Archive of SID

# بررسی رابطه موتاسیون ژن MSX1 با Tooth Agenesis با روش مولکولی RFLP-PCR

دکتر مسعود سیفی*، دکتر بهرام کاظمی**، دکتر پریسا گلکار***


## چکیده

**زمینه و هدف:** با توجه به نقش پر اهمیت ژنتیک در تکوین آنومالیهای دندانی به ویژه عدم تشکیل جوانه دندانی شناسایی جهش ژنتیکی در افراد مبتلا به Tooth Agenesis (T.A) حائز اهمیت بوده، تشخیص پیش بالینی و درمان بهتر ارتودنسی را مقدور می‌سازد. هدف از این مطالعه بررسی رابطه موتاسیون ژن MSX1 با tooth genesis می‌باشد.

**مواد و روشها:** تحقیق به روش مورد - شاهدی (case – control) صورت گرفت. گروه مورد شامل ۲۰ فرد مبتلا به T.A و گروه شاهد شامل ۲۰ فرد ۳۲ دندانی بود. DNA از نمونه خون این افراد با روش P.C.I EXT تهیه گردید. سپس DNA با روش PCR تکثیر شد و با افزودن آنزیم Ban II به محصول PCR، وجود یا عدم وجود جهش بررسی گردید. روش جمع‌آوری اطلاعات مبتنی بر مشاهده نتایج الکتروفورز DNA بود. از آزمون chi-square برای ارزیابی دو صفت کیفی استفاده شد.

***یافته‌ها:*** Ban II بر روی DNA گروه کنترل موثر نبود (مشاهده نوار ۱۹۵ جفت باز در الکتروفورز) ولی بر روی آلل معیوب گروه مورد، تاثیر گذاشت و آن را هضم کرد. (مشاهده نوارهای ۱۰۶ و ۸۹ جفت باز در الکتروفورز). ارتباط آماری بین موتاسیون ژن MSX1 و TA بسیار معنی دار (P<۰/۰۰۱) بود.

***نتیجه‌گیری:*** در گروه ۳۲ دندانی جهش MSX1 رخ نداده بود و در گروه مورد، جهش آلل معیوب ژن MSX1 صورت پذیرفته بود. بنابراین چنانچه در بررسی رادیوگرافیک جوانه دندانی مشاهده نگردید، با متد مطروحه در این تحقیق به قطعیت می‌توان در مورد امکان کلسیفیکاسیون جوانه دندانی در آینده و یا فقدان کامل آن اظهار نظر کرد.


**کلید واژگان:** PCR، موتاسیون ژن Tooth Agenesis، MSX1.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۸/۳ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸٤/۲/۱۳ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸٤/۳/۱۰

## مقدمه

رشد و نمو دندان تحت کنترل شدید ژنتیک می‌باشد.(۱) در سالهای اخیر نقش پر اهمیت ژنتیک در تکوین آنومالیهای دندانی مانند هایپودونشیا و یا عدم تشکیل جوانهٔ دندانی، تبین گشته است. عدم وجود بینش واقعی نسبت به علت این وضعیت، به کاربرد روشهای ژنتیک مولکولی برای شناسایی ژنهای مسبب رشد و نمو طبیعی دندان، منجر می‌شود.(۲)

Agenesis یک یا چند دندان، شایعترین آنومالی تکاملی در انسان، می‌باشد. میزان شیوع دندان مبتلا به T.A (به جز مولر سوم) به جمعیت مورد مطالعه بستگی دارد و تنوع آن وابسته به زمینهٔ قبلی می‌باشد.

نظریه‌های متفاوتی در مورد علل عدم تشکیل جوانه دندانی عنوان شده‌اند.(۳)

در سال ۱۹۹۵، Shape و در سال ۱۹۹۷ Neubuser بیان کردند که ادونتوژنزیس که فرآیندی پیچیده بوده، توسط عوامل مختلفی تنظیم می‌شود از شناخته‌شده‌ترین عوامل شناخته شده ژن MSX1 می‌باشد. علاوه بر آن سایر عوامل Transcription مانند MSX2، DLX1، DLX2، CSC و Pax9 بصورت محدود و یا همپوشان در تکامل دندانها و سیستم دندانی نقش دارند.

*نویسنده مسئول: دانشیار گروه ارتودنسی، دانشکده و مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. E-mail: seifimassoud@gmail.com

**دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و سلولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

***دندانپزشک.

www.SID.ir

Archive of SID

(۵،۴)

Peters در سال ۱۹۹۹ نشان داد که اثرات سینرژیستیک و آنتاگونیستیک مولکول‌های سیگنال دهنده شامل BMPS و FGFs بیان ژنهای فوق را تنظیم می‌کنند. بنابراین بسته به موقعیت و تقابل ژنها با سایر مولکول‌ها، این ژنها نقش متفاوتی ایفا می‌کنند.(۶)

در سال ۱۹۹۷، Stock اظهار داشت که T.A در انسان به عنوان یک تمایل evolutionary شناخته می‌شود و MSX1 به عنوان یکی از ژنهائی که در تحولات الگوی سیستم دندانی نقش دارد، شناخته می شود. هایپودونشیا در نتیجهٔ دو عامل یعنی موتاسیون در ژنهای دخیل در تشکیل دندان و نیز تغییرات اپی ژنتیک که تحت تاثیر محیط است، اتفاق می‌افتد.(۷)

Ruch در سال ۱۹۹۵ و Thessleff در سال ۱۹۹۷ بیان کردند که تکامل دندان ناشی از ارتباط متقابل بین اپی‌تلیوم و مزانشیم می‌باشد.(۹،۸) پس از غلاف شدگی (Envagination) اپی‌تلیوم دندانی در اکتومزانشیم، مورفوژنزیس دندان به مرحله تکاملی موفقی رسیده است و از مرحلهٔ جوانه‌ای تا کلاهکی و سپس زنگوله‌ای عبور می‌کند تا به شکل دندان منجر شود. حین تشکیل دندان چندین مولکول Transcription، عوامل رشد و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی نقش دارند. Mass در سال ۱۹۹۷ در مطالعات خود به نقش ژن MSX1 و در مورد الگوی بیان آن در تکامل دندان در in vivo و in vitro اشاره کرده است.(۱۰)

Vieira در سال ۲۰۰۳، مطالعه‌ای بر روی ژنهای موثر در تکامل دندانهای انسان انجام داد. امروزه تعداد این ژنها به بیش از ۱۰۰ مورد می‌رسد که تمامی آنها برای ایجاد T.A، بالقوه کاندیدا می‌باشند. MSX1 یکی از عوامل Transcription است که در چندین ساختار امبریونیک از جمله مزانشیم دندانی بیان (experss) می‌شود. ژنهای متعددی نیز در اپی‌تلیوم دندانی اولیه بیان می‌شوند از جمله Bmp7، BMP4، BMP2، DLX2، DLX5، Fgf9، Fgf8، Fgf4، FgF2 و Fgf1. تمامی این ژنها برای T.A در انسان بالقوه کاندیدا می‌باشند. انواع مختلف دندانها، احتمالاً، مکانیزم‌های تکاملی مختلفی دارند و عوامل ژنتیک متفاوتی در T.A دندانهای خاص، نقش خود را ایفا می‌کنند. در انسان، موارد T.A به همراه حداقل ۴۵ نوع از انواع سندرم‌ها گزارش شده‌اند، اما در مورد نوع دندانهای درگیر در هر کدام، توصیفات اندکی وجود دارد.(۱۱)

با توجه به میزان ۹/۶-۱/۶٪ وقوع هایپودونشیا (بدون در نظر گرفتن فقدان مولر سوم) آگاهی از عوامل شرکت کننده در آن می تواند از اولویت‌های درمان ارتودنسی- پروتز باشد. برای مثال چنانچه در سنین پائین، کلسیفیکاسیون دندان خاصی روی نداده، سن دندانی آن فرا رسیده باشد، می‌توان با اطمینان در مورد وجود یا عدم وجود جوانه دندانی اظهار نظر کرد.

هدف از انجام این تحقیق پاسخگویی به این پرسش علمی و کاربردی است که آیا در ژن MSX1، موتاسیون اتفاق افتاده است یا خیر. چنانچه پاسخ مثبت باشد می‌توان به تاثیر احتمالی این ژن در تشکیل جوانه دندانی آگاهی یافت.

## مواد و روشها

تحقیق حاضر به روش مورد - شاهدی (case - control) صورت گرفت. جامعه مورد بررسی شامل ۲۰ نفر از بیماران مراجعه کننده به بخش ارتودنسی دانشکده دانداپزشکی شهید بهشتی بودند که مبتلا به T.A بوده و حداکثر ۲ دندان لترال و یا دو دندان پرمولر پائین را نداشتند.

همچنین ۲۰ نفر از افراد سالم ۳۲ دندانی به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند و در تمامی افراد، وجود یا عدم وجود جهش ژن MSX1 مورد بررسی قرار گرفت. نمونه گیری مطالعه از نوع آسان (Convenient Sampling) بود.

در این مطالعه پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه، مقدار ۳



www.SID.ir

Archive of SID

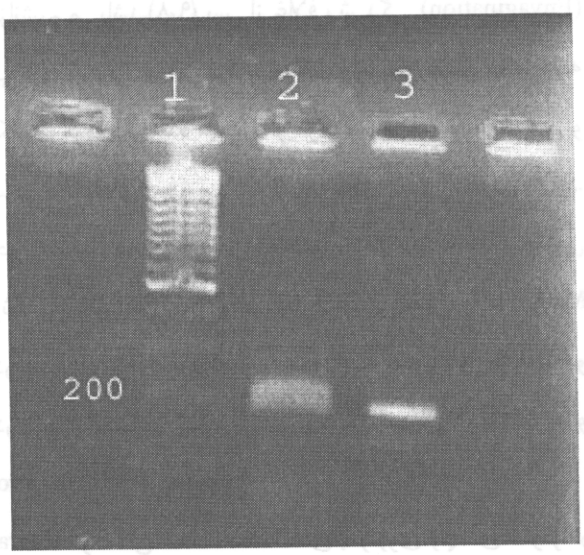


سانتی‌متر مکعب از خون تمامی افراد تهیه و تا هنگام کار در لوله آزمایش محتوی EDTA نگهداری شد. سپس با استفاده از محلول بافرلیز کننده و روش جوشاندن، DNA با روش P.C.I EXT. تخلیص و برای بررسی کمیت و کیفیت آن، بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد. در این حالت DNA با دستگاه UV Transilluminator با طول موج خاص، مشاهده گردید. سپس واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR)[1] جهت تکثیر DNA، انجام شد. در این واکنش ابتدا در اثر حرارت دو رشته DNA از هم باز می‌شوند و دو آغازگر واکنش به قسمتهای مکمل خود روی رشته DNA می‌چسبند. پس از این عمل، آنزیم Tag DNA Polymerase در حضور بازهای آلی موجب افزایش طول آغازگر می شود. PCR شامل چرخه‌های تکرار شونده زیر است: ۱- از هم جدا شدن رشته ها در اثر حرارت ۲- جفت شدن آغازگرها در محل مناسب روی قطعه DNA هدف ۳- تکثیر آغازگرها بوسیله آنزیم Tag که به تکثیر قطعه خاص رشته DNA منجر می‌شود.(۱) واکنش PCR در لوله مخصوص انجام گرفته، مواد لازم به لوله افزوده شده، در دستگاه Thermal قرار داده شدند.

پس از انجام واکنش PCR، محصول PCR روی ژل آگار ۲ درصد الکتروفورز شده، یک نوار در حدود ۱۹۵ جفت باز مشاهده می‌شد که همان ژن MSX1 تکثیر شده بود. برای تشخیص جهش MSX1 آنزیم Ban II که یک آنزیم برش دهنده می‌باشد به محصول PCR اضافه می‌شد. در افرادی که در آنها جهش رخ داده بود نوار مذکور شکسته شده، دو نوار ۱۰۶ جفت باز و ۸۹ جفت باز، مشاهده می‌شد. ولی در افرادی که در آنها جهش رخ نداده بود، آنزیم بر روی محصول PCR، اثر نمی‌کرد و همان نوار ۱۹۵ جفت باز مشاهده می‌شد. جهت تحلیل‌های آماری از آزمون chi – square در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

## یافته‌ها

پس از انجام واکنش PCR بر روی ۴۰ نمونه مورد مطالعه (۲۰ مورد و ۲۰ شاهد) و افزودن آنزیم Ban II به محصول PCR، مشاهده شد که در افراد گروه شاهد، (آللهای بدون موتاسیون) آنزیم بر روی محصول PCR اثر نکرده، تنها همان نوار ۱۹۵ (جفت باز) دیده شد. در نوار الکتروفورز افراد ۳۲ دندانی، جهش مورد نظر رخ نداده است. تمامی افراد گروه مورد بصورت هتروزیگوت بودند یعنی دارای یک آلل سالم بودند و آلل معیوب نیز وجود داشت. در آلل معیوب جهش رخ داده بود و Ban II، بر آن تاثیر کرد لذا یک نوار در حدود ۱۰۶ جفت باز و یک نوار در حدود ۸۹ جفت باز، مشاهده گردید. ارتباط آماری بین موتاسیون ژن MSX1 بسیار معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) بود.




**شکل ۱ - نتایج الکتروفورز نمونهٔ سالم پس از افزودن آنزیم**

| | | |
|---|---|---|
| مارکر | Line1 | |
| PCR ژن MSX1 فرد سالم آنزیم خورده است و هضم نشده است | Line2 | Normal Enzyme |
| PCR ژن MSX1 فرد سالم | Line3 | |

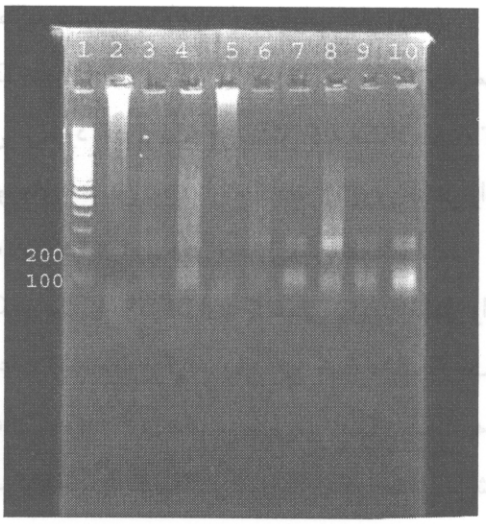
[1] - واکنش زنجیره ای پلیمراز بوسیلهٔ Mullis در اواسط دههٔ ۱۹۸۹ ابداع شد که به کمک آن می توان قطعه خاصی از مولکول DNA را به روش آنزیمی در آزمایشگاه تکثیر نمود.



www.SID.ir

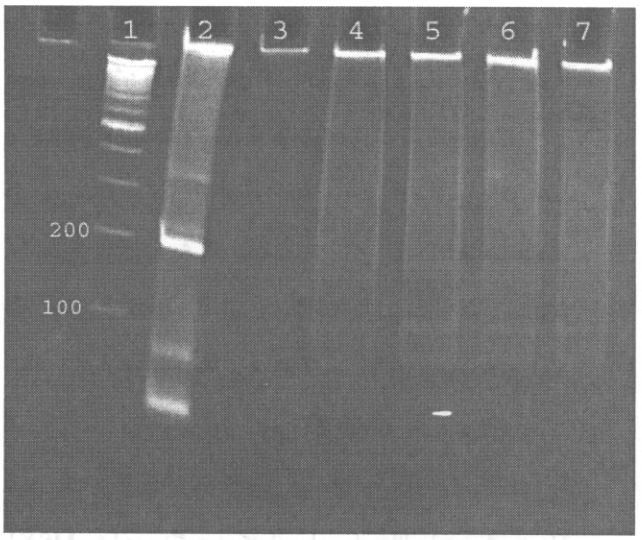
Archive of SID






شکل ۲- نتایج الکتروفورز افراد سالم و افراد هتروزیگوت بر روی ژل آگارز

مارکر Line1
PCR MSX1 (195bp) Line2
افراد سالم Line3,5
افراد هتروزیگوت Line 4, 6, 7,8,9,10
Enzyme Agarose




شکل ۳ - نتایج الکتروفورز نمونه‌های هتروزیگوت پس از افزودن آنزیم

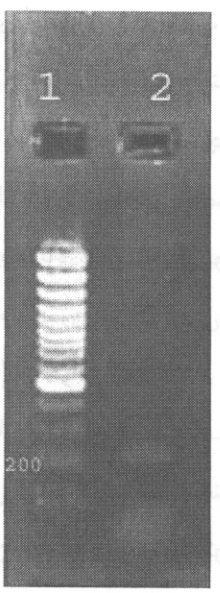
مارکر Line1
(195bp) غیر آنزیم خورده Line2
افراد هتروزیگوت Line4-7
Missing Enzyme

## بحث

هایپودونشیا یکی از شایعترین آنومالیها در تکامل دندان است.(۱۲) موارد شدید هایپودونشیا در سندرم‌ها و سایر نقایص مادرزادی مانند Cherubism, Ectodermal dysplasia یافت می‌شود.

ارگانیزاسیون ساختمانهای اسکتال orofacial، خصوصاً دندانها، در پستانداران یک ویژگی Species-Specific می‌باشد. مبنای ژنتیک دندانها ممکن است از جوندگان تا انسان تغییر کند. برای کشف این نکته و با توجه به اهمیت homeogenes در پاتولوژی انسان، تحقیقات بر روی چند ژن homeobox دخیل در تکامل orofacial انسان، آزمایشات بر روی جوندگان (rodent experiment) و نیز آزمایشاتی براساس فنوتیپهای کلینیکی انسان در موارد مبتلا به موتاسیون homeogenes آغاز شده است.(۱۳)

پیشینه انجام چنین مطالعاتی در کشور ایران توسط محققین




شکل ٤ - مارکر و محصول PCR ژن MSX1

Setup
مارکر Line1
Line 2 PCR MSX1 195 bp



www.SID.ir

یافت نشد. بنابراین با توجه به ارزش تشخیص مطالعهٔ موتاسیون ژن MSX1 در افراد ایرانی و ارتباط آن با T.A (Tooth Agenesis) مطالعهٔ حاضر صورت گرفته است.

در این مطالعه، پس از اتمام کلیه مراحل لابراتوری، در تمامی ۲۰ مورد مبتلا به T.A، موتاسیون ژن MSX1 مشاهده شد. افراد شرکت کننده در این مطالعه در پرمولر دوم مندیبل و لترال اینسایزور ماگزیلا به T.A مبتلا بودند. برخی نیز در اینسایزر مندیبل و پرمولر دوم ماگزیلا، به T.A مبتلا بودند. در هیچ یک از افراد گروه کنترل در مطالعهٔ حاضر، موتاسیون ژن MSX1 مشاهده نگردید که این امر با مطالعات Vastardis در سال ۱۹۹۶ و در سال ۲۰۰۰ همخوانی دارد.(۱۴،۲)

Vastardis (۱۹۹۶) با مطالعه بر روی ۲۸ نفر از اعضای یک خانواده مبتلا به Familial FTA Tooth Agenesia نتیجه گرفت که در تمامی بیماران، موتاسیون ژن MSX1 وجود دارد. تمامی این افراد از نظر دندانهای شیری و سابقه وجود آن، طبیعی بودند ولی با انجام رادیوگرافی فقدان پرمولرهای دوم ماگزیلاومندیبل همچنین مولرهای سوم فکین، مشاهده شد. برخی افراد نیز در پرمولرهای اول ماگزیلا، اینسایزر اول مندیبل و اینسایزور دوم ماگزیلا مبتلا به T.A بودند. Vastardis (۱۹۹۶) اظهار داشت که موتاسیون MSX1 سبب فقدان خلفی به صورت انتخابی و دو طرفه (خصوصاً پرمولرهای دوم و مولرهای سوم) می گردد به نظر می‌رسد که اثرات Arg 31 Pro missense mutation در سایر لوکاسیون‌های دندانی، ناکامل است؛ بدین معنا که برخی از افراد مبتلا، فاقد مولرهای اول مندیبل یا پرمولرهای اول بودند در حالی که که این دندانها در اکثر افراد حامل موتاسیون Arg 31 pro نرمال بود. در این مورد، فرض بر این است که موتاسیون ژن MSX1 ضروری نیست و یا سایر فاکتورهای Transcription این نقص را جبران نموده‌اند.

در مطالعهٔ حاضر، T.A در افراد هتروزیگوت نیز مشاهده گردید که با مطالعه Vastardis (۱۹۹۶) همخوانی ندارد. (۱۴)

Archive of SID

Newman, George در سال ۱۹۹۸ (۱۵) در یک گزارش مورد، گزارشی در مورد مادر و سه فرزندش که مبتلا به T.A در اینسایزورهای مندیبل بودند، ارائه کرده، ۴ تئوری اصلی راجع به علت T.A دراینسایزورهای مندیبل بیان نمودند:

Graber در سال ۱۹۷۸(۱۶) ارث یا همان توزیع فامیلیال را به عنوان علت اولیه مطرح کرده، بیان کرد T.A در نتیجهٔ یک یا چند Point mutation در یک سیستم پلی ژنتیک وابسته به هم می‌باشد که اغلب با یک الگوی اتوزومال غالب منتقل می‌شود که نفوذ ناکامل (incomplete penetrance) و بیان متغیر (variable expression) دارد. وی تاکید کرد که کلینیسین باید جهت شناسایی T.A در سایر اعضای خانواده جستجو نماید. این نظریه با نتایج حاصل از مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد.

Newman در سال ۱۹۷۷ (۱۷) اظهار داشت آنومالیها در تکامل سمفیز مندیبل ممکن است بر بافتهای دندانی تشکیل دهندهٔ جوانه‌های دندانهای اینسایزور فک پائین، تاثیر گذارند. محققین مطالعهٔ حاضر بر این باورند که ضمن اینکه نمی‌توان تاثیر آنومالیهای مربوط به تکامل مندیبل بر جوانه‌های اینسایزور را نادیده انگاشت، اما نتایج الکتروفورز محصولات PCR در فردی که واجد TA در اینسایزورهای مندیبل بود، بیانگر موتاسیون بصورت هتروزیگوت در ژن MSX1 می‌باشد که با تئوری Newman (۱۹۹۷) همخوانی ندارد.

Lavelle در سال ۱۹۷۳(۱۸)، همچنین Brothwell (۱۹) معتقدند که کاهش در تعداد دندانها به عنوان تلاش طبیعت جهت تطابق دادن قوسهای دندانی کوتاه شده می‌باشد. محققین ضمن اینکه چنین فرضی را انکار نمی‌کنند، مترصد یافتن مکانیزمهایی هستند که این امر را سبب شده‌اند.

Newman در سال ۱۹۹۴ (۲۰) اظهار داشت که التهابهای موضعی و یا عفونتهای فکین، ممکن است به جوانه‌های دندانی آسیب رسانده و همچنین اختلال در سیستم اندوکرین ممکن



www.SID.ir

Archive of SID

است باعث Ectodermal dysplasia و T.A شود.

بر طبق نظریه‌های فوق نمی‌توان جهش در MSX1 را به عنوان تنها علت انواع T.A دانست و سایر عوامل مداخله‌گر و عوامل محیطی می‌توانند نقش قابل توجهی در ایجاد T.A داشته باشند.

Satokata در سال۱۹۹۴ (۲۱) در مطالعه بر روی موشهایی که MSX1-deficient بودند چندین نقص کرانیوفاشیال از جمله شکاف کام ثانویه، آنومالی‌های چندین استخوانهای صورت و استخوان چکشی (malleus) در گوش میانی و T.A کامل را گزارش کرد. با توجه به این یافته‌ها MSX1 به عنوان یک ژن کاندیدا جهت ایجاد شکاف کام و T.A انتخابی در انسان، شناخته شد.

در مطالعهٔ Scarel در سال ۲۰۰۰، (۱۲) ۲۰ فرد مبتلا به هایپودونشیا با الگوهای اسپورادیک و یا فامیلیال متفاوت انتخاب شدند. در هیچکدام از این افراد، direct sequencing محصولات PCR، هیچگونه پلی‌مورفیسم یا موتاسیون را در ژن MSX1 نشان نداد. در این مطالعه بر خلاف مطالعهٔ حاضر و برخی تحقیقات دیگر (۱۳،۱۴)، که DNA از نمونه‌های خون افراد استخراج گشته است، DNA را به این روش بدست آوردند که افراد مورد نظر از دهانشویه ۳۰٪ محلول گلوکز استفاده کردند. سپس مخاط باکال به طور ملایم خراشیده (Scraping) و DNA بوسیله محلول Phenol chloroform استخراج شد. بنابراین علیرغم این واقعیت که اطلاعات ژنتیکی سلولهای بدن از جمله سلولهای خونی و سلولهای اپی‌تلیال مخاط دهان یکسان می‌باشد اما احتمال وجود عوامل مداخله‌گر دیگری از جمله نحوهٔ اجرای مراحل آزمایشگاهی و نیز خطاهای حین آزمایش ممکن است در نتیجهٔ نهایی محققین اثرگذار باشند. در مطالعهٔ فوق، ۲ نفر از بیماران به T.A پرمولرهای دوم و ۲ نفر به T.A مولرهای سوم مبتلا بودند. همچنین ۲ نفر از بیماران به T.A مولرهای سوم و ۲ نفر از بیماران نیز به T.A اینسایزورهای اول مندیبل مبتلا بودند. سایرین مبتلا به فقدان نسبی پرمولرهای دوم ماگزیلا و مندیبل و اینسایزور دوم ماگزیلا و مندیبل بودند. عدم وجود موتاسیون ژن MSX1 در این بیماران نشان داد که غیرفعال‌سازی (inactivation) ژن MSX1 در انسان، تاثیر انتخابی شدیدی بر روی دندانها دارد که اثر آن در مورد agenesis پرمولرهای دوم و مولرهای سوم به صورت اتوزومال غالب مشاهده می‌شود.(۲)

اخیراً چندین عامل رشد و عامل Transcription موثر در تکامل دندانها به طور خاص، معین گشته است.(۷) نظر بر این است که این مولکولها در مورفوژنریس، ایفای نقش می‌کنند. بنابراین ژنهای بسیار دیگری در اتیولوژی هایپودونشیا در انسان دخیل می‌باشند. جمعیت برزیلی مورد مطالعهٔ Raquel بسیار هتروژنوس بودند زیرا مخلوطی از گروههای قومی نژادی متفاوت، بودند. در افراد مورد مطالعه هیچگونه پلی‌مورفیسم مشاهده نشد.

Marie-Jose در سال ۲۰۰۰ مطالعه ای بر روی ۱۲ نفر از اعضای یک خانوادهٔ هلندی انجام داد. این خانواده ترکیبات مختلفی از شکاف لب، شکاف کام و Tooth Agenesis را نشان می‌دادند. ۱۱ نفر از این افراد در برخی از دندانهای دائمی، کمبود داشتند. T.A در پرمولرهای دوم ماگزیلا و مندیبل مشاهده می‌شد. مولر سوم نیز بطور متناوب وجود نداشت. به طور کلی اغلب نمونه‌های T.A به صورت دوطرفه و متقارن بودند. با استفاده از پرایمرهای مناسب و MSX1 direct Sequencing، جابجایی سیتوزین با آدنین (C→A) در نوکلئوتید 752 (نامگذاری براساس Hewitt) مشاهده شد. این جابجایی باعث ایجاد یک Stop codon دراگزون ۱ می‌شود. این موتاسیون در ۱۲ فرد مبتلای خانواده (شکاف و یا T.A) بصورت هتروزیگوت بود. علاوه بر آن موتاسیون در ۱۰۲ کروموزوم کنترل وجود نداشت.(۱۶)



www.SID.ir

Archive of SID

Arg 239 pro MSX1 Protein که قبلاً بعنوان Arg 31 Pro missense mutation اگزون ۲ MSX1 گزارش شده است، (۲) ساختار آشفته‌ای دارد. ثبات آن در برابر تغییرات دمایی کاهش یافته، در in vivo به صورت غیرفعال است. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که علت احتمالی فنوتیپ موتانت، haplo insufficiency می‌باشد. بدین معنا که وجود یک STOP Mutation در اگزون ۱، نزدیک به Antp hemeodomain مهم در اگزون ۲ به haplo insufficiency منجر می‌شود.

فنوتیپ خانوادهٔ هلندی از آنچه در MSX1 Arg 239 PRO missense mutation رخ می‌دهد، شدیدتر بود. الگوی T.A تقریباً در هر دو خانواده شناخته شد. در خانوادهٔ هلندی، میزان تنوع شکاف در ۴ نفر از ۱۲ نفر مبین تنوع میزان نفوذ (Penetrance) و بیان (expression) این صفت است، نتیجه آنکه فنوتیپ موتانت خانواده‌ای که شرح داده شد از نظر شکاف‌های oro-facial و T.A مشابه فنوتیپ موش MSX1- mutant بود.

Mackenzi در سال ۱۹۹۲ (۱۷) در مورد T.A دندانهای خاص در اثر موتاسیون ژن MSX1 گزارشی ارائه داد. وی همچنین اثر سایر ژنها از جمله MSX2 و نقش مؤثر آن در جوانه‌های دندان، اینسایزورو کانین را مورد بررسی قرار داد. ارتباط موتاسیون ژن MSX1 با T.A در مطالعهٔ حاضر نیز، به اثبات رسید.

Truekova در سال ۱۹۹۵ اظهار داشت که MSX2 در جوانه‌های دندانهای اینسایزور و مولر پیوسته اما در مورد جوانه‌های دندانهای کانین، به طور گذرا (Transiently) بیان می‌شود.(۱۸) در مطالعهٔ حاضر بررسی MSX2 صورت نپذیرفت و بنابراین راه طولانی در جهت شناسایی عوامل مؤثر در هایپودونشیا در انسان، پیش رو می‌باشد.

Jumlongras در سال ۲۰۰۱ اظهار داشت که در بیماران مبتلا به سندرم WITKOP (خصوصیات سندرم عبارتند از dysgenesis در ناخنها و Tooth Agenesis) یک جهش ژن Msxl به صورت Msx1 ser 202 Stop mutation رخ داده است (۱۹) که با مطالعه حاضر همخوانی ندارد.

Lidral و همکاران در سال ۲۰۰۲ مطالعه‌ای بر روی ۹۲ بیمار مبتلا به T.A (۸۲ نفر خویشاوند و ۴۰ نفر سالم) انجام داد. این افراد از نژادهای مختلف انتخاب شده بودند. در ۲ خواهر و برادر از یک خانوادهٔ بزرگ که T.A را بصورت اتوزومال غالب نشان می‌دادند، Met 61 lys mutation مشاهده شد. در کلیه افراد این خانوادهٔ بزرگ بین موتاسیون T.A و MSX1 رابطه کامل وجود داشت(۲۰) که این یافته با یافته‌های مطالعات قبلی(۱۶،۲)، همچنین مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد. وی همچنین نتیجه گرفت که در موارد مبتلا به incisor T.A موتاسیونی مشاهده نمی‌شود که این یافته با مطالعهٔ حاضر همخوانی ندارد. لذا در مورد T.A اتیولوژی متفاوتی وجود دارد که موتاسیون MSX1 یکی از آنهاست.

Frazier-Bowers و همکاران در سال ۲۰۰۲ موتاسیون در ژن Pax9 را علت T.A در دندانهای مولر، معرفی کرده، موتاسیون MSX1 را علت الیگونشیا در مولرها، عنوان نمی‌نماید.(۲۱) در مطالعهٔ حاضر هیچکدام از موارد مبتلا به T.A مولرها نبودند. بنابراین نقش سایر ژنها در تکامل دندانها از جمله دندانهای مولر، نمی‌توان چشم‌پوشی کرد.

Vieira در سال ۲۰۰۳ اظهار داشت که موتاسیون PAX9, MSX1 جزء موارد اندکی از موتاسیون‌های احتمالی موثر در T.A است.(۱۲)

انواع مختلف دندانها، احتمالاً مکانیزم‌های تکاملی مختلفی دارند و عوامل ژنتیک متفاوتی در T.A دندانهای خاص، نقش خود را ایفا می‌کنند. به عنوان مثال سندرم Van der Woude که با T.A دندانهای سانترال و لترال، کانین (و/یا) پرمولر در ۴۰٪ موارد به علاوهٔ پیت‌های لب تحتانی و شکافهای دهانی توصیف می‌شود. ژن معیوب عامل سندرم که نقشهٔ آن در 1q



www.SID.ir

Archive of SID

شناسائی شد، ژن کاندیدای خوبی برای T.A ایزوله در بیشتر سگمنت‌های قدامی فکین می‌باشد در حالیکه MSX1 و PAX9 بعنوان قوی‌ترین کاندیدا برای T.A در سگمنت‌های خلفی می‌باشند.

## نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج الکتروفورز، در تمامی افراد گروه مورد، جهش مورد نظر رخ داده است و در هیچ یک از افراد گروه ۳۲ دندانی، جهش در MSX1 صورت نپذیرفته است.

تشخیص هایپودونشیا در زمانی قبل از زمان کلسیفیه شدن طبیعی دندان معین، با استفاده از رادیوگرافی به تنهائی میسر نمی‌باشد. با این روش می‌توان در موارد مشکوک به تشخیص قطعی دست یافت.

همچنین با توجه به موارد اختلاف‌نظر که در برخی موارد هایپودونشیا را با فقدان جهش در ژن MSX1 همراه می‌دانند، بررسی سایر عوامل موثر از جمله تغییرات اپی‌ژنتیک و نیز بررسی سایر ژنهای دخیل در تشکیل دندان، توصیه می‌شود.

## *References*


1. Klein ML, Nieminen P, Lammi L, Niebuhr E, Kreiborg S: Novel mutation of the initiation condon of Pax9 causes oligodontia. J Dent Res 2005;84:43-70.
2. Sambrook J, Russell D: Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd Ed. CSHL Press 2001; Chap6:1-61.
3. Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE: A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. Nat Genet 1996;13:417-21.
4. Newman GV, Newman RA: Report of four familial cases with congenitally missing mandibular incisors. Am J Orthod Dentofac Orthop 1998;114: 195-207.
5. Shape PT: Homeobox genes and orofacial development. Connect Tissue Res 1995;32:17-25.
6. Neusbar A, Peters H, Balling R, Marting R, Martin GR: Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways. Cell 1999: 90:247-255.
7. Peters M, Balling R: Teeth: where and how to make their trends. Genet 1999;15:59-64.
8. Stock DW, Weiss KM, Zhao-Zhiyong Z: Patterning of the mammalian dentition in development and evolution. Bioassays 1997;19: 481-90.
9. Ruch JV: Tooth crown morphogenesis and cytodifferentiation: candid questions and critical comments. Connect Tissue Research 1995;32:1-41,1-8.
10. Thesleff I, Sharpe P: Signaling networks regulating dental development. Mech Dev 1997;67:111-123.
11. Mass R, Bei M: The genetic control of early tooth development. Crit Rev Oral Biol Med 1997;8:4-39.
12. Viera AR: Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. J Dent Res 2003;82:162-165.
13. Scarel RM, Trevilatto PC, Di Hipolito O Jr, Camargo LE, Line SR:Absense of mutation in the Homeodomain of the MSX1 gene in Patients with Hypodontia. Am J Med Genet 2000;92:346-9.
14. Davideau J, Demri P, Hotton D, Gu T, MacDougall M, Sharpe P: Comparative study of MSX-2, DLX-5, and DLX-7 gene expression during early human tooth development. Pediat Res 1999;46:650-6.
15. Vastardis H: The genetics of human tooth agenesis: New discoveries for understanding dental anomalies. Am J Orthod Dentofac Orthop 2000; 117:650-6.
16. Van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA,




www.SID.ir

Archive of SID

van Amstel HK: MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. Nat Genet 2000;24:342-4.

17. Mackenzie A, Ferguson MWJ, Sharpe PT: Expression Patterns of the homeobox gene, Hox-8, in the mouse embryo suggent a role in specifying tooth intitiation and shape. Development 1992;115: 403-420.
18. Tureckova J, Sahlberg C, Aberg T, Ruch JV, Theslesff I, Peterkova R: Comparision of expression of the msxl, msx2, BMP-2 and BMP-4 genes in the mouse diastemal and molar tooth primordia. Int J Dev Biol 1995;39:459-468.
19. Jumlongras D, Bei M, Stimson JM, Wang WF, Depalma SR, Sediman CE: A nonsence mutation in MSX1 Cawses Witkop Syndrome. Am J Hum Genet 2001;58:581,1347-1363.
20. Lidral AC, Reising BC: The role of MSX1 in human tooth agenesis. J Dent Res 2002;81:274-8.
21. Frazier-Bowers SA, Guo DC, Cavender A, et al: A novel mutation in Human PAX9 causes molar oligodontia. J Dent Res 2002;81;129-133.



www.SID.ir