18.5 og P2. 678 av disse viste høyere ekspresjonsnivåer ved P2 (Tabell 1). 182 av 1217 gener var ukjente og 78 av disse var høyere uttrykt ved P2. 50 gener viste spesielt uttalte endringer i ekspresjon mellom disse to tidspunktene ($P < 0.015$) og ble hierarkisk "clustered" i et heat map (Figur 1). Kun 9 av disse viste høyere ekspresjon ved E18.5 mens gjenværende 41 gener var høyere uttrykt ved P2. Blant disse var gener som koder for emaljeproteingener ameloblastin (Ambn), amelogenin (Amelx) og enamelin (Enam). Amelx skiller seg mest ut, med størst forskjell i ekspresjon mellom E18.5 og P2. Blant gener som var sterkere uttrykt ved E18.5 var Krt2-4, Krt1-13, Rex3 og Suv39h1. Andre gener med store endringer i ekspresjonsnivå ($P < 0.015$) var Dmp1, Calb1, Wisp1, Cdh2 og Canx (Figur 2).

Molekulære og cellulære funksjoner med signifikante assosiasjoner til gener som viser lavere ekspresjon ved P2

Ved hjelp av Ingenuity Pathway Analysis ble de 539 genene som viste signifikant lavere ekspresjon ved P2 gruppert etter molekylære/cellulære funksjoner og deres signifikans i forhold til disse (Figur 3). Resultatene som er presentert i figur 3 gir følgende kategorier med høyest antall gener og/eller sterk signifikans: aminosyremetabolisme, cellesyklus, celledød, cellulær ansamling og organisering, cellulær kompromittering, cellulær utvikling, cellulær vekst og proliferering, DNA replikasjon, rekombinasjon og reparasjon, genekspresjon, molekylær transport, nukleinsyremetabolisme, posttranslasjonell modifikasjon, proteinsyntese, RNA posttranskripsjonell modifikasjon, små-molekylær biokjemi. I følgende kategorier var det ingen nedregulerte gener ved P2: proteinfolding, protein trafikkerer, RNA skade og reparasjon.

Molekylære og cellulære funksjoner med signifikante assosiasjoner til gener som viser høyere ekspresjon ved P2

Resultatene som er presentert i figur 3 gir følgende kategorier med høyest antall gener og/eller sterk signifikans som er oppregulert ved P2: aminosyremetabolisme, cellesyklus, celledød, cellemorfologi, celle-til-celle signalisering og interaksjon, cellulær ansamling og organisering, cellulær utvikling, cellulær funksjon og vedlikehold, cellulær vekst og proliferasjon, cellulær bevegelse, lipidmetabolisme, molekylær transport, posttranslasjonell modifikasjon, små-molekylær biokjemi. Av disse igjen var flest gener assosiert med celledød (116 gener), cellebevegelse (74 gener) og cellulær vekst og proliferering (62 gener). I følgende kategorier var det ingen oppregulerte gener ved P2: DNA replikasjon, rekombinasjon og reparasjon, energiproduksjon, RNA trafficking, vitamin- og mineralmetabolisme.

Validering av mikromatriseresultater med Real-Time RT-PCR

Enkelte gener som viste uttalte forskjeller i ekspresjonsnivå ble også prosessert med Real-Time RT-PCR. Det ble i tillegg til de aktuelle tidspunktene for matrisene kjørt PCR på tannanlegg fra E17.5, P0 og P6; dette for å få en oversikt over endring i genekspresjonen over tid. Resultatene fra RT-PCR korrelerer godt med mikromatrisedataene, og vi ser at de aktuelle genene har lignende ekspresjonsmønster (Tabell 2). I samsvar med tidligere funn (6) øker mRNA nivået til *Amelx* og *Ambn* dramatisk ved fødsel (P0), mens ekspresjonen til *Enam* ikke øker vesentlig før ved P2 (Figur 4). Ekspresjonen av alle tre genene fortsetter å øke ved P6. Som det også fremkom av heat map'et (Figur 1) er det *Amelx* som uttrykkes kraftigst og har størst forskjell i ekspresjon mellom E18.5 og P2.

Nettverk

I Spotfire ble det gjort et profilsøk på bakgrunn av ekspresjonsmønsteret til emaljeproteingenene *Amelx*, *Ambn* og *Enam*. 46 gener viste lignende ekspresjonsmønster som emaljeproteingenene og ble tatt med over til IPA for videre prosessering. Alle genene viste på samme måte som emaljeproteingenene høyere ekspresjon ved P2. Av de 46 valgte genene var 13 ukjente. I IPA ble det laget 2 nettverk, der det gis en oversikt over assosiasjoner mellom et utvalg av de 46 genene og deres forhold til andre gener. Det ble i tillegg knyttet assosiasjoner mellom genene og ulike signalnettverk, blant annet: Tight Junction signalisering (3 gener), VDR/RXR aktivering (5 gener), PPAR α /RXR α aktivering (3 gener), Wnt/ β -catenin signalisering (5 gener), TGF- β signalisering (3 gener), p53 signalisering (3 gener), P13K/AKT signalisering (4 gener) (Figur 5).

Diskusjon

De mest påfallende funnene fra disse resultatene er det store antallet gener som viser signifikante forskjeller i ekspresjon mellom disse to tidspunktene. Av 1217 gener som viste signifikant forskjell i ekspresjon ble 85% (1034 gener) gjenkjent av Ingenuity Pathway Analysis. 50 gener viste uttalte endringer i ekspresjonsnivå ($P < 0.015$). Flesteparten av disse viste høyere ekspresjonsnivåer ved P2 (Figur 1) hvilket betyr at økende differensiering gjennom utviklingen av tannanlegget krever deltakelse av genprodukter fra mange gener som ikke er aktive under tidlige stadier av tannutviklingen. På den andre siden koder gener som viser høyere ekspresjonsnivåer ved E18.5 (Figur 3) for proteiner som har med basale cellefunksjoner å gjøre. Her er det få gener som man ut fra tidligere kunnskaper kan koble direkte opp mot odontogenesen. I tråd med tidligere funn (6) er disse heller assosiert med basale funksjoner som for eksempel celledød, cellulær ansamling og organisering, cellulær kompromittering, cellulær utvikling, cellulær vekst og proliferering, DNA replikasjon, rekombinasjon og reparasjon, genekspresjon, molekylær transport, nukleinsyremetabolisme, posttranslasjonell modifikasjon og proteinsyntese (Figur 3).

Mikromatrise resultatene viser også at det er flere gener involvert i celledød (apoptose) ved P2 enn det er ved E18.5 (Figur 3). Apoptose er en fellesnevner ved organogenesen, og det er fra tidligere antatt at det foregår apoptose av både ameloblaster og odontoblaster under senere stadier av tannutviklingen (21). Derimot, er det flere gener assosiert med cellyklus som viser signifikant høyere ekspresjon ved E18.5 (44 gener) sammenlignet med P2 (8 gener) (Figur 3). Disse funnene foreslår direkte stimulert celledeling ved E18.5. Ekspresjon av Mki67 og Pcna, ofte brukt som markører for celledeling, viste 1.8-fold høyere ekspresjon i tannanlegget ved E18.5

(resultater ikke vist), noe som også støtter våre funn.

Resultatene i figur 3 foreslår også en klargjøring av tannanlegget til dannelse av emalje og dentin ved E18.5. Dette er i samsvar med utviklingsmessige hendelser på E18.5 hvor det skjer en økt differensiering av celler i indre emaljeorgan (4). Konklusjonene er basert på følgende grupper av nedregulerte gener ved P2: Cellesyklus (44 gener), DNA replikasjon, rekombinasjon og reparasjon (37 gener), RNA posttranskripsjonell modifikasjon (17 gener). Postnalt vil ameloblaster og odontoblaster påvirke hverandre gjensidig, bevege seg i motsatt retning og skille ut emalje og dentin. Dette gjenspeiles i resultatene fra IPA (Figur 3) ved oppregulerte gener i kategoriene: celle til celle signalering og interaksjon (32 gener) og cellebevegelse (73 gener).

Økning i ekspresjon av Amelx og Ambn (Figur 4) faller sammen med initiering av emaljesekresjon (4), og er sannsynligvis forårsaket av økt antall celler i indre emaljeepitel som differensierer til sekretoriske ameloblaster. I human tannutvikling vil en delesjonsmutasjon i amelogeningenet føre til defekter i emaljen, noe som manifesterer seg som amelogenesis imperfekta. Fra figur 5 ser vi at ratioen P2/E18.5 for Amelx og Ambn er henholdsvis 2077 og 94, noe som betyr at begge har signifikant høyere ekspresjon ved P2. Dette styrker hypotesen om at disse proteinene er involvert i dannelse av emalje.

Genene med lik ekspresjonsprofil som emaljeproteinene viste høyere postnatal ekspresjon. Disse genene kan enten direkte eller indirekte knyttes til en rekke signalsystemer (figur 5). Av størst interesse blant disse er Wnt/ β -catenin som ut i fra våre data viser seg å være meget aktiv i tannanlegget etter fødselen. Wnt/ β -catenin signalisering er essensielt for tannutviklingsmønsteret og styrer multiple stadier under tannmorfogenesen (22).

Referanser

1. HOGAN BL. Morphogenesis. *Cell* 1999; **96**(2): 225-33.
2. PISPA J, THESLEFF I. Mechanisms of Ectodermal Organogenesis. *Dev Biol* 2003; **262**(2): 195-205.
3. THESLEFF I. Epithelial-Mesenchymal Signalling Regulating Tooth Morphogenesis. *J Cell Sci* 2003; **116**(Pt 9): 1647-8.
4. COHN SA. Development of the Molar Teeth in the Albino Mouse. *Am J Anat* 1957; **101**(2): 295-319.
5. PISPA J, MIKKOLA ML, MUSTONEN T, THESLEFF I. Ectodysplasin, Edar and TNFRSF19 Are Expressed in Complementary and Overlapping Patterns During Mouse Embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 2003; **3**(5): 675-9.
6. Osmundsen H, Landin MA, From SH, Kolltveit KM, Risnes S. Changes in Gene-Expression During Development of the Murine Molar Tooth Germ. *Arch Oral Biol* 2007; **52**(9): 803-13.
7. THESLEFF I. The Genetic Basis of Tooth Development and Dental Defects. *Am J Med Genet A* 2006; **140**(23): 2530-5.
8. KRATOCHWIL K, DULL M, FARINAS I, GALCERAN J, GROSSCHEDL R. Lef1 Expression Is Activated by BMP-4 and Regulates Inductive Tissue Interactions in Tooth and Hair Development. *Genes Dev* 1996; **10**(11): 1382-94.
9. MILLS AA, ZHENG B, WANG XJ, VOGEL H, ROOP DR, BRADLEY A. P63 Is a P53 Homologue Required for Limb and Epidermal Morphogenesis. *Nature* 1999; **398**(6729): 708-13.
10. YANG A, SCHWEITZER R, SUN D, KAGHAD M, WALKER N, BRONSON RT, TABIN C, SHARPE A, CAPUT D, CRUM C, MCKEON F. P63 Is Essential for Regenerative Proliferation in Limb, Craniofacial and Epithelial Development. *Nature* 1999; **398**(6729): 714-8.
11. PETERS H, NEUBUSER A, KRATOCHWIL K, BALLING R. Pax9-Deficient Mice Lack Pharyngeal Pouch Derivatives and Teeth and Exhibit Craniofacial and Limb Abnormalities. *Genes Dev* 1998; **12**(17): 2735-47.
12. SATOKATA I, MAAS R. Msx1 Deficient Mice Exhibit Cleft Palate and Abnormalities of Craniofacial and Tooth Development. *Nat Genet* 1994; **6**(4): 348-56.13. ABERG T, CAVENDER A, GAIKWAD JS, BRONCKERS AL, WANG X, WALTOMO-SIREN J, THESLEFF I,
- D'SOUZA RN. Phenotypic Changes in Dentition of Runx2 Homozygote-Null Mutant Mice. *J Histochem Cytochem* 2004; **52**(1): 131-9.
14. BOUWMAN P, GOLLNER H, ELSASSER HP, ECKHOFF G, KARIS A, GROSVELD F, PHILIPSEN S, SUSKE G. Transcription Factor Sp3 Is Essential for Post-Natal Survival and Late Tooth Development. *EMBO J* 2000; **19**(4): 655-61.
15. DASSULE HR, LEWIS P, BEI M, MAAS R, MCMAHON AP. Sonic Hedgehog Regulates Growth and Morphogenesis of the Tooth. *Development* 2000; **127**(22): 4775-85.
16. FUKUMOTO S, KIBA T, HALL B, IEHARA N, NAKAMURA T, LONGECKER G, KREBSBACH PH, NANJI A, KULKARNI AB, YAMADA Y. Ameloblastin Is a Cell Adhesion Molecule Required for Maintaining the Differentiation State of Ameloblasts. *J Cell Biol* 2004; **167**(5): 973-83.
17. GIBSON CW, YUAN ZA, HALL B, LONGENECKER G, CHEN E, THYAGARAJAN T, SREENATH T, WRIGHT JT, DECKER S, PIDDINGTON R, HARRISON G, KULKARNI AB. Amelogenin-Deficient Mice Display an Amelogenesis Imperfecta Phenotype. *J Biol Chem* 2001; **276**(34): 31871-5.
18. ROZEN S, SKALETSKY H. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. *Methods Mol Biol* 2000; **132**: 365-86.
19. PFAFFL MW, HORGAN GW, DEMPFLER L. Relative Expression Software Tool (REST) for Group-Wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-Time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**(9): e36.
20. BENJAMINI Y, DRAI D, ELMER G, KAFKANI N, GOLANI I. Controlling the False Discovery Rate in Behavior Genetics Research. *Behav Brain Res* 2001; **125**(1-2): 279-84.
21. Liu F, Chu EY, Watt B, Zhang Y, Gallant NM, Andl T, Yang SH, Lu MM, Piccolo S, Schmidt-Ullrich R, Taketo MM, Morrisey EE, Atit R, Dlugosz AA, Millar SE. Wnt/Beta-Catenin Signaling Directs Multiple Stages of Tooth Morphogenesis. *Dev Biol* 2008; **313**(1): 210-24.
22. Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, Lesot H. Expression Patterns of BMPs in the Developing Mouse Molar. *Cell Tissue Res* 2006; **324**(1): 33-40.

Tabell 1. Gener som viser signifikant forskjell i ekspresjonsnivå ($P < 0.05$) mellom E18.5 og P2.

ANOVA funksjonen i Spotfire program ble brukt for å identifisere gener som viste signifikant forskjell i ekspresjonsnivå i høyre molar tannanlegg i underkjeven mellom E18.5 og P2. Mikromatrisene ble utført i triplikater. Gener som viste nettfluorescensverdier på mindre enn 300 i begge kanaler ble ikke inkludert i den videre analysen.

Total antall gener med signifikant forskjell i ekspresjon	1217
Antall gener med signifikant lavere ekspresjon ved P2	539
Antall gener med signifikant høyere ekspresjon ved P2	678

Tabell 2. Validering av mikromatrisedata ved bruk av RT-PCR.

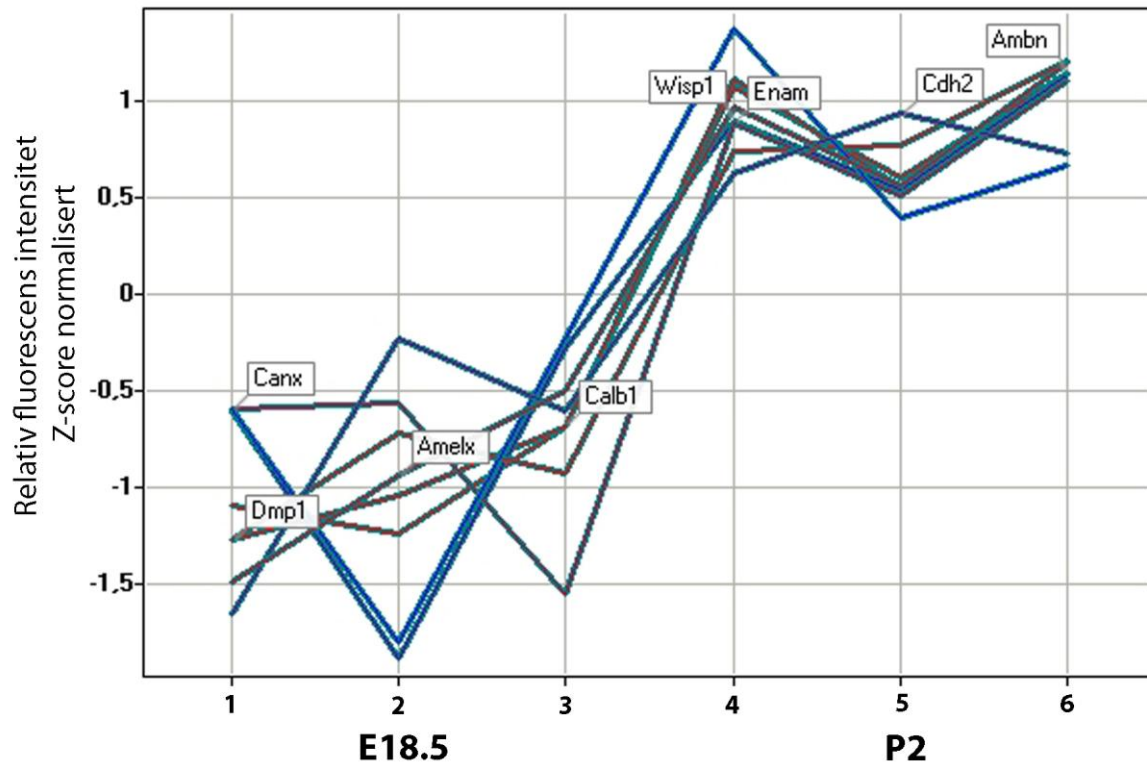
Ekspresjonsdata fra triplikat mikromatriser (gjennomsnittsratio med standardavvik indikert) og fra RT-PCR analyser for ekspresjon av *Ambn*, *Amlx*, *Enam*, *Clu*, *Rgs3*, *Vldlr*, *Fdps*, *Lamc2* og *Krt2-6a*. De tabulerte RT-PCR resultatene representerer gjennomsnittsratio (Ct-verdier ved P2 / Ct-verdier ved E18.5) fra minst fem separate tannanlegg fra både E18.5 og P2, med standardavvik indikert.

Genbetegnelse	P2 / E18.5	
	Mikromatrise data	RT-PCR data
Ambn	94 ± 68	421 ± 247
Amlx	2077 ± 259	6010 ± 1050
Enam	65 ± 23	143 ± 53
Clu	151 ± 86	73 ± 42
Rgs3	4.70 ± 3.32	1.77 ± 0.43
Vldlr	1.65 ± 1.21	2.78 ± 0.30
Fdps	0.60 ± 0.08	0.44 ± 0.22
Lamc2	8.80 ± 6.01	4.20 ± 2.11
Krt2-6a	0.14 ± 0.03	0.07 ± 0.02

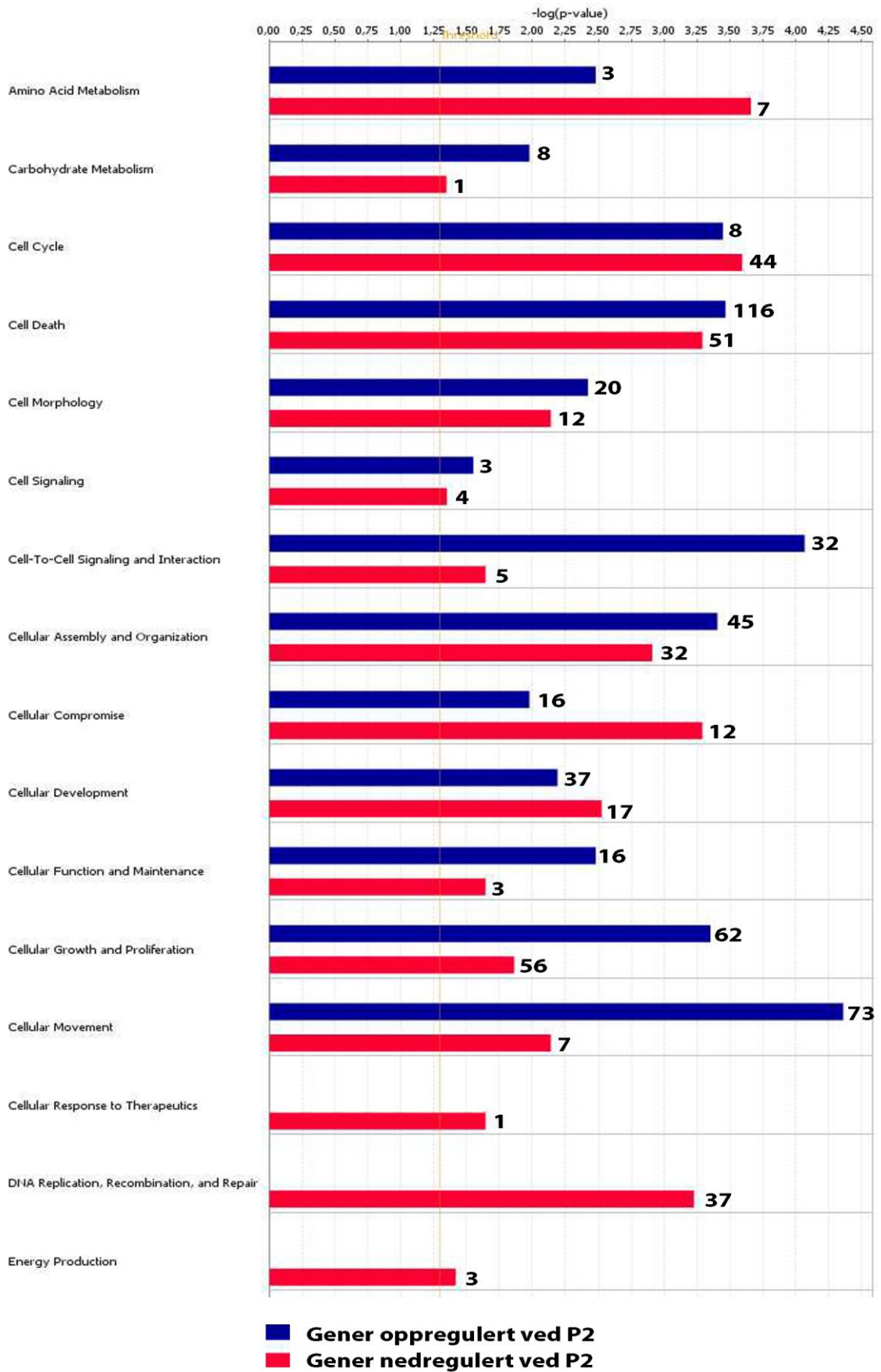
Figur 1



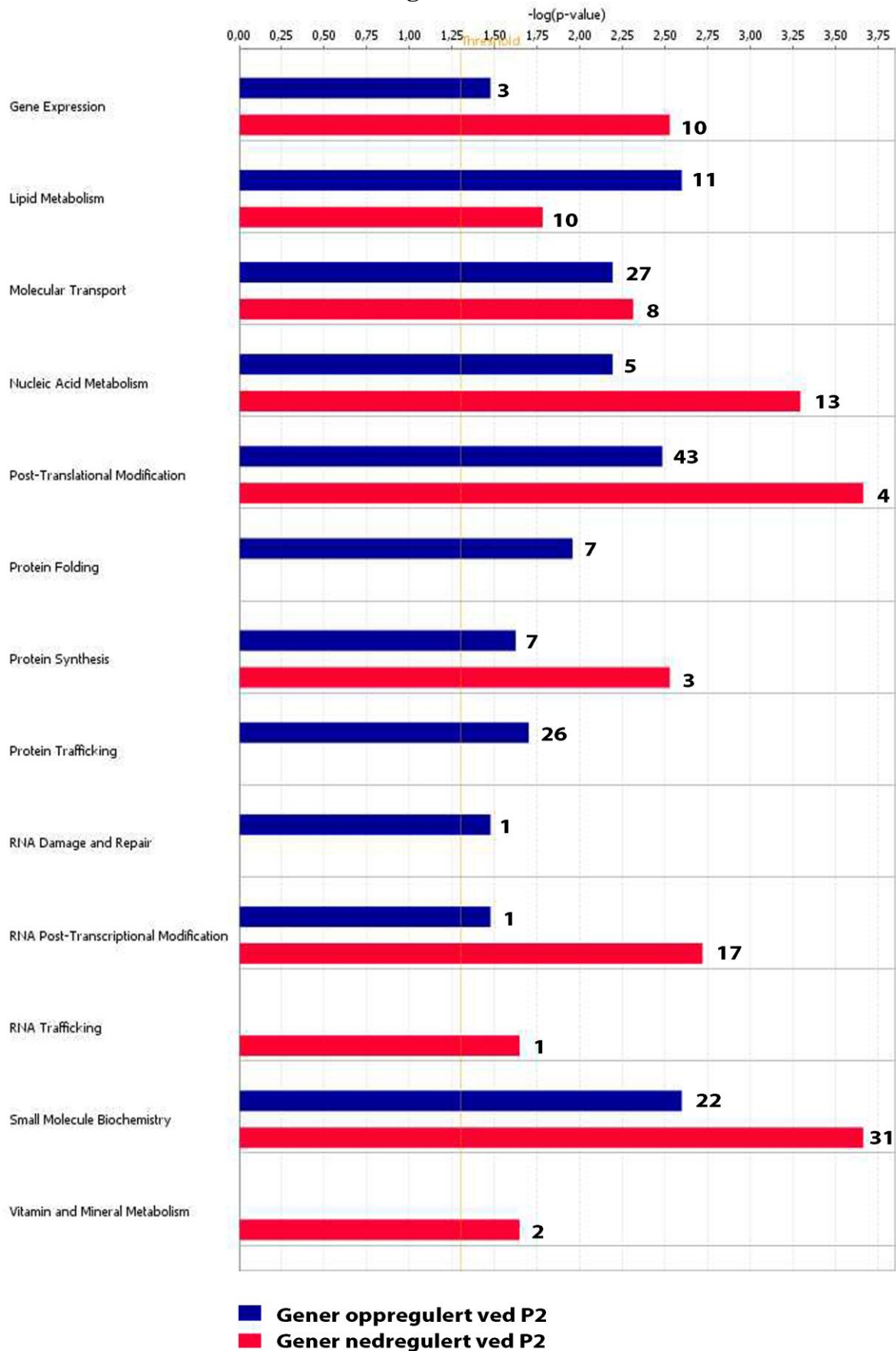
Figur 2



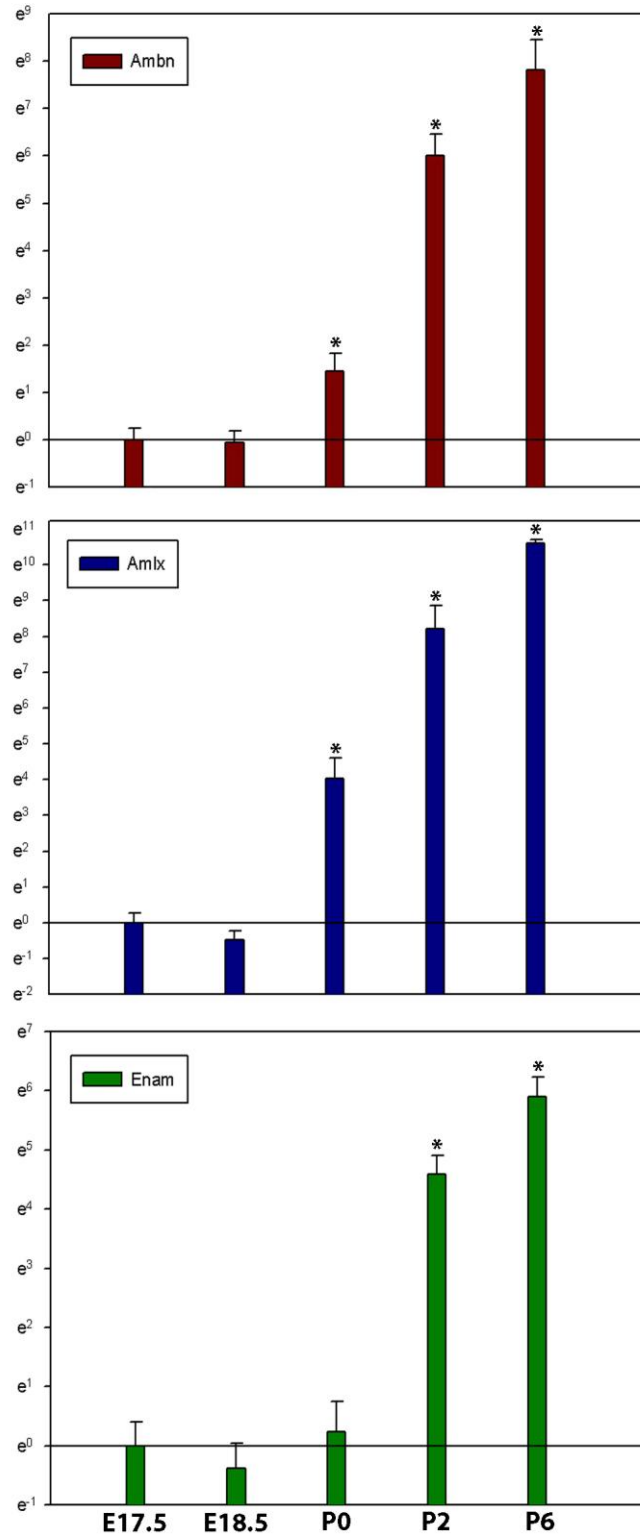
Figur 3



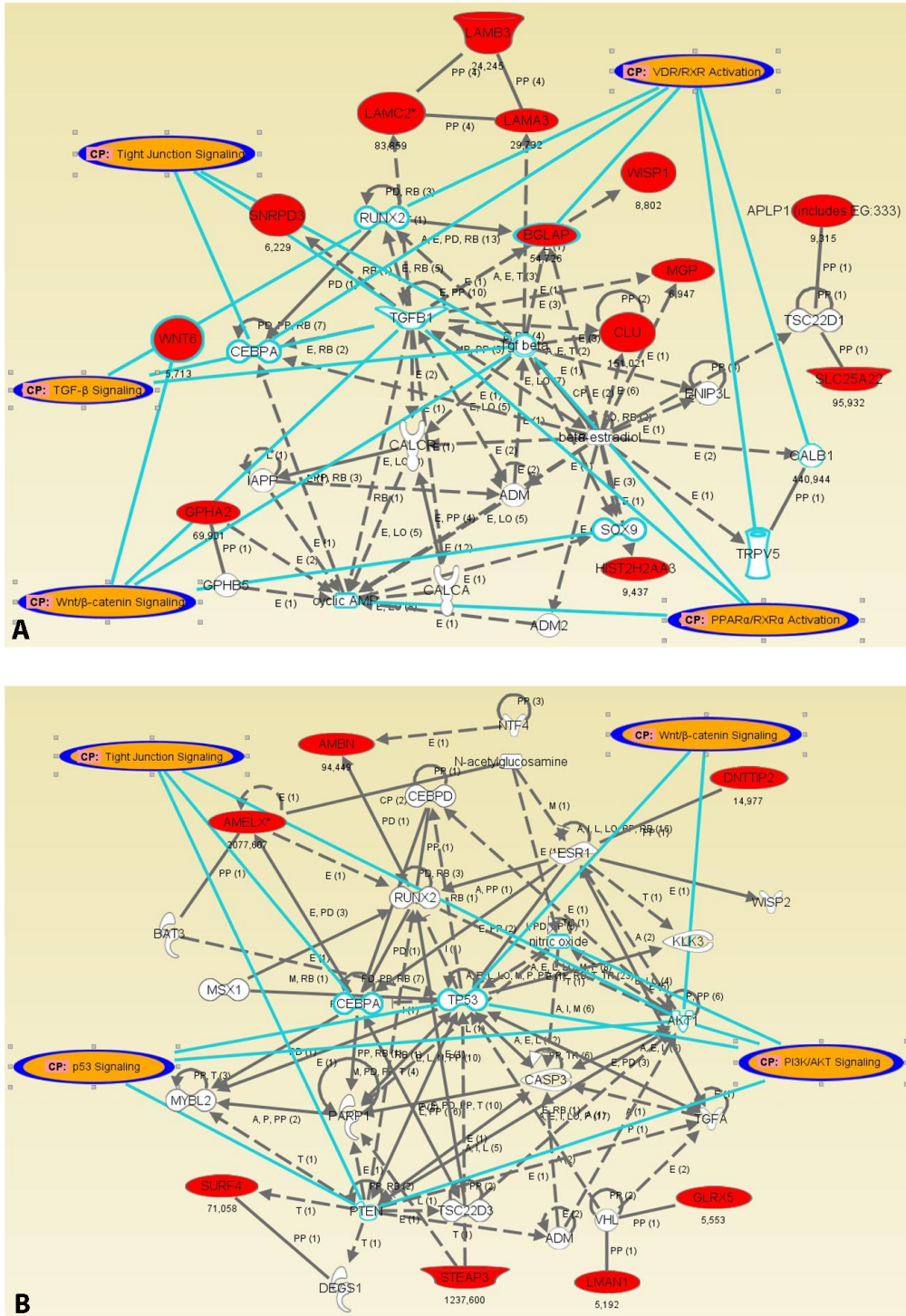
Figur 3 forts.



Figur 4



Figur 5



Figurtekster

Fig. 1. Heat map fra hierarkisk "clustering" av gener som viser signifikant forskjell i ekspresjon mellom E18.5 og P2.

ANOVA ble brukt til å identifisere gener med uttalte ekspresjonsforskjeller mellom disse to utviklingsstadiene under odontogenesen av første molar i underkjeven hos mus. Dette søket resulterte i 50 gener av hvilke 9 viste høyere ekspresjon ved E18.5 mens gjenværende 41 viste høyere ekspresjon ved P2. Fargene indikerer relativ fluorescens intensitet; grønn: lav ekspresjon, svart: middels ekspresjon, rød: høy ekspresjon.

Fig. 2. Komparativ genekspressjon for Dmp1, Canx, Amelx, Calb1, Wisp1, Enam, Cdh2 og Ambn mellom E18.5 og P2.

I spotfire ble 50 gener som viste spesielt uttalte endringer i ekspresjon ($P < 0.015$) mellom disse to tidspunktene identifisert.. Blant disse var gener som koder for emaljeproteiner ameloblastin (Ambn), amelogenin (Amelx) og enamelin (Enam). Figuren viser 7 av disse genene hvor alle har lignende ekspresjonsmønster og er høyere uttrykt ved P2 sammenlignet med E18.5.

Fig. 3 Cellulære og molekylære funksjoner assosiert med gener som viser signifikant forskjell i ekspresjon mellom E18.5 og P2.

Ved å bruke ANOVA funksjonen i Spotfire var det mulig å identifisere gener som viste signifikante forskjeller ($P < 0.05$) i ekspresjonsnivå ved E18.5 og P2. Disse genene ble så behandlet videre i Ingenuity Pathway Analysis hvor de ble koblet til ulike molekylære/cellulære funksjoner. Figuren viser antall gener som er oppregulert eller nedregulert og deres signifikans i forhold til de aktuelle kategoriene.

Fig. 4 Tidskurve over endringer i ekspresjon for emaljeproteingener (Amelx, Ambn og Enam) ved bruk at RT-PCR.

Det ble i tillegg til de aktuelle tidspunktene for matrisene kjørt RT-PCR på tannanlegg fra E17.5, P0 og P6; dette for å få en oversikt over endring i genekspressjonen over tid.

Fig. 5 Funksjonelt nettverk derivert ved bruk av gener med lignende ekspresjonsprofil som emaljeproteingenene.

I Spotfire ble det gjort et profilsøk på bakgrunn av ekspresjonsmønsteret til emaljeproteingenene Amelx, Ambn og Enam. 46 gener viste lignende ekspresjonsmønster som emaljeproteingenene og ble tatt med over til Ingenuity Pathway Analysis (IPA) for videre prosessering. I IPA ble det laget 2 nettverk, der det gis en oversikt over assosiasjoner mellom et utvalg av de 46 genene og deres forhold til andre gener. Det ble i tillegg knyttet assosiasjoner mellom genene og ulike signalnettverk. Rød farge indikerer gener som viser høyere ekspresjon ved P2 sammenlignet med E18.5. Ekspresjonsratio som indikerer forskjellen mellom disse to tidspunktene er angitt under hvert gen.