

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Věra Pešánová

Zubní kmenové buňky během vývoje dentic obratlovců

Dental stem cells during development of vertebrate dentitions

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vladimír Soukup, Ph. D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.8.2018

Podpis

Poděkování

Děkuji svému školiteli, Mgr. Vladimíru Soukupovi, Ph.D., za jeho vstřícnost, užitečné rady a za všechnen čas, který mi věnoval během psaní této práce. Dále děkuji své mamince za její trpělivost, podporu a vše co pro mne dělá. Také děkuji lidem z mého nejbližšího okolí za to, že mi jsou oporou a zdrojem klidu a pohody.

Abstrakt

Dentice obratlovců je dynamickou strukturou, u které dochází k neustálému obnovování jejích elementů, zubů. Neustálou obnovu zubů umožňují zubní kmenové buňky epitelu a mezenchymu. Epitelové kmenové buňky se nachází v dentální lamině, která se, spolu s přilehlým mezenchymem, podílí na jejich regulaci skrze složitou síť signálních drah. Ta zajišťuje umístění, správný počet, inaktivitu, proliferaci a diferenciaci kmenových buněk. Dentice obratlovců jsou morfologicky různorodé, do značné míry je však jejich vývoj řízen sdílenými evolučně zachovalými molekulárními mechanismy. Epitelové zubní kmenové buňky všech zkoumaných skupin obratlovců například exprimují transkripční faktor *Sox2* a na jejich regulaci se podílí signální dráhy jako je *Wnt/β-catenin*, *Shh*, *Fgf* a *Bmp*. Vzhledem k bohaté diverzitě morfologie dentálních lamin jsou i lokace předpokládaných kmenových buněk odlišné mezi obratlovci. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o zubních kmenových buňkách jednotlivých původů k určení sdílených a odvozených znaků dentic obratlovců.

Klíčová slova: kmenové buňky, dentální lamina, vývoj zubu, dentice, obratlovci, evoluce

Abstract

Vertebrate dentition is a dynamic structure, which continuously renews its elements, the teeth. Continuous tooth renewal is enabled thanks to the presence of epithelial and mesenchymal dental stem cells. Epithelial stem cells are located in the dental lamina, which, together with the adjacent mesenchyme, takes part in regulation of the stem cells through a complicated signalling network. This network is responsible for the positioning, correct amount, inactivity, proliferation and differentiation of the stem cells. Vertebrate dentitions are morphologically diverse. However, their development is, to a certain extent, controlled by shared evolutionarily conserved molecular mechanisms. For example, epithelial stem cells of all vertebrate groups examined so far express the transcription factor *Sox2* and are shown to be regulated by signalling pathways, such as *Wnt/β-catenin*, *Shh*, *Fgf* and *Bmp*. Due to the rich diversity in dental lamina morphologies, the locations of presumptive stem cells correspondingly differ among vertebrates. This thesis summarizes current knowledge on dental stem cells in each lineage to identify shared and derived aspects of vertebrate dentitions.

Key words: stem cells, dental lamina, tooth development, dentition, vertebrates, evolution

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Vývoj zubu a kmenové buňky.....	1
2.1	Vývoj dentální laminy a zubu.....	1
2.2	Zubní kmenové buňky.....	3
3	Dentice a zubní kmenové buňky obratlovců.....	4
3.1	Savci.....	4
3.2	Plazi.....	9
3.3	Obojživelníci.....	14
3.4	Kostnaté ryby.....	14
3.5	Paryby.....	20
4	Závěr.....	22
5	Zdroje.....	24

1 Úvod

Kmenové buňky jsou důležité pro tvorbu nových struktur a jejich obnovu. Byly nalezeny například ve střevě, kůži nebo vlasovém folikulu (Leedham et al., 2005; Fuchs a Segre, 2000; Li a Clevers, 2010). Kmenové buňky jsou udržovány v nediferenciovaném stavu, dělením z nich vzniká dceřiná kmenová buňka, která zůstává v klidu, a buňka která se dále dělí a diferencuje (Fuchs a Segre, 2000). Výzkum v posledních letech se kromě jiných orgánů zaměřuje také na identifikaci kmenových buněk, ze kterých vzniká zub. Schopnost regenerovat zuby po celý život dělá z mnoha skupin obratlovců skvělé kandidáty pro výzkum kmenových buněk. Zuby jsou tvořeny epitelem a mezenchymem (Peters a Balling, 1999). Za sídlo zubních kmenových buněk epitelu je považována invaginace orálního epitelu do mezenchymu, tzv. dentální lamina (Smith et al., 2009). Na distálním konci dentální laminy vznikají zubní zárodky, které se dále vyvíjejí a jako plně vyvinutý funkční zub prorazí orální epitel (Handrigan et al., 2010; Wistuba et al., 2002). Nejlépe prozkoumaným modelovým organismem z pohledu identifikace a regulace zubních kmenových buněk je myš. Jako první zubní epitelové kmenové buňky byly identifikovány buňky v krčkové kličce řezáků (Harada et al., 1999). Mezenchymální kmenové buňky jsou oproti tomu méně prozkoumané, u myši bylo ale ukázáno, že se nachází v mezenchymu přilehlému ke krčkové kličce a že pochází z buněk neurální lišty (Kaukua et al., 2014).

Cílem práce je shrnout dosavadní poznatky o dospělých zubních kmenových buňkách a jejich regulaci u různých skupin obratlovců. Zabývá se morfologickými rozdíly dentice a dentální laminy a jak tyto rozdíly ovlivňují lokaci kmenových buněk, a dále osudem a rolí kmenových buněk ve vývoji zubu. Také probírá molekulární faktory, které se na regulaci kmenových buněk podílí a umožňují tak celoživotní regeneraci zubů.

2 Vývoj zubu a kmenové buňky

2.1 Vývoj dentální laminy a zubu

Zuby obratlovců vznikají na pomezí epitelu a mezenchymu (Peters a Balling, 1999), v místech s odontogenetickým potenciálem. Povrchový orální epitel s takovou vlastností se nazývá odontogenetickým pruhem (odontogenic band) a pro jeho identifikaci se využívá

například exprese genů *Pitx2* (Paired-like homeodomain 2) a *Shh* (Sonic hedgehog) (Fraser et al., 2008). U plazů může tvořit kontinuální pruh (Handrigan a Richman, 2010a), u myši je ale například rozdělen na několik oblastí (Peterková et al., 1995). Tato vrstva epitelu ztloustne v místě budoucího zubu (utvoří se zubní plakoda) a následně dojde k invaginaci epitelu do mezenchymu (Peterková et al., 1995). Takto zanořený epitel se označuje jako dentální lamina, nebo také zubní lišta (Smith et al., 2009). Na jejím distálním konci se následně utvoří zubní zárodek, který se postupně během vývoje posouvá po délce dentální laminy a jako plně vyvinutý zub prorazí orální epitel a stane se funkčním. V případě polyfyodontní dentice, kdy se náhradní zuby utváří po celý život, se distální konec laminy nazývá sukcesní lamina, má odlišné vlastnosti oproti zbytku dentální laminy a zubní zárodky zde vznikají i po erupci prvního zubu. Taková dentální lamina je permanentní a nezaniká (Handrigan et al., 2010; Vandenplas et al., 2016a). Dentální lamina může být také dočasná a zanikat po utvoření zubu a poté pro každý náhradní zub vznikat znovu (Huysseune, 2006). V případě monofyodontní dentice, u které dochází k vývoji pouze jedné generace zubů, dentální lamina zanikne (Dosedřlová et al., 2015). Stejně tak v případě difyodontní dentice po dokončení vývoje druhé generace zubů (Moskow a Bloom, 1983; Buchtová et al., 2012). Při degradaci laminy dochází k transformaci a migraci buněk a u menšího počtu i k apoptóze (Buchtová et al., 2012; Dosedřlová et al., 2015).

Základní model vývoje zubu u savců podle Lucketta (1993) rozlišuje několik stádií vývoje. Zub se zakládá v rámci odontogenního pruhu v místě, kde dochází ke ztlouštění orálního epitelu. Stádium zubního pupenu je jasně viditelné vchlípení buněk do mezenchymu. Uprostřed pupenu se zhušťují buňky, které v dalším stádiu utvoří sklovinový uzel (enamel knot), který určuje vrchol korunky. Distální konec zárodku se v pozdější fázi pupenu zplošťuje a v následujícím stádiu zubního pohárku invaginuje do mezenchymu a vzniká mezenchymální dentální papila a folikul. Epitel tvoří dentální orgán (známý také jako sklovinový orgán), který má více vrstev. Tvoří je vnitřní a vnější dentální epitel (známý také jako vnitřní a vnější sklovinový epitel), mezi nimi se začíná tvořit volně uspořádaná vrstva buněk označovaná jako hvězdicovité retikulum (stellate reticulum). Hvězdicovité retikulum dále odděluje čtvrtý typ buněk, tzv. stratum intermedium, typické pouze pro savce. Ve stádiu zvonce se zub dále zvětšuje, v mezenchymu dochází k diferenciaci buněk zubní dřeně odontoblastů vylučujících dentin. Z vnitřního dentálního epitelu se diferencují ameloblasty, které vytváří vrstvu skloviny. Následuje tvorba kořene zubu a erupce na povrch a tím vznik funkčního zubu. U různých skupin obratlovců mohou být ve vývoji zubu odlišnosti, například u zubů, které netvoří kořen zubu, ale přichytávají se v pozdější fázi vývoje ke kosti pomocí

podstavce (pedikulu) (Wistuba et al., 2002). Dále může chybět stratum intermedium (Handrigan et al., 2010). Místo vrstvy skloviny může také vznikat vrstva enameloidu, která se svým složením od skloviny liší (Fosse et al., 1974). Hlavní aspekty vývoje zubu ale zůstávají stejné.

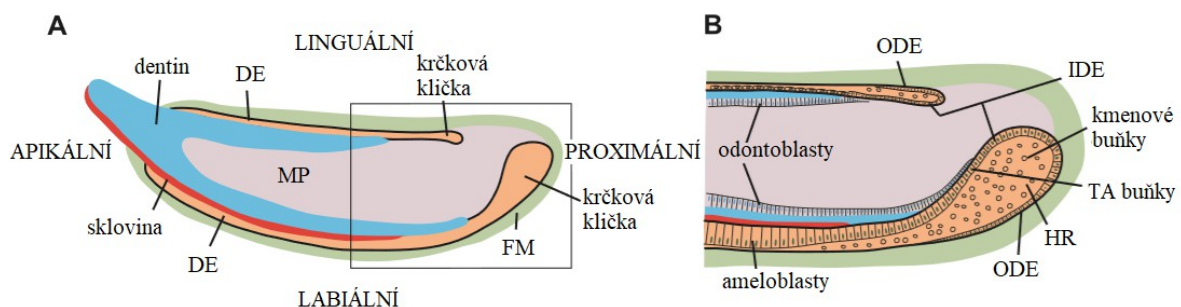
2.2 Zubní kmenové buňky

Dentice schopné regenerace jsou často zkoumány pro objasnění toho, jak se na tvorbě zubů podílí kmenové buňky, jaká je jejich lokace a co je udržuje v klidovém nediferenciovaném stavu, nebo naopak co podporuje jejich proliferaci. Dospělé kmenové buňky jsou multipotentní, jsou definovány jako buňky schopné dát vznik dceřiným kmenovým buňkám a přechodně vysoce proliferujícím buňkám (transit amplifying cells, dále TA buňky) (Fuchs a Segre, 2000). TA buňky jsou multipotentní, počet jejich dělení je omezen a nakonec terminálně diferencují (Potten et al., 1979). Přesnou identifikaci kmenových buněk ztěžuje jejich nediferenciovaný stav a také to, že většina genů exprimovaných v zubních kmenových buňkách je exprimována také u dceřiných TA buněk (Fuchs a Raghavan, 2002; Thiery et al., 2017). Jako marker zubních kmenových buněk epitelu se používá například transkripční faktor *Sox2* (sex determining region Y- box 2) (Juuri et al., 2013) nebo *Lgr5* (Soumalainen a Thesleff, 2010). Pro identifikaci mezenchymálních zubních kmenových buněk se používá například exprese *Glil* (Zhao et al., 2014; Ishikawa et al., 2017). Pro odlišení pomalu cyklujících kmenových buněk od proliferujících TA buněk se používá různé značení. BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridin) se inkorporuje do nově syntetizované DNA buňky. Toto značení se s každým dělením buňky zeslabuje, po dostatečně dlouhé době po aplikaci tak zůstanou pouze některé buňky označené (label retaining cells, dále LRCs). Zatímco z proliferujících buněk BrdU signál vymizí, v pomalu cyklujících kmenových buňkách a případně i v terminálně diferenciovaných buňkách signál zůstává. Dále DiI barvení se používá pro sledování osudu buněk a PCNA (proliferating cell nuclear antigen) pro určení proliferujících buněk. Kombinací těchto technik lze tak snadno zjistit přítomnost a lokalizaci kmenových buněk i to, zda kmenové buňky přispívají k tvorbě nových struktur. Na regulaci kmenových buněk se podílí složitá síť signálních drah, která je pro zuby podrobněji popsána v následující kapitole.

3 Dentice a zubní kmenové buňky obratlovců

3.1 Savci

Savci, na rozdíl od většiny ostatních skupin obratlovců, netvoří nové zuby po celý život a je pro ně typický difyodontní chrup, což znamená, že mají pouze dvě generace funkčních zubů. U několika skupin savců také existuje pouze jedna generace funkčních zubů a taková dentice je označována jako monofyodontní. Přestože absence schopnosti vytvářet nové zuby z nich nedělá ideální kandidáty pro výzkum zubních kmenových buněk, existují druhy, jejichž zuby se obrušují a dorůstají po celý život. Takové zuby se nazývají hypselodontními a najdeme je například u hlodavců a zajíců. Mnoho výzkumů tak bylo učiněno na myších a potkanech, u kterých řezáky neustále dorůstají.



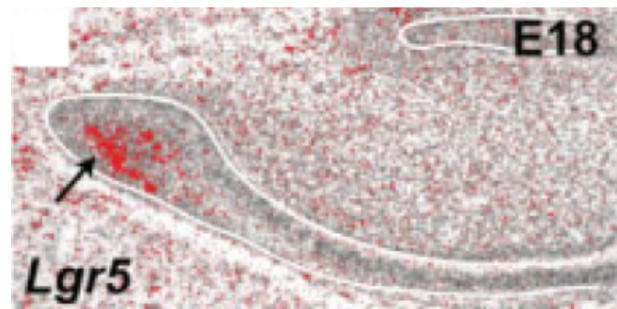
Obr. 1. Schéma řezáku myši (A) Celý řezák, růst probíhá směrem k apikálnímu konci. Na proximálním konci se nacházejí krčkové kličky. (B) Přiblížení označené části předchozího schématu, lze vidět vrstvy epitelu. Červená - sklovina, modrá - dentin, oranžová - epitel, šedá - mezenchym papily, zelená - folikulární mezenchym. DE - dentální epitel, FM - folikulární mezenchym, HR - hvězdicovité retikulum, IDE - vnitřní dentální epitel (inner), MP - mezenchym papily, ODE - vnější dentální epitel (outer). Upraveno podle Wang et al. (2007).

Zubní oblouk myši domácí (*Mus musculus*) a potkana (*Rattus norvegicus*) má na levé i pravé straně jeden řezák, kterému neustále dorůstá vysoká korunka a chybí mu kořen. Za řezákem následuje diastema bez zubů a za ní tři stoličky, které nedorůstají a ani nejsou nijak nahrazovány, za to ale vznikají anterio-posteriorně sériovou adicí (Juuri et al., 2013). U řezáků proliferace a diferenciace buněk v ameloblasty probíhá pouze na labiální straně, sklovina se tak tvoří pouze na jedné straně zubu (Harada et al., 1999). Na distálním konci zubu se nachází tzv. krčkové kličky (cervical loop), což je v případě labiální strany větší vyboulená struktura, tvořena z bazálního epitelu. Ten je obklopen hvězdicovitým retikulem

(stellate reticulum), uskupením buněk, které je považováno za místo, kde se nacházejí epitelové zubní kmenové buňky (Obr. 1). To je podpořeno například nálezy pomalu se dělících buněk a expresí markeru kmenových buněk, genu *Lgr5* (Obr. 2) (Smith a Warshawsky, 1975; Harada et al., 1999; Harada et al., 2002; Soumalainen a Thesleff, 2010). Krčková klička na linguální straně je oproti tomu menší, méně proliferuje a má jen málo kmenových buněk (Harada et al., 1999; Soumalainen a Thesleff, 2010).

Na objasnění vztahů mezenchymální a epitelové signalizace a genové exprese hrající roli v udržování epitelových kmenových buněk na labiální straně se podíleli například

Harada et al. (1999). Bylo zjištěno, že *Fgf10* (fibroblast growth factor 10) exprimovaný v mezenchymu okolo labiální krčkové kličky komunikuje s epitelem pomocí Notch signalizace a hraje zásadní roli při utváření krčkové kličky, protože vyřazením (knock-out) tohoto genu z funkce se klička neutvoří správně (Harada et al., 1999). Exprese *Fgf10* se následně



Obr. 2. Exprese *Lgr5* v krčkové kličce v 18. dni embryonálního vývoje myši. Apikální strana vpravo. Upraveno podle Soumalainen a Thesleff (2010).

podílí i na zajištění správného množství kmenových buněk zde přítomných, a to díky své schopnosti bránit apoptóze (Yang et al., 2015). Při delecii mezenchymového *Alk5* (Activin-like kinase 5), receptoru TGF- β (transforming growth factor β) signalizace, dojde ke zmenšení krčkové kličky a zastavení růstu řezáků (Zhao et al., 2011). Tyto důsledky se dají zvrátit přidáním exogenního *Fgf10*, z čehož vyplývá, že TGF- β signalizace řídí expresi *Fgf10*, reguluje interakci mezenchymu s epitelem, a tím udržuje přítomnost a správnou početnost kmenových buněk (Zhao et al., 2011).

Proliferaci epitelových kmenových buněk naopak řídí mezenchymální exprese *Fgf3*, kterou negativně reguluje *Bmp4* (bone morphogenetic protein 4) a pozitivně reguluje Activin β A (protein z rodiny TGF- β) inhibicí efektu *Bmp4*. Právě tyto faktory hrají roli v omezení exprese *Fgf3* na labiální stranu řezáku (Wang et al., 2007). Transkripční faktor *Runx2*, exprimovaný v mezenchymu, taktéž podporuje expresi *Fgf3* a pomáhá zubnímu pupenu přejít do stádia zubního pohárku (Åberg et al., 2004). *Bmp4* je důležitý nejen pro inhibici proliferace buněk, ale i pro diferenciaci ameloblastů. Při navýšení exprese *Nogginu*, inhibitoru *Bmp4*, se objevil nadměrný růst řezáků, kterým chyběla sklovina (Plikus et al. 2005). Proti Activinu β A pracuje v epitelu protein *Follistatin*, který snižuje proliferaci buněk na linguální straně. U myši, kde byl proveden knock-out *Follistatinu*, se tvoří sklovina nejen

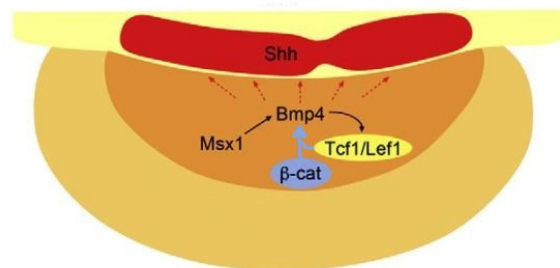
na labiální, ale i na linguální straně řezáku. Naopak při navýšení exprese se sklovina netvoří vůbec. Follistatin totiž pracuje i proti diferenciaci ameloblastů, způsobenou aktivitou *Bmp4* z přiléhajících odontoblastů (Wang et al., 2007). Vnitrobuněčné antagonisty Fgf signalizace kódují geny z rodiny sprouty (*Spry*) (Mason et al., 2006). Při dvojitém knock-outu *Spry4* a *Spry2*, se zrychlí růst řezáků, s ameloblasty diferenciovanými a tvořícími sklovinu po obou stranách zubu, podobně jako u knock-outu *Follistatinu* (Klein et al., 2008). Při porovnání transgenních myší bez *Spry2/Spry4* a bez *Follistatinu* vychází z výsledků najevo, že ne všechny ameloblasty jsou diferenciovány za stejných okolností. První embryonální ameloblasty vznikají z embryonálních ameloblastových progenitorů, které potřebují *Bmp4* pro svou diferenciaci, mohou vzniknout nezávisle na Fgf signalizaci a jsou inhibovány na linguální straně Follistatinem a nikoliv pomocí Sprouty. Pozdější ameloblasty pak vznikají z kmenových buněk krčkové kličky, které k tomu potřebují vyšší hladinu Fgf signalizace a inhibuje je jak Sprouty, tak Follistatin (Klein et al., 2008).

Dále, Hedgehog (Hh) signalizace pozitivně reguluje diferenciaci zubních kmenových buněk v ameloblasty a odontoblasty. Pre-ameloblasty exprimují *Shh*, a podávají tak zpětnou vazbu pro regulaci kmenových buněk (Seidel et al., 2010). Bylo ukázáno, že mezenchymální exprese *Bmp4* je důležitá pro udržování exprese *Shh* v epitelu (Fujimori et al., 2010). Na regulaci diferenciaci kmenových buněk v ameloblasty se tedy mimo jiné podílí síť Fgf, *Bmp4*, *Shh* a Activin β A signalizace, přičemž exprese *Follistatinu* a sprouty genů zcela potlačuje jejich diferenciaci na linguální straně (Wang et al., 2004; Klein et al., 2008).

Do této sítě se také zapojuje kanonická Wnt/ β -catenin signální dráha, která hraje důležitou roli napříč vývojem zubu (Liu et al., 2008). U stoliček způsobuje uměle navýšená aktivita β -catenin v epitelu zakládání nových nadpočetných zubů jednoduchého kuželovitého tvaru, které by se za normálních okolností neutvořily (Järvinen et al., 2006; Liu et al., 2008). Naopak, při inhibici Wnt/ β -catenin dráhy v epitelu pomocí *Dkk1* po založení zubu se jeho vývoj zastaví na začátku, ve fázi zubního pupenu (Liu et al., 2008), stejně jako při nedostatečné expresi *Pitx2* (Lin et al., 1999), která je také pozitivně regulována právě Wnt dráhou (Yuan et al. 2015). V místě tvorby těchto nadpočetných zubů byl tedy detekován β -catenin v epitelu, kdežto v mezenchymu chyběl (Järvinen et al., 2018). Pokud se aktivita Wnt/ β -catenin dráhy v mezenchymu uměle podpoří, dojde k inhibici vývoje sekvenčních zubů a pokud se dráha naopak inhibuje, tak to zakládání nových zubů podpoří (Järvinen et al., 2018). Zatímco tedy Wnt signalizace v orálním epitelu, považovaná za regulátor nadřazený celé síti, iniciuje při vysoké aktivitě vznik sekvenčních zubů, tak Wnt signalizace v okolním mezenchymu má při navýšení své aktivity na zubní zárodky opačný, inhibující efekt (Järvinen

et al., 2018). U stále rostoucích řezáků jsou cílovými geny Wnt/ β -catenin signalizace *Axin2*, *Lef1* a *Tcf1*, které jsou exprimovány v mezenchymu kolem labiální krčkové kličky a znatelně výrazněji kolem linguální krčkové kličky (Suomalainen a Thesleff, 2010). To naznačuje, že vyšší aktivita Wnt/ β -catenin dráhy v mezenchymu přispívá k potlačení přítomnosti epitelových kmenových buněk na linguální straně (Suomalainen a Thesleff, 2010; Yang et al., 2015). Mezenchymální Wnt/ β -catenin signalizace totiž negativně reguluje antiapoptický efekt exprese *Fgf10* u řezáků i stoliček, a vyváženost mezi těmito dvěma faktory tak pomáhá udržet správnou míru apoptózy, potřebnou pro udržování kmenových buněk řezáků (Yang et al., 2015; Järvinen et al., 2018). Silná exprese genu *Axin2* byla rovněž nalezena i přímo v epitelu na linguální straně a jen slabá exprese v preameloblastech a ameloblastech labiální strany a je tak možné, že epitelová Wnt/ β -catenin signalizace má spíše negativní efekt na proliferaci a diferenciaci epitelových zubních kmenových buněk v ameloblasty (Suomalainen a Thesleff, 2010).

Wnt/ β -catenin signalizace a Bmp signalizace jsou blízce propojené a navzájem se regulují během všech stádií vývoje zubu v epitelu i mezenchymu (O'Connell et al., 2012; Zhang et al., 2016). Bmp4 pozitivně reguluje expresi *Lef1* v mezenchymu (Chen et al., 1996). Při delecii mezenchymálního β -cateninů se sníží exprese *Bmp4* v mezenchymu a dojde k rozdělení zubní plakody řezáků a vzniku více zubů (Fujimori et al., 2010). Při aktivaci Wnt signalizace pomocí BIO (6-bromoindirubin-3'-oxime), který inhibuje Gsk3 β (Glykogen syntáza kináza 3 beta), dojde naopak k navýšení mezenchymální exprese *Bmp4* a inhibici vzniku stoličky (Järvinen et al., 2018). Tyto výzkumy tedy ukazují, že mezenchymální Wnt/ β -catenin signalizace stimuluje mezenchymální expresi *Bmp4* v řezácích i stoličkách, kde vzniká smyčka pozitivní zpětné vazby a skrze *Bmp4* je tedy Wnt dráha důležitá i pro epitelovou expresi *Shh* (Obr. 3) (Fujimori et al., 2010).



Obr. 3. Model vyvíjejícího zárodka se zárodka myšího řezáku ukazující kruhovou Bmp a Wnt dráhy v mezenchymu, regulující *Shh* v epitelu. Upraveno podle Fujimori et al. (2010).

Epitelový β -catenin pozitivně reguluje expresi *Lef1* a *Bmp4* v mezenchymu (Liu et al., 2008). Všechny tyto poznatky nám ukazují, že kanonická Wnt/ β -catenin dráha hraje nepochybně zásadní roli ve vývoji zubu.

Msh homeobox (*Msx*) proteiny, *Msx1* a *Msx2* hrají roli přenašečů signálů mezi epitelem a mezenchymem. Knock-out *Msx1* zastaví vývoj zubu ve stádiu zubního pupenu a je

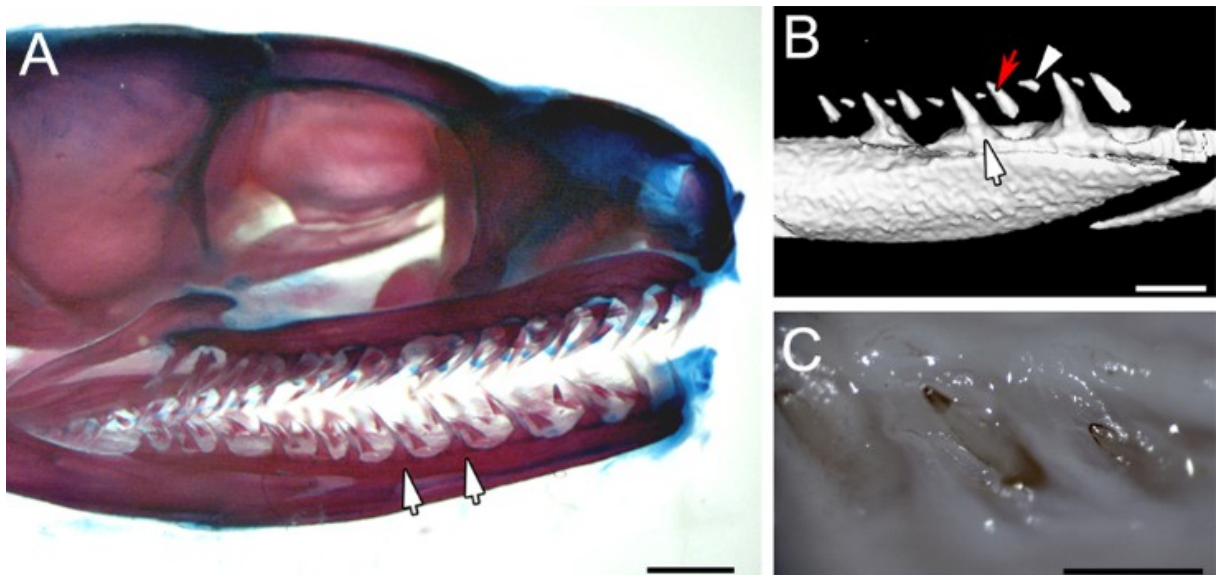
důležitý pro expresi *Lefl* a přenos exprese *Bmp4* z epitelu do mezenchymu, zatímco knock-out *Msx2* zastavuje vývoj pozdějších stádií zubu (Maas et al., 1997). Epitelový β -catenin aktivuje expresi *Msx1* v těsně přiléhajícím mezenchymu skrze *Bmp4* (Liu et al., 2008), mezenchymální β -catenin naopak nemá na expresi *Msx1* žádný vliv (Chen et al., 2009).

Výzkum mezenchymálních kmenových buněk řezáků neprobíhá tak dlouho, jako u epitelových kmenových buněk. Za mezenchymální kmenové buňky, které později diferencují v buňky dentální papily, jsou považovány *Gli1*-pozitivní buňky a LRCs, které se nachází perivaskulárně kolem arteriol u báze zubu (Zhao et al., 2014; Ishikawa et al., 2017). Místa LRCs a exprese *Gli1* se kryjí a je prokázáno, že *Gli1*⁺ buňky přispívají ke tvorbě zubu (Zhao et al., 2014; Ishikawa et al., 2017). *Gli1* je mediátor *Shh* signalizace (Lee et al., 1997), která vychází ze sensorických nervů neurovaskulárního svazku zubu a reguluje mezenchymální kmenové buňky (Zhao et al., 2014; Ishikawa et al., 2017). Diferenciace odontoblastů z mezenchymálních kmenových buněk je řízená *Shh* signalizací ze zubního epitelu a odontoblasty jsou dále spolu s buňkami zubní dřene udržovány autokrinní *Shh* signalizací (Ishikawa et al., 2017). Tato populace mezenchymálních kmenových buněk je obnovována buňkami z neurovaskulárního svazku zubu a nevyskytuje se u arteriol, které nemají ve své blízkosti nervové vlákno (Zhao et al., 2014; Kaukua et al., 2014). Které konkrétní buňky jsou zodpovědné za obnovu mezenchymálních kmenových buněk přibližuje exprese *Sox10* (Kaukua et al., 2014). Transkripční faktor *Sox10* je nejprve exprimován v buňkách neurální lišty, později je v periferní nervové soustavě exprimován pouze ve Schwannových buňkách (Kuhlbrodt et al., 1998). Za použití exprese *Sox10* jako markeru gliových buněk vychází najevo, že z progenitorů Schwannových buněk vznikají s postupem času buňky zubní dřene a odontoblasty (Kaukua et al., 2014). Lokace mezenchymálních zubních kmenových buněk a jejich původ je tedy do určité míry objasněn, další výzkum je ale potřeba pro odhalení toho, co vše se podílí na jejich regulaci.

Zubní kmenové buňky myši jsou ze všech organismů nejpodrobněji prozkoumané. Je známá jejich lokace, a to v krčkové kličce epitelu (Harada et al., 1999) a v mezenchymu u neurovaskulárního svazku zubu (Zhao et al., 2014). Tato práce nezmiňuje zcela všechny výzkumy, a i přes velké množství získaných dat nejsou stále všechny interakce na molekulární úrovni objasněny. Bohaté poznatky o vývoji zubů myši jsou však výchozím bodem pro mnoho dalších výzkumů na jiných organismech.

3.2 Plazi

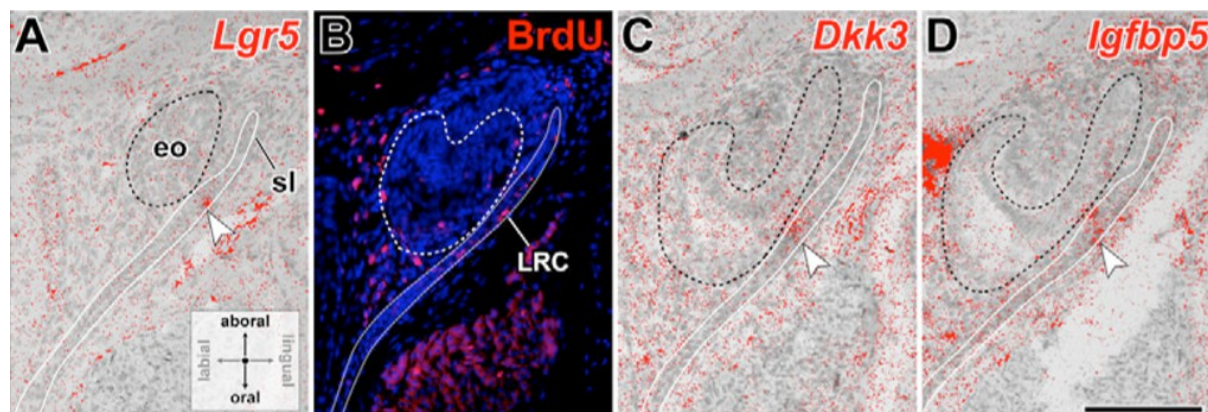
Z hlediska výzkumu zubních kmenových buněk jsou zajímavé pouze modely, u kterých nedošlo ke kompletní ztrátě zubů, jako například u ptáků nebo želv. Tyto skupiny zpravidla mají polyfyodontní dentici, takže, na rozdíl od savců, tvoří náhradní zuby po celý život a jejich dentální lamina nezaniká (Obr. 4). Můžeme tak dlouhodobě sledovat přítomnost a příspěvek kmenových buněk do tvorby nových zubních zárodků. Jednou ze zkoumaných skupin obratlovců s polyfyodontní denticí jsou plazi. Zuby mohou mít jeden či více vrcholů a v případě krokodýlů (*Crocodylia*) jsou alveolární. Dentální lamina plazů je permanentní a kontinuální a podle typu dentice může, nebo nemusí, být oddělena od orálního epitelu (Wu et al., 2013; Handrigan et al., 2010).



Obr. 4. Zubní rodiny užovky červené. (A) Alcian Blue - Alizarin Red barvení skeletu. (B) MicroCT sken mandibulární čelisti. (C) Fotografie erupovaného funkčního zubu. Funkční zuby (bílé šipky), náhradní zuby (červená šipka), nejmladší náhradní zub (bílá špička). Upraveno podle Gaete a Tucker, 2013).

Zubní rodiny gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*) jsou tvořeny až třemi generacemi zubů v jednom časovém úseku a všechny rodiny jsou propojeny dentální laminou. Dentální lamina má vrstvy vnějšího a vnitřního dentálního epitelu, se střední vrstvou volně uspořádaných buněk. Náhradní zuby se vytváří linguálně od funkčního zubu a posouvají se během svého vývoje směrem k funkčnímu zubu, dokud ho nenahradí. Prvotní místo, kde se nový náhradní zub utváří, se nazývá sukcesní lamina (Handrigan et al., 2010). Ta se nachází na distálním konci dentální laminy, kde vyrůstá z vnějšího dentálního epitelu předchozího zubu a skládá se z proliferujících buněk (Handrigan and Richman, 2010). Pomalu cyklující

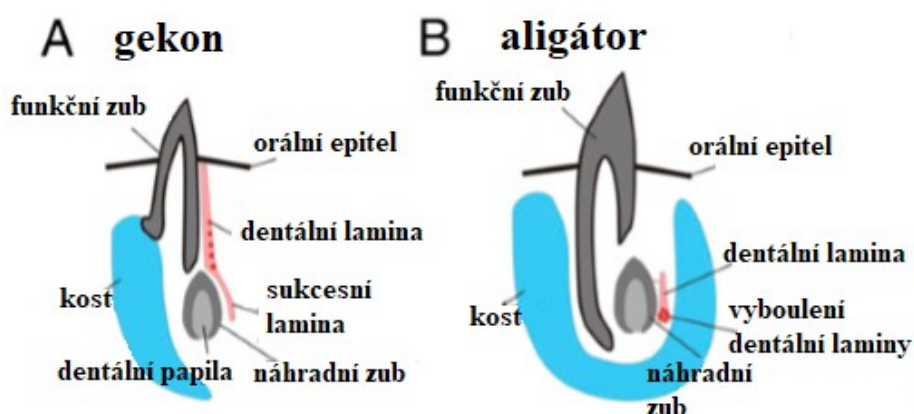
buňky, identifikovány pomocí BrdU značení, se nacházejí v linguální vrstvě dentální laminy a zcela chybí v sukcesní lamině. Tyto LRCs lze považovat za kmenové, protože také exprimují geny *Dkk3*, *Igfbp5* a *Lgr5* (Obr. 5) (Handrigan et al., 2010), které značí kmenovost buněk (Soumalainen a Thesleff, 2010)



Obr. 5. Expres markerů kmenových buněk v porovnání s LRCs u gekončíka. Labiální strana je vlevo, ústní dutina je směrem dolů, sekvenční řezy prováděny směrem od (A) k (D). (A, C, D) autoradiace, (B) fluorescence. Koncentrovaná exprese markerů kmenových buněk (bílá špička) se shoduje s označením buněk pomocí BrdU. Dentální lamina (bílá linka), dentální orgán (přerušovaná linka), eo - dentální orgán, LRC - buňky uchovávající značení, sl - sukcesní lamina. Upraveno podle Handrigan et al. (2010).

Dentální lamina u ještěřů a hadů vypadá podobně jako u gekončíka (Gaete a Tucker, 2013; Handrigan a Richman, 2010a). Pokusy s orgánovými kulturami užovky červené (*Pantheropsis guttatus*) ukazují, že při inhibici Gsk3 β , tedy aktivaci Wnt/ β -catenin dráhy, dentální lamina ztloustne a zvýší se počet zubních zárodků (Obr. 6) (Gaete a Tucker, 2013). Stejný výsledek inhibice Gsk3 β byl potvrzen i u gekončíka (Handrigan et al., 2010). Z toho lze vyvodit, že při aktivaci Wnt/ β -catenin dráhy dochází k aktivaci kmenových buněk a k tvorbě nových náhradních zubů. Na linguální straně dentální laminy užovky se exprimuje *Sox2* (Gaete a Tucker, 2013), kde se tak překrývá s lokacemi předpokládaných kmenových buněk u gekončíka (Handrigan et al., 2010). Výsledky tedy naznačují, že předpokládané umístění kmenových buněk v dentální lamině je u ještěřů i hadů stejné (Gaete a Tucker, 2013; Handrigan et al., 2010). Transkripční faktor *Lef1*, který váže β -catenin a ukazuje nám tak aktivitu Wnt/ β -catenin signální dráhy (Behrens, 1996), je exprimován na distálním konci dentální laminy (tzv. sukcesní lamina), kde naopak exprese *Sox2* chybí (Gaete a Tucker, 2013). U krajty královské (*Python regius*) a užovky domácí (*Lamprophis fuliginosus*) byl navíc zachycen signál exprese *Lef1* i v okolním mezenchymu a to naznačuje, že Wnt/ β -catenin dráha způsobuje proliferaci buněk jak v epitelu, tak v mezenchymu. To dále podporuje i nález exprese genu *Axin2* (Handrigan a Richman, 2010b), který je rovněž cílovým

Zuby krokodýlů (Crocodylia) jsou na rozdíl od šupinatých (Squamata) alveolární, což vede k odlišnostem v dentální lamině juvenilních a dospělých aligátorů (*Alligator mississippiensis*). U dospělců není dentální lamina propojena s orálním epitelem. Přestože jsou jednotlivé zubní rodiny od sebe odděleny kostí, tak jsou všechny dentální laminy rodin spolu navzájem kontinuálně propojeny (Wu et al., 2013). Na distální straně dentální laminy je zvětšený shluk buněk (dental lamina bulge), který obsahuje pomalu cyklující LRCs, u nichž lze předpokládat, že jde o buňky kmenové (Obr. 7). Počet LRCs po dobu cyklu výměny zubu je stálý, kdežto počet TA buněk se při vzniku zubního zárodku zvýší a během dalších fází růstu zubu se postupně snižuje (Wu et al., 2013).



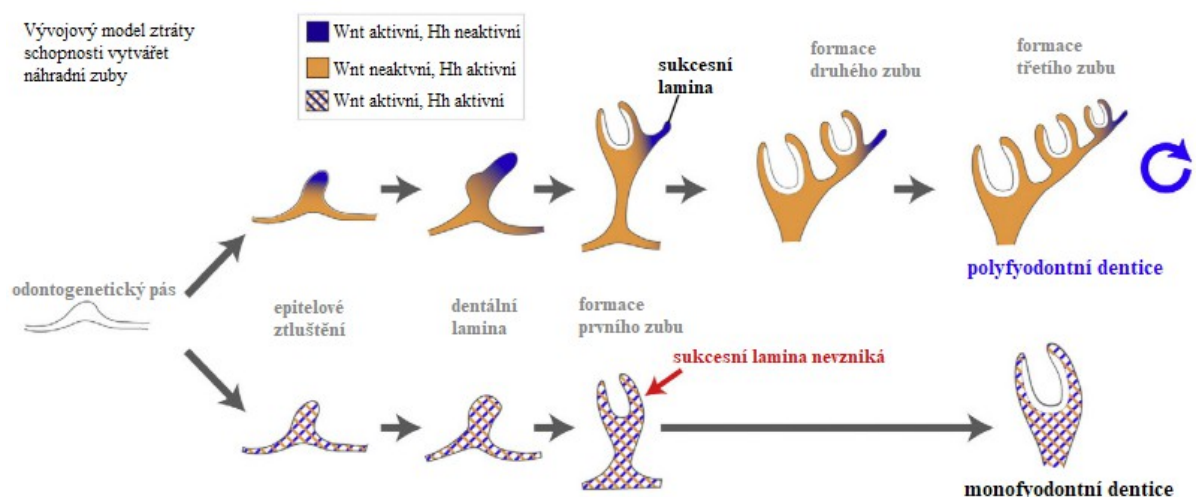
Obr. 7. Schéma srovnávající předpokládané umístění kmenových buněk (červené tečky) u gekončíka a aligátora. Upraveno podle Wu et al. (2013).

Aktivní Wnt/ β -catenin signalizace způsobuje proliferaci a prodloužení distálního konce dentální laminy, kdežto inhibice signalizace zamezí růstu náhradních zubů. Wnt/ β -catenin signalizace je tedy u aligátora důležitá pro aktivaci dělení buněk a tím spuštění cyklu vývoje nových zubů (Wu et al., 2013). Při analýze dynamické aktivity molekulárních drah během vývoje zubu vyšlo najevo, že v přechodu ze stádia zubního pupenu do stádia zubního pohárku je Wnt dráha vysoce aktivní (Tsai et al., 2016). V distálním konci dentální laminy lze najít nukleární β -catenin, zatímco v okolí se nachází pouze v cytoplasmě (Wu et al., 2013). Během tohoto přechodu je také navýšena exprese *Sostdc1* (inhibitoru Wnt a Bmp), exprese Fgf ligandů (například *Fgf3* a *Fgf10*), *Spry2*, Bmp ligandů (například *Bmp3* a *Bmp7*), a dále navýšena signalizace Tgf- β , Notch, Integrin, p53 (Tsai et al., 2016). Ve stádiu pohárku se nukleární β -catenin vyskytuje už i ve vnitřním dentálním epitelu (Wu et al., 2013) a při přechodu do stádia zvonce nedochází k výrazným změnám v aktivitě drah oproti předchozímu přechodu stádií zubu (Tsai et al., 2016). β -catenin už se ale vyskytuje pouze v cytoplasmě,

což znamená, že Wnt dráha není aktivní (Wu et al., 2013). Při přechodu ze zvonce do hotového náhradního zubu dochází k navýšení aktivity 12 ligandů Integrinové dráhy a ke snížení u dalších 12. Dochází také ke snížení exprese většiny Wnt ligandů. Co se týče homeobox genů, *Msx1* vykazuje klesající míru exprese během celého vývoje a *Msx2* zase stoupající, což naznačuje, že každý má jinou roli během vývoje. Z toho všeho je patrné, že tato síť signálních drah se podílí na vývoji zubu řízením proliferace a diferenciace zubních buněk aligátora (Tsai et al., 2016).

Zuby rostou od linguální směrem k bukální straně, čemuž může napomáhat například inhibice Wnt signalizace na linguální straně pomocí Wnt inhibitoru *Sfrp1* a zvýšená aktivita β -cateninů na bukální straně (Wu et al., 2013). Asymetrická exprese je taktéž pozorována u *Fzd3*, *Sfrp2*, *Sostdc1* a *Msx2*, což naznačuje, že Wnt dráha a homeobox geny spolupracují na umístění dentální laminy. Funkční zub se tak díky těmto asymetriím v expresi genů nachází na bukální straně a dentální lamina na straně linguální (Tsai et al., 2016).

Umístění epitelových zubních kmenových buněk plazů je poměrně dobře prozkoumané, výsledky experimentů je lokalizují na linguální straně dentální laminy šupinatých (Handrigan et al., 2010; Gaete a Tucker, 2013) a ve váčkovitém útvaru distálního konce laminy u krokodýlů (Wu et al., 2013). K proliferaci dochází na distálním konci laminy (Handrigan a Richman, 2010b; Wu et al., 2013). Genová exprese a aktivita signálních drah se v různých částech laminy liší. Tato kompartmentalizace umožňuje vznik sukcesní laminy, udržování dentální laminy, a tím celoživotní regeneraci zubů (Obr. 8) (Handrigan a Richman, 2010b).



Obr. 8. Model navrhuje ztrátu schopnosti tvořit náhradní zuby. U polyfyodontní dentice dochází k oddělení aktivity Wnt a Hh drah v dentální lamině, kdežto dentální lamina monofyodontní dentice není takto kompartmentalizovaná. Upraveno podle Handrigan a Richman (2010b).

3.3 Obojživelníci

Dentice obojživelníků může být uspořádána do jedné i více řad nebo do zubních polí. Zuby larev červorů (*Gymnophiona*) a ocasatých (*Caudata*) jsou jednoduché, s jedním vrcholem a u larev žab (*Anura*) se netvoří pravé zuby, ale pouze keratinové. Tvar korunek zubů dospělých obojživelníků se liší u různých druhů, nejčastěji mají dva vrcholy, ale existují i druhy s jedním nebo třemi vrcholy (Das a Coe, 1994). Larvy s pravými zuby mají na povrchu zubů enameloid, dospělí obojživelníci už produkují sklovinu. O zubních kmenových buňkách obojživelníků toho není příliš známo, přestože jejich polyfyodontní dentice je pro jejich výzkum vhodná. Doposud provedené studie, zaměřené na vývoj a regeneraci zubů, se nezabývají přímo hledáním kmenových buněk, jejich konkrétní lokace a příspěvek do tvorby zubů obojživelníků tak stále potřebuje objasnit.

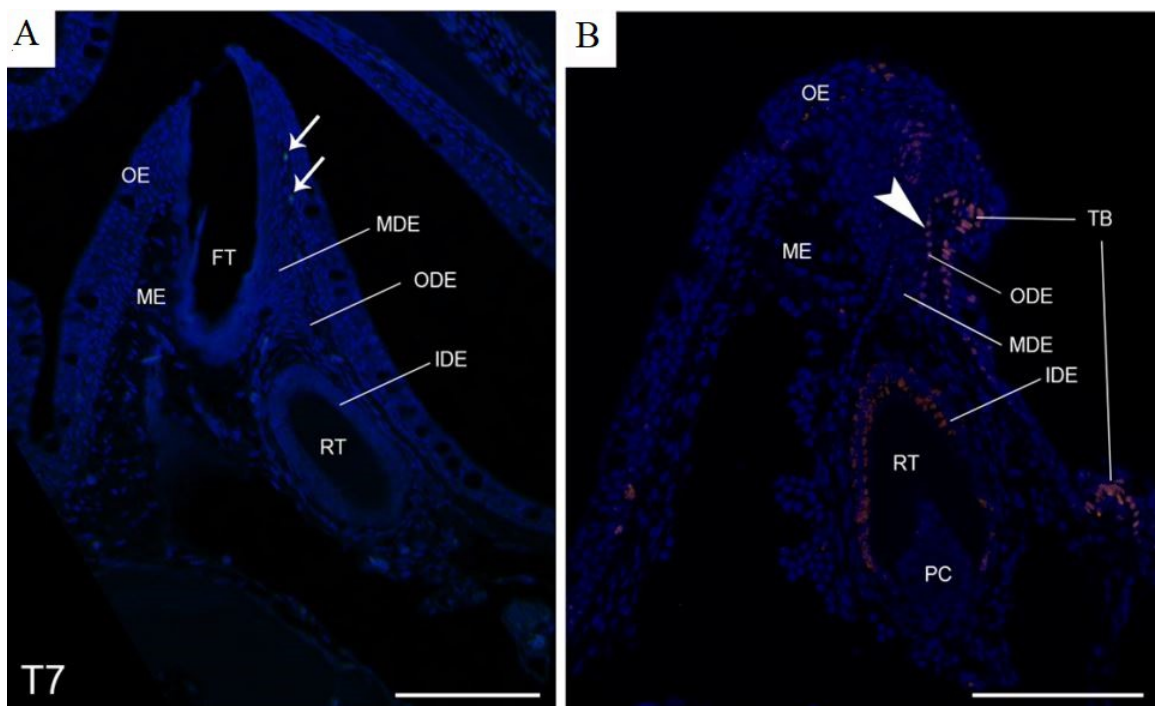
Axolotl mexický (*Ambystoma mexicanum*) je známý pro svou vysokou schopnost regenerace a je modelovým organismem pro mnoho výzkumů v této oblasti. Zuby jsou na okraji čelistí uspořádány do jedné řady, za kterou jsou další zuby uspořádány do zubních polí. Korunky zubů mladých larev jsou jednoduché, u starších jedinců mohou mít dva vrcholy (Wistuba et al., 2002). Není tomu tak ale u všech zubů jedince vzhledem k tomu, že axolotli jsou neoteničtí a nedochází k metamorfóze v dospělou formu. Dentální lamina je permanentní, není zcela kontinuální, ale je rozdělena do regionů pro každou kost nesoucí zuby (Smith et al., 2009). Dentální lamina je zanořena do mesenchymu, má šířku dvou vrstev buněk, které mají velké jádro a málo cytoplasmy, typické pro nediferenciované buňky. Při tvorbě nového zubního zárodku na labiální straně sukcesní laminy dochází k aktivaci proliferace jinak klidných buněk laminy a přilehlého mezenchymu (Smith a Miles, 1971).

Výzkumy dentice prováděné na červorech a žábách se kmenovými buňkami nezabývají, i přes popularitu modelového organismu drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Celkově jsou obojživelníci v této oblasti nejméně prozkoumanou skupinou obratlovců.

3.4 Kostnaté ryby

Orální a faryngeální dentice kostnatých ryb je polyfyodontní, její regenerace probíhá po celý život jedince. Zuby produkují enameloid, mohou být podle vývoje extramedulární, kdy se zubní zárodek v pozdější fázi vývoje připojí ke kosti pomocí podstavce, nebo intramedulární, kdy dlouhý výběžek epitelu pronikne do kosti a zub se začne tvořit uvnitř (Trapani, 2001).

Díky regeneraci zubů je mnoho druhů ryb zkoumáno pro výskyt zubních kmenových buněk. Ten není vždy jasný, kvůli absenci klasické dentální laminy u některých druhů, což je považováno za ancestrální stav (Huyseune a Witten, 2008; Vandenplas et al., 2014). Náhradní zuby utváří v krátkém vychlpení buněk z vnějšího dentálního epitelu předchozího zubu, který se formuje znovu s každým novým zubním zárodkem. Je tomu tak například u bazální ryby, bichira senegalského (*Polypterus senegalus*) (Vandenplas et al., 2014), nebo u lososa obecného (*Salmo salar*) (Huyseune a Witten, 2008). Předpoklad, že střední dentální epitel, který se nachází mezi funkčním a náhradním zubem, funkčně nahrazuje sukcesní dentální laminu a udržuje kmenové buňky (Huyseune a Witten, 2008; Vandenplas et al., 2014), není po bližším zkoumání výskytu LRCs potvrzen. LRCs se u obou druhů ryb nachází ve vnějším dentálním epitelu a mezenchymu a u bichira se ve vnějším dentálním epitelu kryjí s expresí *Sox2* (Obr. 9) (Vandenplas et al., 2014; Vandenplas et al., 2016b). V blízkosti ale nepřiléhá dentální orgán s TA buňkami, k jehož obnově by tyto LRCs přispívaly (Vandenplas et al., 2016b). Protože nalezené LRCs nepřispívají k tvorbě zubního zárodku, není pravděpodobné, že se jedná o epitelové zubní kmenové buňky (Vandenplas et al., 2016b). Kmenové buňky, které neustále cyklují a nemohou být tak zároveň LRCs, byly už dříve nalezeny v jiných tkáních u savců (Li a Clevers, 2010). Je tak tedy možné, že se zubní kmenové buňky ve středním dentálním epitelu vyskytují, ale jedná se o rychle cyklující buňky (Vandenplas et al., 2016b). Pro objasnění existence a umístění epitelových zubních kmenových buněk bichira senegalského a lososa obecného je potřeba dalšího výzkumu.



Obr. 9. BrdU značení (A) a exprese *Sox2* (B) u bichira. Transverzální řezy, imunohistologické barvení. Labiální strana je vlevo, ústní dutina je nahore. LRCs jsou přítomné v mezenchymu (šipky). Expresse *Sox2* (růžová). FT - funkční zub, IDE - vnitřní dentální epitel, MDE - střední dentální epitel, ME - mezenchym, ODE - vnější dentální epitel, OE - orální epitel, PC - dřevná dutina, RT - náhradní zub, TB - chuťový pohárek. Přejchod vnějšího dentálního epitelu v orální epitel (špička). Upraveno podle Vandenplas et al. (2016).

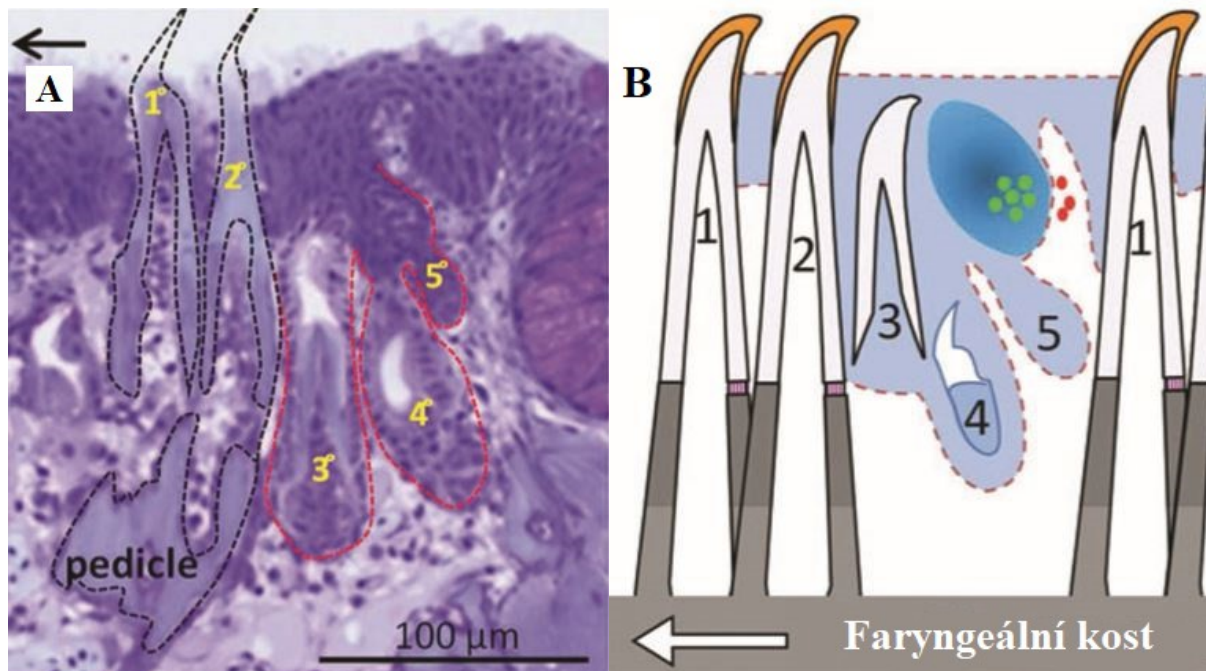


Obr. 10. Faryngeální čelist medaky s řadami zubů. Barvení Alizarin Red S pro vápník. Upraveno podle Tan et al. (2017).

Medaka japonská (*Oryzias latipes*) má dentici orální i faryngeální (Parenti, 1987). Funkční faryngeální zuby jsou uspořádané do hustých řad a mezi nimi, pod povrchem epitelu, se nacházejí nové náhradní zuby (Obr. 10). Cyklus výměny jednoho zubu trvá asi 4 týdny, zuby se tvoří extramedulárně a jedna zubní rodina obsahuje v jeden časový moment dva funkční zuby a tři zubní zárodky (Obr. 11A) (Abduweli et al., 2014). U faryngální dentice medaky není dentální lamina jasně rozpoznatelná. Místo, které by svými vlastnostmi odpovídalo dentální lamině, se nachází na posteriorním konci každé zubní rodiny. Je to vyboulená struktura, ve které se nachází pomalu se dělicí LRCs, které přispívají do tvorby náhradních zubů, a buňky

exprimující *Sox2*, což naznačuje, že jsou zde pravděpodobně přítomné epitelové zubní kmenové buňky (Obr. 11B). Telomerázová aktivita, zjišťovaná podle exprese *telomerázové reverzní transkriptázy (Tert)* u příbuzné medaky *Oryzias melastigma*, v epitelu chybí v brzkých fázích vývoje a zvyšuje se až s tvorbou ameloblastů. V mezenchymu je tomu naopak, tedy vysoká počáteční aktivita spolu s tvorbou odontoblastů mizí (Tan et al., 2017). Expresse *Tert* je v epitelu rozptýlena a nekryje se s místy předpokládaných kmenových buněk (Tan et al. 2017). Podporuje se tím tak předpoklad, že telomerázová aktivita neznačí kmenovost, ale progenitory, které ji potřebují kvůli své vysoké proliferaci, na rozdíl od pomalu se dělicích kmenových buněk (Harrington et al., 2004). V epitelu nebyla nalezena exprese markeru kmenovosti, *Lgr5*, ani markeru pluripotence, *Osr4*. Tímto Tan et al. (2017) zpochybňují výskyt epitelových kmenových buněk předpokládaný Abduwelim et al. (2014). Místo toho poukazují na možnost absence epitelových kmenových buněk a regeneraci zubů

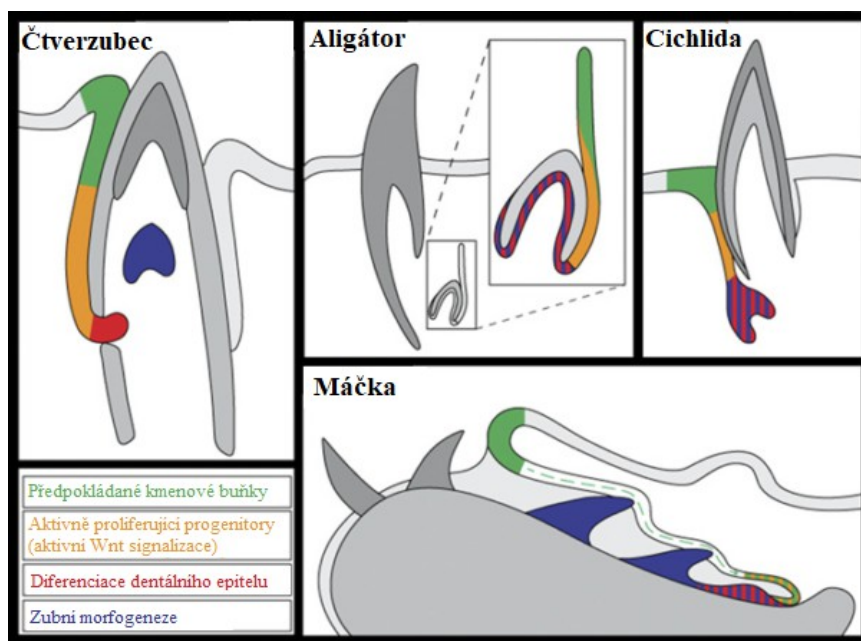
závislou pouze na progenitorech (Tan et al., 2017). Exprese *Tert* v mezenchymu dentální papily (Tan et al., 2017) se překrývá s lokací mezenchymálních LRCs (Abduweli et al. 2014). Výsledky výzkumů existence zubních kmenových buněk epitelu a mezenchymu si odporují a do budoucna je potřeba objasnit, zda regenerace zubů medaky probíhá závisle či nezávisle na pomalu cyklujícími kmenových buňkách a zda se na obnově nepodílí například rychle cyklující buňky (Li a Clevers., 2010).



Obr. 11. Zubní rodina faryngeální dentice medaky. (A) Histologický řez. Funkční zuby s podstavcem (pedicle, černá přerušovaná linka), náhradní zuby (červená přerušovaná linka). (B) Schéma ukazuje přítomnost předpokládaných kmenových buněk. Pomalu cyklující buňky (zelené tečky), exprese *Sox2* (tmavě modrá), mezenchymální kmenové buňky (červené tečky). Funkční zuby s podstavci (1,2), náhradní zuby (3-5). Šipky ukazují k rostru. Upraveno podle Abduweli et al. (2014).

Dánio pružované (*Danio rerio*) má dentici pouze na pátém žaberním oblouku, je ve třech řadách s celkově 11 funkčními zuby na každé faryngeální čelisti (van der Heyden et al, 2000). První generace zubů se tvoří extramedulárně, přímo z faryngeálního epitelu. Později se z dentálního epitelu kolem funkčního zubu zanoří do mezenchymu krátká sukcesní dentální lamina, na jejímž distálním konci se založí zárodek zubu. Zárodek zubu se může objevit oproti sukcesní lamině se zpožděním (Huysseune, 2006). Podobná sukcesní lamina, diskontinuální a dočasná, je též u bohatě morfologicky diverzifikovaných dentic afrických cichlid (Cichlidae) z jezera Malawi s tím rozdílem, že vývoj zubu je intramedulární, s dlouhým proužkem epitelu pronikajícím do otvoru v kosti (Fraser et al., 2013). Marker kmenových buněk *Sox2* je u cichlid exprimován na dvou místech, a to v epitelu nad sukcesní

laminou na labiální straně funkčního zubu, a pak, podobně jako u dánia pruhovaného, ve středu sukcesní laminy, mezi vnějším a vnitřním dentálním epitelem funkčního zubu (Fraser et al., 2013). Za předpokládané místo kmenových buněk u dánia a cichlid označili Huysseune a Thesleff (2004) právě střed sukcesní laminy, zatímco Fraser et al. (2013) u cichlid navrhuje i buňky nad sukcesní laminou jako možné zdroje buněk pro zubní zárodek (Obr. 12).

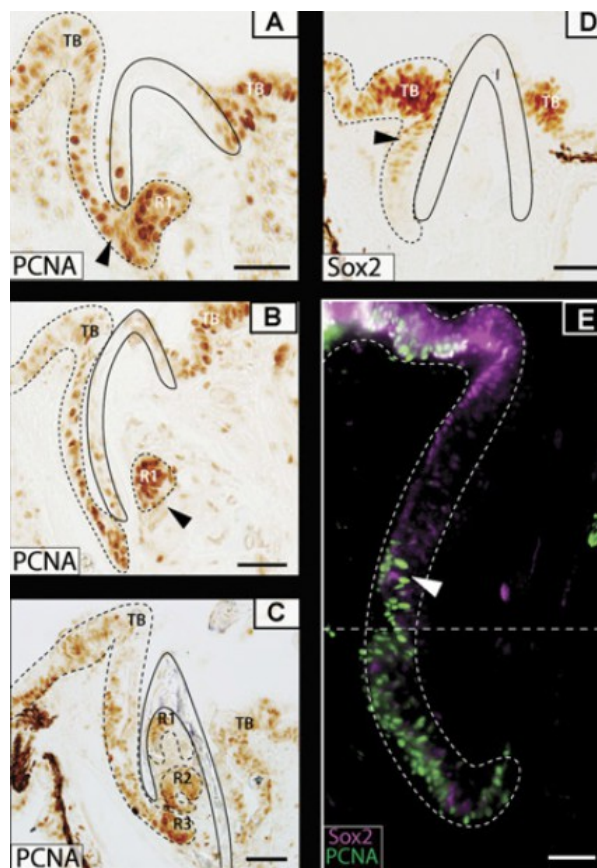


Obr. 12. Schématické znázornění odontogeneticky podobných struktur u aligátora, čtverzubce, cichlidy a máčky. Předpokládané kmenové buňky (zelená), aktivně proliferující buňky značené pomocí ko-exprese *Sox2* a Wnt signálů (oranžová), diferenciace epitelu (červená), zubní morfogeneze (modrá). Upraveno podle Thiery et al. (2017).

První generace zubů čtverzubcovitých (*Tetraodontidae*), vypadá podobně jako u jiných kostnatých ryb, ale pouze na čtyřech zubních pozicích se díky mnoha náhradním zubům nahrazujícím jeden původní utvoří čtyři velké zuby připomínající zobák (Fraser et al., 2012). Intramedulární vývoj náhradních zubů probíhá v dutině velkého zubu, do které prorůstá sukcesní dentální lamina, která z povrchového ústního epitelu sahá hluboko do mezenchymu (Fraser et al., 2012; Thiery et al., 2017). Exprese *Sox2* je podobná jako u cichlid (Fraser et al., 2013), s nejsilnější expresí apikálně a se slábnoucí expresí vedoucí bazálně, značící proud buněk vedoucí k zubnímu zárodku (Thiery et al., 2017). Exprese PCNA, značící proliferaci, se v aborální dentální lamině nepřekrývá se *Sox2*-pozitivními buňkami, jedná se tedy o neproliferující buňky (Obr 12). BrdU značení prokázalo, že dentální lamina přispívá k tvorbě zubního zárodku, a že LRCs se vyskytují blízko povrchu ústního epitelu. β -catenin je exprimován v oblasti dentální laminy, silněji směrem k distálnímu konci

a slaběji směrem k povrchu a chybí v místě silné exprese Sox2. To nám ukazuje, že Wnt/ β -catenin dráha se podílí na aktivaci proliferace buněk, a že dentální lamina je na základě genetické exprese kompartmentalizována. Předpokládané epitelové progenitorové kmenové buňky se nachází v dentální lamině blízko ústního epitelu, v místě silné exprese Sox2 (Obr. 12 a 13) (Thiery et al., 2017).

Dentice kostnatých ryb je velice diverzifikovaná. Ukazuje nám, že dentální lamina ani nemusí být přítomna pro regeneraci zubů. Místo toho, pro každý nový zubní zárodek vzniká nová výchlipka z vnějšího zubního epitelu předchozího zubu, která po utvoření zubu zaniká (Huysseune a Witten, 2008). Nebylo objeveno, že by v tomto modelu Sox2-pozitivní LRCs ve vnějším dentálním epitelu přispívaly k tvorbě zubního zárodku (Vandenplas et al., 2016b). Dále také může být místo klasické dentální laminy přítomná epitelová struktura váčkovitého tvaru na konci každé zubní rodiny, ve které se předpokládá výskyt kmenových buněk (Abduweli et al., 2013). U druhů, které mají dentální laminu, se předpokládá, že sídlo epitelových kmenových buněk je v lamině blízko povrchu orálního epitelu.



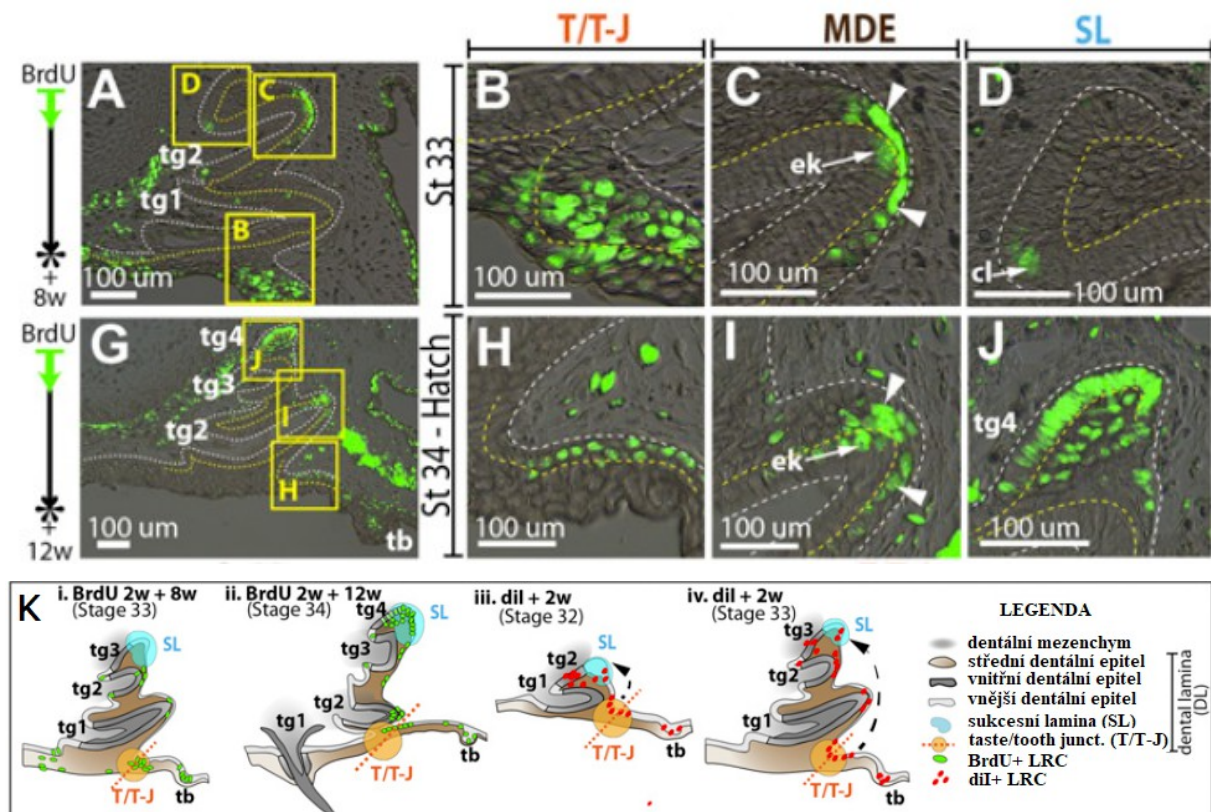
Obr. 13. Lokalizace předpokládaných progenitorových buněk čtverzubce. (A-C) PCNA imunohistochemie ukazuje vysokou proliferaci epitelu, od iniciační fáze zubu první generace R1 (A), po vznik dalších generací zubů R2 a R1 (C). Zubní generace se kupí na sebe do enameloidového obalu (černá linka). (D) Sox2 imunohistochemie. Předpokládané umístění progenitorů (černá špička). (E) Dvojitá imunoflorescence PCNA (zelená) a Sox2 (fialová), překryv PCNA/Sox2 uprostřed (bílá špička). TB - chuťový pohárek. Upraveno podle Thiery et al. (2017).

3.5 Paryby

Dentice chimér (Holocephali) se skládá z zubních desek, zatímco dentice příčnoústých (Elasmobranchii) je polyfyodontní, mnoho náhradních zubů se v rodinách utváří najednou a podobně jako běžící pás se posouvají na místo funkčního zubu. Zuby neprodukují pro ochranu povrchu klasickou sklovinu, ale enameloid (Fosse et al., 1974). Nejčastěji zkoumaným organismem je máčka skvrnitá (*Scyliorhinus canicula*), jejíž dentální lamina je permanentní a kontinuálně propojuje generace zubů i všechny zubní rodiny navzájem (Vandenplas et al., 2016a). Zuby mají více vrcholů a jsou organizovány do rodin, kde v jeden moment můžeme zpravidla nalézt sedm zubů, z toho pět nejstarších je mineralizovaných (Reif, 1980). Epitel dentální laminy obsahuje tři vrstvy: vnitřní, střední a vnější dentální epitel (Vandenplas et al., 2016a). BrdU značení ukazuje přítomnost LRCs na distálním konci dentální laminy, tedy v sukcesní lamině. Dále lze nalézt LRCs při povrchu, kde orální epitel přechází v dentální laminu v místě setkání oblastí zubů a chuťových pohárků (taste/tooth junction, dále T/TJ) (Martin et al. 2016). O něco častěji cyklující LRCs se nachází také ve středním dentálním epitelu na linguálním okraji dentální laminy u vrcholů zubních zárodků (Obr. 14) (Vandenplas et al., 2016a; Martin et al., 2016). Místa nálezů LRCs se shodují s místy exprese *Sox2* (Martin et al., 2016), což podporuje předpoklad, že se jedná o potenciální sídla zubních kmenových buněk. V brzkých vývojových stádiích vede skrze střední dentální epitel sloupec exprese *Sox2*, který propojuje oba konce dentální laminy, jenž se s časem rozpadne. Stejně oblasti exprese *Sox2* se nachází i u rejnoka bodlinatého (*Leucoraja erinacea*) (Martin et al., 2016). DiI barvení pro sledování migrace buněk ukazuje, že buňky migrují z oblasti T/TJ do oblasti sukcesní laminy před i po rozpadnutí kontinuálního sloupce *Sox2*-pozitivních buněk propojujícím tato dvě místa a jejich výskyt se shoduje s výskytem *Sox2* exprimujících LRCs. Je patrné, že buňky z T/TJ i sukcesní laminy se podílejí na tvorbě nových zubních zárodků (Martin et al., 2016). DiI barvení před vznikem zubů a chuťových pohárků poukazuje na jejich společný původ z orálního epitelu (Martin et al., 2016). Je možné, že T/TJ buňky se později podílejí na tvorbě jak zubů, tak i chuťových pohárků, což je potřeba ověřit dalším výzkumem.

Dvojitě barvení *Sox2* protilátkou a PCNA ukazuje, že se střídá období klidu předpokládaných kmenových buněk v preiniciační fázi a období aktivace v iniciační fázi nových zubních zárodků. Mění se i exprese *β-cateninu*. V preiniciační fázi je omezena jen na *Sox2*⁺ buňky a v iniciační fázi je rozšířená skrze celou sukcesní laminu a navíc je *β-catenin*

přemístěn do jádra *Sox2*+ buněk. Aktivní Wnt/ β -catenin dráha se tak podílí na regulaci proliferace pomalu cyklujících buněk (Martin et al., 2016). V mezenchymu zubní papily se exprimuje v brzké fázi vývoje zubu *Fgf3* a během mineralizace zubu se exprimuje v mezenchymu *Bmp4* (Martin et al., 2016), podobně jako u myši (Wang et al., 2007). Také exprese dalších známých regulátorů odontogeneze, jako jsou *Fgf10*, *Lef1* a *Shh* je ve vyvíjejících se zubech potvrzena (Martin et al., 2016) a je potřeba dalšího výzkumu pro potvrzení konkrétní role těchto faktorů v odontogenezi žraloka.



Obr. 14. BrdU značení v dentální lamině žraloka. (A-C) stádium 33, 2 týdny pulse + 8 týdnů chase. (G-J) stádium 34 - líhnutí, 2 týdny pulse + 12 týdnů chase. (A,G) pohled na celou dentální laminu, (B, H) detail místa setkání chuťových pohárků a zubů – T/TJ, (C, I) střední dentální epitel - MDE, (D, J) sukcesní lamina - SL. LRCs (zelená), chybí v ranějším stádiu sukcesní laminy (D), kdy dochází k rychlé obměně dentice. Později dojde ke zpomalení cyklu (J). Koncentrace LRCs (bílá špička) kolem sklovinového uzku (ek). Zubní zárodky (tg1 – tg4). (K) schématické znázornění BrdU (zelená) a DiI (červená) v dentální lamině žraloka). Upraveno podle Martin et al. (2016).

Z dosavadních získaných dat vyplývá, že v dentální lamině máčky skvrnitě jsou dvě místa trvalého výskytu LRCs a buněk exprimujících *Sox2*. Předpokládané dospělé kmenové buňky zubního epitelu, které dávají vznik zubním zárodkům, jsou obnovovány populací progenitorů blízko povrchu epitelu chuťových pohárků (Obr. 12 a 14K) (Martin et al., 2016).

4 Závěr

Zuby obratlovců jsou různorodé, jejich způsob vývoje se mezi skupinami ale příliš neliší. Existují rozdíly v jejich tvaru, ukotvení, celkovém počtu i počtu v zubních rodinách. Dentální lamina je důležitá pro vývoj zubů, existují ale i případy, kdy se zuby vyvíjí i bez ní (Vandenplas et al., 2014; Huysseune a Witten, 2008). Na distálním konci dentální laminy obnovující se dentice je přítomna proliferující sukcesní lamina, kde se většinou pomalu cyklující buňky nenachází. Zubní zárodek zde začíná svůj vývoj. Je tomu tak u difyodontních savců, plazů, obojživelníků a ryb (Buchtová et al., 2012; Gaete a Tucker, 2013; Wistuba et al., 2002; Huysseune, 2006). V případě myši a aligátora může být distální konec laminy vyboulený a obsahovat kmenové buňky (Harada et al., 1999; Wu et al., 2013). V případě žraloků se předpokládané kmenové buňky, které pomalu cyklují, vyskytují i v sukcesní lamině a migrací je jejich populace obnovována z další populace pomalu cyklujících buněk na opačném konci dentální laminy blízko povrchu orálního epitelu (Martin et al., 2016). Předpokládané kmenové buňky vyskytující se blízko povrchu orálního epitelu se nachází i u ryb (Fraser et al., 2013; Thiery et al., 2017). U plazů se kmenové buňky nachází v prostřední části linguální strany dentální laminy (Handrigan et al., 2010; Gaete a Tucker, 2013).

Sox2 je vhodný marker epitelových zubních kmenových buněk, exprimovaný od savců až po žraloky (Juuri et al., 2013; Gaete a Tucker, 2013; Martin et al., 2016; Thiery et al., 2017), značící jeho evoluční zachovalost a důležitost při tvorbě dentic obratlovců. Z probíraných skupin chybí informace o expresi Sox2 pouze u obojživelníků. Wnt/ β -catenin signalizace se ukazuje jako velice významnou pro vývoj zubu, u různých organismů ukázala aktivace a inhibice této dráhy podobné fenotypy (Liu et al., 2008; Gaete a Tucker, 2013). Epitelová Wnt signalizace způsobuje především proliferaci kmenových buněk, mezenchymová Wnt signalizace zase proliferaci inhibuje (Järvinen et al., 2018). Wnt signální dráha ovlivňuje přímo a nepřímo ostatní dráhy podílející se na regulaci kmenových buněk. Například Shh, která udržuje kmenové buňky a Bmp dráha, která v případě mezenchymální Bmp4 inhibuje proliferaci a podporuje diferenciaci v ameloblasty. Důležitou pro regulaci kmenových buněk je také Fgf signalizace, například Fgf10 je zásadní pro vznik vhodného prostředí pro kmenové buňky a pro udržení jejich kmenovosti (Harada et al., 1999). Do toho se zapojují mnohé další molekulární signály a dohromady všechny tyto

epitelově-mezenchymální interakce tvoří regulační síť, která se podílí na regulaci kmenových buněk.

Lokace předpokládaných kmenových buněk se mezi skupinami obratlovců do různé míry odlišují. Problém s určením jejich lokace je ale především u mnoha druhů ryb kvůli absenci klasické permanentní dentální laminy (Fraser et al., 2013; Vandenplas et al., 2016a). Molekulární signalizace regulace kmenových buněk je dobře prozkoumaná u myši a u plazů v poslední době také došlo k bližšímu prozkoumání regulace kmenových buněk. Další skupiny obratlovců jsou v porovnání s myši a plazy molekulárně málo prozkoumané. Obecně nejméně prozkoumanou skupinou jsou obojživelníci, u kterých chybí například i určení lokace pomalu cyklujících buněk. Na umístění zubních kmenových buněk a jejich příspěvek k vývoji zubu u axolotla mexického se bude zaměřovat navazující diplomová práce.

5 Zdroje

- Abduweli, D., Baba, O., Tabata, M. J., Higuchi, K., Mitani, H., & Takano, Y. (2014). Tooth replacement and putative odontogenic stem cell niches in pharyngeal dentition of medaka (*Oryzias latipes*). *Microscopy*, *63*(2), 141–153. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dft085>
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., & Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of β -catenin with the transcription factor Lef-1. *Nature*, *382*(6592), 638–642. <https://doi.org/10.1038/382638a0>
- Buchtová, M., Štebánek, J., Gločová, K., Matalová, E., & Tucker, A. S. (2012). Early regression of the dental lamina underlies the development of diphyodont dentitions. *Journal of Dental Research*, *91*(5), 491–498. <https://doi.org/10.1177/0022034512442896>
- Das, I., & Coe, M. (1994). Dental morphology and diet in anuran amphibians from south India. *Journal of Zoology*, *233*(3), 417–427. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1994.tb05274.x>
- Dosedělová, H., Dumková, J., Lesot, H., Gločová, K., Kunová, M., Tucker, A. S., ... Buchtová, M. (2015). Fate of the molar dental lamina in the monophyodont mouse. *PLOS One*, *10*(5), e0127543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127543>
- Fosse, G., Risnes, S., & Holmbakken, N. (1974). Mineral distribution and mineralization pattern in the enameloid of certain elasmobranchs. *Archives of Oral Biology*, *19*(9), 771–778. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(74\)90165-4](https://doi.org/10.1016/0003-9969(74)90165-4)
- Fraser, G. J., Britz, R., Hall, A., Johanson, Z., & Smith, M. M. (2012). Replacing the first-generation dentition in pufferfish with a unique beak. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(21), 8179–8184. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119635109>
- Fraser, G. J., Bloomquist, R. F., & Streelman, J. T. (2013). Common developmental pathways link tooth shape to regeneration. *Developmental Biology*, *377*(2), 399–414. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.02.007>
- Fraser, G. J., Bloomquist, R. F., & Streelman, J. T. (2008). A periodic pattern generator for dental diversity. *BMC Biology*, *6*(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-32>
- Fuchs, E., & Raghavan, S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews Genetics*, *3*(3), 199–209. <https://doi.org/10.1038/nrg758>
- Fuchs, E., & Segre, J. A. (2000). Stem cells: A New lease on life. *Cell*, *100*(1), 143–155. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81691-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81691-8)
- Fujimori, S., Novak, H., Weissenböck, M., Jussila, M., Gonçalves, A., Zeller, R., ... Hartmann, C. (2010). Wnt/ β -catenin signaling in the dental mesenchyme regulates incisor development by regulating Bmp4. *Developmental Biology*, *348*(1), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.09.009>
- Gaete, M., & Tucker, A. S. (2013). Organized emergence of multiple-generations of teeth in snakes is dysregulated by activation of Wnt/Beta-catenin signalling. *PLoS One*, *8*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074484>

- Handrigan, G. R., Leung, K. J., & Richman, J. M. (2010). Identification of putative dental epithelial stem cells in a lizard with life-long tooth replacement. *Development*, *137*(21), 3545–3549. <https://doi.org/10.1242/dev.052415>
- Handrigan, G. R., & Richman, J. M. (2010a). Autocrine and paracrine Shh signaling are necessary for tooth morphogenesis, but not tooth replacement in snakes and lizards (Squamata). *Developmental Biology*, *337*(1), 171–186. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.020>
- Handrigan, G. R., & Richman, J. M. (2010b). A network of Wnt, hedgehog and BMP signaling pathways regulates tooth replacement in snakes. *Developmental Biology*, *348*(1), 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.09.003>
- Harada, H., Kettunen, P., Jung, H.-S., Mustonen, T., Wang, Y. A., & Thesleff, I. (1999). Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and Fgf Signaling. *The Journal of Cell Biology*, *147*(1), 105–120. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.1.105>
- Harrington, L. (2004). Does the reservoir for self-renewal stem from the ends? *Oncogene*, *23*(43), 7283–7289. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207948>
- Huysseune, A., Witten, P. E. (2008). An evolutionary view on tooth development and replacement in wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Evolution & Development*, *10*(1), 6–14. <https://doi.org/10.1111/J.1525-142X.2007.00209.X>
- Huysseune, A. (2006). Formation of a successional dental lamina in the zebrafish (*Danio rerio*): support for a local control of replacement tooth initiation. *International Journal of Developmental Biology*, *50*, 637–643. <https://doi.org/10.1387/ijdb.052098ah>
- Huysseune, A., & Thesleff, I. (2004). Continuous tooth replacement: The possible involvement of epithelial stem cells. *BioEssays*, *26*(6), 665–671. <https://doi.org/10.1002/bies.20039>
- Chen, J., Lan, Y., Baek, J.-A., Gao, Y., & Jiang, R. (2009). Wnt/beta-catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development. *Developmental Biology*, *334*(1), 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.07.015>
- Chen, Y., Bei, M., Woo, I., Satokata, I., & Maas, R. (1996). Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development*, *122*(10), 3035–3044.
- Ishikawa, Y., Nakatomi, M., Ida-Yonemochi, H., & Ohshima, H. (2017). Quiescent adult stem cells in murine teeth are regulated by Shh signaling. *Cell and Tissue Research*, *369*(3), 497–512. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2632-x>
- Järvinen, E., Salazar-Ciudad, I., Birchmeier, W., Taketo, M. M., Jernvall, J., & Thesleff, I. (2006). Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/beta-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(49), 18627–18632. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607289103>
- Järvinen, E., Shimomura-Kuroki, J., Balic, A., Jussila, M., & Thesleff, I. (2018). Mesenchymal Wnt/ β -catenin signaling limits tooth number. *Development*, *145*(4), dev158048. <https://doi.org/10.1242/dev.158048>
- Jho, E. -h., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., & Costantini, F. (2002). Wnt/ β -Catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the

- signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4), 1172–1183.
<https://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1172-1183.2002>
- Juuri, E., Jussila, M., Seidel, K., Holmes, S., Wu, P., Richman, J., ... Thesleff, I. (2013). Sox2 marks epithelial competence to generate teeth in mammals and reptiles. *Development*, 140(7), 1424–32. <https://doi.org/10.1242/dev.089599>
- Kaukua, N., Shahidi, M. K., Konstantinidou, C., Dyachuk, V., Kaucka, M., Furlan, A., ... Adameyko, I. (2014). Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature*, 513(7519), 551–554. <https://doi.org/10.1038/nature13536>
- Klein, O. D., Lyons, D. B., Balooch, G., Marshall, G. W., Basson, M. A., Peterka, M., ... Martin, G. R. (2008). An Fgf signaling loop sustains the generation of differentiated progeny from stem cells in mouse incisors. *Development*, 135(2), 377–385.
<https://doi.org/10.1242/dev.015081>
- Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Hermans-Borgmeyer, I., & Wegner, M. (1998). Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(1), 237–50.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-01-00237.1998>
- Lee, J., Platt, K., Censullo, P., & Altaba, A. (1995). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development*, 124(13), 2537–2552.
- Leedham, S. J., Brittan, M., McDonald, S. A. C., & Wright, N. A. (2005). Intestinal stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(1), 11–24.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00333.x>
- Li, L., & Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*, 327(5965), 542–5. <https://doi.org/10.1126/science.1180794>
- Lin, C., Kiousi, C., O'connell, S., Briata, P., Szeto, D., Liu, F., ... Rosenfeld, M. (1999). Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature*, 401, 279–282.
- Liu, F., Chu, E. Y., Watt, B., Zhang, Y., Gallant, N. M., Andl, T., ... Millar, S. E. (2008). Wnt/ β -catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Developmental Biology*, 313(1), 210–224. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.016>
- Lockett, W. P. (1993). Ontogenetic staging of the mammalian dentition, and its value for assessment of homology and heterochrony. *Journal of Mammalian Evolution*, 1(4), 269–282. <https://doi.org/10.1007/BF01041667>
- Maas, R., & Bei, M. (1997). The genetic control of early tooth development. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 8(1), 4–39.
<https://doi.org/10.1177/10454411970080010101>
- Martin, K. J., Rasch, L. J., Cooper, R. L., Metscher, B. D., Johanson, Z., & Fraser, G. J. (2016). Sox2+ progenitors in sharks link taste development with the evolution of regenerative teeth from denticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(51), 14769–14774. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612354113>
- Mason, J. M., Morrison, D. J., Albert Basson, M., & Licht, J. D. (2006). Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends in Cell Biology*, 16(1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2005.11.004>
- Moskow, B. S., & Bloom, A. (1983). Embryogenesis of the gingival cyst. *Journal of Clinical Periodontology*, 10(2), 119–130. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1983.tb02200.x>

- Parenti, L. R. (1987). Phylogenetic aspects of tooth and jaw structure of the Medaka, *Oryzias latipes*, and other beloniform fishes. *Journal of Zoology*, *211*, 561–572. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1987.tb01553.x>
- Peterková, R., Peterka, M., Vonesch, J., & Ruch, J. (1995). Contribution of 3-D computer-assisted reconstructions to the study of the initial steps of mouse odontogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, *39*(1), 239–247.
- Peters, H., & Balling, R. (1999). Teeth: where and how to make them. *Trends in Genetics*, *15*(2), 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(98\)01662-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(98)01662-X)
- Plikus, M. V., Zeichner-David, M., Mayer, J. A., Reyna, J., Bringas, P., Thewissen, J. G. M., ... Chuong, C. M. (2005). Morphoregulation of teeth: Modulating the number, size, shape and differentiation by tuning Bmp activity. *Evolution and Development*, *7*(5), 440–457. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2005.05048.x>
- Potten, C. S., Schofield, R., & Lajtha, L. G. (1979). A comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *560*(2), 281–299. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(79\)90022-2](https://doi.org/10.1016/0304-419X(79)90022-2)
- Seidel, K., Ahn, C. P., Lyons, D., Nee, A., Ting, K., Brownell, I., ... Klein, O. D. (2010). Hedgehog signaling regulates the generation of ameloblast progenitors in the continuously growing mouse incisor. *Development*, *137*(22), 3753–3761. <https://doi.org/10.1242/dev.056358>
- Smith, C. E., & Warshawsky, H. (1975). Cellular renewal in the enamel organ and the odontoblast layer of the rat incisor as followed by radioautography using ³H-thymidine. *Anat Rec.*, *183*(4), 523–561.
- Smith, M. M., Fraser, G. J., & Mitsiadis, T. A. (2009). Dental lamina as source of odontogenic stem cells: Evolutionary origins and developmental control of tooth generation in gnathostomes. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *312*(4), 260–280. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21272>
- Smith, M. M., Miles, A. E. W. (1971). The ultrastructure of odontogenesis in larval and adult urodeles; differentiation of the dental epithelial cells. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, *121*(4), 470–498. <https://doi.org/10.1007/BF00560155>
- Suomalainen, M., Thesleff, I. (2010). Patterns of Wnt pathway activity in the mouse incisor indicate absence of Wnt/β-catenin signaling in the epithelial stem cells. *Developmental Dynamics*, *239*(1), 364–372. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22106>
- Tan, W. H., Witten, P. E., Winkler, C., Au, D. W. T., & Huysseune, A. (2017). Telomerase expression in Medaka (*Oryzias melastigma*) pharyngeal teeth. *Journal of Dental Research*, *96*(6), 678–684. <https://doi.org/10.1177/0022034517694039>
- Thiery, A. P., Shono, T., Kurokawa, D., Britz, R., Johanson, Z., & Fraser, G. J. (2017). Spatially restricted dental regeneration drives pufferfish beak development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(22), E4425–E4434. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702909114>
- Trapani, J. (2001). Position of developing replacement teeth in teleosts. *Copeia*, *2001*(1), 35–51. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2001\)001\[0035:PODRTI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2001)001[0035:PODRTI]2.0.CO;2)

- Tsai, S., Abdelhamid, A., Khan, M. K., Elkarargy, A., WidELITZ, R. B., Chuong, C. M., & Wu, P. (2016). The molecular circuit regulating tooth development in Crocodylians. *Journal of Dental Research*, 95(13), 1501–1510. <https://doi.org/10.1177/0022034516667724>
- Van der Heyden, C., Huysseune, A. (2000). Dynamics of tooth formation and replacement in the zebrafish (*Danio rerio*) (Teleostei, Cyprinidae). *Developmental Dynamics*, 219(4), 486–496. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999<::AID-DVDY1069>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1069>3.0.CO;2-Z)
- Vandenplas, S., De Clercq, A., & Huysseune, A. (2014). Tooth replacement without a dental lamina: The search for epithelial stem cells in *Polypterus senegalus*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 322(5), 281–293. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22577>
- Vandenplas, S., Vandeghinste, R., Boutet, A., Mazan, S., & Huysseune, A. (2016a). Slow cycling cells in the continuous dental lamina of *Scyliorhinus canicula*: new evidence for stem cells in sharks. *Developmental Biology*, 413(1), 39–49. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2016.03.004>
- Vandenplas, S., Willems, M., Witten, P. E., Hansen, T., Fjellidal, P. G., & Huysseune, A. (2016b). Epithelial label-retaining cells are absent during tooth cycling in *Salmo salar* and *Polypterus senegalus*. *PLOS One*, 11(4), e0152870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152870>
- Wang, X. P., Suomalainen, M., Felszeghy, S., Zelarayan, L. C., Alonso, M. T., Plikus, M. V., ... Thesleff, I. (2007). An integrated gene regulatory network controls stem cell proliferation in teeth. *PLoS Biology*, 5(6), 1324–1333. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050159>
- Wang, X.-P., Suomalainen, M., Jorgez, C. J., Matzuk, M. M., Werner, S., & Thesleff, I. (2004). Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting Bmp signaling and ameloblast differentiation. *Developmental Cell*, 7(5), 719–730. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2004.09.012>
- Wistuba, J., Greven, H., & Clemen, G. (2002). Development of larval and transformed teeth in *Ambystoma mexicanum* (Urodela, Amphibia): An ultrastructural study. *Tissue and Cell*, 34(1), 14–27. <https://doi.org/10.1054/tice.2002.0219>
- Yang, Y., Li, Z., Chen, G., Li, J., Li, H., Yu, M., ... Tian, W. (2018). Gsk3 β regulates ameloblast differentiation via Wnt and TGF- β pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 233(7), 5322–5333. <https://doi.org/10.1002/jcp.26344>
- Yuan, G., Yang, G., Zheng, Y., Zhu, X., Chen, Z., Zhang, Z., & Chen, Y. (2015). The non-canonical Bmp and Wnt/ β -catenin signaling pathways orchestrate early tooth development. *Development*, 142(1), 128–39. <https://doi.org/10.1242/dev.117887>
- Zhang, F., Song, J., Zhang, H., Huang, E., Song, D., Tollemar, V., ... Ji, P. (2016). Wnt and Bmp signaling crosstalk in regulating dental stem cells: Implications in dental tissue engineering. *Genes & Diseases*, 3(4), 263–276. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.09.004>
- Zhao, H., Li, S., Han, D., Kaartinen, V., & Chai, Y. (2011). Alk5-mediated transforming growth factor signaling acts upstream of Fibroblast growth factor 10 to regulate the proliferation and maintenance of dental epithelial stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, 31(10), 2079–2089. <https://doi.org/10.1128/MCB.01439-10>

Zhao, H., Feng, J., Seidel, K., Shi, S., Klein, O., Sharpe, P., & Chai, Y. (2014). Secretion of Shh by a Neurovascular Bundle Niche Supports Mesenchymal Stem Cell Homeostasis in the Adult Mouse Incisor. *Cell Stem Cell*, *14*(2), 160–173.
<https://doi.org/10.1016/J.STEM.2013.12.013>