

Innhold.

| | |
|---|---------|
| 1. Innledning----- | 2 |
| 2. Formål.----- | 2 |
| 3. Materialer.----- | 3 |
| 4. Metoder----- | 3 |
| 4.1 Isolering av RNA fra tannanlegg----- | 3 |
| 4.2 Elektroforese----- | 3 |
| 4.2 Mikromatriseanalyser----- | 3 |
| 4.3. Kvantitering av mikromatrisedata----- | 4 |
| 4.4 Tolkning av ekspresjonsdata ved bruk av bioinformatikk----- | 4 - 10 |
| 5. Diskusjon----- | 10 - 11 |
| 6. Referanser----- | 12 - 13 |

1. Innledning.

Odontogenesen er prosessen som fører til at det dannes tenner under fosterutviklingen. Denne prosessen har mye til felles med organogenese generelt som er nøye regulert både i tid og rom. Det sier seg selv at gener er involvert i denne prosessen. Det er derfor viktig å forstå hvordan geneekspresjon styrer odontogenese. Dette kan bli et nyttig framtidig verktøy både m.t.p. terapi og diagnose. Kartleggingen av den genetiske styringen er ennå i sin startfase. Et litteratursøk viste at det er rapportert et begrenset antall av slike studier(1)

Dette prosjektet går ut på kartlegge geneekspresjonen under tannutviklingen hos mus. Tannanlegg ble isolert fra musefostere på forskjellige utviklingsstadier. Total RNA ble isolert fra tannanleggene, og brukt til mRNA styrt syntese av cDNA. Merket cDNA ble deretter hybridisert til mikromatriser (med sonder for ca. 30000 gener) for å gi et bilde av hvilke gener som ble opp eller nedregulert på de forskjellige utviklingsstadier.

I dette 4 ukers prosjektet ble tannanlegg isolert fra nyfødte mus (19.5 dager etter befruktning) og fra 4 dager gamle museunger (23.5 dager etter befruktning). Mikromatriseanalysen ble benyttet for å undersøke forskjellen i geneekspresjonen mellom disse to stadiene. Slike resultater kan ved bruk av bioinformatikk også indikere hvilke celle-fysiologiske prosesser som er opp eller nedregulert mellom disse to stadiene i tannutviklingen. Dersom slike arbeider gjennomføres med daglige intervaller fra for eksempel 11.5 dag etter befruktning er det mulig å kartlegge geneekspresjonen under odontogenesen. Slike studier vil være et nyttig bidrag til vår forståelse av odontogenens molekylære og cellulære mekanismer.

Et litteraturstudium viste at det foreligger svært lite data om odontogenesen fra mikromatrisestudier. De fleste studier er utført med immunhistokjemi og in situ hybridiseringsteknikker, som bare gir informasjon om et ganske begrenset antall gener.

2. Formål.

Vi skulle se på den genetiske styringen av odontogenesen.

3. Materialer.

Qiagen RNeasy mini kit, RT-PCR (Qiagen One-step kit), gel og loading buffer for elektroforese, Mikromatriser med sonder for ca. 30 000 musegener ble brukt (produsert ved Medisinsk Teknisk forskningscenter, NTNU, Trondheim), Genisphere 900 merkingskit

4. Metode

4.1 Isolering av RNA fra tannanlegg

Her ble det benyttet tre tannanlegg fra mus fra hvert utviklingsstadium (19.5 og 23.5 dpc (dager post coitum). Alle tannanlegg var fra første molar i underkjeven. Total RNA isoleringen ble utført med Qiagen Rneasy minikit.

4.2 RT-PCR

KONTROLL AV ISOLERT RNA

Her ble det gjort en kvalitetskontroll ved å sjekke ameloblastin og L-27 mRNA ekspresjon vha. RT-PCR (Qiagen One-step RT-PCR kit) og elektroforese. Prinsippet her er at en skulle sjekke at ameloblastin skulle øke i forhold til L-27 (som er uttrykt jevnt hele tiden og ikke påvirket av odontogenesen). På denne måten kan en kontrollere at RNA som er isolert fra tannanlegg er egnet til videre analyse i mikromatrise.

4.2 Mikromatriser

MIKROMATRISERARBEID

cDNA syntese og merking av cDNA med Cy3 og Cy5 ble utført med et Genisphere 900 merkingskit. RNA prøver fra 19.5 dager ble merket med Cy3 og 23.5 dager med Cy5 og prøvene ble analysert i triplikater. Matriseliden ble scannet med en Perkin Elmer ScanArray Light mikromatrisescanner. De resulterende tiff-filene ble kvantitert med ScanArray Express programmet, og resultatet ble statistisk bearbeidet med Spotfireprogrammet. ANOVA i Spotfire ble anvendt for å påvise gener som er signifikant forskjellig uttrykt. Funksjonell og bioinformatisk analyse av gener som ble signifikant forskjellig uttrykt ble utført med programmet WebGestalt.

4.4 Tolkning av resultat ved bruk av bioinformatikk

RESULTATER

Etter scanning og kvantitering av mikromatrisens hybridiseringssignaler, blir netto fluoresenssignaler fra hvert gen ved de to tidspunktene plottet mot hverandre som et scatterplott. Gener som ikke er differensielt uttrykt blir liggende langs med regresjonslinjen, mens gener som er differentielt uttrykt vil ligge fjernt fra linjen.(Fig. 1). Det er også vanlig å filtrere bort lavintensitetsignalene, slik som i Fig.1.

Gener som er signifikant forskjellig uttrykt mellom disse to tidspunktene bestemmes ved hjelp av ANOVA analyse (se Fig.2). Videre ble det laget et nytt scatter plott etter ANOVA-testen hvor en har kun gener med signifikans på $p \leq 0.05$. Dette gjør at gener som ikke er signifikant forskjellig uttrykt, fjernes fra videre analyser(Fig.2).

For å anskueliggjøre trender i resultatet, blir signalene gjenstand for clusteranalyse, som self-organising maps (SOM, Fig.3), hvor gener med lik "oppførsel" i uttryksmønsteret grupperes sammen. Det fremkommer da grupper av gener som er signifikant opp- eller nedregulerte mellom 19.5 og 23.5 dager. Det som er viktig å merke seg at hvert cluster inneholder mange forskjellige gener som på grunnlag av ekspresjonsmønsteret er blitt slått sammen i en gruppe. Disse genene har ikke nødvendigvis noen funksjonell sammenheng.

På de gjenværende gener gjøres det en KEGG analyse med WebGestalt programmet. KEGG analysen går ut på å organisere uttrykte gener basert på biokjemiske reaksjonsveier.

Det videre arbeidet består i å tolke dette og komme frem til en konklusjon. Dette er presentert i diskusjonen.

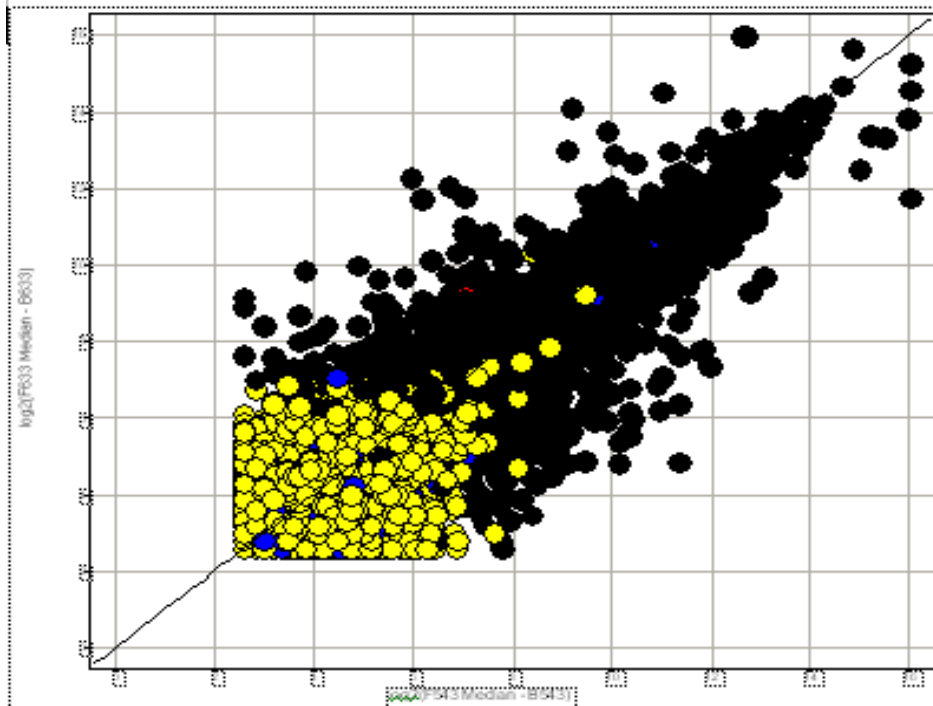


Fig. 1. Scatter plott av resultat etter scanning og kvantiteringen av et slide. På X og Y aksene er det plottet inn resultat fra hhv. 19.5 og 23.5 dager. Lavintensitetssignaler er her bortfiltrert

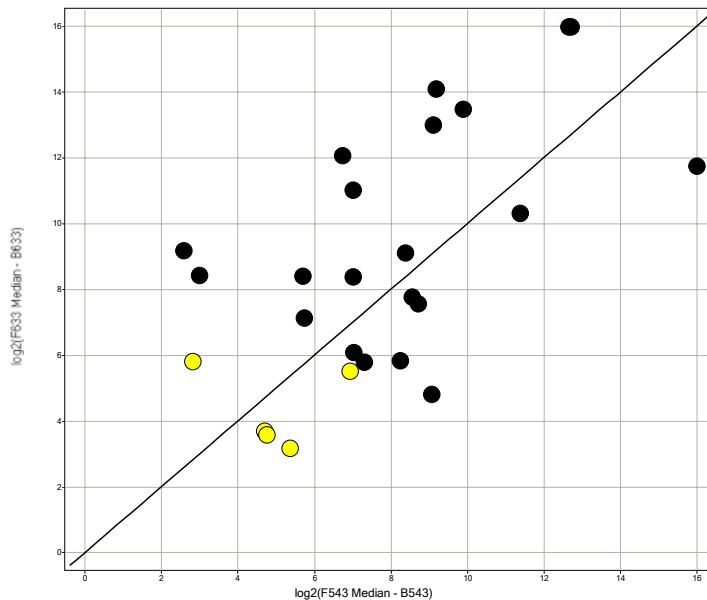


Fig. 2 Data fra slide, som viser gjenværende gener etter ANOVA test hvor signifikans nivået er $P \leq 0.5$. Gener med ikke-signifikant uttrykksforskjell er nå fjernet av plottene.

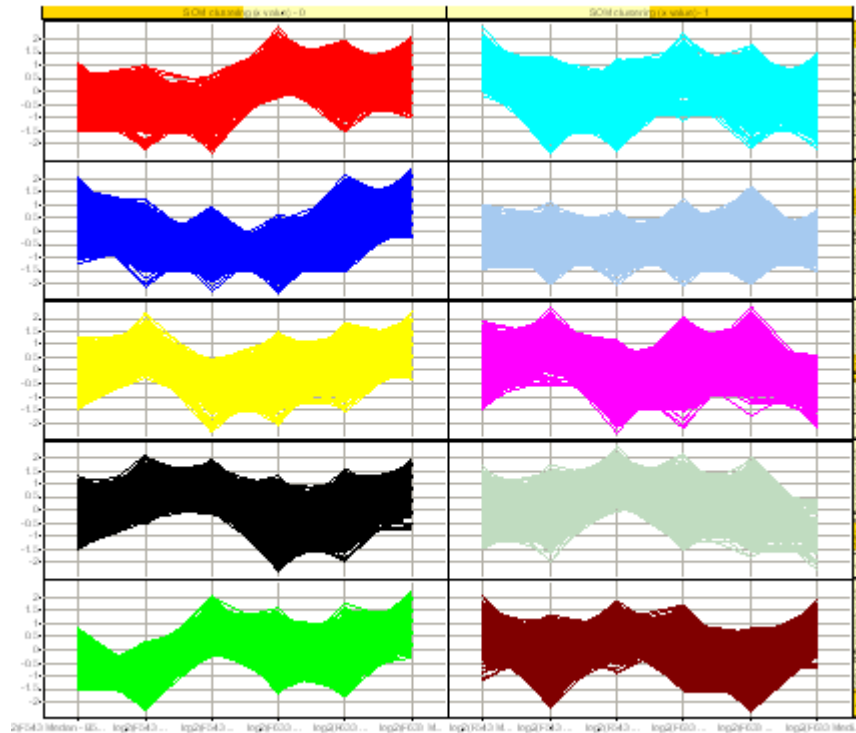


Fig 3. Self-organising maps (SOM) klustering av av ekspresjonsdata fra triplikate mikromatriser fra 19.5 og 23.5 dpc. De 3 først punktene på x-aksen viser data for 19.5 dager, og de 3 siste fra 23.5 dager.

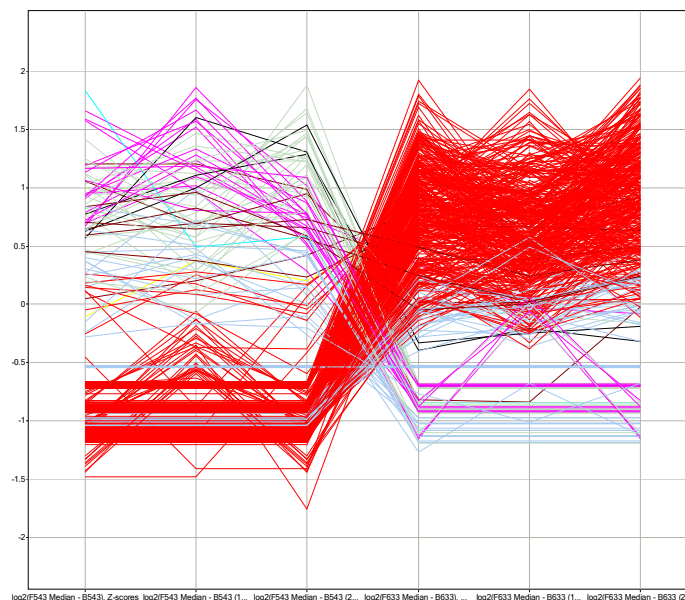


Fig. 4. Gener som er signifikant forskjellig ($P \leq 0.03$) forskjellig uttrykt i følge ANOVA. Flest gener er oppregulert ved 23.5 dager (rød farge), mens de øvrige genene vist på figuren er nedregulert ved 23.5 dager.

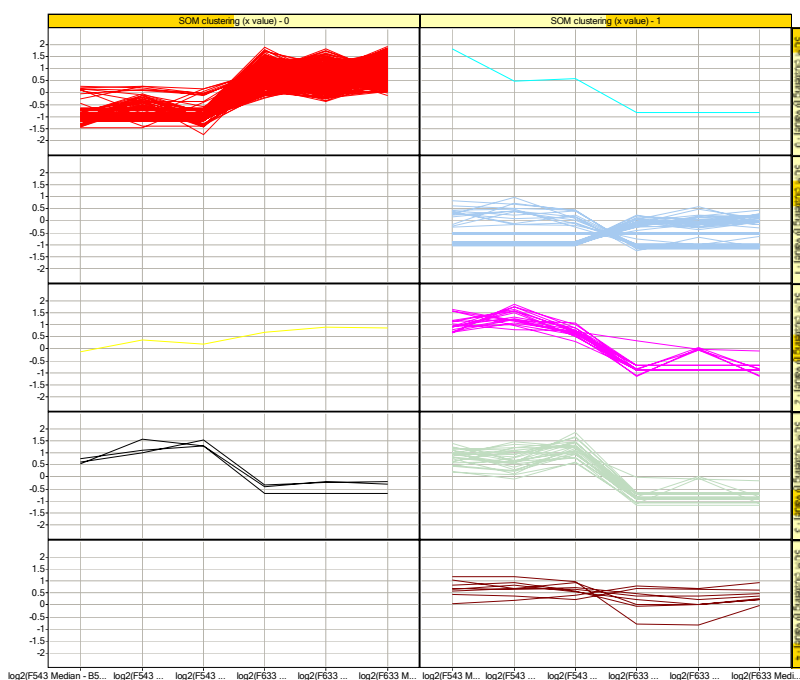


Fig. 5. Gjenværende gener i SOM klusterene når $P \leq 0.03$. For øvrig samme data som i Fig.4

WEBGESTALT RESULTATER

| KEGG pathway | Gene number | Entrez Gene IDs | Enrichment |
|---|-------------|-------------------------------|---|
| Calcium signaling pathway | 5 | 12292 12322 16439 16867 20963 | O=5;E=0.67907553901;R=7.36295111923;P=0.000633824483403 |
| Cytokine-cytokine receptor interaction | 5 | 12776 16196 21926 21949 22164 | O=5;E=0.868136342485;R=5.7594639866;P=0.00188364797894 |
| Neuroactive ligand-receptor interaction | 4 | 14061 15551 16867 19226 | O=4;E=0.991604622305;R=4.03386582719;P=0.0179445384829 |
| Tryptophan metabolism | 3 | 13099 17161 56050 | O=3;E=0.227644640918;R=13.1784345456;P=0.0015688787154 |
| Apoptosis | 3 | 12337 21926 60594 | O=3;E=0.351112920738;R=8.54425976034;P=0.00535735832623 |
| Regulation of actin cytoskeleton | 3 | 14061 16403 18711 | O=3;E=0.756243213898;R=3.96697774587;P=0.0406987679347 |
| Complement and coagulation cascades | 3 | 13136 14061 17175 | O=3;E=0.250794943385;R=11.9619636645;P=0.00207256645938 |
| Phosphatidylinositol signaling system | 3 | 16439 18711 21754 | O=3;E=0.262370094618;R=11.4342299734;P=0.00235789982085 |
| Fatty acid metabolism | 2 | 11430 13099 | O=2;E=0.200635954708;R=9.96830305373;P=0.0173071454863 |
| Wnt signaling pathway | 2 | 12322 20671 | O=2;E=0.532456956724;R=3.75617216517;P=0.0997204086376 |

Fig.6. Grupper av gener som har blitt signifikant assosiert med forskjellige cellefysiologiske prosesser. Bare gener som var signifikant forskjellig uttrykt ble brukt i KEGG analysen. Dette er gener som er signifikant oppregulert ved 23.5dpc sammenlignet med 19.5dpc.

KEGG analyse

KEGG tabellen organiserer uttrykte gener basert på biokjemiske reaksjonsveier.

| KEGG pathway | Gene number | Entrez Gene IDs | Enrichment |
|----------------------------------|-------------|--|---|
| Oxidative phosphorylation | 13 | 11950 11973 12859 12864 12868 170658 17993 17995 20463 54405 57423 66108 66218 | O=13;E=0.978995309632;R=13.2789195945;P=2.23233585443E-11 |
| Focal adhesion | 13 | 110157 11464 12445 12825 12832 12833 18176 18590 18709 20416 22340 22793 26417 | O=13;E=1.75188634355;R=7.42057271457;P=2.96479612071E-08 |
| Ribosome | 12 | 110954 19896 19942 19943 19944 19989 20005 20091 20116 269261 27207 54217 | O=12;E=0.77289103392;R=15.526121372;P=2.03003774289E-11 |
| Regulation of actin cytoskeleton | 11 | 110157 11464 11867 14182 14183 17698 18176 18590 18709 26417 56443 | O=11;E=1.72612330909;R=6.37266175718;P=1.55424947187E-06 |
| MAPK signaling pathway | 8 | 110157 11911 14182 14183 18176 18590 26417 73181 | O=8;E=2.04386740081;R=3.91414824505;P=0.00112803558284 |
| Cell Communication | 7 | 11464 12825 12832 12833 16664 16905 22352 | O=7;E=1.03052137856;R=6.79267810026;P=8.4398653996E-05 |
| Axon guidance | 7 | 13846 14678 17973 18176 26417 50780 73181 | O=7;E=1.15074887273;R=6.08299531367;P=0.000168108531438 |
| Purine metabolism | 6 | 18582 20016 20022 20135 | O=6;E=1.1936872635;R=5.0264421708;P=0.00132839486022 |

| | | | |
|--|---|--|--|
| | | 23918 67054 | |
| Valine, leucine and isoleucine degradation | 6 | 11669 12035 12039 15108 54673 93747 | O=6;E=0.395033195115;R=15.1885969944;P=2.70230112493E-06 |
| Cell cycle | 6 | 12428 12445 12581 18538 26965 50793 | O=6;E=0.910293884395;R=6.59127794096;P=0.0003194998334 |
| Natural killer cell mediated cytotoxicity | 6 | 110157 18176 18709 20416 26417 73181 | O=6;E=0.987582987787;R=6.07543879775;P=0.000494086871082 |
| Tight junction | 6 | 11464 13043 13823 14678 18176 20740 | O=6;E=1.02193370041;R=5.87122236757;P=0.000592154199176 |
| Proteasome | 6 | 19167 19172 19173 19175 26444 59029 | O=6;E=0.25763034464;R=23.289182058;P=1.92342662547E-07 |
| Insulin signaling pathway | 5 | 110157 18176 18709 20416 26417 | O=5;E=1.18509958534;R=4.21905472066;P=0.00695554834549 |
| Gap junction | 5 | 110157 14678 18590 22144 26417 | O=5;E=0.695601930528;R=7.18801915372;P=0.00068284424164 |
| Fatty acid metabolism | 4 | 11532 11669 15108 93747 | O=4;E=0.326331769877;R=12.2574642411;P=0.000313715787296 |
| TGF-beta signaling pathway | 4 | 12161 26417 268977 26965 | O=4;E=0.712777286838;R=5.61185109832;P=0.00577334321538 |
| Dorso-ventral axis formation | 3 | 110157 18176 26417 | O=3;E=0.274805700949;R=10.9168040897;P=0.00259074994186 |
| Glycerolipid metabolism | 3 | 108155 11532 11669 | O=3;E=0.403620873269;R=7.4327176781;P=0.00770434065832 |
| Histidine metabolism | 3 | 11669 15115 54673 | O=3;E=0.377857838805;R=7.93949388343;P=0.00641269965235 |

Fig.7. Her ser vi et gensett som viser signifikant økt ekspresjon ved dag 13.5dpc sammenlignet med 13.5dpc. som er startfasen av odontogenesen, resultatet er kommet frem etter et liknende utførelse som det er beskrevet i metoddelen over. Tabellen viser fra venstre, prosessen genene er assosiert med, antall gener og Entrez gen ID. Siste kolonnen viser parametere som følger:

O: Antall gener observert

E: Forventet antall gener i prosessen.

R: Ratio mellom observerte og forventet antall gener.

P: Signifikans nivået for uttrykte gener.

DISKUSJON

Signalveier som regulerer cellevekst, differensiering og apoptose

På samme måte som beskrevet over, ble det også gjort en studie på gen ekspresjonsmønsteret ved 13.5 dager (Fig. 7), altså ved starten av odontogenesen. I dette stadiet skjer det en meget aktiv organisering av celler i forskjellige lag, og celleproliferasjon (2). Ikke så uventet, finner vi gener som har med basale celledfunksjoner å gjøre. Her er det meget få/ingen gener som er direkte koplet opp mot odontogenesen, de er heller assosiert med basale funksjoner forutgående for organogenese.

Gener involvert i apoptose er oppregulert ved 23.5 dager. Apoptose er en viktig mekanisme hva angår tannmorfologi, og er en fellesnevner ved organogenese. Det er interessant at disse genene er også aktive etter at dannelsen av emalje og dentin har startet. Litteratursøk viser at det er gjort liknende funn ved immunohistokjemiske studier som er gjort på mus (2). Der er det påvist proteiner som styrer apoptose. Det er antatt at under amelogenese og dentinogenese, foregår det apoptose av ameloblaster og odontoblaster. (3)

Når det gjelder de basale cellulære prosesser, som en kan knytte direkte til det en observerer ved immunhistokjemiske studier av odontogenesen, ser vi nukleotid metabolismen som er nødvendig når celler deler seg (Purine metabolism), gener assosiert med ribosom (Ribosome) som også er viktig da en forventer stor protein turn over, MAPK- systemet som er central i regulering av cellyklus via Ras/MAPK kaskaden,(4) TGF- β som har en rolle både i kontroll av celledeling, morfogenese og høyre - venstre orientering av organer som igjen er helt sentral under tanndannelsen (5). Dette er prosesser som er helt logiske i dette stadium. Det en her bør huske er at de nevnte prosessene ikke er helt uavhengige og skjer i samme tid.

Når det gjelder funn av gener som har med cytoskjelettet og celleadhesjon, har dette også med prosessene som skjer i dette stadium av odontogenesen å gjøre (6).

Ca⁺⁺ homeostase og Ca⁺⁺ signalveier

Ved 23.5 dager finner vi gener (Cacna1s) assosiert med kalsium signal veien, det vi vet fra før er at 4-5 dager etter fødselen skjer det en calcsifiseringsprosess av predentin/dentin. Dette er et gen som koder for proteiner som er transmembrane og står for bl.a. transport av Ca⁺⁺. Det er da riktig å anta at det er dette genet og den prosessen som foregår i dette stadiet, har en direkte sammenheng (7), (8).

Cytokinavhengige prosesser

Interleukin 7, et signal molekyl som har blant annet med reguleringen av dentinogenese via Jak/STAT systemet. Når vi ser at dentinogenese er en aktiv prosess i dette stadiet, antar vi at IL7 en regulerende funksjon i prosessen (5). Blant genene, var det en gruppe som ikke hadde litteraturreferanser som direkte kopler dem til odontogenesen. Dette gjelder gener som er implisert i hematopoiesen. En hypotese kan være at under dannelsen og frembrudd av tenner, må benet rundt annleggene resorberes og remoduleres for å gi plass. Nødvendige osteoclaster må rekrutteres fra benmargen. Videre er det funnet holdepunkter for at benmargen i alveolar benet deltar i dannelsen av osteoklaster ved kjeveortopediske behandlinger. Det blir da nærliggende å tro at denne familien av gener som vi har isolert her spiller en rolle i remodulering av benet rundt tannannlegget (9).

Gener assosiert med morfologiske funksjoner

Tre gener er tilknyttet prosesser som styrer aksondannelsen, morfogenesen og dorso-ventral akse dannelsen. En kan se at det skjer en prosess som er helt essensielt i dette stadium av odontogenesen med tanke på at de fremtidige tannannleggene skal både ha nerveforsyning, at de skal dannes på spesifikke plasser i kjeven og forskjellige tenner skal ha forskjellige morfologi. Det er helt logisk at disse tre familier av gener er høy aktive i dette stadium.(5, 10)

Referanser:

(1)

<http://bite-it.helsinki.fi/>

(2)

B.K.B. Berkovitz, G.R.Holland, B.J.Moxham: Oral anatomy, histology and embryology.

(3)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=12539694&itool=iconabstr&query_hl=3

(4)

Ernst J.M.Helmreich: The Biochemistry of Cell Signalling, chapter 4.

(5)

Ernst J.M.Helmreich: The Biochemistry of Cell Signalling, p. 104 –108

(6)

Sidney A. Cohn, Development of the molar teeth in the albino mouse, p.297

(7)

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2672882&dopt=Abstract)

(8)

(<http://www.biomedcentral.com/1523-3774/5/222/abstract>)

(9)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11709665

(10)

http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/show_pathway?mmu04320+110157+18176+26417