

**Effekten av et menaquinon (MK-7, vitamin K2-analog) på
genekspresjon i tannanlegg**

- En in vivo studie (dyrestudie)

- En litteraturstudie

Skrevet av: Yashar Ghadakchi Shabestari



Odontologisk Fakultet

**Universitet i Oslo
2013 - 2015**

**Effekten av et menaquinon (MK-7, vitamin K2-analog) på
genekspresjon i tannanlegg:**

- *En in vivo studie (dyrestudie) og gjennomgang av tidligere forskning på K2-
vitaminer*

Forord

Denne oppgaven ble utført på Institutt for Oral Biologi ved det Odontologiske fakultetet i perioden juni 2012 til august 2014 som min masteroppgave for det 5-årige odontologiske studiet.

Sommeren 2012 kom jeg i kontakt med Prof. Harald Osmundsen angående mulige prosjekter for en fremtidig masteroppgave. Jeg ble hjertelig tatt imot av Prof. Osmundsen og ble satt på et prosjekt der vi skulle se på effekten av MK-7 på genekspresjonen i tannanlegg hos nyfødte mus. Genekspresjonen skulle måles ved hjelp av mikromatriser. Mikromatrisearbeid krever opplæring i RNA isolering, cDNA syntese og hybridisering til mikromatriser, etterfulgt av bioinformatikk for å koble signifikante endringer i genekspresjon til relevante cellulære funksjoner. I den sammenheng kom jeg i kontakt med 1. amanuensis Amer Sehic som hadde utført innledende forsøk med MK-7 injeksjoner i nyfødte mus. På dette tidspunktet skulle jeg læres opp i isolering av total-RNA og kjøring av micromatriser.

Etter flere innledende forsøk med varierende resultater ble det konkludert med at forsøksprotokollen måtte revideres. Jeg brukte flere måneder og sommeren 2013 på å finne feilene i protokollen, men resultatene forble variable. På dette tidspunktet samarbeidet jeg og Maria A. Landin, Phd som ble min andre veileder. I samarbeid med Maria Landin ble protokollen optimalisert. Nå er jeg i besittelse av resultater som et produkt av en velfungerende protokoll. Resultatene er til dels er mine egne og dels Maria Landins resultater.

Dermed vil jeg takke Prof. Harald Osmundsen og Maria A. Landin Ph.D for denne gylne og lærerike reisen. Jeg vil takke han for hans råd og veiledning og ikke minst tålmodigheten han viste overfor meg. Jeg vil også takke Maria A. Landin, Ph.D. for en tett og utmerket oppfølging og mye nyttig kunnskap av praktisk, teknisk og faglig karakter.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	5
1.1	K-vitaminer (K1, K2/MK-7):	5
1.2	Kilder til Vitamin K1 (Phylloquinoner) og K2 (Menanoquinoner):	5
1.3	Hvordan Vitaminene K1 (Phylloquinoner) og K2 (Menanoquinoner) fungerer:.....	6
1.4	Beinremodellering\beinhomeostase:	6
1.5	Virkning av vitamin K2 på beindannelse\remodellering\mineralisering:	9
1.6	Studier som viser anabolsk effekt på bendannelse og økt mineralisering:	10
1.7	Studier som viser anti-katabolsk effekt på beinremodellering:	10
1.8	Forskning - fokus på in vitro studier:	11
1.9	Effekt av K2-vitaminer på bløtvev:	11
1.10	Hemmende effekt på produksjon av ROS:	12
1.11	Tumorsuppressor\anti-proliferativ effekt av vitamin K2.....	12
1.12	Relevans for odontologi:.....	12
1.13	Mål med oppgaven:.....	13
2	Metoder	14
2.1	Forsøksopplegg:.....	14
2.2	Forsøksdyr	14
2.3	Behandlig:.....	14
2.4	Disseksjon av tannanlegg:	14
2.5	Isolering av totalRNA:.....	14
2.6	cDNA syntese og merking:.....	14
2.7	Mikromatriseanalyse:	15
2.8	Bioinformatikk:	15
3	Resultater.....	16
4	Diskusjon.....	25
4.1	Eksperimentell del:	25
4.2	Sammenligning av dosene:	27
4.3	Litteraturstudie.....	29
	Referanser:	31

1 Innledning

1.1 K-vitaminer (K1, K2/MK-7):

K2-vitaminer, eller menaquinoner, utgjør en gruppe molekyler som strukturelt (Fig. 1) likner vitamin K1 (phylloquinon). Disse molekylerne (K1 inkludert) består av en såkalt «quinone»-ring (1,4-naphthoquinone) med en tilkoblet karbonkjede av varierende kjedelengde.

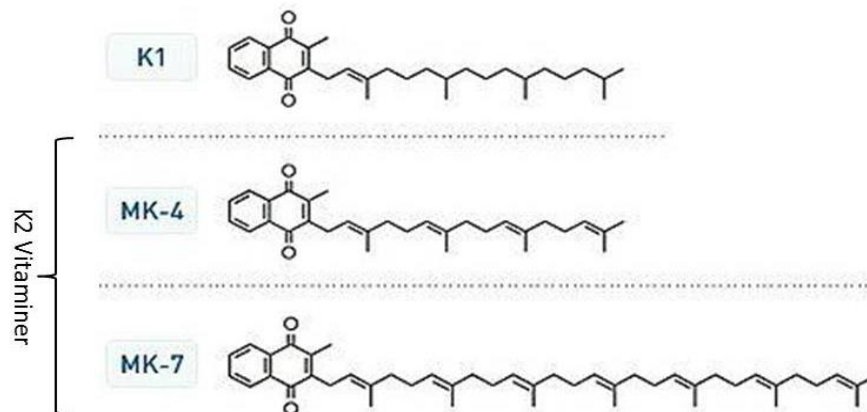


Fig.1 Molekylær struktur av K-vitaminer

1.2 Kilder til Vitamin K1 (Phylloquinoner) og K2 (Menanoquinoner):

Mens den primære kilden for vitamin K1 er stort sett i grønnsaker, for eksempel blomkål, brokkoli, andre planter i kålfamilien, spinat og lignende planter med grønne blader er Vitamin K2 et bakterielt produkt. I den intestinale bakteriefloraen produseres en viss mengde vitamin K2 men bare svært små mengder av dette absorberes (1). Produksjonen av K2-vitaminer foregår i tykktarmen ved hjelp av intestinale mikrofloraen. Alternativ kilde for denne vitaminingruppen er matprodukter som fermenteres av bakterier. Den rikeste kilden for vitamin K2 er den japanske retten «natto» som i hovedsak er fermenterte soyabønner. En kan også finne noe av

disse vitaminene i meieriprodukter som har blitt lagret for modning/fermentering. Modnede, vellagrede oster er eksempler på slike matvarer.

1.3 Hvordan Vitaminene K1 (Phylloquinoner) og K2 (Menaquinoner) fungerer:

K-vitaminer har lenge vært kjent for sin rolle i γ -karboksylering av «glutamat» dermed aktivering av en rekke non-kollagenøse ben- og dentinproteiner som osteocalcin og osteonectin. Mest kjent er aktiveringen av en rekke koagulasjonsfaktorer (II, VII, IX, X, protein C, S og Z), matriks Gla-protein (2) og GAS6-protein.

Nyere forskning har påvist en sterkere γ -karboksyleringseffekt hos «menaquinoner» - familien sammenlignet med «phylloquinoner» (3-6). I tillegg, når det gjelder K2-vitaminer, har man påvist flere γ -karboksyleringsuavhengige regulatoriske mekanismer involvert i beindannelse (7-9). Dette står i kontrast til den γ -karboksyleringsavhengige effekten av K1-vitaminer. Disse mekanismene vil bli forklart i større detalj videre i denne oppgaven. Hovedfokus i denne oppgaven kommer til å være på K2-vitaminer (menaquinoner) og analogen MK-7.

Mesteparten av faglig litteratur rundt K2-vitamins virkning fokuserer på hardvev (bein og skjelett). Dentalt vev (dentin og emalje), spesielt av mesenkymalt opphav, har mange likheter med benvev når det kommer til deres bestanddeler (hydroxyapatitt, kollagen og non-kollagenøse proteiner).

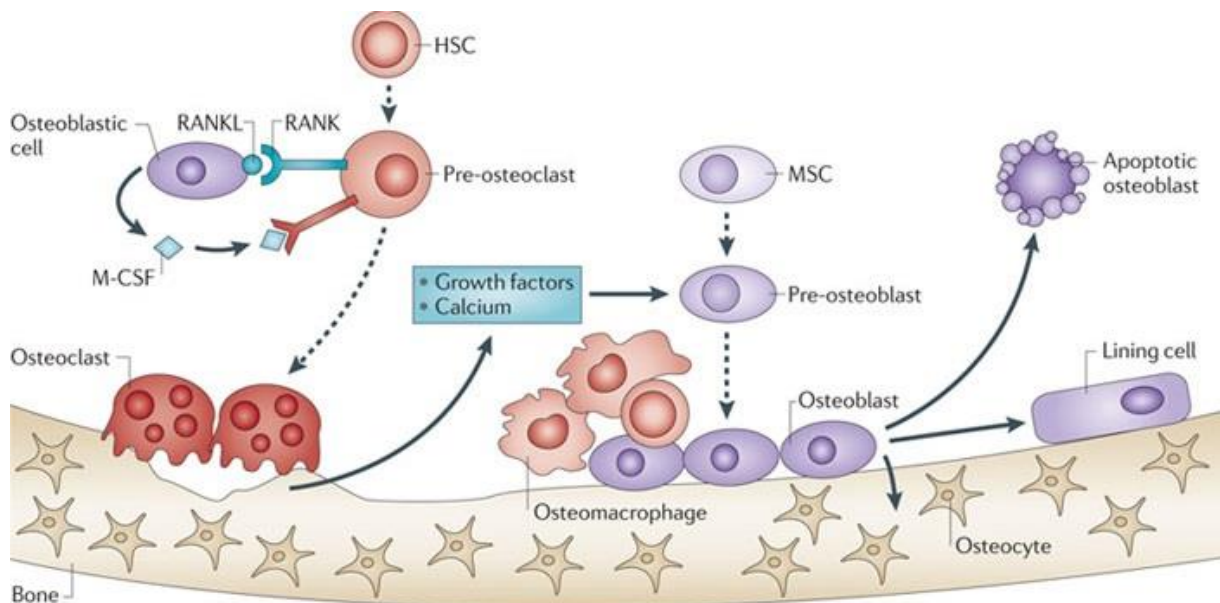
Derfor er det viktig å ha kunnskapen om de kontinuerlige forandringene (beinremodellering eller beinhomeostase) som foregår i bein. Disse mekanismene kan ha paralleller hva angår tannutvikling.

1.4 Beinremodellering\beinhomeostase:

Bein, i motsetning til dentalt vev, er i en kontinuerlig prosess av nedbrytning\resorpsjon (katabolisme) og påleiring\deponering (anabolisme). Dette kalles beinhomeostase. Beinhomeostase påvirkes av fysisk belastning, ernæringstilstand, skader (både på makro og mikro nivå) og hormoner.

De to hoved cellytterne som er involvert i denne prosessen er osteoblaster og osteoklaster. Osteoblaster har som oppgave å deponere nydannet bein og i tillegg at de har en viktig rolle i aktivering av osteoklaster som resorberer bein.

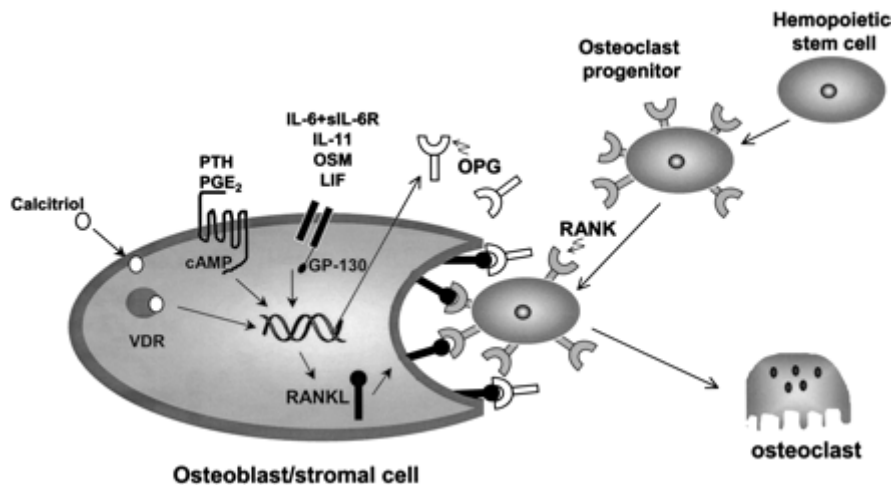
(Fig. 2)



Dette samspillet foregår ved hjelp av RANK\RANKL\OPG-systemet. Dette er skissert i figuren nedenfor.

RANK som står for “Receptor Activator of Nuclear Factor κ B”, er en transmembranøs reseptor i celledommen til osteoklaster. RANK fungerer som reseptor for og blir aktivert av liganden RANKL. Disse to membranproteinene er involvert i aktivering og differensiering av osteoklaster. I dette samspillet inngår også OPG som er en såkalt cytokin-reseptor eller «decoy»-molekyl som kan blokkere RANKL og dermed blokkere aktivering av RANK\RANKL-signalveien. En aktivering av RANK-RANKL-komplekset setter i gang en rekke cellulære funksjoner gjennom aktivering av NF- κ B-signalveien.

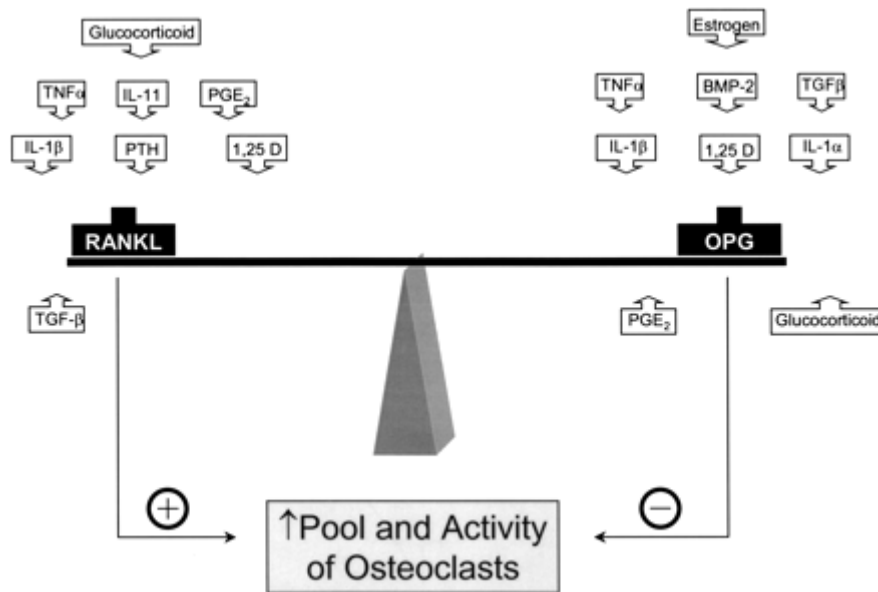
(Fig 3.)



RANKL og RANK er svært viktig i aktivering av osteoklaster (Fig.3). OPG fungerer som et inhiberende molekyl på RANKL. Overekspressjon av OPG fører til redusert beinnettbygning, osteoklastogenese, osteoklastmodning og differensiering.

Nettoeffekten eller retning av dette samspillet bestemmes av mange cytokiner (Fig. 4)

(Fig 4.)



1.5 Virkning av vitamin K2 på beindannelse\remodellering\mineralisering:

Det er flere studier som indikerer at andre mekanismer enn de ovenfor nevnte kan forårsake vitamin K2-avhengig stimulering av beindannelse og mineralomsetningen. Noen av disse studiene rapporterer en anti-inflammatorisk effekt som er spesifikt for K2-vitaminer (2, 3).

Alle senere studier av menaquinoner omtaler en dobbelt effekt, dvs den anabolske og den anti-katabolske mekanismen for beindannelse og remodellering.

De anabolske effektene (økning av biokjemiske komponenter som calcium, alkaliske fosfataser og DNA i «diaphyseal» og «metapheseal» vev) og anti-katabolske effektene (hemming av signalveier utløst av inflammasjonsfaktorer som TNF-alfa og dermed hemming av beinresorpsjon og økt basal beindannelse) er beskrevet som langt sterkere for menaquinoner sammenliknet med phylloquinoner (1, 14). Dette kan skyldes forskjellene i molekylstrukturene men også forskjeller i absorpsjon over tarmepitelet og opptak i kroppens celler (4, 5).

Mange kliniske studier viser betydelig reduksjon av risiko for benbrudd som følge av langtidsadministrering av MK-4 (en menaquinone med langt kortere biologisk halveringstid enn MK-7) (1, 6-8). Dette ser ut til at K2-vitaminer i større grad påvirker

den katabolske\osteoklastiske delen av beinremodellering (9-11) og forbedrer BMD (beintetthet) signifikant (12).

1.6 Studier som viser anabolsk effekt på bendannelse og økt mineralisering:

In vitro studier viser en betydelig økning av biokjemiske komponenter som calcium, alkaline fosfataser og DNA i «diaphyseal» og «metapheseal» vev i lange bein hos mus ved en K₂-vevskonsentrasjon på 10⁻⁵M. Denne effekten blir forsterket når K₂ er administrert i kombinasjon med phytoestrogenet genistein (13)

MK-7 ser ut til å fremme en pro-osteoblastisk differensiering av stromaceller i beinmarg hos mus (14) og stimulerer mineralisering i ben (15)

Genekspresjonsstudier tyder på at en annen mekanisme kan ligge bak den anabolske effekten av K₂ vitaminene. Mekanismen går ut på at K₂-vitaminer fører til aktivering av SXR-reseptorer og dermed aktiverer SRX-mål gener, som inkluderer gener som koder for proteiner som står for produksjon av kollagen og andre «ekstracellulær-matrix»-komponenter (matrix Gla-proteiner, som er viktig i bendannelsesprosessen). Flere av disse SRX-målgene koder for proteiner som CD14, CD24 som har ATP-binding cassetter, samt TSK og matrilin-2. Disse proteinene er viktig for osteoclastogenese og osteoblastogenese (dannelse av osteoclaster og osteoblaster) (2, 16). I disse studiene ble det observert en opphoping av disse proteinene spesielt i osteoblaster, osteoclaster, chondrocytter og chondroblaster som følge av behandling med K₂-vitaminer (2, 16). CD24 har tidligere vært kjent som markører for ikke-differensierte SCAP celler (stamceller fra apikale papilla). Disse cellene differensieres til odontoblaster og pulpaceller (17).

1.7 Studier som viser anti-katabolsk effekt på beinremodellering:

Som tidligere vist i Fig. 4, er bein under konstant remodellering som inkluderer resorpsjon og ny beindannelse. Dette er en fysiologisk prosess under kontroll av en rekke cytokiner. Faktorer som TNF-alfa, IL-1 og IL6 er blant cytokiner som stimulerer basal resorpsjon som en del av remodelleringsprosessen.

MK-7 kan hemme TNF-alfa-avhengige signalveier som NF-κB og vil slik også hemme basal beinresorpsjon og stimulere til økt basal beindannelse (18).

K2-vitaminer er rapportert å forbygge TNF-alfa-avhengig hemming av den anabolske «TGF-beta»- og «BMP-2»-induserte SMAD-aktivering. Dette kan ha stor betydning for interaksjonen mellom epitelet og dental mesenkymet under knopp- og klokkestadiet av tannmorfogenese (14, 19, 20). Denne signalkaskaden har også vist seg for å være av kritisk betydning for dannelse av tannkusper (21).

TNF-alfa har en noe forskjellig effekt på pulpale stamceller. Her aktiverer TNF α signalveien NF-kB, som igjen fremmer odontoblast-differensiering og økt mineralisering i pulpa i forbindelse med dannelse av tertiært reparativt dentin. Samtidig blir det økt ekspresjon av matrixproteiner DSP, DPP, DMP-1 and osteocalcin (22)

1.8 Forskning - fokus på in vitro studier:

Stort sett har forskning fokusert på effekten av phylloquinoner (K1) og menaquinoner (K2) på beinvekst. I de fleste av disse studiene utført med cellekulturer fra mus indikerer resultatene stimulert differensiering av osteoblast-forløpere MC3T3 (23) med økt ekspresjon av gener som koder for proteiner som stimulerer produksjon av hardvev. Samtidig er det påvist at osteoklastaktivitet og differensiering hemmes (13, 24). Det er imidlertid lite som er kjent hva angår effekter i dentalt vev (dentin og emalje).

1.9 Effekt av K2-vitaminer på bløtvev:

I de siste 10 årene har det også vært en stadig økende oppmerksomhet rundt den negative korrelasjonen mellom inntaksmengden av menaquinoner og kardiovaskulære sykdommer. Kalsifisering av bløtvev og årevegger der økt plasmakonsentrasjon av menaquinoner har blitt assosiert med reversering, eller forebygging, av patologisk kalsifisering i bløtvev og plakkdannelse i årevegger. Mens lave konsentrasjon av disse vitaminene i plasma er forbundet med økt bløtvevskalsifisering (25-28). Dette kan være en av K2-vitaminers fysiologiske effekter i kroppen.

1.10 Hemmende effekt på produksjon av ROS (Reactive Oxygen Species eller frie radikaler):

Det er nylig funnet at K-vitaminer kan hemme produksjon av ROS og oksidativ stress som kan være resultatet av denne produksjonen, og medfølgende celledød, i hjerneceller in vitro (29). Effekten har vist seg å være langt sterkere hos MK-4 (en menaquinone-analog), og er trolig γ -karboxyleringsuavhengig.

Dette kan være av stor betydning i forskning rundt periodontale sykdommer der ROS innehar en sentral rolle i initiering og progresjon av periodontitt.

Dette er den motsatte effekten som vitamin K3 (blir effektivt omdannet til K2 i kroppen) utøver på kreftceller- her stimuleres dannelsen av ROS (30).

1.11 Tumorsuppressor\anti-proliferativ effekt av vitamin K2

Det er flere humane studier som indikerer at K2-vitaminer kan ha en tumor-suppressor effekt ved å påvirke celleprolifisering (31-50). De best kartlagte av disse signalveiene er vitamin K2-avhengig hemming av DNA-polymerase, dannelse av nye blodkar samt forstyrrelse av mikrotubuli-funksjon under ukontrollert celleprolifisering. (49, 51)

Den nyoppdagede γ -karboxyleringsuavhengige virkningsmekanismen på hardvev, ROS-hemmende effekt, en mulig hemmende effekt på bløtvevsforkalkningen samt en mulig anti-proliferativ\anti-neoplastisk effekt peker i den retning at vitamin K2 kan ha funksjoner som vitamin K1 ikke har.

1.12 Relevans for odontologi:

Resultater fra forskning omkring effekter av K2 vitaminer på beinvev kan også være av interesse for odontologi. Vi vet at mange av de viktigste matrix-proteinene i osteogenesen er også tilstede i tannvev og er av betydning for tidlig og sen tannutvikling (52). Som eksempel på disse proteinene kan en nevne osteocalcin og osteonectin. Osteonectin har vist seg å være vesentlig under tidlig dentinutvikling, mens osteocalcin har en kritisk rolle under emaljedannelse (52).

Utvikling av et tannanlegg fra fortykningen av det epitelcellelaget til en ferdig utviklet tann består av en balanse mellom apoptose og celleproliferasjon. Det er derfor mulig at K2-vitaminer har en rolle også under tannutvikling.

Innen kariologi og konserverende behandling har det vært flere studier som har undersøkt rollen matrix metalloproteinaser (MMP) har i kariespatologien (53) og for svikt av fyllingsmaterialer (54). Disse studiene har påvist store mengder av disse enzymene i saliva, CSF og i mineralisert dentin produsert av odontoblaster (55-59). I tillegg ble det påvist en sterk aktivering av disse enzymene ved lav pH-verdier (60). Disse enzymene har også en sentral rolle i utvikling og progresjon av pulpale og periapikale lesjoner (61, 62). Disse enzymene har i tillegg vært assosiert med maligne tumorer og deres grad av aggressivitet spesielt i orofacial region (63). Dette er interessant grunnet den hemmende effekten som K2-vitaminer er vist å ha på MMP (64).

I periodontologi har man lenge studert forhold og faktorer som kan ha betydning for utvikling av periodontitt. Denne sykdommen har en immunologisk komponent siden flere studier indikerer at NF-kB-aktivering har en viktig rolle (65). Behandling av periodontitt med faktorer som inhiberer NF-kB-aktivering spesielt i osteoklaster har vist lovende resultater i behandling av periodontitt (66, 67) i hunde- og musestudier.

1.13 Mål med oppgaven:

Den første delen av denne oppgaven, beskrevet i innledningen og første delen av diskusjonen, har til hensikt å gi en oversikt over forskning som er utført på K-vitaminer med spesiell vekt på K2-vitaminer, hardvev og relevansen i faget odontologi. Den andre delen tar for seg vårt in-vivo eksperiment der vi ser nærmere på effekten av MK-7 (som er en K2-vitamin-analog) på genekspressjonen i tannanlegg 24 timer etter subkutan apikal injeksjon av dette vitaminet.

2 Metoder

2.1 Forsøksopplegg:

Total RNA isolert fra tannanlegg fra nyfødte mus behandlet med MK-7 og fra nyfødte kontroll mus ble undersøkt med mikromatriser. De behandlede prøvene er tannlegg fra mus eksponert for tre forskjellige doser MK-7 etter apikal injeksjon in vivo ved P0. Kontrollene er tannanlegg fra mus injisert med kontrollvæske på samme måte og med samme injeksjonsvolum som de behandlede prøvene. Det forelå til sammen 4 biologiske replikater (n=4) som ble brukt som kontroller mot behandlede biologiske replikater (n=3) fra biologisk forskjellige kull i hver konsentrasjonsklasse (0,1mg/kg, 2mg/kg, 10mg/kg)

2.2 Forsøksdyr

Det ble brukt musunger (Balb c mus/CD-1) fra mødre som ble foret med vitamin K-fattig fôr i 14 dager før bruk i forsøk.

2.3 Behandlig:

Ved P0, ble det injisert apikalt i tannanlegg (maksilær 1. molar) en løsning av MK-7 i doser på henholdsvis 0,1mg/kg kv, 2mg/kg kv og 10mg/kg kv løst i olivenolje.

2.4 Disseksjon av tannanlegg:

Ved P1 ble musungene avlivet ved dekapitering og tannanleggene ble dissekert og ble lagt i stabiliseringsbuffer (RNALater).

2.5 Isolering av totalRNA:

RNAet ble isolert etter anbefalinger fra RNeasy MINI KIT fra Qiagen og RNA-konsentrasjonen ble målt med NanoDrop 1000. cDNA syntese og merking:

Det ble syntetisert cDNA og indirekte merket etter instruksjer Genisphere 3DNA Array 900 (W500130 Cy3). Deretter ble cDNAet hybridisert til mikromatriser anskaffet hos Phalanx BioTech.

2.6 Mikromatriseanalyse:

Behandlede prøvene og kontrollprøvene ble 2 og 2 hybridisert som beskrevet i «Genisphere and Phalanx»-protokoller ved hjelp av SlideBooster Hybridization System.

Microarray-matrisene ble etter hybridisering skannet for fluorescenssignaler med ScanArrayLite (Packard BioScience) på samme dag. Hybridiserings signaler ble kvantitert med programmet ScanArray Express. Deretter ble rå data filene lastet opp i programmet SpotFire DesisionSite. Her ble mikromatrise LOWESS normalisert, og fluorescens signaler mindre enn 500 filtrert bort. Gjenværende signaler ble \log_2 transformert. Mikromatrisene ble videre normalisert ved hjelp av (Z-score) i SpotFire DesisionSite. Gener med P-verdien lik eller mindre enn 0.05 anses som signifikante i denne oppgaven.

2.7 Bioinformatikk:

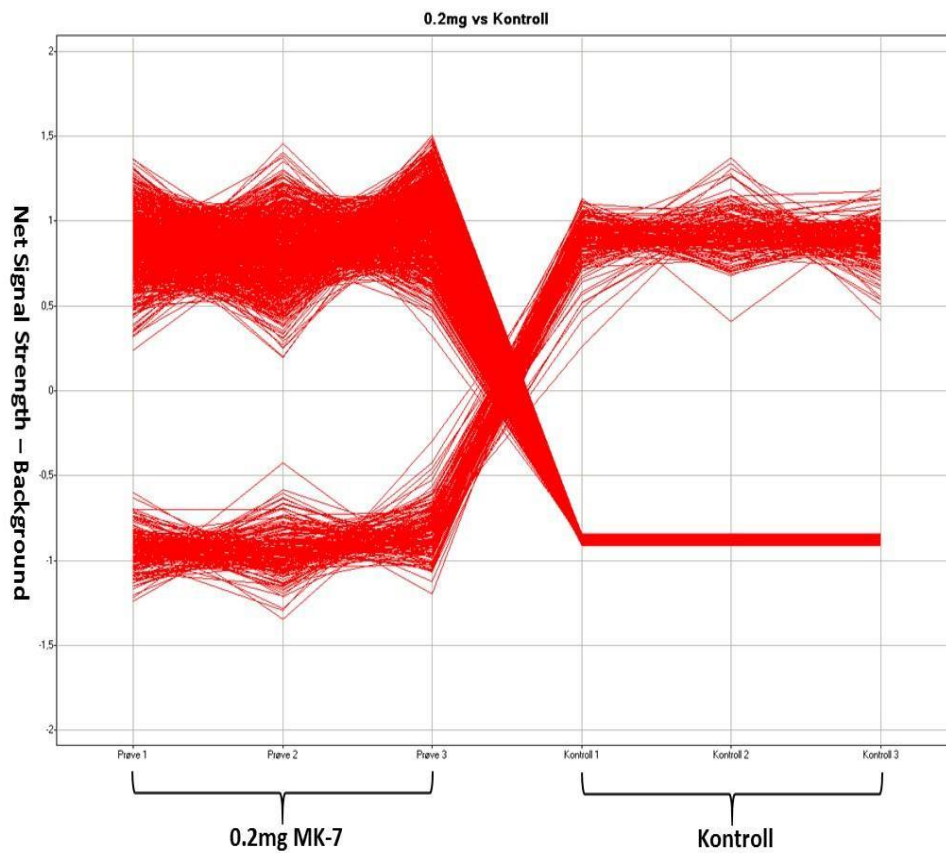
Etter Z-score analysen ble alle gener med signifikant forandret ekspresjon lastet opp til IPA (Ingenuity System Inc., Redwood City, CAL, USA) der «kjerne-analyse» ble brukt for å finne signifikante assosiasjoner i «Canonical Pathways», nettverksfunksjoner, «Molecular and Cellular Functions», oppregulerte og nedregulerte molekyler og transkripsjonsfaktorer. Parametere som ble brukt var: Kun gener kjent i Ingenuity Knowledge Base, species (mouse, human, primary mouse (cell culture (epithelial cells, odontoblast, ameloblasts og adipocytes)].

IPA transkripsjonsfaktor-analyse (Kramer et al., 2014) ble brukt for å identifisere transkripsjonsfaktorene assosiert med de påviste signifikante forandringene i genekspresjon.

3 Resultater

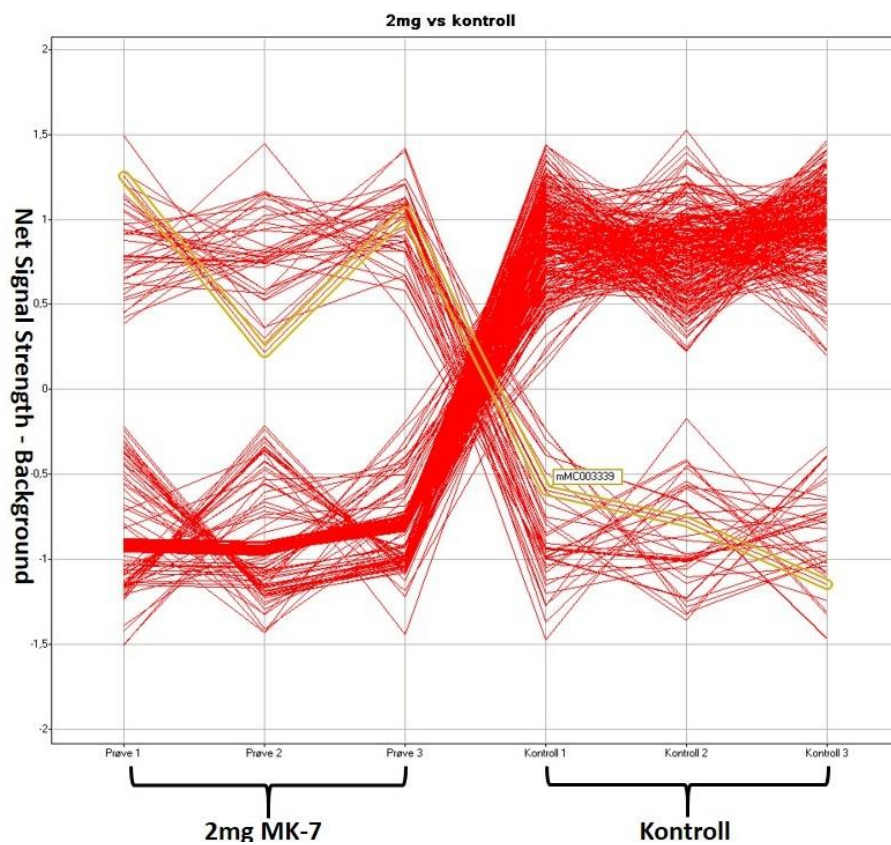
Totalt ble 774 gener ekspresjonsnivå endret ($p < 0.01$) hvorav 158 ble nedregulert og 616 oppregulert (Fig. 5) etter MK-7 injeksjon. Figuren viser log₂-transformerte, normaliserte, netto-fluorescensintensiteter. Her sammenlikner vi triplikater av behandlede prøver (0.2mg/Kg MK7) mot triplikater av kontroller.

(Fig. 5)



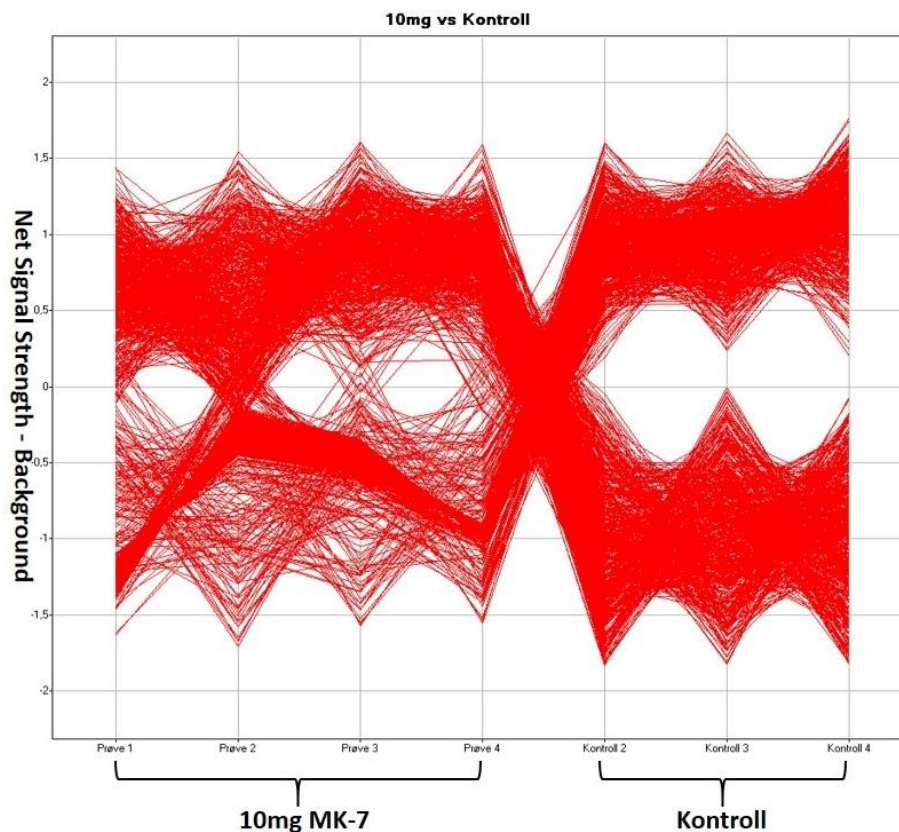
Hele 277 ($p < 0.01$) gener fikk sitt uttrykksnivå endret hvorav 225 gener ble nedregulert og 52 oppregulert etter injeksjon med 2mg MK-7. Ved denne konsentrasjonen ser vi en betydelig reduksjon i antallet gener som ble oppregulert som en følge av behandlingen. Triplikater fra behandling sammenliknet med kontrollene er skissert i figuren nedenfor. (Fig. 6).

(Fig. 6)



Figuren viser en signifikant ($p < 0.01$) forskjell i ekspresjon av 1245 gener som følge av injeksjon med (10mg MK-7) sammenliknet med de respektive kontrollene. 642 ble oppregulert og 603 gener som ble nedregulert (Fig. 7). Her ser vi den samme tendensen som tidligere.

(Fig. 7)



Bioinformatikk:

Gene signifikant påvirket av MK-7 behandling i de forskjellige dosene ble lastet opp i Ingenuity Pathway Analysis (IPA) for å se hvordan forandringer i genekspresjon påvirket cellulære prosesser som inngår i tannutvikling ved P1 (24 timer etter subkutan apikal injeksjon). Disse genene ble assosiert med følgende kategorier: 1) Kanoniske signalveier 2) nettverk analyse 3) Molekylære og cellulære funksjoner 4).

1) Canonical signalveier:

	Name	P-Value
0,2mg MK-7 mot Kontroll	EIF2 Signaling	1,17E-03
	Glutathione-mediated Detoxification	4,98E-03
	Amyloid Processing	1,21E-02
	Phosphatidylcholine Biosynthesis I	1,41E-02
	Phosphatidylethanolamine Biosynthesis II	1,85E-02
2,0mg MK-7 mot Kontroll	Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates	2,54E-03
	GADD45 Signaling	1,76E-02
	Uridine-5'-phosphate Biosynthesis	2,15E-02
	Polyamine Regulation in Colon Cancer	2,33E-02
	Estrogen-mediated S-phase Entry	2,75E-02
10,0mg MK-7 mot Kontroll	RhoGDI Signaling	1,1E-03
	ILK Signaling	2,1E-03
	Integrin Signaling	2,99E-03
	Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	4,56E-03
	Interferon Signaling	8,17E-03

Tabell.1 Tabellen viser hvilke signalveier som ble signifikant assosiert med gener med signifikant endret ekspresjon etter injeksjon med forskjellige konsentrasjoner av MK7.

2) Nettverks analyse:

	Associated Network Functions	Score
0,2mg MK-7 mot Kontroll	Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Tissue Development	50
	DNA Replication, Recombination, and Repair, Energy Production, Nucleic Acid Metabolism	45
	Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair, Cell Cycle	45
	RNA Post-Transcriptional Modification, Cell Death and Survival, Cellular Development	40
2mg MK-7 mot Kontroll	Gene Expression	37
10,0mg MK-7 mot Kontroll	Cellular Assembly and Organization, Cardiovascular System Development and Function, Cancer	42
	Cell Signaling, Protein Synthesis	35
	Cell Cycle, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	30
	Cellular Development, Nervous System Development and Function, Tissue Development	29
	Cell Cycle, Developmental Disorder, Hereditary Disorder	28

Tabell 2. Nettverksanalyse viser hvilke nettverk som blir assosiert med de genene som fikk sin ekspresjon signifikant endret som følge av behandlingene.

3) Molekulære og cellulære funksjoner:

	Name	P-value	Gener
0,2mg MK-7 mot Kontroll	Cellular Growth and Proliferation	3,38E-08 - 2,71E-02	50
	Cell Death and Survival	2,41E-05 - 2,71E-02	45
	Molecular Transport	6,53E-05 - 2,71E-02	45
	Protein Trafficking	6,53E-05 - 6,53E-05	43
	Gene Expression	6,72E-05 - 2,67E-02	40
2mg MK-7 mot Kontroll	Cellular Assembly and Organization	1,16E-04 - 4,67E-02	16
	Cellular Function and Maintenance	1,16E-04 - 4,67E-02	21
	Cell Cycle	6,89E-04 - 4,47E-02	18
	Protein Degradation	1,31E-03 - 1,31E-03	5
	Protein Synthesis	1,31E-03 - 4,25E-02	26
10mg MK-7 mot Kontroll	Cellular Development	8,63E-05 - 2,43E-02	58
	Cellular Movement	3,12E-04 - 2,43E-02	42
	Cellular Compromise	4,43E-04 - 1,80E-02	6
	Cellular Assembly and Organization	5,95E-04 - 2,32E-02	29
	Cellular Function and Maintenance	5,95E-04 - 2,43E-02	40

Tabell 3. Denne tabellen viser cellulære funksjoner assosiert med gener med signifikant endret ekspresjonsnivå.

Transkripsjonsfaktor analyse:

	Upstrøms Regulatorer/TF	p-value of overlap
0,2mg MK-7 mot Kontroll	HNF4A	1,42E-08
	CTGF	4,86E-05
	ERBB2	1,72E-04
	miR-1 (and other miRNAs w/seed GGAAUGU)	2,31E-04
	miR-29b-3p (and other miRNAs w/seed AGCACCA)	2,48E-04
2,0mg MK-7 mot Kontroll	miR-1 (and other miRNAs w/seed GGAAUGU)	2,97E-06
	RET	2,06E-04
	HNF4A	2,19E-04
	WNT1	6,60E-04
	miR-590-3p (miRNAs w/seed AAUUUUA)	1,03E-03
10mg MK-7 mot Kontroll	TGFB1	8,60E-06
	JUN	2,85E-05
	NFKBIA	3,50E-05
	Lipopolysaccharide	4,48E-05
	miR-16-5p (and other miRNAs w/seed AGCAGCA)	7,66E-05

Tabell 4. Denne tabellen viser hvilke transkripsjonsfaktorer som er ansvarlige for genekspressjonsendringer etter behandlingen med MK-7 analogen. Den viser også hvilke opp-strøms regulatorer som kan være aktivert ut fra ekspressjonsverdiene i datasettet (for eksempel miRNAer).

Molekyler/gener som ble oppregulert etter MK7 behandling:

	Gener	Exp. Value
0,2mg MK-7 mot Kontroll	MINPP1	↑ 2,047
	PIN1	↑ 1,684
	DCK	↑ 1,682
	SPAG9	↑ 1,655
	DAAM2	↑ 1,653
	AMELX	↑ 1,393
	SLC10A7	↑ 1,274
	Eef1a1	↑ 1,233
	CAPN6	↑ 1,146
	SPARC	↑ 1,138
2mg MK-7 mot Kontroll	MINPP1	↑ 4,653
	PDZD2*	↑ 3,663
	DCK	↑ 3,653
	LRRN3	↑ 3,653
	RSPH6A	↑ 3,653
	DAAM2	↑ 3,647
	Gnas	↑ 3,647
	PIN1	↑ 3,647
	SPAG9	↑ 3,640
	SLC10A7	↑ 3,640
10mg MK-7 mot Kontroll	TMCC3	↑ 3,319
	NRP2	↑ 3,319
	FAM188B	↑ 2,761
	STK32B	↑ 2,671
	BRI3BP	↑ 2,574
	IRGQ	↑ 2,346
	CSF1R	↑ 2,314
	HLX	↑ 2,118
	MRPL41	↑ 2,055
	DNAJA1	↑ 2,032

Tabell 5. Tabellen viser hvilke gener hvis ekspresjon ble signifikant økt ($p < 0.05$) oppregulert. Verdiene viser log-ratio verdier av ekspresjonsøkningen hos behandlede prøver sammenliknet med kontrollene.

Molekyler/gener som ble nedregulert etter MK7 behandling:

	Gener	Exp. Value
0,2mg MK-7 mot Kontroll	TRPM5	↓ -627,502
	ACSL4	↓ -213,333
	ING2	↓ -101,636
	DCLRE1B	↓ -74,564
	KLK3	↓ -69,436
	SOCS4	↓ -66,089
	MOV10	↓ -38,625
	TMEM125	↓ -22,812
	CCND2	↓ -8,880
	ACHE	↓ -8,481
2mg MK-7 mot Kontroll	PSMB8	↓ -42,857
	PRSS16	↓ -30,000
	PPP1R2	↓ -25,000
	SDK2	↓ -14,286
	SLC2A5	↓ -10,000
	DDO	↓ -9,375
	ZNF728	↓ -6,383
	NOTCH4	↓ -6,000
	SLC6A19	↓ -6,000
	LSAMP	↓ -5,660
10mg MK-7 mot Kontroll	PQLC1	↓ -1,944
	PRRT1	↓ -1,743
	PRKAG3	↓ -1,743
	Hmgn1	↓ -1,584
	EEF1B2	↓ -1,583
	IER3IP1	↓ -1,573
	ADH5*	↓ -1,573
	NXN	↓ -1,553
	DDX39A	↓ -1,537
	Zim1	↓ -1,517

Tabell 6. Tabellen viser hvilke gener hvis ekspresjon ble signifikant ($p < 0.05$) nedregulert. Verdiene viser hvor mange ganger denne reduksjon er hos behandlede prøver sammenliknet med kontrollene.

4 Diskusjon

4.1 Eksperimentell del:

Bioinformatikkanalyse er innviklet og kompleks. Ved mikromatisestudier er det vanskelig å tolke datasett fordi de genererer store mengder datatil analyse. Ved slike studier kan vi ved å bruke bioinformatikk skaffe oss ett innblikk i hvilke biologiske prosesser som for eks. kanoniske signalveier, molekylære og cellulære prosesser som påvirkes av gener med signifikante ekspresjonsendring etter MK-7 behandling gitt i forskjellige doser. Transkripsjonsfaktoranalyse viser hvilke regulatorer/transkripsjonsfaktorer som sannsynligvis regulerer gener som viste signifikant endret ekspresjon. Tolkning av effekten av MK-7 på transkripsjonsnivå er ganske innviklet.

Vi hadde som hensikt å observere effekten av de aktuelle dosene på umineralisert tannanlegg under utvikling. Hypotesen var at så høy konsentrasjon som 10mg og selv 2mg ikke nødvendigvis ville vise fysiologisk relevante resultater. En tidlig studie har undersøkt terskeldosen for apoptose (10uM) og nekrose (100uM) i pancreas-celler ved behandling med K3 (68). Så av de 3 konsentrasjonene vi undersøkte, er antagelig 0,2mg det mest interessante i forhold fysiologisk og biologisk virkning av MK-7 på tannanlegg i utvikling.

Etter administrering av 0,2mg, 2mg og 10mg dosene, så vi en rekke felles gener bli både opp- og nedregulert. Noen av disse genene (Pin1) er kjent for å påvirke celleprolifering\celleoverlevelse\cellemodning og regulering av osteoblaster, odontoblaster (68-71), og det kan tenkes at vi observerer den samme effekten i vårt forsøk. Ved P1 begynner odontoblaster å produsere dentin. I vårt datasett ser vi en forøkt ekspresjon av Minpp1 som er forbundet med mineralisering av bein (72). Dette genet kan også være med på dentindeponering og mineralisering av tannanlegg.

En overordnet oversikt over signalveier som er berørt av MK-7 behandling viser en signifikant ($P < 0.05$) og sentral rolle for K2-vitaminer i celleproliferasjon, cellemigrasjon, programmert celledød, vevsmodning og tumorsuppresjon (tabellene 1-4). I Tabell 4, ser vi gener som Pin1 som tidligere har vært assosiert til

cellemodnings og prolifereringsprosesser¹ (73, 74), *Dnaja1* som er tidligere koblet til motvirkning av ukontrollert celleproliferasjon av enkelte krefttyper i viscerale organer (75).

Transkripsjonsanalysen forsterker dette bildet. Transkripsjonsfaktorene *Ctgf*², *Tgfb1*³ regulerer gener involvert i celleproliferasjon og cellemigrasjon (76-79), *Nfkb1a* er involvert i programmert celledød (80), og *Hnf4a*, *Ctgf*, *ErbB2* inngår i vevsmodning og tumorsuppresjon (77). Disse funnene kan også tydelig observeres i tabellene 2 og 3.

Disse funnene er i overensstemmelse med velkjente kjemoterapeutiske effektene av K2-vitaminer på blant andre flere krefttyper (31-50), kontroll av celleproliferasjon (49, 71) og vevsmodning av tannanlegg (52). Disse studiene foreslår samtidig en meget viktig rolle for K2-vitaminer i programmert celledød spesielt på osteoclaster og under beinremodellering *in vitro* (81). Vårt *in vivo* eksperiment ser ut til å bekrefte en lignende effekt i umineralisert tannanlegg ved økt ekspresjon av gener direkte involvert i odontoblast-differensiering og dentin påleiring i tannanlegg (*Pin1*, *Minpp1* og *Amelx*).

Oppregulering av enkelte gener som *Pdzd2* har over lengre tid vært assosiert med suppresjon av neoplastisk vekst i prostata, og i vårt eksperiment kan vi observere en betraktelig og signifikant oppregulering av dette genet som følge av behandling med MK-7 (82). Innenfor det medisinske fagmiljøet er det kjent at prostatakreft er en sjelden kreftform i land som Japan der konsumet av menaquinoner i form av den vitamin K2-rike matvaren «natto» er svært høyt.

Her er det svært viktig å understreke at det er mange gener som er involvert i normal celledeling, proliferasjon, vevsmodning og vekst. Endret ekspresjonsnivå av disse genene under patologiske eller toksiske forhold kan gi opphav til kreft. Det er ikke så utenkelig at doser på 2mg/kg eller 10 mg/kg kan ha en neoplastisk, toksisk eller apoptosestimulerende effekt på celler i tannanlegget. Noe av dette blir gjenspeilet i oppregulering av en rekke gener som *Fam188b*, *Stk32b*. Siden overekspresjon av

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5300>

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1490>

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7040>

disse to genene er koblet til initiering og progresjon av kreft (83) (84), Bri3bp er også oppregulert i vårt datasett; et gen som er assosiert med legemiddelindusert celledød (85). Ing2 er nedregulert. Dette genet er forbundet med undertrykking av neoplastisk vekst (86) og overstimulering av gener som Dck med påfølgende cytotoxisk effekt⁴, og noe mindre kjente gener som Daam2.

MK-7, gitt i 10mg dosen, oppregulerer Csf1r som er vist å øke inflammasjon og rekruttering av monocytter. Vi kan også se oppregulering av Pin1 ved dosene 0.2mg og 2mg. Dette genet assosieres med odontogen differensiering av dentale pulpastamceller og osteoklastisk differensiering til henholdsvis odontoblaste og osteoclaste. Dette ser ut til å være i overensstemmelse med tidligere studier (69, 70, 73)

Resultatene av vårt eksperiment viser også oppregulering av en rekke gener med ukjent funksjon (Tmcc3, Nrp2)

4.2 Sammenligning av dosene:

Våre doser på 0,2 - 2mg viser betydelig aktivering nettverk som regulerer celleproliferasjon\apoptose, vevsdannelse, modning, vedlikehold og reparasjon som impliserer DNA transkripsjon (Se tabell 2 og 3). Dette kan også observeres i transkripsjonsreguleringen der faktorer som Ctgf (Se tabell 4) viser betydelig oppregulering som følge av vår behandling. Enkelte gener som Minpp1 og Pin1 (Se tabell 5) bekrefter denne vevsdannende (stort sett hardvev) og proliferative effekten.

Kanskje det viktigste funnet i vår studie i forhold til odontologi var effekten av behandling med MK-7 på ekspresjon av Amelx. Ved administrering av 0.2mg dosen kunne vi se en markant økning i ekspresjon av Amelx-genet som er av svært stor betydning for amelogenese og ikke minst dannelse og modning av PDL senere i tannutviklingen. Dette ser ut til å være i overensstemmelse med tidligere studier der man har påvist transkripsjon av genet, og translatert protein, før mineraliseringen har startet. Det kan tyde på at dette genet også har andre funksjoner under tidlig tannutvikling (87).

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1633>

Men det ble ikke påvist signifikante endringer i ekspresjon av gener som koder for dentinproteiner. Dette kan som tidligere nevnt skyldes en hemmende effekt av K2-vitaminer på NF- κ B signalveien (2, 3, 14). Denne signalveien er vist seg å styre dentindannelse. Men det kan skyldes at dentindeponeringen ikke har kommet i gang ved dette stadiet. Tannanlegget ble injisert ved P0 og dissekert ved P1. Hos denne typen mus begynner dentindeponeringen ved P2.

Videre forsøk er nødvendig for å bekrefte denne hemmende effekten av MK-7. Dette kan vise seg å være viktig terapeutisk og klinisk med tanke på en pre-eruptiv forbedring av emaljekvalitet og tetthet. Det kan også være av nytte i behandling av sykdommer som periodontitt der denne signalveien står sentralt i sykdomsinitiering og progresjon sett i sammenheng med resorpsjon av periodontalt bein. Dette er ikke usannsynlig, gitt at en slik terapeutisk effekt allerede er observert i ben ellers i kroppen. Poenget har vært utnyttet i medisin (administrering av MK-4) i Japan gjennom mange år ved behandling av osteoporose (88). Beinvev er et dynamisk vev som gjennom hele livet er under remodellering (nedbrytning og oppbygning). Dette er ikke tilfelle for tannemalje eller dentin ved friske forhold men det er mulig at en slik effekt i fremtiden vil kunne utnyttes under mineraliseringsprosessen.

Dosen 2mg påvirket ekspresjon av gener som deltar i viktige cellulære funksjoner som cellededdeling, cellyklus, proteinsyntese og proteindegradering (psmb8). Dette er trolig en doseeffekt, muligens toksisk gitt at dette er en middels høy dose.

Nettverks- og transkripsjonsanalyse på 10mg dosen viser for det meste samme effekter som 2mg dosen med unntak av cellyklus og proteinsyntese/degradering. Derimot er det en større oppregulering av gener involvert i utviklings sykdommer og kreft. Dette kan bekreftes ved økt ekspresjon av gener som Fam188b og Stk32b (se tabell 5). Denne dosen førte til en betydelig stimulert intercellulær signalering (Se tabell 1 og 2).

Behandling med forskjellige doser MK-7 førte til opp- eller nedregulering av en rekke gener. Resultatene fra dette arbeidet er noe usikre fordi det bare foreligger data fra

injeksjon ved P0. Det trengs oppfølging av flere utviklingsstadier for å få et bedre og sikrere bilde. Derneft er det også behov for en større utvalgsgruppe for hver dose, en optimalisering av protokoll for mikromatrisekjøring og ikke minst bekreftelse av disse ekspresjonsendringene for utvalgte gener ved hjelp av RT-PCR-teknikk.

Vår studie gir et grovt bilde av effekten MK-7 utøver på umineralisert tannanlegg i en in vivo dyremodell. Det foreligger imidlertid et stort behov for flere studier som utforsker og bekrefter en eventuell klinisk betydning for MK-7 i dentalt vev.

4.3 Litteraturstudie

Det er mange studier som bekrefter tilstedeværelse av en γ -karboxyleringsuavhengig effekt hos K2-vitaminer, en effekt som er langt viktigere og sterkere enn det K1-vitaminer er har vært kjent for. Ett av studiene på tannutvikling understøtter dette. I dette arbeidet, utført på musunger, ble ingen effekt påvist som følge av behandling med warfarin - en K-vitamin antagonist som hemmer γ -karboxyleringsavhengige reaksjoner - på mineralisering, mineraliseringsrate, morfologi eller det histologiske bildet i dentin (89).

Som omtalt tidligere, er TNF-alfa induert aktivering av NF- κ B signalveien en nødvendig forsvarsmekanisme under dype karieslesjoner. Og det kan tenkes at økte mengder av MK-7 vil motvirke denne forsvarsmekanismen. Flere studier, som nevnt innledningsvis, indikerer at MK-7 utøver sin effekt via hemming av NF- κ B-signalveien i bein. Det er slik MK-7 mistenkes for å hemme basal (aldersrelatert) eller patologisk beinresorpsjon; noe som for tiden ansees å være den viktigste og mest kjente effekten av K2-vitaminer på bein (14, 90). Dette skjer gjennom økt produksjon av I κ B som igjen hemmer transkripsjon av NF- κ B.

Dette kan være interessant gitt at RANKL-indusert beinresorpsjon via NF- κ B-aktivering, spiller en sentral rolle i beinremodelering, fysiologisk rotresorpsjon ved felling av melketenner og ikke minst ved kjeveortopedisk flytting av tenner og den medfølgende rotresorpsjonen ofte sett under slik behandling (91). Serum-RANKL og OPG har tidligere vært foreslått som en indikator på beinremodelleringsraten under kjeveortopedisk behandling (91). Utfra dette kan det tenkes at en økt MK-7 serumnivå kan forsinke og forlenge tiden som er nødvendig for fullføring av en

kjeveortopedisk behandling. Alternativt kan det tenkes at MK-7 kan redusere den uønskede rotresorpsjonen som oppstår under en slik behandling.

I faget periodontologi har en lenge sett på den viktige rollen NF-kB-signalveien har ved forøkt RANKL\OPG-ratio. Det er godt mulig at tilstedeværelse av K2-vitaminer har en sterk modifierende rolle i periodontale sykdommer som periodontitt. Dette spennende feltet krever nærmere undersøkelse. En mulig effekt av K2-vitaminer på periodontiet gjenstår å bli oppdaget.

Referanser:

1. Groenen-van Dooren MM, Soute BA, Jie KS, Thijssen HH, Vermeer C. The relative effects of phylloquinone and menaquinone-4 on the blood coagulation factor synthesis in vitamin K-deficient rats. *Biochemical pharmacology*. 1993;46(3):433-7.
2. Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S. Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(25):16927-34.
3. Ohsaki Y, Shirakawa H, Miura A, Giriwono PE, Sato S, Ohashi A, et al. Vitamin K suppresses the lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory cytokines in cultured macrophage-like cells via the inhibition of the activation of nuclear factor kappaB through the repression of IKKalpha/beta phosphorylation. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2010;21(11):1120-6.
4. Garber AK, Binkley NC, Krueger DC, Suttie JW. Comparison of phylloquinone bioavailability from food sources or a supplement in human subjects. *The Journal of nutrition*. 1999;129(6):1201-3.
5. Gijsbers BL, Jie KS, Vermeer C. Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers. *The British journal of nutrition*. 1996;76(2):223-9.
6. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. Vitamin K2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2000;15(3):515-21.
7. Adams J, Pepping J. Vitamin K in the treatment and prevention of osteoporosis and arterial calcification. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2005;62(15):1574-81.
8. Cockayne S, Adamson J, Lanham-New S, Shearer MJ, Gilbody S, Torgerson DJ. Vitamin K and the prevention of fractures: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med*. 2006;166(12):1256-61.
9. Sato Y, Honda Y, Kuno H, Oizumi K. Menatetrenone ameliorates osteopenia in disuse-affected limbs of vitamin D- and K-deficient stroke patients. *Bone*. 1998;23(3):291-6.
10. Kameda T, Miyazawa K, Mori Y, Yuasa T, Shiokawa M, Nakamaru Y, et al. Vitamin K2 inhibits osteoclastic bone resorption by inducing osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;220(3):515-9.
11. Akiyama Y, Hara K, Tajima T, Murota S, Morita I. Effect of vitamin K2 (menatetrenone) on osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cultures. *Eur J Pharmacol*. 1994;263(1-2):181-5.
12. Huang DW, Wan YM, Xie LQ, Ma YJ, Liang WB, Shi ZZ. [Effects of vitamin K on bone metabolism in tail-suspended rats]. *Space Med Med Eng (Beijing)*. 2001;14(5):346-9.
13. Yamaguchi M, Uchiyama S, Tsukamoto Y. Stimulatory effect of menaquinone-7 on bone formation in elderly female rat femoral tissues in vitro: prevention of bone deterioration with aging. *International journal of molecular medicine*. 2002;10(6):729-33.
14. Yamaguchi M, Weitzmann MN. Vitamin K2 stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by suppressing NF-kappaB activation. *International journal of molecular medicine*. 2011;27(1):3-14.
15. Koshihara Y, Hoshi K, Ishibashi H, Shiraki M. Vitamin K2 promotes 1alpha,25(OH)2 vitamin D3-induced mineralization in human periosteal osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. 1996;59(6):466-73.
16. Ohta K, Lupo G, Kuriyama S, Keynes R, Holt CE, Harris WA, et al. Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. *Developmental cell*. 2004;7(3):347-58.
17. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS one*. 2006;1:e79.
18. Li Y, Li A, Strait K, Zhang H, Nanes MS, Weitzmann MN. Endogenous TNFalpha lowers maximum peak bone mass and inhibits osteoblastic Smad activation through NF-kappaB. *Journal of*

bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2007;22(5):646-55.

19. Strait K, Li Y, Dillehay DL, Weitzmann MN. Suppression of NF-kappaB activation blocks osteoclastic bone resorption during estrogen deficiency. *International journal of molecular medicine*. 2008;21(4):521-5.
20. Xu X, Jeong L, Han J, Ito Y, Bringas P, Jr., Chai Y. Developmental expression of Smad1-7 suggests critical function of TGF-beta/BMP signaling in regulating epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. *The International journal of developmental biology*. 2003;47(1):31-9.
21. Ohazama A, Sharpe PT. TNF signalling in tooth development. *Current opinion in genetics & development*. 2004;14(5):513-9.
22. Paula-Silva FW, Ghosh A, Silva LA, Kapila YL. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *Journal of dental research*. 2009;88(4):339-44.
23. Uchiyama S, Yamaguchi M. Anabolic effect of beta-cryptoxanthin in osteoblastic MC3T3-E1 cells is enhanced with 17beta-estradiol, genistein, or zinc sulfate in vitro: the unique effect with zinc on Runx2 and alpha1(I) collagen mRNA expressions. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008;307(1-2):209-19.
24. Koshihara Y, Hoshi K, Okawara R, Ishibashi H, Yamamoto S. Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. *The Journal of endocrinology*. 2003;176(3):339-48.
25. Beulens JW, Bots ML, Atsma F, Bartelink ML, Prokop M, Geleijnse JM, et al. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification. *Atherosclerosis*. 2009;203(2):489-93.
26. Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, Schurgers LJ, Knapen MH, van der Meer IM, et al. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *The Journal of nutrition*. 2004;134(11):3100-5.
27. Schurgers LJ, Spronk HM, Soute BA, Schiffers PM, DeMey JG, Vermeer C. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood*. 2007;109(7):2823-31.
28. Gast GC, de Roos NM, Sluijs I, Bots ML, Beulens JW, Geleijnse JM, et al. A high menaquinone intake reduces the incidence of coronary heart disease. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2009;19(7):504-10.
29. Li J, Lin JC, Wang H, Peterson JW, Furie BC, Furie B, et al. Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J Neurosci*. 2003;23(13):5816-26.
30. Verrax J, Taper H, Buc Calderon P. Targeting cancer cells by an oxidant-based therapy. *Curr Mol Pharmacol*. 2008;1(1):80-92.
31. Ohizumi H, Masuda Y, Nakajo S, Sakai I, Ohsawa S, Nakaya K. Geranylgeraniol is a potent inducer of apoptosis in tumor cells. *J Biochem*. 1995;117(1):11-3.
32. Habu D, Shiomi S, Tamori A, Takeda T, Tanaka T, Kubo S, et al. Role of vitamin K2 in the development of hepatocellular carcinoma in women with viral cirrhosis of the liver. *JAMA*. 2004;292(3):358-61.
33. Yamamoto T, Nakamura H, Liu W, Cao K, Yoshikawa S, Enomoto H, et al. Involvement of hepatoma-derived growth factor in the growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells by vitamin K(2). *J Gastroenterol*. 2009;44(3):228-35.
34. Nishikawa Y, Wang Z, Kerns J, Wilcox CS, Carr BI. Inhibition of hepatoma cell growth in vitro by arylating and non-aryating K vitamin analogs. Significance of protein tyrosine phosphatase inhibition. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(49):34803-10.
35. Otsuka M, Kato N, Shao RX, Hoshida Y, Ijichi H, Koike Y, et al. Vitamin K2 inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. *Hepatology*. 2004;40(1):243-51.

36. Kuriyama S, Hitomi M, Yoshiji H, Nonomura T, Tsujimoto T, Mitoro A, et al. Vitamins K2, K3 and K5 exert in vivo antitumor effects on hepatocellular carcinoma by regulating the expression of G1 phase-related cell cycle molecules. *Int J Oncol.* 2005;27(2):505-11.
37. Matsumoto K, Okano J, Nagahara T, Murawaki Y. Apoptosis of liver cancer cells by vitamin K2 and enhancement by MEK inhibition. *Int J Oncol.* 2006;29(6):1501-8.
38. Kim HJ, Mun JY, Chun YJ, Choi KH, Ham SW, Kim MY. Effects of a naphthoquinone analog on tumor growth and apoptosis induction. *Arch Pharm Res.* 2003;26(5):405-10.
39. Sakai I, Hashimoto S, Yoda M, Hida T, Ohsawa S, Nakajo S, et al. Novel role of vitamin K2: a potent inducer of differentiation of various human myeloid leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205(2):1305-10.
40. Sun L, Yoshii Y, Miyagi K, Ishida A. [Proliferation inhibition of glioma cells by vitamin K2]. *No Shinkei Geka.* 1999;27(2):119-25.
41. Tokita H, Tsuchida A, Miyazawa K, Ohyashiki K, Katayanagi S, Sudo H, et al. Vitamin K2-induced antitumor effects via cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer cell lines. *International journal of molecular medicine.* 2006;17(2):235-43.
42. Ogawa M, Nakai S, Deguchi A, Nonomura T, Masaki T, Uchida N, et al. Vitamins K2, K3 and K5 exert antitumor effects on established colorectal cancer in mice by inducing apoptotic death of tumor cells. *Int J Oncol.* 2007;31(2):323-31.
43. Yoshida T, Miyazawa K, Kasuga I, Yokoyama T, Minemura K, Ustumi K, et al. Apoptosis induction of vitamin K2 in lung carcinoma cell lines: the possibility of vitamin K2 therapy for lung cancer. *Int J Oncol.* 2003;23(3):627-32.
44. Yokoyama T, Miyazawa K, Yoshida T, Ohyashiki K. Combination of vitamin K2 plus imatinib mesylate enhances induction of apoptosis in small cell lung cancer cell lines. *Int J Oncol.* 2005;26(1):33-40.
45. Kassouf W, Highshaw R, Nelkin GM, Dinney CP, Kamat AM. Vitamins C and K3 sensitize human urothelial tumors to gemcitabine. *J Urol.* 2006;176(4 Pt 1):1642-7.
46. Scott GK, Atsriku C, Kaminker P, Held J, Gibson B, Baldwin MA, et al. Vitamin K3 (menadione)-induced oncosis associated with keratin 8 phosphorylation and histone H3 arylation. *Mol Pharmacol.* 2005;68(3):606-15.
47. Yokoyama T, Miyazawa K, Naito M, Toyotake J, Tauchi T, Itoh M, et al. Vitamin K2 induces autophagy and apoptosis simultaneously in leukemia cells. *Autophagy.* 2008;4(5):629-40.
48. Gilloteaux J, Jamison JM, Arnold D, Jarjoura D, Von Greuningen V, Summers JL. Autoschizis of human ovarian carcinoma cells: scanning electron and light microscopy of a new cell death induced by sodium ascorbate: menadione treatment. *Scanning.* 2003;25(3):137-49.
49. Matsubara K, Kayashima T, Mori M, Yoshida H, Mizushima Y. Inhibitory effects of vitamin K3 on DNA polymerase and angiogenesis. *International journal of molecular medicine.* 2008;22(3):381-7.
50. Tetef M, Margolin K, Ahn C, Akman S, Chow W, Leong L, et al. Mitomycin C and menadione for the treatment of lung cancer: a phase II trial. *Invest New Drugs.* 1995;13(2):157-62.
51. Acharya BR, Choudhury D, Das A, Chakrabarti G. Vitamin K3 disrupts the microtubule networks by binding to tubulin: a novel mechanism of its antiproliferative activity. *Biochemistry.* 2009;48(29):6963-74.
52. Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, et al. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone.* 2002;30(2):377-85.
53. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *Journal of dental research.* 2001;80(6):1545-9.
54. Moon PC, Weaver J, Brooks CN. Review of matrix metalloproteinases' effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. *Open Dent J.* 2010;4:147-52.

55. Sorsa T, Ding YL, Ingman T, Salo T, Westerlund U, Haapasalo M, et al. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *J Clin Periodontol.* 1995;22(9):709-17.
56. Tjaderhane L, Salo T, Larjava H, Larmas M, Overall CM. A novel organ culture method to study the function of human odontoblasts in vitro: gelatinase expression by odontoblasts is differentially regulated by TGF-beta1. *Journal of dental research.* 1998;77(7):1486-96.
57. Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Ronka H, Sorsa T, Salo T, et al. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. *Journal of dental research.* 2000;79(1):77-84.
58. Palosaari H, Ding Y, Larmas M, Sorsa T, Bartlett JD, Salo T, et al. Regulation and interactions of MT1-MMP and MMP-20 in human odontoblasts and pulp tissue in vitro. *Journal of dental research.* 2002;81(5):354-9.
59. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjaderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(2):117-27.
60. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *Journal of dental research.* 1998;77(8):1622-9.
61. Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J.* 2002;35(11):897-904.
62. Wahlgren J, Maisi P, Sorsa T, Sutinen M, Tervahartiala T, Pirila E, et al. Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *J Pathol.* 2001;194(2):217-24.
63. Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004;10(6):311-8.
64. Ide Y, Zhang H, Hamajima H, Kawaguchi Y, Eguchi Y, Mizuta T, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase expression by menatetrenone, a vitamin K2 analogue. *Oncol Rep.* 2009;22(3):599-604.
65. Arabaci T, Cicek Y, Canakci V, Canakci CF, Ozgoz M, Albayrak M, et al. Immunohistochemical and Stereologic Analysis of NF-kappaB Activation in Chronic Periodontitis. *Eur J Dent.* 2010;4(4):454-61.
66. Shimizu H, Nakagami H, Morita S, Tsukamoto I, Osako MK, Nakagami F, et al. New treatment of periodontal diseases by using NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides via prevention of bone resorption and promotion of wound healing. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(9):2065-75.
67. Nichols TC, Fischer TH, Deliarhyris EN, Baldwin AS, Jr. Role of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Ann Periodontol.* 2001;6(1):20-9.
68. Sata N, Klonowski-Stumpe H, Han B, Haussinger D, Niederau C. Menadione induces both necrosis and apoptosis in rat pancreatic acinar AR4-2J cells. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(6):844-50.
69. Lee YM, Shin SY, Jue SS, Kwon IK, Cho EH, Cho ES, et al. The role of PIN1 on odontogenic and adipogenic differentiation in human dental pulp stem cells. *Stem cells and development.* 2014;23(6):618-30.
70. Cho YA, Jue SS, Bae WJ, Heo SH, Shin SI, Kwon IK, et al. PIN1 inhibition suppresses osteoclast differentiation and inflammatory responses. *Journal of dental research.* 2015;94(2):371-80.
71. Akedo Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Mizuno Y, Kaneki M, et al. Vitamin K2 modulates proliferation and function of osteoblastic cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;187(2):814-20.
72. Caffrey JJ, Hidaka K, Matsuda M, Hirata M, Shears SB. The human and rat forms of multiple inositol polyphosphate phosphatase: functional homology with a histidine acid phosphatase up-regulated during endochondral ossification. *FEBS letters.* 1999;442(1):99-104.
73. Esnault S, Braun RK, Shen ZJ, Xiang Z, Heninger E, Love RB, et al. Pin1 modulates the type 1 immune response. *PloS one.* 2007;2(2):e226.

74. Uchida T, Takamiya M, Takahashi M, Miyashita H, Ikeda H, Terada T, et al. Pin1 and Par14 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cell proliferation. *Chem Biol.* 2003;10(1):15-24.
75. Stark JL, Mehla K, Chaika N, Acton TB, Xiao R, Singh PK, et al. Structure and function of human DnaJ homologue subfamily a member 1 (DNAJA1) and its relationship to pancreatic cancer. *Biochemistry.* 2014;53(8):1360-72.
76. Grotendorst GR, Duncan MR. Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J.* 2005;19(7):729-38.
77. Chien W, Yin D, Gui D, Mori A, Frank JM, Said J, et al. Suppression of cell proliferation and signaling transduction by connective tissue growth factor in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2006;4(8):591-8.
78. Riley KG, Pasek RC, Maulis MF, Dunn JC, Bolus WR, Kendall PL, et al. Macrophages are essential for CTGF-mediated adult beta-cell proliferation after injury. *Mol Metab.* 2015;4(8):584-91.
79. Tan W, Cheng Z, Tan Q, Wang T, Lian M, Zhang L. [Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating expression of calpain]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2015;38(3):202-5.
80. Pazarentzos E, Mahul-Mellier AL, Datler C, Chaisaklert W, Hwang MS, Kroon J, et al. IkkappaBetaalpha inhibits apoptosis at the outer mitochondrial membrane independently of NF-kappaB retention. *EMBO J.* 2014;33(23):2814-28.
81. Urayama S, Kawakami A, Nakashima T, Tsuboi M, Yamasaki S, Hida A, et al. Effect of vitamin K2 on osteoblast apoptosis: vitamin K2 inhibits apoptotic cell death of human osteoblasts induced by Fas, proteasome inhibitor, etoposide, and staurosporine. *J Lab Clin Med.* 2000;136(3):181-93.
82. Tam CW, Cheng AS, Ma RY, Yao KM, Shiu SY. Inhibition of prostate cancer cell growth by human secreted PDZ domain-containing protein 2, a potential autocrine prostate tumor suppressor. *Endocrinology.* 2006;147(11):5023-33.
83. Yasui T, Okada A, Urabe Y, Usami M, Mizuno K, Kubota Y, et al. A replication study for three nephrolithiasis loci at 5q35.3, 7p14.3 and 13q14.1 in the Japanese population. *Journal of human genetics.* 2013;58(9):588-93.
84. Parris TZ, Aziz L, Kovacs A, Hajizadeh S, Nemes S, Semaan M, et al. Clinical relevance of breast cancer-related genes as potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma. *BMC cancer.* 2014;14:324.
85. Yamazaki T, Sasaki N, Nishi M, Yamazaki D, Ikeda A, Okuno Y, et al. Augmentation of drug-induced cell death by ER protein BRI3BP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362(4):971-5.
86. Borkosky SS, Gunduz M, Beder L, Tsujigiwa H, Tamamura R, Gunduz E, et al. Allelic loss of the ING gene family loci is a frequent event in ameloblastoma. *Oncology research.* 2010;18(10):509-18.
87. Landin MA, Shabestari M, Babaie E, Reseland JE, Osmundsen H. Gene Expression Profiling during Murine Tooth Development. *Front Genet.* 2012;3:139.
88. Ishida Y. [Vitamin K2]. *Clin Calcium.* 2008;18(10):1476-82.
89. Gorter de Vries I, Wisse E, Williamson MK, Price PA. Effect of warfarin on early rat tooth development. *Calcif Tissue Int.* 1991;49(5):355-8.
90. Eliseev RA, Schwarz EM, Zuscik MJ, O'Keefe RJ, Drissi H, Rosier RN. Smad7 mediates inhibition of Saos2 osteosarcoma cell differentiation by NFkappaB. *Experimental cell research.* 2006;312(1):40-50.
91. Tyrovola JB, Spyropoulos MN, Makou M, Perrea D. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *Journal of oral science.* 2008;50(4):367-76.