

# Univerzita Karlova

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



**Bc. Štěpánka Novotná**

Vývoj a dynamika palatální a faryngeální dentice u jesetera malého  
Development and dynamics of the palatal and pharyngeal dentition in sterlet

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Anna Pospíšilová, Ph.D.

Praha, 2021



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, 10.8.2021

Bc. Štěpánka Novotná

---

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, bez kterých by tato práce nikdy nemohla vzniknout. Mé obrovské dík patří mému školiteli Láďovi, který mě trpělivě vedl bakalářským a magisterským studiem. Děkuji hlavně za veškerý čas, který mi věnoval, za poskytnuté cenné rady a znalosti, ochotu s čímkoli pomoci a neuvěřitelné zapálení do vědy, které pro mě bylo motivací po celou dobu studia. Další nesmírně poděkování patří mé konzultantce Aniče, která mě zasvětila do tajů práce v laboratoři a měla se mnou ohromnou trpělivost. Děkuji za vše, co mě naučila, za veškeré rady a nápady, poskytnutí dat k doplnění této práce, stále dobrou náladu a kanadské žertíky, díky kterým u nás nebyla nikdy nuda.

Děkuji i všem bývalým a současným členům „laboroky přes držky“, jmenovitě Robertovi za veškeré podnětné připomínky a rady, které pomohly při formování této práce. Honzovi za užitečné rady a výrobu hybridizačních prób. Tomovi, Týně, Viki a Agátě za všechny dobré nápady, pomoc při práci v laboratoři, naučení rozličných histologických technik a mikroskopování. Vojtovi, za technickou podporu, péči o chovy a pomoc s jesetery. Děkuji doc. Martinu Pšeničkovi a jeho týmu ve Vodňanech za spolupráci a poskytnutí jeseterů pro tuto práci a prof. Marcele Buchtové a Dr. Marii Landové Šulcové za zavedení nové metody TRAP barvení do naší laboratoře.

Mé největší dík však patří mojí rodině, která tu pro mě vždy byla a ve všem, co jsem dělala mě podporovala, za co jsem nezměrně vděčná. Děkuji také přátelům, díky kterým jsem se i v Praze cítila jako doma. V neposlední řadě děkuji mému příteli za to, že mi byl oporou, za veškerou pomoc a trpělivost, kterou se mnou měl při mé cestě ke vzdělání.

Převážná část této práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (GAČR 18-04580S). Výroba in-situ hybridizačních prób byla umožněna díky asemblovaným transkriptomům jesetera malého v rámci MŠMT projektů CESNET (LM2015042) a CERIT-Scientific Cloud (LM2015085).

## Abstrakt

Dentice je zásadní inovací obratlovců vykazující jak ohromnou morfologickou diverzitu, tak i rozdílné udržování či nahrazování funkčních zubů. Většina dnešních obratlovců nahrazuje zuby pomocí hluboce invaginovaného epitelu, tj. následné dentální laminy, díky přítomnosti zubních kmenových buněk. Nicméně, u některých časně divergujících linií paprskoploutvých ryb (Actinopterygii) dochází ke vzniku nových zubních zárodků z přilehlého povrchového epitelu bez přítomnosti následné dentální laminy. Zda jsou oba typy vývoje dentic obratlovců srovnatelné a zda se na náhradě zubů podílejí obdobné zubní kmenové buňky, není doposud dostatečně zhodnoceno.

Tato diplomová práce si klade za cíl popsat vývoj palatální a faryngeální dentice u zástupce časně divergující linie paprskoploutvých ryb, jesetera malého (*Acipenser ruthenus*). Dentice jesetera je poměrně dynamická. Zuby jsou nahrazovány bez následné dentální laminy, avšak tato náhrada vykazuje podobné znaky, které byly popsány u obratlovců s následnou dentální laminou. Marker zubních kmenových/progenitorových buněk, Sox2, se nachází ve vnějším zubním epitelu předcházejícího zubu poblíž přilehlých chuťových pohárků, což koreluje s přítomností tzv. „label-retaining cells“. Buňky vzdálenější od tohoto místa naopak vykazují proliferační charakter a přítomnost faktorů zodpovědných za odontogenezi.

Na základě mé práce navrhuji hypotézu, že nové zubní zárodky jesetera malého se vyvíjejí ze zubních kmenových buněk, které jsou lokalizovány v těsné blízkosti chuťových pohárků, což je srovnatelné s vývojem zubů z následné dentální laminy. Toto umístění kmenových buněk implikuje, že dentice s přítomnou či nepřítomnou následnou dentální laminou jsou obdobně fungujícími systémy pouze s odlišnými fenotypovými projevy.

**Klíčová slova:** zuby, faryngeální dentice, palatální dentice, adice, náhrada, ztráta, hltan, jeseter, *Acipenser*, paprskoploutvé ryby, vývoj, evoluce, zubní kmenové/progenitorové buňky

## Abstract

Dentition is a key vertebrate innovation showing not only great morphological diversity, but also different maintenance or replacement of functional teeth. Most extant vertebrates replace their dentition through addition of new teeth from deeply invaginated epithelium, i.e. the successional dental lamina, due to presence of dental stem cells. However, in some early branching lineages of ray-finned fishes (Actinopterygii), new tooth germs arise from the adjacent superficial epithelium without the presence of the successional dental lamina. Whether the two types of dental development in vertebrates are equivalent and whether comparable dental stem cells play role in tooth replacement is currently not satisfactorily evaluated.

This Master thesis aims at describing the development of palatal and pharyngeal dentition of a member of an early branching lineage of ray-finned fishes, the sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*). The sterlet dentition is fairly dynamic. The teeth are replaced without the successional dental lamina, however, this replacement shows characteristics similar to those described in vertebrates with the successional dental lamina. A marker of dental stem/progenitor cells, Sox2, is localized in the outer dental epithelium of the predecessor tooth in the vicinity of the adjacent taste buds in correlation with the presence of the so-called „label-retainig cells“. On the other hand, cells distant from this place exhibit proliferative characteristics and presence of factors responsible for odontogenesis.

Based on my work, I propose a hypothesis that new teeth of the sterlet develop from dental stem cells localized in immediate proximity to taste buds, i.e. a comparable situation to teeth developing from the successional dental lamina. The localization of stem cells niche implies that dentitions with or without the successional dental lamina represent similar developmental systems diverging only in their phenotypic expressions.

**Key words:** teeth, pharyngeal dentition, palatal dentition, addition, replacement, loss, pharynx, sturgeon, sterlet, *Acipenser*, ray-finned fishes, development, evolution, dental stem/progenitor cells

# Obsah

1. Úvod .....	1
2. Literární přehled.....	3
2.1. Nahrazování dentice.....	3
2.2. Na vývoji zubů se podílí dentální lamina .....	3
2.3. Wnt signální dráha hraje zásadní roli při nahrazování zubů .....	4
2.4. Kmenové buňky podílející se na nahrazování zubů .....	6
2.4.1. Transkripční faktor Sox2 a jeho role při náhradě zubů .....	7
2.4.2. Domnělé kmenové/progenitorové buňky – pomalu cyklující buňky podílející se na náhradě zubů.....	8
2.5. Vývoj zubů bez dentální laminy.....	10
2.6. Studovaný druh jeseter malý ( <i>Acipenser ruthenus</i> ) .....	12
2.6.1. Dosavadní poznatky o dentici jeseterů ve srovnání s příbuznými veslonosy .....	13
3. Materiál a metody.....	14
3.1. Fixace.....	14
3.2. Parafínová histologie.....	14
3.3. Plastová histologie .....	15
3.4. Histologické barvení .....	15
3.4.1. Hematoxylin/eosin .....	15
3.4.2. Azure B/eosin .....	16
3.5. Imunohistochemie – protilátkové barvení.....	16
3.6. <i>In situ</i> hybridizace (ISH) .....	17
3.6.1. Whole-mount <i>in situ</i> hybridizace (WISH).....	17
3.6.2. Analýza ISH na řezech.....	18
3.7. TRAP barvení .....	19
3.8. Kalceinové barvení .....	19
3.9. Alizarin Red barvení.....	19
3.10. EdU experiment a EdU whole-mount barvení .....	19
3.11. Mikroskopická technika a zpracování dat .....	20
4. Výsledky.....	22
4.1. Stavba dentice jesetera malého.....	22
4.1.1. Orální dentice .....	22
4.1.2. Palatální dentice .....	22
4.1.3. Faryngeální dentice .....	23
4.1.4. Shrnutí společných znaků palatální a faryngeální dentice .....	25

4.2. Dynamika vývoje zubů a rychlost obměny dentice v rámci jednotlivých zubních polí .....	25
4.2.1. Analýza ztráty dentice .....	25
4.2.2. Rychlost výměny dentice.....	26
4.3. Nový zubní zárodek vzniká superficiálně z přilehlého epitelu .....	27
4.4. Iniclace, raný vývoj a patternování dentice.....	29
4.4.1. Exprese zubních markerů při iniciaci zubů a vývoji náhradních zubních zárodků.....	29
4.4.2. Exprese genů na úrovni proteinů při vývoji zubních zárodků ukazuje širší souvislosti než na úrovni mRNA .....	31
4.5. Identifikace potenciálních zubních kmenových buněk a buněk s vysokou proliferací.....	32
4.5.1. Sox2 protein se vyskytuje i mimo chuťový pohárek v těsné blízkosti zubního zárodku ..	32
4.5.2. LRCs buňky se nalézají v oblasti SDE mezi chuťovým pohárkem a zubním zárodkem.....	33
4.6.    Obrazové tabule .....	35
5.    Diskuse .....	74
5.1. Vývoj palatální a faryngeální dentice je oproti orální dentici mírně opožděn a postupuje rostrálně-kaudálním směrem.....	74
5.2. Zubní pole procházejí v průběhu vývoje jesetera významnými přestavbami .....	74
5.3. Nové zubní zárodky u jesetera vznikají bez formace následné dentální laminy.....	76
5.4. Náhradní zuby vznikají u jesetera z progenitorových buněk v blízké asociaci s chuťovými pohárky.....	77
5.5. Vývoj dentice z kmenových/progenitorových buněk u jesetera v kontextu ostatních obratlovců .....	81
6. Závěr .....	84
7. Seznam použité literatury .....	86
8. Přílohy.....	97
<i>In situ</i> hybridizace protokol .....	97

## Seznam použitých zkratk

DE – dentale

DL – dentální lamina (dental lamina)

DPT – dermopalatinum

HYP1 – hypobranchiale 1

HYP2 – hypobranchiale 2

IDE – vnitřní dentální epitel (inner dental epithelium)

ODE – vnější dentální epitel (outer dental epithelium)

INF – infrafaryngobranchiale

LRCs – buňky, které si uchovávají značení (label retaining cells)

MDE – střední dentální epitel (middle dental epithelium)

PPT – palatopterygoid

RSDL – rudimentární následná dentální lamina (rudimentary successional dental lamina)

SDE – následný dentální epitel (successional dental epithelium)

SDL – následná dentální lamina (successional dental lamina)

TA – přechodné vysoce proliferující buňky (transit amplifying cells)

TB – chuťový pohárek (taste bud)

TL – celková velikost (total length)

---

Pro přehlednost jsou číslováním odděleny obrázky v textu (obr.) a obrazové tabule, které jsou součástí výsledků (Fig.).

## Seznam obrazových tabulí

**Fig. 1:** Schématické znázornění rozmístění zubních polí jesetera malého (*Acipenser ruthenus*).

**Fig. 2:** Stavba a vývoj zubních polí lokalizovaných na palatopterygoidu.

**Fig. 3:** Stavba a vývoj zubních polí lokalizovaných na infrapharyngobranchiale.

**Fig. 4:** Stavba a vývoj zubních polí lokalizovaných na hypobranchiale 1 a hypobranchiale 2.

**Fig. 5:** Analýza výměny dentice – zuby přirůstají z jedné strany zubního pole a z opačné strany vypadávají.

**Fig. 6:** Rychlost výměny dentice na palatopterygoidu.

**Fig. 7:** Rychlost výměny dentice na infrapharyngobranchiale.

**Fig. 8:** Rychlost výměny dentice na hypobranchiale 1.

**Fig. 9:** Protilátkové barvení proti E-cadherinu ukazuje rozhraní epitelu a mesenchymu.

**Fig. 10:** Histologická stavba zubních polí na palatopterygoidu a hypobranchiale 1 – zubní zárodek vzniká bez příspěvku dentální laminy.

**Fig. 11:** Exprese genů *Pitx2*, *Shh* a *Sox2* během iniciace a patternování dentice.

**Fig. 12:** Exprese genu *Sox2* ukazuje vývoj a patternování chuťových pohárků.

**Fig. 13:** Exprese genu *Lef1* během raného vývoje zubů.

**Fig. 14:** Identifikace přítomnosti  $\beta$ -catenin a *Sox2* v zubních polích při vývoji zubních zárodků.

**Fig. 15:** Identifikace přítomnosti *Shh* a *Pitx2* v zubních polích při vývoji zubních zárodků.

**Fig. 16:** Analýza vztahu markeru zubních kmenových/progenitorových buněk *Sox2*, pozice chuťových pohárků a proliferačních tkání během vývoje zubních zárodků.

**Fig. 17:** Analýza vztahu markeru zubních kmenových/progenitorových buněk *Sox2* a pozice chuťových pohárků na horizontálních řezech.

**Fig. 18:** Identifikace potenciálních zubních kmenových/progenitorových buněk a míst s vysokou proliferací prostřednictvím EdU značení.

**Fig. 19:** Identifikace potenciálních zubních kmenových/progenitorových buněk a míst s vysokou proliferací prostřednictvím EdU značení – III. fixace.

## 1. Úvod

Vznik zubů je považován za klíčovou evoluční novinku obratlovců, která společně s čelistmi vedla k ohromnému úspěchu čelistnatců (Gnathostomata) a jejich adaptivní radiaci. První nálezy dentice pocházejí od fosilních pancířnatců (Placodermi) z doby přibližně před 420 mil. lety. Nicméně bývá diskutován i dřívější vznik u konodontů (Aldridge et Purnell, 1996; Rücklin et Donoghue, 2015). Evoluční původ zubů je do dnešní doby tématem hojně diskutovaným (Smith, 2003; Rücklin et al. 2012; Fraser et al., 2009; Qu et al. 2015; Chen et al. 2016; Chen et al. 2020).

Dentice obratlovců je velice diverzifikovaná, což poukazuje na specializaci k potravní strategii jednotlivých skupin. Dentice se může lišit v mnoha aspektech, a to zejména počtem jednotlivých zubů, jejich velikostí, tvarem, uspořádáním a rozmístěním. Zuby mohou tvořit jednu řadu (monostichní uspořádání) nebo více řad (polystichní uspořádání) a bývají v různé kombinaci umístěny na čelistech, na patře a na faryngeálních elementech. Další rozdíly najdeme ve výstavbě zubů (např. stavba dentinu, enamel/enameloid), ve způsobu ukotvení a v nahrazování zubů. Rozlišujeme například zuby s jednou funkční generací (monofyodontní) a s více funkčními generacemi (polyfyodontní). Předpokládá se však, že navzdory této ohromné diverzitě je proces vývoje zubu napříč obratlovcí vysoce konzervovaný (Jernvall et Thesleff, 2012; Rasch et al., 2016, Square et al. 2021).

Výzkum dentice obratlovců je atraktivním tématem již po celá desetiletí. Pozornost je v současné době z větší části věnována vývoji zubů u myši (*Mus musculus*). Myší dentice je ovšem velmi specializovaná, má pouze jednu generaci zubů v orální dutině, proto není příliš vhodným modelem pro studium otázek týkajících se ancestrálního stavu dentic obratlovců či procesu náhrady zubů a zubních kmenových buněk, které se této náhrady účastní. K zodpovězení těchto otázek je vhodnější hledat modely v linii paprskoploutvých ryb (Actinopterygii), která představuje nejpočetnější a nejdiverzifikovanější skupinu dnešních obratlovců s více než 35 000 popsány druhy (Fricke et al., 2021). Několik druhů z této skupiny se již stalo modelovými organismy pro výzkum dentice, a to zejména dáňo pruhované (*Danio rerio*) (např. Van der heyden et Huysseune, 2000; Wise et Stock, 2010; Kague et al., 2018), medaka japonská (*Oryzias latipes*) (např. Debais-Thibaud et al., 2007; Abduweli et al., 2014), koljuška tříostná (*Gasterosteus aculeatus*) (např. Ellis et al., 2015;

Hart et al., 2018) nebo africké cichlidy (např. Fraser et al., 2008). Všechny tyto druhy však představují odvozené druhy Teleostei, které sice zuby nahrazují, ale mají opět vysoce specializovanou, modifikovanou dentici na čelistech a/nebo na posledním faryngeálním oblouku. Nicméně se předpokládá, že výchozím stavem dentice obratlovců byla přítomnost zubů v celé orofaryngeální dutině, a tento stav je výsledkem redukce počtu zubů a zubních polí v průběhu evoluce (Nelson, 1969; Stock, 2001; Smith, 2003). Pro výzkum evoluce dentice jsou tedy klíčové časně divergující linie paprskoploutvých ryb, u kterých se tento stav v různé míře zachoval: Polypteriformes (bichiři), Acipenseriformes (jeseteři a veslonosi), Amiiformes (kaprouni) a Lepisosteiformes (kostlíni). I navzdory důležitosti porozumění odontogeneze u těchto linií jsou studie zabývající se tímto tématem poměrně málo početné (např. Clemen et al., 1998; Wacker et al., 2001; Smith et al., 2015).

Tato diplomová práce navazuje na předchozí výzkum kolegyně Mgr. Pospíšilové, Ph.D., která se denticí jesetera malého začala zabývat nejprve ve své diplomové práci (Pospíšilová, 2015) a následně ve své disertační práci (Pospíšilová, 2020). V rámci této práce vznikl dosud nepublikovaný článek s názvem „The remarkable dynamics in the establishment, replacement, and loss of dentition during the ontogeny of the sterlet sturgeon“ (Pospíšilová et al., in prep.). Předkládaná diplomová práce má za cíl rozšířit tyto poznatky. Zaměřuje se na charakteristiku dentice jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) s důrazem na morfologickou deskripci jednotlivých zubních polí, iniciaci zubních zárodků s identifikováním faktorů účastnících se vývoje náhradních zubů, popis dynamiky vývoje zubů společně s rychlostí jejich náhrady a identifikaci potenciálních kmenových/progenitorových buněk a míst s vysokou proliferací.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Nahrazování dentice

Dentice obratlovců čelí neustálému opotřebením, ke kterému dochází při zpracovávání potravy. Toto opotřebením musí být nějakým způsobem kompenzováno, aby dentice zůstala funkční. Nejběžnějším řešením tohoto problému je přítomnost polyfyodontie, tj. více generací funkčních zubů, kde v průběhu života kontinuálně dochází k vypadávání opotřebených zubů a k výměně za zuby nové (Jernvall et Thesleff, 2012; Tucker et Fraser, 2014).

Schopnost nepřetržitě nahrazovat zuby po celý život jedince je tématem v současnosti stále rostoucího zájmu. Tento stav je považován za pleziomorfní v rámci Chondrichthyes a Osteichthyes a předpokládá se, že je ancestrálním stavem dentice obratlovců. Schopnost nahrazovat zuby je zachována u většiny obratlovců nesoucích zuby (vyjma např. savců) a pravděpodobně se vyskytovala i u raných čelistnatců (Rücklin et al. 2012; Maisey et al., 2014; Vaškaninová et al., 2020).

Oproti tomu u savců najdeme povětšinou dentici, která má dvě generace zubů, kde první generaci zubů označujeme jako mléčné a druhou generaci jako zuby trvalé. Přejchod od ancestrální polyfyodontie k difyodontii bývá vysvětlován v souvislosti se zvýšenou komplexitou tvaru zubů v této skupině (Hunter et Jernvall, 1995; Kielan-Jaworowska et al., 2014). Nejrozšířenější modelový organismus obratlovců – myš domácí (*Mus musculus*) má ještě více specializovanou dentici – dokonce pouze jednu generaci zubů. Tedy i přes to, že většina obratlovců má polyfyodontní dentici, relativně málo vědeckých prací se touto problematikou zabývá a o molekulárních mechanismech, které jsou základem celoživotní výměny zubů, se zatím mnoho neví.

### 2.2. Na vývoji zubů se podílí dentální lamina

Důležitým orgánem pro vznik zubů je epiteliální struktura, která vzniká invaginací do mesenchymu. Takto zanořený epitel je nazýván zubní lišta (dentální lamina) (Smith et al., 2009). U druhů, které mají více generací zubů, dále dochází ke vzniku následné/sukcesivní dentální laminy (successional dental lamina). Následná dentální lamina je charakterizována jako histologicky odlišitelný hluboce zanořený epitel, který je přímo spojený s vnějším

zubním epitelem předcházejícího zubu (Reif, 1982; Berkovitz et Shellis, 2017). Nový zubní zárodek se vyvíjí na jejím distálním konci a v průběhu vývoje se po dentální lamině posouvá směrem k předcházejícímu zubu. U Osteichthyes nově vznikající zub vyvolá osteoklastovou aktivitu a dojde k enzymatické disociaci báze předcházejícího zubu a k remodelaci zubonosné připojovací kosti (pokud je přítomna). K tomuto dochází buď před nebo během časné erupce zubu, kdy se zub stává funkčním (Witten et Huysseune, 2009; Mantoku et al., 2016).

Podle Reifa (1982) rozlišujeme dentální laminu na několik typů – kontinuální/nekontinuální a permanentní/nepermanentní (přechodná). Kontinuální dentální lamina se táhne po celé zubonosné struktuře (např. kosti) a navzájem propojuje zubní rodiny. Naopak v případě nekontinuální dentální laminy nejsou zubní rodiny propojené a každá je tvořena vlastní epidermální invaginací. Permanentní dentální lamina tvoří alespoň jeden, ale většinou více náhradních zubů a nezaniká (zahrnuje všechny kontinuální a mnoho nekontinuálních dentálních lamin). Nepermanentní dentální lamina vždy tvoří pouze jeden zub, poté zaniká a pro každý nový náhradní zub se vyvíjí znovu. Příkladem přechodné a nekontinuální dentální laminy je dánío pruhované (*Danio rerio*) a gekončík noční (*Eublepharis macularius*) (Huysseune, 2006; Handrigan et al., 2010). Permanentní dentální laminu nalezneme například u žebrovníka (*Pleurodeles waltl*) nebo u *Sicyopterus japonicus* z čeledi hlaváčovitých (Davit-Béal et al., 2006; Moriyama et al., 2010).

U monofyodontní dentice (jedna funkční generace zubů) a difyodontní dentice (dvě funkční generace zubů) dentální lamina zaniká po utvoření konečné generace zubů (Buchtová et al., 2012; Buchtová et al., 2013; Jussila et al., 2014; Dosedělová et al., 2015). V rozporu s tímto se však ukázala být například agama vousatá (*Pogona vitticeps*), která udržuje prolifерující následnou dentální laminu i poblíž zubů, které nejsou nahrazovány. Samotná přítomnost následné dentální laminy tedy nemusí znamenat vznik náhradního zubu (Salomies et al., 2019).

### 2.3. Wnt signální dráha hraje zásadní roli při nahrazování zubů

Molekulární mechanismy, které ovlivňují vývoj náhradních zubů, byly studovány hlavně u řady druhů plazů, ryb, žraloků nebo u fretky, ale překvapivě i u myši. Na základě těchto

prací byla popsána konzervovaná sada transkripčních faktorů a signálních molekul vykazujících podobné vzorce exprese v zubním aparátu.

Jako klíčová signální dráha ve spojitosti s výměnou zubů se ukázala být kanonická Wnt signální dráha (Handrigan et Richman, 2010; Fraser et al., 2013; Gaete and Tucker, 2013; Wu et al., 2013; Jussila et al., 2014; Rasch et al., 2016, Square et al., 2021). Tato dráha řídí osud buněk pomocí regulace genové exprese. Wnt dráha se aktivuje navázáním ligandů Wnt na receptory Lrp a Frz na povrchu buněk. Tím se inhibuje multiproteinový komplex, také označovaný jako „destruktivní komplex“, který jinak reguluje hladinu  $\beta$ -catenin v cytoplazmě. Když se  $\beta$ -catenin nahromadí, přemístí se do jádra a interaguje s transkripčními faktory rodiny Tcf/Lef, které jsou při absenci aktivní Wnt signalizace navázány na Tle korepresory (MacDonald et al., 2009; Ring et al., 2014).  $\beta$ -catenin dokáže nahradit Tle korepresory z Tcf/Lef transkripčních faktorů a umožní tak spuštění exprese downstream genů (Daniels et Weis, 2005).

Manipulace s touto dráhou může vést k tvorbě nadpočetných zubů, jak bylo ukázáno u hadů a myši (Järvinen et al., 2006; Wang et al., 2009; Gaete et Tucker, 2013). Zvýšená aktivace nebo inhibice Wnt/ $\beta$ -catenin dráhy má však na vývoj náhradních zubů odlišný vliv v závislosti na tom, kde tato dráha působí, zda v epitelu či v mesenchymu. Umělé zvýšení epiteliální exprese  $\beta$ -catenin, vede u myších stoliček k zakládání nadpočetných zubů, které by jinak nevznikly (Järvinen et al., 2006). Naopak při inhibování epiteliální exprese  $\beta$ -catenin dochází k zastavení vývoje zubu ve stádiu zubního pupenu (Liu et al., 2008). Jestliže se však aktivita Wnt/ $\beta$ -catenin dráhy zvýší v mesenchymu, dochází naopak k inhibici vzniku nových zubů, zatímco inhibice této dráhy v mesenchymu vede k tvorbě nových zubů (Järvinen et al., 2018). U užovky červené (*Pantheropsis guttatus*) bylo ukázáno, že při aktivaci Wnt/ $\beta$ -catenin dráhy, došlo k vytvoření většího počtu zubních zárodků (Gaete et Tucker, 2013).

Ačkoli je myší dentice monofyodontní a tedy náhradní zuby netvoří, během vývoje dochází k vytvoření přechodné rudimentární následné dentální laminy (transient rudimentary successional dental lamina, RSDL). Tato rudimentární následná dentální lamina exprimuje transkripční faktor Sox2 (viz dále), a naopak neobsahuje žádnou signalizaci Wnt/ $\beta$ -catenin dráhy. Sox2 potlačuje aktivitu Wnt signální dráhy, ale při navýšení exprese Wnt dojde k downregulaci Sox2, tedy k negativní zpětné vazbě. U myši tak první vytvořený zub sice

zabraňuje tvorbě náhradního zubu, ale při umělé stabilizaci Wnt/ $\beta$ -catenin signální dráhy dojde k vytvoření nových zubních zárodků, které vznikají linguálně (Popa et al., 2019).

Na základě zmíněných prací se zdá, že Wnt/ $\beta$ -catenin signální dráha hraje zásadní roli v regulování oblastí kmenových buněk a při rozhodování, zda kmenové buňky setrvají kmenové, či začnou proliferovat a diferencovat se v buňky dentální.

#### 2.4. Kmenové buňky podílející se na nahrazování zubů

Pro vývoj a zachování všech orgánových soustav je nezbytná přítomnost kmenových buněk (Sánchez et Yamanaka, 2014). Jsou rozlišovány na embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells, ES) a dospělé kmenové buňky (adult stem cells, ASC). Embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní, u myši a člověka například pocházejí z vnitřní buněčné hmoty blastocysty a mají schopnost dát vznik ektodermu, entodermu i mesodermu (Thomson et al., 1998; Chambers et Smith, 2004; Thomson et al., 2011). Dospělé kmenové buňky zahrnují populaci buněk, které jsou charakteristické klidovým obdobím, asymetrickým dělením a plasticitou. Samy sebe obnovují a zároveň dávají vznik různým liniím buněčných progenitorů, zatímco zůstávají v nediferencovaném stavu, a to i po dlouhém neaktivním klidovém období (Fuchs et Segre, 2000; Zaminy, 2012; Bhartiya et al., 2019). Progenitorové buňky mohou vytvořit různé diferencované buňky, a to buď přímo, nebo nepřímo skrze přechodné vysoce proliferující buňky (tzv. transit amplifying cells, TA buňky). Tyto buňky jsou definovány jako multipotentní, počet jejich dělení je na rozdíl od kmenových buněk omezen, a nakonec u nich dochází k terminální diferenciaci (Potten et al., 1979). Dospělé kmenové buňky jsou tedy nepostradatelnou součástí při regeneraci tkání, nahrazování buněk ztracených v důsledku apoptózy či poranění. Aby kmenové buňky mohly správně fungovat po celý život organismu, je zapotřebí udržovat rovnováhu mezi sebeobnovou a diferenciací. Oblast, ve které se kmenové buňky nacházejí, je striktně regulované mikroprostředí, které tuto rovnováhu řídí (Spradling et al., 2001; Li et Xie, 2005).

Dentice schopné nahrazování zubů jsou zájmem zkoumání kmenových buněk. Identifikace kmenových buněk je však obtížná, a to převážně kvůli jejich nediferencovanému stavu (Bluteau et al., 2008). Z tohoto důvodu se při lokalizaci domnělých kmenových buněk využívají techniky, pomocí kterých lze popsat charakteristiky spojené s kmenovostí

buněk, tedy buňky s pomalým mitotickým cyklem nebo expresí konkrétních transkripčních faktorů. Takto využívaným je především transkripční faktor Sox2 (např. Juuri et al., 2013; Tucker et Fraser, 2014).

#### 2.4.1. Transkripční faktor Sox2 a jeho role při náhradě zubů

Rodina Sox genů byla poprvé definována objevem samčího SRY (sex determining region Y) (Gubbay et al., 1990; Berta et al., 1990). Proteiny této rodiny sdílejí vysoce konzervované HMG (high-mobility-group) DNA vázající domény. Do současné doby bylo popsáno 20 různých Sox genů (Schepers et al., 2002), které jsou podle stupně homologie v rámci domény HMG dále děleny do podskupin. Sox2 je spolu se Sox1 a Sox3 řazen jako člen skupiny SoxB1 (Bylund et al., 2003) a má zásadní funkci v embryonálním vývoji a v udržování pluripotence a sebeobnovy embryonálních kmenových buněk. Nicméně se Sox2 uplatňuje i při vývoji dalších mnoha struktur, např. při vývoji sítnice (Taranova et al., 2006), chuťových pohárků (Okubo et al., 2006), mozku (Ferri et al., 2004) nebo chlupových folikulů (Clavel et al., 2012).

Sox2 byl také identifikován jako marker epitelových zubních kmenových buněk, jehož exprese je konzervována od savců až po žraloky (Tucker et Fraser, 2014). U myšího řezáku byla Sox2 exprese pozorována v krčkové klíčce (cervical loop), což je oblast považovaná za zdroj epitelálních kmenových buněk (Juuri et al., 2012). Dále byla exprese Sox2 popsána v následné dentální lamině u savců, a to například u fretky (*Mustela putorius furo*), člověka (*Homo sapiens*) či králíka (Juuri et al., 2013; Jussila et al., 2014; Bertonnier-Brouty et al., 2020). I u plazů byla detekována exprese Sox2 v souvislosti s výměnou zubů, a to u aligátora severoamerického (*Alligator mississippiensis*), leguána zeleného (*Iguana iguana*), gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*), agamy vousaté (*Pogona vitticeps*), krajty královské (*Python regius*) a užovky červené (*Elaphe guttata*) (Handrigan et al., 2010; Gaete et Tucker, 2013; Juuri et al., 2013; Wu et al., 2013; Salomies et al., 2019). U medaky (*Oryzias latipes*) se Sox2 exprese nacházela na posteriorním konci zubní rodiny (Abduweli et al., 2014). Kromě epitelových zubních kmenových buněk potřebných pro vývoj ameloblastů zubu se Sox2 ukázal být klíčový i pro vývoj chuťových pohárků u myši (Okubo et al., 2006). V této souvislosti je zajímavé zmínit, že popsání exprese Sox2 u zástupců ze skupiny příčnoústých (Elasmobranchii) ukázalo, že zuby i anteriorní chuťové pohárky

vznikají ze sdílené oblasti Sox2+ progenitorů, která byla nazvána odontogustační pruh (odontogustatory band) (Martin et al., 2016; Rasch et al., 2020).

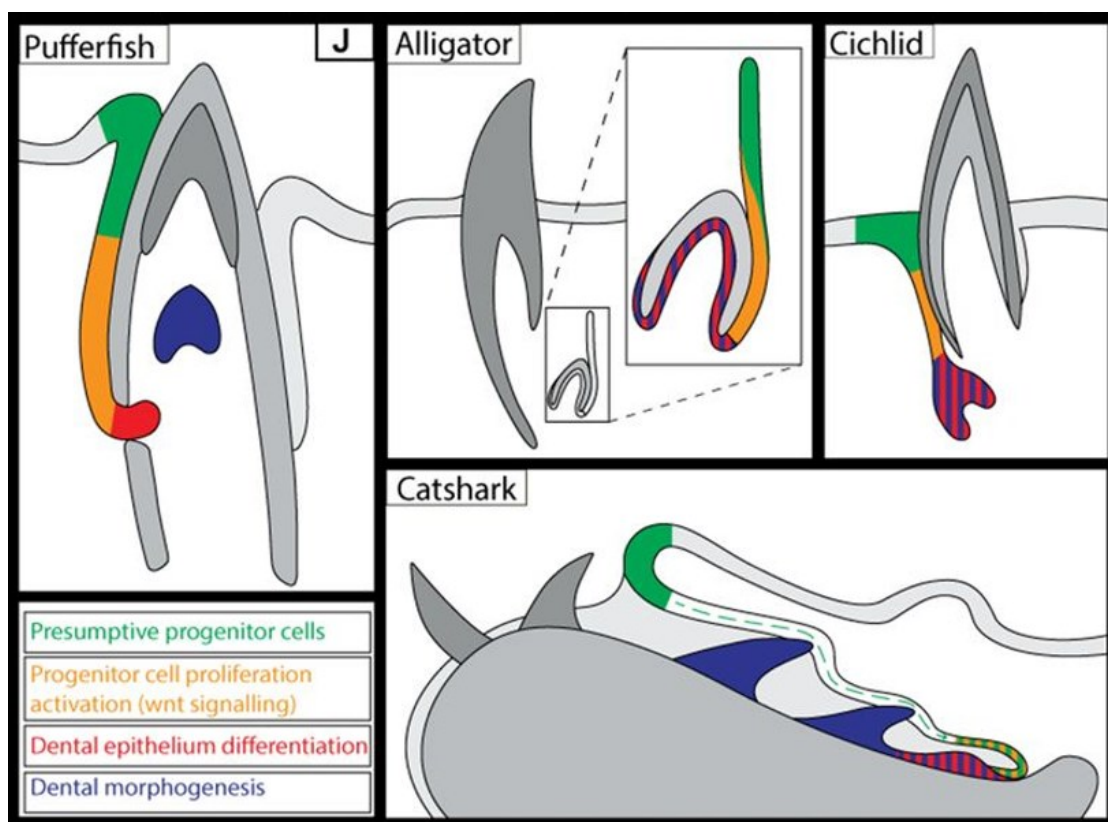
2.4.2. Domnělé kmenové/progenitorové buňky – pomalu cyklující buňky podílející se na náhradě zubů

Specifické markery kmenových buněk nejsou do dnešní doby přesně známy. Používaným a přijímaným způsobem pro značení kmenových/progenitorových buněk se stala retence DNA značky. Pro toto značení se dnes používají hlavně molekuly BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridin) nebo EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridin). BrdU nebo EdU se inkorporuje do nově syntetizované DNA buňky během S fáze buněčného cyklu. S každým dělením buňky se signál vyředuje, a proto po dostatečně dlouhé době po aplikování zůstanou označené jen „buňky, které si uchovávají značení“ – tzn. label retaining cells (LRCs). To znamená, že z proliferujících buněk signál zmizí, zatímco v kmenových buňkách, pomalu cyklujících buňkách a v terminálně diferencovaných buňkách signál přetrvá. Pro identifikaci proliferujících buněk se naopak využívá protilátkového značení PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Iatropoulos et Williams, 1996; Flomerfelt et Gress, 2016).

Za hlavní zdroj putativních odontogenních kmenových buněk je považována dentální lamina (Huysseune et Thesleff, 2004; Smith et al., 2009; Jernvall et Thesleff, 2012; Juuri et al., 2013; Thiery et al., 2017). U gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*) byly LRCs buňky identifikovány výhradně na linguální straně dentální laminy, která se vyznačuje nízkou mírou proliferace a nepodílí se na morfogenezi zubu. Tyto LRCs buňky tvořily organizované shluky v blízkosti následné dentální laminy. Jejich umístění na straně dentální laminy, která netvoří zub, by mohlo poukazovat na to, že zubní kmenové buňky jsou tímto způsobem izolovány od signálů, které by je jinak mohly přimět k diferenciaci (Handrigan et al., 2010). Dále byly LRCs buňky identifikovány na distální straně dentální laminy v jejím vyboulení (dental lamina bulge) u aligátora severoamerického (*Alligator mississippiensis*) (Wu et al., 2003). Když v tomto místě s klidovými zubními progenitorovými buňkami dojde k aktivaci fyziologickou exfoliací nebo umělou extrakcí, dojde k zahájení výměny zubu, což koreluje s aktivací Wnt/ $\beta$ -catenin signalizace, která způsobí proliferaci a dojde k prodloužení distálního konce dentální laminy. Počet LRCs buněk se během nahrazování zubu nemění, naopak počet TA buněk se při vývoji zubního zárodku navýší a postupně se snižuje během následného vývoje zubu (Wu et al., 2013). Další práce lokalizující LRCs buňky

ukazála jejich přítomnost v následné dentální lamině a orálním epitelu v oblasti setkání zubů a chuťových pohárků (taste/tooth junction, T/TJ) u máčky skvrnitě (*Scyliorhinus canicula*) a u rejnoků. Tento výskyt se shodoval s místy nálezů exprese Sox2 (Martin et al., 2016; Rasch et al., 2020). Přítomnost LRCs buněk byla také ukázána v dentální lamině blízko orálního epitelu u čtverzubců (Tetraodontidae) (Thiery et al., 2017).

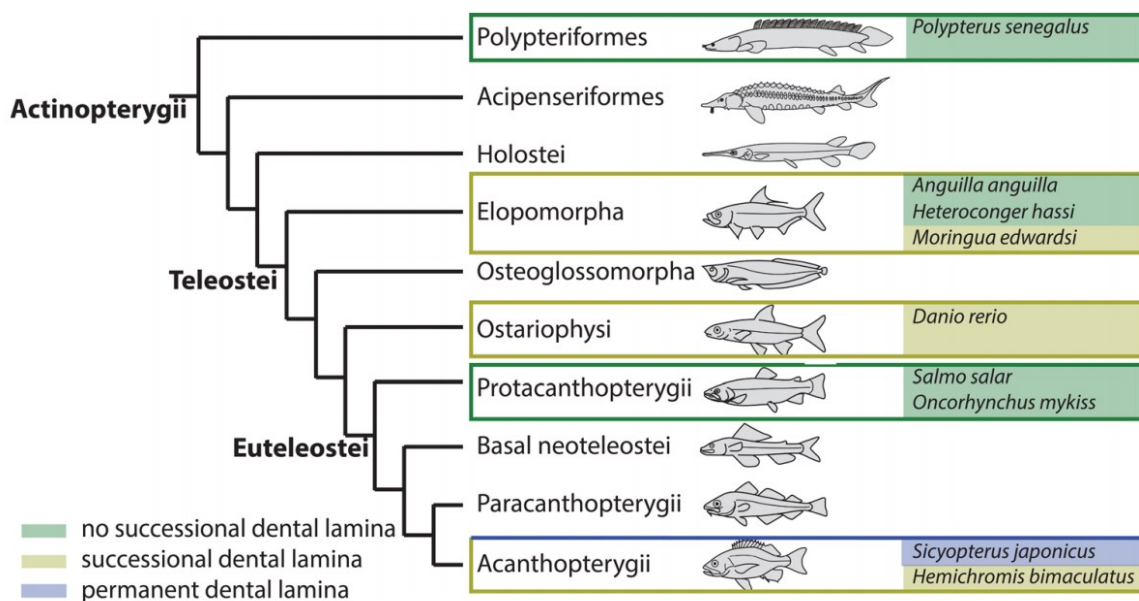
Na základě výše uvedených prací se zdá, že sídlem zubních kmenových buněk je dentální lamina. Kmenové buňky dávají vznik progenitorovým/TA buňkám, které proliferují a migrují do hlubokých částí dentální laminy, kde dochází k diferenciaci do zubních buněk a následné zubní morfogenezi, jak ukazuje obr. 1 u různých obratlovců (Thiery et al., 2017).



**Obr. 1:** Schéma znázorňující rozmístění srovnatelných částí následné dentální laminy u polyfyodontní dentice čtverzubce, aligátora, cichlidy a žraloka. Pomocí barev jsou zobrazeny čtyři hlavní vývojové etapy: zelenou barvou jsou znázorněny předpokládané zubní progenitorové buňky, žlutě aktivně proliferující progenitorové buňky (koexpresie Sox2 a aktivní Wnt signální dráhy), červeně diferenciaci dentálního epitelu (upregulace různých vývojových genů na distálním konci dentální laminy a růst zubního pupenu) a modře zubní morfogeneze (Thiery et al., 2017).

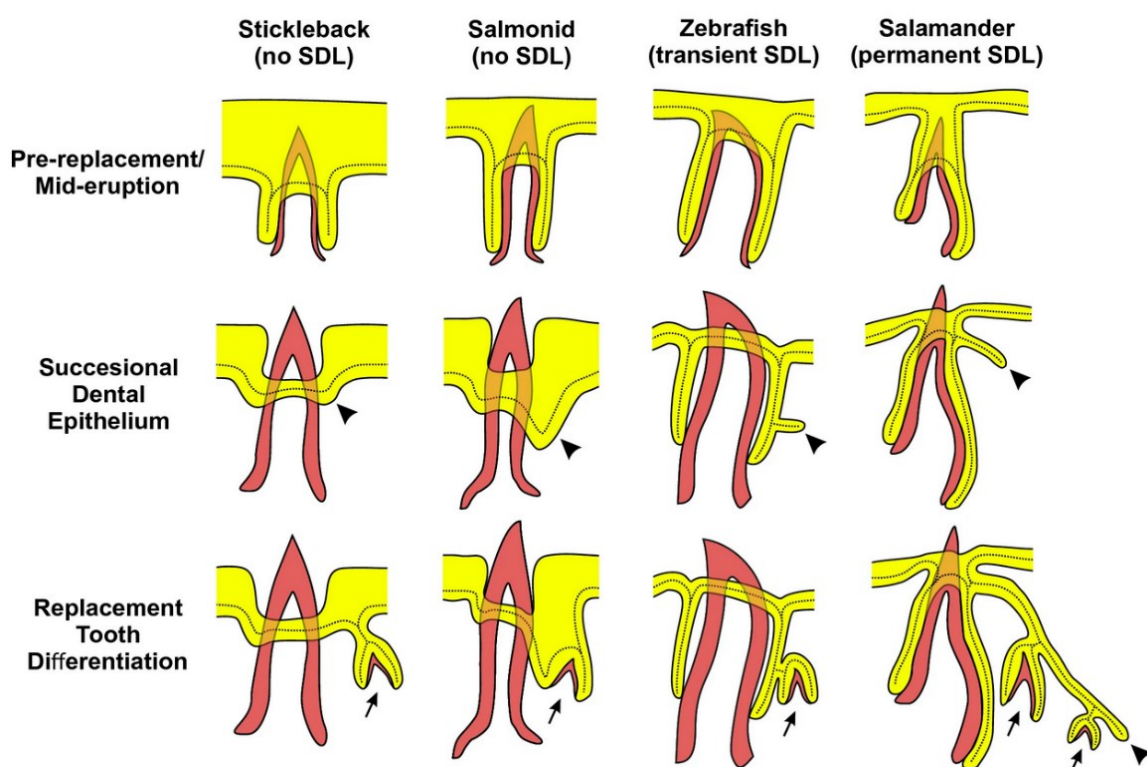
## 2.5. Vývoj zubů bez dentální laminy

Proces náhrady zubu se často uskutečňuje pomocí epiteliální struktury nazývané následná dentální lamina (viz výše). V recentních studiích však bylo ukázáno, že náhradní zuby mohou vznikat i bez dentální laminy z přilehlého povrchového epitelu. Tento způsob vzniku náhradních zubů byl doposud pozorován u několika zástupců paprskoploutvých ryb, jejichž fylogenetické vztahy ukazuje obrázek č. 2. Mezi ně patří pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) (Berkovitz, 1977; Fraser et al., 2006), losos obecný (*Salmo salar*) (Huysseune et Witten, 2008), bichir senegalský (*Polypterus senegalus*), úhoř říční (*Anguilla anguilla*), úhořovec Hassův (*Heteroconger hassi*) (Vandenplas et al., 2014), veslonos americký (*Polyodon spathula*) (Smith et al., 2015) a koljuška tříostná (*Gasterosteus aculeatus*) (Square et al., 2021). U všech těchto druhů se náhradní zub vyvíjí přímo z vnějšího dentálního epitelu předcházejícího zubu. Bylo navrženo, že funkci dentální laminy by zde mohl zastávat střední dentální epitel (middle dental epithelium) nacházející se mezi vnějším a vnitřním dentálním epitelem (Huysseune et Witten, 2008; Vandenplas et al., 2014). Tato hypotéza však později nebyla podpořena (Vandenplas et al., 2016).



**Obr. 2:** Schéma vyobrazující zjednodušené fylogenetické vztahy ve skupině paprskoploutvých ryb (Actinopterygii) s vyznačením přítomnosti či nepřítomnosti následné dentální laminy (Vandenplas et al., 2014).

Studium druhů s odlišným způsobem náhrady zubů, tj. náhrada prostřednictvím následné dentální laminy a náhrada bez následné dentální laminy z povrchového dentálního epitelu, ukázalo konzervovanou expresi sady genů asociovaných s odontogenezí. Jako souhrnný pojem pro oba typy nahrazování dentice byl navržen termín následný dentální epitel (successional dental epithelium, SDE), který by mohl představovat homologický konzervovaný dentální buněčný typ (Square et al., 2021). Oba způsoby nahrazování dentice by tak mohly být pouze odlišným fenotypovým projevem stejného systému vývoje zubů u obratlovců. Schematické zobrazení vývoje náhradních zubů u obou typů výměny ukazuje obrázek č. 3.



**Obr. 3:** Schématické vyobrazení následného dentálního epitelu u polyfyodontních dentic čtyř různých zástupců (koljuška, losos, dánio, žebrovník) s rozdílným nahrazováním zubů. Sagitální řezy, hlava orientována doleva. První dva sloupce ukazují situaci náhrady zubů bez dentální laminy (koljuška, losos), druhé dva sloupce situaci s následnou dentální laminou (dánio, žebrovník). Šipky značí zubní zárodky, hroty šipek značí následný dentální epitel. Převzato ze Square et al. 2021.

## 2.6. Studovaný druh jeseter malý (*Acipenser ruthenus*)

Jeseter malý (*Acipenser ruthenus*) patří do řádu Acipenseriformes (jeseteři), který zahrnuje jesetery, veslonose a fosilní příbuzné. Tento řád zastává v rámci fylogeneze obratlovců důležitou pozici – dnes uznávaný jako nejčasnější linie, která se odštěpila od ostatních větví vedoucích ke skupině Neopterygii, která obsahuje Lepisosteiformes (kostlíny), Amiiformes (kaprouny) a Teleostei (kostnatí) (Betancur-R et al., 2017). V současné době řád tvoří dvě čeledi. První z nich je čeleď veslonosovití (Polyodontidae) obsahující 2 druhy – veslonos americký (*Polyodon spathula*) a veslonos čínský (*Psephurus gladius*). Druhá čeleď nese název jeseterovití (Acipenseridae) a celkem obsahuje 25 druhů včetně rodů *Huso* (vyza), *Acipenser* (jeseter), *Pseudoscaphirhynchus* a *Scaphirhynchus* (lopatonosi). Tyto druhy jsou podle nejnovější fylogenetické studie rozdělovány do čtyř skupin: první skupina zahrnuje členy rodu *Scaphirhynchus*, druhá skupina spojuje *A. sturio* a *A. oxyrinchus* jako sesterské druhy, třetí skupina obsahuje pacifické druhy *A. dabryanus*, *A. sinensis*, *A. schrenckii*, *A. transmontanus* a *H. dauricus* a poslední čtvrtou skupinu tvoří druhy atlantické *A. baerii*, *A. fulvescens*, *A. gueldenstaedtii*, *A. persicus*, *A. ruthenus*, *A. stellatus*, *H. huso* a *P. kaufmanni*. Některé evoluční vztahy však stále zůstávají částečně nevyřešeny (Krieger et al., 2008; Luo et al., 2019).

Jeseteři jsou považováni za „živoucí fosílie“, protože se nezdá, že by se od svého vzniku před přibližně 200 milióny lety morfologicky příliš změnili. Mezi dnešními obratlovci vykazují jedno z nejpomalejších temp molekulární evoluce (Patterson, 1982; Krieger et Fuerst, 2002). Jeseteři, díky svým ojedinělým znakům, vzbuzují zájem morfologů již od 19. století. Od té doby vzniklo několik prací zabývajících se skeletem různých druhů (např. Parker, 1882; Nelson, 1969; Jollie, 1980; Dillman et Hilton, 2015; Warth et al., 2017a). Kostra jeseterů je nápadná pěti řadami velkých kostěných desek táhnoucích se podél těla, které je protáhlé a ventrálně zploštělé. Endoskelet jeseterů je z velké části chrupavčitý. Jejich kraniální morfologie je velmi specializovaná, umožňuje vysunovat čelistní aparát do značné vzdálenosti od neurokrania díky pohyblivému hyoidnímu oblouku a vyvázání čelistí ze závislosti na neurokraniu. Dále mají jeseteři výrazné rostrum s dvěma páry chemosenzitivních vousků a ústa lokalizována na ventrální pozici (Bemis et al., 1997). Přes poměrně rozsáhlé popisy chondrogenese a skeletogeneze je odontogeneze u této skupiny překvapivě poměrně málo prozkoumaná.

### 2.6.1. Dosavadní poznatky o dentici jeseterů ve srovnání s příbuznými veslonosy

Jeseteři a veslonosi sdílejí v rámci dentice a orofaryngeálního aparátu mnoho znaků. Mezi tyto znaky patří rozmístění zubních polí, remodelace orofaryngeálního aparátu během ontogeneze a bezzubost dospělých jedinců. Jeseteři ztrácejí zuby postupně v průběhu ontogeneze (Bemis et al. 1997, Hilton et al. 2011), u veslonosů dojde k vypadnutí zubů nebo je přeroste okolní kost (Grande et Bemis, 1991). U obou čeledí nicméně dochází ke kompenzaci nefunkční dentice přestavbou orofaryngeálního aparátu. Veslonosi nahrazují nefunkční dentici vytvořením filtračního aparátu (Imms, 1904; Grande et Bemis, 1991). Oproti tomu u jeseterů dochází ke vzniku vychlípitelných čelistí, které spolu s faryngeálními drtíci hřebeny utvářejí specializovaný aparát k nasávání a následnému rozdrčení kořisti (Nelson 1969, Findeis 1997, Warth et al. 2017b).

Podrobnější popis dentice veslonosů zpracovala až Moya Smith s kolegy (Smith et al., 2015) a detailnější popis jeseteří dentice se začal nedávno formovat na naší univerzitě převážně prací kolegyně Mgr. Anny Pospíšilové Ph.D. Další aspekty týkající se dynamiky, vývoje a náhrady dentice jesetera malého jsou rozpracovány v této diplomové práci.

### 3. Materiál a metody

Oplozené jikry jesetera malého (*Acipenser ruthenus*, Linnaeus, 1758) byly získány ve spolupráci s doc. Ing. Martinem Pšeničkou, Ph.D., který působí na Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém, Fakultě rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích sídlící ve Vodňanech. Tyto jikry byly odchováány ve studených akvarijních chovech Katedry zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v nádržích s roztokem E2 (zebrafish medium) a 1% antibiotiky penicilin/streptomycin. Vylíhlá larvální stádia byla až do požadovaného stupně ontogenetického vývoje chována v nádržích s vodou a krmena nitěnkami.

#### 3.1. Fixace

Po dosažení požadovaného ontogenetického stádia byli jedinci anestetováni pomocí MS-222 (Tricaine methanesulfonate, Serva) a následně přes noc fixováni 4% roztokem PFA (paraformaldehyd) pufovaným roztokem 0,1 M PBS (phosphate buffered saline). Druhý den byli jedinci převedeni do methanolu postupným promýváním po 15 minutách pomocí methanolové vzestupné řady (25%, 50%, 75%, 100%). Zafixovaní jedinci byli skladováni při teplotě -20 °C. Velikost jedinců byla vždy měřena po fixaci od špičky rypce po nejdelší paprsek ocasní ploutve (total length = TL).

#### 3.2. Parafínová histologie

Před započítím protokolu pro parafínovou histologii byly vzorky dekalcifikovány. Nejprve byly vzorky převedeny do PBS postupným promýváním po 15 minutách pomocí methanolové sestupné řady (100%, 75%, 50%, 25%), poté byly převedeny do roztoku EDTA (2,5 g EDTA a 17,5 ml dH<sub>2</sub>O) o výsledném pH 7,0. Doba působení EDTA závisela na velikosti stádií, stádia menší jak 20 mm TL byla dekalcifikována přes noc, stádia nad 20 mm TL minimálně 2 dny.

Dekalcifikované vzorky byly 10 minut promývány v PBS, dále v každém kroku po 10 minutách odvodněny vzestupnou ethanolovou řadou (25%, 50%, 80%, 96%, 100%). Z ethanolu byly vzorky převedeny do xylenu (3x 20 minut) a následně promyty směsí xylenu-paraplast v poměru 1:1 při teplotě 58 °C (2x 20 minut). Při stejné teplotě byly vzorky

přesunuty do paraplastu. Paraplast byl vyměněn 2x po dvouhodinových intervalech, v posledním paraplastu se vzorky nechaly inkubovat přes noc. Další den následovalo orientování a polohování vzorků v silikonovém bločku. Po ztuhnutí při pokojové teplotě byl vzorek připevněn pomocí paraplastu na dřevěnou kostku a následně nakrájen na mikrotomu (Leica RM 2155). Řezy o tloušťce 10  $\mu\text{m}$  byly pomocí pinzety položeny do kádinky na vodní hladinu (pro lepší vypnutí řezu), dále naorientovány na předem nahřáté podložní sklíčko a sušeny na ploténce o teplotě 40 °C. Vyschnuté vzorky na sklíčkách byly 20 minut zapékány při teplotě 58 °C, aby při další práci nedošlo k odplavení řezů. Takto připravené řezy byly použity pro barvení směsí hematoxylin/eosin, barvení protilátkami a metodou TRAP.

### 3.3. Plastová histologie

Obdobně jako u parafínových řezů byly vzorky nejprve dekalcifikovány. Po dekalcifikaci byla pod binolupou vypreparována jednotlivá zubní pole, která byla 10 minut promývána v PBS, dále odvodněna ethanolovou vzestupnou řadou (25% - 10 minut, 50% - 10 minut, 70% - 20 minut, 80% - 20 minut, 96% - 20 minut, 100% - 20 minut). K zalití vzorků byla použita histologická sada Technovit, která se skládá ze složek Technovit 1 a Technovit 2. Ve složce Technovit 1 byly vzorky nechány nejprve 30 minut, poté byla složka vyměněna za čistou a vzorky byly takto ponechány přes noc při pokojové teplotě. Druhý den byla smíchána složka Technovit 1 (15 ml) a Technovit 2 (1 ml), vzorky byly zality do této směsi, napolohovány a překryty parafilmem. Polymerizovaný bloček byl další den nakrájen na mikrotomu (Leica RM 2155) na řezy o tloušťce 5  $\mu\text{m}$ . Ty byly stejně jako řezy parafínové přeneseny na nahřáté podložní sklíčko a sušeny na ploténce o teplotě 40 °C.

### 3.4. Histologické barvení

#### 3.4.1. Hematoxylin/eosin

Barvení směsí hematoxylin/eosin bylo použito na parafínové řezy. Samotnému barvení předcházelo zapečení řezů (20 minut na 58 °C), a následná deparafinizace použitím xylenu 2x po 10 minutách. Preparáty byly barveny po dobu 30s v hematoxylinu, poté na okamžik ponořeny do eosinu a následně promyty destilovanou vodou. Obarvené preparáty byly zakápnuty Mowiolem, přikryty krycím sklem a zalakovány. Řezy byly analyzovány pod mikroskopem Olympus BX 51.

### 3.4.2. Azure B/eosin

Pomocí azure B/eosin byly barveny plastové řezy (Technovit) po dobu 5 minut. Poté byly 3x promyty destilovanou vodou a usušeny na ploténce o teplotě 40 °C. Dále byla na preparáty nanášena pryskyřice DPX a řezy byly překryty krycím sklem. Po zatuhnutí byly řezy analyzovány pod mikroskopem Olympus BX 51.

### 3.5. Imunohistochemie – protilátkové barvení

Zapečené parafínové řezy byly deparafinizovány s použitím xylenu 2x po 10 minutách, a poté převedeny sestupnou ethanolovou řadou v pětiminutových intervalech do destilované vody (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%, 25%). Po hydrataci následovala permeabilizace prostřednictvím citrátového pufru (10 mM kyselina citronová, 0,05% Tween 20, pH 6,0) ve vodní lázni o teplotě 97 °C po dobu 20 minut. Po vychladnutí byly řezy přesunuty do vlhké komůrky a promyty 0,025% roztokem Tritonu v PBS. Po 5 minutách byly řezy obtaženy hydrofobním fixem a zality 1% roztokem BSA (bovine serum albumin, Sigma) na minimálně 1 hodinu. Dále byla na řezy přidána primární protilátka v roztoku 1% BSA. Koncentrace každé protilátky byla upravena dle dostupné literatury a empirických dat. Použité protilátky, které fungovaly, jsou uvedeny v tabulce č. 1, nefungující protilátky v tabulce č. 2. Řezy s primární protilátkou byly přes noc inkubovány při teplotě 4 °C.

Tabulka č. 1 – fungující protilátky

Název protilátky	Výrobce	Katalogové číslo	Biologický zdroj	Koncentrace
anti-Shh	Santa Cruz	sc-365112	mouse	1:10
anti-Sox2	Abcam	ab97959	rabbit	1:1250
anti-Sox2	R&D systems	AF2018-SP	goat	1:1250
anti-Calretinin	Abcam	Ab702	rabbit	1:500
anti-PCNA	Abcam	ab29	mouse	1:2000
anti- $\beta$ -catenin	Thermo Fisher	PA5-16429	rabbit	1:500
anti-Pitx2	R&D systems	AF7388	sheep	1:1000
anti-Sox9	EMD Millipore	AB5535	rabbit	1:500
anti-E-cadherin	Abcam	Ab76055	mouse	1:250

Tabulka č. 2 – nefungující protilátky

Název protilátky	Výrobce	Katalogové číslo	Biologický zdroj	Koncentrace
anti- $\beta$ -catenin-ABC	Sigma	05-665	rabbit	1:250
anti-Calbindin-D-28K	Sigma	SAB4200543	mouse	1:250

Druhý den byla primární protilátka odsáta, řezy 3x 5 minut promývány 0,025% roztokem Tritonu v PBS a dále byla přidána sekundární protilátka Alexa Fluor 488 nebo Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher) v roztoku 1% BSA v koncentraci 1:1000 na minimální dobu 2,5 hodin při pokojové teplotě. Po odmytí sekundární protilátky pomocí roztoku PBS byl na podložní sklíčko přidán roztok Fluoroshield s DAPI (Sigma) nebo jako alternativa Mowiol s DAPI. Následně bylo podložní sklíčko překryto sklíčkem krycím, jehož okraje byly zalakovány. Sklíčka byla skladována při teplotě 4 °C a analyzována na fluorescenčním mikroskopu Olympus Cell-R.

### 3.6. *In situ* hybridizace (ISH)

#### 3.6.1. Whole-mount *in situ* hybridizace (WISH)

*In situ* hybridizace probíhala na whole-mount jedincích fixovaných ve 100% methanolu, kterým byly pro lepší penetraci sond do faryngeální oblasti nastřiženy koutky úst. Vzorky byly rehydratovány sestupnou methanolovou řadou (100%, 75%, 50%, 25%) a poté 2x promyty v 0,1M PBS-T (PBS, 0,1% DEPC, 0,2% Tween 20). Dále proběhlo bělení (bleaching) jedinců pro odstranění pigmentu a pro zvýšení kontrastu výsledného signálu. Pro tento účel byl použit roztok 10% peroxidu vodíku, 5% formamidu a 0,5% SSC v destilované vodě. Pro urychlení reakce byly vzorky umístěny pod přímé světlo, a depigmentace byla zastavena promytím v roztoku PBS-T 2x po dobu 5 minut. Následovalo přidání proteinázy K za účelem degradace RNA vazebných proteinů. Koncentrace i doba působení proteinázy K se lišila podle velikosti jedinců. U zde použitých jedinců (12-16 mm) byl použit roztok proteinázy K 20 mg/ml v PBS-T po dobu 45 minut. Následně byly vzorky 20 minut fixovány ve 4% PFA a promyty v PBS-T. V dalším kroku byl k PBS-T přidán hybridizační roztok v poměru 1:1 po dobu 5 minut. Proces prehybridizace probíhal již v čistém hybridizačním roztoku po dobu alespoň 60 minut při teplotě 60 °C. V posledním kroku byla do hybridizačního roztoku přidána DIG značená próba a vzorky ponechány v hybridizační peci

přes noc. Próby pro mRNA *in situ* hybridizaci byly vyrobeny kolegou Mgr. Janem Štundlem Ph.D. na základě jím asemblovaného transkriptomu s využitím následujících primerů: Lef1 (forward 5'-GMTAYCCHGGBTACATCATG, reverse 5'-GTGAAGCTGCCKTTCYTTVC), Shh (forward 5'-GCBATYTCDGTRATGAACCA-3', reverse 5'-CARSRSYTGAGTACCACT-3'), Sox2 (forward 5'-AAYGCBTTYATGGTNTGGTC, reverse 5'-CYSAYRTCRTARCGGTGCAT), Pitx2 (forward 5'-ATGCAGCCCTACGAAGACAT-3', reverse 5'-ATTTAGGTGACACTATAGTGGAGTTGCAAGTGCCCTA-3').

Druhý den byla snížena teplota v hybridizační peci na 58 °C. Vzorky byly 10x promyty v posthybridizačním roztoku po 15 minutách, poté převedeny do MAB-T a vychlazeny na pokojovou teplotu a následně znovu promývány v MAB-T po dobu 20 minut. Dále byl ke vzorkům přidán na 1 hodinu blokovací roztok (blokovací činidlo, ovčí sérum a MAB-T v poměru 1:1:3), který zabraňuje nespecifickým interakcím navazující se protilátky. Poté byla ke vzorkům přidána protilátka anti-DIG-AP (anti-digoxygenin s navázanou alkalickou fosfatázou) v koncentraci 1:3000 a vzorky byly inkubovány přes noc v lednici při teplotě 4°C.

Třetí den byly vzorky promyty v MAB-T 10x po 15 minutách, aby došlo k vymytí nenavázané protilátky. Poté byly vzorky promyty 2x 5 minut a 1x 10 minut v NTMT (0,1M Tris, 0,1M NaCl, 0,05M MgCl<sub>2</sub>, Tween 20, dH<sub>2</sub>O). Vizualizace navázané mRNA sondy proběhla chromogenní reakcí po přidání BM purple (Sigma). Po vyvinutí signálu byli jedinci zafixováni v 4% PFA.

Celý používaný protokol je uveden v příloze této práce.

### 3.6.2. Analýza ISH na řezech

Řezy byly provedeny na již hybridizovaných jedincích. Nejprve byli jedinci promyti v PBS, poté v čistém roztoku směsi želatiny a albuminu v poměru 1:1, následně byli přesunuti do polohovací komůrky s želatinou/albuminem a přidavkem 100 µl glutaraldehydu. Směs želatiny/albuminu a glutaraldehydu umožňuje ztvrdnutí vzorku po cca 1 hodině. Ztvrdnuté bločky byly nalepeny sekundovým lepidlem na terčík a nakrájeny na vibratomu (Leica VT 1200S) na 40 µm tlusté řezy. Tyto řezy byly přeneseny na podložní skla, zakápnuty Mowiolem s přidavkem DAPI, překryty krycím sklem a zalakovány.

### 3.7. TRAP barvení

Barvení TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) bylo prováděno na parafínových řezech (viz parafínová histologie). Nejprve byly vzorky rehydratovány a promyty destilovanou vodou. Dále byly vzorky inkubovány ve tmě při teplotě 37 °C v roztoku TRAP složeného ze tří složek: 0,2 M acetate buffer (0,2 M acetic acid, 0,2 M sodium acetate) + 100 mM sodium tartrate dibasic dihydrate (Sigma), 6% substrate solution (2 mM naphthol-AS-TR-phosphate [Sigma] in N,N-dimethylformamide), Fast Red TR Salt (Sigma, 60 mg/100 ml). Vzorky se v tomto roztoku nechaly inkubovat po dobu 1 hodiny. Poté byly vzorky promyty vodou z vodovodu a krátce barveny v roztoku Mayerova hematoxylinu a eosinu. Řezy byly analyzovány pod mikroskopem Olympus BX 51.

### 3.8. Kalceinové barvení

Pro kalceinové barvení bylo vybráno 30 jedinců o velikosti přibližně 30 mm TL. Tito jedinci byli po dobu 6 minut ponořeni do 0,2% roztoku kalceinu (2 g kalceinu (Sigma) a 1 l destilované vody, pH=7) a poté byli několikrát promyti v čerstvé vodě. Následný odchov probíhal v zatemněné nádrži. Fixace jedinců probíhala průběžně po dobu 6 týdnů, přičemž každý týden bylo zafixováno 5 jedinců. Jedinci byli usmrceni pomocí MS-222 (Sigma), následně byli fixováni ve 4% PFA a uchováni ve tmě.

### 3.9. Alizarin Red barvení

Jedinci barveni pomocí Alizarin Red (Sigma) byli fixováni 4% PFA a před započítím barvení byli promyti destilovanou vodou. Po změření celkové délky byly jedincům odřezány spodní čelisti a části těla posteriorně od břišních ploutví. Vzorky byly barveny 1 hodinu v 0,5% roztoku KOH s přídavkem Alizarin Red, pak byly 5x promyty čistým 0,5% roztokem KOH. Následně byly vzorky převedeny do glycerolu vzestupnou řadou (25%, 50%, 75%, 100%) po jednodenních intervalech.

### 3.10. EdU experiment a EdU whole-mount barvení

Pro EdU experiment bylo vybráno 30 jedinců o velikosti přibližně 30 mm TL. Každý den po dobu dvou týdnů byli tito jedinci na 2 hodiny přemístěni do nádrže s roztokem EdU (5 mg EdU v 500 µl DMSO do 500 ml vody) za stálého prokysličování vody. Po ukončení působení

EdU byla provedena první fixace po 5 jedincích (čas  $t_0$ ), poté následovaly fixace rovněž po 5 jedincích každý týden (celkem 4 fixace, 10 jedinců v průběhu experimentu uhynulo). Fixace proběhla v 4% PFA po anestezii MS-222 a druhý den byli jedinci převedeni do methanolu vzestupnou methanolovou řadou (25 %, 50 %, 75 %, 100 %) a uskladnění v  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Ze 100% methanolu byly vzorky převedeny do PBS sestupnou methanolovou řadou (75%, 50%, 25%) po patnáctiminutových intervalech. Před zahájením barvení byla pod binolupou vypreparována jednotlivá zubní pole. Takto připravené vzorky byly 3x po dobu 5 minut promyty v 1% roztoku Tritonu, 90 minut natráveny v 2,5% trypsinu a promyty 3x po dobu 5 minut v destilované vodě. Dále byly vzorky na 10 minut převedeny do acetonu a umístěny do  $-20^{\circ}\text{C}$ . Po 10 minutách byly vzorky vyndány na pokojovou teplotu a byly 10 minut promývány v destilované vodě. Následně byly opět po dobu 3x 5 minut promývány v 1% roztoku Tritonu. Po posledním promývání roztokem Tritonu byl použit čerstvě připravený roztok vzniklý smícháním složek EdU Click-it reaction kit (Thermo Fisher) v tomto pořadí: 1. EdU reaction buffer (Tris buffered saline) 1,7 ml,  $\text{CuSO}_4$  (4mM in 1x Tris) 80  $\mu\text{l}$ , 3. Alexa Fluor azide 20  $\mu\text{l}$ , 4. buffer additive (sodium ascorbate 100mM in 1x Tris) 200  $\mu\text{l}$ . Vzorky byly ponechány v EdU barvicím roztoku po dobu 2 hodin a poté 5x promyty v PBS. Následně byly vzorky dehydratovány do 100% ethanolu vzestupnou ethanolovou řadou (25%, 50%, 80%, 96%, 100%) a převedeny do Technovitu (viz plastové řezy). Řezy byly krájeny na tloušťku 5  $\mu\text{m}$  na mikrotomu Leica RM 2155. Na řezy byl přidán Fluoroshield s DAPI a krycí sklo, jehož okraje byly zalakovány. Řezy byly analyzovány na fluorescenčním mikroskopu Olympus Cell-R.

Tento experiment byl proveden dvě následující sezóny po sobě. První experiment byl vykonán kolegou Soukupem Ph.D. a Pospíšilovou Ph.D. jako zkušební. Oba experimenty měly po dokončení obdobné výsledky. Pro potřeby této diplomové práce byly využity data pouze ze druhého experimentu.

### 3.11. Mikroskopická technika a zpracování dat

Histologické preparáty byly analyzovány mikroskopem Olympus BX51, snímky byly pořizovány programem SPOT. Fluorescenční mikroskopické preparáty byly analyzovány na mikroskopu Olympus Cell-R s programem Xcellence RT. Celí jedinci byli pozorováni pod binolupou Olympus SZX12 motorizovaným posunem v ose z. K pořízení a složení

výsledného obrazu byl použit program QuickPhoto.Micro. Fluorescenční fotografie celých jedinců byly pořízeny na binolupě Zeiss SteREO Lumar.V12 s motorizovaným posunem v ose z a kamerou Axio CAM za pomoci programu ZEN. Fotografie byly upravovány v programu Adobe Photoshop 2019 a Fiji, schémata byla vytvořena ve vektorovém programu Inkscape.

## 4. Výsledky

### 4.1. Stavba dentice jesetera malého

Dentice jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) je lokalizována v orální, palatální a faryngeální oblasti, jak je schematicky znázorněno na Fig. 1 (č. 1-6). Dentice je uspořádána do zubních polí, která sdílejí společné znaky, ale v mnoha aspektech se odlišují. Tyto odlišnosti budou rozebrány níže u popisu jednotlivých zubních polí, pro jejichž analýzu byla použita metoda barvení vápenatých struktur pomocí Alizarin Red. Při popisu uspořádání dentice, počtu jednotlivých zubů a zubních řad je nutné mít na paměti variabilitu mezi jedinci, ale i variabilitu v rámci pravé a levé strany dentice jedinců.

#### 4.1.1. Orální dentice

Orální dentici tvoří dorzálně zuby na dermopalatinu (Fig. 2A, DPT) a ventrálně na dentale (Fig. 4A, DE). Tato dentice se od ostatních zubních polí odlišuje nejvíce, a to zejména tím, že má monostichní uspořádání (tvoří pouze jednu funkční zubní řadu) (Fig. 2A, Fig. 4A) a je monofyodontní (tvoří pouze jednu zubní generaci bez náhradních zubů) (Pospíšilová et al., in prep.). Tyto zuby jsou funkční jen krátkou část života jedince a brzy vypadávají.

#### 4.1.2. Palatální dentice

Palatální dentice byla identifikována ve formě zubního pole na kostěném palatopterygoidu (Fig. 1A, 1B, č.2). Ke sledování vývoje tohoto zubního pole byli vybráni jedinci o velikosti 30 mm, 47 mm, 56 mm a 66 mm TL (Fig. 2A–2D). Toto zubní pole se skládá z jednotlivých zubů s jednou špičkou, které mají jednoduchý kónický tvar s mírným zahnutím na posteriorní části (Fig. 2D'). Mineralizace zubů můžeme pozorovat od jejich špiček. Poté dochází k mineralizaci zubních kónů a bází, a nakonec k připojení k bázím ostatních zubů daného zubního pole. Podle mineralizovaných špiček můžeme identifikovat nově přirůstající zuby, které se později budou připojovat k zubními poli (Fig. 2A'–2D', žluté hroty šipek). Jednotlivé zuby se v průběhu růstu jedince zvětšují a distálně protahují (srovnej Fig. 2A' a 2D'). Dochází i ke zvětšování celého zubního pole v antero-mediálním směru. Zuby vznikají blízko u sebe, vytvářejí nepravidelné zubní řady a jejich špičky směřují do různých stran (Fig. 2D'). U jedince o velikosti 30 mm TL se zubní pole skládá v nejširším místě ze čtyř

zubních řad (Fig. 2A'). U jedince o velikosti 47 mm TL je v nejširším místě přítomno pět zubních řad (Fig. 2B'), u starších jedinců o velikosti 56 mm TL a 66 mm TL se počet zubních řad snižuje na tři zubní řady (Fig. 2C', 2D'). Na posteriorním okraji zubního pole je patrné, že zde dochází k jeho narušování, viditelné jsou otvory po vypadnutí zubů (Fig. 2B'–2D', bílé hroty šipek). Nové zuby zde tedy přirůstají, narozdíl od ostatních zubních polí, na anteriorní straně zubního pole (Fig. 2 A'–D', žluté hroty šipek) a vypadávají na straně posteriorní (Fig. 2B'–2D', bílé hroty šipek).

#### 4.1.3. Faryngeální dentice

Další zubní pole jesetera malého se nacházejí v anteriorní části faryngeální oblasti v asociaci s faryngeálními chrupavkami. Dorzálně se jedná o infrapharyngobranchiale na prvním žaberním oblouku (Fig. 1A, 1B, č. 3), ventrálně o hypobranchiale na prvním žaberním oblouku (Fig. 1A, 1C, č. 5) a hypobranchiale na druhém žaberním oblouku (Fig. 1A, 1C, č. 6) (dále označováno jako hypobranchiale 1 a 2).

K popsání vývoje zubního pole lokalizovaného na infrapharyngobranchiale byli vybráni jedinci o velikosti 36 mm, 47 mm, 56 mm a 66 mm TL (Fig. 3A–3D). Zuby tohoto zubního pole mají podobně jako zuby na palatopterygoidu jednoduchý kónický tvar s mírně zahnutou špičkou (Fig. 3D'). Na rozdíl od dentice na palatopterygoidu však není patrné zvětšování jednotlivých zubů s růstem jedince, pouze zvětšování celé zubní desky (srovnej Fig. 3A' a 3D'). Zuby jsou uspořádané do zubních řad. U jedince o velikosti 36 mm TL vidíme až čtyři zubní řady (Fig. 3A'), u jedince o velikosti 47 mm TL dosahuje zubní pole pěti zubních řad (Fig. 3B'), jedinci o velikosti 56 mm a 66 mm TL mají zubní řady opět čtyři (Fig. 3C', 3D'). Špičky jednotlivých zubů mohou v zubní řadě směřovat různými směry (Fig. 3C'). Zvětšování zubní desky probíhá postero-mediálně, u starších stádií se obě pole vzájemně přibližují (srovnej Fig. 3A a 3D). Dalším rozdílem oproti palatopterygoidní dentici je směr přirůstání a vypadávání dentice. Mineralizované špičky nově přirůstajících zubů jsou patrné na posteriorní části zubního pole (Fig. 3A'–3D', žluté hroty šipek), známky rozrušení a perforace zubního pole vidíme naopak na anteriorní straně (Fig. 3A'–3D', bílé hroty šipek). Zajímavé je, že některé zuby mohou vznikat odděleně od zbytku zubní desky a vytvořit tak izolovanou menší zubní desku (Fig. 3A, modrý hrot šipky). Z dostupných dat nelze určit, zdali se tyto zubní desky v následujícím vývoji spojí dohromady, či zůstanou samostatné,

jelikož je patrné rozdělení zubní desky i u staršího jedince o velikosti 66 mm TL (Fig. 3D, modrý hrot šipky). Je pravděpodobné, že se nejedná o původně celistvé zubní pole, které by se následně rozdělilo v souvislosti s vypadáváním dentice, jelikož nikdy nebyla detekována ztráta zubů uprostřed zubního pole (viz dále).

Dentici na hypobranchiale 1 u jedinců o velikosti 30 mm, 47 mm, 56 mm a 66 mm TL znázorňuje Fig. 4. Dentice je jako u předchozích zubních polí uspořádána do zubních řad, které jsou spojeny připojovací kostí do zubních desek. Počet zubních řad je proměnlivý. Zubní pole se u jedince o velikosti 30 mm TL skládá ze čtyř zubních řad (Fig. 4A', HYP1), u staršího jedince o velikosti 47 mm TL z šesti zubních řad (Fig. 4B'), u jedinců o velikostech 56 mm a 66 mm TL z pěti zubních řad (Fig. 4C', 4D'). Zubní pole v průběhu růstu jedince mění i svůj tvar (srovnej Fig. 4A a 4D). U jedinců 30 mm a 47 mm TL jsou zuby v posteriorní části zubního pole seřazeny téměř v rovině, v laterální části je zubní pole nejužší a postupně se antero-mediálně rozšiřuje (Fig. 4A', 4B'). U jedinců 56 mm a 66 mm TL se zubní pole mediálně prodlužuje, posteriorně se prohýbá a vytváří tak tvar podobný srpku (Fig. 4C', 4D'). Zuby zde vypadávají a přirůstají stejným způsobem jako u zubního pole na infrapharyngobranchiale, tj. nové zubní zárodky vznikají na posteriorní straně zubního pole (Fig. 4A'–4D', žluté hroty šipek) a na anteriorní straně dochází ke ztrátě zubů (Fig. 4B'–4D', bílé hroty šipek). Nové zuby vznikají v pozicích mezi zuby předešlé zubní řady (Fig. 4A'–4D'). Na anteriorní straně zubního pole jsou znatelné zbytky připojovací kosti, u které po vypadávání zubů dochází k resorpci (viz dále) (Fig. 4C', 4D', modré hroty šipek). Podobně jako u zubního pole na infrapharyngobranchiale i zde vidíme vzniklý plně mineralizovaný zub izolovaný od zbytky zubní desky (Fig. 4B', modrý hrot šipky).

Z obrázku 4A je patrné, že zatímco zubní pole na hypobranchiale 1 (HYP1) je již utvořené z několika zubních řad, na hypobranchiale 2 (HYP2) teprve začínají vznikat první samostatné zuby. U jedince o celkové velikosti 30 mm tvoří toto zubní pole pouze pár jednotlivých zubů (Fig. 4A). U dalších jedinců 47 mm, 56 mm a 66 mm TL můžeme pozorovat vznik celé zubní desky. U nejstaršího jedince o velikosti 66 mm TL vidíme zubní pole rozdělené na tři části – izolované zuby anteriorně (Fig. 4D, modrý hrot šipky) a pod nimi další dvě samostatné seskupení zubů, mezi kterými však vidíme posteriorně vznik nového zubu (Fig. 4D, žluté hroty šipek), což by mohlo znamenat následné spojení těchto částí. Vývoj zubního pole na hypobranchiale 2 je oproti ostatním zubním polím výrazně

opožděn. Z tohoto důvodu byla další podrobnější analýza prováděna pouze na dentici na hypobranchiale 1.

#### 4.1.4. Shrnutí společných znaků palatální a faryngeální dentice

Společné znaky palatální a faryngeální dentice představují polyfyodontní charakter (více zubních generací, které nahrazují zuby vypadnuté), polystichní uspořádání (více funkčních zubních řad) a dynamický vývoj, kterým jednotlivá zubní pole procházejí. Vývoj zubů začíná mineralizací jejich špičky, což je patrné u všech zubních polí u nově vznikajících zubů (Fig. 2, Fig. 3 a Fig. 4, žluté hroty šipek). Poté dochází k mineralizaci zubních kónů a bází, a nakonec k připojení k bázím ostatním zubům daného zubního pole. Zuby mají ve všech zubních polích přibližně stejný jednoduchý kónický tvar. Na Fig. 2, Fig. 3 a Fig. 4 vidíme postupně se měnící zubní pole, která procházejí významnou strukturální přestavbou. Na jedné straně zubních polí vždy dochází k vypadávání zubů, na straně opačné dochází k adici zubů nových. Zubní pole se během ontogeneze rozšiřují, dokud nedojde k zastavení vývoje nových zubů a postupně k úplné ztrátě dentice. Všichni mnou analyzovaní jedinci měli stále funkční dentici.

#### 4.2. Dynamika vývoje zubů a rychlost obměny dentice v rámci jednotlivých zubních polí

Barvení pomocí Alizarin Red ukázalo morfologickou stavbu a proměnu jednotlivých zubních polí v závislosti na vývoji jedinců. Pro porozumění, jak se tyto vyzorované změny dentice odehrávají, byla provedena detekce aktivity enzymu TRAP a experiment s využitím kalceinového barvení.

##### 4.2.1. Analýza ztráty dentice

Pro detailnější pohled na vypadávání zubů byla použita metoda detekce aktivity tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). TRAP je enzym, který způsobuje degradaci mineralizované matrix a je produkován osteoklasty a odontoklasty (Okamura et al., 1993; Sasaki et al., 2003).

U zubního pole na hypobranchiale 1 je signál aktivity enzymu TRAP viditelný při bázi zubu, který leží nejvíce anteriorně. Signál je přítomný na anteriorní straně zubu ve dvou místech, mezi kterými je již patrné rozrušení zubu (Fig. 5A, 5B, bílé hroty šipek). Za tímto zubem se

nachází další zub, který je funkční a nejvíce posteriorně je vyvíjející se nový zubní zárodek (Fig. 5A, 5B, žluté hroty šipek), u těchto zubů nebyl detekován žádný signál aktivity TRAP (Fig. 5A, 5B). U zubního pole na palatopterygoidu je signál naopak přítomný v nejvíce posteriorním zubu této zubní rodiny. U této situace vidíme pokročilejší fázi ztráty zubu než u předchozího případu (srovnej Fig. 5A, 5B a 5C, 5D). Zde již došlo k vypadnutí zubu a zbývají pouze zbytky jeho rozrušené báze (Fig. 5C, 5D, bílé hroty šipek). Před ním se nachází plně funkční zub a anteriorně od něj vznikající zubní zárodek (Fig. 5C, 5D, žluté hroty špiček), v kterých opět nebyl detekován žádný signál (Fig. 5C, 5D).

Signál aktivity enzymu TRAP byl detekován při bázi zubu na okraji zubního pole, kde dochází k resorpci tvrdých tkání a následnému vypadnutí zubu (Fig. 5A–5D). To, že byl signál ve všech případech přítomen na jedné straně zubního pole, zatímco na druhé straně zubního pole se již formoval nový zubní zárodek, poukazuje na to, že resorpce a nahrazování zubů je u těchto zubních polí po určitou dobu života jesetera velmi dynamický proces.

#### 4.2.2. Rychlost výměny dentice

Pro analýzu rychlosti výměny dentice byl proveden experiment pomocí vitální fluorescenční barvy kalceinu. Kalcein se v době svého působení váže jen na mineralizující struktury. Tímto způsobem je možné označení pouze nově mineralizujících zubů, zatímco funkční zuby, které již jsou mineralizované, označeny nejsou. Fig. 6, Fig. 7 a Fig. 8 ukazují průběh experimentu, který probíhal po dobu 6 týdnů. Vybraní jedinci se ponechali v nádrži s roztokem kalceinu po dobu 6 minut a během následujících 6 týdnů byli jedinci postupně fixováni a analyzováni.

Výsledky experimentu u dentice na palatopterygoidu ukazuje Fig. 6. První týden po působení kalceinu (Fig. 6A, 6A') je signál přítomný ve špičkách zubů v první zubní řadě na anteriorní straně zubního pole, tedy v místě přirůstání nových zubů. Na obrázcích 6B, 6B', 6C, 6C', 6D, a 6D' vidíme vždy posun zubu se signálem kalceinu o jednu zubní řadu za jeden týden posteriorním směrem, tj. po dvou týdnech v druhé zubní řadě, po třech týdnech ve třetí zubní řadě a po čtyřech týdnech ve čtvrté zubní řadě. Po pěti týdnech (Fig. 6E, 6E') signál kalceinu zůstává ve čtvrté zubní řadě. Tato situace byla pozorována u všech zafixovaných jedinců. Jedinci fixováni po šesti týdnech již neměli přítomný signál kalceinu

v zubech (Fig. 6F, 6F'), u čtyř z pěti jedinců byl signál kalceinu viditelný na okraji připojovací kosti.

Průběh výměny dentice na infrapharyngobranchiale zobrazuje Fig. 7. První týden od ukončení působení kalceinu je signál přítomný ve špičkách zubů v první zubní řadě, která je na posteriorní straně zubního pole (Fig. 7A, 7A'). V dalších týdnech (Fig. 6B'– 6E') vidíme posun signálu v zubních řadách anteriorním směrem. Po dvou týdnech (Fig. 7B, 7B') je signál viditelný v zubech ve druhé zubní řadě, po třech týdnech (Fig. 7C, 7C') je signál přítomný v zubech ve třetí zubní řadě, po čtyřech týdnech (Fig. 7D, 7D') je signál přítomný v zubech ve čtvrté zubní řadě, po pěti týdnech (Fig. 7E, 7E') je signál v páté zubní řadě. V šestém týdnu je zbytek signálu viditelný na okraji připojovací kosti, nikoli však ve špičce zubu (Fig. 7F, 7F').

U dentice na hypobranchiale 1 je po prvním týdnu signál kalceinu viditelný v zubech, které jsou na zubním poli nejvíce posteriorně (první zubní řada) (Fig. 8A, 8A'). Stejně jako u dentice na infrapharyngobranchiale vidíme trend v posunu signálu v zubních řadách anteriorním směrem (Fig. 8A–8F). Po dvou týdnech je signál přítomný ve druhé zubní řadě (Fig. 8B, 8B'), po třech týdnech ve třetí zubní řadě (Fig. 8C, 8C'), po čtyřech týdnech ve čtvrté zubní řadě (Fig. 8D, 8D') a po pěti týdnech v páté zubní řadě (Fig. 8E, 8E'). Nová zubní řada tak vzniká jako u předchozích zubních polí přibližně každý týden (Fig. 8A'–8E'). Po šesti týdnech je signál přítomný nad pátou zubní řadou na okraji připojovací kosti, nikoli však ve špičkách zubů (Fig. 8F').

První týden po působení kalceinu je signál viditelný ve špičkách zubů v první zubní řadě u všech zubních polí (řady jsou počítány podle směru vývoje nových zubních zárodků). Zbytek zubů zůstal kalceinem neoznačený, jelikož v době působení kalceinu byly již tyto zuby mineralizované. Dva týdny po působení kalceinu vidíme zuby označené kalceinem ve druhé zubní řadě, a i následující týdny se signál posouvá přibližně o celou jednu zubní řadu. Zhruba za jeden týden tak můžeme pozorovat vznik nové zubní řady a výměna celého zubního pole složeného ze čtyř až pěti řad trvá přibližně šest týdnů.

#### 4.3. Nový zubní zárodek vzniká superficiálně z přilehlého epitelu

Analýza předešlých dat ukázala, že palatální i všechna faryngeální zubní pole jsou velmi dynamické struktury s rychlou výměnou (cyklicitou) zubů. Při studování toho, jak probíhá

nahrazování zubů, je důležitý časoprostorový vztah mezi nově vznikajícím zubním zárodkem a jeho předchůdcem (Smith, 2003; Huysseune et Witten, 2006). Pro detailnější popis vývoje zubních zárodků a zjištění, zda je při náhradě zubů přítomná následná dentální lamina, bylo využito histologických technik. Pro rozlišení epitelu a mesenchymu byl použit E-cadherin, který je přítomný na cytoplasmatických membránách epiteliálních buněk, kde zajišťuje soudržnost epiteliální tkáně. Vizualizace E-cadherinu nám ukázala epiteliální komponenty u jednotlivých zubní polí při vývoji nových zubních zárodků (Fig. 9A–9F). Na základě tohoto barvení bylo u následujících řezů zakresleno epitelomesenchymální rozhraní.

Histologické řezy nám ukazují detailnější stavbu zubních polí – funkční zuby, nově vznikající zubní zárodky a jejich souvztažnost s chuťovými pohárky (Fig. 10A–10F). Obrázky 10A a 10B zobrazují zubní pole na hypobranchiale 1, které okluduje proti zubnímu poli na palatopterygoidu (modré hroty šipek).

Vznik zubních zárodků můžeme pozorovat na obrázcích 10E a 10F. Nový zubní zárodek vzniká v těsné blízkosti předchozího zubu z přilehlého povrchového epitelu a z pod ním ležícího mesenchymu, když je jeho zubní předchůdce v určité fázi vývoje před dokončením erupce (Fig. 10E, 10F). Vývoj nového zubního zárodku začíná u posteriorní strany předcházejícího zubu (Fig. 10E, žlutý hrot šipky). Při vývoji dentální epitel obklopuje kondenzující mesenchym (Fig. 10F, žlutý hrot šipky). Tento mesenchym dává vznik dřevné dutině, která je zdrojem odontoblastů tvořících dentin (Fig. 10F, žlutý hrot šipky). Dentální epitel je rozlišený na vnitřní, střední a vnější (inner dental epithelium IDE, middle dental epithelium MDE, outer dental epithelium ODE) (Fig. 10E). Vnitřní dentální epitel tvoří jedna vrstva buněk, která dává vznik ameloblastům zubního zárodku (Fig. 10E). Vnější dentální epitel náhradního zubu tvoří jedna vrstva buněk, která později dává vznik vnitřnímu epitelu nového zubního zárodku. Náhradní zubní zárodek tak vzniká z vnějšího dentálního epitelu předchozího zubu a je s ním v průběhu vývoje nadále spojený (Fig. 10F). Střední dentální epitel, který byl popsán u lososa obecného (*Salmo salar*) s podobným vývojem nahrazování zubů (Huysseune et Witten, 2008), je přítomný i u jesetera, nachází se v prostoru mezi vnitřním a vnějším epitelem a skládá se z několika vrstev různě orientovaných buněk (Fig. 10E). Tento střední dentální epitel (MDE) byl identifikován pouze

u některých vývojových stádií zubního zárodku (Fig. 10E), u vývojově mladších stádií zubních zárodků ještě nebyl rozlišen (např. Fig. 10D, 10F).

Zubní zárodek se vyvíjí rovnoběžně s orofaryngeálním epitelem, tj. vůči funkčním zubům je položený na stranu a během vývoje se postupně vzpřímí (Fig. 10C). Z dostupných dat se zdá být vývoj náhradních zubů u jesetera extramedulární (extraosseous), kdy se náhradní zuby zakládají na povrchu kosti. Tento způsob náhrady zubů byl popsán u ne-kostnatých ryb za účasti permanentní či přechodné dentální laminy a je považován za pleziomorfní (Trapani, 2001). Moje data však ukázala, že k vývoji náhradních zubů dochází bez přítomnosti následné dentální laminy.

Z topografického hlediska je zajímavá souvislost vyvíjejícího se zubu s pozicí chuťového pohárku (Fig. 9, Fig. 10, černé šipky, viz níže). Zdá se, že dentální epitel nově vznikajícího zubního zárodku plynule vede až k chuťovému pohárku (např. Fig. 10E). Na základě tohoto pozorování by tato oblast mohla obsahovat epiteliální zubní kmenové/progenitorové buňky podílející se na vývoji náhradních zubů, podobně jako tomu je například u žraloků, rejnoků nebo agamy (Martin et al., 2016; Salomies et al., 2019; Rasch et al., 2020).

#### 4.4. Iniclace, raný vývoj a patternování dentice

##### 4.4.1. Expresie zubních markerů při iniciaci zubů a vývoji náhradních zubních zárodků

Pro popsání iniciace zubních zárodků a raného vývoje zubů, byla provedena *in situ* hybridizace genů *Shh*, *Pitx2*. Tyto geny patří mezi známé konzervované nejčasnější markery zubních zárodků ukazující oblasti odontogenní kompetence ještě před první morfologickou známkou odontogeneze (např. Fraser et al., 2004; Stock et al., 2006; Rasch et al., 2016).

Expresie genu *Pitx2* je u jedince 10 mm TL patrná jako souvislé pruhy na levé a na pravé straně v oblasti horní čelisti na budoucím dermopalatinu (Fig. 11A, DPT, bílý hrot šipky) a dolní čelisti na budoucím dentale (Fig. 11F, DE, bílý hrot šipky). Tyto pruhy exprese značí pole s odontogenním potenciálem, kde budou později vznikat zubní zárodky. U jedince 11 mm TL vidíme počínající změnu v této expresi, kdy v rámci předtím souvislého pruhu začínají vznikat místa s nižší expresí *Pitx2* (Fig. 11B, DPT; 11G, DE, bílé šipky). V tomto stádiu také pozorujeme první známky exprese *Pitx2* v oblasti budoucího zubního pole na palatopterygoidu (Fig. 11B, PPT, bílý hrot šipky) a na hypobranchiale 1 (Fig. 11G, HYP1, bílý

hrot šipky). V dalším stádiu 12 mm TL se exprese na palatopterygoidu i hypobranchiale 1 rozšiřuje (Fig. 11C, PPT; 11H, HYP1, bílé hroty šipek). U tohoto stádia se také poprvé objevuje exprese značící odontogenní potenciál na budoucím infrapharyngobranchiale (Fig. 11C, INF, bílý hrot šipky). U jedince 13 mm TL vidíme signál exprese rozdělený na pozice jednotlivých zubních zárodků na dermopalatinu (Fig. 11D, DPT, žlutý hrot šipky) a na dentale (Fig. 11I, DE, žlutý hrot šipky). Na palatopterygoidu vidíme oproti předchozímu stádiu více rozšířený signál a opět místa s nižší expresí *Pitx2* (Fig. 11D, PPT, bílá šipka). I u hypobranchiale 1 vidíme zvětšení oblasti exprese *Pitx2*, uvnitř které jsou místa s nižší expresí (Fig. 11I, HYP1, bílá šipka). U posledního analyzovaného stádia 14 mm TL jsou již viditelné funkční zuby bez exprese *Pitx2* na dermopalatinu (Fig. 11E, DPT) a dentale (Fig. 11J, DE). Exprese *Pitx2* přetrvává v zubních zárodcích na palatopterygoidu (Fig. 11E, PPT, žlutý hrot šipky), v oblasti zubního pole na infrapharyngobranchiale (Fig. 11E, INF, bílá šipka) a v zubních zárodcích na hypobranchiale 1 (Fig. 11J, HYP1, žlutý hrot šipky).

Dalším analyzovaným genem v souvislosti s iniciací zubních zárodků byl *Shh* (Fig. 11K, 11L). *Shh* byl exprimován v nově vznikajících zubních zárodcích. Pro odlišení exprese v zubních zárodcích (žluté hroty šipek) a chuťových pohárcích (černé šipky) byli hybridizovaní jedinci nařezáni (Fig. 11L). Exprese *Shh* se ukázala být nejen v epitelu nových zubních zárodků, ale také v chuťových pohárcích obklopující zubní pole (Fig. 11L, černá šipka). Exprese *Shh* v zubních zárodcích koreluje s expresí *Pitx2* (porovnej Fig. 11E a Fig. 11K).

*Sox2* je považovaný za marker kmenových a progenitorových buněk a ukázal se být klíčový při vývoji zubů u různých druhů obratlovců. U jesetera malého však nebyl pomocí vizualizace genové exprese identifikován přímo v souvislosti s vyvíjejícími se zuby (Fig. 11M). Jeho exprese byla zaznamenána pouze v chuťových pohárcích (Fig. 11M, černé šipky). Pro ověření, že signál se opravdu vyskytuje jen v chuťových pohárcích, byli hybridizovaní jedinci nařezáni. Z řezu je viditelné, že exprese *Sox2* nezasahuje do nově vznikajícího zubního zárodku (Fig. 11N, žlutý hrot šipky).

Exprese *Sox2* byla tedy použita k identifikaci chuťových pohárků a popsání jejich patternování (Fig. 12). U stádia 12 mm TL vidíme expresi *Sox2* v chuťových pohárcích kolem zubního pole na dermopalatinu nejvíce posteriorně (Fig. 12A, DPT) a slabší signál kolem zubního pole na palatopterygoidu, který ještě není zřetelně rozdělen do jednotlivých chuťových pohárků (Fig. 12A, PPT). U dalšího stádia 13 mm TL se zvyšuje intenzita exprese

*Sox2* a chuťových pohárků přibývá (Fig. 12B). Oproti předchozímu stádiu vidíme, že se chuťové pohárky začínají objevovat anteriorně mezi levým a pravým zubním polem na palatopterygoidu (Fig. 12B, PPT). U dalších stádií již jsou chuťové pohárky přítomny po celé délce mezi pravým a levým palatopterygoidem (Fig. 12C, 12D). Dále chuťové pohárky přibývají posteriorním směrem (Fig. 12C), u jedince 15 mm TL již chuťové pohárky obklopují i celé zubní pole na infrapharyngobranchiale (Fig. 12D).

Dále byla analyzována exprese genu *Lef1*, což je transkripční faktor v rámci Wnt/ $\beta$ -catenin signální dráhy, který zprostředkovává jadernou odpověď a interakcí s  $\beta$ -cateninem aktivuje expresi downstreamových genů (Eastman et Grosschedl, 1999). *Lef1* byl exprimován v nově vznikajících zubních zárodcích na palatopterygoidu anteriorně od již vzniklých zubů u všech analyzovaných jedinců 13 mm, 14 mm a 16 mm TL (Fig. 13A, 13B, 13C, PPT). Exprese *Lef1* je také přítomná v nově vznikajících zubních zárodcích na infrapharyngobranchiale u jedince 13 mm TL (Fig. 13A, INF). U stádia 14 mm a 15 mm TL vidíme již vzniklé zuby na infrapharyngobranchiale a od nich posteriorně signál *Lef1* opět v nových zubních zárodcích (Fig. 13B, 13C, INF). Exprese *Lef1* je u všech stádií patrná i v chuťových pohárcích, avšak jen v některých a chuťové pohárky bezprostředně kolem zubních polí, kde vznikají nové zubní zárodky, jsou bez signálu (srovnej Fig. 12 a Fig. 13). Na řezech provedených jedincem 14 mm TL je viditelný signál *Lef1* v epitelu i mesenchymu nového zubního zárodku, zatímco signál chybí v sousedních chuťových pohárcích (Fig. 13D, 13E).

4.4.2. Exprese genů na úrovni proteinů při vývoji zubních zárodků ukazuje širší souvislosti než na úrovni mRNA

Pro podrobnější popis vývoje náhradních zubů byla provedena série protilátkových barvení, která ukázala širší souvislosti vyvíjející se jeseteří dentice než analýza na úrovni mRNA.

Protilátkové barvení proti  $\beta$ -catenin ukázalo přítomnost tohoto faktoru v nově vznikajícím zubním zárodku v epitelu i v mesenchymu a také v chuťových pohárcích (Fig. 13F, 13G, 13H).  $\beta$ -catenin byl exprimován i v mesenchymu předchozího funkčního zubu (Fig. 13F, 13G, 13H). Ve funkčních zubech je  $\beta$ -catenin přítomný v mesenchymu a pouze v cytoplasmě (Fig. 13F, 13G, 13H). V nově vznikajících zubních zárodcích je silný pozitivní signál  $\beta$ -catenin u patrný v mesenchymu v buněčných jádrech, nejsilnější signál je v mesenchymu apikálně (Fig. 13G, 13F, 13H). Na obrázku 13F je silný jaderný signál

přítomný i v dentálním epitelu zubního zárodku, zatímco v situaci na obrázcích 13G a 13H je  $\beta$ -catenin v dentálním epitelu přítomen převážně v cytoplasmě a pouze slabě v několika jádrech.

Jelikož se ukázalo, že při výměně zubů hraje důležitou roli vzájemná interakce mezi Sox2 a Wnt/ $\beta$ -catenin signální dráhou (Juuri et al., 2012), bylo provedeno dvojité protilátkové barvení proti  $\beta$ -catenin společně se Sox2. Pozitivní signál  $\beta$ -catenin je stejný jako v předešlém případě (porovnej Fig. 13 a Fig. 14). Nejsilnější signál vidíme v buňkách mesenchymu zubních zárodků a ve vnitřním dentálním epitelu (IDE) (Fig. 14B). Ve vnějším dentálním epitelu (ODE) signál slábne, až se úplně vytrácí. Zajímavé je, že ve všech případech je několik Sox2 pozitivních buněk přítomno mimo chuťový pohárek v epiteliální bazální vrstvě ve směru vedoucí k novému zubnímu zárodku. Zdá se, že v místech vnějšího dentálního epitelu (ODE), kde končí pozitivní signál Sox2, navazuje pozitivní signál  $\beta$ -catenin, signál se u několika buněk překrývá (Fig. 14A–14D, bílé šipky). Signál se překrývá i v buňkách chuťového pohárku (Fig. 14A–14C)

Shh protein byl detekován v širší oblasti epitelu nově vznikajícího zubního zárodku než genová exprese *Shh*, která byla více lokalizovaná do menší populace buněk dentálního epitelu (srovnej Fig. 15B a Fig. 11L). V pozdějším vývoji zubních zárodků byl protein Shh přítomný v celém dentálním epitelu (IDE, MDE, ODE) i v mesenchymu (Fig. 15C). Dále byl Shh protein přítomný v chuťových pohárcích (Fig. 15A, 15B). Stejně tak se pozitivní signál Shh vyskytuje v mesenchymatických buňkách funkčních zubů (Fig. 15A–15C) (srovnej Fig. 11 a Fig. 15). Oproti tomu Pitx2 protein je přítomen striktně v jádrech epiteliálních buněk v zubních zárodcích i v okolním orofaryngeálním epitelu (Fig. 15D–15F). Signál se nevyskytuje v chuťových pohárcích (Fig. 15D–15F, černé šipky), naopak nejsilnější signál Pitx2 vidíme ve vyvíjejícím se zubním zárodku (Fig. 15D–15F, žluté hroty šipek).

#### 4.5. Identifikace potenciálních zubních kmenových buněk a buněk s vysokou proliferací

##### 4.5.1. Sox2 protein se vyskytuje i mimo chuťový pohárek v těsné blízkosti zubního zárodku

Přítomnost transkripčního faktoru Sox2 bývá spojována s kmenovými a TA buňkami. Exprese genu *Sox2* na úrovni mRNA, však byla přítomná pouze v chuťových pohárcích a do zubních zárodků nezasahovala (viz ISH Fig. 12). Protilátkové barvení proti Sox2 proteinu však naznačilo, že Sox2 protein by mohl být přítomný i mimo chuťový pohárek (viz Fig. 16 a

Fig. 17). Pro nesporné odlišení signálu v chuťovém pohárku a mimo chuťový pohárek se tedy udělalo dvojitě protilátkové barvení proti Sox2 a Calretininu. Calretinin je protein specifický přímo pro chuťový pohárek (Northcutt, 2004; Díaz-Regueira et al., 2005) (Fig. 16A, 16B). Na tomto dvojitém barvení je znatelný překryv signálů obou proteinů v chuťovém pohárku (Fig. 16C, 16D). Je však zřetelné, že Sox2 signál přesahuje oblast chuťového pohárku i do okolního epitelu směrem k nově vznikajícímu zubnímu zárodku (Fig. 16C', 16D', bílé šipky). Pro lepší identifikaci umístění buněk s pozitivním Sox2 signálem bylo následně protilátkové barvení s Calretininem provedeno také na horizontálních řezech zubních polí (Fig. 17). Tyto řezy nám ukazují jiný pohled na situaci v zubním poli a potvrzují přítomnost Sox2 pozitivních buněk i mimo chuťové pohárky (Fig. 17A–17I).

Stejnou situaci vidíme i v případě dvojitého barvení proti Sox2 a PCNA (Fig. 16E, 16F). PCNA značí proliferující buňky, které vidíme hojně v celém orofaryngeálním epitelu, dále v celém zubním zárodku v epitelu i v mesenchymu (Fig. 16E', 16F'). Překryv signálu Sox2 a PCNA vidíme v několika buňkách u chuťového pohárku (Fig. 16E', 16F', bílé šipky). Překryv Sox2 a PCNA signálu by mohl značit přítomnost právě se dělících kmenových buněk, které dávají vznik progenitorovým buňkám, nebo dále se dělících progenitorových buněk/TA buněk. Pro otestování této hypotézy byl navržen EdU experiment, který značí LRCs.

#### 4.5.2. LRCs buňky se nalézají v oblasti SDE mezi chuťovým pohárkem a zubním zárodkem

Pro identifikování potenciálních kmenových buněk byl proveden EdU experiment, který je založen na principu inkorporace EdU molekul (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) do nově syntetizované DNA během S fáze buněčného cyklu. Fluorescenční signál poté značí jádra buněk, u kterých došlo během inkubační doby EdU k mitóze. Během následných mitotických dělení dochází k vytrácení signálu, s každým buněčným dělením označený signál slábne. Tímto způsobem můžeme po dostatečně dlouhé době identifikovat buňky, v kterých signál přetrvává, tj. terminálně diferenciované buňky a kmenové/progenitorové buňky, „buňky, které si uchovávají značení“, tzv. LRCs. Tento experiment byl nezávisle proveden dvě sezóny po sobě se srovnatelnými výsledky. V této práci jsou ukázána data pouze z druhého experimentu.

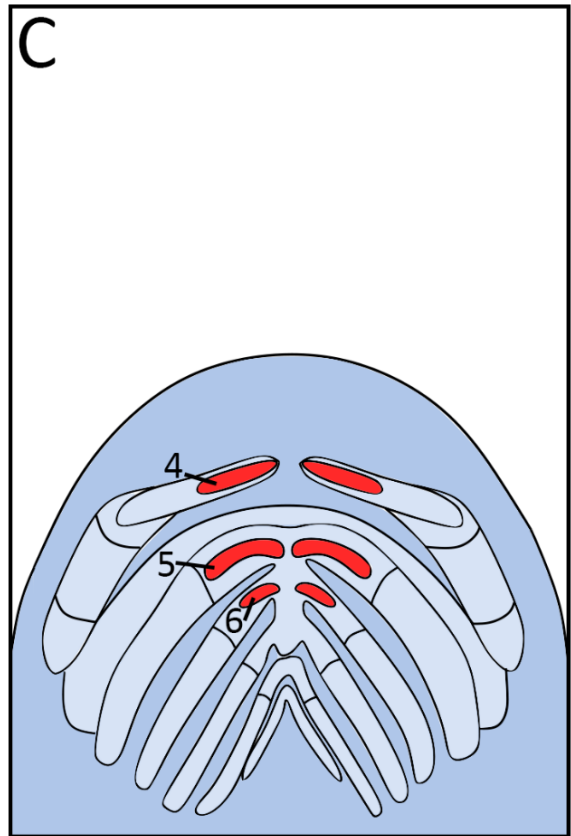
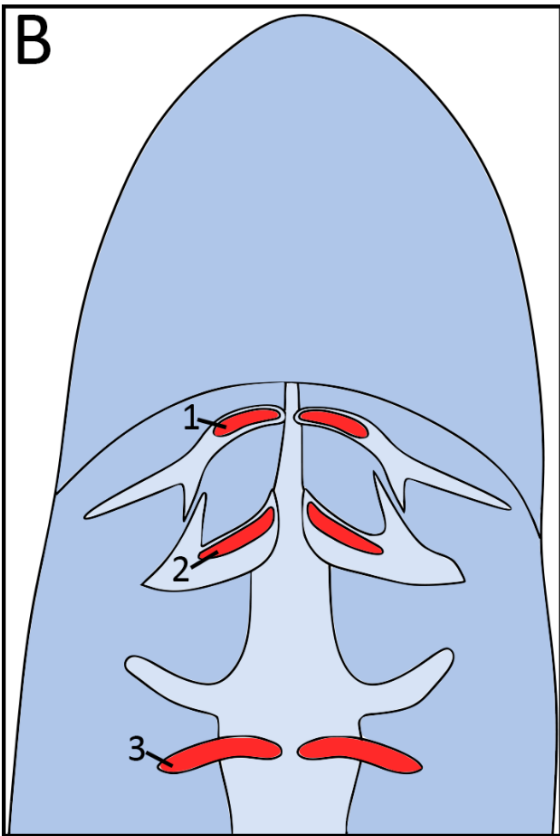
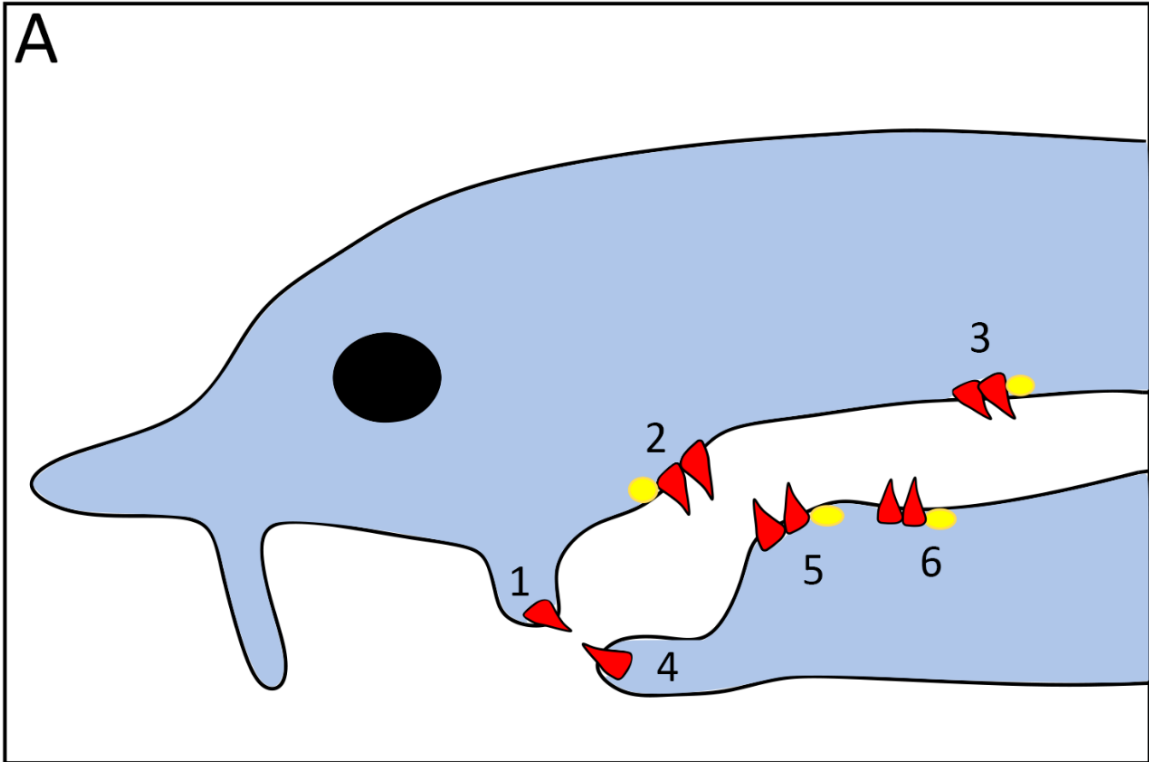
Experiment probíhal po dobu sedmi týdnů. Vybraní jedinci o přibližné velikosti 30 mm byli přemístěni do nádrže s roztokem EdU vždy na dvě hodiny denně po dobu dvou týdnů (tzv. pulse). Poté byli jedinci v týdenních intervalech fixováni (tzv. chase) (viz tab. č. 3).

První fixace proběhla ihned po skončení působení EdU (pulse 2w, chase 0w) (Fig. 18A, 18B). Fluorescenční signál je přítomný ve většině buněčných jader v orofaryngeálním epitelu, v mesenchymu, v zubních zárodcích i v chuťových pohárcích, neboť značí jádra buněk, které se v době působení EdU dělila. U jedinců zafixovaných o týden později (pulse 2w, chase 1w) (Fig. 18C, 18D) signálu v jádrech buněk ztlačně ubývá, tedy dalším dělením buněk došlo k vyředění jejich signálu. Signál ale stále zůstává ztlačně v některých buňkách epitelu i mesenchymu, v ameloblastech zubních zárodků a v buňkách chuťových pohárků. O další týden později (pulse 2w, chase 2w) (Fig. 18E, 18F) signálu ještě více ubývá. Signál přetrvává již pouze v jádrech terminálně diferencovaných buněk, tj. v buňkách chuťového pohárku a v ameloblastech, a dále v jádrech buněk, které se nacházejí mezi chuťovým pohárkem a nově vznikajícím zubním zárodkem v místech následného dentálního epitelu (Fig. 18E, 18F, bílé šipky). Právě tyto pomaleji se dělící buňky LRCs by mohly být potenciálně zubní kmenové/progenitorové buňky. V souladu s předchozími analýzami je více než zajímavé, že umístění těchto LRCs buněk koreluje s přítomností buněk se Sox2 pozitivním signálem (srovnej např. Fig. 16C', 17I a Fig. 19F). Více obrázků z podobných situací ukazuje Fig. 19. Tři a více týdnů po ukončení působení EdU (pulse 2w, chase 3w) (Fig. 18G, 18H) je již signál viditelný pouze v terminálně diferencovaných jádrech buněk chuťového pohárku.

## 4.6. Obrazové tabule

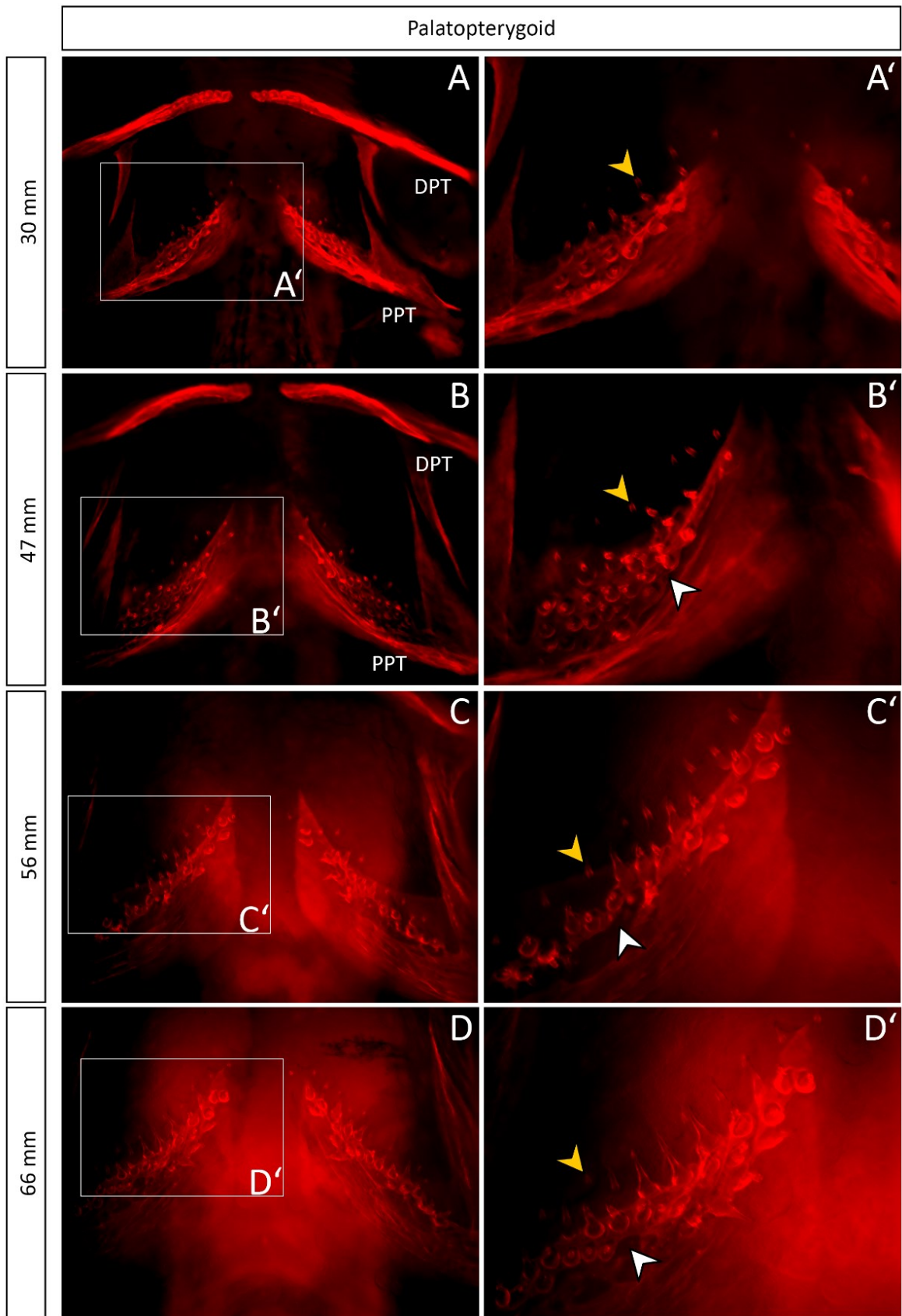
**Fig. 1: Schématické znázornění rozmístění zubních polí jesetera malého (*Acipenser ruthenus*).**

**(A)** Sagitální řez hlavou jedince ukazující rozložení všech zubních polí jesetera malého, hlava orientována doleva. Červenou barvou jsou vyznačeny funkční zuby, žlutá místa znázorňují pozici vzniku budoucích zubních zárodků. **(B)** Pohled na strop orofaryngeální dutiny (tzv. roof) po rozdělení hlavy jedince v místě čelistního kloubu a odebrání spodní části. Červeně značená místa ukazují rozvržení jednotlivých zubních polí na dermopalatinu (1, DPT), palatopterygoidu (2, PPT) a infrapharyngobranchiale (3, INF). **(C)** Pohled na dno orofaryngeální dutiny (tzv. floor) po rozdělení hlavy jedince v místě čelistního kloubu a odebrání horní části. Červeně značená pole vymezují pozice jednotlivých zubních polí na dentale (4, DE), hypobranchiale 1 (5, HYP1) a hypobranchiale 2 (6, HYP2).



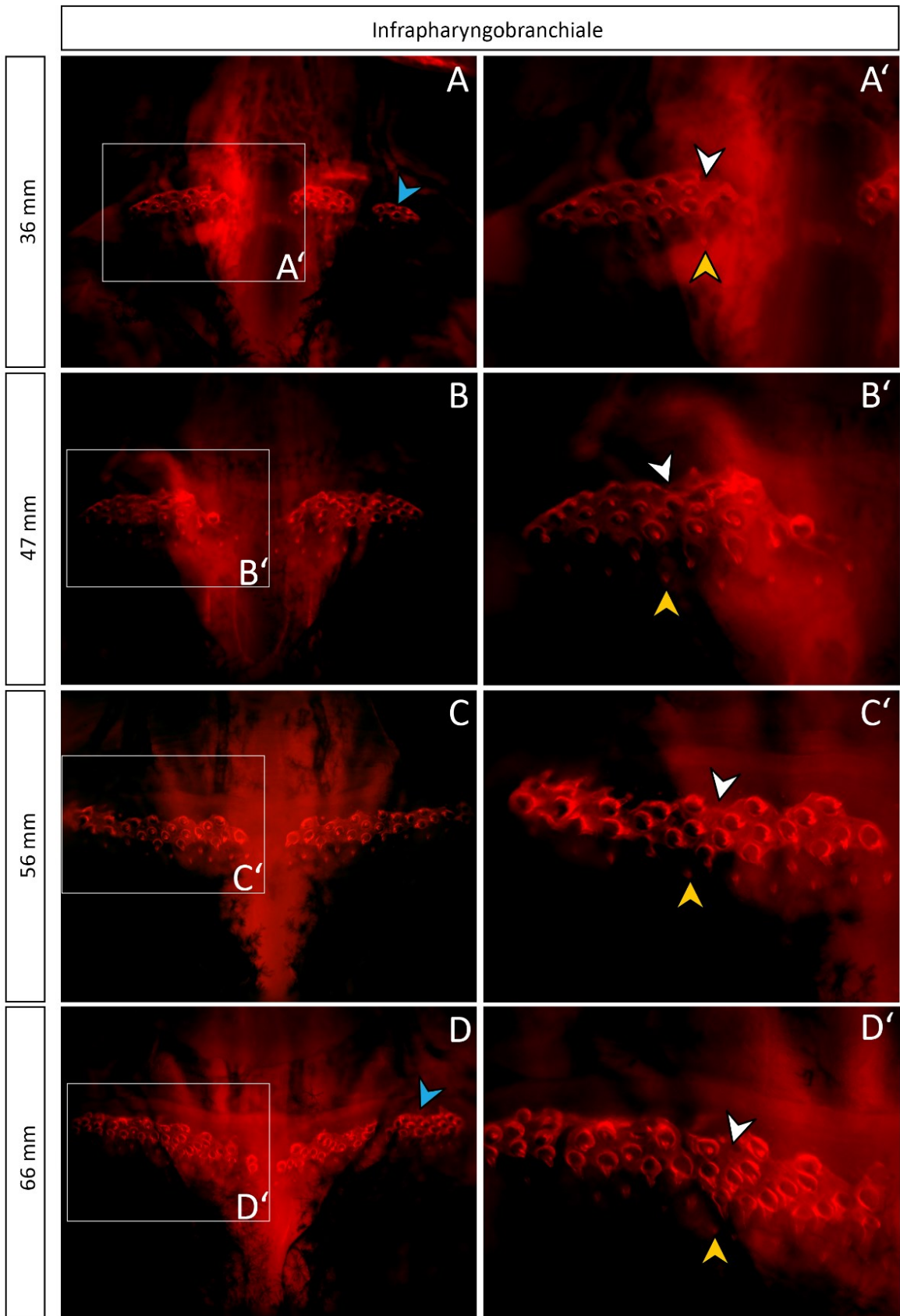
**Fig. 2: Stavba a vývoj zubních polí lokalizovaných na palatopterygoidu.**

**(A-D)** Dentice na palatopterygoidu (PPT) vizualizovaná pomocí barvení Alizarin Red u jedinců 30 mm, 47 mm, 56 mm a 66 mm TL. Pohled na strop orofaryngeální dutiny (tzv. roof) po odpreparování spodní části v místě čelistního kloubu. **(A)** Stále přítomná dentice na dermopalatinu (DPT). **(B-D)** Dermopalatinum (DPT) po ztrátě veškeré dentice. **(A'-D')** Detail levého zubního pole z obrázků (A-D). Žluté hroty šipek ukazují na mineralizované špičky nových zubů, bílé hroty šipek ukazují na pozůstatky po vypadnutých zubech.



**Fig. 3: Stavba a vývoj zubních polí lokalizovaných na infrapharyngobranchiale.**

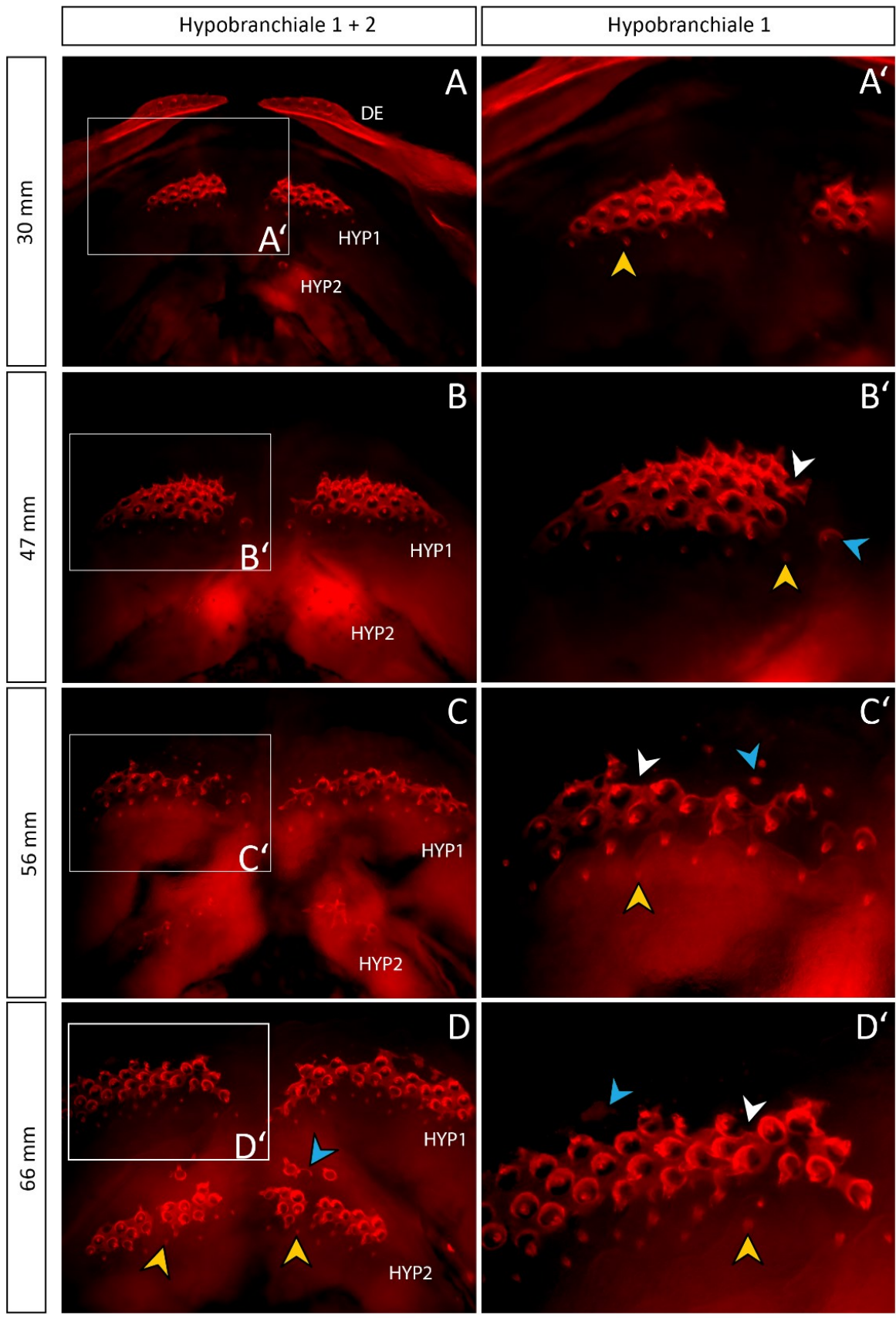
**(A-D)** Dentice na infrapharyngobranchiale (INF) vizualizovaná pomocí barvení Alizarin Red u jedinců 36 mm, 47 mm, 56 mm a 66 mm TL. Pohled na strop orofaryngeální dutiny (tzv. roof) jedinců po odpreparování spodní části v místě čelistního kloubu. **(A, D)** Hroty modrých šipek směřují k izolovaným zubním deskám. **(A'-D')** Detailní zvětšení levého zubního pole z obrázků (A-D). Žluté hroty šipek ukazují na mineralizované špičky nových zubů, bílé hroty šipek ukazují na vypadávající zuby a rozrušení zubní desky.



**Fig. 4: Stavba a vývoj zubních polí lokalizovaných na hypobranchiale 1 a hypobranchiale 2.**

**(A-D)** Dentice na hypobranchiale 1 (HYP1) a hypobranchiale 2 (HYP2) vizualizovaná pomocí barvení Alizarin Red u jedinců 30 mm, 47 mm, 56 mm a 66 mm TL. Pohled na dno orofaryngeální dutiny (tzv. floor) po odpreparování horní části v místě čelistního kloubu.

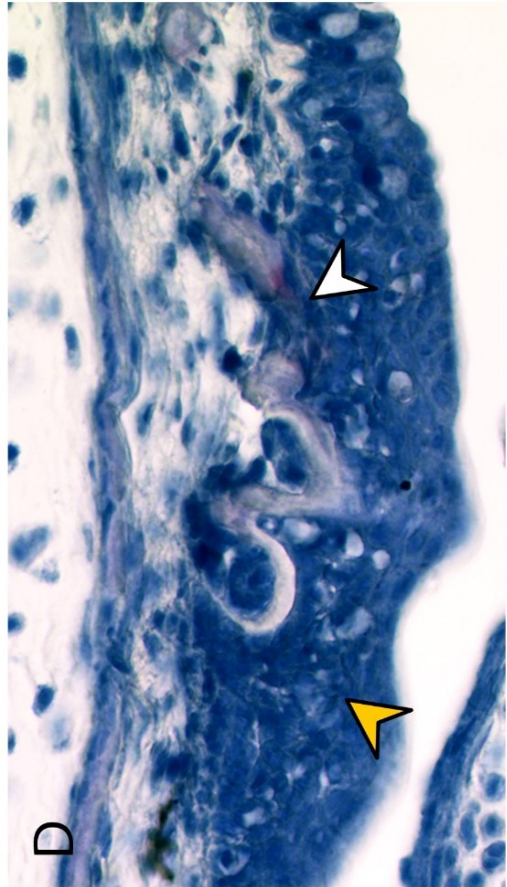
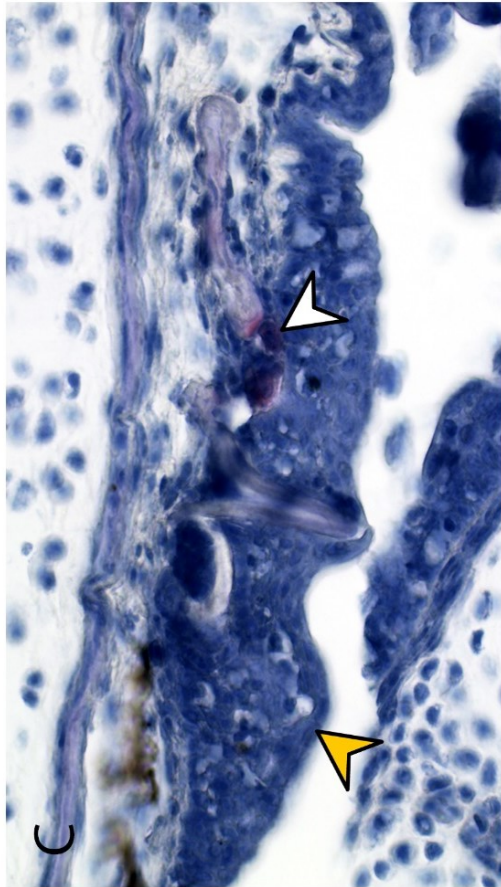
**(A'-D')** Detail levého zubního pole hypobranchiale 1 (HYP1) z obrázků (A-D). Žluté hroty šipek ukazují na mineralizované špičky nových zubů, bílé hroty šipek ukazují na vypadávající zuby. Modré hroty šipek ukazují na vznik izolovaných zubů **(D, B')** a zbytky připojovací kosti po vypadnutí zubů, u které dochází k resorpci **(C', D')**.



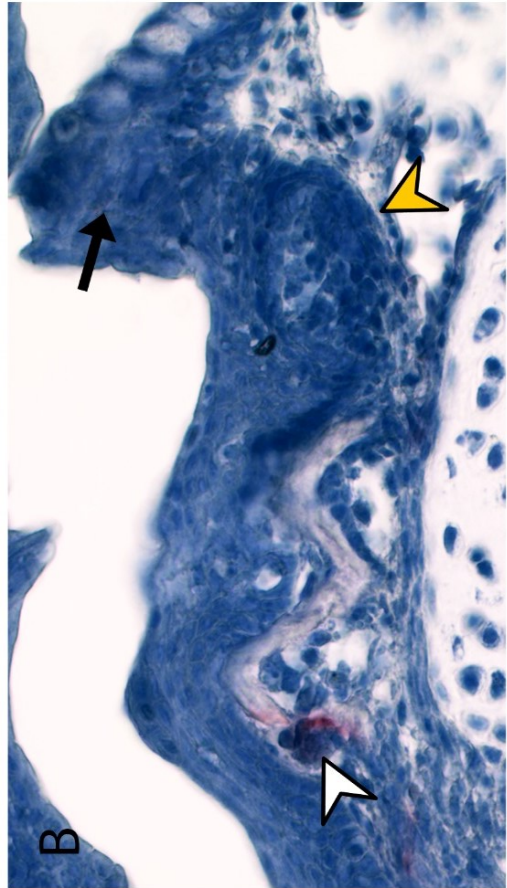
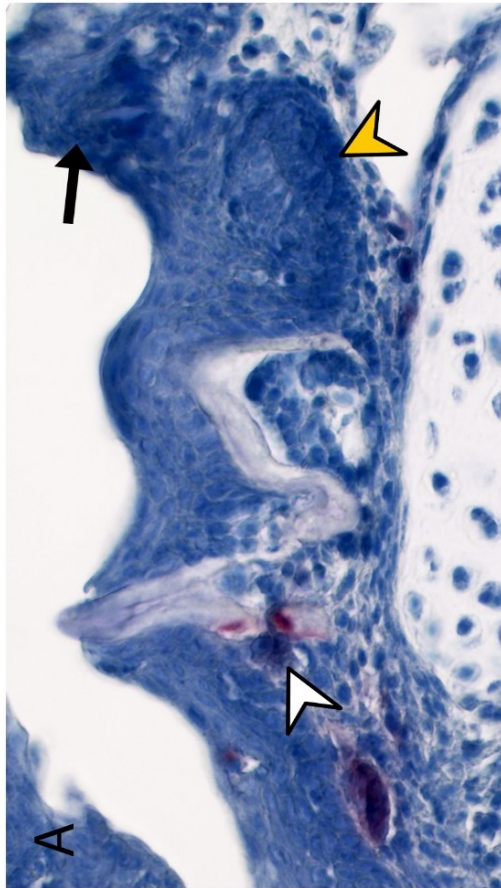
**Fig. 5: Analýza výměny dentice – zuby přirůstají z jedné strany zubního pole a z opačné strany vypadávají.**

**(A-D)** Histologické parafínové řezy (10  $\mu\text{m}$ ) zubními poli na hypobranchiale 1 (HYP1) **(A, B)** a palatopterygoidu (PPT) **(C, D)** barvené hematoxylinem/eosinem a vizualizace detekce enzymatické aktivity TRAP. Žluté hroty šipek značí pozici nově vznikajícího zubního zárodku, černé šipky značí chuťové pohárky. Bílé hroty šipek ukazují na TRAP aktivitu u báze vypadávajícího zubu a rozrušení zubu na anteriorní straně zubního pole na hypobranchiale 1 (HYP1) **(A, B)** a na posteriorní straně zubního pole na palatopterygoidu (PPT) **(C, D)**.

Palatopterygoid



Hypobranchiale 1



**Fig. 6: Rychlost výměny dentice na palatopterygoidu.**

**(A-F)** Průběh experimentu barvení fluorescenčním kalceinem. Každý týden bylo zafixováno 5 jedinců (první fixace po 1 týdnu od ukončení vystavení jedinců kalceinu, poslední fixace 6 týdnů od ukončení vystavení jedinců kalceinu). Pohled na strop orofaryngeální dutiny (tzv. roof) po odpreparování spodní části v místě čelistního kloubu. Pro lepší vizualizaci obarveno Alizarin Red. **(A'-F')** Detail obrázků (A-F) s bílými hroty šipek, které ukazují na signál kalceinu. Číslo značí jednotlivé zubní řady. **(A')** U fixace po 1 týdnu je signál viditelný ve špičkách zubů, které jsou na zubním poli nejvíce anteriorně (1. zubní řada). Na dalších obrázcích vidíme trend v posunu signálu v zubních řadách posteriorním směrem, tj. ve směru výměny dentice zubního pole na palatopterygoidu. **(B')** Po 2 týdnech je signál přítomný v zubech ve 2. zubní řadě, po 3 týdnech je signál přítomný v zubech ve 3. zubní řadě **(C')**, po 4 týdnech je signál přítomný v zubech ve 4. zubní řadě **(D')**. U fixace po 5 týdnech signál přetrvává v zubech 4. zubní řady **(E')**. **(F')** Po 6 týdnech je zbytek signálu stále viditelný, ale již není ve špičce zubu, nýbrž na okraji zubního pole v připojovací kosti.

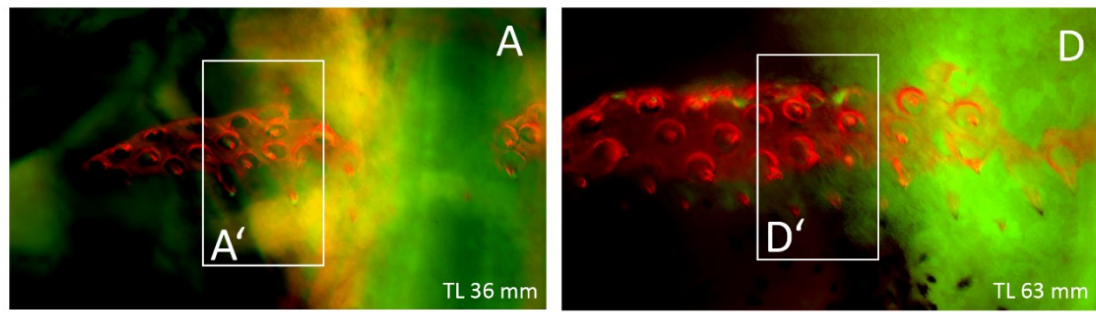


**Fig. 7: Rychlost výměny dentice na infrapharyngobranchiale.**

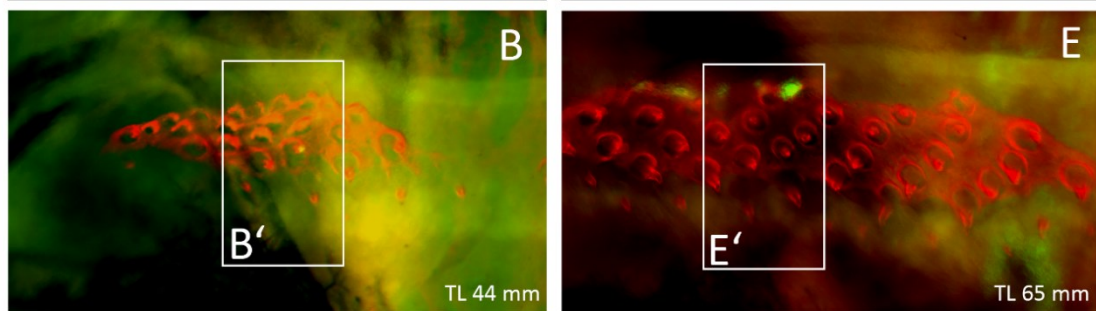
**(A-F)** Průběh experimentu barvení kalceinem. Každý týden bylo zafixováno 5 jedinců (první fixace po 1 týdnu od ukončení vystavení jedinců kalceinu, poslední fixace 6 týdnů od ukončení vystavení jedinců kalceinu). Pohled na strop orofaryngeální dutiny (tzv. roof) po odpreparování spodní části v místě čelistního kloubu. Pro lepší vizualizaci obarveno Alizarin Red. **(A'-F')** Detail obrázků (A-F) s bílými hroty šipek, které ukazují na signál kalceinu. Číslo značí jednotlivé zubní řady. **(A')** Po 1 týdnu je signál viditelný ve špičkách zubů, které jsou na zubním poli nejvíce posteriorně (1. zubní řada). Na dalších obrázcích vidíme trend v posunu signálu v zubních řadách anteriorním směrem, tj. ve směru výměny dentice zubního pole na infrapharyngobranchiale. **(B')** Po 2 týdnech je signál viditelný v zubech ve 2. zubní řadě, po 3 týdnech je signál přítomný v zubech ve 3. zubní řadě **(C')**, po 4 týdnech je signál přítomný v zubech ve 4. zubní řadě **(D')**, po 5 týdnech je signál v 5. zubní řadě **(E')**. **(F')** Po 6 týdnech je zbytek signálu stále viditelný, ale již není ve špičce zubu, nýbrž na okraji připojovací kosti.

Infrapharyngobranchiale

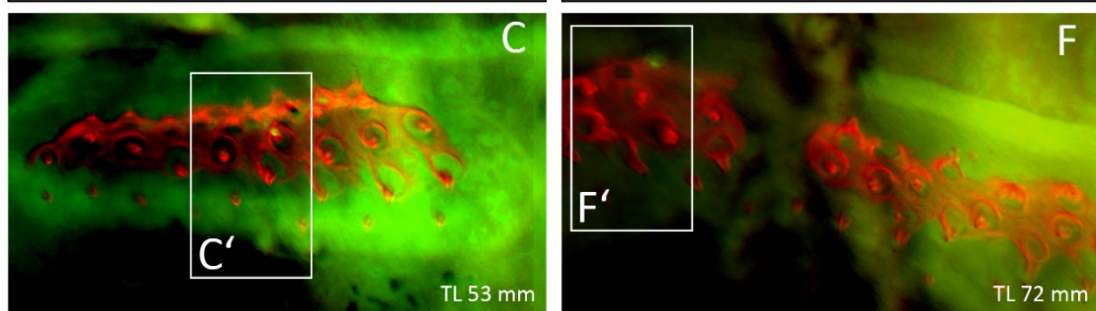
1. týden 4. týden



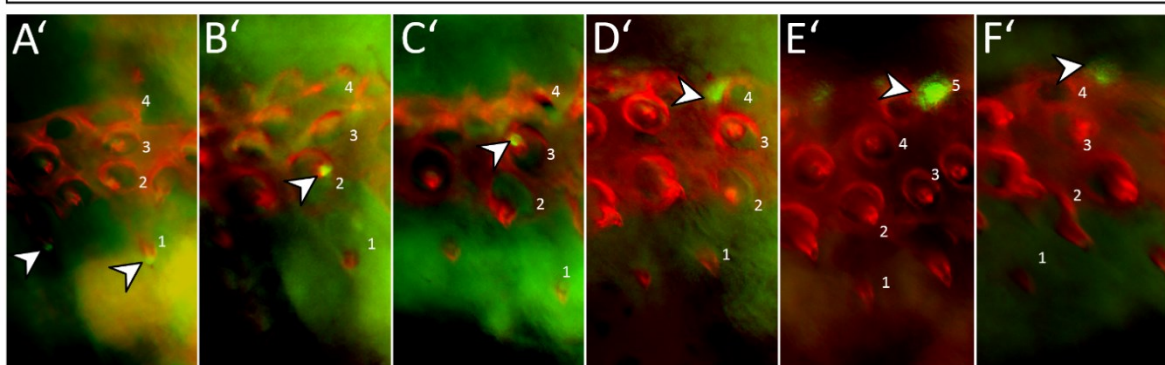
2. týden 5. týden



3. týden 6. týden



Infrapharyngobranchiale - detail

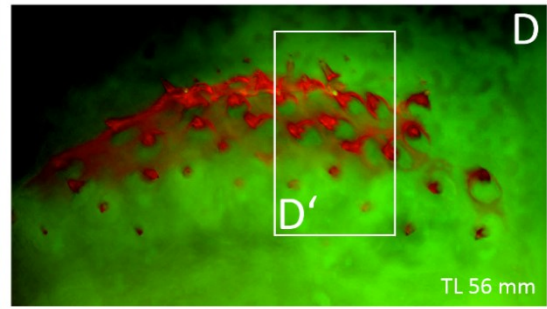
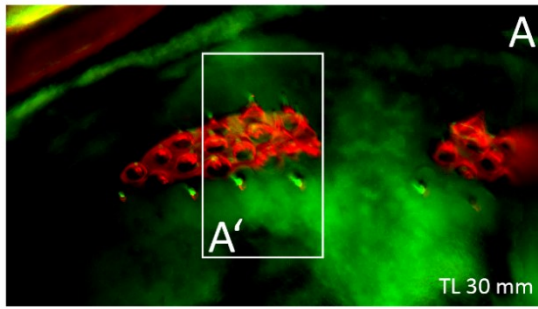


**Fig. 8: Rychlost výměny dentice na hypobranchiale 1.**

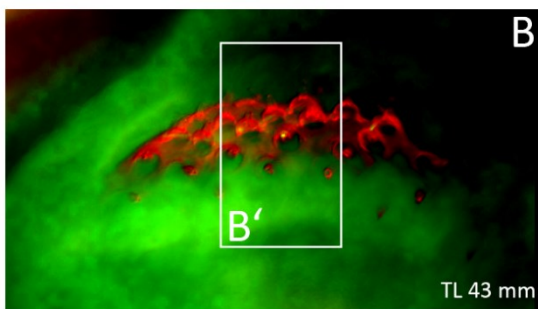
**(A-F)** Průběh experimentu barvení kalceinem. Každý týden bylo zafixováno 5 jedinců (první fixace po 1 týdnu od ukončení vystavení jedinců kalceinu, poslední fixace 6 týdnů od ukončení vystavení jedinců kalceinu). Pohled na dno orofaryngeální dutiny (tzv. floor) po odpreparování horní části v místě čelistního kloubu. Pro lepší vizualizaci obarveno Alizarin Red. **(A'-F')** Detail obrázků (A-F) s bílými hroty šipek, které ukazují na signál kalceinu. Číslo značí jednotlivé zubní řady. **(A')** Po 1 týdnu je signál viditelný ve špičkách zubů, které jsou na zubním poli nejvíce posteriorně (1. zubní řada). Na dalších obrázcích vidíme trend v posunu signálu v zubních řadách anteriorním směrem, tj. ve směru výměny dentice zubního pole na hypobranchiale 1. **(B')** Po 2 týdnech je signál viditelný v zubech ve 2. zubní řadě, po 3 týdnech je signál přítomný v zubech ve 3. zubní řadě **(C')**, po 4 týdnech je signál přítomný v zubech ve 4. zubní řadě **(D')**, po 5 týdnech je signál v 5. zubní řadě **(E')**. **(F')** Po 6 týdnech je zbytek signálu stále viditelný, ale již není ve špičce zubu, nýbrž na okraji připojovací kosti nad pátou zubní řadou.

Hypobranchiale 1

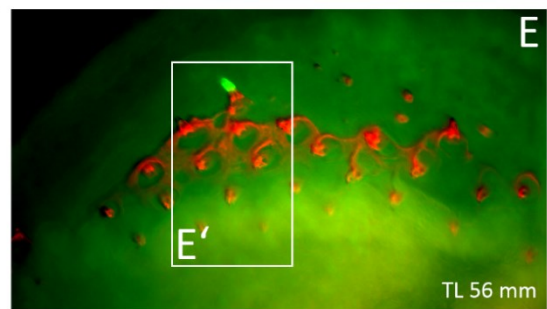
1. týden 4. týden



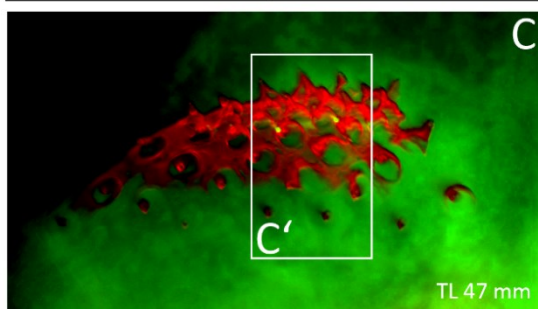
2. týden



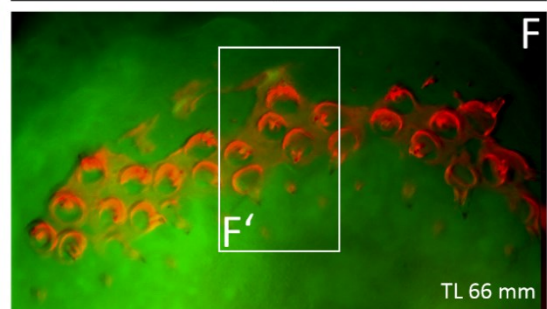
5. týden



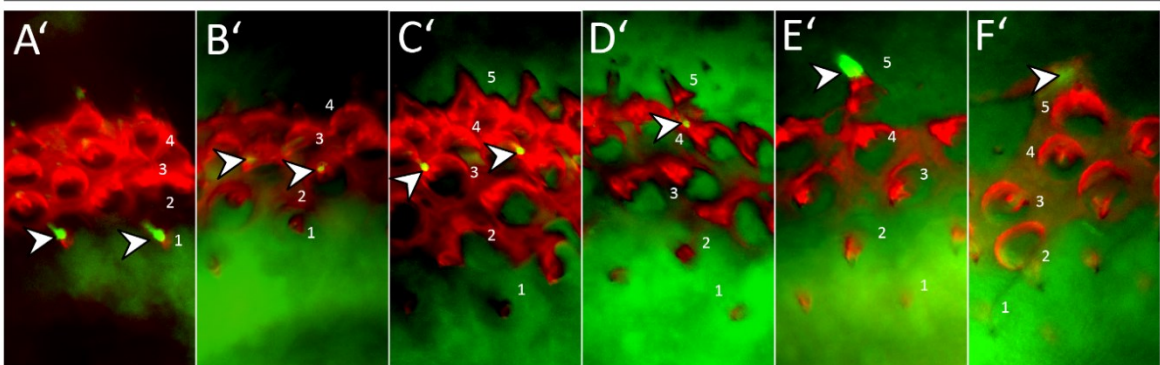
3. týden



6. týden

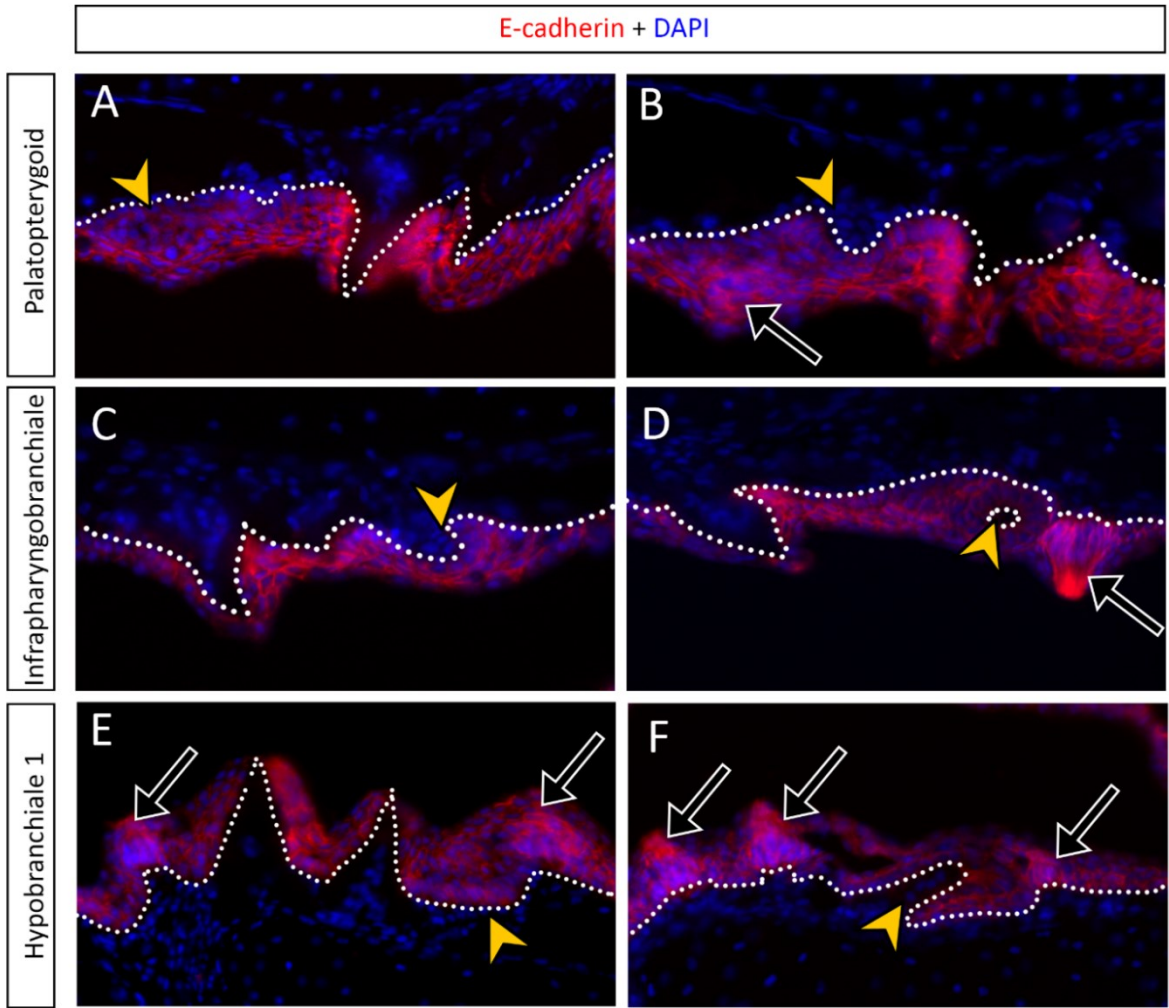


Hypobranchiale 1 - detail



**Fig. 9: Protilátkové barvení proti E-cadherinu ukazuje rozhraní epitelu a mesenchymu.**

**(A-F)** Imunohistochemické sagitální řezy zubními poli na palatopterygoidu **(A-B)**, infrapharyngobranchiale **(C-D)** a hypobranchiale 1 **(E-F)** o tloušťce 10  $\mu\text{m}$ , hlava orientována doleva. Bílá tečkovaná čára představuje rozhraní epitelu a mesenchymu. Žluté hroty šipek značí pozice nově vznikajících zubních zárodků, černé šipky značí chuťové pohárky. Pozitivní signál E-cadherinu (červeně) je přítomný na cytoplasmatických membránách epitelálních buněk, ukazuje tak rozhraní mezi epitelem a mesenchymem. DAPI (modře) značí jádra buněk. Pro palatopterygoid, infrapharyngobranchiale a hypobranchiale 1 byly zvoleny dva řezy pro demonstraci různých částí zubních polí.

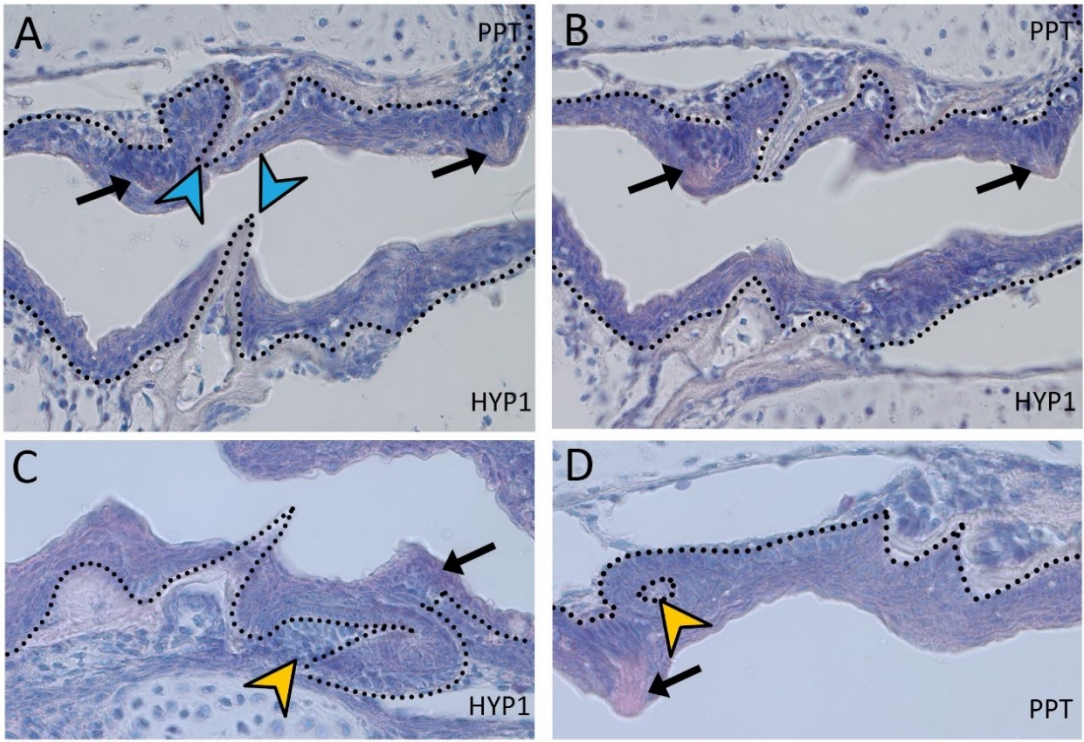


**Fig. 10: Histologická stavba zubních polí na palatopterygoidu a hypobranchiale 1 – zubní zárodek vzniká bez příspěvku dentální laminy.**

**(A-D)** Histologické řezy (10  $\mu\text{m}$ ) zubními poli na palatopterygoidu a hypobranchiale 1 obarvené pomocí hematoxylin/eosin. Žluté hroty šipek značí pozici nově vznikajících zubů, černé šipky značí chuťové pohárky. Obrázky **(A-B)** ukazují protistojnou pozici dentice na palatopterygoidu a hypobranchiale 1 (modré hroty šipek). Obrázky **(C-D)** ukazují řez zubním polem s nově vznikajícím zubním zárodkem a jeho topologickou souvislost s chuťovým pohárkem. **(E-F)** Histologické řezy (10  $\mu\text{m}$ ) zubním polem na hypobranchiale 1 obarvené pomocí azure B/eosin. Žluté hroty šipek značí pozici nově vznikajících zubů, černé šipky značí chuťové pohárky. Obrázky představují detailnější pohled na nově vznikající zub, dentální epitel a chuťový pohárek. Na obrázku **(E)** vidíme rozlišení dentálního epitelu na vnitřní dentální epitel (IDE), střední dentální epitel (MDE) a vnější dentální epitel (ODE). Vnitřní dentální epitel je již zřetelně diferencován na ameloblasty. Žlutý hrot šipky ukazuje na pozici budoucího zubního zárodku, který bude vznikat v těsné blízkosti předcházejícího zubu z jeho vnějšího dentálního epitelu.

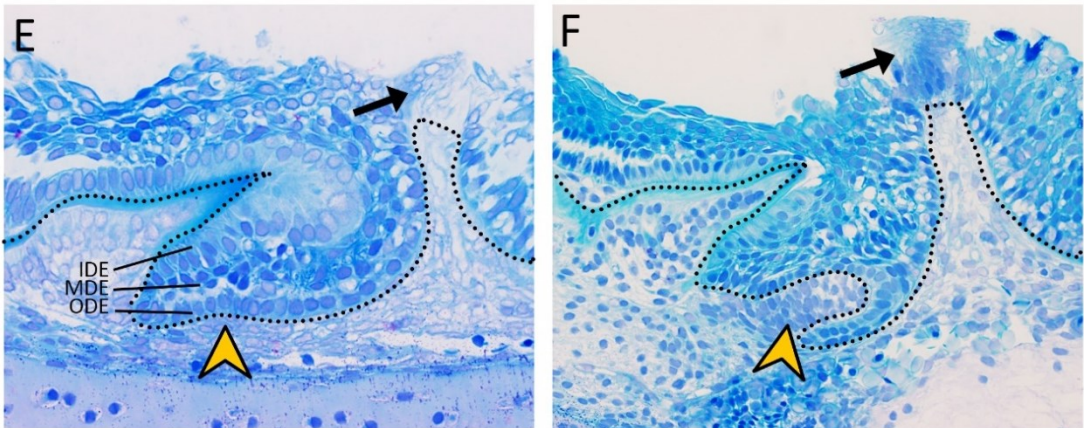
Hematoxylin/eosin

Hypobranchiale 1 + palatopterygoid



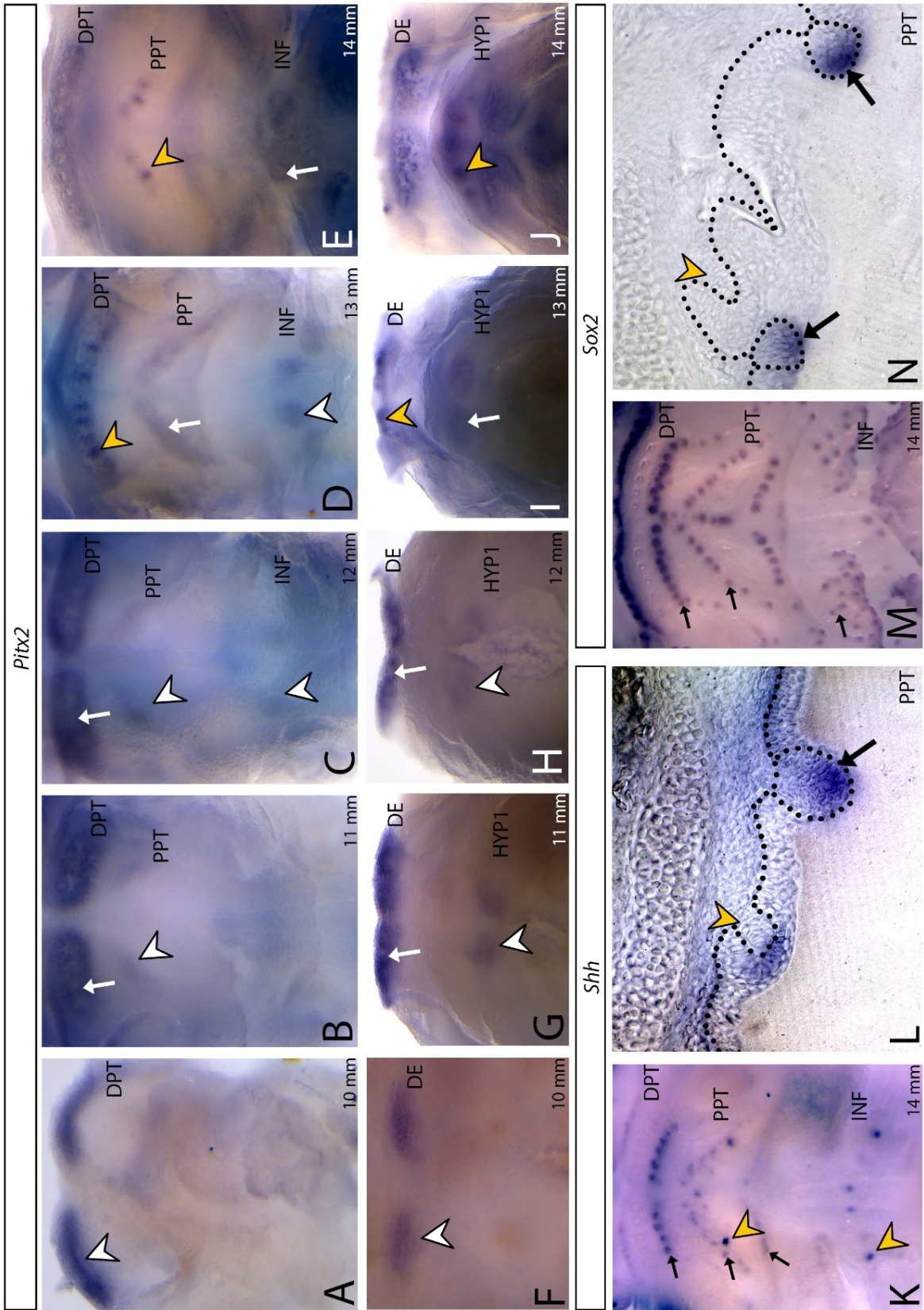
Azure B/eosin

Hypobranchiale 1



**Fig. 11: Exprese genů *Pitx2*, *Shh* a *Sox2* během iniciace a patternování dentice.**

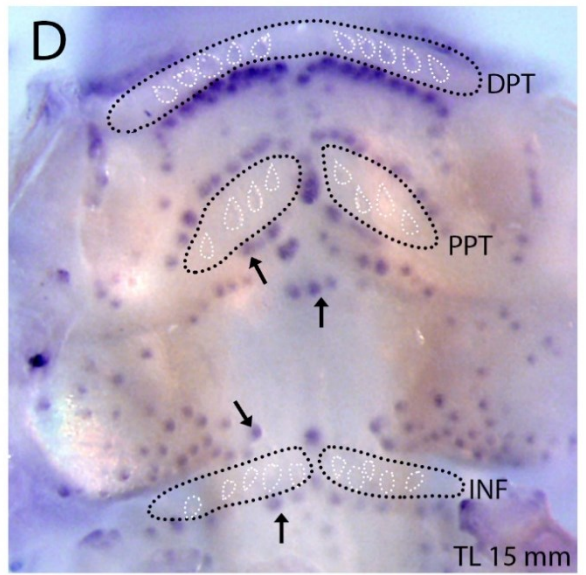
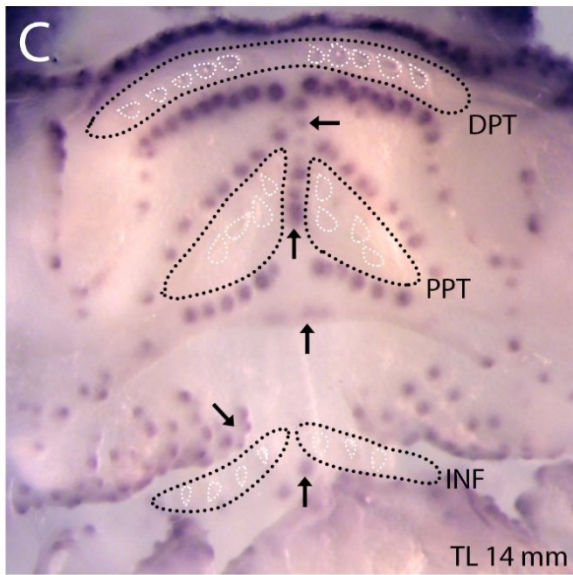
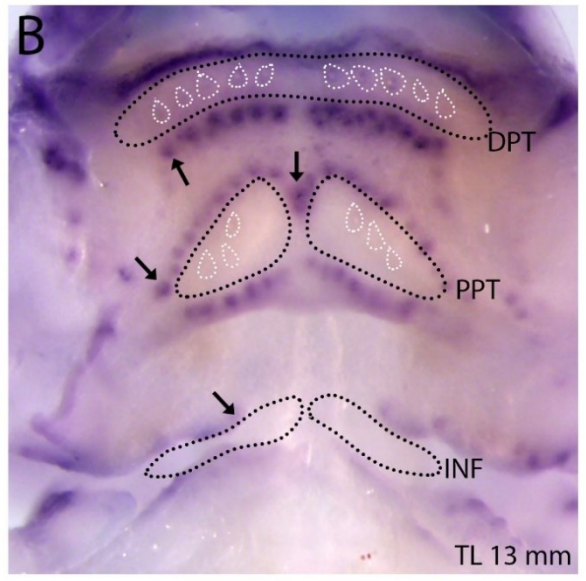
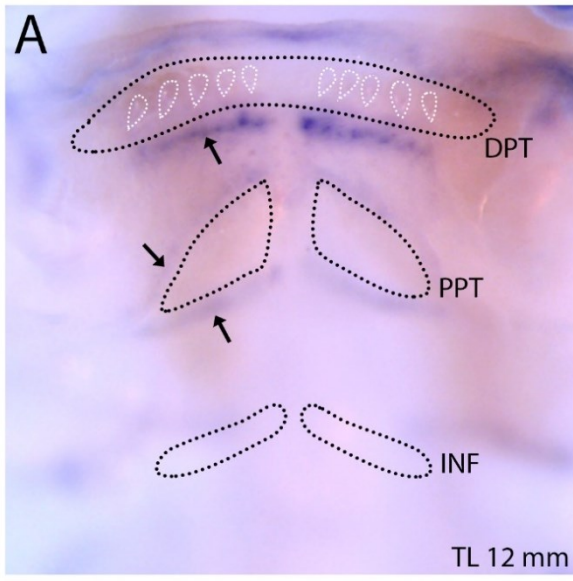
**(A-J)** Whole-mount hybridizovaní jedinci 10 až 14 mm TL. **(A-E)** Pohled na strop orofaryngeální dutiny (tzv. roof) po rozdělení hlavy jedince v místě čelistního kloubu a odebrání spodní části. **(F-J)** Pohled na dno orofaryngeální dutiny (tzv. floor) po rozdělení hlavy jedince v místě čelistního kloubu a odebrání horní části. Bílé hroty šipek značí počáteční expresi *Pitx2*, která vymezuje oblasti s odontogenním potenciálem, v kterých později vznikají zuby. Bílé šipky značí pozdější kompartmentalizovanou oblast exprese *Pitx2*. Žluté hroty šipek značí jednotlivé zubní zárodky. Hybridizace genu *Pitx2* byla provedena a nafocena Mgr. Annou Pospíšilovou Ph.D. **(K)** Pohled na strop orofaryngeální dutiny (tzv. roof) po odpreparování spodní části. Whole-mount hybridizovaný jedinec ukazuje expresi genu *Shh* na úrovni mRNA. Černé šipky ukazují na expresi genu *Shh* v chuťových pohárcích, žluté hroty šipek ukazují expresi genu *Shh* v nových zubních zárodcích. **(L)** Sagitální řez o tloušťce 40  $\mu$ m provedený jedincem z obrázku K v místě zubního pole na palatopterygoidu (PPT), hlava směřuje doleva. Žlutý hrot šipky ukazuje pozici nově vznikajícího zubu, černá šipka ukazuje na chuťový pohárek. Černá tečkovaná čára představuje rozhraní epitelu a mesenchymu a také obtahuje samotný chuťový pohárek. Na řezu je patrné, že signál *Shh* je vidět jak v chuťovém pohárku, tak v nově vznikajícím zubu. **(M)** Pohled na strop orofaryngeální dutiny (tzn. roof) po odpreparování spodní části. Whole-mount hybridizovaný jedinec ukazuje expresi genu *Sox2* na úrovni mRNA. Černé šipky značí expresi genu *Sox2* v chuťových pohárcích, žluté hroty šipek značí pozici nově vznikajících zubních zárodků. **(N)** Sagitální řez o tloušťce 40  $\mu$ m provedený jedincem z obrázku M v místě zubního pole na palatopterygoidu (PPT), hlava směřuje doleva. Žlutý hrot šipky ukazuje pozici nově vznikajícího zubu, černá šipka ukazuje na chuťový pohárek. Pozitivní signál *Sox2* na úrovni mRNA je přítomný pouze v chuťových pohárcích, nikoli ve vyvíjejícím se zubním zárodku.



**Fig. 12: Exprese genu *Sox2* ukazuje vývoj a patternování chuťových pohárků.**

**(A-D)** Whole-mount hybridizovaní jedinci. Pohled na strop orofaryngeální dutiny (tzv. roof) po rozdělení hlavy jedince v místě čelistního kloubu a odebrání spodní části. Černá tečkovaná čára ohraničuje oblast s odontogenním potencionálem, v které vznikají zuby. Bílá tečkovaná čára zvýrazňuje již mineralizované zuby. Černé šipky ukazují na expresi genu *Sox2* v chuťových pohárcích. **(A)** Chuťové pohárky vznikají nejdříve posteriorně od zubů na dermopalatinu (DPT), slabý signál je již patrný také kolem zubního pole na palatopterygoidu, kde jsou již v dalším stádiu 13 mm TL **(B)** zřetelně viditelné chuťové pohárky. V tomto stádiu se slabý signál objevuje i kolem zubního pole na infrapharyngobranchiale (INF). U jedince 14 mm TL jsou již chuťové pohárky přítomny okolo všech zubních polí **(C)**. V dalším stádiu 15 mm TL chuťových pohárků dále přibývá posteriorním směrem **(D)**. Chuťové pohárky se s ontogenezí jedince vyvíjejí v antero-posteriorním směru, nejvíce v blízkosti zubních polí.

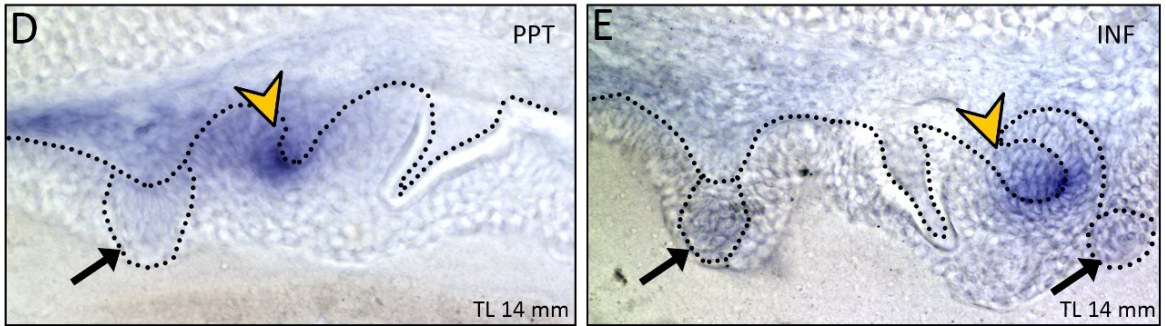
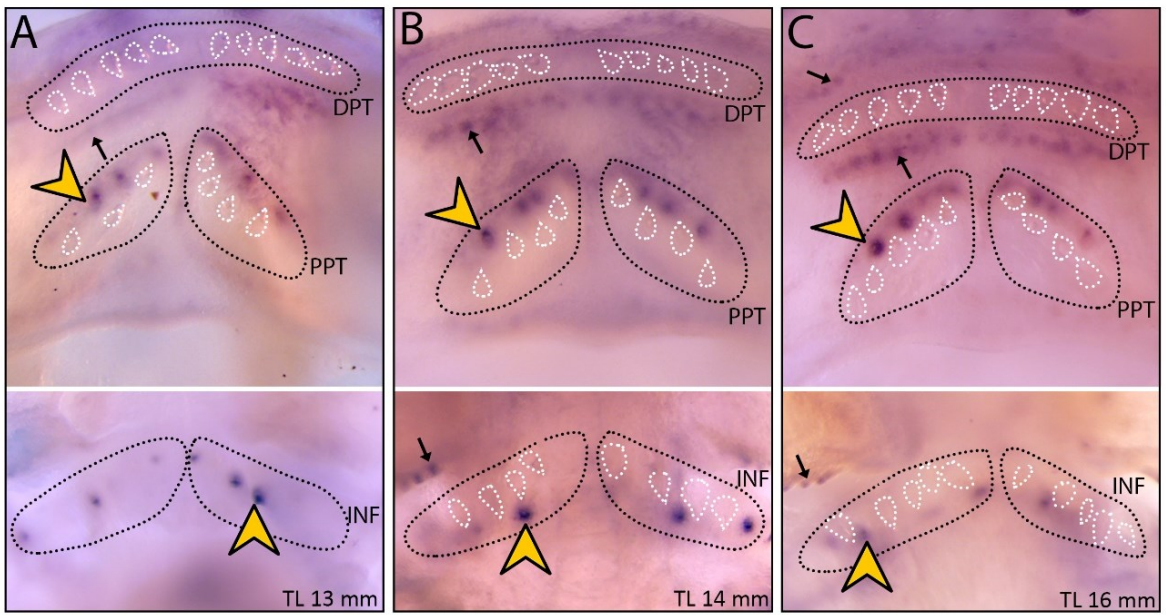
Sox2



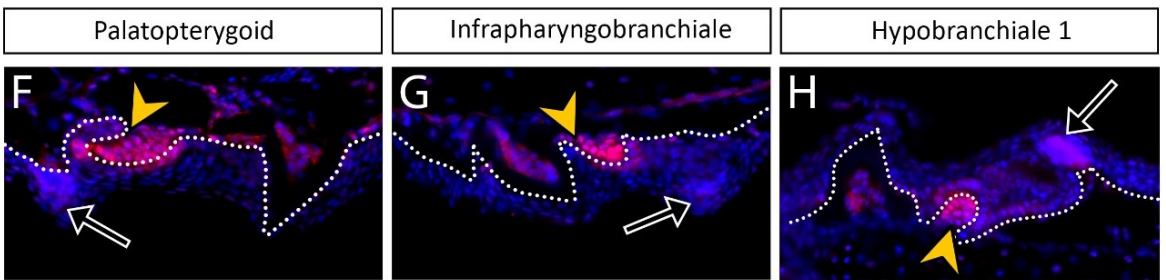
**Fig. 13: Exprese genu *Lef1* během raného vývoje zubů.**

**(A-C)** Whole-mount hybridizování jedinci 13 mm, 14 mm a 16 mm TL. Pohled na strop orofaryngeální dutiny (tzv. roof) po rozdělení hlavy jedince v místě čelistního kloubu a odebrání spodní části. Černá tečkovaná čára ohraničuje oblast s odontogenním potencionálem, ve které vznikají zuby. Bílá tečkovaná čára zvýrazňuje již mineralizované zuby. Černé šipky ukazují na expresi genu *Lef1* v chuťových pohárcích, žluté hroty šipek značí expresi genu *Lef1* v nových zubních zárodcích. **(D-E)** Řezy provedené na hybridizovaném whole-mount jedinci z obrázku (B) v místě zubního pole na palatopterygoidu (D, PPT) a infrapharyngobranchiale (E, INF). Černá tečkovaná čára ukazuje rozhraní epitelu a mesenchymu a ohraničuje chuťový pohárek. Žluté hroty šipek ukazují na expresi genu *Lef1* v místě vzniku nového zubního zárodku, černé šipky ukazují na expresi genu *Lef1* v chuťových pohárcích. **(F-H)** Imunohistochemické značení sagitálních řezů zubními poli na palatopterygoidu (F), infrapharyngobranchiale (G) a hypobranchiale 1 (H) o tloušťce 10  $\mu$ m, hlava orientována doleva. Žluté hroty šipek značí pozice nově vznikajících zubních zárodků, černé šipky značí chuťové pohárky. Pozitivní signál  $\beta$ -cateninů (červeně) je přítomný v zubních zárodcích v epitelu i mesenchymu. DAPI (modře) značí buněčná jádra.

*Lef1*

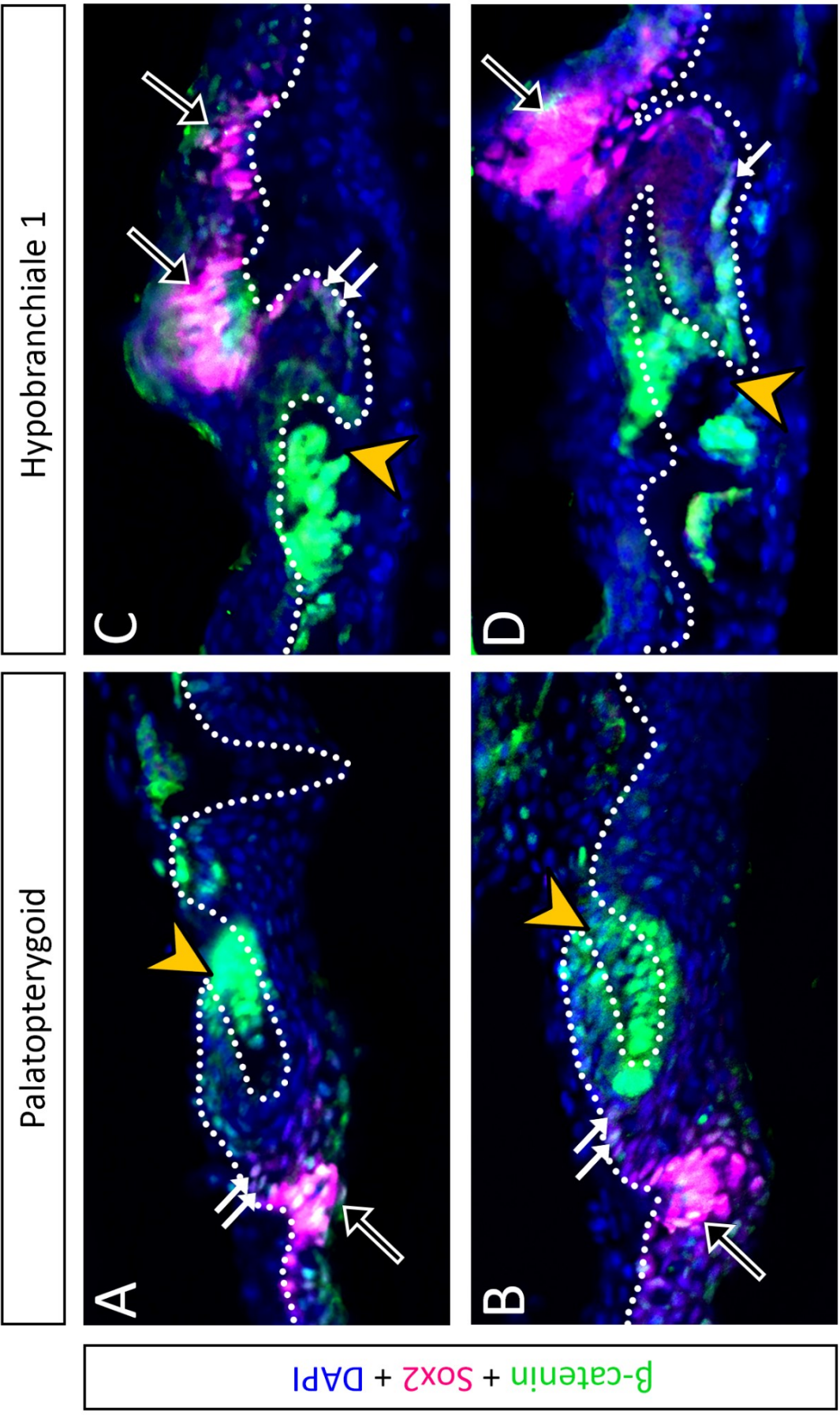


$\beta$ -catenin + DAPI



**Fig. 14: Identifikace přítomnosti  $\beta$ -cateninů a Sox2 v zubních polích při vývoji zubních zárodků.**

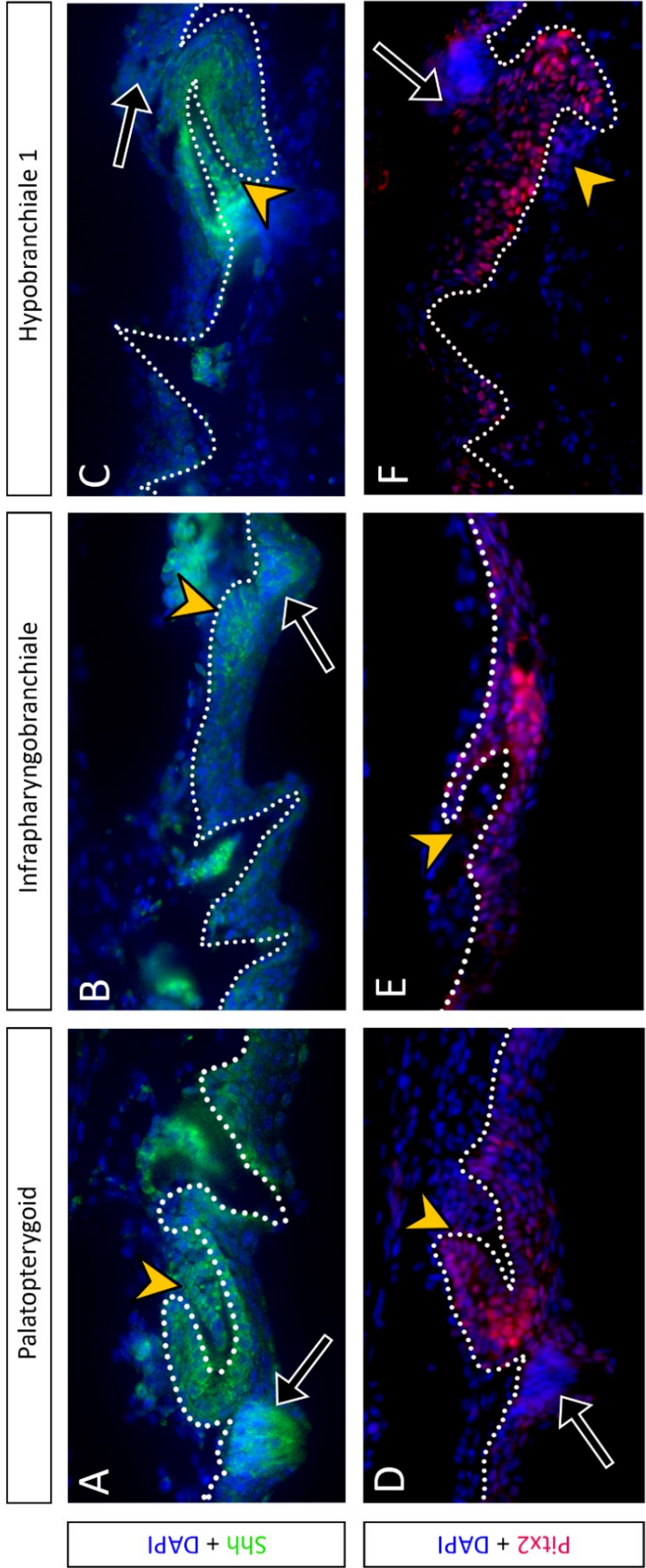
**(A-D)** Imunohistochemické značení sagitálních řezů zubními poli na palatopterygoidu (A, B), a hypobranchiale 1 (C, D) o tloušťce 15  $\mu$ m, hlava orientována doleva. Žluté hroty šipek značí pozice nově vznikajících zubních zárodků, černé šipky značí chuťové pohárky. Pozitivní signál Sox2 (magenta) je přítomný v chuťových pohárcích, mimo chuťové pohárky v bazální vrstvě epitelu vedoucí ke vznikajícímu zubnímu zárodku. Pozitivní signál  $\beta$ -cateninů je viditelný v mesenchymu i epitelu zubních zárodků i v chuťových pohárcích. Bílé šipky ukazují na místa dentálního epitelu, v kterých přechází pozitivní signál Sox2 v pozitivní signál  $\beta$ -cateninů. Signály se mírně překrývají. DAPI (modře) značí jádra buněk.



β-catenin + Sox2 + DAPI

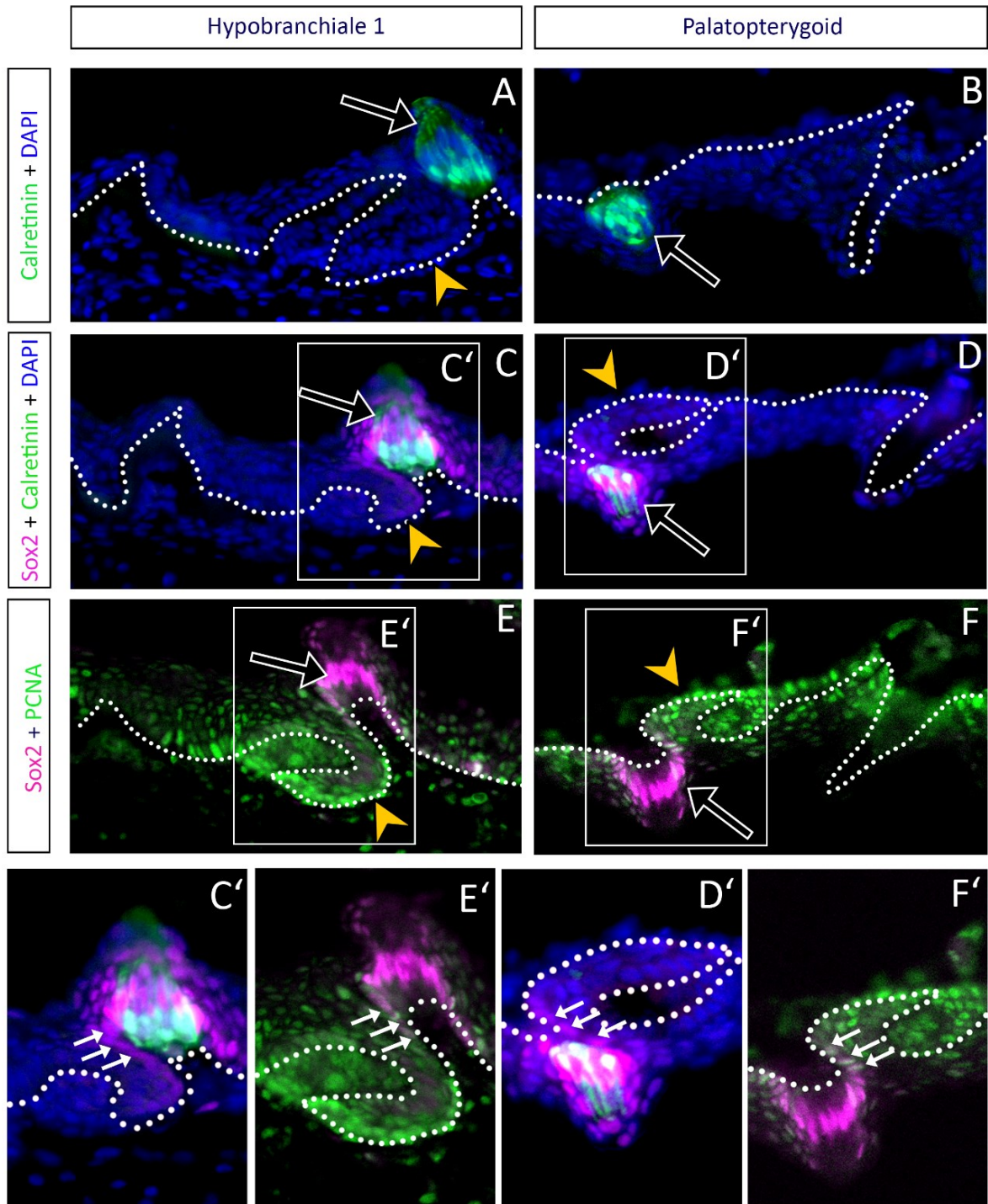
**Fig. 15: Identifikace přítomnosti Shh a Pitx2 v zubních polích při vývoji zubních zárodků.**

**(A-C)** Imunohistochemické značení sagitálních řezů zubními poli na palatopterygoidu (D), infrapharyngobranchiale (E) a hypobranchiale 1 (F) o tloušťce 10  $\mu\text{m}$ , hlava orientována doleva. Žluté hroty šipek značí pozice nově vznikajících zubů, černé šipky značí chuťové pohárky. Pozitivní signál proteinu Shh (zeleně) je viditelný v epitelu i v mesenchymu nově vznikajícího zubního zárodku a v chuťovém pohárku. DAPI (modře) značí jádra buněk. **(D-F)** Imunohistochemické značení sagitálních řezů zubními poli na palatopterygoidu (G), infrapharyngobranchiale (H) a hypobranchiale 1 (I) o tloušťce 10  $\mu\text{m}$ , hlava orientována doleva. Žluté hroty šipek ukazují pozice nově vznikajících zubních zárodků, černé šipky značí chuťové pohárky. Pozitivní signál Pitx2 (červeně) je viditelný v jádrech epiteliálních buněk, v dentálním epitelu je signál nejintenzivnější. DAPI (modře) značí jádra buněk.



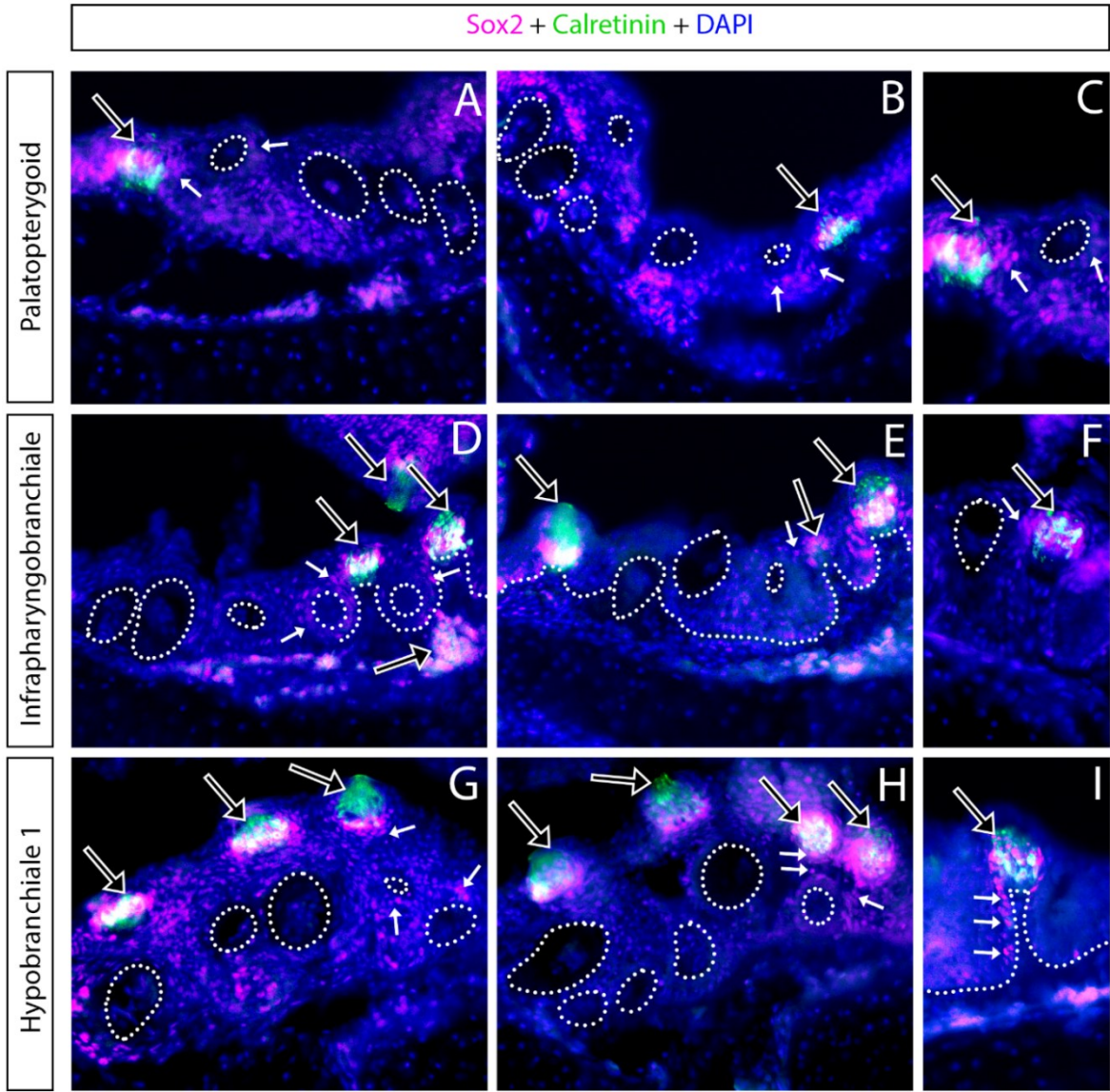
**Fig. 16: Analýza vztahu markeru zubních kmenových/progenitorových buněk Sox2, pozice chuťových pohárků a proliferujících tkání během vývoje zubních zárodků.**

**(A-F)** Imunohistochemické značení sagitálních řezů zubními poli na hypobranchiale 1 (A, C, E) a palatopterygoidu (B, D, F) o tloušťce 10  $\mu$ m, hlava orientována doleva. Bílá tečkovaná čára představuje rozhraní epitelu a mesenchymu. Žluté hroty šipek značí pozice nově vznikajících zubních zárodků, černé šipky značí chuťové pohárky, bílé šipky ukazují pozitivní signál proteinu Sox2 mimo buňky chuťového pohárku. **(A, B)** – Protilátkové barvení proti Calretininu (zeleně) označuje výhradně buňky chuťového pohárku. DAPI (modře) značí jádra buněk. **(C, C', D, D')** Protilátkové barvení proti Sox2 (magenta) a Calretininu (zeleně). Sox2 pozitivní signál vidíme nejen v buňkách chuťového pohárku, ale i v oblasti přesahující chuťový pohárek v místech dentálního epitelu (bílé šipky). Calretinin (zeleně) značí chuťový pohárek. DAPI (modře) značí jádra buněk. **(E, E', F, F')** Protilátkové barvení proti Sox2 (magenta) a PCNA (zeleně). Sox2 pozitivní signál je nejen v buňkách chuťového pohárku, ale i v oblasti přesahující chuťový pohárek (bílé šipky). PCNA značí proliferující buňky. **(C', D', E', F')** – Přiblížený detail obrázků C, D, E, F, který je fokusovaný na pozitivní Sox2 signál mimo chuťové pohárky.



**Fig. 17: Analýza vztahu markeru zubních kmenových/progenitorových buněk Sox2 a pozice chuťových pohárků na horizontálních řezech.**

**(A-I)** Imunohistochemické značení horizontálních řezů zubními poli na palatopterygoidu (A, B, C), infrapharyngobranchiale (D, E, F) a hypobranchiale 1 (G, H, I) o tloušťce 15  $\mu\text{m}$ , hlava orientována anteriorně. Bílá tečkovaná čára ohraničuje jednotlivé zuby, v případě obr. D, E a I představuje také rozhraní epitelu a mesenchymu u chuťového pohárku. Protilátkové barvení proti Sox2 (magenta) značí chuťové pohárky, ale signál je zřejmý i v místech mimo chuťové pohárky. Bílé šipky ukazují na signál Sox2 v místech dentálního epitelu a na místa, kde signál přesahuje chuťový pohárek. Calretinin (zeleně) značí chuťové pohárky, DAPI (modře) značí jádra buněk.

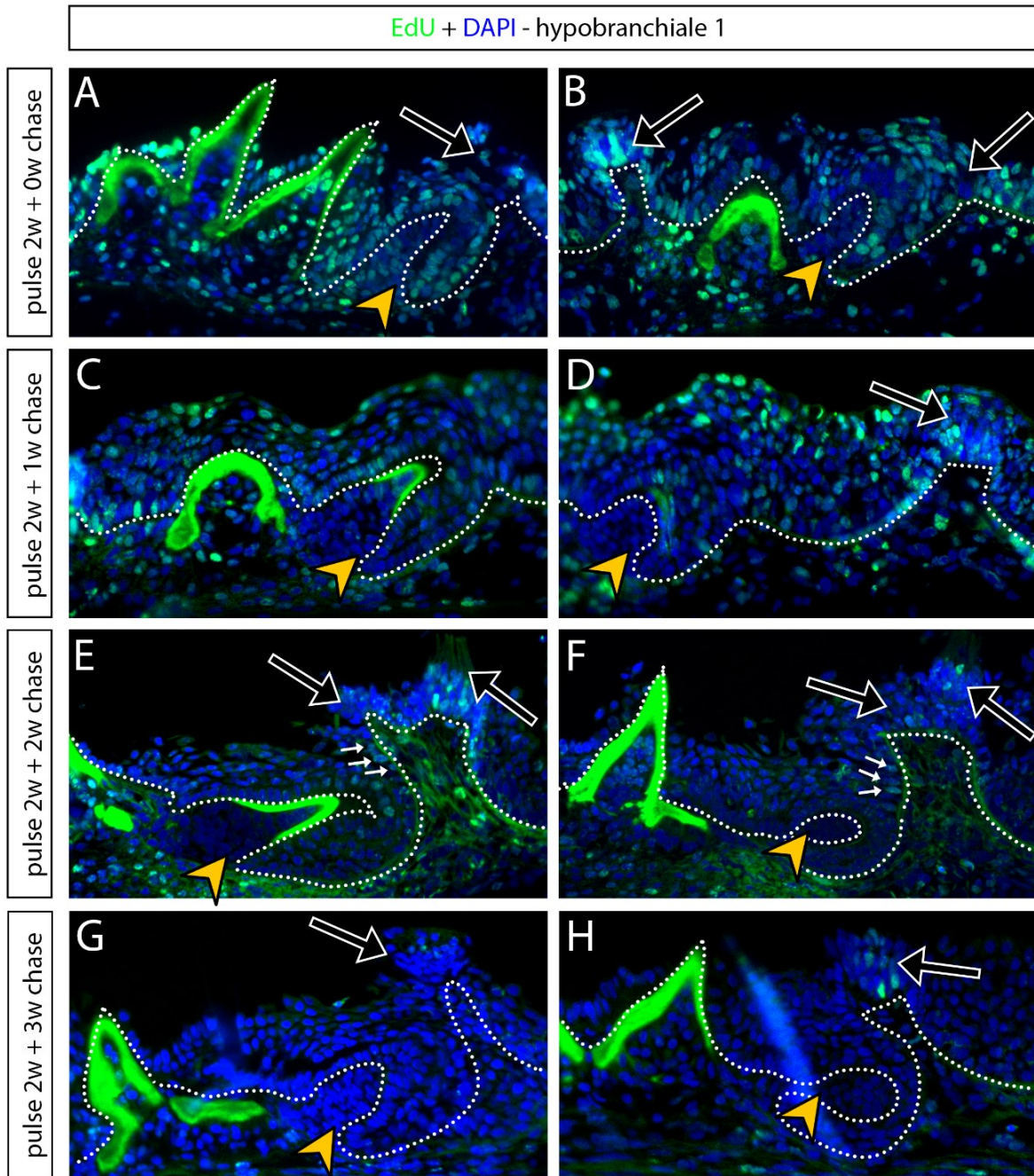


**Fig. 18: Identifikace potenciálních zubních kmenových/progenitorových buněk a míst s vysokou proliferací prostřednictvím EdU značení.**

**Tab. č. 3:** Průběh EdU experimentu – tabulka s údaji o průběhu experimentu, která obsahuje informace o době pulse (tj. doba vystavení jedinců působení EdU), době chase (tj. doba uplynutá po ukončení vystavování jedinců působení EdU), fixaci a počtu zafixovaných jedinců. **(A-H)** Sagitální řezy zubním polem hypobranchiale 1 o tloušťce 5  $\mu$ m, hlava orientována doleva. Bílá tečkovaná čára představuje rozhraní epitelu a mesenchymu. Žluté hroty šipek značí pozice nově vznikajících zubních zárodků, černé šipky značí chuťové pohárky, bílé šipky značí potenciální zubní kmenové/progenitorové buňky. **(A-B) I. fixace** (ihned po ukončení působení EdU, tj. 2w pulse + 0w chase) – signál je viditelný v jádrech velké části buněk epitelu i mesenchymu – buňky, které při působení EdU procházely mitotickým dělením, značí buněčnou proliferaci. **(C-D) II. fixace** (1 týden po ukončení působení EdU, tj. 2w pulse + 1w chase) – signálu ve srovnání s obrázkem znatelně (A-B) ubývá. Signál je však stále patrný v některých buňkách epitelu i mesenchymu, v ameloblastech zubních zárodků a v buňkách chuťových pohárků. **(E-F) III. fixace** (2 týdny po ukončení působení EdU, tj. 2w pulse + 2w chase) – signál je viditelný v jádrech terminálně diferencovaných buněk (chuťový pohárek a ameloblasty) a také v jádrech epitelálních buněk, které jsou mezi chuťovým pohárkem a nově vznikajícím zubním zárodkem v místě následného dentálního epitelu – navržené potenciální zubní kmenové/progenitorové buňky (bílé šipky). **(G-H) IV. fixace** (3 týdny po ukončení působení EdU, tj. 2w pulse + 3w chase) – signál je již viditelný pouze v jádrech buněk, které jsou terminálně diferencované (chuťový pohárek).

Tabulka č. 3 - průběh EdU experimentu

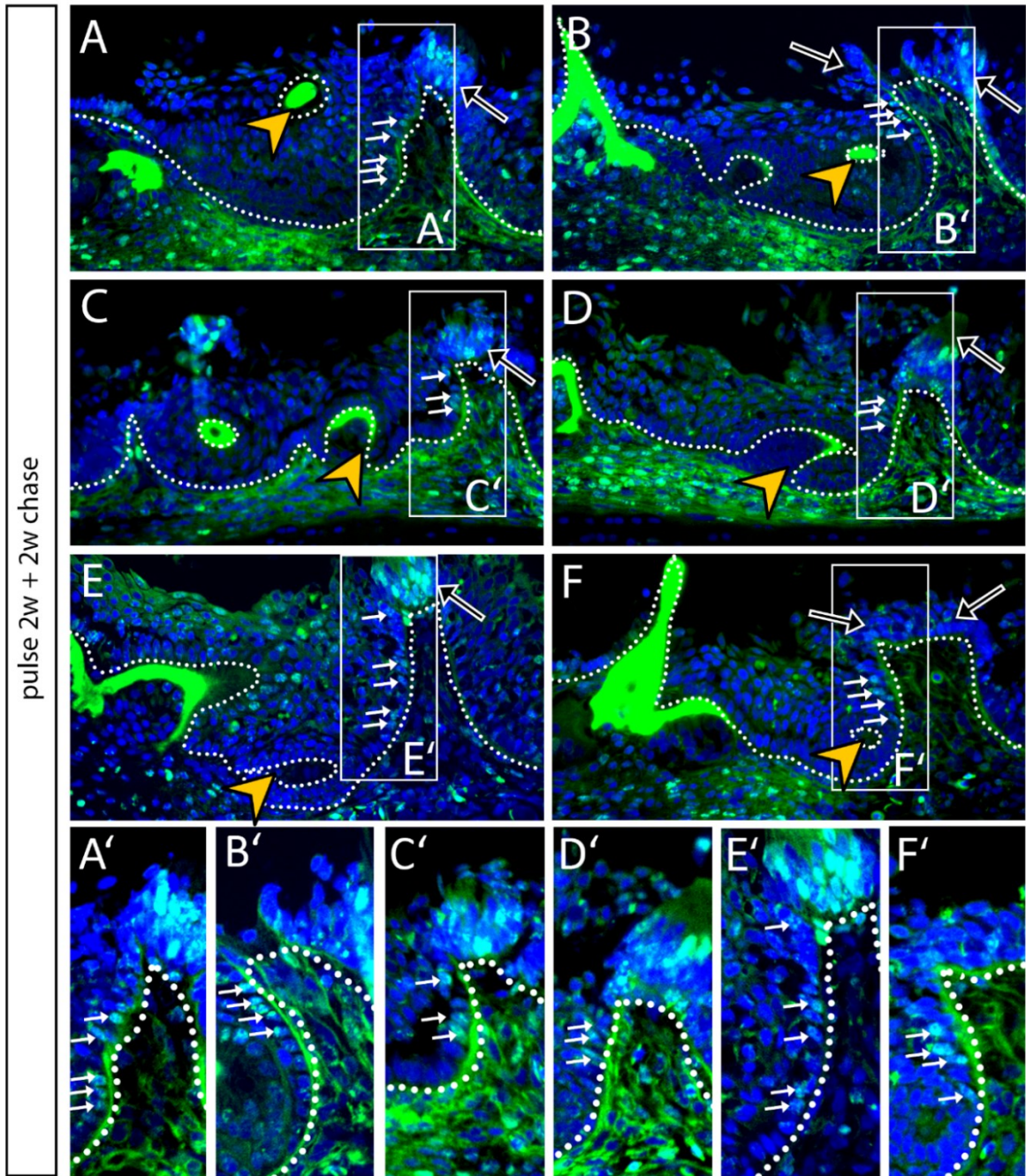
2w pulse	0w chase	1w chase	2w chase	3w chase	4w chase	5w chase
EdU –	0 týdnů	1 týden	2 týdny	3 týdny	4 týdny	5 týdnů
2 týdny po	I. fixace	II. fixace	III. fixace	IV. fixace	V. fixace	VI. fixace
dobu 2 hodin	5 jedinců	5 jedinců	5 jedinců	5 jedinců	5 jedinců	5 jedinců



**Fig. 19: Identifikace potenciálních zubních kmenových/progenitorových buněk a míst s vysokou proliferací prostřednictvím EdU značení – III. fixace.**

**(A-F)** Sagitální řezy zubním polem hypobranchiale 1 o tloušťce 5  $\mu\text{m}$ , hlava orientována doleva. Bílá tečkovaná čára představuje rozhraní epitelu a mesenchymu. Žluté hroty šipek značí pozice nově vznikajících zubních zárodků, černé šipky značí chuťové pohárky, bílé šipky značí potenciální kmenové/progenitorové buňky. **(A'–F')** Zvětšený detail obrázků (A-F) zaměřený na oblasti s potenciálně kmenovými/progenitorovými buňkami. Bílé šipky ukazují na jednotlivé buňky, které si uchovaly značení (LRCs).

EdU + DAPI - hypobranchiale 1



## 5. Diskuse

5.1. Vývoj palatální a faryngeální dentice je oproti orální dentici mírně opožděn a postupuje rostrálně-kaudálním směrem

Analýza získaných dat genové exprese umožnila popis dentice jesetera malého od samotné iniciace zubních zárodků. Nejdříve dochází k vývoji zubů v oblasti horní čelisti na budoucím dermopalatinu (DPT) a dolní čelisti na budoucím dentale (DE), k jejich vzniku dochází současně. Tyto zuby, které vytvářejí marginální dentici na čelistech, se od zbytku veškeré dentice nejvíce odlišují. Hlavním rozdílem od ostatních zubních polí je monostichní uspořádání, tj. uspořádání zubů do jedné zubní řady, a monofyodontie, tj. jedna funkční generace zubů bez vzniku zubů náhradních (Pospíšilová et. al, in prep.). Zuby na čelistech sice vzniknou jako první, ale právě kvůli jejich nenahrazujícímu charakteru tato zubní pole přestávají být funkční velmi brzy v ontogenezi.

Palatální a faryngeální zubní pole jsou svým vývojem oproti dentici na čelistech mírně opožděna. Navzdory tomu jsou, díky vývoji více zubních generací, tato zubní pole funkční podstatně delší dobu během ontogenetického vývoje jesetera. Jako další zároveň vznikají zubní pole posteriorně od čelistí, a to dorzálně na patře na palatopterygoidu (PPT) a ventrálně v anteriorní části fáryngu na hypobranchiale na prvním žaberním oblouku (HYP1). Následně vzniká dorzálně zubní pole na infrapharyngobranchiale (INF) na prvním žaberním oblouku a nejpozději vzniká ventrálně zubní pole na hypobranchiale na druhém žaberním oblouku (HYP2). Tato data ukazují na trend vzniku zubních polí v rámci orofaryngeální dutiny ve směru rostrálně-kaudálním. Podobné schéma vzniku zubních polí bylo popsáno i u příbuzného veslonose (Smith et al., 2015), a tudíž se zřejmě bude jednat o společný znak linie Acipenseriformes.

5.2. Zubní pole procházejí v průběhu vývoje jesetera významnými přestavbami

Zubní pole jsou v orofaryngeální dutině uspořádána ve vzájemné okluzi. Konkrétně proti sobě okludují zubní pole na dermopalatinu a dentale, palatopterygoidu a hypobranchiale 1, infrapharyngobranchiale a hypobranchiale 2 (Fig. 1A). Vizualizace mineralizovaných tkání umožnila popsání, kde se v rámci zubních polí vyvíjejí nové zuby, a kde naopak zuby vypadávají, což způsobuje viditelné rozrušení zubních desek. Jednotlivá zubní pole se mezi

sebou liší v mnoha aspektech, a to převážně uspořádáním, tvarem a náhradou zubů. Dentici na čelistech tvoří jedna zubní řada bez náhradních zubních generací, po vypadnutí zůstávají čelisti bezzubé. Oproti tomu zubní pole lokalizovaná na palatopterygoidu a na anteriorních faryngeálních elementech jsou tvořena více zubními řadami a po určitou dobu ontogenetického vývoje jesetera procházejí velmi dynamickým vývojem. Tato doba začíná iniciací prvních zubních zárodků, pokračuje tvorbou nových náhradních zubů a vypadáváním nejstarších funkčních zubů. Tento dynamický vývoj funguje na principu synchronního vzniku nových zubních zárodků na jedné straně zubního pole a vypadávání nejstarších zubů na opačné straně zubního pole. U vypadávajících zubů byla detekována aktivita enzymu TRAP, který je produkovaný osteoklasty a odontoklasty (Okamura et al., 1993; Sasaki et al., 2003). Tato aktivita, která je patrná na bázi zubu, spouští proces vypadnutí a je přítomná, dokud nedojde k vypadnutí zubu a resorpci jeho báze (Fig., 5C, 5D). Po určité době dochází ke zpomalování tvorby náhradních zubů, počet zubů se snižuje, a nakonec je dentice zcela ztracena. Dospělí jedinci jsou bezzubí (Nelson, 1969).

Z předchozího pozorování je patrné, že zubní pole jesetera prochází dynamickou proměnou adice a ztráty zubů. Tuto dynamiku a celkovou rychlost cyklu náhrady zubů ukázal experiment s vitální fluorescenční barvou kalceinem, který se váže pouze na mineralizující struktury, takže označuje pouze nově vznikající zuby. Funkční zuby se signálem kalceinu, které se v rámci zubních polí objevily v následujícím týdnu až šesti týdnech, představují náhradní zuby, které v době působení kalceinu nově vznikaly. U všech zubních polí byla první týden označena první zubní řada od směru přirůstání dentice. Každý další týden vznikla přibližně jedna nová zubní řada (již bez působení kalceinu, a tedy i signálu kalceinu) a označené zuby se tak vznikem nových zubů v zubním poli posouvaly na posteriorní část zubního pole (palatopterygoid) nebo na anteriorní část zubního pole (infrapharyngobranchiale a hypobranchiale 1), dokud se nedostaly na okraj zubního pole a nedošlo k jejich vypadnutí. K tomu u jedinců, jejichž zubní desky se skládaly přibližně ze čtyř až pěti zubních řad, došlo po zhruba šesti týdnech, tj. nově vzniklý zub byl funkční po dobu pěti týdnů. Z toho lze vyvodit, že vývoj zubního zárodku, než se stane zubem funkčním, trvá přibližně jeden týden. Toto pozorování odhaluje značnou rychlost a dynamiku při vývoji a přestavbě zubních polí.

Tento poměrně rychlý proces vzniku zubů na jedné straně zubního pole a ztráta zubů na straně opačné zapříčiňuje remodelaci a rozšiřování zubních polí. Jak je vidět na Fig. 2-4, nové zuby vznikají v pozicích mezi zuby předchozí řady a po určitou dobu vývoje jedince takto dochází ke zvětšování zubních desek, a to navyšováním počtu zubních řad a také jejich rozšiřování v laterálním a mediálním směru, což by například u zubního pole na infrapharyngobranchiale mohlo vést ke spojení levé a pravé zubní desky (Fig. 3D). U starších stádií je patrné, že dochází ke zpomalování náhrady dentice a zubů celkově na zubních polích ubývá, a to již u jedinců kolem 70 mm TL. Po ztrátě veškeré dentice se u jesetera vyvíjí drtící hřebeny v místě, kde bývalo zubní pole na hypobranchiale 1. Tyto hřebeny okludují oproti dorzální části orofaryngeální dutiny, u níž dochází k zesílení pomocí chrupavčitého palatálního komplexu (Nelson 1969; Findeis 1997; Warth et al., 2017a).

### 5.3. Nové zubní zárodky u jesetera vznikají bez formace následné dentální laminy

Dříve byla dentální lamina, tj. hluboká epiteliální invaginace, považovaná za nezbytnou strukturu při vývoji dentice a její přítomnost či nepřítomnost se používala k odlišování zubů a dermálních dentikul, tj. zubům podobným elementům dermálního skeletu (Reif, 1982). Tato hypotéza se ukázala být pravdivou u mnoha druhů obratlovců, kde je následná dentální lamina opravdu klíčovou strukturou pro vznik náhradních zubů a místem epiteliálních kmenových/progenitorových buněk účastnících se na vývoji nového zubního zárodku (např. Martin et al., 2016; Thiery et al., 2017, Salomies et al., 2019). Nicméně se ukázalo, že u některých zástupců paprskoploutvých ryb následná dentální lamina není přítomná a náhradní zuby se vyvíjejí přímo z přilehlého povrchového epitelu. Tato skutečnost byla popsána např. u bichira, lososa, koljušky a veslonose (Huysseune et Witten, 2008; Vandenplas et al., 2014; Smith et al., 2015; Square et al., 2021). Moje práce dokládá, že ke druhům, u nichž náhradní zuby vznikají bez následné dentální laminy, patří také jeseter malý. Při pozorování vývoje náhradních zubních zárodků u všech polyfyodontních zubních polí je patrné, že vznikají bez hluboce zanořeného epitelu, a to přímo z povrchového dentálního epitelu předcházejícího zuby. Zajímavé je, že u zástupců, u kterých není přítomná následná dentální lamina (bichir, losos), byl popsán střední dentální epitel nacházející se mezi vnitřním a vnějším dentálním epitelem. Byla navržena hypotéza, že by tato oblast mohla funkčně nahrazovat dentální laminu (Huysseune et Witten, 2008; Vandenplas et al., 2014), další výzkum však tuto hypotézu nepodpořil

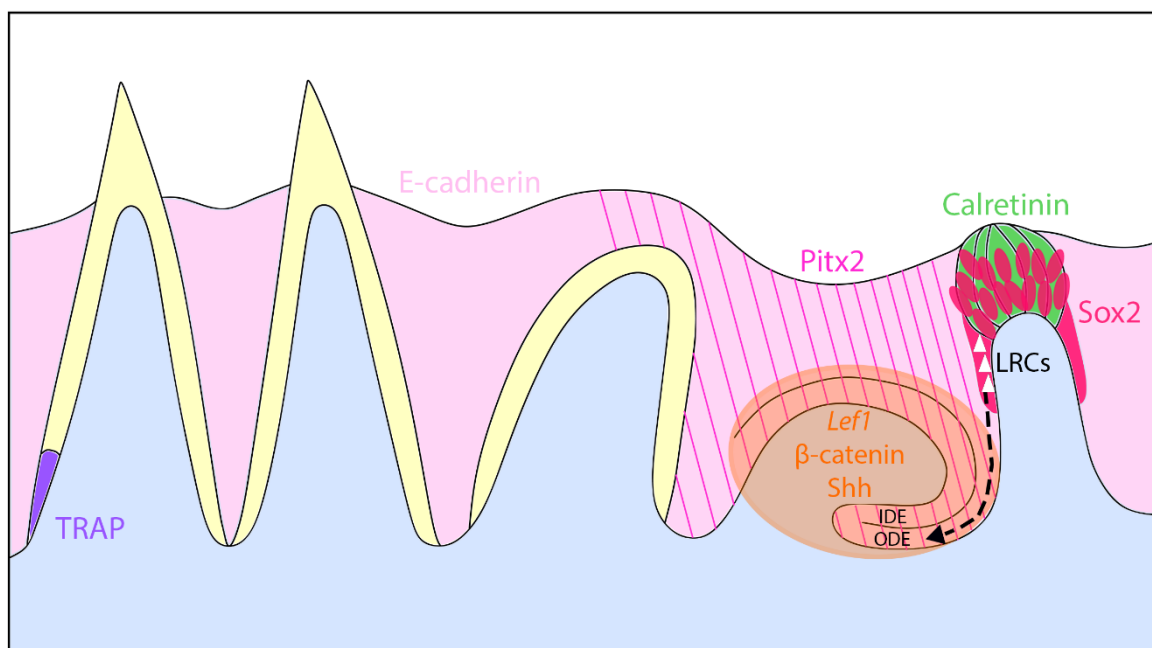
(Vandenplas et al., 2016). Střední dentální epitel jsem byla schopná identifikovat i u jesetera. Při analýze mnou získaných dat také nebyla zjištěna souvislost středního dentálního epitelu se vznikem náhradních zubních zárodků. Jedná se tedy o další případ nepotvrzující tuto hypotézu.

Vyvstává otázka, zdali je stav náhrady zubů bez dentální laminy plesiomorfním stavem obratlovců. U fosilního druhu *Andreolepis hedei*, který se řadí mezi kmenové zástupce Osteichthyes, dentice pravděpodobně postrádala následnou dentální laminu (Chen et al., 2016). Na základě tohoto zjištění, byla navržena hypotéza, která pokládá vznik následné dentální laminy za událost, která se odehrála nezávisle v různých liniích a náhradu zubů bez této struktury pokládá za stav přítomný již u posledního společného předka Osteichthyes (Chen et al., 2016). Tato data naznačují, že systém náhrady zubů bez dentální laminy, který se vyskytuje u zástupců bazálních linií paprskoploutvých ryb např. u již zmíněného bichira a veslonose, a jak je ukázáno v této práci, i u jesetera, vykazuje určitou podobnost s náhradou dentice u raných obratlovců. Toto zjištění přispívá k hypotéze, že náhrada zubů bez dentální laminy představuje u paprskoploutvých ryb zachovaný ancestrální stav znaku, spíše než sekundárně odvozený stav (Vandenplas et al., 2014; Chen et al., 2016).

Výzkum porovnávající vývoj zubních zárodků z dentální laminy (dánio) i v případě její absence (koljuška) poukázal na přítomnost exprese obdobných genů v obou případech vývoje (Square et al., 2021). Všechny zmíněné skutečnosti dohromady naznačují, že by se mohlo jednat o funkčně stejný systém pouze s různým fenotypickým projevem, tj. jak navrhl Square et al. (2021) souhrnným názvem následný dentální epitel (SDE).

5.4. Náhradní zuby vznikají u jesetera z progenitorových buněk v blízké asociaci s chuťovými pohárky

Jeseteří polyfyodontní zubní pole, tj. zubní pole na palatopterygoidu, infrapharyngobranchiale, hypobranchiale 1 a hypobranchiale 2, se skládají z více funkčních zubních řad a vyvíjejících se zubních zárodků (viz obr. 4).



**Obr. 4:** Souhrnné schématické znázornění zubního pole na hypobranchiale 1 (HYP1), sagitální řez, hlava orientována doleva. Schéma bylo zakresleno na základě dat v této diplomové práci a znázorňuje zubní pole v průběhu cyklu vypadávání a náhrady dentice. Na anteriorní straně zubního pole je znázorněn funkční zub, u které započíná vypadávání (aktivita TRAP, fialová barva), posteriorně za ním se nachází další funkční zub. Na pozici za ním se nachází zubní zárodek v pokročilé fázi vývoje před erupcí. Nejvíce posteriorně leží v těsné blízkosti chuťového pohárku nově vznikající zubní zárodek. Světle růžová barva značí epitel, modrá barva mesenchym, zelená barva chuťový pohárek. Červenou barvou je označena populace pozitivních Sox2 buněk, bílé trojúhelníky značí LRCs buňky, přerušovaná čára značí navrhovaný pohyb potenciálních dentálních epiteliálních progenitorových buněk, IDE (vnitřní dentální epitel), ODE (vnější dentální epitel). V nově vznikajícím zubním zárodku je pozitivní signál Pitx2 (tmavě růžové šrafování, epitel), *Lef1*,  $\beta$ -catenin, a *Shh* (oranžová barva, epitel a mesenchym).

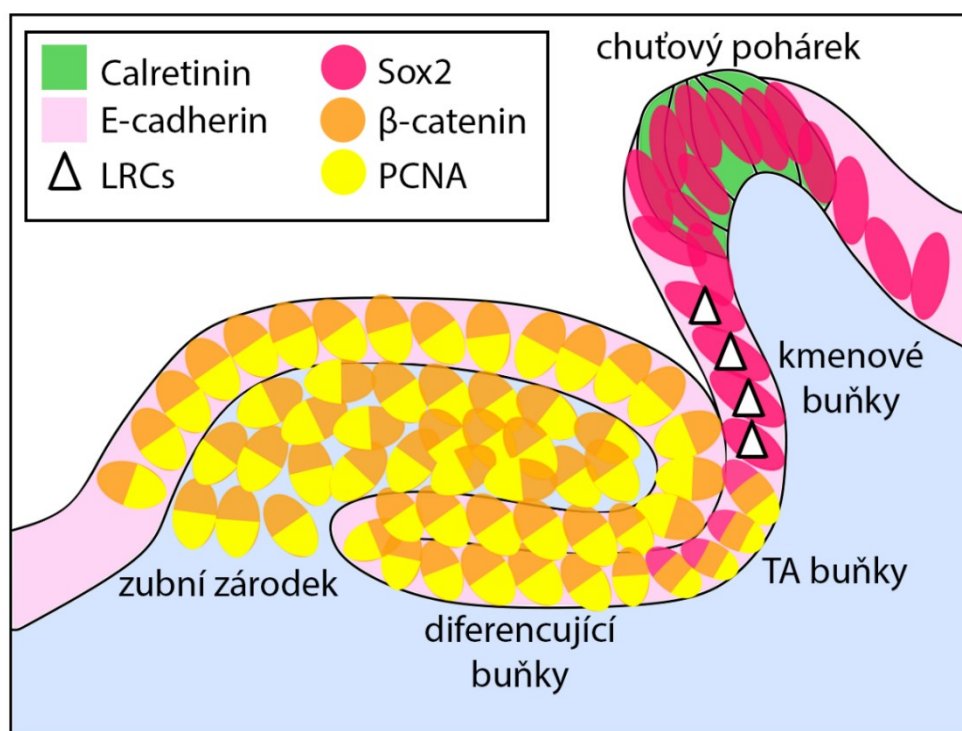
Nově vznikající zubní zárodek se vyvíjí superficiálně z vnějšího dentálního epitelu (ODE) předcházejícího zubu, na který je dále napojen svým vnitřním dentálním epitelem (IDE). Střední dentální epitel (MDE) byl identifikován jen u některých stádií zubních zárodků a nebyla rozpoznána jeho funkce. Nejčasnějším odontogenním markerem, který předznamenává samotný vznik zubních zárodků, je *Pitx2*, jehož exprese značí v časnějších stádiích kontinuální oblasti odontogenního potenciálu, později se exprese rozděluje na menší kompartmenty a značí jednotlivé zárodky zubů (Fig. 11A–11J). Exprese genu *Sox2* na úrovni mRNA byla přítomná výlučně v chuťových pohárcích, jejichž vznik můžeme

pozorovat od anteriorní k posteriorní oblasti převážně okolo zubních polí, v zubních zárodcích však nikoli (Fig. 12). Nicméně přítomnost Sox2 proteinu byla detekována v širší oblasti i mimo chuťový pohárek (Fig. 16) (viz dále). Exprese *Shh* byla detekována v epitelu vyvíjejících se zubních zárodků, stejně tak jako v chuťových pohárcích, ale chyběla v mesenchymu. Zajímavé je, že Shh protein byl přítomen v širší oblasti epitelu než *Shh* transkript, a navíc i v zubních mesenchymálních buňkách. Z toho vyplývá, že v průběhu vývoje zubního zárodku je Shh protein schopen se rozšířit mimo *Shh* exprimující buňky v dentálním epitelu do mesenchymálních buněk zubu. Podobná situace byla popsána i u zubu myši (Cobourne et al., 2004).

Jak bylo ukázáno, Wnt/ $\beta$ -catenin signální dráha hraje klíčovou roli při náhradě zubů (např. Gaete et Tucker, 2013; Huysseune et al, 2014). Ke tvoření dalších zubů dochází díky zvýšení proliferace dentálního epitelu, což je způsobené zvýšenou expresí *Lef1*, downstream efektoru Wnt/ $\beta$ -catenin signální dráhy. Například overexprese *Lef1* vede u myši ke zvýšení proliferace epiteliálních kmenových buněk, vytvoření nového labiálního kompartmentu kmenových buněk krčkové kličky, ze kterého vznikají rychle rostoucí dlouhé řezáky podobné klům (Sun et al., 2016). Udržování či proliferace zubních kmenových buněk je tedy ovlivňováno skrze regulace Wnt signální dráhy (Tummers et Thesleff, 2009; Handrigan et Richman, 2010). Tato práce dokládá důležitost Wnt signální dráhy u nahrazování dentice jesetera malého. *Lef1* se ukázal být exprimován jak v zubních zárodcích zubů první generace (např. Fig. 13A, INF), tak u náhradních zubních zárodků (např. Fig 13B, INF). Jeho exprese je lokalizovaná ve špičce vyvíjejícího se zubu v dentálním epitelu i v mesenchymu. Pozitivní jaderný signál  $\beta$ -catenin byl také přítomný v dentálním epitelu i mesenchymu nově vznikajících zubních zárodků. Tento signál je nejsilnější ve vnitřním dentálním epitelu (IDE) a jeho intenzita ubývá ve vnějším dentálním epitelu (ODE) směrem k chuťovému pohárku (Fig. 13F, 14B). Zdá se, že u pár těchto posledních buněk dochází k překryvu pozitivního signálu  $\beta$ -catenin se Sox2, jehož intenzita od vnějšího dentálního epitelu směrem k chuťovému pohárku se naopak zvyšuje (obr. 5).

Na základě porovnání Sox2 pozitivních buněk s pozitivním či negativním signálem  $\beta$ -catenin, PCNA a pozicí nalezených LRCs buněk můžeme navrhnout přítomnost jednotlivých typů buněk účastnících se vzniku zubního zárodku. Oblast s předpokládanými zubními kmenovými buňkami obsahuje EdU pozitivní LRCs buňky, v kterých je zároveň

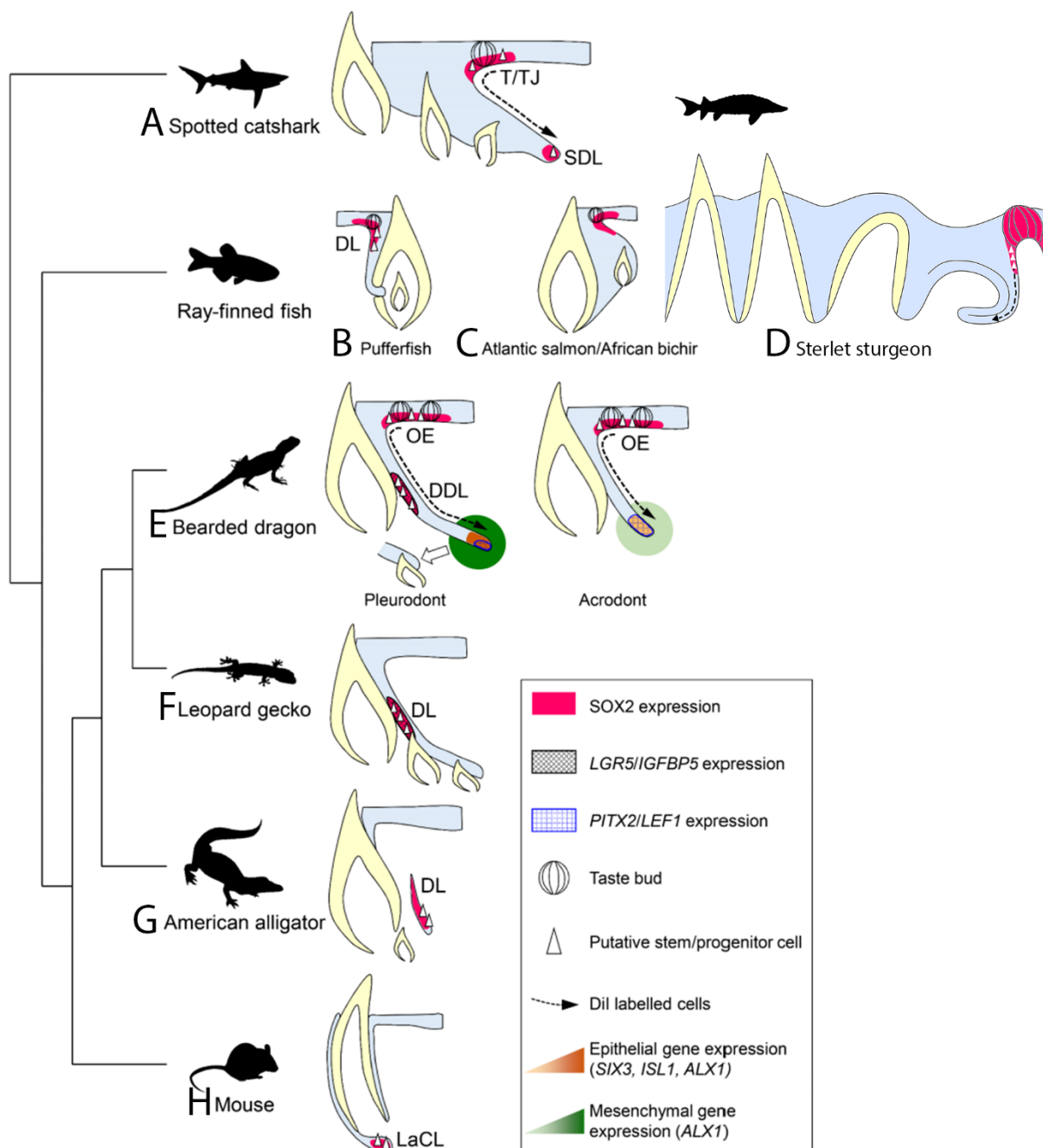
přítomný pozitivní signál Sox2 a nepřítomný signál  $\beta$ -catenin a PCNA. Tyto domnělé kmenové buňky dávají vznik navrženým progenitorovým/TA buňkám, které díky svému proliferujícímu charakteru již neobsahují EdU signál, ale je v nich zároveň přítomný pozitivní signál Sox2,  $\beta$ -catenin a PCNA. Tyto buňky zřejmě dávají vznik dentálním diferencujícím buňkám, v kterých je detekovatelný silný signál  $\beta$ -catenin a PCNA, a na rozdíl od buněk předchozích již nemají Sox2 pozitivní signál (obr. 5). Zde navržené schéma vývoje jeseteří dentice je v souladu s publikovanými pracemi na ostatních druhích obratlovců a podporuje hypotézu, že Wnt/ $\beta$ -catenin signální dráha se zdá hrát zásadní roli v rozhodování, jestli kmenové buňky zůstanou kmenové, či začnou proliferovat a diferencovat se v buňky dentální.



**Obr. 5:** Schématické zakreslení znázorňující navrženou přítomnost typů buněk účastnících se tvorby nově vznikajícího zubního zárodku na základě pozitivního či negativního signálu Sox2,  $\beta$ -catenin, PCNA a LRCs buněk z EdU experimentu. Sagitální řez zubním polem na hypobranchiale 1 (HYP1), hlava orientována doleva. Červená barva značí pozitivní signál Sox2, oranžová barva  $\beta$ -catenin, žlutá barva PCNA, bílé trojúhelníky LRCs buňky. Růžová barva značí E-cadherin přítomný v epitelu, modrá barva mesenchym. Zeleně je znázorněn chuťový pohárek (TB). Kombinace signálu Sox2 a LRCs představuje navržené kmenové buňky, Sox2 společně se signálem  $\beta$ -catenin a PCNA představuje navržené TA buňky a samotný signál  $\beta$ -catenin a PCNA představuje navržené diferencující se dentální buňky.

## 5.5. Vývoj dentice z kmenových/progenitorových buněk u jesetera v kontextu ostatních obratlovců

Jak již bylo navrženo u několika polyfyodontních druhů, identifikace LRCs buněk spojená s koexpresí markeru kmenových/progenitorových buněk Sox2 podporuje hypotézu o důležitosti epiteliálních kmenových/progenitorových buněk při náhradě zubů obratlovců (viz obr. 6).



**Obr. 6:** Schématické porovnání náhrady zubů u žraloka (A) (Martin et al., 2016), čtverzubce (B) (Thierry et al., 2017), lososa a bichira (C) (Vandenplas et al., 2016), jesetera (D) (moje

práce), agamy (**E**) (Salomies et al., 2019), gekončika (**F**) (Handrigan et al., 2010) a aligátora (**G**) (Wu et al., 2013) se zakreslením pozic nově vznikajících zubních zárodků, chuťových pohárků (TB), oblastí domnělých kmenových/progenitorových buněk (bílé trojúhelníky) a molekulárních faktorů podílejících se na tvorbě náhradních zubů. Tečkovaná šipka značí u žraloka a agamy Dil označené migrující buňky, u jesetera značí navržený pohyb domnělých zubních epiteliálních kmenových buněk. Pro porovnání je zakreslena i oblast domnělých kmenových/progenitorových buněk u myšího řezáku (**H**) (Harada et al., 1999). Upraveno ze Salomies et al., 2019.

Například u žraloka migrují Sox2 pozitivní domnělé progenitorové dentální buňky z orálního epitelu z místa označovaného jako taste-tooth junction, (T/TJ) do následné dentální laminy (obr. 6A) (Martin et al., 2016). U linie paprskoploutvých ryb byly rozlišeny dva systémy náhrady zubů. První systém byl popsán například u čtverzubce (obr. 6B) (Thiery et al., 2017) a navržený byl i u cichlid (Fraser et al., 2013), kde se Sox2 pozitivní oblasti s domnělými zubními progenitorovými buňkami nachází v superficiální části dentální laminy. U druhého systému, který je přítomný u lososa či bichira (obr. 6C) (Vandenplas et al., 2016), nebyly identifikovány žádné epiteliální LRCs buňky, pouze pozitivní signál Sox2 v přechodové oblasti orálního epitelu a vnějšího dentálního epitelu. U agamy byly Sox2 pozitivní LRCs buňky identifikovány v orálním epitelu s následnou migrací do následné dentální laminy (obr. 6E) (Salomies et al., 2019). U gekončika byly potenciální kmenové buňky identifikovány na linguální straně dentální laminy (obr. 6,F) (Handrigan et al., 2010) a u aligátora ve vyboulení na distálním konci dentální laminy (obr. 6G) (Wu et al., 2013). U obou druhů byl s touto oblastí obsahující domnělé kmenové buňky ukázán překryv s pozitivní expresí Sox2. U myšího řezáku se oblast s pozitivním Sox2 signálem a kmenovými buňkami, které zajišťují jeho kontinuální růst, nachází v labiální krčkové kličce (obr. 6H) (Juuri et al., 2012). Sox2 signál je u myši exprimovaný i v přechodné rudimentární následné dentální lamině (RSDL), která dává při navýšení Wnt/ $\beta$ -catenin signální dráhy vznik nadpočetným zubním zárodkům (Popa et al., 2019).

Situace u jesetera (obr. 6D) se od zmíněných případů (kromě bichira a lososa) liší skutečností, že náhradní zuby vznikají bez následné dentální laminy. Navzdory této odlišnosti je zde však nápadná podobnost s průběhem nahrazování dentice žraloka (obr. 6A), kde se vyskytuje podobná populace LRCs buněk v orálním epitelu v místě setkání zubů

a chuťových pohárků (tzv. taste-tooth junction, T/TJ), odkud buňky migrují směrem do následné dentální laminy (Martin et al., 2016). Také u agamy byla ukázána přítomnost populace LRCs buněk s pozitivním Sox2 signálem v orálním epitelu v blízkosti chuťových pohárků a následná migrace těchto buněk ze superficiálního epitelu směrem do následné dentální laminy, která dává vznik náhradnímu zubu (obr. 6E) (Salomies et al., 2019). Dále bylo ukázáno u cichlid, že společná epiteliální vrstva dává vznik jak zubům, tak chuťovým pohárkům (Bloomquist et al., 2015). Spojitost mezi vývojem a náhradou zubů a chuťovými pohárky byla ukázána i u rejnoků (Rasch et. al., 2020). I u jesetera (obr. 6D) je nápadná blízká přítomnost chuťových pohárků a vznikajících zubních zárodků. Tato pozorování jsou více než zajímavá a nabízí se otázka, zdali Sox2 pozitivní buňky u jesetera mohou mít také bipotentní charakter a přispívat ke vzniku jak zubů, tak chuťových pohárků. U zmíněných druhů, kde byly pozorovány populace kmenových/progenitorových buněk v blízkosti chuťových pohárků, se však chuťové pohárky nevyskytují v bezprostřední blízkosti vznikajících náhradních zubních zárodků, jak je to ukázáno zde u jesetera. Tento rozdíl je způsoben právě tím, že u jesetera nevzniká hlubokou invaginací následná dentální lamina, což nezpůsobuje oddálení místa nově vznikajícího zubního zárodku od povrchově umístěných chuťových pohárků hluboko pod povrchový epitel jako v ostatních případech, ale funkčně by se mohlo jednat o srovnatelné systémy (porovnej žraloka a agamu na obr. 6 se schématem u jesetera).

## 6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo popsání odontogeneze jesetera malého (*Acipenser ruthenus*), jakožto zástupce časně se odštěpující linie paprskoploutvých ryb, která zastává klíčové fylogenetické postavení v evoluci obratlovců. Za pomoci různých metod jsem v této práci popsala proces nahrazování dentice a identifikovala jsem potenciální epiteliální zubní kmenové buňky. Z mých získaných výsledků je patrné, že palatální a faryngeální dentice jesetera je velmi dynamickým orgánem s rychlou cyklicitou zubů, která však trvá po omezenou dobu ontogenetického vývoje jesetera.

Během tohoto období se palatální zubní pole lokalizované na palatopterygoidu a faryngeální zubní pole na infrapharyngobranchiale, hypobranchiale 1 a hypobranchiale 2 proměňují skrze přirůstání nových zubů na jedné straně zubních polí, a to rychlostí vzniku přibližně jedné řady za týden. Na straně opačné zuby vypadávají. Dochází k přibývání a rozšiřování zubních řad, čímž dochází ke zvětšování celých zubních polí. U pozdějších stádií se vývoj nových zubních zárodků nápadně zpomaluje, začíná převažovat ubývání zubů, což vede ke ztrátě celé dentice a k remodelaci orofaryngeálního aparátu.

Provedená analýza histologických dat ukázala, že se u jesetera malého nově vznikající zubní zárodky vyvíjejí bez hluboce zanořeného epitelu, tj. následné dentální laminy. Místo toho dochází k jejich vývoji z povrchového vnějšího dentálního epitelu předcházejícího zubu. Zubní zárodek se vyvíjí spojený s vnějším dentálním epitelem svého předchůdce a v nápadné blízkosti chuťového pohárku.

Data v této diplomové práci ukázala, že ačkoli jeseteří dentice vzniká bez přítomnosti dentální laminy, populace Sox2 pozitivních buněk je přítomná v bazální vrstvě epitelu spojující chuťové pohárky a nové zubní zárodky. Ve stejné oblasti jsem identifikovala i LRCs buňky. Tato zjištění dohromady navrhuje přítomnost oblasti zubních kmenových buněk. Mnou analyzovaná data korelují s daty získanými u zástupců, kteří dentici nahrazují prostřednictvím dentální laminy. Tato skutečnost naznačuje, že náhrada zubů s dentální laminou nebo bez ní jsou pouze odlišné fenotypové projevy obdobně fungujícího systému nahrazování dentic obratlovců. Také to podporuje hypotézu existence následného dentálního epitelu sdružujícího vývoj zubů z anebo bez následné dentální laminy jako homologního konzervovaného buněčného typu u obratlovců.

Tato diplomová práce tak dále přispívá k rozšíření znalostí o struktuře, diverzitě a dynamice polyfyodontních dentic u obratlovců a o tvorbě náhradních zubů z kmenových buněk u dentice bez následné dentální laminy.

## 7. Seznam použité literatury

- 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.
- Aldridge, R. J., & Purnell, M. A.** (1996). The conodont controversies. *Trends in Ecology and Evolution*, *11*(11), 463–468.
- Bemis W. E., Findeis E. K. & Grande L.** (1997). An overview of Acipenseriformes. *Environmental Biology of Fishes* *48*, 25–71.
- Berkovitz, B. K. B.** (1977). The order of tooth development and eruption in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Zoology*, *201*(2), 221–225.
- Berkovitz, B. & Shellis, P.** (2017). The Teeth of Non-Mammalian Vertebrates. *Academic Press*.
- Berta, P., Hawkins, J., Sinclair, A., Taylor A., Griffiths B. L., Goodfellow P. N., Fellous M.** (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* *348*, 448–450.
- Bertonnier-Brouty, L., Viriot, L., Joly, T., & Charles, C.** (2021). Gene expression patterns associated with dental replacement in the rabbit, a new model for the mammalian dental replacement mechanisms. *Developmental Dynamics*, *September 2020*, 1–11.
- Betancur-R, R., Wiley, E. O., Arratia, G., Acero, A., Bailly, N., Miya, M., Lecointre, G., & Ortí, G.** (2017). Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evolutionary Biology*, *17*(1), 1–40.
- Bhartiya, D., Mohammad A. S., Guha A., Singh P., Sharma D., Kaushik A.** (2019). Evolving Definition of Adult Stem/Progenitor Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, *15*, 456–458.
- Bloomquist, R. F., Parnell, N. F., Phillips, K. A., Fowler, T. E., Yu, T. Y., Sharpe, P. T., & Streelman, J. T.** (2015). Coevolutionary patterning of teeth and taste buds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(44), E5954–E5962.
- Bluteau, G., Luder, H. U., De Bari, C., Mitsiadis, T. A.** (2008). Stem Cells for tooth engineering. *European Cells and Materials Vol. 16*, 1-9, 1473-2262.

- Buchtová, M., Štembírek, J., Glocová, 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.
- Buchtová, M., Zahradníček, O., Balková, S., & Tucker, A. S. (2013).** Odontogenesis in the Veiled Chameleon (*Chamaeleo calypttratus*). *Archives of Oral Biology*, *58*(2), 118–133.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B. G., & Muhr, J. (2003).** Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nature Neuroscience*, *6*(11), 1162–1168.
- Chambers, I., & Smith, A. (2004).** Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*, *23*(43 REV. ISS. 6), 7150–7160.
- Chen, D., Blom, H., Sanchez, S., Tafforeau, P., & Ahlberg, P. E. (2016).** The stem osteichthyan *Andreolepis* and the origin of tooth replacement. *Nature*, *539*(7628), 237–241.
- Chen, D., Blom, H., Sanchez, S., Tafforeau, P., Märss, T., & Ahlberg, P. E. (2020).** The developmental relationship between teeth and dermal odontodes in the most primitive bony fish *lophosteus*. *ELife*, *9*, 1–20.
- Clavel, C., Grisanti, L., Zemla, R., Rezza, A., Barros, R., Sennett, R., Mazloom, A. R., Chung, C. Y., Cai, X., Cai, C. L., Pevny, L., Nicolis, S., Ma'ayan, A., & Rendl, M. (2012).** Sox2 in the Dermal Papilla Niche Controls Hair Growth by Fine-Tuning BMP Signaling in Differentiating Hair Shaft Progenitors. *Developmental Cell*, *23*(5), 981–994.
- Clemen, G., Bartsch, P., & Wacker, K. (1998).** Dentition and dentigerous bones in juveniles and adults of *Polypterus senegalus* (Cladistia, Actinopterygii). *Annals of Anatomy*, *180*(3), 211–221.
- Cobourne, M. T., Miletich, I., & Sharpe, P. T. (2004).** Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development. *Development*, *131*(12), 2875–2885.
- Daniels, D. L., & Weis, W. I. (2005).**  $\beta$ -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature Structural and Molecular Biology*, *12*(4), 364–371.
- Davit-Béal, T., Chisaka, H., Delgado, S., & Sire, J. Y. (2007).** Amphibian teeth: Current knowledge, unanswered questions, and some directions for future research. *Biological Reviews*, *82*(1), 49–81.

- Debiais-Thibaud, M., Borday-Birraux, V., Germon, I., Bourrat, F., Metcalfe, C. J., Casane, D., & Laurenti, P.** (2007). Development of oral and pharyngeal teeth in the medaka (*Oryzias latipes*): Comparison of morphology and expression of *eve1* gene. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *308*(6), 693–708.
- Díaz-Regueira, S. M., Lamas, I., & Anadón, R.** (2005). Calretinin immunoreactivity in taste buds and afferent fibers of the grey mullet *Chelon labrosus*. *Brain Research*, *1031*(2), 297–301.
- Dillman, C. B., & Hilton, E. J.** (2015). Anatomy and early development of the pectoral girdle, fin, and fin spine of sturgeons (Actinopterygii: Acipenseridae). *Journal of Morphology*, *276*(3), 241–260.
- Dosedělová, H., Dumková, J., Lesot, H., Glocová, K., Kunová, M., Tucker, A. S., Veselá, I., Krejčí, P., Tichý, F., Hampl, A., & Buchtová, M.** (2015). Fate of the molar dental lamina in the monophodont mouse. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–22.
- Ellis, N. A., Glazer, A. M., Donde, N. N., Cleves, P. A., Agoglia, R. M., & Miller, C. T.** (2015). Distinct developmental genetic mechanisms underlie convergently evolved tooth gain in sticklebacks. *Development*, *142*(14), 2442–2451.
- Ferri, A. L. M., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P. P., Sala, M., DeBiasi, S., & Nicolis, S. K.** (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, *131*(15), 3805–3819.
- Findeis, E. K.** (1997). Osteology and phylogenetic interrelationships of sturgeons (Acipenseridae). *Environmental Biology of Fishes*, *48*(1–4), 73–126.
- Flomerfelt F. A., & Gress R.E.** (2016). Analysis of Cell Proliferation and Homeostasis Using EdU Labeling. In: Bosselut R., S. Vacchio M. (eds) *T-Cell Development. Methods in Molecular Biology*, vol 1323. Humana Press, New York, NY, 211-220.
- Fraser, G. J., Graham, A., & Smith, M. M.** (2004). Conserved deployment of genes during odontogenesis across osteichthyans. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *271*(1555), 2311–2317.
- Fraser, G. J., Berkovitz, B. K., Graham, A., & Smith, M. M.** (2006). Gene deployment for tooth replacement in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A developmental model for evolution of the osteichthyan dentition. *Evolution and Development*, *8*(5), 446–457.

- Fraser, G. J., Bloomquist, R. F., & Streelman, J. T.** (2008). A periodic pattern generator for dental diversity. *BMC Biology*, *6*, 1–15.
- Fraser, G. J., Hulsey, C. D., Bloomquist, R. F., Uyesugi, K., Manley, N. R., & Streelman, J. T.** (2009). An ancient gene network is co-opted for teeth on old and new jaws. *PLoS Biology*, *7*(2), 0233–0247.
- Fraser, G. J., Bloomquist, R. F., & Streelman, J. T.** (2013). Common developmental pathways link tooth shape to regeneration. *Developmental Biology*, *377*(2), 399–414.
- Fricke R. Eschmeyer W. N., & Van der Laan, R.** (eds.) (2021). Eschmeyer’s catalog of fishes: genera, species, references.  
(<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>).
- Fuchs, E., & Segre, J. A.** (2009). Stem cells: A New Lease on Life. *Stem Cells*, *100*, 143–155.
- 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).
- Grande, L., & Bemis, W. E.** (1991). Osteology and phylogenetic relationships of fossil and recent paddlefishes (polyodontidae) with comments on the interrelationships of acipenseriformes. *Journal of Vertebrate Paleontology*, *11*(September 2014), 1–121.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., & Lovell-Badge, R.** (1990). *Nature*, *346*, 245–250.
- 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.
- Handrigan, G. R., & Richman, J. M.** (2010). A network of Wnt, hedgehog and BMP signaling pathways regulates tooth replacement in snakes. *Developmental Biology*, *348*(1), 130–141.
- 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. *Journal of Cell Biology*, *147*(1), 105–120.
- Hart, J. C., Ellis, N. A., Eisen, M. B., & Miller, C. T.** (2018). Convergent evolution of gene expression in two high-toothed stickleback populations. *PLoS Genetics*, *14*(6), 1–22.

- Hilton, E. J., Grande, L., & Bemis, W. E.** (2011). Skeletal Anatomy of the Shortnose Sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesueur, 1818, and the Systematics of Sturgeons (Acipenseriformes, Acipenseridae). *Fieldiana Life and Earth Sciences*, 3, 1–168.
- Hunter, J. P., & Jernvall, J.** (1995). The hypocone as a key innovation in mammalian evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23), 10718–10722.
- Huyseune, A., & Thesleff, I.** (2004). Continuous tooth replacement: The possible involvement of epithelial stem cells. *BioEssays*, 26(6), 665–671.
- Huyseune, 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(7), 637–643.
- Huyseune, A., & Witten, P. E.** (2006). Developmental mechanisms underlying tooth patterning in continuously replacing osteichthyan dentitions. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 306(3), 204–215.
- Huyseune, A., & Witten, P. E.** (2008). An evolutionary view on tooth development and replacement in wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Evolution and Development*, 10(1), 6–14.
- Huyseune, A., Soenens, M., & Elderweirdt, F.** (2014). Wnt signaling during tooth replacement in zebrafish (*Danio rerio*): Pitfalls and perspective. *Frontiers in Physiology*, 5(OCT), 1–11.
- Iatropoulos, M. J., & Williams, G. M.** (1996). Proliferation markers. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 48(2–3), 175–181.
- Imms A. D.** (1904). Notes on the gill-rakers of the spoonbill sturgeon, *Polyodon spathula*. *Proceedings of the Zoological Society of London* 74, 22–35.
- 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 of the United States of America*, 103(49), 18627–18632.
- Järvinen, E., Shimomura-Kuroki, J., Balic, A., Jussila, M., & Thesleff, I.** (2018). Mesenchymal Wnt/ $\beta$ -catenin signaling limits tooth number. *Development (Cambridge)*, 145(4), 1–12.
- Jernvall, J., & Thesleff, I.** (2012). Tooth shape formation and tooth renewal: Evolving with the same signals. *Development (Cambridge)*, 139(19), 3487–3497.

- Jollie M.** (1980). Development of head and pectoral girdle skeleton and scales in *Acipenser*. *Copeia* 2, 226–249.
- Jussila, M., Crespo Yanez, X., & Thesleff, I.** (2014). Initiation of teeth from the dental lamina in the ferret. *Differentiation*, 87(1–2), 32–43.
- Juuri, E., Saito, K., Ahtiainen, L., Seidel, K., Tummers, M., Hochedlinger, K., Klein, O. D., Thesleff, I., & Michon, F.** (2012). Sox2+ Stem Cells Contribute to All Epithelial Lineages of the Tooth via Sfrp5+ Progenitors. *Developmental Cell*, 23(2), 317–328.
- Juuri, E., Jussila, M., Seidel, K., Holmes, S., Wu, P., Richman, J., Heikinheimo, K., Chuong, C. M., Arnold, K., Hochedlinger, K., Klein, O., Michon, F., & Thesleff, I.** (2013). Sox2 marks epithelial competence to generate teeth in mammals and reptiles. *Development (Cambridge)*, 140(7), 1424–1432.
- Kague, E., Witten, P. E., Soenens, M., Campos, C. L., Lubiana, T., Fisher, S., Hammond, C., Brown, K. R., Passos-Bueno, M. R., & Huysseune, A.** (2018). Zebrafish sp7 mutants show tooth cycling independent of attachment, eruption and poor differentiation of teeth. *Developmental Biology*, 435(2), 176–184.
- Kielan-Jaworowska Z., Cifelli R., L., Luo Z-X.,** (2004). Mammals From the Age of Dinosaurs: Origins, Evolution, and Structure. *New York: Columbia University Press*.
- Krieger, J., & Fuerst, P. A.** (2002). Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes. *Molecular Biology and Evolution*, 19(6), 891–897.
- Krieger, J., Hett, A. K., Fuerst, P. A., Artyukhin, E., & Ludwig, A.** (2008). The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(SUPPL. 1), 36–45.
- Li, L., & Xie, T.** (2005). Stem cell niche: Structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 605–631.
- Liu, F., Chu, E. Y., Watt, B., Zhang, Y., Gallant, N. M., Andl, T., Yang, S. H., Lu, M. M., Piccolo, S., Schmidt-Ullrich, R., Taketo, M. M., Morrisey, E. E., Atit, R., Dlugosz, A. A., & Millar, S. E.** (2008). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Developmental Biology*, 313(1), 210–224.
- Luo, D., Li, Y., Zhao, Q., Zhao, L., Ludwig, A., & Peng, Z.** (2019). Highly resolved phylogenetic relationships within order acipenseriformes according to novel nuclear markers. *Genes*, 10(1).

- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X.** (2009). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9–26.
- Maisey, J. G., Turner, S., Naylor, G. J. P., & Miller, R. F.** (2014). Dental patterning in the earliest sharks: Implications for tooth evolution. *Journal of Morphology*, 275(5), 586–596.
- Mantoku, A., Chatani, M., Aono, K., Inohaya, K., & Kudo, A.** (2016). Osteoblast and osteoclast behaviors in the turnover of attachment bones during medaka tooth replacement. *Developmental Biology*, 409(2), 370–381.
- 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 of the United States of America*, 113(51), 14769–14774.
- Moriyama, K., Watanabe, S., Iida, M., & Sahara, N.** (2010). Plate-like permanent dental laminae of upper jaw dentition in adult gobiid fish, *Sicyopterus japonicus*. *Cell and Tissue Research*, 340(1), 189–200.
- Nelson, G.** (1969). Gill arches and the phylogeny of fishes, with notes on the classification of vertebrates. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 141(4), 475–552.
- Northcutt, R. G.** (2004). Taste buds: Development and evolution. *Brain, Behavior and Evolution*, 64(3), 198–206.
- Okamura, T., Shimokawa, H., Takagi, Y., Ono, H., & Sasaki, S.** (1993). Detection of collagenase mRNA in odontoclasts of bovine root-resorbing tissue by In situ hybridization. *Calcified Tissue International*, 52(4), 325–330.
- Okubo, T., Pevny, L. H., & Hogan, B. L. M.** (2006). Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes and Development*, 20(19), 2654–2659.
- Parker W. K.** (1882). On the Structure and Development of the Skull in Sturgeons (*Acipenser ruthenus* and *A. sturio*). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 173, 139-185.
- Patterson, C.** (1982). Morphology and interrelationships of primitive actinopterygian fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 22(2), 241–259.
- Popa, E. M., Buchtova, M., & Tucker, A. S.** (2019). Revitalising the rudimentary replacement dentition in the mouse. *Development (Cambridge, England)*, 146(3).

- Pospíšilová, A.** (2015). Characterization of cranial skeletogenesis and odontogenesis in basal Ray-finned fishes. *Master Thesis. Prague: Charles University.*
- Pospíšilová, A.** (2020). Comparative analyses of cranial skeletogenesis and odontogenesis in basal Ray-finned fishes. *Dissertation. Prague: Charles University.*
- Pospíšilová, A., Štundl J., Brejcha J., Metscher B. D., Pšenička M., Černý R., & Soukup V.** (in prep.). The remarkable dynamics in the establishment, replacement, and loss of dentition during the ontogeny of the sterlet sturgeon.
- Potten, C. S., Schofield, R., & Lajtha, L. G.** (1979). A comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. *BBA - Reviews on Cancer, 560(2)*, 281–299.
- Qu, Q., Haitina, T., Zhu, M., & Ahlberg, P. E.** (2015). New genomic and fossil data illuminate the origin of enamel. *Nature, 526(7571)*, 108–111.
- Rasch, L. J., Martin, K. J., Cooper, R. L., Metscher, B. D., Underwood, C. J., & Fraser, G. J.** (2016). An ancient dental gene set governs development and continuous regeneration of teeth in sharks. *Developmental Biology, 415(2)*, 347–370.
- Rasch, L. J., Cooper, R. L., Underwood, C., Dillard, W. A., Thiery, A. P., & Fraser, G. J.** (2020). Development and regeneration of the crushing dentition in skates (Rajidae). *Developmental Biology, 466(1–2)*, 59–72.
- Reif, W.-E.** (1982). Evolution of Dermal Skeleton and Dentition in Vertebrates. The Odontode-Regulation Theory. *Evolutionary Biology, 15*, 287–368.
- Ring, A., Kim, Y. M., & Kahn, M.** (2014). Wnt/Catenin Signaling in Adult Stem Cell Physiology and Disease. *Stem Cell Reviews and Reports, 10(4)*, 512–525.
- Rücklin, M., Donoghue, P. C. J., Johanson, Z., Trinajstić, K., Marone, F., & Stampanoni, M.** (2012). Development of teeth and jaws in the earliest jawed vertebrates. *Nature, 491(7426)*, 748–751.
- Rücklin, M., & Donoghue, P. C. J.** (2015). Romundina and the evolutionary origin of teeth. *Biology Letters, 11(6)*, 0–4.
- Salomies, L., Eymann, J., Khan, I., & Di-Po, N.** (2019). The alternative regenerative strategy of bearded dragon unveils the key processes underlying vertebrate tooth renewal. *ELife, 8(DI)*, 1–26.

- Sánchez Alvarado, A., & Yamanaka, S.** (2014). Rethinking differentiation: Stem cells, regeneration, and plasticity. *Cell*, *157*(1), 110–119.
- Sasaki, T.** (2003). Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microscopy Research and Technique*, *61*(6), 483–495.
- Schepers, G. E., Teasdale, R. D., & Koopman, P.** (2002). Twenty pairs of Sox: Extent, homology, and nomenclature of the mouse and human Sox transcription factor gene families. *Developmental Cell*, *3*(2), 167–170.
- Smith, M. M.** (2003). Vertebrate dentitions at the origin of jaws: When and how pattern evolved. *Evolution and Development*, *5*(4), 394–413.
- 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.
- Smith, M. M., Johanson, Z., Butts, T., Ericsson, R., Modrell, M., Tulenko, F. J., Davis, M. C., & Fraser, G. J.** (2015). Making teeth to order: Conserved genes reveal an ancient molecular pattern in paddlefish (Actinopterygii). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1805).
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., & Kai, T.** (2001). Stem cells find their niche. *Nature*, *414*(6859), 98–104.
- Square, T. A., Sundaram, S., Mackey, E. J., & Miller, C. T.** (2021). Distinct tooth regeneration systems deploy a conserved battery of genes. *EvoDevo*, *12*(1), 1–17.
- Stock, D. W.** (2001). The genetic basis of modularity in the development and evolution of the vertebrate dentition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *356*(1414), 1633–1653.
- Stock, D. W., Jackman, W. R., & Trapani, J.** (2006). Developmental genetic mechanisms of evolutionary tooth loss in cypriniform fishes. *Development*, *133*(16), 3127–3137.
- Sun, Z., Yu, W., Navarro, M. S., Sweat, M., Eliason, S., Sharp, T., Liu, H., Seidel, K., Zhang, L., Moreno, M., Lynch, T., Holton, N. E., Rogers, L., Neff, T., Goodheart, M. J., Michon, F., Klein, O. D., Chai, Y., Dupuy, A., Engelhardt, J. F., Chen, Z., & Amendt, B. A.** (2016). Sox2 and Lef-1 interact with Pitx2 to regulate incisor development and stem cell renewal. *Development (Cambridge)*, *143*(22), 4115–4126.

- Taranova, O. V., Magness, S. T., Fagan, B. M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S. R., & Pevny, L. H.** (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes and Development*, *20*(9), 1187–1202.
- 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 of the United States of America*, *114*(22), E4425–E4434.
- Thomson, J. A.** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *282*(5391), 1145–1147.
- Thomson, M., Liu, S. J., Zou, L. N., Smith, Z., Meissner, A., & Ramanathan, S.** (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*, *145*(6), 875–889.
- Trapani, J.** (2001). Position of Developing Replacement Teeth in Teleosts. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*. *2001*(1), 35–51.
- Tucker, A. S., & Fraser, G. J.** (2014). Evolution and developmental diversity of tooth regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *25–26*, 71–80.
- Tummers, M., & Thesleff, I.** (2009). The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *312*(4), 309–319.
- 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.
- Vandenplas, S., Willems, M., Witten, P. E., Hansen, T., Fjellidal, P. G., & Huysseune, A.** (2016). Epithelial label-retaining cells are absent during tooth cycling in *Salmo salar* and *Polypterus senegalus*. *PLoS ONE*, *11*(4), 1–19.
- 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.
- Vaškaninová, V., Chen D., Tafforeau P., Johanson Z., Ekrt B., Blom H. & Ahlberg P. E.** (2020). Marginal dentition and multiple dermal jawbones as the ancestral condition of jawed vertebrates. *Science* *369*, 211–216.

- Wacker, K., Bartsch, P., & Clemen, G.** (2001). The development of the tooth pattern and dentigerous bones in *Polypterus senegalus* (Cladistia, Actinopterygii). *Annals of Anatomy*, 183(1), 37–52.
- Wang, X. P., O’Connell, D. J., Lund, J. J., Saadi, I., Kuraguchi, M., Turbe-Doan, A., Cavallesco, R., Kim, H., Park, P. J., Harada, H., Kucherlapati, R., & Maas, R. L.** (2009). Apc inhibition of Wnt signaling regulates supernumerary tooth formation during embryogenesis and throughout adulthood. *Development*, 136(11), 1939–1949.
- Warth, P., Hilton, E. J., Naumann, B., Olsson, L., & Konstantinidis, P.** (2017a). Development of the skull and pectoral girdle in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, and Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseriformes: Acipenseridae). *Journal of Morphology*, 278(3), 418–442.
- Warth, P., Hilton, E. J., Naumann, B., Olsson, L., & Konstantinidis, P.** (2017b). Development of the muscles associated with the mandibular and hyoid arches in the Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* (Acipenseriformes: Acipenseridae). *Journal of Morphology* 279, 163-175.
- Wise, S. B., & Stock, D. W.** (2010). Bmp2b and bmp4 are dispensable for zebrafish tooth development. *Developmental Dynamics*, 239(10), 2534–2546.
- Witten, P. E., & Huysseune, A.** (2009). A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biological Reviews*, 84(2), 315–346.
- Wu, P., Wu, X., Jiang, T. X., Elsey, R. M., Temple, B. L., Divers, S. J., Glenn, T. C., Yuan, K., Chen, M. H., Widelitz, R. B., & Chuong, C. M.** (2013). Specialized stem cell niche enables repetitive renewal of alligator teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22).
- Zaminy, A.** (2012). Stem Cell Characterization. In: Schmid I, editor. *Flow Cytometry—Recent Perspectives*. 261–282.

## 8. Přílohy

### *In situ* hybridizace protokol

#### Whole-mount

##### 1. den

- 1) Vzorky fixované v 100% MetOH a uchovávané při teplotě -20°C.
- 2) Převést vzorky ze 100% MetOH do PBS-T (75%, 50%, 25%) po 15 min.
- 3) Promýt 2x v PBS-T po 5 min.
- 4) Depigmentace – přidat odbarvovací roztok (bleaching solution) a ponechat pod lampou, dokud není vzorek požadovaně odbarven (cca 15 min).
- 5) Po odbarvení 2x promýt v PBS-T (5 min), poté přidat proteinázu K – 20 mg/ml PBS-T, 45min (koncentrace a doba působení záleží na velikosti vzorku).
- 6) 2x promýt v PBS-T (5 min), poté fixace 4% PFA 20 min a následně promýt 2x PBS-T (5 min).
- 7) Promýt v PBS-T/HYB v poměru 1:1 (5 min).
- 8) Prehybridizace – HYB 1 hod při teplotě 60°C.
- 9) Hybridizace – DIG-označená próba v HYB při teplotě 60 °C přes noc.

##### 2. den

- 1) Promýt 10x pHYB po 15 min při teplotě 58°C.
- 2) Promýt pHYB/MAB-T 10 min při teplotě 58°C.
- 3) Zchladit na pokojovou teplotu, poté promýt MAB-T 5 min a 20 min.
- 4) Přidat blokující roztok na 1 hod.
- 5) Anti-DIG protilátka 1µl: 3000 µl blokující roztok do dalšího dne v lednici.

##### 3. den

- 1) Promýt v MAB-T nejdřív 5 min, potom 10x po 15 min.
- 2) Promýt nejdříve 2x NTMT po 5 min, pak NTMT na 10 min.
- 3) Chromogenní reakce – BM purple (ve tmě několik hodin podle rychlosti reakce)
- 4) Zastavení reakce – 4% PFA

## Reagencie

- DEPC voda (DEPC, dH<sub>2</sub>O)
- 20x SSC (3M NaCl, 0,3M sodium citrate, DEPC voda)
- DIG-značená próba v HYB – 1μl v 1ml HYB (koncentrace se může u různých prób lišit)
- 4% PFA
- 10% Tween v DEPC vodě
- Bleaching solution (5% formamide, 0,5% SSC, 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dH<sub>2</sub>O)
- Proteináza K – 1,5μl v 5ml PBS-T po dobu 45 minut
- Hybridizační roztok (HYB) (formamide, 20x SSC, 5mg/ml heparin, 50x Denhardt's, 10% CHAPS v DEPC vodě, 10mg/ml yeast RNA, 0,5M EDTA, 10% Tween v DEPC vodě, DEPC voda)
- Post-hybridizační roztok (pHYB) (50% formamide, 20x SSC, 10% Tween, dH<sub>2</sub>O)
- MAB-T (100mM kyselina maleinová, 150mM NaCl, 0,2% Tween)
- PBS-T (DEPC, PBS, 10% Tween)
- NTMT (0,1M Tris, 0,1M NaCl, 0,05M MgCl<sub>2</sub>, Tween 20, dH<sub>2</sub>O)
- 0,5M EDTA pH 7,5 (EDTA, DEPC voda, NaOH)
- Tris-HCl pH 9,5 (Trizma base, DEPC voda, HCl)
- 1mM EDTA-PBST (PBS, 0,5M EDTA)
- Blokovací roztok (2% blokovací činidlo, 20% ovčí sérum, MAB-T)
- Anti-DIG protilátka (v blokujícím roztoku koncentrace 1:3000)
- BM Purple