

RNF43-geenin mutaatioiden yhteys hammaspuutoksien syntyyn

Anna Koskenranta

HLK

Suu- ja leukasairauksien osasto

Helsinki 1.11.2020

Tutkielma

Ohjaajat: Dosentti Pekka Nieminen, professori David Rice

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

anna.koskenranta@helsinki.fi

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty | | |
| Lääketieteellinen tiedekunta/ Suu- ja leukasairauksien osasto | | |
| Tekijä – Författare – Author | | |
| Anna Koskenranta | | |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title | | |
| RNF43-geenin mutaatioiden yhteys hammaspuutoksien syntyyn | | |
| Oppiaine – Läroämne – Subject | | |
| Ortodontia | | |
| Työn laji – Arbetets art – Level | Aika – Datum – Month | Sivumäärä-Sidoantal - Number of pages |
| Tutkielma | Marraskuu 2020 | 34+1 |
| Tiivistelmä – Referat – Abstract | | |
| <p>Hammaspuutokset ovat yleisin kraniofakiaalinen anomalia. Ne voivat esiintyä sekä erillisinä anomalioina että oireyhtymien yhteydessä. Niiden vaikutus elämänlaatuun on negatiivinen muun muassa heikentyneen suunterveyden ja sosiaalisten suhteiden vaikeutumisen kautta.</p> <p>Pekka Niemisen tutkimusryhmä Helsingin yliopistosta löysi hammaspuutospotilaiden perimätutkimuksissa kaksi uutta mahdollisesti hammaspuutoksia aiheuttavaa geenimutaatiota geenissä <i>RNF43</i>. RNF43-proteiini on normaalisti toimiessaan osa hampaiden kehitykseen ja kasvuun vaikuttavan WNT-viestinnän negatiivista takaisinkytkentää. Mutaatioiden arvellaan häiritsevän hampaiden kehitystä WNT-viestinnän aktiivisuuden muuntelemisen kautta. Tutkimuksessamme tutkimme mutaatioiden vaikutusta RNF43-proteiinin määrään ja sijoittumiseen solussa ja pyrimme näin todistamaan mutaatioiden patogeenisyyden. Käytimme tutkimuksessa HEK293-soluja. Transfektoimme niitä villityypin ja kahden eri mutaation plasmideilla, jotka sisälsivät myös GFP-proteiinin. Värjäsimme niitä membraani- ja tumaväriaineilla, jotta pystyimme hahmottamaan GFP:n ja siten proteiinin sijaintia solussa fluoresenssi- ja konfokaalimikroskooppien avustuksella.</p> <p>Mutaatioilla ei havaittu olevan vaikutusta RNF43:n tuotannon määrään tai sijoittumiseen soluissa, emmekä näin ollen voineet tässä tutkimuksessa todentaa niiden patogeenisyyttä. Veimme tutkimuksellamme kuitenkin kyseisten mutaatioiden ja hammaspuutosten genetiikan tutkintaa eteenpäin. Tästä tutkimuksesta saatujen havaintojen pohjalta voidaan <i>RNF43</i>-geenin mutaatioiden tutkimusta jatkaa muilla menetelmillä.</p> | | |
| Avainsanat – Nyckelord – Keywords | | |
| RNF43 protein human, Tooth Agenesis | | |
| Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited | | |
| HELDA–Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto | | |
| Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information | | |

SISÄLLYSLUETTELO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 Johdanto..... | 1 |
| 2 Kirjallisuuskatsaus | 2 |
| 2.1 Hampaan normaali kehitys..... | 2 |
| 2.2 Hampaan kehitystä ohjaavat signaalireitit | 6 |
| 2.3 Tähän mennessä tunnistetut erillistä hammaspuutosta aiheuttavat mutaatiot | 10 |
| 2.4 Geenitaustan tunnistaminen | 11 |
| 2.5 RNF43..... | 13 |
| 3 Tutkimuksen tavoitteet..... | 15 |
| 4 Tutkimusaineisto- ja menetelmät | 15 |
| 4.1 Edeltävän tutkimuksen tulokset..... | 15 |
| 4.2 Soluviljely..... | 17 |
| 4.3 Transfektointi | 18 |
| 4.4 Värjäykset | 20 |
| 5 Tulokset | 22 |
| 5.1 Tulkinta fluoresenssimikroskoopilla | 22 |
| 5.2 Tulkinta konfokaalimikroskoopeilla | 26 |
| 6 Pohdinta | 31 |
| 6.1 Tutkimuksen virhelähteet | 31 |
| 6.2 Tutkimustulosten merkitys..... | 33 |
| 6.3 Johtopäätökset | 34 |
| Lähdeluettelo | 35 |

1 Johdanto

Hammaspuutokset ovat yleisin synnynnäinen kraniofakiaalinen anomalia. 25 %:lla väestöstä yksi tai useampi viisaudenhammas jää kehittymättä. Riippuen tutkitusta väestöstä 1.6–9.6 %:lla ihmisistä esiintyy lievää hammaspuutosta eli hypodontiaa. Se tarkoittaa 1–5 pysyvän, muun kuin viisaudenhampaan, puutosta. (1) Noin promililla väestöstä esiintyy oligodontiaa eli vakavaa hammaspuutosta. Tällöin pysyviä hampaita, lukuun ottamatta viisaudenhampaita, puuttuu kuusi tai enemmän. (1,2) Puutokset voivat ilmentyä erillisinä, ilman oireyhtymää esiintyvinä anomaliaina, mutta niitä tavataan myös usean eri oireyhtymän yhteydessä (2).

Hammaspuutoksia tutkittaessa niiden on havaittu johtuvan pääasiassa geneettisistä mutta myös ympäristön aiheuttamista syistä (3). Genetiikasta tällä hetkellä eniten tietoa on syndroomien yhteydessä havaituista hammaspuutoksista sekä erillisesti esiintyvistä oligodontiasta. Tällä hetkellä tiedetään, että erillistä hammaspuutosta aiheuttavat *MSX1*-, *PAX9*-, *AXIN2*-, *WNT10A*-, *EDA*- ja *EDAR*-geenien mutaatiot. (1,2,4) On kuitenkin paljon hammaspuutospotilaita, joiden mutaatioita ei ole tunnistettu (4). Erityisesti hypodontiassa kyseessä voi olla myös monitekijäinen etiologia, jolloin koodaavan alueen mutaatioiden sijasta taustalla voi olla geenisäätelyyn vaikuttavia riskitekijöitä (3).

Hammaspuutokset vaikuttavat henkilön elämänlaatuun negatiivisesti. Vaikutukset kohdistuvat henkilön ulkonäköön sekä kykyyn puhua ja syödä. (1) Oligodontialla on myös merkittävä negatiivinen vaikutus suunterveyteen, sosiaalisiin suhteisiin ja mielenterveyteen (1,5,6).

Pekka Niemisen tutkimusryhmä on analysoinut erillisistä hammaspuutoksista kärsivien potilaiden perimää. Tutkimuksissa löydettiin kaksi uutta, todennäköisesti hammaspuutoksia aiheuttavaa mutaatiota *RNF43*-geenistä. Tämän tutkielman tavoitteena oli jatkaa perimänlaajuiseen mutaatiotutkimukseen pohjautuen

hammaspuutosten genetiikan tutkimusta ja tutkia *RNF43*-geenin mutaatioiden patogeenisyyttä soluviljelyyn avulla.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Hampaan normaali kehitys

Hampaat kehittyvät alkion ektodermistä peräisin olevasta hammasepiteelistä ja sen alla sijaitsevasta hermostopienasta peräisin olevasta mesenkymaalisolukosta. Näiden kahden solukerroksen välinen edestakainen vuorovaikutus saa aikaan hampaan kehityksen alkamisen ja säätelee suuren osan siitä. (7,8)

Hampaan kehitys voidaan jakaa karkeasti kruunun ja juuren kehitykseen. Kruunu muodostuu pääosin sikiöaikana, kun taas juurten kehitys alkaa syntymän jälkeen. (9) Maitohampaiden kehitys alkaa 5–8-viikon ikäisenä alkiona. Mineralisaatio saa alkunsa sikiöviikoilla 14–18 ja on puoliksi valmis syntymään mennessä. Maitohampaiden juurten kehitys on hampaan mukaan valmis 1.5–3 –vuotiaana. Pysyvien hampaiden kehitys alkaa 20. sikiöviikon ja 10. syntymän jälkeisen kuukauden välillä. Niiden mineralisaatio alkaa hampaan mukaan syntymän ja 2–3. ikävuoden välillä. Pysyvien hampaiden kruunun kehitys on valmis noin 5–7 –vuotiaana. Viisaudenhampaiden kehityksen aikataulussa on suuria vaihteluita. (3)

Initiaatio ja morfogeneesi

Hampaiden kehitys alkaa hammasjuosteen muodostumisella eli oraaliepiteelin paksuuntumisella tulevien hampaiden kohdalla. Ensimmäisenä initiaation aikaansaavaa signaalimolekyyliä eli BMP4:ää tuottaa oraaliepiteeli tulevien etuhampaiden kohdalla. (9) Initiaation aikoihin oraaliepiteeli työntyy paksuuntuessaan alla olevaan

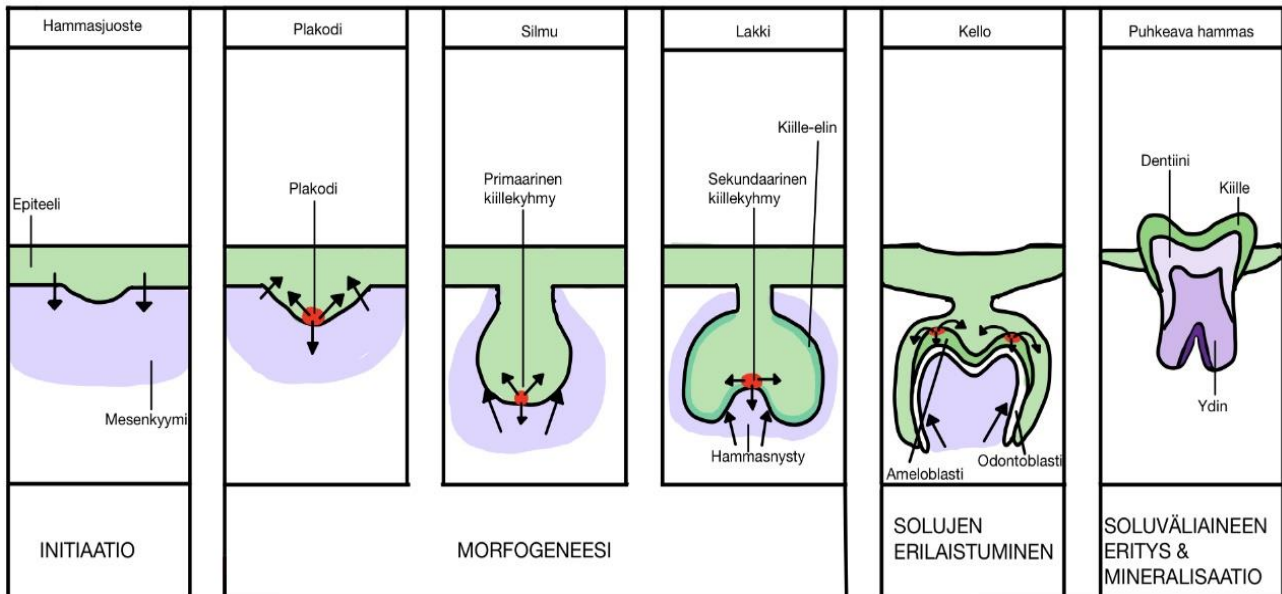
mesenkyymiin ja muodostaa plakodin. Osa plakodin soluista alkaa tuottaa signaalimolekyylejä muodostaen varhaisen signaalikeskuksen. Plakodin muodostuminen saa aikaan mesenkyymisolujen tiivistymisen sekä kyvyn ohjata hampaan kehitystä tuottamalla signaalimolekyylejä. (3,8,9) Tärkeä on myös mesenkyymistä ilmentyvä transkriptiotekijä PAX9, joka edelleen lisää mesenkyymien tiivistymistä. (9). Plakodin tuottama signaalimolekyyli Shh saa pääasiassa aikaan epiteelisolujen jakautumisen ja niiden työntymisen mesenkyymiin. Tällöin hampaan kehitys siirtyy silmuvaiheeseen. (3,8,9)

Silmuvaiheessa epiteelisolujen ympärillä olevat mesenkyymisolut tiivistyvät. Mesenkyymisolujen indusoimana silmun päähän kehittyy seuraavana signaalikeskuksena toimiva primaarinen kiillekyhmy. Primaarinen kiillekyhmy tuottaa ympäröivän epiteelin jakautumista edistäviä signaalimolekyylejä mm. Shh:ta, Fgf:ää ja Wnt-perheen molekyylejä. Sen omat solut eivät jakaannu ja näin epiteeli laskostuu, minkä johdosta servikaalisilmukat muodostuvat. Epiteelin yhä jakautuessa se muodostaa lakkimaisen rakenteen. (3)

Lakkivaiheessa epiteelisolujen muodostama kiille-elin kehittyy mesenkyymien ympärille. Kiille-elimeen syntyy ulompi ja sisempi kiille-epiteeli ja niiden väliin jäävä stellate reticulum. (8) Epiteelisolujen alle jäävistä mesenkyymisolusta kehittyy mesenkymaalinen hammasnysty. Kiille-elintä ympäröivästä mesenkyymistä kehittyy hampaan follikkeli. Hammasnystystä kehittyvät myöhemmin hampaan ydin ja odontoblastit ja follikkelista kehittyvät parodontaalikudokset. (10) Lakkivaiheessa primaarinen kiillekyhmy kypsyy sekundaarisiksi kiillekyhmyiksi, jotka edelleen toimivat kasvua edistävinä signaalikeskuksina. Sekundaariset kiillekyhmyt syntyvät monikuspisissa hampaissa tulevien kusprien kohdalle. Kasvun jatkuessa kehitys saavuttaa kellovaiheen. (3,8,10)

Kellovaiheessa sekundaariset kiillekyhmyt erittävät signaaliperheitä useista eri signaaliperheistä, kuten Fgf-, BMP- ja Wnt-perheistä. (9) Tulevien signaalien indusoimana määräytyvät tulevien kusprien paikat, jotka määrittävät tulevan kruunun

muodon. Signaalien vaikutuksesta myös ameloblastit ja odontoblastit alkavat erilaistua; ameloblastit epiteelistä ja odontoblastit mesenkyymistä. (3,8) Solujen erilaistuminen ja väliaineen tuotto jatkuu kunnes hampaan kehitys on valmis (10). Kuvassa 1 on kuvattu hampaan kehityksen vaiheet havainnollistavin kuvin.



Kuva 1. Hampaiden kehitys.

Mineralisaatio

Hampaan mineralisaatio alkaa myöhäisen kellovaiheen aikana sekundaaristen kiillekyhmyjen erittämien signaalimolekyylien vaikutuksesta. Solujen erilaistuminen ja hampaan mineralisaatio alkavat hampaan kruunun nystermien kärjistä. Epiteelistä erilaistuneet ameloblastit tuottavat kiillettä ja hammasnystystä peräisin olevat odontoblastit dentiiniä. Kudosten muodostus etenee eri suuntiin: ameloblastit muodostavat kiillettä loitontuen kohti hampaan pintaa ja odontoblastit muodostavat dentiiniä edeten kohti ydintä. Erilaistumista säätelevät epiteeli-mesenkyymäli-vuorovaikutukset sekä epiteelin alainen tyvikalvo, joka vaikuttaa solujen polarisaatioon. (7,8)

Odontoblastien erilaistuminen on tiukasti yhteydessä hampaan morfogeneesiin. Erilaistuessaan odontoblasteista tulee postmitoottisia ja kolumnaarisia ja niiden tuma siirtyy epiteelistä pois päin. Tällöin solut alkavat erittää predentiiniä, joka myöhemmin

mineralisoituu dentiiniksi. Solujen edetessä yhä kohti ydintä ne jättävät jälkeensä ulokkeet dentiinin sisälle, joista muodostuvat dentiinitubulukset. Kun dentiinin erityis on valmis, solut jäävät paikoilleen muodostaen kerroksen hampaan ytimen ja dentiinin väliin. (10)

Ameloblastien erilaistuminen on myös tiukasti yhteydessä morfogeneesiin ja dentinogeneesiin. Ameloblastit muuttuvat postmitoottisiksi samoihin aikoihin kuin odontoblastit aloittavat predentiinin muodostuksen. Solujen tuma ja soluelimet polarisoituvat ja solut muuttuvat pitkiksi ja kolumnaariksi. Solut alkavat erittää kielteen matriksia predentiiniin pinnalle. Kiille mineralisoituu hyvin nopeasti sen erittämisen jälkeen. Kun kiille on kokonaisuudessaan muodostunut, ameloblastit jäävät kielteen pinnalle säädellen kielteen lopullista mineralisaatiota eli maturaatiota. Hampaan puhjetessa suuhun ameloblastikerros hajoaa. (10)

Odontoblastien erilaistumisesta vastaavien transkriptiotekijöiden tutkimus on yhä käynnissä. *In vitro* kokeissa on kuitenkin osoitettu, että erityisesti BMP-perheen signaalimolekyylit ovat merkittävä osa odontoblastien lopullisen erilaistumisen ohjaamista. Myös WNT-signaalimolekyyliperheen molekyylien on havaittu hiirissä tehdyissä kokeissa vaikuttavan odontoblastien erilaistumiseen ja dentiinin tuoton määrään. Ameloblastien erilaistumista säätelevät myös BMP-perheen signaalimolekyylit, jotka välittävät viestejä kaksisuuntaisesti epiteelin ja mesenkyymin välillä. (9) Vaadittavaa BMP4:ää tuottavat mahdollisesti odontoblastit (10). Myös BMP:n alavirran proteiineilla, Runx2 ja Osterix, on havaittu hiirikokeissa olevan vaikutusta kielteen kehittymiseen. (9)

Hampaan juuren muodostus alkaa, kun mineralisaatio ja ameloblastien erilaistuminen on saavuttanut tulevan kruunun kervikaaliosan. Tällöin muodostuu HERS eli Hertwig's epithelial root sheath eli juurituppi. HERS muodostuu epiteelisolukerroksesta. (7) HERS toimii signaalikeskuksena tuottaen viestejä, jotka saavat aikaan juuren pidentymisen (9). Tällöin HERS'in solut eivät enää erilaistu ameloblasteiksi, mutta epiteeli jatkaa jakautumistaan. Tämä johtaa servikaalisilmukkamaisen rakenteen muodostumiseen,

mutta ilman välitilan stellate reticulum soluja. (7) Juuren yhä kasvaessa HERS:in solut menettävät kontaktin kruunun kiille-epiteelin kanssa. Tämä mahdollistaa hampaan follikkelin solujen kontaktin dentiinin pinnan kanssa, jolloin ne alkavat erilaistua sementoblasteiksi. (10) Epiteeli indusoi odontoblastien erilaistumisen ja dentiinin muodostumisen juuren alueelle. Juuren pinnalla sijaitsevat hammasfollikkelista erilaistuneet sementoblastit, jotka tuottavat sementin juuren pintaan kiilteen sijasta (7).

Juuren kehityksestä ja morfogeneesistä vastaavat HERS:in ja mesenkyymien väliset interaktiot. (10) Juuren muodostumiseen vaikuttavat signaalimolekyylit ovat suurelta osin vielä epäselviä. On kuitenkin havaittu, että HERS:in muodostuksen aikana BMP-signalointi on aktiivisena sekä epiteelissä, että mesenkyymissä. (9) Sementoblastien erilaistumiseen vaikuttavat todennäköisesti HERS:in tuottamat signaalit. (10)

Hampaan kehitys indusoi luun muodostuksen ympärilleen. Mikäli hammas ei kehity, jää myös läheinen alveoliluu kehittymättä. Juuren sementin ja alveoliluun väliin kehittyy periodontaaliligamentti, mikä kiinnittää hampaan luuhun. (7,8)

2.2 Hampaan kehitystä ohjaavat signaalireitit

Tärkeimmät ihmisillä kehitystä säätelevät signaalireitit ovat WNT, BMP, Shh ja FGF. Signaalireitit määräävät kudoksen muovautumista vaikuttamalla transkriptiotekijöiden ilmentymiseen niiden geenien ilmentymisen säätelyn kautta. (8) Erityisesti hampaiden kehitykseen liittyviä signaalireittejä on kyetty tutkimaan lähinnä hiirillä (11). Niillä hampaiden kehityksen on havaittu liittyvän ainakin WNT-, BMP-, FGF-, Shh- ja EDA-signaalireitteihin (8). Hammaspuutoksista kärsivillä ihmisillä on löydetty mutaatioita näiden samojen signaalireittien molekyyleistä (4).

Hiirillä tehdyissä tutkimuksissa kaikilla viidellä signaalireitillä on havaittu olevan yhteys hampaan kehityksen alkamiseen. Tällöin tapahtuu odontogeenisen potentiaalin eli hampaan muodostamiskyvyn siirtyminen hammasepiteeliltä hammasmesenkyymiin.

Myöhemmin morfogeneesiä ohjaavat hammasepiteeliin kehittyvät signaalikeskukset ilmentävät molekyylejä myös kaikista viidestä signaaliperheestä. Signaalikeskusten viestien kanssa vuorovaikuttavat mesenkyymien ilmentävät signaalimolekyylit ovat peräisin BMP-, Fgf- ja aktiviini-signaaliperheistä. (8)

WNT-viestintä

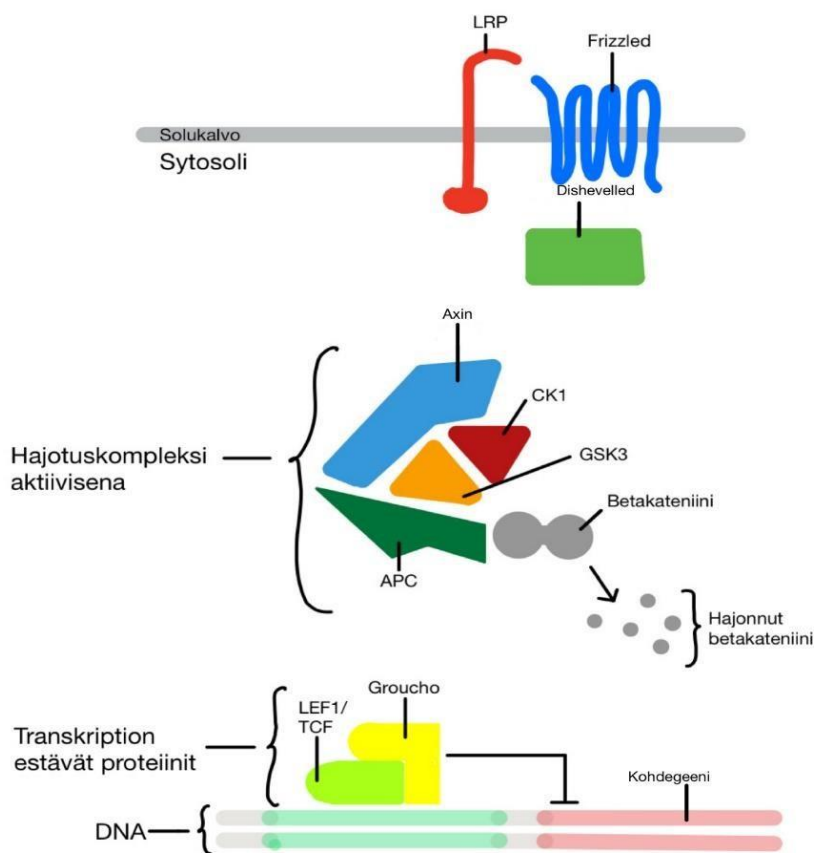
RNF43-proteiini säätelee normaalisti toimiessaan WNT-viestinnän aktiivisuutta negatiivisen takaisinkytkennän kautta (11). Tutkielmassani tutkittavan RNF43:n mutaation ajatellaan vaikuttavan WNT-viestinnän aktiivisuuteen. Siksi keskityn kirjallisuuskatsauksessa erityisesti tämän signaalireitin toimintaan.

WNT-viestintä toimii yleisesti ihmisessä kudoksen kasvua lisäävänä ja sen muotoa määrävänä tekijänä. Sen viestit vaikuttavat soluihin useissa eri solusyklin vaiheissa. (12) Ihmisellä on 19 erilaista WNT-proteiinia, joilla on erilaiset rakenteesta ja ilmentymisestä riippuvat, mutta usein päällekkäin menevät vaikutukset (13).

WNT-proteiinit kykenevät aktivoimaan ainakin kaksi erilaista signaalireittiä: Wnt/ β -kateniini -reitin ja planar polarity -reitin. Tunnetumpi näistä on Wnt/ β -kateniini -reitti, joka säätelee geenien ilmentymistä transkriptiotekijä beetakateniinin ja sen proteolyyysin kautta. Planar polarity -reitti taas koordinoi solujen polarisaatiota epiteelissä ja toimii Rho-perheen G-proteiinien kautta. (13) *RNF43*:n mutaatioiden oletetaan tutkimuksemme tapauksessa vaikuttavan lähinnä Wnt/ β -kateniini -reittiin, joten käsittelen pelkästään sen tarkemmin.

Wnt/ β -kateniini -reitin β -kateniini on pysyvässä muodossaan solujen välisissä liitoksissa. Ilman WNT-viestintää muualla sytoplasmassa sijaitsevana se hajoaa. Hajoaminen riippuu hajotuskompleksista, johon kuuluu ainakin neljä erilaista proteiinia: aktiiviset kaseinikinaasi 1 (CK1) ja glykogeensyntaasikinaasi 3 (GSK3) sekä organisoitumisproteiinit Axin ja adenomatoottinen polypoosi coli (APC), jotka pitävät

kompleksin yhdessä. Hajotuskompleksi sitoutuu β -kateniiniin WNT-signaloinnin puuttuessa. β –kateniini fosforyloituu ensin CK1-proteiinin toimesta ja sen jälkeen GSK3:n toimesta. Fosforylaatio ohjaa β –kateniinin ubiquitinaatioon. Ilman WNT-viestintää, sen tumassa olevat kohdegeenit pysyvät inaktiivisina transkriptiota estävien proteiinien avulla. Kompleksiin kuuluu LEF1/TCF-perheen transkriptiosäätelijä ja siihen kiinnittynyt ko-repressoriproteiini Groucho. (13) Kuva 2 havainnollistaa tilannetta solussa epäaktiivisen WNT-signaloinnin aikana.

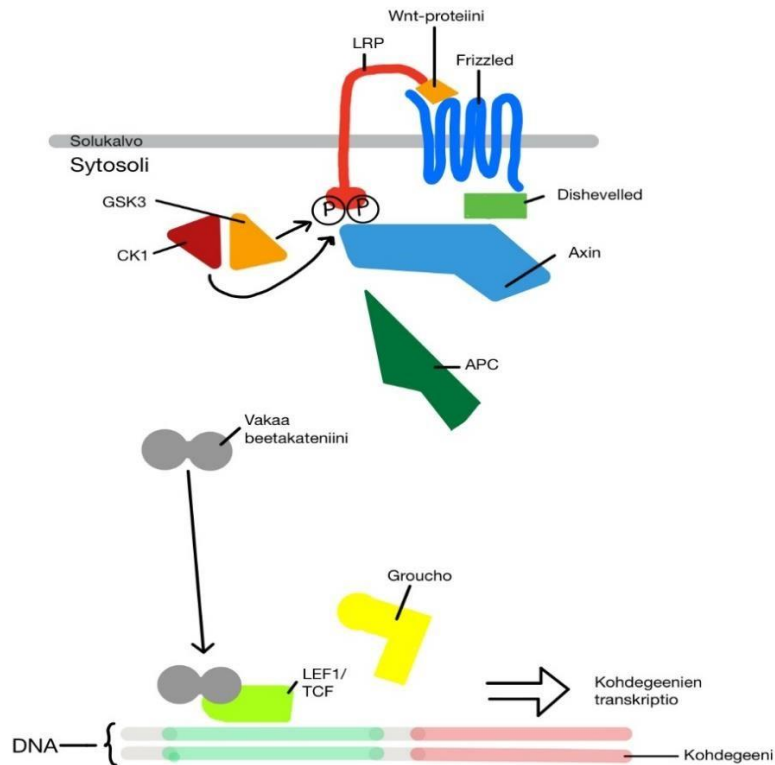


Kuva 2. Wnt/ β -kateniini –signaalireitti inaktiivisena ilman Wnt-signaalia

Wnt/ β -kateniini –reitissä viestintä alkaa, kun WNT-proteiinit sitoutuvat Frizzled –perheen reseptoriin ja ko-reseptori LRP:hen eli LDL-reseptoriin liittyvään proteiiniin (LDL-receptor-related protein). Sen jälkeen säätelyproteiini Dishevelled kiinnittyy reseptorikompleksiin, mikä auttaa signaalin etenemisessä eteenpäin. Samalla LRP:n solunsisäinen osa fosforyloituu β -kateniinin hajotuskompleksissa sijaitsevien CK1:n ja GSK3:n fosforyloimana sekä hajotuskompleksin Axin kiinnittyy reseptorikompleksiin ja inaktivoituu. Näin β -kateniinin hajotuskompleksi purkautuu ja β -kateniinin hajoaminen

esty, jolloin se pääsee tumaan. Tumassa se sitoutuu LEF1/TCF transkriptiotekijään irrottaen Groucho-proteiinin ja aktivoi sitä kautta kohdeproteiinien transkription. (13)

Kuva 3 havainnollistaa aktiivista WNT-signalointia.



Kuva 3. Wnt/β-kateniini -signaalireitti aktiivisena

WNT-viestintää ilmenee hampaan kehityksessä initiaatiosta alkaen odontoblastien ja ameloblastien erilaistumiseen asti (7). WNT-viestinnän signaalimolekyylejä on hiiri- ja soluviljelytutkimuksissa havaittu hampaan kehityksen alkuvaiheessa odontogeenisen potentiaalin siirtyessä hammasepiteeliltä hammasmesenkyymille sekä hampaan morfogeneesin signaalikeskuksien (plakodi, primaarinen kiillekyhmy, sekundaarinen kiillekyhmy) tuottamana. Myös signaalikeskuksien muodostumisen on havaittu mahdollisesti alkavan WNT-signaloinnin indusoimana. (8) Wnt-β-kateniini -reitin loss of function –mutaatioiden on havaittu häiritsevän hampaan kehitystä johtaen hypodontiaan, kun taas yliaktivaation on havaittu liittyvän ylimääräisten hampaiden syntymiseen (14).

2.3 Tähän mennessä tunnistetut erillistä hammaspuutosta aiheuttavat mutaatiot

Erillisestä hammaspuutoksesta kärsivien ihmisten perimää tutkittaessa on löydetty useita mutaatioita aiemmin mainittuihin signaalireitteihin vaikuttavista molekyyleistä (1,2). Varmistettuja mutaatioita on löydetty ainakin *MSX1*-, *AXIN2*, *EDARADD*-, *PAX9*-, *EDA*-, *EDAR*- ja *WNT10A*-geeneistä. Nämä mutaatiot ovat joko lukukehyksen katkaisevia loss-of-function mutaatioita tai yhden aminohapon vaihdoksen aiheuttavia missense-mutaatioita ja *WNT10A*:ta lukuun ottamatta heterotsygoottisia. Useimmin mutaatioita erillisen hammaspuutoksen yhteydessä on löydetty *WNT10A*-geenistä, kun taas *AXIN2* mutaatiot ovat erittäin harvinaisia. (4)

PAX9 koodaa, kuten aiemmin mainittu, transkriptiotekijää, jota hammasmesenkyymi ilmentää. (9) Mutaatiot tässä geenissä on yhdistetty erityisesti molaarien ja premolaarien kehityksen pysähtymiseen silmuvaiheeseen. (4, 15) *MSX1* on tiivistyvän ektomesenkyymien ilmentämä geeni. Mutaatiot tässä geenissä on yhdistetty vakaviin hypodontian muotoihin. (15)

AXIN2-geenin tuotteet ovat normaalisti osallisena solujen erilaistumiseen, jakautumiseen ja kasvuun. Se on osa WNT-viestinnän negatiivista takaisinkytkentää. Mutaatiot siinä on yhdistetty pääasiassa erittäin laaja-alaisiin pääasiassa pysyvien hampaiden puutoksiin. (4)

EDA-geeni koodaa ektodysplasiini-signaalimolekyyliä, joka säätelee epiteelin kasvua ja kehitystä. Mutaatiot siinä on alun perin tunnistettu X-kromosomaalisen ektodermaalisen dysplasian aiheuttajana, mutta se on myöhemmin yhdistetty myös erillisiin hammaspuutoksiin (4).

Mutaatiot eri geeneissä vaikuttavat eri hampaisiin. *PAX9*- ja *MSX1*-geenien mutaatioiden on havaittu aiheuttavan erityisesti molaarien ja premolaarien puutosta (2,4). *EDA*- ja

EDAR-geenien mutaatioiden on taas havaittu vaikuttavan enemmän kulmahampaiden ja inkisiivien puutoksiin (4).

WNT10A on geeni, jota epiteelin signaalikeskukset ilmentävät hampaan kehityksen aikana. Se on liitetty myös ektodermaalisen dysplasiaan, mutta myöhemmin yhteys erillisiin hammaspuutoksiin on löydetty useissa tutkimuksissa. (4) *WNT10A*:n mutaatioiden merkitys erittäin laaja-alaisten erillisten hammaspuutosten synnyssä saattaa olla merkittävä. Ainakin kahdessa eri *WNT10A*:n mutaatioiden prevalenssia laaja-alaisesta hammaspuutoksista kärsivillä potilailla tutkivassa tutkimuksessa yli 50%:lla tutkituista on löydetty kyseisen geenin mutaatioita. (16,17)

2.4 Geenitaustan tunnistaminen

Sairauksia aiheuttavien geneettisten mutaatioiden etsimiseen ja tunnistamiseen on lukuisia erilaisia tapoja. Lähestymistavan valinta riippuu siitä, onko taudilla selkeitä ehdokasgeenejä joko taudin piirteiden tai aiemman geenitiedon ansiosta ja siitä, periytyykö sairaus monogeenisesti vai monitekijäisesti. Mikäli ehdokasgeenejä tunnetaan, niitä voidaan tutkia yleensä sekvensoimalla. Mikäli ehdokasgeenejä ei ole tai ne on tutkittu tuloksetta, voidaan jatkaa tekemällä perimänlaajuinen analyysi. (18) Potentiaalisen geenin paikkaa voidaan etsiä kytkentäanalyysillä, mikäli kyseessä on monogeenisesti periytyvä sairaus ja tutkittavat suvut ovat kohtuullisen kokoisia. Assosiaatioanalyysiä voidaan käyttää potentiaalisen geenin havaitsemiseen, jos tutkittavia potilaita on paljon. Se sopii myös monitekijäisten sairauksien tutkimiseen. (19)

KytKentäanalyysin avulla voidaan päätellä sairausgeenin paikkaa perimässä tarkastelemalla, miten ilmiäiset tai sairaudet periytyvät suvuissa yhdessä eri alleelien kanssa eli etsimällä perimän kohtia, joissa ilmiäisen ja alleelin välillä on mahdollisimman vähän meioottisia rekombinaatioita (20). Mitä enemmän analysoitavia potilaita on, sitä helpompi lokuksen sijainti kromosomissa on määrittää. KytKentää voidaan määrittää erilaisten tietokoneohjelmien, esimerkiksi GeneHunterin, avulla sairaiden henkilöiden

perimästä. Assosiaatioanalyysi taas perustuu oletukseen, että väestön sairailta yksilöillä on suureksi osaksi samat altistavat geneettiset tekijät. Assosiaatioanalyysissä analysoidaan toisilleen ei sukua olevien, sairaiden henkilöiden alleeli- ja genotyypifrekvenssejä ja verrataan tuloksia terveeseen kontrolliryhmään. Mikäli sairailta henkilöillä olevat frekvenssit poikkeavat terveistä, voidaan tehdä oletus, että tutkittu variantti aiheuttaa sairautta itsessään tai on kytkeytynyt sairautta aiheuttavaan geneettiseen tekijään. (19) Mikäli kytöntäanalyysi tai assosiaatioanalyysi antaa tilastomatemattisen arvioinnin avulla positiivisen tuloksen siitä, että sairausalleeli on oletettu alleeli tai sijaitsee tutkitulla alueella, tehdään alueelle eksonien tai koko alueen sekvensointi (20).

Nykytekniikalla koko genomia voidaan tutkia eksomisekvenssoinnilla tai koko genomien sekvenssoinnilla. Sekvenssoinnissa määritetään perimän aminohappojärjestystä. Saatua tulosta voidaan analysoida erilaisten ohjelmistojen avulla ja verrata jo olemassa olevaan tietoon normaalista perimästä ja jo tunnistetuista mutaatioista. Sekvenssoinnin ongelmana on sen tuottama valtava tietomäärä perimästä, jonka seasta olennaista tietoa voi olla vaikeaa löytää. (21,22)

Eksomisekvenssoinnin avulla voidaan siis löytää potentiaalisia aiheuttajageenejä, mutta tietoa täytyy osata tulkita ja potentiaalisia geenejä täytyy edelleen tutkia, jotta niiden patogeenisuus voidaan todeta. Mutaatioiden patogeenisuutta voidaan arvioida jo hankitun tiedon perusteella. Voidaan päätellä esimerkiksi miten tarpeellinen ja korvattavissa oleva geenin koodaama proteiini on. Myös mutaation tyyppin perusteella voi ennustaa sen haitallisuutta. Jos mutaatio on viitekehysmutaatio tai aiheuttaa liian aikaisen lopetuskodonin, voidaan se yleensä arvioida haitallisemmaksi kuin missense-mutaatio. Missense-mutaatio voi kuitenkin olla hyvinkin haitallinen, riippuen siitä, miten se vaikuttaa proteiinin ominaisuuksiin. Missense-mutaatioiden patogeenisuutta voidaan arvioida laskennallisilla menetelmin eri ohjelmien, esimerkiksi PolyPhen2, SIFT ja PhastCONS, avulla. (21)

2.5 RNF43

Tutkielmassani tutkimuksen kohteena oleva RNF43 on tuumorisupressoriproteiini, joka normaalisti toimiessaan säätelee Wnt/ β -kateniini –signalointireitin aktiivisuutta. Se ohjaa WNT-signaloinnin Frizzled-reseptorin lysosomaaliseen tuhoutumiseen ubiquitinoimalla sen. (11)

Rakenne

RNF43 koostuu 760 aminohaposta. Se on solukalvon läpäisevä proteiini, jonka solun ulkoisessa osassa on proteiinin N-terminus ja sisäisessä osassa C-terminus sekä RING-tyyppin E3 ligaasi-yksikkö. Solun ulkoisen osan ajatellaan olevan potentiaalisesti se osa, joka kohdentaa Frizzled-reseptorin ubiquitinaatioon ja lysosomiin hajotettavaksi. Sen ajatellaan vaikuttavan myös RNF43:n poistoon solukalvolta. Solun sisäinen RING-E3-ubikitiini-transferaasi ubiquitinoi Frizzledin. (11)

Toiminta

RNF43 sitoutuu WNT-viestinnän Frizzled-reseptoriin ja LRP5/6-reseptoreihin muodostaen kompleksin. Se ohjaa tiettyjen lysyiini-sivuketjujen ubiquitinoimista näiden reseptorien sytoplasmassa sijaitsevilla osilla. Tämä aiheuttaa reseptorien poiston solukalvolta ja siten WNT-viestinnän alasajon. (11)

WNT-signalointi itsessään indusoi RNF43:n ilmentymistä eli RNF43 on osa WNT-signaloinnin negatiivista takaisinkytkentää. WNT-signaloinnille vastaavia säätelyalueita eli WRE:itä (Wnt-responsive elements) on tunnistettu RNF43-geenin intronissa 2. On osoitettu, että Wnt/ β -kateniini –signalointireitin transkriptiotekijät β -kateniini ja T-solutekijä-4 eli TCF4 sitoutuvat kompleksina WRE-alueisiin ja lisäävät siten RNF43:n ilmentymistä. (11)

RNF43:n toimintaa inhiboivat R-spondiinit. Ne ovat ligandeja, jotka sitoutuvat leusiinirikkaaseen G-proteiini -reseptoriin LGR4 tai -5 ja RNF43:een muodostaen niiden kanssa tertiäärisen kompleksin. Sitoutuminen saa aikaan RNF43:n autoubikitinaation ja siten sen poistumisen solukalvolta. RNF43:n poistumisen ansiosta WNT-signalointi voi aktivoitua. (11)

Tähän mennessä tunnistetut mutaatiot

RNF43 mutaatioiden on aiemmin havaittu olevan kytköksissä ainakin suolistosyöpään, naisten munasarja- ja kohtusyöpiin (11,23), mahasyöpiin (11,24) sekä haiman kystisiin muutoksiin ja adenokarsinoomaan (11,25,26). Yhteys syöpiin johtuu todennäköisesti siitä, että loss of function- mutatoitunut RNF43 ei kykene hillitsemään Wnt/ β -kateniini -signaalireittiä poistamalla Frizzled- reseptoreita, jolloin Wnt- signalointi lisääntyy tarpeettomasti ja saa aikaan hallitsematonta solujen jakautumista (11). Syöpämutaatioista lähes kaikki on kuitenkin tunnistettu syöpäkudoksesta, eli ne ovat todennäköisesti somaattisia. Muutamissa suvuissa ituradan mutaatioita on kuitenkin havaittu mm ruuansulatuskanavan kasvainten yhteydessä (27,28). Näiden mutaatioiden yhteyttä kehityksellisiin ilmiöihin ei ole kuvattu. Aiempia hammaspuutoksiin liittyviä mutaatioita ei ole ennen Pekka Niemisen tutkimusryhmän havaintoa kuvattu.

RNF43 mutaatioiden vaikutus olla muukin kuin loss of function. Hypoteesimme on, että tutkimamme mutaatiot vaikuttavat R-spondiinien ja RNF43:n vuorovaikutukseen, jolloin R-spondiinit eivät kykene inhiboimaan RNF43:a, jolloin tämä estää voimakkaammin WNT-viestintää. Tällöin WNT-viestintä kehityksessä vaimentuisi.

3 Tutkimuksen tavoitteet

Tämän tutkielman tarkoituksena on selvittää RNF43-geenin mutaatioiden vaikutusta solun toimintaan. Tarkoituksena on löytää vastaus siihen, vaikuttavatko mutaatiot RNF43:n tuotannon määrään ja sen kulkeutumiseen solukalvolle. Mikäli mutaatioilla on vaikutusta ainakin toiseen, voidaan sen pohjalta todeta mutaatioiden patogeenisuus. Jatkossa tässä työssä kehitettyjä menetelmiä voidaan käyttää mutaatioiden muun kaltaisten vaikutusten tutkimukseen. Tutkimus pohjautuu Pekka Niemisen – tutkimusryhmän tekemän aiemman perimätutkimuksen tuloksiin.

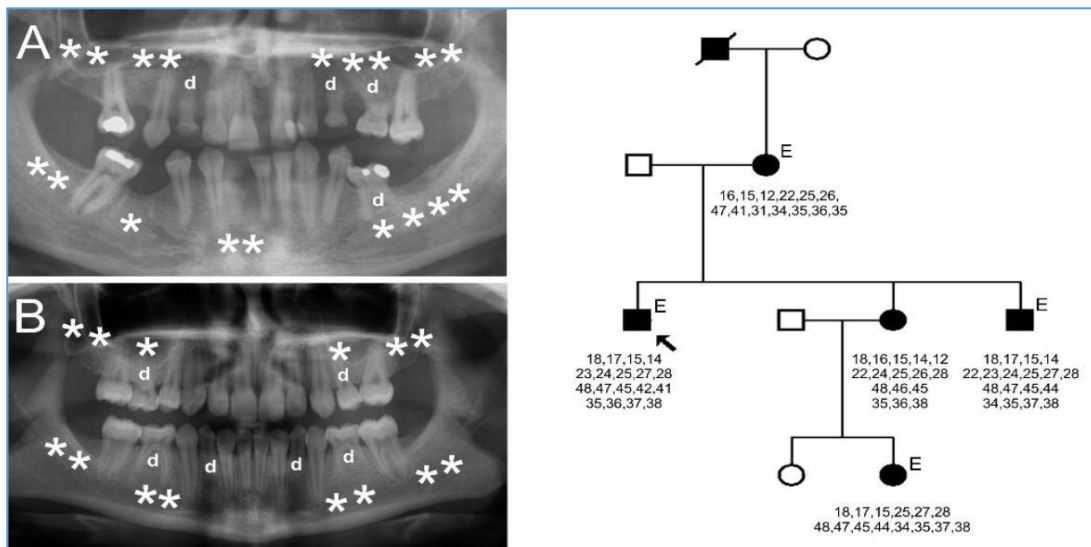
4 Tutkimusaineisto- ja menetelmät

4.1 Edeltävän tutkimuksen tulokset

Pekka Niemisen tutkimusryhmä Helsingin yliopistosta havaitsi perimätutkimuksissa *RNF43*-geenin mutaatioita hammaspuutoksista kärsivillä potilailla. Perimätutkimuksissa tutkittiin eksomisekvensoinnilla perheitä, joissa esiintyi hammaspuutoksia. Tutkittavat henkilöt olivat Helsingin yliopiston ja HUS:n tutkimuspotilaita. Kahdesta perheestä löydettiin *LEF1*-geenin mutaatiot ja yhdestä perheestä *RNF43*-geenin mutaatiot. Kun myös muiden tutkimukseen osallistuneiden perheiden perimää tutkittiin edelleen Sanger-sekvensoinnilla, löydettiin kahdesta perheestä *RNF43*:n mutaatiot.

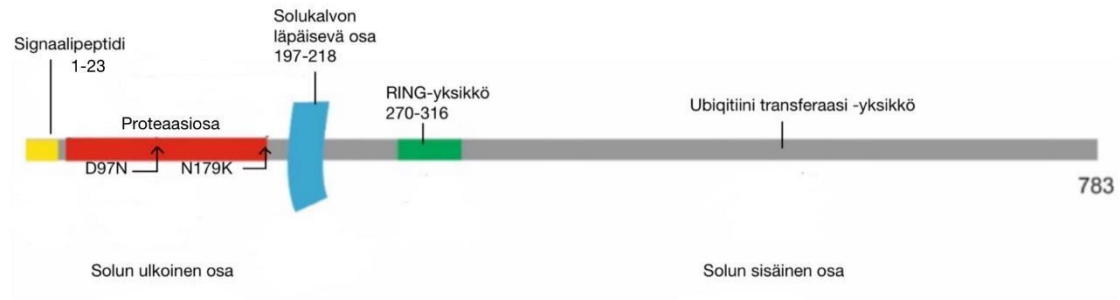
Ensimmäisenä löydettiin mutaatio N179K suvusta numero 228. Suvussa ilmeni vakavia hammaspuutoksia, jotka vaikuttivat lähinnä premolaareihin ja molaareihin. Puutos periytyi vallitsevasti. Neljä hammaspuutospotilasta tästä suvusta tutkittiin eksomisekvensoinnilla Suomen molekyyliiläketieteen instituutissa eli FIMM TC:ssä

(Institute for Molecular Medicine Finland Technology Center). Ensimmäisistä tuloksista poimittiin ne variantit, jotka löytyivät kaikilta neljältä potilaalta. Tutkimushenkilöille yhteisistä varianteista rajattiin pois selvästi ei-patogeeniset muutokset ja geenien yleiset variantit, jonka tuloksena löydettiin kaksi potentiaalisesti patogeenistä missense-mutaatiota. Sen jälkeen toinen varianteista pystyttiin sulkemaan pois Sanger-sekvensoinnin avulla ja ainoaksi mahdolliseksi variantiksi jäi RNF43:n mutaatio N179K. Kuvassa 4 on esitetty perheen 228 kahden jäsenen röntgenkuvia sekä mutaation periytymistä. Kun samanlaisen fenotyypin omaavia potilaita muista perheistä tutkittiin Sangerin sekvensoinnilla, löytyi sama mutaatio myös yhdeltä koehenkilöltä, joka on luultavasti kaukaista sukua perheen 228 jäsenille. Variantti oli täysin uusi löydös. Se aiheuttaa yhden aminohapon muutoksen *RNF43*-geenin koodaaman proteiinin solun ulkoisessa osassa, jossa asparagiini vaihtuu lysiiniksi. Vaihdon on todettu olevan todennäköisesti patogeeninen bioinformatiivisten työkalujen kuten SIFTin ja PolyPhen 2:n avulla.



Kuva 4. Röntgenkuvat perheen 228 tutkittavasta numero III:1 (A) ja tutkittavasta numero IV:2 (B). Molemmissa tähdet kuvaavat puuttuvia hampaita. Sukupuusi ilmaisee hammaspuutoksen periytymistä perheessä 228. E=eksomisekvensointi.

Myös toinen haitalliseksi arvioitu mutaatio löydettiin Sangerin sekvensoinnin avulla. Mutaatio havaittiin potilaalla, jolta puuttuivat kaikki premolaarit ja viisaudenthampaat. Mutaatiossa D97N tapahtuu yhden aminohapon muutos asparagiinihapon vaihtuessa asparagiiniksi. Alla kaavakuva RNF43-proteiinista, jossa hammaspuutospotilailta löydettyjen mutaatioiden sijainnit on esitettyinä (kuva 5).



Kuva 5. Kaavakuva RNF43-proteiinista. Hammaspuotospotilailta löydettyjen mutaatioiden sijainnit merkitty nuolella.

4.2 Soluviljely

Käytimme tutkimuksessa HEK293-soluja. HEK293-solut ovat alkuperältään ihmisen alkion munuaissoluja, joiden genomiin kromosomiin 19 on integroitunut osa ihmisen adenovirus tyyppi 5:n eli Ad5:n perimästä. Tällä hetkellä kaupallisesti saatavat solut ovat alun perin vuonna 1977 Grahamin, Smileyn, Russelin ja Nairnin tekemän transformaation jäljiltä. (29)

Solut otettiin nestetypestä. Solut siirrettiin kasvamaan 10 cm petrimaljoille. Kasvatimme soluja 10 cm:n maljoilla 12 ml:ssä mediumia. Solut kasvoivat inkubaattorissa, jossa oli 37°C lämmintä ja ilmassa 5 % hiilidioksidia. Vaihdoimme mediumit soluille arkena päivittäin ja viikonloppuisin kerran.

Mediumin pohjana käytimme BioWhittakerin Dulbecco's Modified Eagle Serumia eli DMEM:iä (Lonza 12-707F). Lisäsimme siihen seerumia 1/10 DMEM:n määrästä ja 200 mM L-glutamiinia (Life Technologies Europe BV 25030024) 1/100 DMEM:n määrästä. Seerumina käytimme Fetal Bovine Serumia eli FBS:sää (Life Technologies Europe BV 10270106). Se oli inaktivoitu pitämällä sitä 58°C vesihauteessa 30min. Kasvatusliuokseen lisättiin myös antibioottisekoitusta, joka sisälsi 10000 U/ml penisilliiniä ja 10000 µg/ml streptomysiiniä (Lonza DE17-602E). Myös sitä lisättiin 1/100 DMEM:in määrästä.

Tuorensimme soluja, kun ne olivat kasvaneet 10 cm maljoilla 70–90 % konfluenteiksi. Tuorennosten metodi on kuvattu tarkemmin alla olevassa taulukossa (taulukko 1).

Taulukko 1. Solujen tuorentaminen

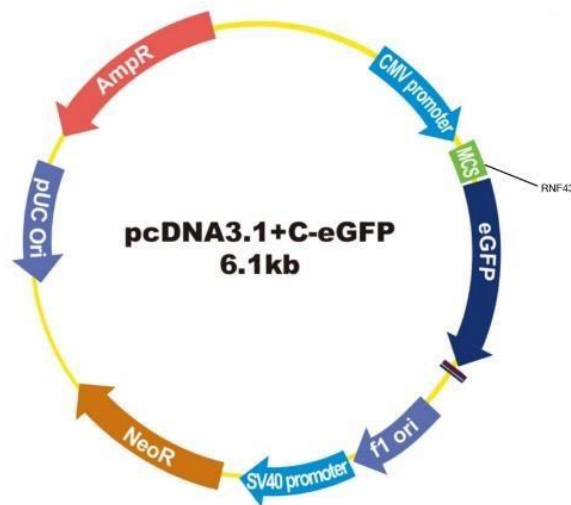
1. Solujen irrottaminen toisistaan ja maljasta 0,25 % trypsiini+EDTA –liuoksella (Gibco 25200–056). Ensin huuhtelu 2 ml liuoksella, joka imetään heti pois. Sen jälkeen 2 ml lisää liuosta ja malja inkubaattoriin noin 1–2 min ajaksi, kunnes solut irronneet toisistaan (havainnointi mikroskoopilla).
2. Trypsiini+EDTA:n siirto koeputkeen. Maljan huuhtelu 4 ml:lä mediumia, trypsiinin vaikutuksen lopettamiseksi ja jotta saisimme mahdollisimman suuren osan soluista mukaan.
3. Koeputki sentrifugiiin 1600rpm 2min. Supernatantin imeminen pois. Solusakan päälle 4–6 ml mediumia ja sekoitus pipetoimalla edestakaisin, jotta solut suspensoituisivat.
4. Solujen laskenta invitrogenin Countess[®] -solulaskimella. Sitä varten 10 µl solususpensiota ja 10 µl trypaanin sinistä väriainetta (Life Technologies T10282) sekoitetaan. 10 µl sekoitusta siirretään erillisellä laskentalevyllä sijaitseviin laskentakammioihin.
5. Solususpension mittaaminen uusille maljoille tai 12-/24-kuoppalevyille laskennan tulosten ja halutun solumäärän mukaan.

Pääsääntöisesti tuorensimme 10 cm maljalle 500 000–1 000 000 solua. Tuorensimme soluja myös 12- ja 24-kuoppalevyille transfektointia ja värjäyksiä varten. 12-kuoppalevyille tuorensimme noin 100 000–250 000 solua ja 24-kuoppalevyille noin 25 000–50 000 solua. 12-kuoppalevyille käytimme kasvatukseen 1 ml kasvatusliuosta ja 24-kuoppalevyille 0,5 ml kasvatusliuosta.

4.3 Transfektointi

Tutkiaksemme RNF43-mutaatioita, transfektoimme HEK293-soluihin mutaatioita sisältäviä plasmideja. Soluihin transfektoitiin myös villityypin *RNF43*-plasmideita, jotta

pystyimme vertailemaan mutaatioiden ja villityypin eroja. Käytimme transfektointiin pcDNA3.1+C-eGFP plasmidia (GenScript Biotech). Alla olevassa kuvassa (kuva 6) on esitetty plasmidin rakenne. Plasmidiin oli lisätty *RNF43*-geenin lukukehys green fluorescence protein- eli GFP-geenin koodin yläpuolelle. Fluoresenssi näkyy vihreänä aallonpituudella 509nm. Aminohappojärjestystä luettaessa *RNF43*-geeni luetaan ensin ja sen jälkeen GFP, joten GFP-proteiini muodostuu *RNF43*:n solunsisäisen osan perään. Plasmideja oli kolmea erilaista: yhdessä oli *RNF43*:n villityypin lukukehys, toinen sisälsi N97K mutaation ja kolmas D97N-mutaation. Transfektointia varten laimensimme plasmidit tislattuun veteen konsentraatioon 200ng/μl.



Kuva 6. Kaavakuva plasmidista. MCS:n kohdalla plasmidin mukaan joko villityypin, N97K-mutaation tai D97N-mutaation *RNF43* lukukehys. Kuva alun perin (30), muokattu.

Transfektioireagenssina käytimme invitrogenin FuGENE® 6:ta (Promega E269A). Noudatimme transfektioinnissa sen valmistajan antamia ohjeita, kokeillen eri sekoitussuhteita DNA:n ja FuGENE:n määrien välillä. Käytimme sekoitussuhteita 4:1 (8μl FuGENE+2μg DNA), 3:1 (6μl FuGENE+2μg DNA) ja 2:1 (4μl FuGENE+ 2μl DNA). Sekoitussuhteet 4:1 ja 3:1 osoittautuvat ensimmäisissä transfektioinneissa parhaiksi, joten käytimme vain niitä ensimmäisten transfektointien jälkeen.

Valmistelimme transfektion sekoittamalla DMEM:n, FuGENE:n ja DNA:n 96-kuoppalevyille. Ensin kuoppiin laitettiin 100 μl DMEM:iä ja 4–8 μl reagenssia, jonka jälkeen sekoituksen annettiin inkuboitua huoneenlämmössä 5–15 min. Ensimmäisillä kerroilla käytimme vähintään kahta eri reagenssimäärää vertaillaksemme transfektioinnin onnistumisastetta eri suhteilla. Inkuboinnin jälkeen lisäsimme

sekoitukseen 2 µg plasmidia eli 10 µl aiemmin valmistettua plasmidisekoitusta. Sen jälkeen seoksen annettiin inkuboitua 15 min huoneenlämmössä.

Sekoitetuamme plasmidit, FuGENE:n ja DMEM:in siirsimme sekoitusta 12- tai 24-kuoppalevyille. Solut olivat saaneet kasvaa levyillä tuorennoksen jälkeen 24-48h ennen transfektointia. 12-kuoppalevyn transfektointiin käytimme 45 µl sekoitusta ja 24-kuoppalevyn transfektointiin 23 µl.

Analysoimme transfektoinnin onnistumista mikroskoopin avulla. Käytimme UV-valoa, jotta saimme vihreän fluoresenssin esiin. Transfektoinnin onnistumisasteessa oli vaihteluita. Huomasimme eri sekoitussuhteita testatessamme, että FuGENE sekoitussuhde 2:1 toimi huonosti, eikä sillä saatu aikaan tehokasta transfektiota. Transfektio epäonnistui joillakin kerroilla myös 4:1 ja 3:1 sekoitussuhteilla selvittämättä jääneestä syystä. Epäonnistuneissa transfektioissa solut usein kuolivat. Onnistuneissa transfektioissa transfektioaste soluissa oli n 30-50% silmämääräisesti arvioiden.

4.4 Värjäykset

Käytimme värjäykseen 24-levyjä sekä konfokaalimikroskooppia varten peitinlasipohjaisia 4-kuoppalevyjä (Nunc Lab-Tek II 155382). Värjäsimme soluja membraanivärillä ja tumavärillä havainnollistaaksemme RNF43:n sijaintia solussa. Käytimme CellMask™ Orange plasma membrane stain-väriä (Life Technologies C10045), joka värjää solukalvot punaiseksi. Tumavärinä käytimme NucBlue™ Live ReadyProbes™ tumaväriainetta (ThermoFisher R37605). CellMask fluoresoi aallonpituudella 567nm (31). Käytimme värjättyjä soluja analysoidaksemme RNF43:n määrää ja sijoittumista eri plasmidityypeillä fluoresenssimikroskoopin ja konfokaalimikroskoopin avulla.

Testasimme värjäyksiä ensin fiksattuihin soluihin kokeillen eri CellMask:in sekoitussuhteita ja inkubaatioaikoja löytääksemme yhdistelmän, joka värjäisi solukalvot tehokkaimmin menemättä solun sisään. Fiksatuissa soluissa CellMask kuitenkin värjäsi myös solun sisäistä

endoplasmakalvostoa kaikilla testatuilla yhdistelmillä, vaikka värin pitäisi sopia sen käyttöohjeen mukaan myös fiksatuille soluille. Testasimme laimennoksia 1:1000, 1:2000 ja 1:3000 sekä inkubaatioaikoja 4min, 6min ja 12min. Kokeilimme näiden epäonnistuneiden testien jälkeen värjäyksiä, joissa kuvansimme soluja heti värjäyksen jälkeen elävinä ilman fiksaamista. Tällöin väri jäi pelkästään solukalvolle. Testasimme fiksaamattomiin soluihin laimennosta 1:3000 sekä aiempaa lyhyempiä aikoja 6min, 4min ja 2min. Käytimme vain laimennosta 1:3000 ja kyseisiä aikoja, sillä fiksatuilla soluilla kuvantaessa huomasimme näiden riittävän värjäytymiseen. Parhaan tuloksen saimme käyttäessämme 1:3000 laimennosta ja 2min inkubaatiota. Käytimme värjätessämme aina samaa metodologia, jonka olen tarkemmin kuvannut alla sijaitsevassa taulukossa (taulukko 2).

Gelatinoimme joillakin värjäyskerroilla osan peitinlaseista, joita käytimme värjäyksissä. Emme kuitenkaan havainneet suurta eroa solujen määrässä gelatinoitujen ja ei-gelatinoitujen lasien välillä.

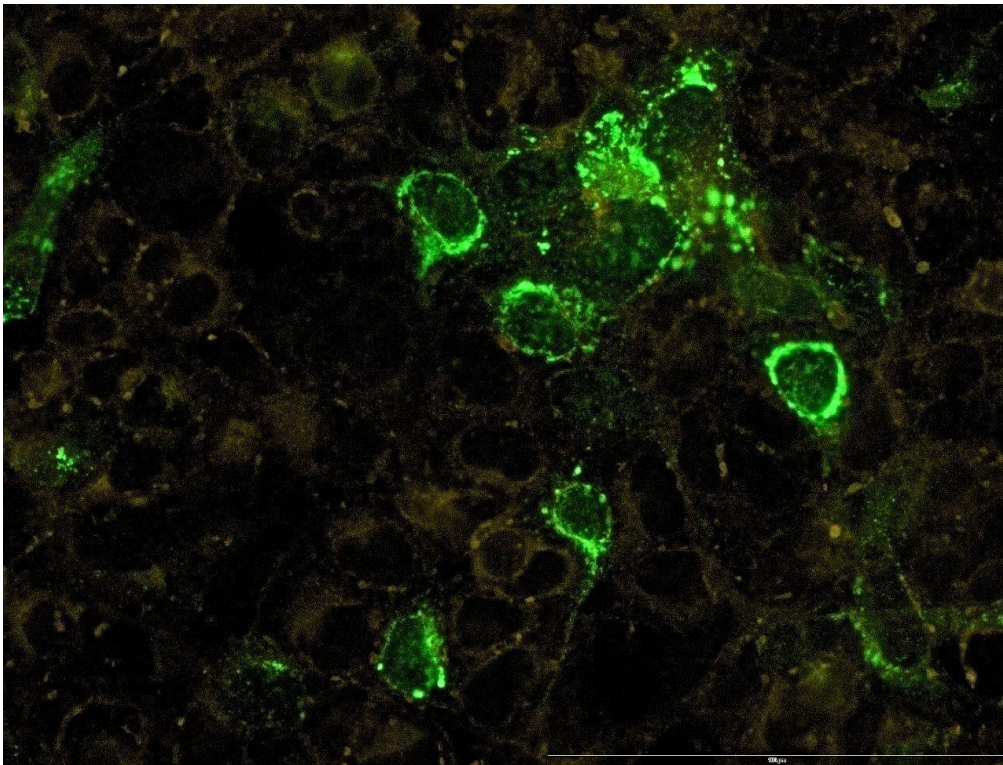
TAULUKKO 2. VÄRJÄYKSEN SUORITUS

1. Väriaineiden laimennos lämmitetyn DMEM:in sekaan. Valmiiseen laimennokseen 2 pisaraa NucBlueta per ml.
CellMask: värjäyskerran mukaan 1:1000, 1:2000 tai 1:300
2. Mediumin poisto kuopista. 30–125 μ l (riippuen alustasta) laimennosta kuoppiin.
Solut inkubaattoriin 2min, 4min, 6min tai 12min ajaksi.
3. Väriaineen poisto. Huuhtelu 3x DMEM. Elävien solujen peitinlasien mounttaus (24-levyt) ja kuvantaminen tämän vaiheen jälkeen tai kuvantaminen suoraan konfokaalimikroskoopilla ilman mounttausta.
4. Solujen fiksaus 4 % PFA, vaikutusaika 20min. Huuhtelu 3x PBS.
5. Peitinlasien mounttaus lasialustoille 11 μ l ProLong®Gold antifade- reagenssin avulla (invitrogen P36934)

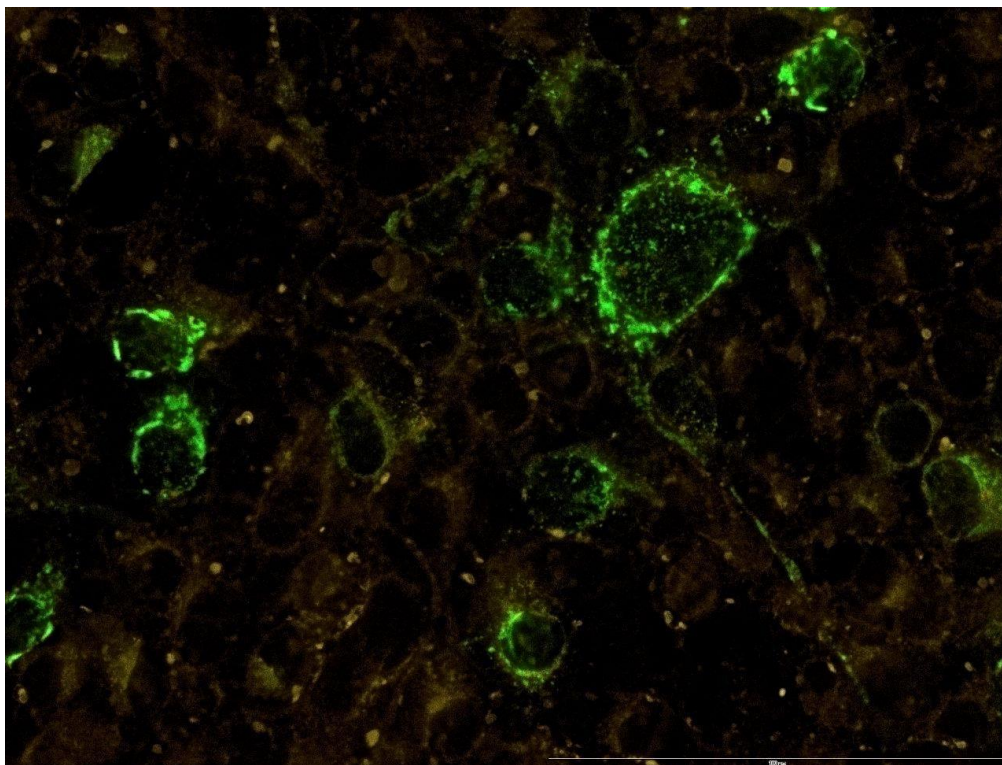
5 Tulokset

5.1 Tulkinta fluoresenssimikroskoopilla

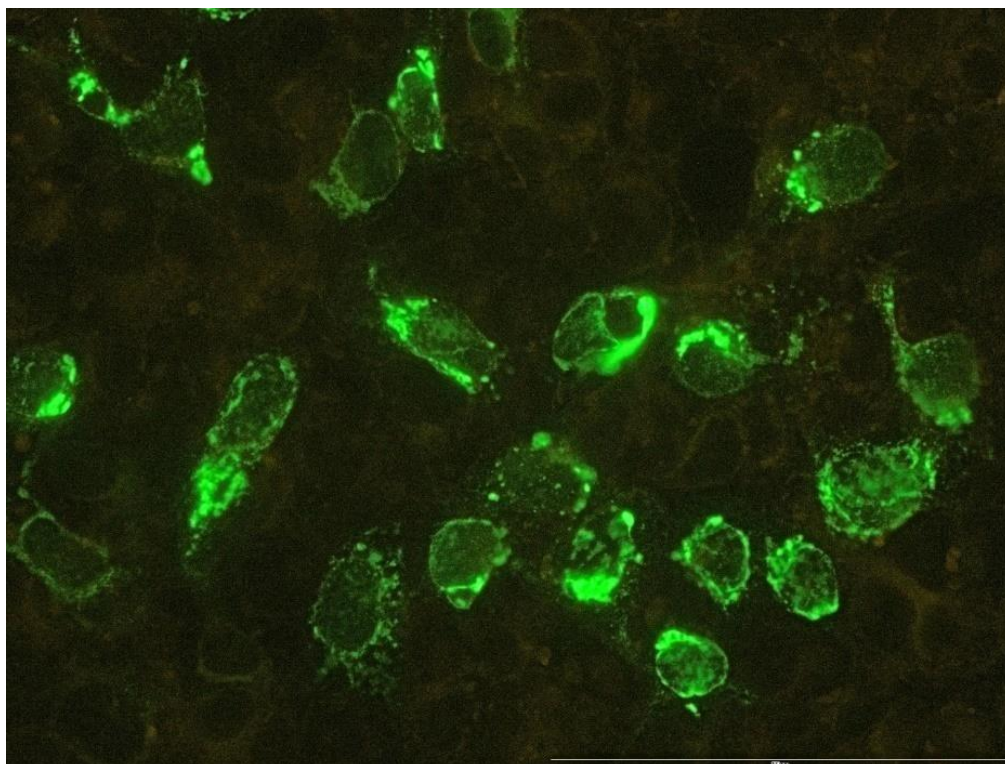
Tarkasteltaessa fluoresenssimikroskoopilla silmämääräisesti GFP:n aiheuttamaa vihreää fluoresenssia saimme tietoa RNF43:n määrästä ja sijoittumisesta solussa. Tarkastelimme useita kertoja eri kerroilla fiksattuja soluja. Kuten kuvista 7–9 on havaittavissa, proteiinin määrässä tai paikassa ei ollut havaittavissa eroja eri plasmidityyppien välillä. Voimakkain fluoresenssi suurimmassa osassa soluista oli havaittavissa kehämäisenä solujen reunoilla. Fluoresenssi ei kuitenkaan aina näkynyt tasaisesti pelkästään solun reunoilla, vaan siinä oli havaittavissa pisteisyyttä ja osassa soluista se ilmeni huomattavasti voimakkaampana jommallakummalla puolella solun reunaa.



Kuva 7. Yleistilanne. Fluoresenssimikroskooppikuva villityypin proteiinista, suurennos 40x. GFP:n ilmeneminen. Soluja viljelty 24h tuennoksen jälkeen ennen leimausta ja 24h leimauksen jälkeen. Leimauksessa käytetty 3:1 FuGENE-suhdetta. Fiksattut solut.

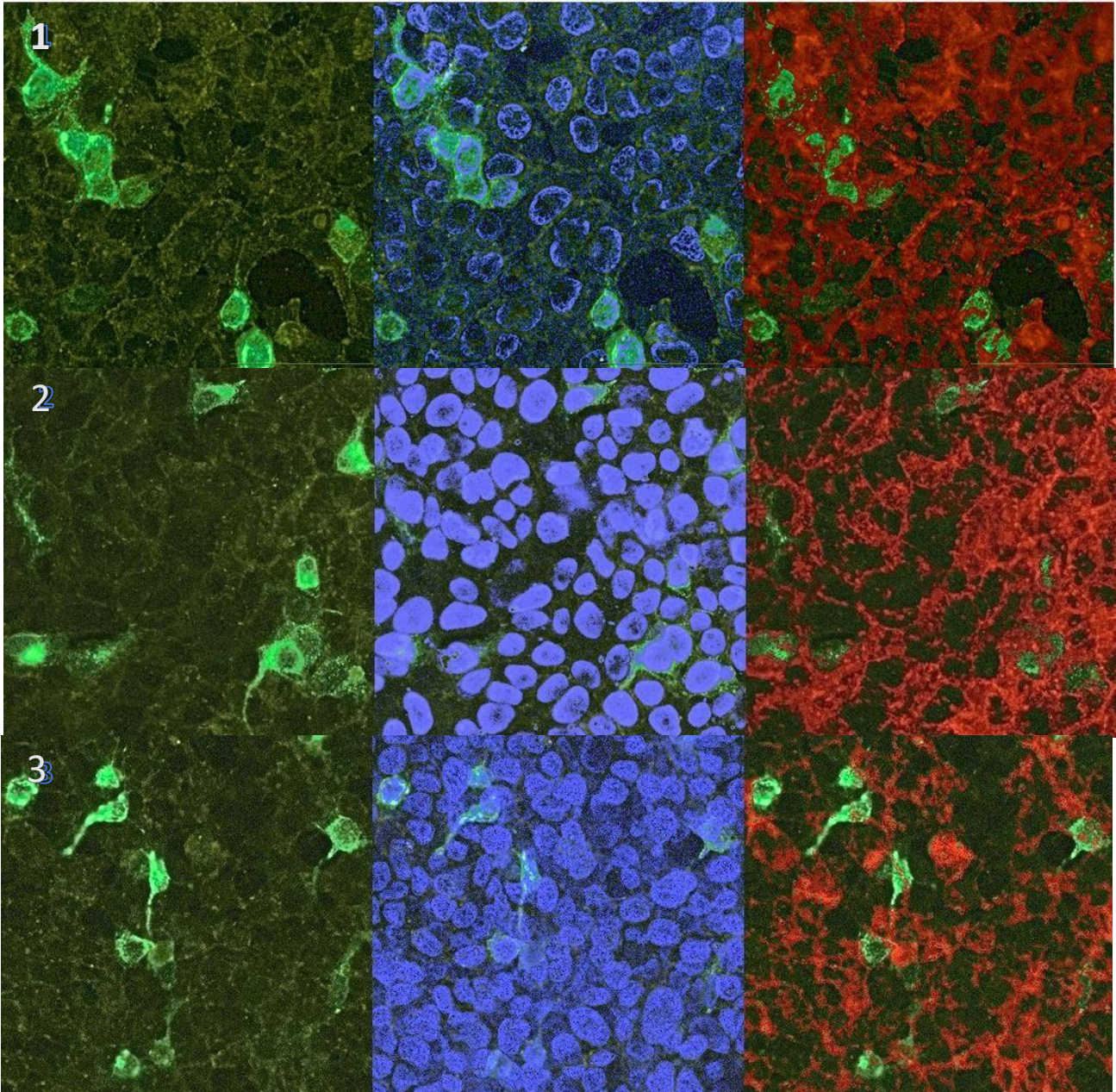


Kuva 8. Yleistilanne. Fluoresenssimikroskooppikuva proteiinista, jossa mutaatio D97N, suurennos 40x. GFP:n ilmeneminen. Soluja viljelty 24h tuorennoksen jälkeen ennen leimausta ja 24h leimauksen jälkeen. Leimauksessa käytetty 3:1 FuGENE-suhdetta. Fiksatut solut.



Kuva 9. Yleistilanne. Fluoresenssimikroskooppikuva proteiinista, jossa mutaatio N197K, suurennos 40x. GFP:n ilmeneminen. Soluja viljelty 24h tuorennoksen jälkeen ennen leimausta ja 24h leimauksen jälkeen. Leimauksessa käytetty 3:1 FuGene-suhdetta. Fiksatut solut.

Värjätyissä, mountatuissa ja fiksaamattomissa soluissa fluoresenssimikroskoopin avulla havaittaessa fluoresenssi osuu suurilta osin sinisen tumavärin kohdille ja endoplasmakalvostoon punaisen solukalvovärin sisäpuolelle. Osa väristä vaikuttaa osuvan myös solukalvon päälle. Laitoimme eri väreistä ottamiamme kuvia päällekkäin Corel®PaintShop®ProX9 -ohjelman avulla (kuva 10). Kun sininen on sijoitettuna vihreän päälle, vihreä sijoittuu suurilta osin sinisen tumavärin alle. Kun punainen tumaväri on laitettu vihreän värin päälle, punainen peittää sitä jonkin verran. Alla olevat kuvat (kuva 10) on kerrostettu Corel®PaintShop®ProX9:lla. Tulkintaa vaikeutti CellMask-värjäyksen onnistumisen epätasaisuus, sillä osa solukalvoista värjäytyi voimakkaammin ja osa hieman heikommin, ja osassa soluista CellMask tunkeutui kaikesta huolimatta hieman solukalvon sisään. Solut olivat myös osittain päällekkäin, joten tavallisen fluoresenssimikroskopian rajoittuneisuuden (kuva kaikki kerrokset yhteen kuvaan) takia päällekkäin olevat solut kuvantuvat hieman sekavasti. Alla olevat kuvien (kuva 10) solut on värjätty CellMaskin laimennoksella 1:3000 ja inkuboitu 2min.



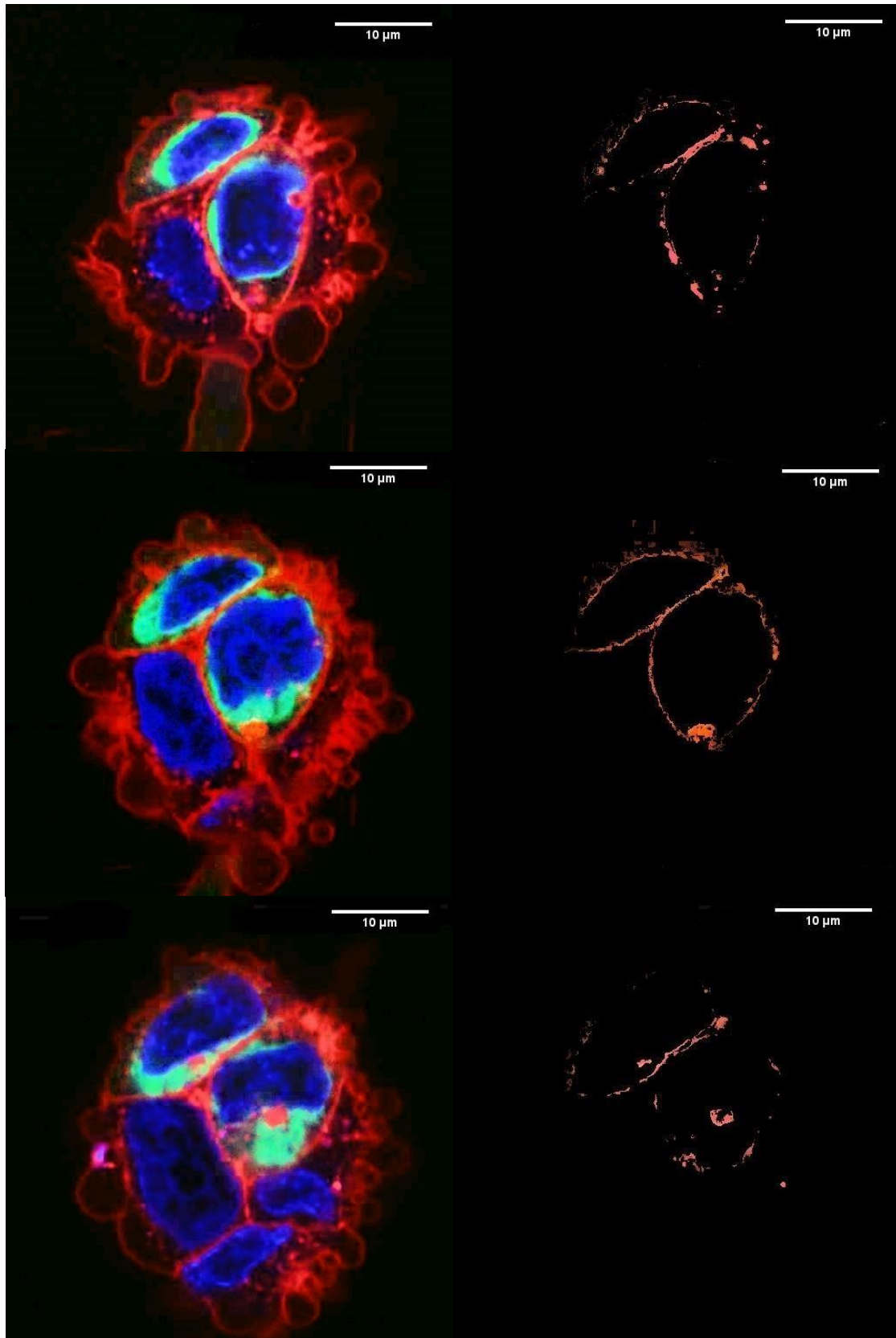
Kuva 10. GFP:n sijoittuminen suhteessa tuma- ja solukalvoväriin. Fluoresenssimikroskooppikuva, suurennos 20x. Vasemmanpuoleisissa kuvissa pelkkä GFP. Keskimmäinen ja oikeanpuoleinen kuva kerroskuvia, keskimmaisissä kuvissa sininen tumaväri GFP:n päällä ja oikealla punainen solukalvoväri GFP:n päällä. Soluja viljelty tuorennoksen jälkeen 24h ennen leimaamista ja 24h leimaamisen jälkeen ennen värjäystä. Solut leimattu 3:1 FuGENE-suhteella. Värjäys CellMaskin 1:3000 suhteella 2min inkubaatioajalla. Kuvannettu välittömästi värjäyksen jälkeen ilman fiksausta. 1) Villityypin plasmidi 2) Mutaatio D97N 3) Mutaatio N197K.

5.2 Tulkinta konfokaalimikroskoopeilla

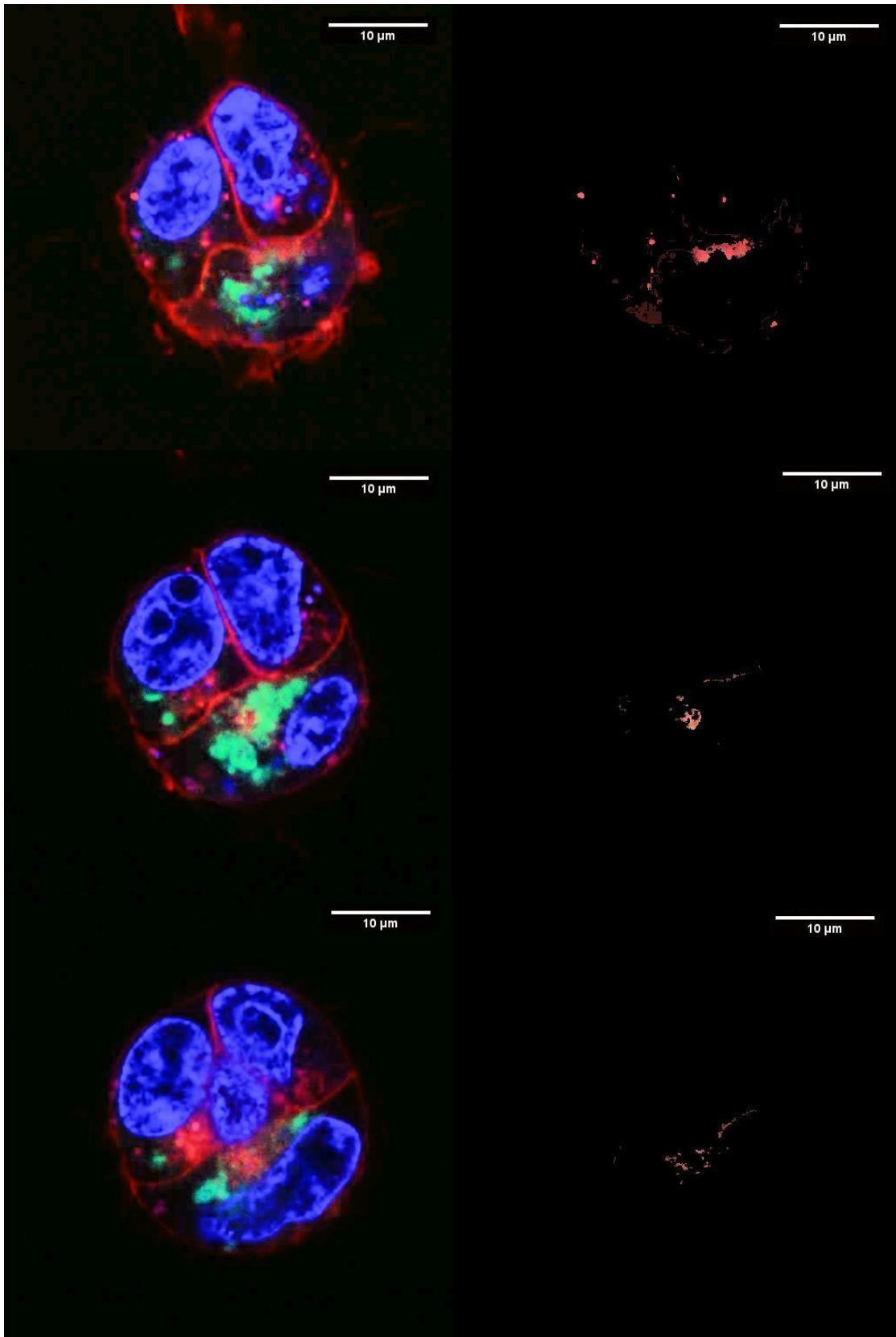
Konfokaalimikroskoopilla kuvansimme soluja elävinä peitinlaseilla, jossa ne olivat saaneet kasvaa. Konfokaalimikroskoopilla kuvantaessa otimme soluista useita kuvia eri tasoista, jotta saimme tarkempaa käsitystä RNF43:n sijoittumisesta. Kerrostimme eri väreistä samasta kerroksesta otetut kuvat Corel®PaintShop®ProX9:lla siten, että värien ollessa päällekkäin ne tuottavat summaväriin. Tämä edellytti värien intensiteetin säätöä, joka tehtiin vakiomuutoksilla. Tällöin punaisen CellMaskin ja vihreän GFP:n osuessa päällekkäin syntyy keltainen/oranssi väri ja GFP:n ja tumaväriin osuessa päällekkäin turkoosi/vaaleansininen väri. Pelkästään silmämääräisesti tarkastelemalla ei plasmidityyppien välillä ollut juuri havaittavissa eroja RNF43:n määrässä tai sijoittumisessa konfokaalilakaan analysoidessa. Eroavaisuudet johtuvat luultavasti valitusta kuvauspaikasta ja värialueen valinnan epävarmuudesta. Konfokaalilla kuvantaminen tuki fluoresenssimikroskoopin avulla tehtyjä havaintoja, mutta tarkensi GFP:n sijoittumisen havainnoinnin tarkkuutta. GFP vaikutti sijoittuvan suurimmaksi osaksi endoplasmakalvostoon, mutta sitä erottuu myös solusolukalvon päällä tai sen välittömässä läheisyydessä. Osa GFP:stä ilmeni myös osittain tumaväriin päällä. Yhteistä fluoresenssimikroskoopin havaintojen kanssa oli se, että plasmidityypistä riippumatta GFP ei jakautunut tasaisesti soluun. Siinä oli selvää pistemäisyyttä ja kirkkaampia kohtia toispuoleisesti soluissa. Mutaatioissa sijoittumisessa oli havaittavissa ehkä hieman vähemmän pistemäisyyttä ja enemmän kirkkaita kertymiä, mutta nämä havainnot saattavat johtua myös hieman erilaisesta transfektiotehosta solujen välillä. Pelkät konfokaalimikroskooppikuvat eri kerroksista ovat liitteessä 1.

Alla olevissa kuvissa (kuvat 11–13) on esitetty eri plasmidityyppien konfokaalimikroskoopilla otettuja kuvia eri tasoista. Niiden viereen on sijoitettu kuvasta Corel®PaintShop®ProX9:n ohjelman taikasauvatoiminnon avulla eristetty keltainen/oranssi osuus, joka kuvaa solukalvoväriin ja GFP:n osuista päällekkäin. Vähäinen keltaisen/oranssin määrä kertoo siitä, ettei RNF43:ää juurikaan ole solukalvon välittömässä läheisyydessä missään plasmidityypissä. Kuvissa sen sijaan näkyy turkoosia/vaaleansinistä jonkin verran kaikissa plasmidityypeissä, mikä kertoo siitä, että

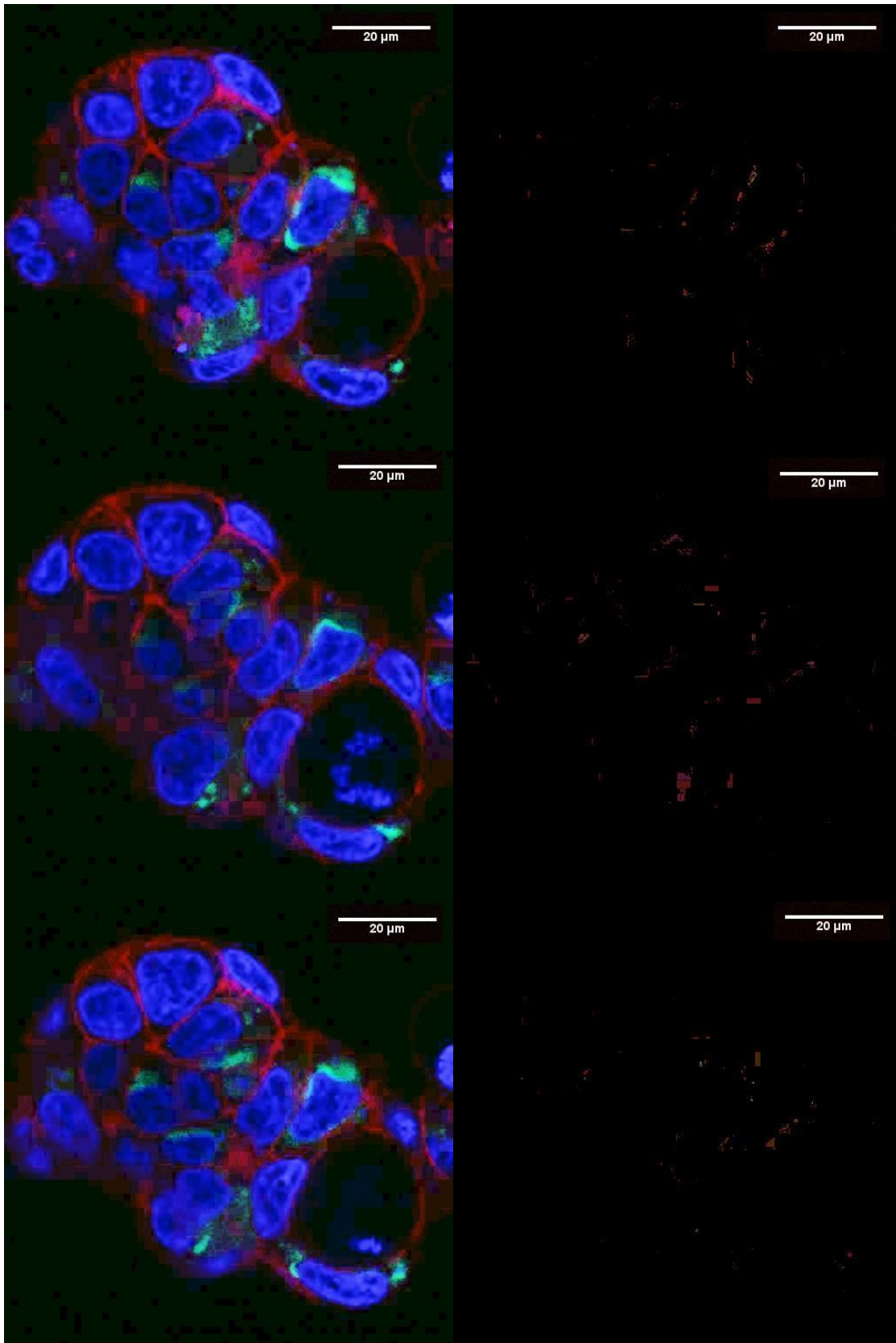
osa RNF43:stä sijoittuu tumaan. Kuvien perusteella voi havaita pientä eroavaisuutta GFP:n ja CellMaskin yhdistelmävärin määrässä eri tyyppien välillä. Villityypissä RNF43 vaikuttaisi kulkeutuvan solukalvolle parhaiten ja mutaatiossa N197K huonoiten. Erot ovat kuitenkin melko pieniä ja saattavat johtua kuvien silmämääräisestä muokkauksesta, sillä muut tekemämme havainnot eivät tue tätä havaintoa. GFP:n määrässä ei ole havaittavissa eroja näissäkään kuvissa.



Kuva 11. Solukalvoväriin ja GFP:n ilmeneminen päällekkäin. Konfokaalimikroskooppikuvat villityypin proteiinista. Vasemmassa kuvassa solukalvoväri, tumaväri ja GFP kerrostettuna samaan kuvaan. Oikeanpuoleisissa kuvissa GFP:n ja solukalvoväriin tuottama keltainen/oranssi yhdistelmäväri. Solujen annettu kasvaa tuorennoksen jälkeen 24h ennen leimaamista ja 24h leimaamisen jälkeen ennen värjäystä. Värjäyksessä käytetty CellMaskin suhdetta 1:3000 ja inkubaatioaikaa 2min. Solut kuvannettu elävinä välittömästi värjäyksen jälkeen.



Kuva 12. Solukalvovärin ja GFP:n ilmeneminen päällekkäin. Konfokaalimikroskooppikuvat proteiinista, joissa mutaatio D97N. Vasemmassa kuvassa solukalvoväri, tumaväri ja GFP kerrostettuna samaan kuvaan. Oikeanpuoleisissa kuvissa GFP:n ja solukalvovärin tuottama keltainen/oranssi yhdistelmäväri PaintShopilla muokattuna. Solujen annettu kasvaa tuorennoksen jälkeen 24h ennen leimaamista ja 24h leimaamisen jälkeen ennen värjäystä. Värjäyksessä käytetty CellMaskin suhdetta 1:3000 ja inkubaatioaika 2min. Solut kuvannettu elävinä välittömästi värjäyksen jälkeen.



Kuva 13. Solukalvovärin ja GFP:n ilmeneminen päällekkäin. Konfokaalimikroskooppikuvat proteiinista, jossa mutaatio N197K. Vasemmassa kuvassa solukalvoväri, tumaväri ja GFP kerrostettuna samaan kuvaan. Oikeanpuoleisissa kuvissa GFP:n ja solukalvovärin tuottama keltainen/oranssi yhdistelmäväri PaintShopilla muokattuna. Solujen annettu kasvaa tuorennoksen jälkeen 24h ennen leimaamista ja 24h leimaamisen jälkeen ennen värjäystä. Värjäyksessä käytetty CellMaskin suhdetta 1:3000 ja inkubaatioaikaa 2min. Solut kuvannettu elävinä välittömästi värjäyksen jälkeen.

6 Pohdinta

6.1 Tutkimuksen virhelähteet

Fluoresenssimikroskoopilla saatujen tulosten luotettavuuteen vaikuttaa kuvien kaksikulotteisuus. Sillä tarkasteltaessa nähdään värjäytyminen kaikista kerroksista, joten tarkempaa analyysia värjäytymisen onnistumisesta ja GFP:n paikasta on mahdotonta tehdä. Esimerkiksi osa GFP:stä, mikä näyttäisi osuvan tumavärin päälle, saattaa olla todellisuudessa eri tasossa kuin tuma. Myös solujen päällekkäisyys lisää sekavuutta kaksikulotteisessa kuvantamisessa.

Fluoresenssimikroskoopilla otetut kuvat ovat myös melko pienillä suurennoksilla (20x ja 40x) otettuja. Näissä suurennoksissa pienemmät erot proteiinimäärässä tai sen sijainnissa solussa, eivät välttämättä tule esiin.

Transfektio tehokkuuden vaihtelevuus vaikuttaa myös RNF43:n tuotannon määrän ja siten myös solussa sijoittumisen arvioimisen luotettavuuteen. Transfektio tehokkuutta eri kokeissa on hyvin hankalaa vakioida, vaikka vakioisi transfektointimenetelmän. Esimerkiksi jos toisella plasmidityypillä transfektoidut solut ovat transfektoituneet paremmin, se saattaa antaa vaikutelmaa siitä, että niihin transfektoitu plasmidityyppi aiheuttaisi esimerkiksi runsaampaa RNF43:n tuotantoa, vaikka todellisuudessa näin ei olisikaan. Transfektio tehokkuuden vaihtelevuuden tuottama epävarmuus voi vähentää toistamalla transfektioita ja värjäyksiä useita kertoja, jolloin tehokkuuden vaihtelun tuottamat erot saavat pienemmän merkityksen.

Proteiinin sijoittumisen tulkintaan vaikuttaa GFP. GFP on kiinnitetty RNF43-proteiinin solunsisäiseen päähän. On myös mahdollista, että GFP on osittain irrallaan. Tämä

saattaa vaikuttaa siihen, että osa todellisesti solun pinnalla olevasta RNF43-proteiinista näyttää tarkastelussa olevan solun sisällä. Suuri osa GFP:stä näyttäytyy kuitenkin etäälle solukalvosta, joten tämän virhelähteen merkitys ei ole kovin suuri. GFP saattaa vaikuttaa myös proteiinin kulkeutumiseen solussa, vaikka sitä on käytetty onnistuneesti useiden muiden proteiinien kanssa. Tämä ei sinänsä muuttaisi tuloksia, jos oletetaan, että vaikutus kulkeutumiseen olisi kuitenkin kaikilla plasmidityypeillä sama.

CellMaskilla värjääminen osoittautui tutkimuksessa haastavaksi. Tuotteen mukana tulleet ohjeelliset laimennokset (1:500-1:2000) toimivat liian voimakkaasti ja inkubaatioajat (5-10min) olivat paljon pidempiä, kuin mitä loppujen lopuksi itse käytimme. Kaikissa värjäyksissä, joissa fiksasimme solut, CellMask tunkeutui solujen sisään laimennoksista ja inkubaatioajoista riippumatta. Myös eläviä soluja kuvantaessa väri tunkeutui hieman solun sisään, mikäli mounttasimme solut. Tämä vaikeutti fluoresenssimikroskoopilla otettujen kuvien tulkintaa myös elävien solujen tapauksessa. Lopputulemaan siitä, että plasmidityyppien RNF43:n tuotannon määrässä ja sijainnissa ei ole eroa, ei tällä virhelähteellä ole kuitenkaan suurta vaikutusta, sillä ongelmat CellMaskin kanssa olivat samankaltaisia kaikilla plasmidityypeillä. Konfokaalimikroskoopilla eläviä soluja kasvualustallaan välittömästi värjäyksen jälkeen kuvantaessa CellMask pysyi hyvin solun pinnalla.

Tutkimuksessa suoritettu arviointi RNF43:n sijoittumisesta ja määrästä solussa on suoritettu ilman määrällistä/laskennallista mittausta. Näin havainnoidessa mahdolliset pienet erot eivät tule esiin. Tutkimuksessa keskityimme kuitenkin perustavanlaatuisen erojen löytämiseen, jotka olisi mahdollista havainnoida myös silmällä. Tarkempaa laskennallista analyysia sijoittumisesta ja määrästä olisi mahdollista hankkia esimerkiksi Opera Phenix™-mikroskoopilla kuvantamalla.

Corel®PaintShop®ProX9:lla muokkaus tehtiin myös käsin eli oranssit kohdat valittiin silmämääräisen havainnoinnin perusteella ja eroteltiin toiseen kuvaan. Paintshopilla muokatuissa kuvissa näyttäisi siltä, että mutaatiossa N197K kulkeutuminen solukalvolle olisi vähäisempää kuin villityypillä ja mutaatiolla D97N. Tämä ero johtuu todennäköisesti kuitenkin silmämääräisestä valinnasta ja kuvan hieman pienemmästä suurennoksesta.

6.2 Tutkimustulosten merkitys

Tekemämme tutkimus oli ensimmäinen laatuaan liittyen *RNF43*:n mutaatioiden yhteydestä hammaspuutoksiin. Alkuperäinen tutkimuskysymys pohti, vaikuttavatko hammaspuutosten yhteydessä *RNF43*-geenissä havaitut mutaatiot *RNF43*-proteiinin tuottoon tai sen kulkeutumiseen solussa ja ovatko mutaatiot sitä kautta todettavissa patogeenisiksi. Fluoresenssi- ja konfokaalimikroskoopilla tehtyjen havaintojen perusteella ei havaittu, että mutaatioilla olisi vaikutusta proteiinin tuotantoon tai sijaintiin.

Havaitut mutaatiot voivat olla patogeenisia ja hammaspuutoksia aiheuttavia, vaikka tässä tutkimuksessa emme todenneetkaan eroja proteiinin tuotannossa tai kulkeutumisessa villityypin ja mutanttien välillä. Havaintomme kuitenkin rajasi pois tämän kaltaisen patogeenisyyden ja näin ollen vei patogeenisyyden tutkintaa eteenpäin.

Mutaatiot saattavat vaikuttaa muulla tavoin *RNF43*-proteiinin toimintaan ja siten WNT-viestinnän aktiivisuuteen. Yhtenä jatkohypoteesina on, että tutkimamme mutaatiot vaikuttavat R-spondiinien ja *RNF43*:n vuorovaikutukseen, jolloin R-spondiinit eivät kykene inhiboimaan *RNF43*:a, jolloin tämä estää voimakkaammin WNT-viestintää. Tällöin WNT-viestintä kehityksessä vaimentuisi. Tätä voitaisiin tulevaisuudessa tutkia lisäämällä R-spondiinia solujen kasvatusliuokseen. Mikäli mutaatiot eivät estä R-spondiinien ja *RNF43*:n vuorovaikutusta, pitäisi WNT-signaloinnin tällöin indusoida normaalia enemmän. Mikäli mutaatiot estäisivät normaalin vuorovaikutuksen, R-spondiinin lisäämisellä ei pitäisi olla suurta vaikutusta WNT-viestinnän aktiivisuuteen. WNT-viestinnän aktiivisuutta voidaan havaita mittaamalla β -kateniinin aktiivisuutta käyttämällä *RNF43*-geenien kanssa ko-transfektoitua lusiferaasi-entsyymien koodia. Tulevaisuudessa voisi olla hyödyllistä tutkia myös sitä, vaikuttavatko mutaatiot β -

kateniinin sijaintiin tai määrään solussa tai WNT-viestinnän Frizzled-reseptorien kulkeutumiseen solun pinnalle. β -kateniinin sijaintia ja määrää voitaisiin tutkia esimerkiksi Western Blottingin avulla. Frizzled-reseptorien sijaintia voitaisiin tutkia vasta-ainevärjäyksin.

6.3 Johtopäätökset

Tutkimuksemme ei todistanut mutaatioiden patogeenisyyttä. Saamiemme tutkimustulosten perusteella voidaan todeta, ettei tutkimillamme RNF43-geenin mutaatioilla ole merkittävää vaikutusta RNF43:n tuotantoon tai sijoittumiseen solussa. Mutaatioilla ei siis ole vaikutusta WNT-viestintään tätä kautta. Tulokset eivät kuitenkaan sulje pois mutaatioiden patogeenisyyttä, sillä on useita muita tapoja, joilla ne voivat vaikuttaa haitallisesti WNT-viestinnän aktiivisuuteen. Kokonaisuudessaan tutkimuksemme vei eteenpäin kyseisten mutaatioiden patogeenisyyden tutkintaa ja tulevaisuudessa voidaan mutaatioiden patogeenisyyttä yrittää todistaa muilla tavoin.

Lähdeluettelo

- (1) Matalova E, Fleischmannova J, Sharpe PT, Tucker AS. Tooth Agenesis: from Molecular Genetics to Molecular Dentistry. *Journal of Dental Research* 2008 Jul;87(7):617-623
- (2) Nieminen P. Genetic basis of tooth agenesis. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 2009 Jun 15;;312B(4):320-342
- (3) Arte S. Phenotypic and genotypic features of familial hypodontia [väitöskirja]. Helsinki (FI):Yliopistopaino; 2001. [siteerattu 2020 June 8].
- (4) Arte S, Parmanen S, Pirinen S, Alaluusua S, Nieminen P. Candidate Gene Analysis of Tooth Agenesis Identifies Novel Mutations in Six Genes and Suggests Significant Role for WNT and EDA Signaling and Allele Combinations. *PloS one* 2013;8(8):e73705.
- (5) Wong A, Mcmillan AS, Mcgrath C. Oral health-related quality of life and severe hypodontia. *Journal of Oral Rehabilitation* 2006 Dec;33(12):869-873.
- (6) Saltnes SS, Geirdal AØ, Saeves R, Jensen JL, Nordgarden H. Experiences of daily life and oral rehabilitation in oligodontia - a qualitative study. *Acta Odontologica Scandinavica* 2019 Apr 3;;77(3):197-204

- (7) Sariola H, Frilander M, Heino T, Jernvall J, Partanen J, Sainio K et al. *Kehitysbioologia*. 2th ed. Helsinki: Duodecim; c2015. Chapter 14: Iho, karvat, rauhaset ja hampaat; p.230, 235-237
- (8) Balic A, Thesleff I. Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol 115 2015: 157-186
- (9) Yuan Y, Yang C. Regulatory mechanisms of jaw bone and tooth development. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol 133 2019: 91-118
- (10) Thesleff I, Nieminen P. Tooth induction. In *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons Ltd. 2005 <https://doi.org/10.1038/npg.els.0004183>
- (11) Serra S, Chetty R. RNF43. *J Clin Pathol* 2017 Oct 10,;0:1-6
- (12) Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 2017 Jun 1,;169(6):985-999
- (13) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; c2015. Chapter 15, Cell Signaling; p813-888
- (14) Järvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, Taketo M, Jernvall J, Thesleff I. Continuous Tooth Generation in Mouse Is Induced by Activated Epithelial Wnt/ β Catenin Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2006 Dec 5,;103(49):18627-18632
- (15) Al-Ani AH, Antoun JS, Thomson WM, Merriman TR, Farella M. Hypodontia: An Update on Its Etiology, Classification, and Clinical Management. 2017 Mar 19; 2017: 9378325–9. Available from: <https://dx.doi.org/10.1155/2017/9378325>

- (16) Ruiz-Heiland, G., Lenz, S., Bock, N. *et al.* Prevalence of *WNT10A* gene mutations in non-syndromic oligodontia. *Clin Oral Invest* 23, 3103–3113 (2019). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2731-4>
- (17) van den Boogaard MJ, Créton M, Bronkhorst Y, van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D *et al.* Mutations in *WNT10A* are present in more than half of isolated hypodontia cases. *J Med Genet* 2012; 49; 327-331. Available from <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100750>
- (18) Strachan Tom, Read AP. *Human Molecular Genetics 2*. 2th ed. UK: BIOS Scientific Publishers Ltd; 1999
- (19) Nieminen P. *Molecular Genetics of Tooth Agenesis [väitöskirja]*. Helsinki: Yliopistopaino; 2007. 85p.
- (20) Ollikainen V, Uimari P. Parametrinen kytkentäanalyysi, Ei-parametrinen kytkentäanalyysi. *Geenikartoitusopas [Internet]*. Espoo: CSC- Tieteellinen laskenta Oy; 2004 [cited 2020 June 23th]. Chapters 1, 5-6. Available from: <https://research.csc.fi/documents/48467/73374/geenikartoitusopas.pdf>
- (21) Shendure J, Bamshad MJ, Ng SB, Emond MJ, Nickerson DA, Bigham AW, *et al.* Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics* 2011 Nov;12(11):745-755.
- (22) U.S National Library of Medicine. *Genetics Home Reference: What are whole exome sequencing and whole genome sequencing? [Internet]*. United States of America: U.S National Library of Medicine; June 23th, 2020 [cited 2020 June 23th]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/testing/sequencing>

- (23) Giannakis M, Hodis E, Jasmine Mu X, Yamauchi M, Rosenbluh J, Cibulskis K, et al. RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nature genetics* 2014 Dec;46(12):1264-1266
- (24) Neumeyer V, Vieth M, Gerhard M, Mejías-Luque R. Mutated Rnf43 Aggravates Helicobacter Pylori -Induced Gastric Pathology. *Cancers* 2019 Mar 16;;11(3):372
- (25) Jiao Y, Yonescu R, Offerhaus GJA, Klimstra DS, Maitra A, Eshleman JR, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic neoplasms with acinar differentiation. *The Journal of Pathology* 2014 Mar;232(4):428-435
- (26) Jian Wu, Yuchen Jiao, Marco Dal Molin, Anirban Maitra, Roeland F. de Wilde, Laura D. Wood, et al. Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011 Dec 27;;108(52):21188-21193
- (27) Taupin D, Lam W, Rangiah D, McCallum L, Whittle B, Zhang Y, et al. A deleterious RNF43 germline mutation in a severely affected serrated polyposis kindred. *Human genome variation* 2015;2(1):15013.
- (28) Giannakis M, Hodis E, Jasmine Mu X, Yamauchi M, Rosenbluh J, Cibulskis K, et al. RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nature genetics* 2014;46(12):1264-1266.
- (29) Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2005;51(3):187-200
- (30) GenScript [Internet]. [Place unknown]:GenScript; c2020.Express cloning vector list; [cited 2020 June 30]; Available from:

<https://www.genscript.com/express-cloning-vector-list.html>.

Image:

pcDNA3.1+CeGFP

- (31) CellMask™ Plasma Membrane Stains USER GUIDE [package insert on the Internet]. Thermo Fisher Scientific Inc, 2014 [cited 2020 July 13]. Available from: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?id=man0001956&version=a.0&pdfurl=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAAssets%2FLSG%2Fmanuals%2FCellMask_Plasma_Membrane_Stains_Pi.pdf&title=Q2VsbE1hc2sgUGxhc21hIE1lbWJyYW5lIFNOYWlucw== .