

## Genetische eigenschappen van Dumbo ratten

De dumbomutatie onder de ratten verscheen voor het eerst in de handel in huisdierratten en de data dat dit geschreven is, lijkt men er zich niet bewust van te zijn hoe interessant (wetenschappelijk gezien) deze mutatie is. De dumbomutatie is nog niet opgevallen, gemeten of bestudeerd door ontwikkelingsbiologen of genetici. Er zijn nog geen officiële documenten gepubliceerd over deze mutatie bij ratten.

Daarom is de volgende lijst van eigenschappen in z'n geheel overgenomen. Het is gebaseerd op de beschrijvingen van de eigenaren van dumboratten, en uit beschrijvingen van dumbonormen en storingen van rattenkeuringen. Deze lijst is vrij informeel en onnauwkeurig. Niet alle dumboratten zijn behept met al deze eigenschappen:

Oor vorm:

De dumbomutatie produceert een breed scala aan oorvormen en maten. Meest wenselijk onder fokkers zijn dombootjes met grote, ronde, lage ingeplante oren. Maar de dumbomutatie kan ook gekreukte, gebogen, gevouwen, gekreukelde gekrulde, misvormde, smalle, spitse, langwerpige en buisvormige oorschelpen geven. Oren kunnen hoger of lager op de schedel worden geplaatst. De oren kunnen eveneens ook asymmetrisch op de kop staan.

Schedel vorm:

De bovenkant van de schedel kan plat en breed zijn. Sommige dumboschedels kunnen ook hol gevormd zijn. Het achterhoofd van de schedel kan te prominent aanwezig zijn.

### Informatie over dumbo en gewoonoor afmetingen

A. Dann heeft de lengte, breed en hoogte gemeten bij ratten die als perfect gekeurd waren op shows. Hij heeft deze gegevens omgezet naar de afmetingen (lengte / hoogte, breedte / hoogte en lengte / hoogte) om de meest voorkomende maten bij deze ratten te controleren en te noteren.

Resultaten gewoonoor

	lengte/hoogte	breed/hoogte	breed/hoogte
Over het algemeen	1.75	1.07	1.88
Standaard afwijking	0.11	0.06	0.12

### Dumbo rats

	lengte/hoogte	breed/hoogte	breed/hoogte
Over het algemeen	1.17	1.65	1.89
Standaard afwijking	0.22	0.27	0.19

Deze tabellen, de lengte / hoogte en maatvoering, lijken heel consistent tussen de gewoonoren en de dumboratten, maar de kopjes van de dumboratten zijn relatief breder dan de standaardkopjes zijn.

Monstermetingen van één standaard en een dumboratt:

	Lengte	breete	hoogte
Standaard	56 mm	32 mm	30 mm
Dumbo	55 mm	50 mm	30 mm

Merk op dat deze metingen informeel zijn en het aantal individuen te klein om conclusies over de totale rattenpopulatie te trekken in het algemeen! Echter, het is interessant de verschillen op te merken bij beide type ratten als het gaat over de vormverschillen van beiden. Nader onderzoek zou wel eens heel interessant kunnen zijn.

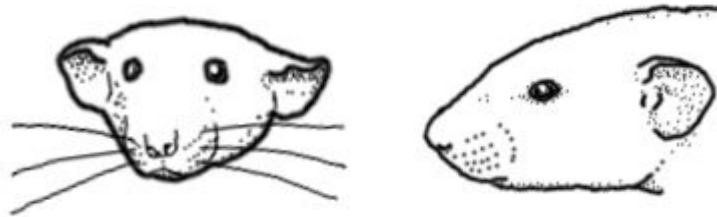
**Kaakvorm:** sommige dumbo's hebben een te smalle onderkaak.

**Oogvorm :** sommige dumbo's tonen verschillende oogvormen en posities  
(*pers. comm.* Dann 2005).

**Lichaams bouw:** Het lijf kan breder en korter zijn.

**Orbeweging:** Eigenaren van dumboratten hebben gemerkt dat de oren van de dames niet bewegen wanneer ze flapperig zijn.

**Temperament:** Dumbootjes zijn befaamd om een volgzzaam en rustig temperament.



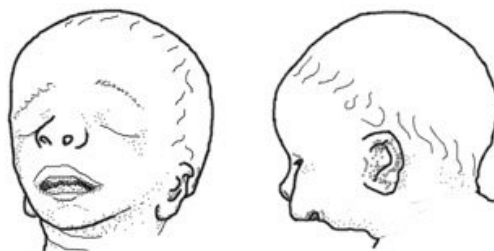
Getekend, 2 ratten met dumbo mutatie.

### Verschillende menselijke aandoeningen van dumbo mutatie

Er zijn verschillende menselijke aandoeningen die erg lijken op de dumbomutatie bij ratten.

**Treacher Collins syndrome:** Gekenmerkt door kleine en anderszins misvormde oren, een kleine kaak, schuine lijn ogen, kleine jukbeenderen, een klein gezicht en een brede mond. De kleine kaak kan de normale grootte van de tong terug in de keel te dwingen, het belemmerd de luchtwegen. Treacher Collins kan ook gehoorverlies bij optreden. Het heeft geen invloed op de intelligentie van een kind. De afwijking wordt veroorzaakt door erfelijke of spontane mutaties in het TCOF1 gen gelegen op menselijk chromosoom 5q31-Q34 (Dixon *et al* 1991, Dixon 1996, Edwards *et al.* 1997, Horiuchi 2004) ([OMIM entry](#))

**Nager syndroom:** Vergelijkbaar met Treacher Collins. Gekenmerkt door vlakke wangen, schuine lijn van de ogen, de afwezigheid van de wimpers, de laaggezette komvormige oren en een zeer kleine onderkaak. Kan ook misvormingen van de duimen onderarmen, urogenitale (urine gelinkt) en cardiale(long gelinkte) afwijkingen ([OMIM entry](#)).



Tekening van een jong kind met Nager syndroom.

**DiGeorge syndrome:** Gekenmerkt door de laag gezette oren, abnormale vouwing van het uitwendige oor, kleine kaak, ogen omhoog of omlaag schuin gericht en een kleine bovenlip en kleine mond. Korte van gestalte en een milde tot matige verstandelijke beperking. Intern gekenmerkt door een kleine bijschildklier, een kleine of afwezige schildklier en hartafwijkingen. Veroorzaakt door deleties van chromosoom 22q11.2 (Demczuk en Aurias 1995 Gong et al. 1996), waarin een aantal kandidaat-genen, waaronder TUPLE1 en Tbx1 elimineert (Jerome en Papaioannou 2001) ( [OMIM entry](#)).

**Goldenhar syndrome:** Zeer variabel syndroom gekenmerkt door misvorming of afwezigheid van de oren, afwijkingen van de middelste en /of het binnenoer, kleine boven- en onderkaak, kleine juk beenderen, kleine lagere schedel, brede mond, onvolledige ontwikkeling van bepaalde spieren van het gezicht, kleine ogen, afwezigheid van weefsel van het bovenste ooglid en / of afwijkingen van de wervelkolom. De meeste mensen die deze aandoening hebben zijn asymmetrisch, aan één kant van het lichaam en de andere zijde is onaangetast of minder beïnvloed. In de meeste gevallen treedt deze afwijking spontaan op, maar sommige zijn autosomaal dominant ([OMIM entry](#)).

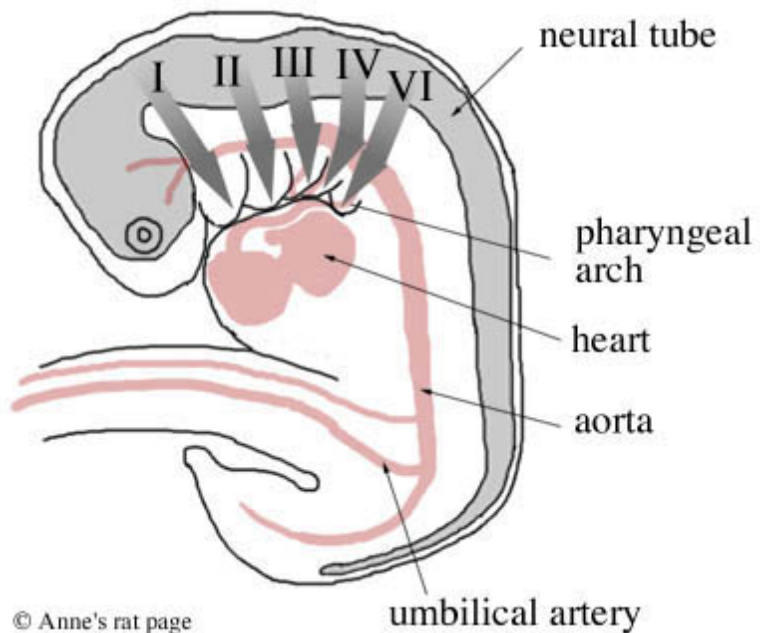
### Wat doen deze syndromen in het algemeen?

Bovenstaande alle genoemde syndromen behoren tot een subset van craniofaciale aandoeningen. Ook wel faryngeale boogaandoeningen genoemd. Allemaal worden ze veroorzaakt door problemen bij de ontwikkeling van de structuren zijn afgeleid van de faryngeale (of branchial) bogen.

### Wat zijn de pharynx bogen?

Pharynxbogen gepaarde structuren groeien aan weerszijden van het toekomstige hoofd en nek van de ontwikkelende embryo en zekering op de middellijn. Pharynxbogen ontwikkelen vanaf het cefale (hoofd) deel van de neurale lijst (Fukiishi en Morriss-Kay 1992). Dat is een strook van weefsel die loopt de achterkant van het embryo en leidt tot een groot aantal verschillende organen. Pharynxbogen produceren kraakbeen, bot, zenuwen, spieren, klieren, bindweefsel van het gezicht en de hals.

Zoogdier embryo's hebben vijf paren van deze pharynx bogen. De eerste twee paren geven aanleiding tot botten, spieren en zenuwen van het oor, kaak en bovenste hals. Met name de eerste paar pharynx bogen leiden tot de twee botten van het middenoor (aambeeld en malleus), de onderkaak en de zenuwen en spieren die betrokken zijn bij het kauwen, de spieren van het oor en het zachte gehemelte.



© Anne's rat page

*Diagram van de migratie van neurale lijstcellen (dikke grijze pijlen) uit de neurale ..... om de vijf pharynx bogen (I, II, III, IV en VI. Arch V onttaardt). (Adapted from Gilbert 1994, p. 284.)*

Het tweede paar bogen leidt tot een bot in het middenoor (de stijgbeugel), de vorming van de oorschelp, de spieren die de gezichtsuitdrukking aansturen, spieren van de kaak en de bovenste hals, delen van het bot boven de larynx en de zevende gezichts-zenuw.

De laatste drie paar bogen leiden tot de botten, spieren en klieren (thymus, schildklier) van de hals en de uitstroom van het hart. Alles wat de ontwikkeling van de eerste en tweede pharynx bogen verstoort zal veroorzaken dat delen van het gezicht abnormaal ontwikkelen. Een verstoring omvat verstoring van de productie, groei, of beweging van de boogcellen tijdens de ontwikkeling - bijvoorbeeld onvoldoende migratie van neurale cellen in de pharynx bogen. Een verstoring kan worden veroorzaakt door een mutatie in één van de vele genen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van deze bogen, of door externe factoren zoals teratogens tijdens de zwangerschap.

Wanneer de ontwikkeling van de eerste en tweede pharynxbogen wordt verstoord, ontwikkelen de bogen abnormaal, waardoor een verscheidenheid van craniofaciale afwijkingen aan de vorm van het gezicht aan het uitwendige oor, gehoorgang, middenoor, jukbeen, bovenkaak, onderkaak, oog, aangezichtspieren en zenuwen die de gezichtsuitdrukking aansturen (zie ook Jacobsson en Granstrom 1997).

#### *Voorbeelden van genen die betrokken zijn bij faryngeale boog ontwikkeling*

*TCOF1 is een van de vele genen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van de faryngeale boog. Het eiwit, stroop, het meest intens in de eerste faryngeale boog uitgedrukt in tijden van kritieke craniofaciale ontwikkeling, met inbegrip van de vorming en fusie van de pharynxbogen met de rest van het gezicht (Dixon et al. 1997). Treacle is betrokken bij ribosomaal RNA productie prefusion neurale plooien tijdens de vroege embryogenese (Valdez et al. 2004).*

*Nog zo'n gen is TBX1. Dit gen is nodig voor diverse functies. Het regelt de juiste neurale celmigratie in de achterste pharynxbogen, stabiliseert de structurele patronen van het midden- en binnenoor tijdens de ontwikkeling, regelt het begin van de ontwikkeling van de kaak en nekspieren, controleert het correcte patroon van cellen in de kaak, steunt goede proliferatie van cellen en het delen van cellen die voorbestemd zijn om deel te worden van de cardiale uitstroomkanaal en is nodig voor de vorming van de scheiding tussen de aorta en de longslagader (Moraes et al. 2005, Kelly et al. 2004, Xu et al. 2004).*

#### **Kan een faryngeale boog stoornis worden opgewekt?**

Ja.

Verschillende teratogens kan een lage setting van de oren en andere oormisvormingen bij ratten, muizen en hamsters veroorzaken. Retinoïden (zoals retinoïnezuur en vitamine A), cyclofosfamide en isotretinoïne (Roaccutane) toegediend tijdens de zwangerschap kunnen aanleiding geven tot een reeks van afwijkingen van het oor, de oog, boven- en onderkaak, en het gehemelte, die lijkt op Treacher Collins en andere eerste en tweede pharynx arch syndromen (Emmanouil-Nikoloussi et al. 2000, Granstrom 1990 Granstrom en Kirkeby 1990 Granstrom et al. 1991, Jarvis et al. 1990, Mallo en Gridley 1996, Padmanabhan en Singh 1984 Poswillo 1975, Wiley et al. 1983 ).

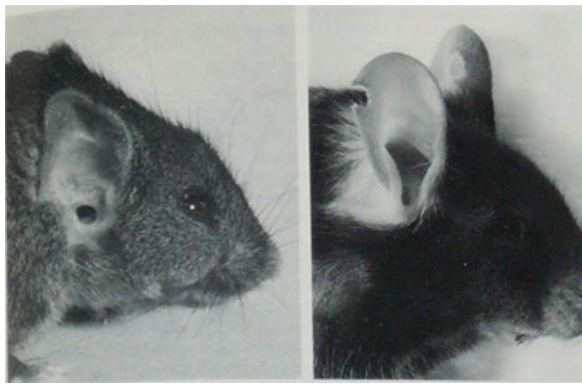
Diabetes mellitus tijdens de zwangerschap kan ook leiden tot aangeboren afwijkingen bij de foetus als gevolg van verminderde ontwikkeling van craniale neurale lijstcellen. Dergelijke afwijkingen zijn de laag-aangezette oren, kleine kaak, kleine thymus, schildklier en bijschildklieren en afwijkingen van het hart en de grote vaten. Deze afwijkingen zijn vergelijkbaar met Velocardiofaciaal syndroom bij mensen (Siman 1997 Siman et al. 2000).

#### **Hebben andere dieren ook last van faryngeale boog stoornis?**

Ja.

Muizen:

Low-set oren (LSE) is een faryngeale boogstoornis bij muizen die wordt gekenmerkt door misvormde en slecht gepositioneerde oorschelpen en oogafwijkingen. LSE muizen hebben ook last van verminderde groei na de geboorte en verminderde levensvatbaarheid (Theiler en Sweet 1986).



*Rechteroor van een acht maanden oude LSE + muis (links) en een controlemuis (rechts). De inkeping in het oor van de controle muis is een oor merk. Van Theiler en Sweet 1986.*

LSE gen bij muizen is gelegen op chromosoom 7 (Eric et al. 1999). Otani et al. (1991) rapporteren de spontane verschijning van kleine oren, waarvan sommige laag aangezet waren, in een lijn van transgene muizen. De aandoening was asymmetrisch. Aangedane muizen hadden ook aandoeningen aan het middenoor, schedelbasis, bovenkaak en keelholtestructuren. De aandoening is erfelijk als een autosomaal dominant, homozygote en dodelijk. de oorafwijking werd herleid tot onderontwikkeling van de tweede faryngeale boog tijdens de 9e en 10e dag van de dracht, door mesenchymale storingen en bloedingen in het gebied van de eerste en tweede branchial bogen. De aandoening werd herleid tot een mutatie op chromosoom 10, B1-3, op een plaats genaamd Hfm (Cousley et al. 2002, Naora et al. 1994).

Honden: Haworth et al. (2001) studeerde TCOF1, de homoloog van het Treacher Collins-gen bij de mens, in 13 verschillende hondenrassen. Ze ontdekten dat TCOF1 negen verschillende varianten bij honden kent. Eén van deze varianten (C396T) is geassocieerd met een brede schedel en korte zijde (brachycephalie) bij honden. De auteurs suggereren dat deze mutatie slechts één keer kunnen zijn ontstaan in de geschiedenis van de hond domesticatie.

---

Is de dumbo mutatie een aandoening van de eerste en tweede faryngeale boog ontwikkeling?

Niemand weet het zeker, omdat de dumbo mutatie nooit is onderzocht in het laboratorium.

Er zijn echter sterke overeenkomsten tussen de kenmerken van dumboratten en de klinische kenmerken van de eerste en tweede faryngeale boog syndromen bij de mens. Misvormde en slecht gepositioneerde oren van de dumbo rat, mogelijk kleine kaak, mogelijke verschillen in vorm en de positie van het oog en mogelijke onderontwikkeling van de spieren die verantwoordelijk zijn voor het functioneren van de zenuwen die als taak hebben de controle over de beweging hiervan, doen sterk denken aan een eerste en tweede faryngeale boogstoornis.

Dit is een hypothese. Het antwoord moet komen van toekomstig onderzoek door genetici en biologen naar ontwikkelingsstoornissen. Dumboratten kunnen mogelijk een potentiële diermodel blijken te zijn voor deze onderzoeken naar eerste en tweede faryngeale boog aandoeningen bij de mens.

maart 2005

---

## Update 2010

Update 2010: Het lijkt erop dat de dumbo mutatie is inderdaad een aandoening van de eerste faryngeale boog ontwikkeling!

Katerji et al. (2009) onderzochten de craniofaciale ontwikkeling van Dumbo ratten. Zij ontdekten dat de kwantitatieve gebreken in de structuren van Dumboratten zijn afgeleid van de eerste faryngeale boog: stoornissen in de ontwikkeling van kraakbeen en het begin van botvorming.

Ze onderzocht de expressie van de MSX1 en Dlx1 genen in de Dumbo rat tijdens de craniofaciale morfogenese. De Msx en Dlx homeoboxgenen worden uitgedrukt in verschillende tijden en op verschillende locaties van de eerste faryngeale boog ontwikkeling, waar ze het uitvoeren van een verscheidenheid moeten aandragen.

---

### Informatiebronnen :

- , from the Texas Pediatric Otolaryngology Center
- [Branchial anomalies](#), by Foundation for Faces of Children.
- 
- [Print version ISSN 1415-4757](#)
- [Genet. Mol. Biol. vol.32 no.2 São Paulo 2009 Epub May 01, 2009](#)
- <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572009005000041>
- DEVELOPMENTAL GENETICS SHORT COMMUNICATION
- Expression of *Msx1* and *Dlx1* during Dumbo rat head development: correlation with morphological features
- Suhair Katerji<sup>1</sup>, Nathalie Vanmuylder<sup>1</sup>; Michal Svoboda<sup>2</sup>; Marcel Rooze<sup>1</sup>; Stéphane Louryan<sup>1</sup>
- <sup>1</sup>Laboratory of Anatomy and Embryology, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium [Genetics and Molecular Biology](#)
- <sup>2</sup>Laboratory of Biological Chemistry, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium
- **ABSTRACT**
- De Dumbo rat beschikt over een aantal kenmerken die verschillende menselijke syndromen, zoals Treacher-Collins roepen: korthed van de bovenkaak, jukbeen en onderkaak botten, en de lage stand van de oren. Wetende dat veel homeoboxgenen zijn kandidaten in craniofaciale ontwikkeling, hebben we onderzoek gedaan naar de betrokkenheid van de MSX1 en Dlx1 genen in de Dumbo fenotype met als doel het begrijpen van hun mogelijke rol in abnormale craniofaciale morfogenese en het onderzoeken van de mogelijkheid van het gebruik Dumbo rat als een experimenteel model voor het begrijpen van abnormale craniofaciale ontwikkeling. We bestudeerden de expressie van deze genen gedurende craniofaciale morfogenese door RT-PCR methode. We gebruikten Dumbo embryo's E12 en E14 en omvatte de Wistar-stam als controle. Semi-kwantitatieve PCR-analyse toonde aan dat MSX1 en Dlx1 verschillend tussen Dumbo en Wistarratten worden uitgedrukt, wat aangeeft dat hun lage expressie van de Dumbo fenotype kan ten grondslag liggen. **Key words:** Dumbo rat, Msx1, Dlx1, face, embryo, development.
- De "aangeboren misvormde" Dumbo ratten lijken het product van binnenlandse fokken van ratten van Wistar oorsprong, waarschijnlijk in de Verenigde Staten, een paar decennia geleden zijn. Ze roepen vergelijkingen met sommige menselijke malformatiesyndromen, zoals Treacher-Collins, DiGeorge en Nager syndromen vanwege micrognathie, lage stand van de oren en hypoplasie van het jukbeen, bovenkaak en onderkaak botten (afbeelding 1). Deze soort kan een experimenteel model voor het begrijpen van abnormale craniofaciale ontwikkeling vormen.



**Figure 1** - CT scanning 3D reconstruction of Wistar (W) and Dumbo (D) adult rats. Upper panel: cutaneous reconstruction; lower panel: skeletal reconstruction. Note the low-situated ears, short zygomatic bone, thin tympanic ring, and short snout and mandible in the Dumbo strain.

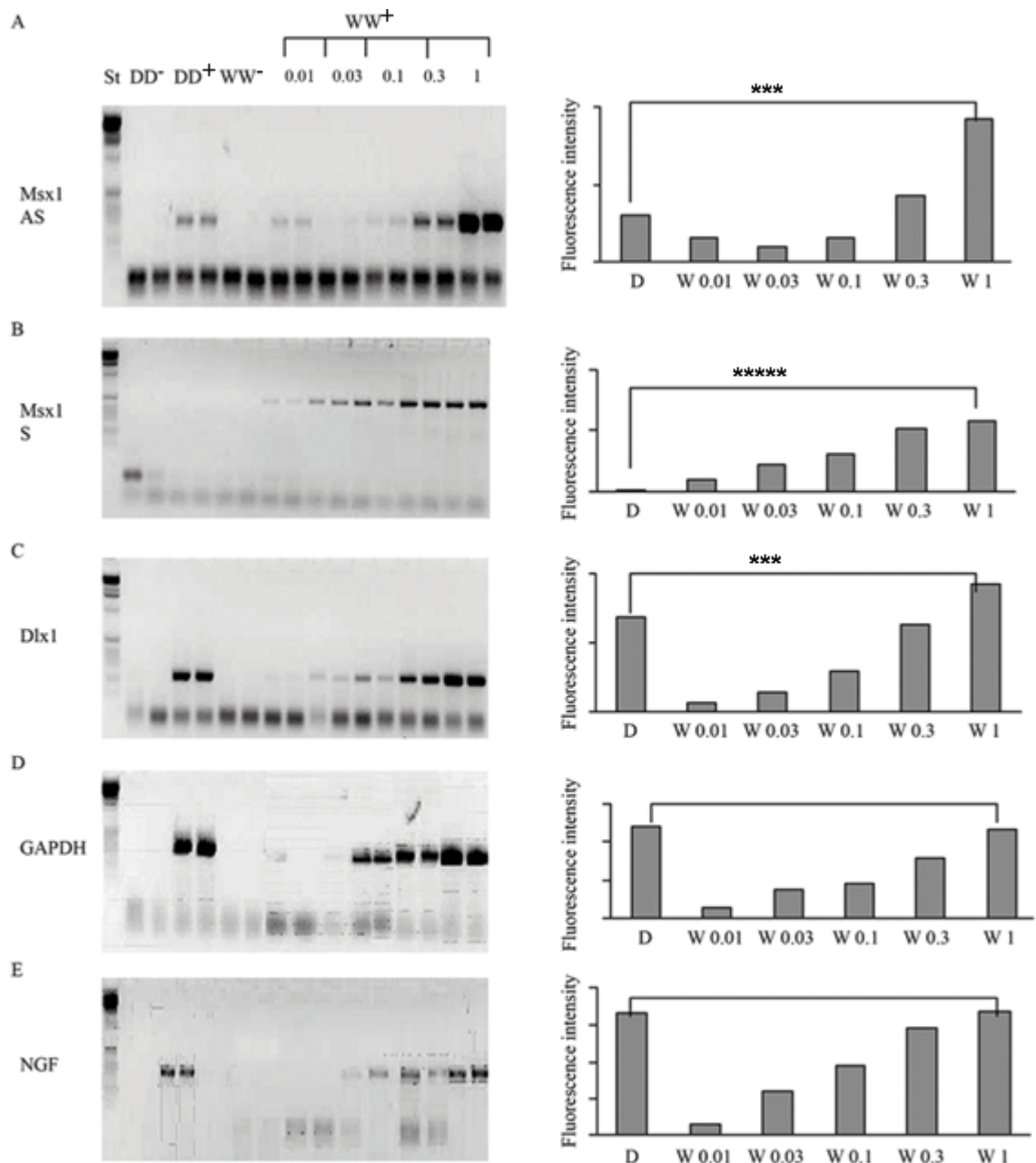
- Voorlopige morfologische en morphometric analyse gaf aan dat de aanzienlijke verschillen tussen de craniofaciale structuren van Dumbo en Wistar-ratten te wijten zou zijn aan genetische mutaties in de Dumbo rat die niet op te sporen waren door “chromosoommapping”. Bovendien vertoonden de embryonale schedels van Dumbo ratten een groeivertraging in de botstructuur. Daarom hebben we de embryonale leeftijd E12 en E14 (inleiding van de chondrogenese, begin-ossificatie) voor deze studie gekozen.
- Analyse van de embryonale ontwikkeling van Dumboratten toont kwantitatieve defecten in structuren afgeleid van de eerste faryngeale boog. Deze ontwikkelingsstoornissen gebreken worden vertegenwoordigd door stoornissen in chondrogenese en osteogenese paden, wat suggereert dat de betrokkenheid van de *MSX1* en *Dlx1* genen.
- Om de genetische expressie te vergelijken in Dumboratten met de normale Wistar-stam, gebruikten we RT-PCR om de expressie van *MSX1* en *Dlx1* schatten. Als loading controles gebruikten we het huishoudgen glyceraldehyde-3-fosfaat dehydrogenase (*GAPDH*), die wordt uitgedrukt op een constant niveau in verschillende weefsels, cellen of experimentele behandelingen (de Jonge et al., 2007) aangezien het gebruik van meerdere interne controle genen is aanbevolen (Vandesompele et al., 2002) en er gebruik is gemaakt van de zenuw-groefactor (*NGF*) coderend gen als tweede referentie-gen. *NGF* lijkt alomtegenwoordig uitgedrukt in sommige craniofaciale rudimentaire tijdens ontwikkeling van de muis (Louryanet al., 1995).
- Voor de analyses van Dumbo ratten, werden van drie verschillende moeders negen embryo in de stadia E12 en E14 verkregen. We hebben ook hetzelfde aantal embryo's voor Wistar ratten verzameld. Totaal RNA werd geëxtraheerd uit kleine hoeveelheden kop weefsel (20-100 mg) met de RNA NU TC methode (Texagen) volgens de aanwijzingen van de fabrikant. De RNA-pellet werd opgelost in 50 pl DEPC-behandeld water en RNA concentratie werd spectrofotometrisch bij 260 nm / 280 nm met een Nanodrop ND1000 inrichting (Isogen). cDNA werd gesynthetiseerd door de Gene Amp RNA PCR kit (Applied Bio systemen) met de enzym MultiScribeRT (50 U / ul): 1-2 ug totaal RNA werd getranscribeerd in 20 pl eindvolume buffer fabricage's verrijkt met 2,5 uM willekeurige hexameren 1 mM dNTP en 20 eenheden van RNase-remmer. Monsters werden eerst geïncubeerd bij 25 ° C gedurende 10 min, vervolgens bij 37 ° C gedurende 120 min. De reactie werd gestopt door het adition van 20 pi 0,1 M EDTA en 30 pi water. De monsters werden tot 94 ° C gedurende 2 minuten voor bewaren bij -20 ° C verhit. PCR reacties werden in 20 ui, met het GoTaq PCR kit (Promega) met "groene buffer" en een eindconcentratie van 200 uM dNTP, en 10 nM van elke primer met 0,5 eenheden GoTaq DNA polymerase. Thermocycli wasperformed in MyCycler (BioRad), beginnend met een denaturatie gedurende 2 min bij 94 ° C, vervolgens cycli van 10 s bij 94 ° C, 20 seconden bij 55-60 ° C (afhankelijk paar primer gebruikt), 1 min bij 72 ° C.

Indien niet anders vermeld, werden 35 amplificaties cycli gedaan. Na amplificatie werd elektroforese van 10  $\mu$ l van elk PCR-product uitgevoerd op een 2% agarosegel met 0,5  $\mu$ g / ml ethidiumbromide en werd fragmentgrootte van een met 1 kb DNA ladder (Promega) geschat. Om verontreiniging op monsters te bepalen met genomisch DNA werden alle PCR amplificaties parallel uitgevoerd met een negatieve controle van reverse transcriptie, d.w.z. met RNA ingediende omgekeerde transcriptie monsters zonder MultiScribe Reverse Transcriptase.

Semi-kwantitatieve RT-PCR schattingen werden gevalideerd met behulp van een standaard curve verdunningsreeks van Wistar ratten cDNA. Densitometries amplicon fluorescentie-intensiteit werden uitgevoerd met VilberLourmat Bio1D software.

- De RT-PCR-analyse toont dat de expressie van het MSX1 sense (S) gen, het MSX1 antisense (AS) gen en de Dlx1 gen in de craniofaciale regio E12 en E14 bij embryoos van Dumbo ratten duidelijk lager was dan in Wistar ratten (Figuur 2). Een groot verschil werd waargenomen voor de Msx1sense (S) gen, die bijna niet detecteerbaar was in Dumboratten. Met de verdunningskrommingen van het Wistar cDNA, valideerde dat onder de omstandigheden (de fluorescentie-intensiteit van amplicons is direct gerelateerd aan de oorspronkelijke concentratie van target DNA). Met verdunningscurves schatten we in dat het expressie-niveau in de Dumborat (het MSX1 sense (S) honderd keer lager dan in de Wistar rat. Het verschil tussen Dumbo- en Wistar ratten is significant ( $p = 0.0008$ ). Expressie van het Msx1antisense-gen en van de Dlx1-gen in de Dumbo rat waren ruwweg drievoudig lager dan in de Wistar rat. De verschillen tussen Dumbo en Wistar ratten significant ( $p = 0.0008$ ). Zoals verwacht konden de twee stammen rat niet significant verschillen in de expressie van het controle gen: voor GAPDH gen ( $p = 1.00$ ) en voor NGF-gen ( $p = 0.87$ ).





**Figure 2** - Comparison by RT-PCR analysis of the expression of the Msx1-AS gene, the Msx1-S gene, and the Dlx1 gene between Dumbo and Wistar rats during craniofacial morphogenesis. PCR products were separated by electrophoresis on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. DD<sup>-</sup>: negative control of Dumbo cDNA. DD<sup>+</sup>: positive control of Dumbo cDNA. WW<sup>-</sup>: negative control of Wistar cDNA. WW<sup>+</sup>: positive control of Wistar cDNA with a dilution series of Wistar cDNA :from 0.01-0.03-0.1-0.3-1.0 The expression of the Msx1-AS gene and the Msx1-S gene were markedly lower in Dumbo rats compared to the Wistar strain ( $p = 0.0008$ ). Expression of the NGF encoding gene was identical in both strains ( $=0.87$ ).

Tijdens de embryogenese, migreren craniale neurale lijst cellen naar de vermoedelijke onderkaak, bovenkaak en jukbeen primordia, waar ze condenseren tot mesenchymale en precartilagineus blastemata vormen voordat differentiatie ontstaat in osteoblasten. De osteoblasten synthetiseren botmatrix door intramembraneuze ossificatie (Couly et al, 1993 Hal en Miyake, 2000), terwijl de gehoorbeentjes Van het oor, afgeleid van Meckel's en Reichert's kraakbeen de deur vormen naar endochondrale ossificatie. Normale ontwikkeling vereist waarborging dat botmorfologie en groei worden afgestemd op de Ontwikkeling van de schedel (Morriss-Kay, 1993). De generatie van de verschillende celtypen van craniale neurale lijst (CNC) wordt geregeld door genetische controle, omdat een groot aantal kandidaat regulerende-genen geïdentificeerd wordt en de mutaties in deze genen gemaakt wordt. Sommige van deze genen zijn homeobox genen. Ze worden uitgedrukt in de beginfase van de ontwikkeling binnen een beperkte in ruimte en tijd en zijn betrokken bij de specificatie van bepaalde kenmerken.

Homeobox genen zijn geconserveerd gevonden in alomtegenwoordige superfamilie van transcriptiefactoren in alle eukaryoten, met analogen in prokaryoten. Deze genen reguleren in het algemeen bepalingen als, segmentale patroonvorming en weefselidentiteit tijdens de ontwikkeling. Het eiwitproduct van een homeobox gen bevat een zeer geconserveerde homeodomein aan het carboxyluiteinde dat een DNA bindende helix-turn-helix motief omvat. Homeobox eiwitten zijn samengesteld uit een variabel aantal betrokken domeinen voor wat betreft eiwitbinding, specificiteit en regulatie (Qian et al, 1989;.. Kissinger et al, 1990)

- MSX en Dlx homeobox genfamilies zijn uitgedrukt in de pharynx bogen, die leiden tot craniofaciale structuren. De onderkaak, bovenkaak, jukbeen en oor zijn afgeleid van de eerste faryngeale boog, die neurale cellen ontvangt van de middenhersenen, namelijk het mesencephalon en rhombomeres r1 en r2 (Tan en Morriss-Kay, 1985). De emigratie en expressie van MSX en Dlx genfamilies in de craniale neurale cellen van het centrale zenuwstelsel, blijft in de craniofaciale regio.
- Het MSX1 gen (sterk tot expressie gebracht in CNC ; craniale neurale cellen) speelt een cruciale rol in de regulering epitheliale-mesenchymale overgang gedurende morfogenese (Robert et al., 1989). Expressie van MSX1 in de craniale neurale blijft tijdens celmigratie en kolonisatie in de pharynx bogen (Mackenzie et al., 1992). In het centrale zenuwstelsel, is de expressie van MSX1 essentieel in de achterhersenen en rhombomeres. Dorsolaterale expressie van MSX1 blijft in de hersenen tijdens neurulatie en vormt meer zijwanden (Bendall en Abate-Shen, 2000).
- Dlx1 is een lid van de distale minder homeobox genfamilie. Het is waarschijnlijk verantwoordelijk voor de programmering ontwikkelingsprocessen langs de proximodistal en mediolateral afmetingen van de pharynx bogen is (Qiu et al., 1995, Depew et al., 2005). Aangezien de CNC bijdragen aan de bovenkaak en onderkaak componenten van de eerste boog is afgeleid van de achterste middenhersenen en rhombomeres 1 en 2 (Osumi-Yamashita et al., 1994), moeten er kandidaat regulatoren van de Dlx genen in dit neuroepithelium voorkomen.
- Onze bevindingen kunnen helpen om de vertraagde chondrogenese en wijlen ossale groei van deze regio's in Dumbo ratten in vergelijking met Wistarratten verklaren. Blin-Wakkach et al., (2001) bewezen al endogene MSX1 antisense RNA (MSX1-RNA) in gedifferentieerde tandheelkundige en craniofaciale weefsels van muizen, ratten en mensen. Tevens bleken deze RNA MSX1 eiwitexpressie blokkeren en het vertoont een omgekeerde temporospatial strooibeeld met MSX1 eiwit zowel in vivo als in vitro.
- MSX1-S wordt sterk tot expressie in de proliferatieve progenitorcellen van dentale mesenchym en bot, en is neerwaarts gereguleerd in terminaal gedifferentieerde weefsels (Robert et al, 1989; Mackenzie et al, 1991;.. Houzelstein et al, 1997). Daarentegen werd een inverse verdeling van de MSX1-AS RNA aangetoond door Blin-Wakkach et al. (2001). Deze auteurs toonden aan dat wanneer de AS transcript overvloediger, MSX1 eiwit detecteerbaar en omgekeerd, overexpressie van het sense RNA leidt tot productie van MSX1 eiwit. Zij hebben vervolgens aangetoond dat de balans tussen de niveaus van de twee MSX1 RNA (sense / antisense) is gerelateerd aan de expressie van MSX1 eiwit en dat deze verhouding zeer belangrijk is voor de terminale differentiatie van het skelet. Zij toonden ook aan dat de MSX1-AS RNA betrokken is bij de oversprong tussen de MSX Dlx trajecten. Forest-Potts en Sadler (1997) benadrukten dat antisense demping van MSX1 tijdens de vroege stadia van neurulatie leidt tot hypoplasie van de bovenkaak en onderkaak botten, en ook tot afwijkingen in de neurale buis. Wanneer gekweekte embryo's van muizen werden geïnjecteerd met MSX1-AS oligodeoxynucleotiden en de expressie van MSX1 eiwit werd verstoord volgden craniofaciale afwijkingen. Door MSX1 werd aangetoond dat door de neerwaarts regulering van het meester-gen van osteoblastenactiviteit vastberadenheid, Cbfa1, er sprake is van een sterke aanwijzing dat de verhouding tussen de MSX1-S en MSX1-AS RNA een belangrijke factor is in cel-differentiatie en fenotypische expressie in gemineraliseerde weefsels (Blin-Wakkach ea ., 2001).


Omdat de expressiepatronen van MSX genen nauw verbonden zijn met de ontwikkeling van neurale cellen in verscheidene species, kan er sprake zijn van vroegtijdig falen van de craniofaciale ontwikkeling door afwijkende CNC cellen inductie of migratie (Han et al., 2007). MSX1 gen is vereist is voor osteogenese in de craniale neurale stam. Aangetoond is dat differentiatie van het mesenchym en de vaststelling van bepaalde craniofaciale een defect geeft in de MSX1- structuren was van muizen (- / -). Zij toonden ook het falen aan van CNC-afgeleide mesenchymale cellen in de Runx2 en Osterix uitingen in de afwezigheid van MSX1 om osteogene differentiatie te voorkomen. Runx2 beheerst essentiële transcriptiefactor osteoblast differentiatie. Nulmutatie van Runx2 leidt tot een volledig gebrek aan ossificatie in zowel de neurale lijst en mesoderm afgeleide beenderen (Komori et al., 1997)

- Gerichte nulmutatie van MSX1 resulteren in meerdere craniofaciale afwijkingen waarbij een defect in de onderkaak botontwikkeling ontstaat. Bij menselijke mutaties in de MSX1 gen spreekt men van een open- of gespleten gehemelte (Padanilam et al, 1992;.. Hu et al, 1998 en Van Den Boogaard et al, 2000). Het fenotype wordt verondersteld gerelateerd te zijn een dosis-effect van MSX1 eiwit (Hu et al., 1998). Interessant is dat MSX1 downregulatie geassocieerd wordt met de terminale differentiatie van verschillende celtypes, zoals kraakbeen (Mackenzie et al, 1991;.. Coelho et al, 1993;.. Mina et al, 1995) en spieren (Houzelstein et al, 1999).
- Onze gegevens gaven aan dat expressie van het gen Dlx1 op E12 en E14 (fasen van craniofaciale ontwikkeling ) zwakker aanwezig waren in de Dumborat dan in de Wistar-ratten. De verminderde expressie van het gen in Dlx1 Dumbo ratten kan worden gerelateerd aan de 'misvorming' van de kop van de Dumboratten (Depew , 2002, 2005). Gebleken is dat Dlx-mutante muizen ernstige craniofaciale misvormingen vertonen, zoals een gespleten gehemelte, en dysmorphic middenoor en kaakbeenderen. Dlx-mutante muizen vertraagde ossificatie van dermale botten (Merlo et al., 2000) lijkt de defecten te veroorzaken door inactivatie van één exemplaar van Cbfa1 (Otto et al., 1997). Het lijkt erop dat zowel MSX1 en Dlx1 een directe of indirecte relatie hebben met Cbfa1.
- Kim et al, (1998) toonden dat FGFR2 expressie in de craniofaciale structuren van MSX1 werd verlaagd - / - muizenembryo's. Er zijn aanwijzingen dat FGF signalering betrokken is bij calvarial ontwikkeling. In calvarial cultuur, FGF4 versnelt botvorming. FGF2 kan de gecompromitteerde osteogonitor proliferatie van Tgfr2 conditionele "knockout muizen" redden (Sasaki et al., 2006). Robel et al., (1995) toonde aan dat FGF2 verhoogde Dlx1 expressie en dit effect was genspecifiek, dosisafhankelijk en tijd-gereguleerd, met grotere effecten in eerdere stadia van ontwikkeling. Deze interactie tussen FGF2 en Dlx1 kan belangrijk zijn voor de regulatie van de antero-posterieure patroon in craniofaciale ontwikkeling. Zhang et al, (1997) toonden aan dat sommige van de defecten in MSX1 - / - muizen konden verergeren of verminderen door regulering van bepaalde Dlx genen. De essentiële voorwaarde voor het optreden van deze verordening is dat de twee genen tegelijk tot expressie worden gebracht in dezelfde cellen.
- Tot slot, vonden we dat de MSX1 en Dlx1 genen verschillend reageren in de expressie tijdens het ontwikkelen van het hoofd van de Dumbo- en de Wistarratten, met een vermindering van kenmerken in de Dumbo stam. Dit suggereert dat de dumborat een geschikt diermodel voor het begrijpen abnormale craniofaciale ontwikkeling zou zijn. Deze rat weerspiegelt de verhouding tussen sommige homeobox genen en craniofaciale afwijkingen. De zoektocht en bevestiging naar andere gelijktijdige kenmerken in verband met craniofaciale afwijkingen zal nodig zijn, zoals het bestuderen van apoptose en de betrokkenheid van andere genen in de Dumbo fenotype (het onderzoeken van de expressie van MSX1 eiwit door Western blot analyse).

- **Refencies**

- Bendall AJ and Abate-Shen C (2000) Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene* 247:17-31. [ [Links](#) ]
- Blin-Wakkach C, Lezot F, Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Monteiro S, Teillaud C, Pibouin L, Orestes-Cardoso S, Papagerakis P, Macdougall M, *et al.* (2001) Endogenous Msx1 antisense transcript: *In vivo* and *in vitro* evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7336-7341. [ [Links](#) ]
- Coelho CN, Upholt WB and Kosher RA (1993) The expression pattern of the chicken homeobox-containing gene GHox-7 in developing polydactylous limb buds suggests its involvement in apical ectodermal ridge-directed outgrowth of limb mesoderm and in programmed cell death. *Differentiation* 52:129-137. [ [Links](#) ]
- Couly GF, Coltey PM and Le Douarin NM (1993) The triple origin of skull in higher vertebrates: A study in quail-chick chimeras. *Development* 117:409-429. [ [Links](#) ]
- de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EG, van der Zee AG, te Meerman GJ and ter Elst A (2007) Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS ONE* 2:e898. [ [Links](#) ]
- Depew MJ, Lufkin T and Rubenstein JLR (2002) Specification of jaw subdivision by Dlx genes. *Science* 298:381-384. [ [Links](#) ]
- Depew MJ, Simpson CA, Morasso M and Rubenstein JL (2005) Reassessing the Dlx code: The genetic regulation of branchial arch skeletal pattern and development. *J Anat* 207:501-561. [ [Links](#) ]
- Dupont E, Canu MH, Stevens L and Falempin M (2005) Effects of a 14-day period of hindpaw sensory restriction on mRNA and protein levels of NGF and BDNF in the hindpaw primary somatosensory cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 133 78-86. [ [Links](#) ]
- Forest-Potts L and Sadler TW (1997) Disruption of Msx-1 and MSX-2 reveals roles for these genes in craniofacial, eye, and axial development. *Dev Dyn* 209:70-84. [ [Links](#) ]
- Hall BK and Miyake T (2000) Craniofacial development of avian and rodent embryos. *Meth Mol Biol* 135:127-137. [ [Links](#) ]
- Han J, Ishii M, Bringas Jr P, Maas RL, Maxson Jr RE and Chai Y (2007) Concerted action of Msx1 and Msx2 in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development. *Mech Dev* 124:729-745. [ [Links](#) ]
- Houzelstein D, Cohen A, Buckingham ME and Robert B (1997) Insertional mutation of the mouse Msx1 homeobox gene by an lacZ reporter gene. *Mech Dev* 65:123-133. [ [Links](#) ]
- Houzelstein D, Auda-Boucher G, Chéraud Y, Rouaud T, Blanc I, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Fontaine-Pérus J and Robert B (1999) The homeobox gene Msx1 is expressed in a subset of somites, and in muscle progenitor cells migrating into the forelimb. *Development* 126:2689-2701. [ [Links](#) ]
- Hu G, Vastardis H, Bendall AJ, Wang Z, Logan M, Zhang H, Nelson C, Stein S, Greenfield N, Seidman CE, *et al.* (1998) Haploinsufficiency of MSX1: A mechanism for selective tooth agenesis. *Mol Cell Biol* 18:6044-6051. [ [Links](#) ]
- Kim HJ, Rice DP, Kettunen PJ and Thesleff I (1998) FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development* 125:1241-1251. [ [Links](#) ]
- Kissinger CR, Liu BS, Martin-Blanco E, Kornberg TB and Pabo CO (1990) Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63:579-590. [ [Links](#) ]
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, *et al.* (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755-764. [ [Links](#) ]
- Louryan S, Biermans J and Flemal F (1995) Nerve growth factor in the developing craniofacial region of the mouse embryo. *Eur J Morphol* 33:415-419. [ [Links](#) ]
  
- Mackenzie A, Leeming GL, Jowett AK, Ferguson MW and Sharpe PT (1991) 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* 111:269-285. [ [Links](#) ]

- Mackenzie A, Ferguson MW and Sharpe PT (1992) Expression patterns of the homeobox gene, Hox-8, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape. *Development* 115:403-420. [ [Links](#) ]
- Merlo GR, Zerega B, Paleari L, Trombino S, Mantero S and Levi G (2000) Multiple functions of Dlx genes. *Int J Dev Biol* 44:619-626. [ [Links](#) ]
- Mina M, Gluhak J, Upholt WB, Kollar EJ and Rogers B (1995) Experimental analysis of Msx-1 and Msx-2 gene expression during chick mandibular morphogenesis. *Dev Dyn* 202:195-214. [ [Links](#) ]
- Morriss-Kay G (1993) Retinoic acid and craniofacial development: Molecules and morphogenesis. *Bioessays* 15:1-5. [ [Links](#) ]
- Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Doi H and Eto K (1994) The contribution of both forebrain midbrain crest cell to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Dev Biol* 164:409-419. [ [Links](#) ]
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GWH, Beddington RSP, Mundlos S, Olsen BR, *et al.* (1997) Cbfa, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:75-771. [ [Links](#) ]
- Padanilam BJ, Stadler HS, Mills KA, McLeod LB, Solursh M, Lee B, Ramirez F, Buetow KH and Murray JC (1992) Characterization of the human HOX 7 cDNA and identification of polymorphic markers. *Hum Mol Genet* 1:407-410. [ [Links](#) ]
- Pibouin-Fragner L, Nadra R, Fernandes I, Berdal A and Menuelle P (2005). Régulation hormonale du gène Msx1 chez le rat: Caractérisation et expression de l'ARN Msx1 antisens au cours du développement craniofacial. *Cahiers de l'ADF* 18-19:50-56. [ [Links](#) ]
- Price M, Lemaistre M, Pischetola M, Di Lauro R and Duboule D (1991) A mouse gene related to Distal-less shows a restricted expression in the developing forebrain. *Nature* 351:748-751. [ [Links](#) ]
- Qian YQ, Billeter M, Otting G, Müller M, Gehring WJ and Wüthrich K (1989) The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: Comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59:573-580. [ [Links](#) ]
- Qiu M, Bulfone A, Martinez S, Meneses JJ, Shimamura K, Pedersen RA and Rubenstein JLR (1995) Role of Dlx-2 in head development and evolution: Null mutation of Dlx-2 results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain. *Genes Dev* 9:2523-2538. [ [Links](#) ]
- Robel L, Ding M, James AJ, Lin X, Simeone A, Leckman JF and Vaccarino FM (1995) Fibroblast growth factor 2 increases Otx2 expression in precursor cells from mammalian telencephalon. *J Neurosci* 15:7879-91. [ [Links](#) ]
- Robert B, Sassoon D, Jacq B, Gehring W and Buckingham M (1989) Hox-7, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis. *EMBO J* 8:91-100. [ [Links](#) ]
- Sasaki T, Ito Y, Bringas P Jr, Chou S, Urata MM, Slavkin H and Chai Y (2006) TGFbeta-mediated FGF signaling is crucial for regulating cranial neural crest cell proliferation during frontal bone development. *Development* 133:371-381. [ [Links](#) ]
- Tan SS and Morriss-Kay G (1985) The development and distribution of the cranial neural crest in the rat embryo. *Cell Tissue Res* 240:403-16. [ [Links](#) ]
- Van Den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA and van Amstel HK (2000) MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet* 24:342-3. [ [Links](#) ]
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:e34. [ [Links](#) ]
- Zhang H, Hu G, Wang H, Sciavolino P, Iler N, Shen MM and Abate-Shen C (1997) Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol Cell Biol* 17:2920-2932. [ [Links](#) ]
- 
-

-  **Send correspondence to:**  
Stephane Louryan  
Laboratory of Anatomy  
Biomechanics and Organogenesis  
Faculté de Médecine  
Université Libre de Bruxelles  
route de Lennik 808 B  
1070, Brussels  
E-mail: [slouryan@ulb.ac.be](mailto:slouryan@ulb.ac.be)
- Received: August 6, 2008; Accepted: December 16, 2008.