

Carolina Vieira de Almeida

Análise da atividade transcricional da região promotora do gene PAX9 humano

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Biologia Buco-Dental – Área de Histologia e Embriologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Piracicaba

2009

Ficha Catalográfica

Almeida CV, Andrade SC, Saito CPB, Ramenzoni LL, Line SRP.

Análise da atividade transcricional da região promotora do gene PAX9 humano / Carolina Vieira de Almeida – Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Sérgio Roberto Peres Line
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Biologia Buco-dental. 2. Morfologia. 3. Histologia e Embriologia. I. Line SRP. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)

Título em inglês: Transcriptional analysis of the human *PAX9* promoter.

Palavras-chaves em inglês (*keywords*): *Pax9*; Transcriptional analysis; Promoter region; pGL3.

Área de concentração: Biologia Buco-dental

Titulação: Mestre em Biologia Buco-dental

Banca examinadora: Fernando Dini Andreote, Marcelo Rocha Marques, Sergio Roberto Peres Line

Data da defesa: 13/03/2009

Programa de pós-graduação em Biologia Buco-dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 13 de Março de 2009, considerou a candidata CAROLINA VIEIRA DE ALMEIDA aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "S. Line", written over a horizontal line.

PROF. DR. SERGIO ROBERTO PERES LINE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Fernando Dini Andreote", written over a horizontal line.

PROF. DR. FERNANDO DINI ANDREOTE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marcelo Rocha Marques", written over a horizontal line.

PROF. DR. MARCELO ROCHA MARQUES

Aos meus pais Cristina e Marcílio, dedico.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP).

Ao Diretor Prof. Dr. Francisco Haíter Neto.

Ao Coordenador da Pós-graduação Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biologia Buço-dental, Prof. Dr. Fausto Brezine.

Ao Prof. Dr. Sérgio R. P. Lina pela orientação.

Aos técnicos dos laboratórios de Microscopia e Histologia, Eliene Narvaís e Gustavo Narvaís, sempre prontos e dedicados.

Às Secretárias Suzete e Joélma, pela atenção.

A Sra. Wílma Ferraz, técnica do laboratório de Microbiologia, por estar sempre disposta a ajudar.

A todos que de forma direta ou indireta participaram da realização desse trabalho.

Agradecimentos Especiais

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado uma família tão maravilhosa, meu porto seguro.

Aos meus pais, por todo amor, carinho, compreensão e respeito, por jamais me deixarem desistir.

À minha irmã Livia, meu anjo da guarda, melhor amiga... Obrigada por fazer parte da minha história!

Aos meus avós e padrinhos Marley e Décio, pela frequente participação, torcida, confiança, carinho e apoio durante toda minha vida.

Aos meus avós Cecília e David de Almeida (in memoriam) pelo carinho e incentivo.

Aos meus tios Nasaré (minha mãezinha) e Luiz Francisco (Tito) pela presença fundamental em minha vida.

Ao meu primo Miguel, pelas noites me ajudando a estudar e boa companhia durante os anos que dividimos o mesmo teto.

Ao meu querido tio Paulo (in memoriam), pessoa maravilhosa, especial e fundamental em minha vida, que tantas vezes me abrigou em seus braços. Sinto sua falta.

Ao Denis, amigo, confidente, parceiro, por me fazer erguer a cabeça e enfrentar tudo e todos, por me fazer feliz, completa e sempre provocar meus risos. Estendo à sua família maravilhosa que me acolheu como filha. Obrigada pelos bons momentos juntos.

À minha segunda família, tia Cida, tio Vado e Marcela, pela amizade incondicional.

À minha “amiga de infância” Débora Lima, pelos momentos de descontração e palavras sinceras. A sua mãe Solange e seu irmão Douglas por terem me recebido de braços abertos.

À amiga Cecília Pereira, pela amizade, bom humor e presença constantes, mesmo estando tão longe.

À amiga Patrícia Martins por seu jeito meigo e doce, sempre descontraíndo a todas nós.

À Bruna Lima, amiga desde o primeiro dia de Universidade, sempre alegre e extremamente esforçada, uma pessoa exemplar.

À amiga Mariana Ribeiro, por sua amizade, carinho e atenção.

À amiga Denise, por toda força, ajuda e paz que me passou durante esses anos, e toda doçura e sinceridade de seu olhar e de suas palavras.

À Simone Caixeta, pela ajuda indispensável, paciência, e por ter sido tão prestativa. Obrigada por tudo.

Aos amigos do laboratório Luciana, Naila, Aline, Marise, Juliana e Marcelo, pelas experiências vividas e por tornarem o ambiente de trabalho mais leve e tranquilo.

À professora Darcy pela atenção e correções gramaticais desse trabalho.

À Maria Aparecida Varellá - Cidinha - técnica do laboratório de Histologia, que além da ajuda profissional, tornou-se uma pessoa de grande estima para mim.

À Ivani Demétrio, sempre com suas palavras positivas e reconfortantes, trazendo luz e bons flúidos para o ambiente.

Ao Jonathan Pinheiro, sempre corrigindo os problemas do meu computador (normalmente causados por mim), tornando-se com o tempo uma pessoa especial e um grande amigo.

À Moníca Barnabé e ao Sr. Pedro Justino, secretária e técnico do laboratório de Dentística, pelo apoio e convicção de que tudo sempre acaba dando certo.

À Vivian Nalim, pela atenção, torcida, pelos momentos “relax” que me proporcionou e, claro, pelos chocolates, que mantiveram minha calma diária...

Um agradecimento especial à Cristiane Saíto, Liza Ramenzoni, Maria Cristina Santos e Gilcy Damn colaboradoras do laboratório, pela contribuição fundamental para meu crescimento espiritual. Que elas encontrem em seus caminhos pessoas especiais como elas.

“ ...

*Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas.”*

Pablo Neruda

Resumo

O gene PAX9 pertence a uma família de fatores de transcrição denominada família *Pax*. Esse gene é expresso em tecidos embrionários como somitos, bolsa endodérmica da faringe, brotos distais dos membros e mesênquima derivado da crista neural. Alguns polimorfismos na região promotora desse gene em humanos vêm sendo associados a formas de agenesias não-sindrômicas autossômicas dominantes. No presente trabalho, nós verificamos a expressão gênica e a influência de duas seqüências da região promotora na transcrição do gene PAX9 em ensaios *in vitro* com células de tecido embrionário de ratos de 13.5 dias obtidas a partir de seus membros, face e regiões do mesencéfalo e romboencéfalo. Os fragmentos da região promotora foram clonados em plasmídios repórteres e transfectados nos três diferentes tecidos embrionários. Nossos resultados das análises de RT-PCR demonstraram que em culturas *in vitro*, as células dos membros e do SNC expressam o gene PAX9, porém, aquelas obtidas a partir da face não o expressaram. Além disso, os resultados dos ensaios de luciferase mostraram que a atividade dessa nos vetores construídos são mais fracas do que do vetor *pGL3-Basic* sozinho, sugerindo que essas regiões não são suficientes para guiar a transcrição gênica.

Palavras chaves: PAX9; Análise transcricional; Região promotora; *pGL3*.

Abstract

PAX9 belongs to a transcriptional factor genes family named *Pax*. This gene is expressed in embryonic tissues like somites, pharyngeal pouch endoderm, distal limb buds and neural crest-derived mesenchyme. Some polymorphisms in the upstream promoter region of the human PAX9 have been associated with human non-syndromic forms of autosomal dominant agenesis. In the present study we verified the *in vitro* expression of this gene and the influence of two promoter sequences in the transcription of PAX9 gene, in embryo tissues obtained from digits, face and midbrain and hindbrain regions. These fragments were cloned on reporter plasmid and were transfected into the different cells cultures. Our RT-PCR results showed that *in vitro* E13.5 limb bud and CNS cells express PAX9, but not in derived facial region cells. Moreover, the luciferase activity of the Pax9 promoter vectors were weaker than *pGL3*-Basic alone, suggesting that the PAX9 sequences of promoter region are not sufficient to drive PAX9 gene transcription.

Key words: PAX9; Transcriptional analysis; Promoter region; *pGL3*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. Transcriptional Analysis Of The Human PAX9 Promoter Region	3
3. CONCLUSÃO	13
4. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	14

Introdução

O gene PAX9 pertence a uma família composta por nove genes que codificam fatores de transcrição, denominadas proteínas *Pax*, que são caracterizadas pela presença de um “domínio pareado” e uma região altamente conservada de ligação ao DNA com aproximadamente 128 aminoácidos ^{1, 2}. Essas proteínas têm importante papel durante o desenvolvimento embrionário e organogênese, pois são expressas em vários tecidos embrionários como somitos, bolsa endodérmica da faringe, germes distais dos membros e no mesênquima derivado da crista neural, que se desenvolve em estruturas crânio-faciais como, por exemplo, os dentes nas fases de botão e capuz ^{8, 11}. Tais proteínas são também essenciais durante os estágios mais tardios do desenvolvimento dos dentes ^{2, 5, 9, 12}. Sabe-se que a produção dessas moléculas estão sob controle da sinalização do *Fgf/Bmp4* ⁴.

Os produtos protéicos do PAX9 são essenciais para o estabelecimento do potencial mesenquimático da odontogênese, onde a expressão parece ser marcada pelos sítios de dentes em formação ocorrendo antes de qualquer manifestação desse processo ⁹. De acordo com Peters *et al.* ¹¹, em embriões de ratos, o Pax9 é um marcador de fases iniciais do desenvolvimento dentário, uma vez que está presente no mesênquima no dia E10 antes mesmo do espessamento ectodérmico e é o primeiro fator a ser expresso entre os demais genes de sinalização. Além disso, seus altos níveis de expressão são mantidos durante os estágios iniciais de botão e capuz (E11.5) sendo somente diminuída sua expressão na fase de sino (E16).

Um grande número de mutações nos genes PAX9 e MSX1 em famílias que apresentam formas autossômicas dominantes não-sindrômicas de agenesia de dentes posteriores vêm sendo identificadas, sendo que as agenesias de segundos pré-molares e terceiros molares estão associadas a mutações de perda de sentido (*missense*) do homeobox MSX1 ¹⁶, enquanto que agenesias de molares estão envolvidas com mutações do tipo “*frameshift*” ¹⁴.

A descoberta inicial de agenesia dentária causada por mutações no gene PAX9 foi descrita por Stockton *et al.* ¹⁴, e desde então, muitas outras mutações autossômicas dominantes vêm sendo identificadas por todo o gene, estando a maioria destas localizadas tanto no domínio pareado, quanto no domínio de ligação do DNA ao fator de transcrição PAX9. Polimorfismos na região promotora do gene Pax9 vêm sendo associados a diversas formas de oligodontia em humanos ¹⁰. Atualmente, sabe-se que deleções heterozigóticas em todo este gene estão associadas a formas severas de agenesias não-sindrômicas que envolvem os primeiros molares e alguns dentes permanentes posteriores (pré-molares e molares) ^{3, 5, 6, 14}. No entanto, o mecanismo preciso responsável pela agenesia dentária continua desconhecido ¹⁷.

O objetivo desse trabalho foi verificar a influência de seqüências do promotor do gene PAX9 humano em sua transcrição. Para tanto dois fragmentos da região promotora foram clonados em um plasmídio repórter contendo o gene da luciferase, e então tranfectados em três diferentes tecidos embrionários de ratos: membros, face e sistema nervoso central. Nossos resultados indicaram que essas seqüências do promotor do PAX9 apresentam fraca atividade transcricional e que para que haja uma transcrição completa desse gene, provavelmente é necessário a atividade de outra região ativadora da transcrição (*enhancer*).

Title: Transcriptional analysis of the human PAX9 promoter region.

Authors: Almeida CV, Caixeta S, Saito CPB, Ramenzoni LL, Line SRP*

Department of Morphology, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

*Corresponding author: +551921065333; (fax) +5519 34210144

E-mail address: serglin@fop.unicamp.br

Introduction

The gene *PAX9* belongs to a family composed of nine genes that encode transcription factor proteins, the *Pax* proteins, characterized by the presence of the paired domain, and a highly conserved DNA binding region of about 128 amino acids^{1, 2}. These factors play important roles in embryonic patterning and organogenesis being expressed in various embryonic tissues like somites, pharyngeal pouch endoderm, distal limb buds and neural crest-derived mesenchyme that develops into craniofacial structures, like teeth, expressed in the mesenchyme of developing tooth germs, especially at the bud and cap^{8, 11}, and are essential during later stages of tooth development^{2, 5, 9, 12}. It is known that they are under the control of Fgf/Bmp signaling⁴.

Pax9 protein products are essential for the establishment of the odontogenic potential of the mesenchyme, where the expression seems to be a marker for the sites of tooth formation due to its occurrence before any morphological manifestation of this process⁹. Analysis of mouse embryos showed that the *PAX9* is an early marker of tooth development, appearing at E10 stage in the mesenchyme, before the ectodermal thickening and prior to the expression of other tooth signaling genes. High levels of *Pax9* expression are subsequently maintained throughout the initiation (E11.5), bud, and cap stages and are down regulated at the bell stage (E16)¹¹.

The initial description of the tooth agenesis caused by the mutation in *Pax9* was made by Stockton et al. ¹⁴, since then, many others autosomal dominant mutations have been identified throughout the entire gene, been the majority of mutations is located in the paired domain, the DNA-binding domain of *PAX9*. Polymorphisms in the upstream promoter region of the human *PAX9* have been associated with variable forms of oligodontia ¹⁰. To the date it is know that heterozygous deletion of whole *PAX9* gene is associated with a severe form of non-syndromic tooth agenesis that involves all the primary molars and some posterior permanent teeth (premolars and molars) ^{3, 5, 6, 14}. However, the precise mechanisms for the development of tooth agenesis remain unclear ¹⁷.

The aim of the present study is to verify the influence of promoter sequences in the transcription of *PAX9* gene. Two fragments of the promoter region were cloned on reporter plasmid containing luciferase gene and transfected into three different rat embryo tissues: digits, face and midbrain and hindbrain regions.

Material and Methods

Construction of Expression Plasmids - The human *PAX9* promoter region between positions – 1209 and +92 was amplified from human DNA by PCR and subcloned into *SacI-HindIII* restriction sites of TOPO TA vector (Invitrogen) to generate high copies for cloning into *pGL3Basic* vector. The second plasmid was constructed by the *pGL3-Basic-PAX9* (1098bp) promoter was digested with *Apal* restriction enzyme (deleting bases 413 to 921), resulting on an insert with 590bp (*pGL3-Basic-PAX9-Apal*). In both, the +92 base was oriented to luciferase gene (fig. 1).

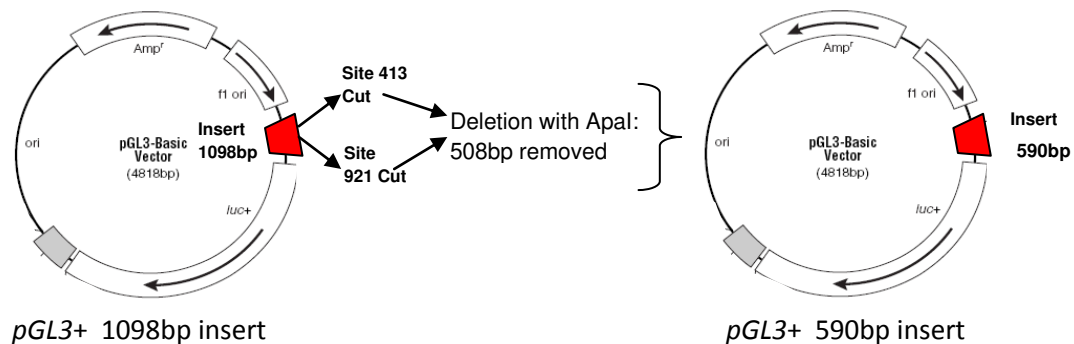


Figure 1: Construct Pgl3Pax9Apal was digested with Apal and re-ligated resulting in a plasmid containing the 590bp (by Ramenzoni, L.L.).

Maternal and Fetal Surgical Manipulation - The day of sperm finding is E0, and at day 13.5 pregnant females was anesthetized with Ketamine (100mg/ml) and after the surgery, it was killed by cervical dislocation and had the uterus was aseptically removed out into a 25ml screw-capped tube containing 20ml Phosphate-Buffered Saline (PBS) and 1% antibiotic solution (Anti/Anti Invitrogen). Embryos were dissected out the uteri in a flow hood area and transferred to a fresh dish of sterile PBS. The embryos digits, face and midbrain and hindbrain regions (these cells will be referred as CNS) were placed 35mm cell culture dishes. Experiments were performed in duplicate. The cells were grown in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* DMEM – High glucose (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic solution (Anti/Anti - Invitrogen) and incubated at 37 ° C in the presence of 5% CO₂ . Ethical approval was granted by the Ethics Committee of the Piracicaba Dental School.

mRNA analysis - After 48 hours of culture, cells were homogenized and total RNA were isolated with TRIzol™, following manufacturer's instructions (Invitrogen). The cDNA was synthesized from 1µg of total RNA using Superscript III Reverse Transcriptase following manufacturer's instructions (Invitrogen). DNase I digestion of RNA was performed prior to the reverse

transcriptase reaction. In two independent experiments, PCR amplifications were performed using gene-specific primers for Pax9 and β -actin genes. Pax9 primer sequences were: Pax9Rat sense (5' GAGTTCCATCAGCCGGATTC 3') and Pax9Rat antisense (5' CAAGGCTCCCTTCTCCAATC 3'), and β -actin primer sequence β -actinRat sense (5' TGACATCCGTAAAGACCTCT 3') and β -actin antisense (5' AGATGTGATCAGCAAGCAG 3'). Polymerase chain reactions were performed on a TC-512 PCR machine (Techne Incorporated Burlington, NJ, USA) using 5 μ L of *cDNA*, 5 pmoles of each oligonucleotides primers, GoTaq[®] Green Master (Promega) in a 25 μ L volume. The PCR program initially started with a 94°C denaturation for 4 min, followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension of 72°C for 10 minutes for all set of RT-PCR primers. β -Actin gene amplifications were performed in separated tubes. PCR program initially started with a 94°C denaturation for 4 min, followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension of 72°C for 10 minutes. Amplifications were verified in 2% agarose gels stained with ethidium bromide [10 μ g/ml] and photographed on top of a 280 nm UV light box. The gel images were digitally captured with a CCD camera and analyzed with the NIH Image J program.

Transient transfection - Transient transfections were performed with 2.5×10^5 cells, through lipofection by using Lipofectamine 2000[™] reagent (Invitrogen) in the presence of Reduced Serum Medium according to the manufacturer's instructions. Then 0.8 μ g of pGL3 (Promega[™]) was used for a co-transfection with 0.08 μ g of the pRc-CMV vector (kindly provided by Dr. Kleber Franchini - Unicamp) for luciferase analysis normalization. Transfected cells were incubated at 37°C in the presence of 5% CO₂.

Luciferase analysis - Forty eight hours after the transfection, cell extracts were collected and firefly and Renilla luciferase activities were measured (dual glo luciferase assay system; Promega[™]). Briefly, 75 μ L of remain DMEM serum free medium were mixtured with 75 μ L of Dual-Glo[™] Luciferase Reagent and incubated for 1 min. The lysate were measure for firefly luciferase activity in 96-well microplate reading luminometer (Veritas[™] - Turner Biosystems). Each sample was normalized to *Renilla* luciferase absorbance to

correct for variations in transfection efficiency using 75 μ L of Stop & Glo® Reagent added to the same well and incubated for 10 min after reading. Experiments were performed in duplicate.

Results

mRNA analysis - In our experiments, a semi-quantitative assay RT-PCR was performed to measure the *in vitro* expression of the gene *Pax9*, using E13.5 rat embryonic cell in culture. The results indicated that the *Pax9* gene is not expressed in face at this day, while in digits and CNS this gene is expressed (figure 2). The presence of amplicons for the amplification of *β -actin* gene validates our approach, indicating that the gene is repressed in face tissues of the evaluated embryos.

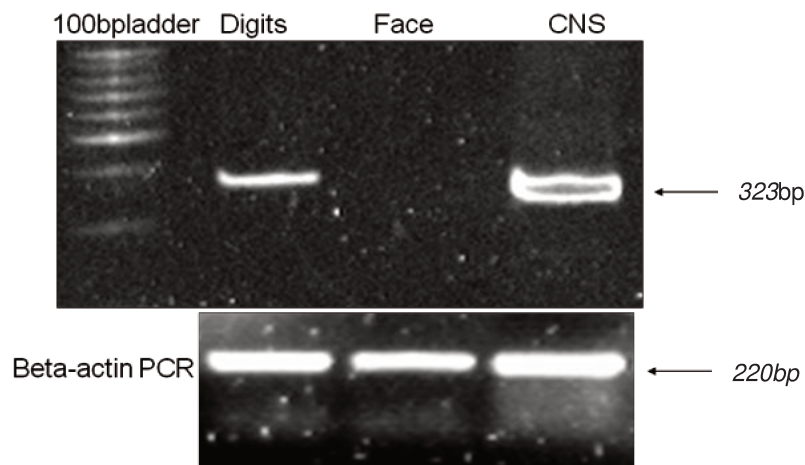


Figure 2: *Pax9* expression in rat embryos cells were detected by semi-quantitative PCR in agarose 2% with ethidium bromide.

Luciferase analysis – The experiments revealed that both transfected constructions pGL3/*Pax9* plasmids were not able to highly express the Luc protein. However, values of expression were found in decreasing the protein synthesis in digits and CNS transfected cells, and inhibited it in face transfected cells (figure 3).

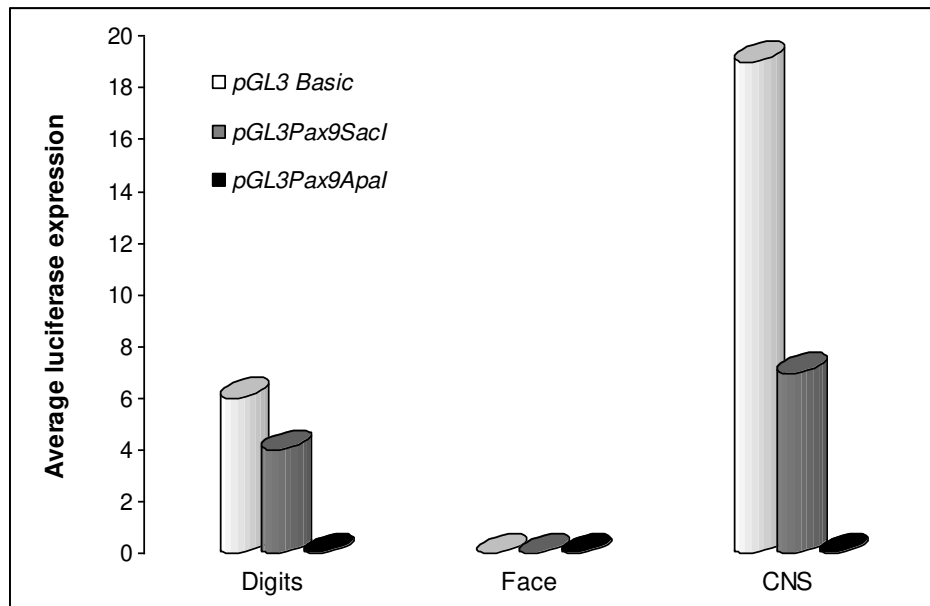


Figure 3: Luciferase expression and inhibition evidences in rat embryo 13.5 days of digits, face and CNS cells cultures. It can be observe that in the digits and CNS cells, the *Luc* was down expressed in *pGL3Pax9SacI* transfected cells, and its complete inhibition in *pGL3Pax9ApaI* transfected cells. In face cells, there was the complete inhibition of the *Luc* expression of all plasmids transfected cells.

Discussion

In this study, Pax9 transcriptional regulatory pattern was examined by analysis of its promoter sequence in rat embryos. In our experiments RT-PCR was performed to detect gene expression of Pax9 in vitro by using rat embryonic cell. We also analyzed the capacity of Pax9 promoter region to drive the transcriptional activity by transfected *pGL3* basic plasmids vectors containing inserts of Pax9 promoter region in rat embryos primary cell culture of digits, face and CNS.

Experiments showed that Pax9 gene was expressed in day E13.5 in limb bud and CNS cells, but surprisingly was not expressed in cells derived from facial region. Kriangkrai et al ⁷ showed that Pax9 was expressed on facial region of rats at stages E13 and E14. One possible explanation for this discrepancy is that the transcription of PAX9 was inhibited when facial cells were cultured, may be the cells face was in an apoptotic in early satges of cell

culture, getting the absence of growth factors that are necessary for the PAX9 expression. In fact, one thing that is evidenced in studies that analyze the expression of PAX9 in mouse and rat embryonic tissues is that the expression of this gene changes rapidly during ontogeny ^{7, 9}. Therefore, it is conceivable PAX9 transcription may be influenced subtle changes in cell environment. In the present study two polymorphisms in the *PAX9* promoter located within the region, that shown to be associated with third molar agenesis in humans, were analyzed ¹⁵. Moreover, two conserved noncoding regions with enhancer activities for expression of *Pax9* were already identified, where one of these sequences contained a consensus Gli-binding motif ¹³. In addition, those authors also identified highly conserved sequences in the 5' regions of *Pax9* gene that were located about 2kb distant from the transcription initiation site and in the third íntron of this gene.

Conclusions

The results of the present study showed that the luciferase activity of *pGL3-Pax9* constructs was weaker than *pGL3-Basic* vector alone, suggesting that *PAX9* 5' flanking sequences alone are not sufficient to drive *Pax9* gene transcription and that this region might contain inhibitory cis-acting sequences. These results also indicate that enhancer sequences located in 5' sequences distant from the transcription origin or in intronic regions are necessary for *Pax9* transcription.

Acknowledgments

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP - for the financial support. Process: 2006/05187-8.

References

1. Balling R, Helwing U, Nadeau J, Neubüser A, Schmahl W, Imi K. Pax genes and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 785:27-33.
2. Cobourne M.T. Familial human hypodontia--is it all in the genes? *Br Dent J.* 2007; 203:4-8.
3. Das P, Stockton DW, Bauer C, Shaffer LG, D'Souza RN, Wright T, Patel PI. Haploinsufficiency of Pax9 associated with autosomal dominant hypodontia. *Hum Genet.* (2002); 110:371-376.
4. Fleischmannová J, Matalová E, Tucker AS, Sharp PT. Mouse models of tooth abnormalities. *Eur J Sci.* 2008; 116:1-10.
5. Kapadia H, Mues G, D'Souza RN. Genes affecting tooth morphogenesis. *Orthod Craniofac Res.* 2007; 10:237-244.
6. Klein M.L., Nieminen P., Lammi L., Niebuhr E., Kreiborg S. Novel Mutation of the initiation codon of Pax9 causes oligodontia. *J Dent Res.* 2005; 84(1):43-47.
7. Kriangkrai R, Iseki S, Eto K, Chareonvit S. Dual odontogenic origins develop at the early stage of rat maxillary incisor development. *Anat Embryol (Berl).* 2006
8. Mackenzie A, Leeming GL, Jowett AK, Ferguson MW, Sharpe PT. The homeobox gene HOX 7.1 has specific regional and temporal expression patterns during early murine craniofacial embryogenesis, especially tooth development in vivo and in vitro. *Development.* 1991; 111:269-285.

9. Neubuser A, Koseki H, Balling R. Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. *Dev Biol.* 1995; 170:701-716.
10. Peres RC, Scarel-Caminaga RM, do Espírito Santo AR, Line SR. Association between PAX-9 promoter polymorphisms and hypodontia in humans. *Arch Oral Biol.* 2005; 50(10):861-71.
11. Peters H, Balling R. Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet.* 1999; 15:59-65.
12. Sanatagati F, Gelber J-k, Blusch JH, Kokubu C, Peters H, Adamski J, Werner T, Balling R, Imai K. Comparative analysis of the genomic organization of Pax9 and its conserved physical association with Nkx2-9 in the human, mouse, and pufferfish genomes. *Mamm Genome.* 2001; 12:232-237.
13. Sanatagati F, Abe K, Schmitt-John T, Suzuki M, Yamamura K, Imai K. Identification of Cis-regulatory Elements in the Mouse Pax9/Nkx2-9 Genomic Region: Implication for Evolutionary Conserved Synteny. *Genetics.* 2003; 165: 235–242.
14. Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI. Mutation of Pax9 is associated with oligodontia. *Nat Genet.* 2000; 24:18-19.
15. Stokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit clef palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994; 6:348-356.
16. Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. A human Msx1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet.* 1996; 13:417-421.

17. Wang Y, Wu H, Wu J, Zhao H, Zhang X, Mues G, D'Souza RN, Feng H, Kapadia H. Identification and functional analysis of two novel PAX9 mutations. *Cells Tissues Organs*. 2009; 189(1-4):80-7.

Conclusão

Os resultados de nossos estudos mostraram que a atividade da luciferase das construções de *pGL3-PAX9* são mais fracas do que o vetor *pGL3* sozinho, sugerindo que as seqüências da região 5' flanqueadora do gene PAX9 não são suficientes para regular sua transcrição, ou que esta região apresente seqüências *cis-ativadas*. Esses resultados sugerem também que seqüências *enhancers* localizadas na região 5' do gene distantes da origem de início da transcrição ou em suas regiões intrônicas seja necessárias para transcrição do PAX9.

Bibliografia Consultada

1. Breitling R, Gerber J-k. Origen of paired domain. *Dev Genes Evol.* 2000; 210:644-650.
2. Gerits A, Nieminen P, De Muyneck S, Carels C. Exclusion of coding region mutations in MSX1, PAX9 and AXIN2 in eight patients with severe oligodontia phenotype. *Orthod Craniofac Res.* 2006; 9(3):129-36.
3. Hansen L, Kreiborg S, Jarlov H, Niebuhr E, Eiberg H. A novel nonsense mutation in PAX9 is associated with marked variability in number of missing teeth. *Eur J Oral Sci* 2007; 115: 330–333.
4. Jumlongras D, Lin J-y, Chapra A, Seidman CE, Seidman JG, Mass RL, Olsen BR. A novel missense mutation in the paired domain of Pax9 causes non-syndromic oligodontia. *Hum Genet.* 2004; 114:242-249.
5. Kapadia H, Frazier-Bowers S, Ogawa T, D_Souza RN. Molecular characterization of a novel PAX9 missense mutation causing posterior tooth agenesis. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14: 403–409.
6. Matalova E, Fleischmannova J, Sharpe PT, Tucker AS. Totth Agenesis: from molecular genetics to molecular dentistry. *J Dent Res.* 2008; 87(7):617-623.
7. Mostowska A, Kobiela A, Biedziak B, Trzeciak W. H. Novel mutation in the pairedbox sequence of PAX9 gene in a sporadic form of oligodontia. *Eur J Oral Sci* 2003; 111:272–276.

8. Nieminen P, Arte S, Tanner D, Paulin L, Alaluusua S, Thesleff I, Pirinen S. Identification of a nonsense mutation in the Pax9 gene in molar oligodontia. *Euro J Hum Genet.* 2001; 9:743-746.
9. Ogawa T, Kapadia H, Raghoebar JQFR, Peters H, D'Souza RN. Functional Consequences of Interactions between Pax9 and Msx1 Genes in Normal and Abnormal Tooth Development. *Jour of Biol Chem.* 2006; 281 (27): 18363–18369.
10. Ogawa T, Kapadia H, Wang B, D'Souza RN. Studies on Pax9-Msx1 proteins interaction. *Arch Oral Biol.* 2005; 50:141-145.
11. Pemberton TJ, Gee J, Patel PI. Gene discovery for dental anomalies: a primer for the dental professional. *J Am Den Assoc.* 2006; 137(6):743-52.
12. Peters H, Neubüser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes & Dev.* 1998; 12: 2735-2747.
13. Stock DW. The genetic basis of modularity in the development and evolution of the vertebrate dentition. *The Royal Society.* 2001; 356, 1633-1653.
14. Thesleff I. Developmental biology and building a tooth. *Quintessence Int.* 2003; 34(8):613-20.
15. Thesleff I. The genetic basis of normal and abnormal craniofacial development. *Acta Odontol Scand.* 1998; 56(6):321-5.

16. Tucker AS, Khamis AI, Sharpe PT. Interactions between Bmp4 and Msx1 act to restrict gene expression to odontogenic mesenchyme. *Dev Dyn.* 1998; 212:533-539.
17. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of Bmp4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell.* 1993; 75:45-58.
18. Zhao J., Hu Q., Chen Y., Luo S. Bao L. Xu Y. A Novel Missense Mutation in the Paired Domain of Human PAX9 Causes Oligodontia. *Am Jour Medic Genet Part A.* 2007; 143A:2592–2597.