

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Antropologie



Mgr. Svatava Lagronová

Časná morfogeneze dolních tvářových zubů u myší s genovými defekty
Early morphogenesis of lower cheek teeth in mice with gene defects

Disertační práce

Školitel: MUDr. Renata Peterková, CSc.

Praha, 2014

Úvodem bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali při zpracování této práce. Děkuji především své školitelce MUDr. Renatě Peterkové, CSc. za její neuvěřitelnou trpělivost, za skvělé odborné vedení po několik let ve vědeckém prostředí, a za cenné odborné i lidské rady. Dále bych ráda poděkovala vedoucímu Oddělení teratologie ÚEM AVČR, Doc. Miroslavu Peterkovi, CSc. za to, že mi umožnil podílet se na vědecké práci. Mé díky patří také všem spolupracovníkům z Oddělení teratologie. V neposlední řadě děkuji svým rodičům a manželovi za veškerou podporu po celou dobu mého studia.

Podklady pro tuto práci vznikaly v letech 2006 – 2013 pod vedením MUDr. Renaty Peterkové, CSc. s následující finanční podporou:

Grantová agentura ČR (granty č. 304/02/0448, 304/05/2665, 304/2007/0223, a 305/12/1766), Ministerstvo školství mládeže a tělovýchovy ČR (projekt číslo COST B23.002), Akademie věd ČR (projekt číslo AV0Z 50390512).

Pracovní pobyty ve Štrasburku (Francie), kde jsem se podílela na zhotovení 3D rekonstrukcí, byly hrazeny v rámci dohody INSERM-AVČR nebo z příslušných grantů.

Prohlášení:

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

V Praze, 16.02.2014

Podpis:

Obsah

1. Anotace	5
2. Abstract	6
3. Seznam zkratk	7
4. Úvod	10
5. Literární přehled	12
5.1. Evoluce dentice	12
5.2. Stavba a vývoj dentice	13
5.2.1. Lidská dentice	13
5.2.2. Vývoj lidské dentice	16
5.2.3. Specifické rysy myší dentice	19
5.2.4. Základní morfogenetické buněčné procesy v odontogenezi	21
5.2.5. Geny účastnící se zubního vývoje	22
5.3. Syndromické a nesyndromické vývojové vady zubů u člověka	23
6. Cíle práce	27
7. Materiál a metody	28
7.1. Myši a odběr embryí	28
7.2. Histologie	29
7.3. Kvalitativní analýza zubního vývoje na histologických řezech	30
7.4. 3D rekonstrukce	30
7.5. Kvantitativní analýza zubního vývoje na histologických řezech	32
7.5.1. Určení regionů pro kvantitativní analýzu	32
7.5.2. Kvantitativní analýza apoptózy a proliferace	33
7.5.3. Měření plochy a objemu	34
7.6. Statistické metody	35
7.7. <i>In situ</i> hybridizace celých mandibul (WISH)	35
8. Výsledky	41
8.1. Normální vývoj dentice v tvářové oblasti mandibuly	41
8.2. Vývoj dentice v tvářové oblasti mandibuly u myší <i>Spry2^{-/-}</i> a <i>Spry4^{-/-}</i>	43
8.2.1. Frekvence nadpočetných zubů na pozdějších stádiích odontogeneze	47
8.2.2. Kvantitativní analýza zubního epitelu na histologických řezech	51
8.2.3. <i>Shh In situ</i> hybridizace celých mandibul	55
8.2.4. Funkční dentice u dospělých <i>Spry2^{-/-}</i> a <i>Spry4^{-/-}</i> myší	57
8.3. Vývoj nadpočetného tvářového zubu u <i>Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}</i> myší	59
8.4. Porovnání vývoje rudimentárních základů zubů u <i>Spry</i> a <i>Tabby</i> myší	63
8.5. Zdvojený incisor u <i>Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}</i> myší	68
9. Diskuze	71
9.1. Časný vývoj incisorů	71
9.1.1. Normogeneze incisorové oblasti	71
9.1.2. Zdvojený incisor u <i>Spry2^{+/-}; Spry4^{-/-}</i> myší	73
9.2. Vývoj dentice v tvářové oblasti dolní čelisti	75
9.2.1. Vývoj nadpočetného tvářového zubu u <i>Sprouty</i> myší	78
9.3. Evolučně-vývojové aspekty	83
9.4. Antropologický přínos	86
10. Závěry	88
11. Seznam publikací, které jsou podkladem disertační práce	89
12. Seznam příloh	90
13. Reference	91

1. Anotace

Lidská i myší dentice je redukována co do počtu zubů oproti původnímu zubnímu vzorci savců. V oblastech zubů ztracených během evoluce se v případě chybného vývoje mohou objevit po narození zuby nadpočetné. Avšak vznik nadpočetného zubu, stejně tak jako vznik jiných zubních anomálií, nelze studovat přímo na lidském embryu. Proto jsme vývoj nadpočetného zubu studovali na myším modelu této anomálie. **Cíle disertační práce směřovaly k ověření hypotézy: Při vývoji nadpočetných zubů u mutantních myší se uplatňuje revitalizace rudimentárních primordií zubů potlačených během evoluce.**

Byly porovnány morfologické a kvantitativní ukazatele růstu a vývoje zubního epitelu rudimentárních (premolárových) zubních primordií zvaných MS a R2 v dolní čelisti myší kontrolních, a *Spry2^{-/-}*, *Spry4^{-/-}*, *Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}* a Tabby mutantních myší, u nichž se vyvíjí nadpočetný zub před prvním molárem. Podobným způsobem byl analyzován vznik horního řezáku u myší kontrolních a korelován se vznikem zdvojeného horního řezáku u *Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}* mutant.

Na rozdíl od kontrolních myší jsme u *Spry* mutant prokázali v rudimentárních zubních primordiích snížení buněčné apoptózy a zvýšení buněčné proliferace společně se zvětšováním objemu dentálního epitelu. Tyto změny ukazovaly na revitalizaci rudimentárních zubních zárodků s cílem vytvořit nadpočetný zub před prvním molárem. V pozdějších stádiích však efekt revitalizace a vývoj nadpočetného zubu pokračoval jen u části myší, zatímco v ostatních případech byl vývoj nadpočetného zubu zastaven. Přesto i přechodná revitalizace rudimentů zapříčinila odchylky ve velikosti a tvaru sousedního prvního moláru. Zvýšení proliferace a snížení apoptózy provázelo i vznik zdvojeného horního řezáku u *Spry* mutant. Vznik nadpočetného zubu u Tabby myší byl podobný vývoji nadpočetného zubu u *Spry4^{-/-}* mutant.

Disertační práce potvrdila hypotézu, že při vývoji nadpočetných zubů na myším modelu se uplatňuje revitalizace rudimentárních zubních primordií.

2. Abstract

Tooth number is reduced in humans and mice when compared to the presumed basic tooth formula in mammals. In the regions, where teeth had been suppressed during evolution, a supernumerary tooth can appear as a result of abnormal development. However development of a supernumerary tooth, as well as origin of other anomalies, cannot be directly investigated in human embryos. That is the development of a supernumerary tooth was studied in a mouse model of this anomaly. **The aims of the thesis were focused to verifying the hypothesis: Development of the supernumerary tooth in mutant mice is based on the revitalization of the rudimentary primordia of the teeth suppressed during evolution.**

We compared the morphological and quantitative aspects of the developing epithelium of the largest rudimentary (premolar) tooth primordia, called MS and R2, in the mandibles of WT, *Spry2*^{-/-}, *Spry4*^{-/-}, *Spry2*^{-/-};*Spry4*^{-/-} and *Tabby* mutant mice. Similarly, the upper incisor in WT mice was analysed and compared to the development of the duplicated incisor in *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{-/-} mutant mice.

In comparison to controls, decreased cell apoptosis and increased cell proliferation together with an enlarged volume of the dental epithelium were found during rudimentary tooth development in *Spry* mutant mice. These changes showed the revitalization of the tooth primordia and their ability to form a supernumerary tooth. The revitalization effect continued to later stages only in some of the animals, while the development was arrested in others. However, even a temporary revitalization of the rudimentary tooth primordia had an impact on the size and cusp arrangement of the adjacent first molar. The duplication of the incisor in *Spry* mutant mice was also accompanied by a decrease of apoptosis and increase of proliferation in dental epithelium. The supernumerary tooth in *Tabby* mutant mice developed similarly as that one in *Spry4*^{-/-} mice.

The thesis confirmed the hypothesis about the revitalization of rudimentary tooth primordia during origin of supernumerary teeth in the mouse model.

3. Seznam zkratek

AP	apoptotický poměr
Bmp	bone morphogenetic proteins
BrdU	bromodeoxyuridin
C	caninus
CD1	myší outbrední kmen
CL	cervical loop
D	diastemové pupeny
DE	dentální epitel
DEPC	diethylpyrocarbonate
DKO	double knock out
ED	embryonální den
Eda	ectodysplasin
Edar	ectodysplasin receptor
Fgf	fibroblast growth factors
g	gram
HED	hypohidrotická ektodermální dysplázie
HYB	hybridizační roztok
H ₂ O	voda
I	incisivus
KH ₂ PO ₄	dihydrogen fosforečnan draselný
KO	knock Out
KCl	chlorid draselný
M	molar
M	molární hmotnost
MAB	maleic acid buffer

mg	miligram
MI	mitotický index
ml	mililitr
MS	mesiální Segment
Msx	msh homeobox
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
Na ₂ HPO ₄	hydrogenfosforečnan sodný
P	premolar
PBS	phosphate buffered saline
pH	power of hydrogen
PND	postnatální Den
qPCR	polymerase chain reaction
R	rudimentární základ zubu
rpm	rotations per minute
Runx	runt-related trnscription faktor
S	supernumerary tooth
SDS	sodium dodecyl sulphate
Shh	sonic hedgehog
SO	směrodatná odchylka
SOL	solution (vymývací roztok)
Spry	sprouty
SSC	saline-sodium citrate
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
μl	mikrolitr

WISH whole mount in situ hybridizace

WNT wingless

WT wild type

4. Úvod

Zuby jsou pro člověka velmi důležité z funkčního i estetického hlediska. Kontrola a léčba zubů je zabezpečena zubním lékařem, ale vrozené vady zubů se řeší se zpožděním, až po jejich prořezání či nezaložení. Naukou o zubech se zabývá věda zvaná odontologie. Odontologové zkoumají zuby ve všech jejich podobách od začátku zubní evoluce až po jejich současný stav a vývoj dentice u jedinců jakýchkoliv druhů včetně člověka. Ani s přibývajícimi poznatky nejsou stále ještě jasné některé základní principy zubní evoluce, například vznik vícehrbolkových zubů nebo existence a vývojový význam rudimentárních zubních struktur přítomných i u člověka. Rudimentární struktury by mohly souviset s výskytem některých ústních patologií, a pomoci porozumět jejich etiopatogenezi. Proto základní výzkum v oblasti odontogeneze může v budoucnu umožnit rychleji zareagovat na přítomnost zubní vady a najít její adekvátní léčbu.

Poznání zubního vývoje a vývojových vad u člověka je zprostředkováno základním výzkumem vývoje zubů (odontogeneze) u různých experimentálních modelů. Častým experimentálním modelem je, vzhledem k několika nesporným výhodám, laboratorní myš. Výhodou myši je krátká generační doba, která umožní křížení, šlechtění a genetické manipulace, a také přítomnost dvou typů zubů (trvale rostoucí řezáky a stoličky), které jsou odděleny bezzubou mezerou (diastema). V diastemě se embryonálně na místě chybějících zubů vyskytují rudimentární zubní primordia. Nevýhodou myši je například pouhá jedna generace zubů a tudíž chybění zubní výměny, a chybění dvou zbylých typů zubů přítomných u člověka (špičáků a třenových zubů). Proto se také vyhledávají i další zvířecí modely.

Lidský genom je v dnešní době již velmi dobře zmapován a genů účastnících se zubního vývoje je nepřehledné množství. Úkolem studia odontogeneze je najít souvislosti mezi jednotlivými geny a jejich funkcí v zubním vývoji. K tomuto účelu je nutné využít co nejvíce myších experimentálních modelů, u kterých můžeme vyřadit nebo naopak zvýšit funkci určitého genu a pak sledovat jejich účinky při vzniku vývojových anomálií dentice na různých stupních vývoje. Přímou vazbu na člověka mají studie genů, které již byly zjištěny jako příčiny lidských vývojových poruch a syndromů.

Pro tuto disertační práci byly použity laboratorní myši bez genové manipulace (WT, CD1), myši s vyřazeným genem *Sprouty* (*Spry*)2 a/nebo 4, což je simulující mutace v *Fgf* (gen pro fibroblastový růstový faktor) signální dráze, která způsobuje některé

lidské syndromové vrozené vady, a Tabby myši nesoucí mutaci v genu pro ectodysplasin, stejnou, která u člověka způsobuje syndrom hypohidrotické ektodermální dysplázie vázané na X chromosom (X-HED).

V minulosti se kladl důraz na viditelný tvar zubů v dospělosti i v embryonálním vývoji, a na mezidruhové srovnání tvarů, typů a funkce zubů. V posledních dvou desetiletích se výzkum zaměřil na odhalování genů účastnících se zubního vývoje. Dnes, s pomocí moderních technologií, je možné detekovat aktivitu genů přímo ve vyvíjejících se zubech *in vivo* nebo *in vitro*. Bohužel se v této fázi občas pozapomíná na třetí (3D prostorovou) a čtvrtou (časovou) dimenzi vývoje zubů. Předložená disertační studie propojuje morfologické metody s detekcemi genových expresí během fyziologického i patologického vývoje zubů na experimentálním modelu odontogeneze u myši.

5. Literární přehled

5.1. Evoluce dentice

Otázkou původu zubů se zabývá mnoho vědců a je stále velmi diskutovaným tématem. Dodnes je přijímána základní teorie o rozšíření původních kožních odontod (nejčastěji se mluví o plakoidních šupinách paryb) do prostoru stomodea, kde se diferencovaly v zubní struktury (Odontodová a Outside-in teorie (Reif, 1982)). Podle novější teorie zvané „Inside-out“ se zuby vyvinuly naopak v ústní dutině a odtud se rozšířily na povrch, a to už u skupiny zvané Konodonta, fylogenetických předchůdců paryb (Smith and Coates, 1998). U ryb se zuby mohou vyskytovat nejen v ústní, ale také ve faryngeální dutině. U obojživelníků a plazů se jejich výskyt omezil pouze na ústní dutinu (Ungar, 2010). Typické zuby ryb, obojživelníků a plazů jsou jednoduchého tvaru a navzájem si podobné (homodontie), vyskytují se ve vysokém počtu (polyodontie) a mnohonásobně se obnovují (polyfyodontie).

Během evoluce savčí dentice dosáhly zuby ještě dalších výrazných proměn. Počty zubů se redukovaly, ubylo několik zubních generací tak, že z původně polyfyodontní dentice se vyvinula dentice difyodontní (dvě generace zubů) nebo monofyodontní (jedna generace zubů). A současně z typicky homodontní dentice (tvarově stejné zuby) se vyvinula dentice heterodontní (morfologicky a funkčně různé zuby v jednom čelistním kvadrantu). V heterodontní dentici savců rozlišujeme zuby jednohrbolkové - řezák (incisor) a špičák (caninus) a vícehrbolkové zuby - třenový zub (premolár) a stolička (molár). Základní zubní vzorec savčí dentice obsahuje tři řezáky, jeden špičák, čtyři třenové zuby a tři stoličky v jednom čelistním kvadrantu (Stock et al., 1997) a je v různé míře redukován u jednotlivých druhů savců.

Existují čtyři základní teorie o vzniku vícehrbolkových zubů. Teorie konkrescenční vychází z úvahy o spojování zubních primordií jednoduchých zubů savčích předků během embryonálního vývoje. Toto spojování probíhá ve dvou rovinách jednak mezi zuby sousedícími mesio-distálně (předo-zadně), tak i mezi zuby několika generací (labio-liguálně), (Kukenthal, 1892). Z této základní představy pak částečně vycházejí další dvě navazující teorie „Koncentrační teorie“ a „Dimerní teorie“.

Koncentrační teorie podle Bolka (1922) zamítá spojení zubních primordií podél předozadní osy čelisti, ale zastává spojení dvou generací primordií, tudíž těch ležících

labio-linguálně. Podle tohoto autora jsou dvojice primordií uspořádány cik-cak do dvou řad (jedna na zevním a druhá na vnitřním okraji čelisti). Vždy dvě takto uspořádané dvojice primordií tvoří zubní rodinu, přičemž dvojice ležící na okraji dává vznik mléčným zubům a dvojice ležící uvnitř dává vznik zubům trvalým (Bolk, 1922; Peyer, 1968).

Dimerní teorie vychází také z předpokladu o splývání dvou zubů, ale podle této představy jsou dva spojující se zuby již mírně diferencované do tříhrbolkového “triconodontu”. Dva fúzované triconodonty pak tvoří šestihrbolkovou stoličku (Bolk, 1912).

Diferenciační teorie, popsána Osbornem a Copem a podporovaná především paleontologickými nálezy, zamítá představu o spojování jednoduchých zubů. Tato teorie popisuje, jak zmnožení hrbolků při vzniku vícehrbolkových zubů vzniká diferenciací jednoduchých plazích kónických zoubků (Osborn, 1888).

Data získaná na myším modelu dokládají existenci spojeného vývoje zubních primordií (Konkrescenční teorie) jak morfologicky (Peterkova et al., 2000; 2006), tak experimentálně (Prochazka et al., 2010). Je možné, že to, co autoři Diferenciační teorie popisují jako zmnožení hrbolků u funkční dospělé dentice, bylo výsledkem spojování zubních primordií během ontogeneze daného druhu. Dalo by se říci, že zatímco Konkrescenční teorie popisuje vývojový proces zmnožení zubních hrbolků, Diferenciační teorie popisuje výsledek tohoto procesu v dospělé dentici (Peterkova et al., 2000; 2002b).

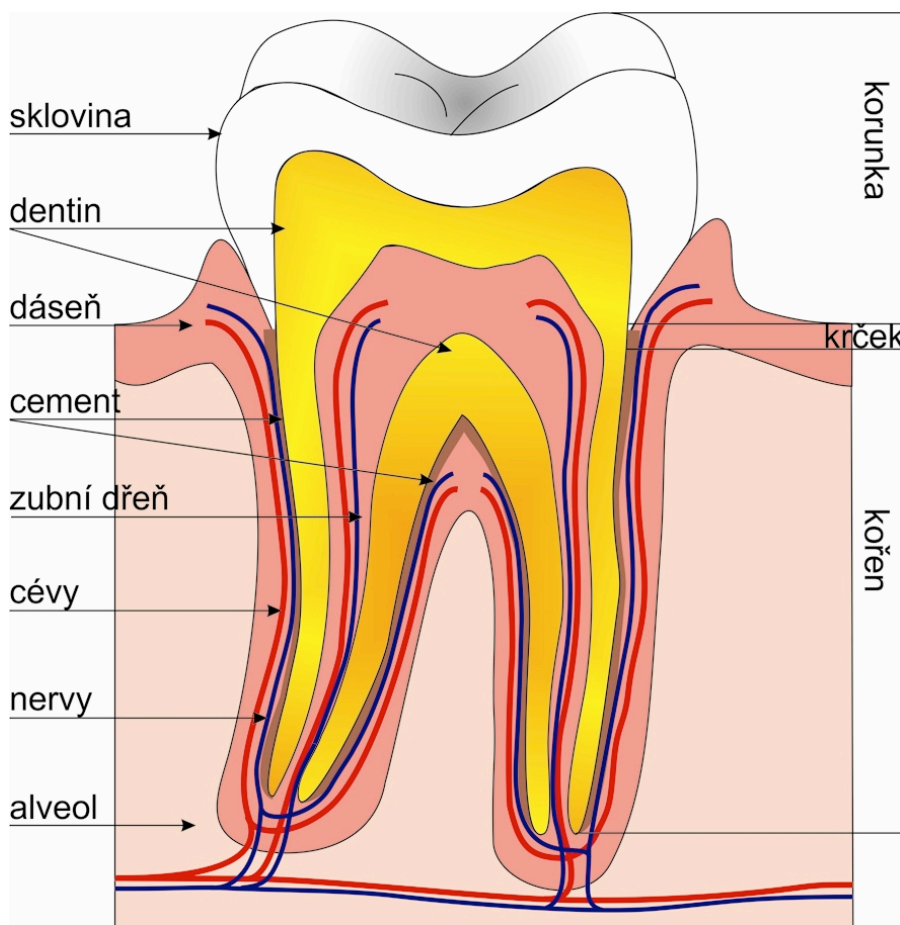
5.2. Stavba a vývoj dentice

5.2.1. Lidská dentice

Základní morfologicky patrné části zubu jsou korunka (corona dentis), krček (collum dentis), kořen (radix dentis) a dutina zubu (cavitas dentis), která je vyplněna zubní dřeví (pulpa dentis). Korunka, krček a kořen jsou tvořeny tvrdými zubními tkáněmi dentinem (dentinum), sklovinou (enamelum), a zubním cementem (cementum).

Korunka je část zubu vyčnívající do ústní dutiny pokrytá sklovinou. Krček je krátký úsek mezi korunkou a kořenem. Dentin krčku je kryt cementem a uložen v měkké tkáni dásní. Kořen zubu je pevně, ale přitom pružně upevněný vazivovým závěsným aparátem (ozubicí) v kostěném lůžku alveolu. Kořen je kryt zubním cementem. Dřeňová

dutina probíhá všemi částmi zubu, je širší v korunce a v kořenu se zužuje do kanálku. Je vyplněna cévami a nervy propletenými rosolovitým vazivem zubní dřevě (Obr. 1).



Obr. 1: Stavba zubu

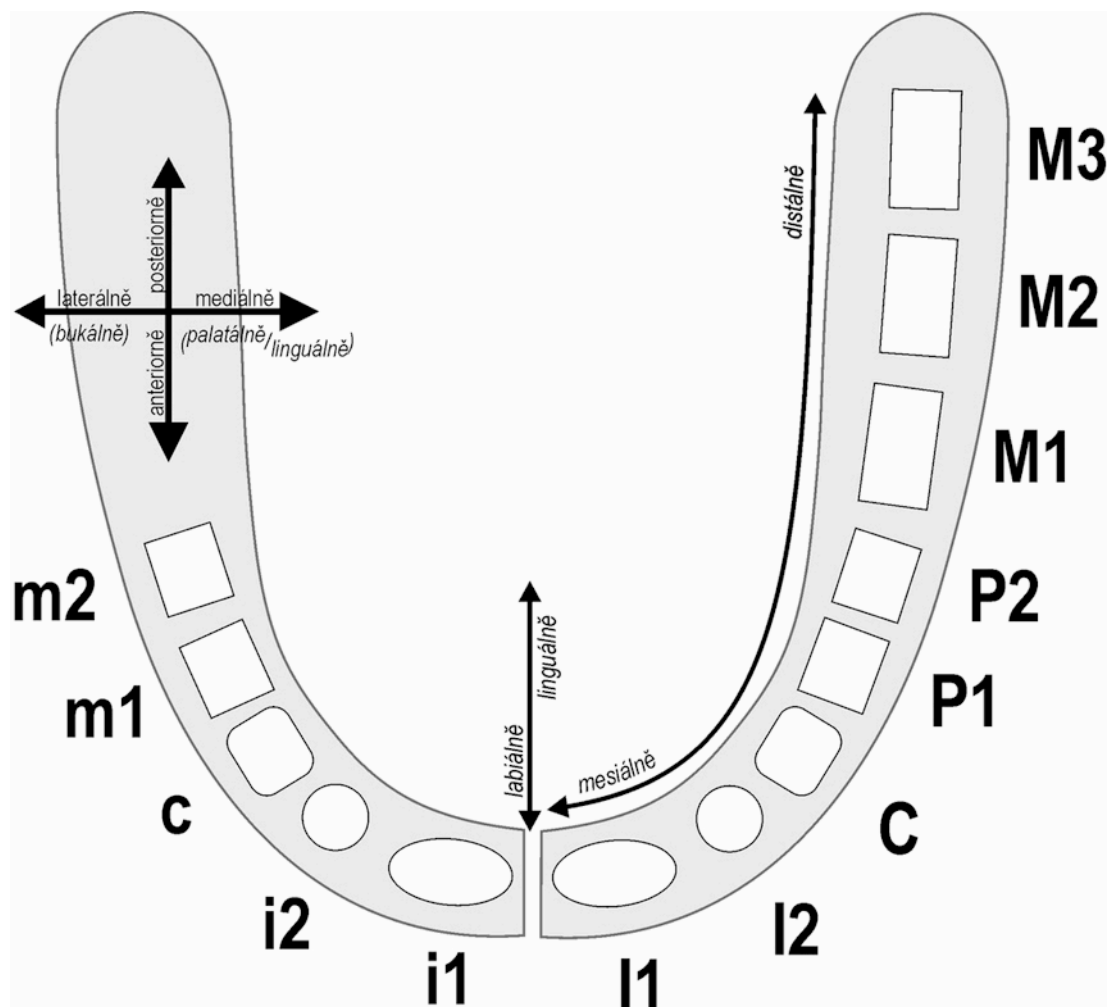
Schématičký obrázek stavby zubu s popisem základních pojmů.

Dentin vzniká činností odontoblastů jako hlavní hmota zubu. Má vysoký podíl anorganické hmoty, 67-70%, zbytek je složen z proteoglykanů a kolagenu. Dentin je tvrdší než kost, přesto si ponechává svou pružnost. Odontoblasty zasahují do dentinu cytoplazmatickými výběžky ve formě vláken (*vlákna Tomesova*), pro něž jsou v dentinu vytvořeny úzké kanálky.

Sklovina je nejtvrďší hmota v lidském těle, obsahuje 96-97% minerálních látek. Sklovina se skládá ze sloupečků tvořených krystalky hydroxyl-apatitu (prismata enameli), které do sebe zapadají a probíhají po celé tloušťce skloviny. Na průřezu skloviny se pod intenzivním světlem objevují proužky na sebe kolmé. Jedny jsou dány postavením prizmat (*Hunterovy-Schregerovy proužky*) a druhé nerovnoměrnou mineralizací na hranicích přírůstků prizmat (*Retziusovy proužky*). Sklovinná prizmata obaluje organická hmota skloviny, nekolagenní proteiny ze skupiny enamelinů a

amelogeninů. Buňky produkující organickou hmotu a podílející se na mineralizaci skloviny se nazývají ameloblasty. Povrch skloviny neprořezaného zubu kryje tenká nezápenatělá blanka (*cuticula enameli*), která je zbytkem sklovinného orgánu a při prořezání zubu mizí.

Zubní cement je modifikovaná vláknitá kost. Je skromný na kostní buňky, avšak bohatý na minerální látky, kterých obsahuje 46-50%. S povrchem dentinu je spojen kolagenními vlákny. Na krčku zubu je vrstva cementu poměrně slabá, zatímco na kořenu je silná. Cement je spojen s kostí snopci kolagenních vláken (*Sharpeyova vlákna*).



Obr. 2: Schéma lidské dentice

Vlevo – zubní vzorec mléčné dentice v horní i dolní čelisti, vpravo – zubní vzorec trvalé dentice v horní i dolní čelisti. Mléčné zuby: i1 a i2 - první a druhý řezák, c – špičák, m1 a m2 – první a druhá stolička (molár). Trvalá dentice: I1 a I2 – první a druhý řezák, C – špičák, P1 a P2 – první a druhý premolár, M1, M2, M3 – první, druhá a třetí stolička (molár). Termín linguálně lze použít pro označení vnitřního směru v horní i dolní čelisti. Termín palatálně se týká pouze horní čelisti (horní index) a používá se společně s termínem linguálně pro čelisti dolní (dolní index).

Kompletní lidská dentice má dvě generace zubů (mléčné a trvalé) a čtyři typy zubů rozlišené podle tvaru jejich korunky: řezák - incisor (I, i), špičák - canin (C, c), třenový zub - premolár (P, p) a stolička - molár (M, m). Trvalé zuby mají vždy svého předchůdce v mléčné dentici. Výjimkou jsou stoličky trvalé dentice, které jsou vývojovým pokračováním dentice mléčné v zadní části ústní dutiny. Terminologicky matoucí je skutečnost, že mléčné premoláry jsou na základě svého tvaru označovány jako mléčné stoličky (moláry).

Zubní vzorec mléčné i trvalé lidské dentice společně se základními pojmy a směry je schematicky znázorněn viz Obr. 2.

5.2.2. Vývoj lidské dentice

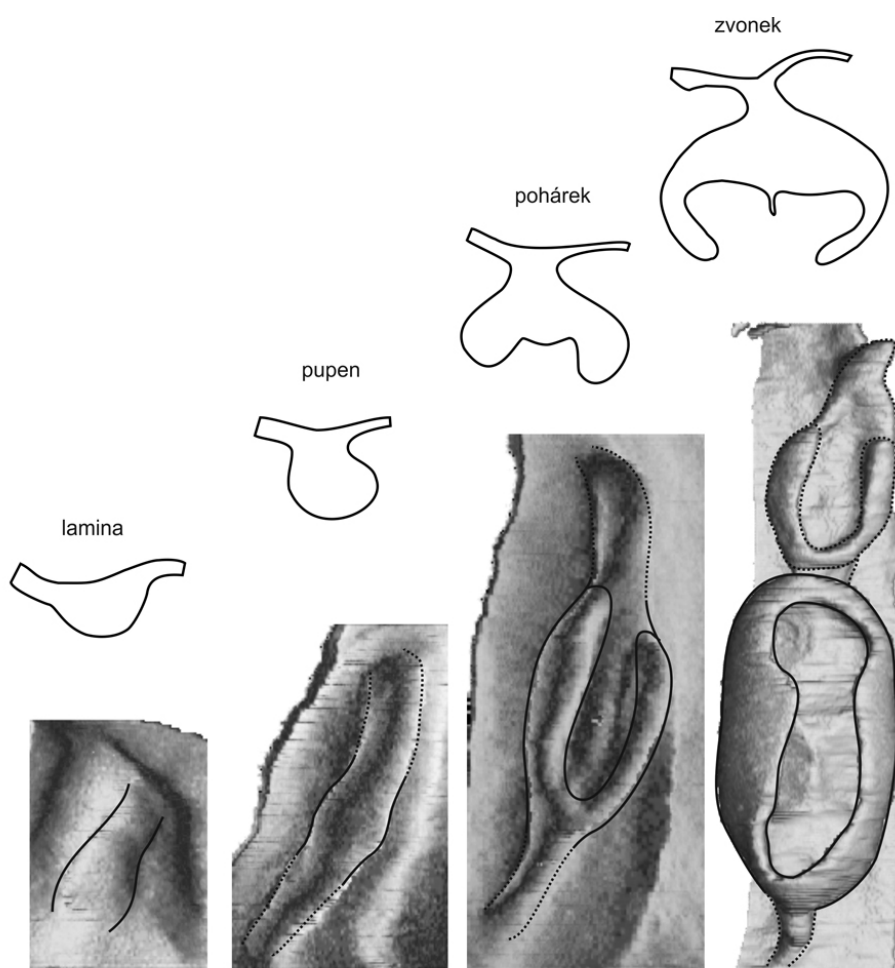
Odontogeneze začíná fází iniciace, tj. vnořením ústního epitelu na povrchu čelistí do jejich mesenchymového základu. V místech vnoření vzniká epitelové ztluštění. Dalším vrůstáním epitelu do mesenchymu čelisti vzniká útvar, který se na řezech označuje termínem zubní lišta (lamina) (Obr. 3).

V některých místech laminy vytváří zubní epitel návalky, které na řezech odpovídají zubním pupenům. Na vrcholu pupenu se buňky mohou seskupovat do cibulovité struktury zvané sklovinný uzel, který slouží také jako signální centrum pro další vývoj zubu. Postranní části pupenu pak obrůstají sklovinný uzel a vzniká tzv. sklovinný orgán na stádiu pohárku a posléze zvonku. Všechny tyto změny jsou zahrnuty do fáze morfogeneze (morfodiferenciace).

Ruku v ruce s morfodiferenciací probíhá diferenciací na úrovni tkání – histodiferenciace. Epitelová část zubního primordia se diferenciuje na vnitřní a vnější zubní epitel, které představují vrstvy buněk na vnitřním a vnějším obvodu sklovinného orgánu. Přejít mezi vnitřním i vnějším zubním epitelem se nazývá „cervical loop“ (CL) (Obr. 4). Epitelové buňky uvnitř sklovinného orgánu se rozestupují a tvoří hvězdicovité retikulum. Na stádiu zvonku se buňky vnitřního zubního epitelu diferencují na ameloblasty, které produkují sklovinu směrem k bazální membráně (epitelo-mesenchymové rozhraní) a samy před svým produktem ustupují na opačnou stranu. Po začátku mineralizace skloviny roste okraj sklovinného orgánu (CL) do hloubky jako tzv. Hertwigova epitelová pochva, v souvislosti s vývojem kořene. V mesenchymové papile se buňky naléhající na basální membránu diferencují v odontoblasty, které produkují dentin a ustupují do vnitřní části (budoucí dřeňové dutiny) zubu. Na rozdíl od

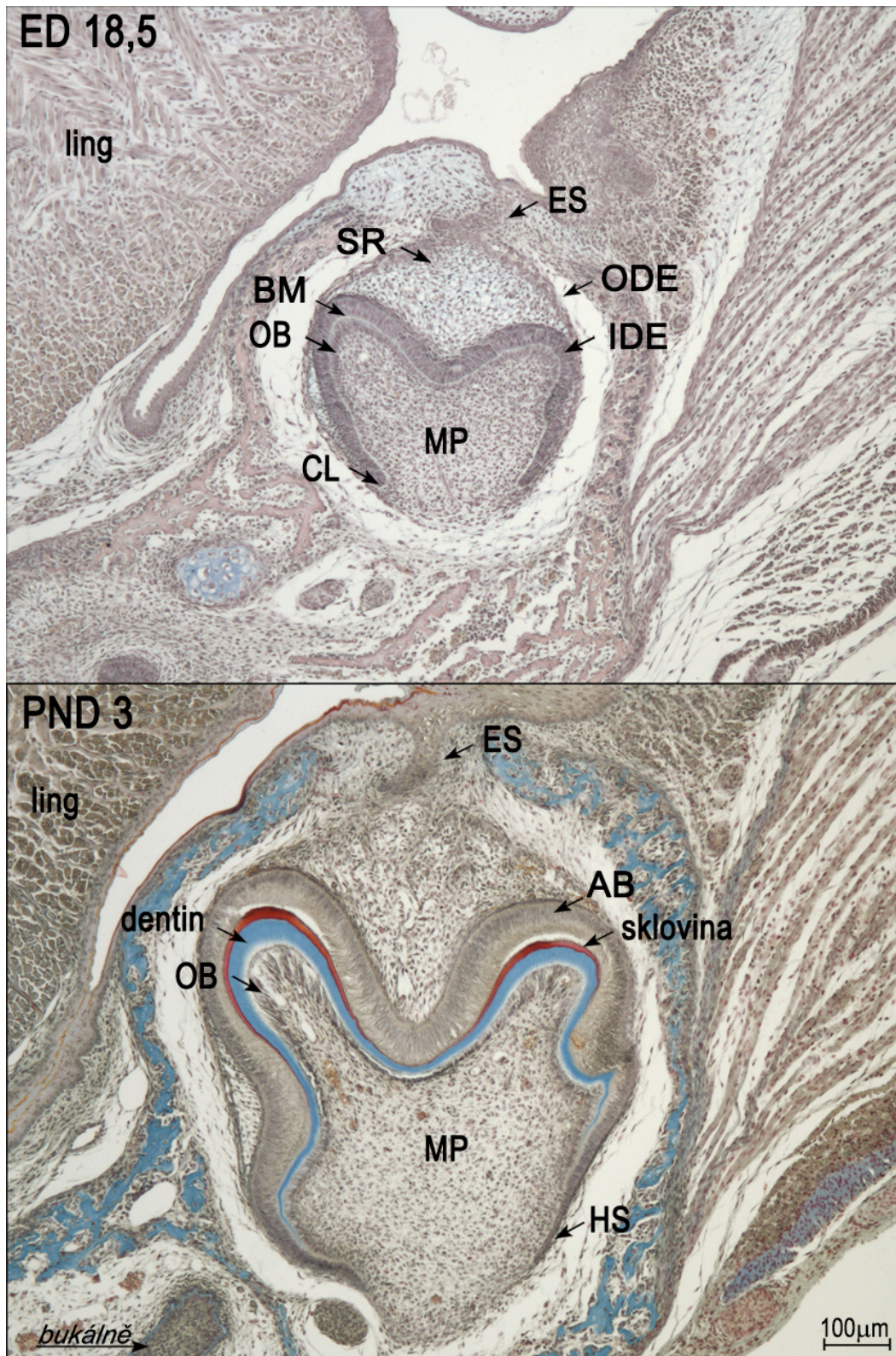
zanikajících ameloblastů odontoblasty přežívají po celý život v dřevné dutině zubu, a díky výběžkům - tzv. Tomesovým vláknům kontrolují sekreci dentinu a doplňují ji o sekundární případně terciární dentin. Po ukončení mineralizace dentinu korunky se pokračuje v tvorbě kořene, k čemuž přispívají také cementoblasty. Cementoblasty jsou modifikované osteoblasty, které produkují zubní cement pokrývající dentin krčku a kořenu.

Výsledkem odontogeneze je prořezaný zub pevně připoutaný množstvím vazivových vláken v kostěném lůžku (alveolu) v čelisti.



Obr. 3: Fáze vývoje zubu.

Nahoře: 2D představa určité fáze vývoje zubu na základě tvaru zubního epitelu na frontálních histologických řezech. Dole: 3D rekonstrukce zubního a přilehlého ústního epitelu na stádiích zubního vývoje zobrazených nahoře. Epitel odpovídající dané 2D struktuře je černě ohraničený, zbylý zubní epitel je tečkovaně ohraničený.



Obr. 4: Popis jednotlivých histologických vrstev při vývoji zubu.

Histologický řez ústní dutinou myši stáří ED18,5 (nahore) a PND3 (dole). ling – jazyk (lingua), ES – epitelová stopka, AB – ameloblasty, OB – odontoblasty, HS – Hertwigova epitelová kořenová pochva (Hertwig's epithelial root sheath), SR – hvězdčicovité retikulum (stellate reticulum), ODE – vnější zubní epitel (outer dental epithelium), IDE – vnitřní zubní epitel (inner dental epithelium), BM – basální membrána, MP – mesenchymová papila.

U člověka začíná stádium iniciace kolem 5. týdne embryonálního vývoje. V době, kdy základy mléčné dentice dosáhnou stádia zvonku, se od jejich epitelové stopky odštěpují základy pro náhradní zuby trvalé dentice. Přibližně ve stejné době se vytváří základ prvního trvalého moláru, který nemá svého předchůdce v mléčné dentici. Základ druhého moláru vzniká asi ve čtvrtém měsíci po narození a třetí molár se zakládá až kolem 5. roku života dítěte. Mineralizace mléčných zubů začíná ve čtvrtém měsíci prenatalního vývoje a mineralizace probíhá až do prořezání korunky a dotvoření kořene jednotlivých zubů.

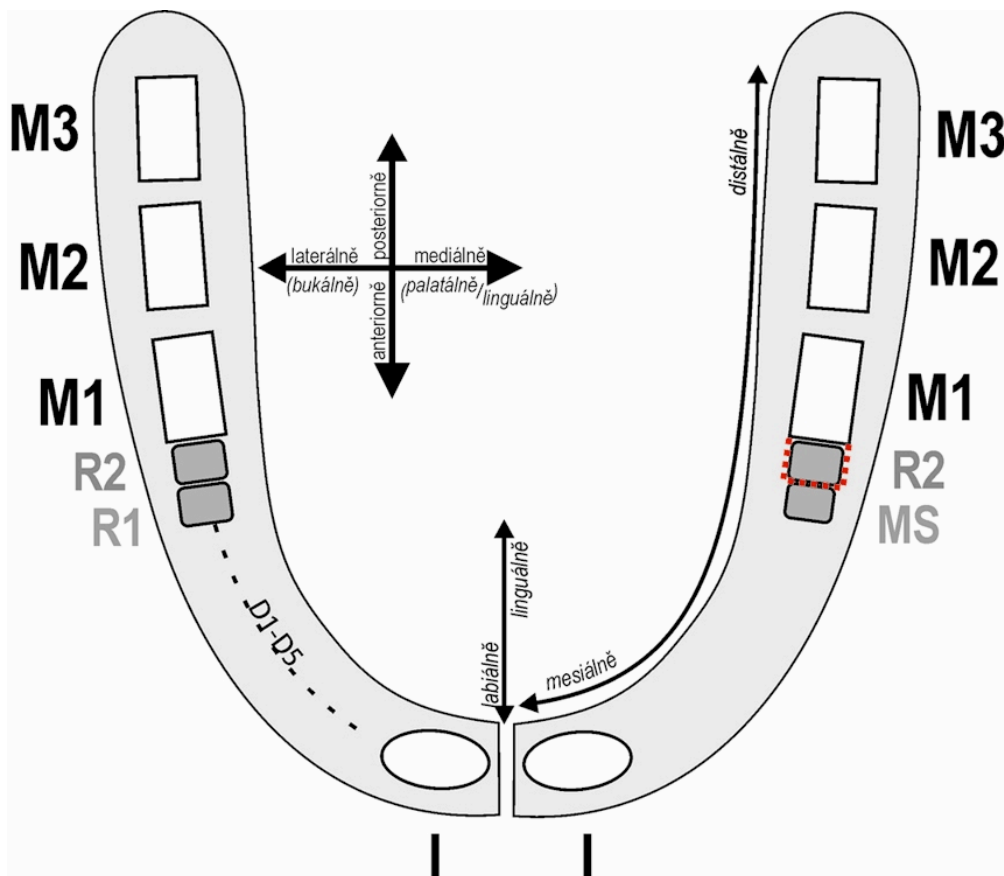
Kromě vlastní dentice se v přilehlé oblasti vyvíjí také předsíň ústní – vestibulum oris. Vestibulum oris je prostor mezi zuby a dásněmi na straně jedné a tváří nebo rty na straně druhé. Epitelový základ vestibula oris se u člověka objevuje ve stejné době, kdy probíhá iniciace zubního vývoje. Podle embryologických učebnic se vestibulum oris vyvíjí ze souvislé epitelové vestibulární lišty, která probíhá paralelně a zevně s lištou zubní. Tedy obě lišty zubní i vestibulární leží paralelně vedle sebe a mají podkovovitý tvar. Tato představa byla vyvrácena studií s použitím histologických řezů a 3D rekonstrukcí zubního a přilehlého ústního epitelu lidských zárodků a plodů různého stáří. Tato studie prokázala namísto jedné podkovovité vestibulární lišty systém epitelových lišt a vyvýšenin, které v horní čelisti opakovaně splývají s lištou zubní (Hovorakova et al., 2005). Zároveň byl také dokumentován vývoj horního laterálního řezáku, který vzniká fúzí dvou zubních základů, z nichž každý vzniká na jiném obličejovém výběžku (mediálním nasálním a maxilárním). Ke spojení obou základů dochází při spojení obličejových výběžků (Hovorakova et al., 2006).

5.2.3. Specifické rysy myší dentice

Myší dentice je oproti lidské dentici ještě více redukována vzhledem k základnímu savčímu zubnímu vzorci. Myš má v jednom zubním kvadrantu pouze dva druhy zubů, jeden trvale rostoucí incisor a tři moláry oddělené bezzubou mezerou zvanou diastema.

U myši se vyskytuje také pouze jedna generace funkčních zubů. Během vývoje se však kromě budoucích zubů funkčních zakládají i rudimentární primordia zubů potlačených během evoluce (Obr. 5). V řezákové oblasti tato primordia dávají vznik rudimentárním zoubkům (Hovorakova et al., 2011), které jsou v literatuře známy jako tzv. mléčné řezáky (Woodward, 1894; Fitzgerald, 1973).

V oblasti embryonální diastemy (oblast mezi vyvíjejícím se řezákem a prvním molárem – M1) dosahují rudimentární zubní základy nanejvýš stádia zubního pupenu a potom se jejich vývoj zastavuje za pomoci buněčné apoptózy. Základy v přední části horní diastemy („D“ primordia 1-5) zanikají beze stopy. V dolní čelisti nebyly objeveny základy odpovídající malým „D“ primordiím, ale jen krátkodobě se vyskytující epitelové ztlustění. Nejvýznamnější jsou dva velké diastemové pupeny (Obr. 5), které se vyvíjejí před M1 a na časných stádiích byly do nedávna mylně považovány za základ M1. Velké pupeny v zadní části horní diastemy (R1, R2) a dolní diastemy (MS) se přeměňují v epitelové lišty vybíhající dopředu ze sklovinného orgánu M1. Velký zadní diastemový pupen (R2) v dolní čelisti se inkorporuje do přední stěny prvního moláru (Peterkova et al., 2002b), což prokázala nedávná experimentální data (Prochazka et al., 2010). Velké diastemové pupeny R1, MS, R2 jsou považovány za základy premolárů potlačených během evoluce myšovitých (Peterkova et al., 1996; 2000; 2006; Prochazka et al., 2010).



Obr. 5: Myší embryonální čelist

Vlevo – dolní čelist, vpravo – horní čelist. Pojem palatálně se používá pouze u horní čelisti (horní index) a linguálně pouze u dolní čelisti (dolní index).

5.2.4. Základní morfogenetické buněčné procesy v odontogenezi

Vývoj myší dentice nezačíná až vývojem funkčních zubů, jak bylo popsáno výše. Dříve nežli jsou patrná primordia funkčních zubů se v myší embryonální čelisti objevuje mnoho rudimentárních zubních zárodků zastavujících svůj růst na stádiu zubního pupenu. Při zastavení samostatného progresivního vývoje těchto struktur hraje důležitou úlohu apoptóza (programovaná buněčná smrt) v jejich epitelu. U kontrolních myší byla nalezena zvýšená koncentrace buněčné degenerace v místě rudimentárního zubního epitelu horní diastemy (Peterkova, 1983; Peterkova et al., 1995). Tato buněčná smrt byla později identifikována jako apoptóza v místě malých diastemových „D“ rudimentů (Tureckova et al., 1996), i ve velkých rudimentárních pupenech horní i dolní čelisti (Peterkova et al., 1996; 1998; Lesot et al., 1996; Viriot et al., 2000). Stejně výrazná koncentrace odumírajících buněk (apoptózy) je patrná v místě sklovinného uzlu vyvíjejícího se pohárku (Lesot et al., 1996; Vaahtokari et al., 1996b; Matalova et al., 2004; 2012) a v přední části prvního moláru na pozdějších stádiích (Lesot et al., 1996; Viriot et al., 2000; Boran et al., 2005). V řezákové oblasti se apoptóza vyskytuje v malé míře v anterolaterální oblasti zubního pupenu a v ústním epitelu (Kieffer et al., 1999; Miard et al., 1999), na pozdějších stádiích hlavně ve stopce spojující sklovinný orgán funkčního řezáku a ústní epitel, a její akumulace je také patrná v oblasti vyvíjejícího se sklovinného uzlu v pohárku na ED14,5 (Kieffer et al., 1999). Apoptózu můžeme vyhledávat na histologických řezech pod mikroskopem podle definovaných morfologických kritérií (Tureckova et al., 1996) nebo s pomocí imunodetekčních metod (Shigemura et al., 1999).

Pro růst a další vývoj zubu je zapotřebí i jiných buněčných pochodů jako je migrace (přesun buněk) a proliferace (množení buněk). Rozložení buněk v mitóze bylo dokumentováno v prvním moláru myší pomocí 3D rekonstrukcí u kontrolních (wild type, WT) myší jak v oblasti prvního moláru v dolní i horní čelisti (Jernvall et al., 1994; Lesot et al., 1996; Shigemura et al., 1999), tak v oblasti dolního řezáku (Kieffer et al., 1999; Miard et al., 1999).

Proliferující buňky zubního epitelu lze sledovat pomocí imunodetekce BrdU (Casasco et al., 1989; Vaahtokari et al., 1991; Lisi et al., 2003; Obara and Lesot, 2007; Shigemura et al., 1999), tritio-tymidinu (Osman and Ruch, 1975; Nso et al., 1992; Lesot et al., 1999) nebo PCNA (Setkova et al., 2006). Různé fáze mitózy lze dobře detekovat pod mikroskopem podle morfologických kritérií popsaných Elalfy a Leblondem (1987).

Tímto způsobem byla studována distribuce buněk v mitóze v myším dolním řezáku (Kieffer et al., 1999; Miard et al., 1999) a moláru (Lesot et al., 1996; Viriot et al., 1997).

V ED12,5 byla nalezena rovnoměrná distribuce buněk v mitóze v předozadním průběhu celého zubního epitelu v dolní tvářové oblasti (Viriot et al., 1997). O den později (ED13,5) se pomocí imunodetekce BrdU objevily dvě oddělené BrdU negativní oblasti naznačující místa, kde nedochází k proliferaci buněk. První z těchto oblastí se vyskytuje v přední části zubního epitelu, druhá pak v oblasti sklovinného uzlu prvního moláru (Shigemura et al., 1999). V ostatních oblastech buněčná proliferace zajišťuje další růst a zanořování epitelu, který postupně obklopuje budoucí mesenchymální papilu zubu. Podobné BrdU negativní oblasti se objevují také na dalších stádiích vývoje dolního M1 v oblastech sekundárních sklovinných uzlíků, které jsou považovány za regulační signální centra jednotlivých hrbolků moláru (Jernvall et al., 1994). U řezáku jsou mitotické buňky rovnoměrně rozmístěné v zubním epitelu i přilehlém mesenchymu. Pouze na stádiu ED13,5 v době transformace pupenu v pohárek, bylo nalezeno jen velmi málo proliferujících buněk v zubním epitelu (Kieffer et al., 1999).

5.2.5. Geny účastníci se zubního vývoje

Zubní vývoj je přísně regulován genetickými dráhami a zároveň komunikací mezi tkáněmi epitelem a mesenchymem. Mezi hlavní signální molekuly zajišťující regulaci zubního vývoje patří členové *Bmp*, *Fgf*, *Shh* a *Wnt* genových rodin.

Bmp (bone morphogenetic proteins – kostní morfogenetické proteiny) působí jako obousměrné signální faktory mezi zubním epitelem a mesenchymem. Exprese *Bmp4* se objevuje v zubním epitelu již při jeho ztlušťování (Peters and Balling, 1999) a poté se exprese přesune do mesenchymu, odkud indukuje vytvoření epitelového sklovinného uzlu. *Bmp2* a *Bmp7* jsou exprimovány taktéž v zubním epitelu, ale až ve stádiu pupene (Vaahtokari et al., 1996a). *Bmp* také stimulují další transkripční faktory jako *Msx1* a *Msx2* (Bei et al., 2000). Zatímco *Msx1* je exprimován v mesenchymu během všech kroků zubní morfogeneze (MacKenzie et al., 1992), *Msx2* je exprimován v mesenchymu pouze v místech, kde se do mesenchymu vnořuje zubní lišta, v pozdějších stádiích také v zubní papile a v epitelových buňkách sklovinného uzlu (Galluccio et al., 2012).

Fgf (fibroblast growth factors – fibroblastové růstové faktory) jsou velmi dobře prostudovány ve většině z jejich 19 podob (*Fgf1-19*). Do zubního vývoje se nejvíce zapojují *Fgf3* a *Fgf10*, jejichž geny se exprimují v zubní papile, přičemž jejich receptory

se objevují v zubním epitelu (Kettunen et al., 2000). Stejně důležité jsou také exprese *Fgf4*, *Fgf8* a *Fgf9* exprimované naopak v zubním epitelu. *Fgf8* se účastní počátečních fází odontogeneze, exprese *Fgf4* se objevuje v primárním i sekundárním sklovinném uzlu a *Fgf9* v epitelu pozdních fází zubního zvonku, kde se účastní diferenciací odontoblastů a ameloblastů (Kettunen and Thesleff, 1998). Zároveň Fgf proteiny stimulují expresi dalších genů jako zmiňovaný *Msx1*, *Pax9*, *Activin βA* a *Runx2* v mesenchymu.

Expresí *Shh* hraje důležitou úlohu již v počátcích odontogeneze při vzniku epitelového ztlustění, znovu se objevuje ve sklovinném uzlu funkčních i rudimentárních zubů a je považována za jeho marker (Jernvall et al., 1994; Prochazka et al., 2010; Hovorakova et al., 2011). Receptor *Shh* zvaný Patched se vyskytuje pouze v přilehlém mesenchymu. Myší mutanty se sníženou (Cobourne et al., 2001) i zvýšenou funkcí *Shh* shodně vykazují zastavení zubního vývoje na stádiu pupenu. Tyto výsledky naznačují, že podstatnou úlohu hraje určitá hladina *Shh* a s ním spojená genová homeostáze (Cobourne et al., 2009).

Wnt (wingless) genová rodina čítá více než 10 členů. Každý z nich se účastní jiné fáze odontogeneze od epitelového ztlustění po stádium časného zvonku. *Wnt* se objevují převážně v epitelu a to i specificky v epitelovém ztlustění mimo oblasti budoucího zubu (*Wnt3*, *Wnt7b*). Receptory jednotlivých *Wnt* genů se převážně objevují v mesenchymu (Sarkar and Sharpe, 1999). Podle nejnovějších studií se *Wnt* přes navázaný β-*katenin* podílí společně s *Fgf* na iniciaci zubního vývoje (Chen et al., 2009).

5.3. Syndromické a nesyndromické vývojové vady zubů u člověka

Jak již bylo popsáno, zubního vývoje se účastní celá řada růstových faktorů, transkripčních faktorů, signálních molekul a genů jiných důležitých proteinů. Porušení jednoho z těchto faktorů může vézt k menší či větší poruše vývoje zubů. Někdy je taková porucha spojena s vývojovými vadami jiných orgánů a tkání, pak hovoříme o genetickém syndromu. Vývojové vady zubů se mohou projevit změnami v počtu, velikosti, tvaru a/nebo struktuře zubů, nebo v jejich prořezávání či postavení v čelisti.

Anomálie v počtu zubů se vyskytují až u 20% - 25% lidské populace. Pokud nepočítáme chybění třetích molárů, klesá prevalence anomálií v počtu zubů na 1,6 - 9,6% (Fleischmannova et al., 2008; Matalova et al., 2008). Snížení počtu zubů nazýváme hypodoncie (chybění jednoho až pěti zubů kromě M3), oligodoncie (chybění šesti a více

zubů najednou) nebo anodoncie (chybění všech zubů). Výskyt nadpočetných zubů nazýváme hyperodoncie (Matalova et al., 2008; Menezes and Vieira, 2008).

Nejčastější anomálií v počtu zubů, která se dokonce stává sekulárním trendem dnešní doby, je chybění třetích molárů (Rozkovcová et al., 2004; Fleischmannova et al., 2008). O jejích příčinách se často diskutuje, ale patří mezi ně méně abrazivní strava, zmenšování čelisti a genetický vliv (Bergman, 1998; Matalova et al., 2008). Dalšími častými příklady ageneze jednotlivých zubů jsou horní laterální incisory a dolní druhé premoláry. Příčina chybění laterálních incisorů může být zakotvena v počátcích vývoje čelisti (Hovorakova et al., 2006). Ageneze zubů může souviset s poruchou genů *Pax9* a *Msx1* u člověka i u myši (Fleischmannova et al., 2008; Matalova et al., 2008). Oba tyto geny patří mezi homeobox transkripční faktory exprimované v mesenchymu během počátečního vývoje zubů a jsou kontrolovány zmiňovanými Fgf/Bmp signálními molekulami. Jejich funkce byla sledována také např. na zvířecím modelu. Myši s odstraněnými funkčními geny *Pax9* a *Msx1* mají shodně postiženou celou ústní oblast se zárodky zubů zastavenými ve stádiu pupenu a s orofaciálními rozštěpy. Naproti tomu myši s pouze sníženým množstvím *Pax9* mají velkou fenotypovou variabilitu zubního postižení s různými chybějícími zuby, což se mnohem více podobá takto postiženým lidským pacientům (Kist et al., 2005).

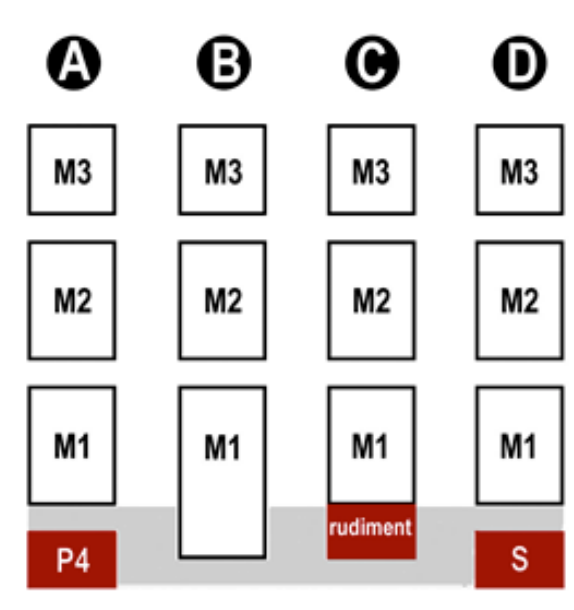
Příkladem syndromické poruchy v počtu zubů je hypohidrotická ektodermální dysplázie (HED) vyskytující se shodně u lidských i myších jedinců. U tohoto syndromu se vyskytuje postižení kůže a jejích derivátů, mezi něž patří absence vlasů, ochlupení, potních žláz a také zubů. Pacienti mohou trpět jak úplnou anodoncií, tak lehčí oligodoncií spojenou s anomáliemi tvaru a velikosti zubů. Nejčastěji mají vyvinutých pouze 5-7 zubů, především špičáky a první moláry. Přítomné zuby mají kónický tvar a jsou menší než obvykle (Clauss et al., 2008; 2010). Příčinou syndromu je mutace genu pro ektodysplasin-A *Eda* na X q12-q13,1 raménku (Kere et al., 1996; Ferguson et al., 1997) nebo genů *Edar* na 2q11-q13 (Headon and Overbeek, 1999; Monreal et al., 1999) či *Edaradd* na 1q42,1-q43 (Headon et al., 2001), kódující receptor ektodysplasinu A a jeho regulační doménu. Podobný fenotyp byl popsán u spontánně vzniklého kmenu myši nazvaného Tabby. „Tabby“ vzniklo z anglického výrazu pro mourovatou srst, která je na první pohled charakteristická pro heterozygotní fenotyp těchto myši díky už zmíněnému postižení chlupů. U Tabby myši byla zjištěna mutace právě v genu *Eda* na X chromozómu (Zonana et al., 1992). Zároveň se objevily myši s podobným stejným

fenotypem downless a crinched (Sofaer, 1969) s mutací v genech *Edar* a *Edaradd* ležících na autozomech.

Hyperodoncie se vyskytuje u 0,3-3% lidské populace (Fleischmannova et al., 2008; Galluccio et al., 2012). Nejčastěji se vyskytují v horní čelisti v podobě tzv. mesiodens, což je malý kónický zoubek vložený mezi první incisory. V dolní čelisti se pak nadpočetný zub vyskytuje nejčastěji v oblasti premolárů (Galluccio et al., 2012). U lidských pacientů bývá hyperodoncie spojována s mutací v genu kódujícího *Runx2*, který spolupracuje s *Fgf* a *Wnt* signální dráhou a způsobuje autosomálně dominantně dědičný syndrom kleidokraniální dysplázie (Fleischmannova et al., 2008). Etiologie nesyndromického výskytu nadpočetného zubu není docela známá. Existuje mnoho teorií, jak dochází ke vzniku nadpočetných zubů. Mezi prvními se objevila tzv. "teorie atavismů", která označuje nadpočetný zub atavismem, tedy pozůstatkem neboli návratem v zubní evoluci (Smith, 1969). Ojedinelý výskyt nadpočetných zubů na různých místech v mléčné nebo definitivní dentici však nepřispívá k obhajobě této teorie a další autoři se proto přiklánějí k teorii „náhodného objevení“ (Primosch, 1981). Dále bylo uvažováno o rozpadu zubního primordia na dva zuby, čímž se jeden z nich stal nadpočetným (Taylor, 1972). Zajímavá je také teorie o limitované a nezávislé buněčné proliferaci, která může být následkem genetické abnormality, úrazu či jiného faktoru stimulována k tvorbě nadpočetného zubu (Rajab and Hamdan, 2002). Přes všechny tyto teorie se stále nepodařilo identifikovat geny zodpovědné za nesyndromický výskyt nadpočetných zubů u člověka (Galluccio et al., 2012).

Naopak u myši se podařilo nalézt hned několik genů, jejichž vyřazení způsobí výskyt nadpočetného zubu. Nadpočetný incisor i molár se objevuje u *Epiprofin* mutantních myši (Nakamura et al., 2008). Různé genotypy *Sprouty2* a *4* deficientních myši mají buď nadpočetný tvářový zub a/nebo incisor (Klein et al., 2006; 2008; Boran et al., 2009). Do výčtu těchto genů spadá i *Lrp4* a *Ectodin* působící jako antagonisty Bmp dráhy (u myši také zvaný *Usag-1*), jejichž nedostatek funkce způsobuje opět tvorbu nadpočetného zubu před prvním molárem u myši (Kassai et al., 2005; Ohazama et al., 2008). Poněkud zvláštním příkladem je také zmiňovaný gen pro ectodysplasin *Eda*. Umělé navýšení funkce *Eda* genu u myších mutantů K14-*Eda* je spojeno s výskytem nadpočetného moláru (Kangas et al., 2004), ale zároveň spontánní mutace v tomto genu způsobující syndrom HED, v určitém ohledu má za následek také tvorbu nadpočetného zubu, přestože bývá spíše spojována s hypodoncií. Nadpočetný zub se vyskytuje u *Eda*^{+/-}

myši. Jako „nadpočetný“ zub se také označuje u homo/hemizygotního Tabby fenotypu malý zoubek před moláry (Sofaer, 1969), jejichž celkový počet je snížen (místo 3 molárů jsou přítomny pouze 2), a podle tvaru nelze bezpečně identifikovat, o jaké moláry se jedná (Sofaer, 1969; Kristenova et al., 2002). Prenatální studie ukázala, že tento zubní fenotyp vzniká na podkladě poruchy segmentace zubního epitelu na časných stádiích vývoje. Byl navržen hypotetický model, podle něhož zmíněný „nadpočetný“ element odpovídá separované přední části prvního moláru, kde dochází u WT myších embryí k inkorporaci premolárového zubního primordia (Peterkova et al., 2002a) (Obr. 6).



Obr. 6: Hypotéza o původu nadpočetného tvářového zubu u mutantních myši.

A - zubní vzorec v tvářové oblasti u myších předků, B – dospělé myši, C – myšihho embrya, D – Tabby myši. M – molár, P – premolár, S – nadpočetný zub (supernumerary tooth). (Upraveno podle Peterkova et al., 2002a)

Z literárních údajů tedy vyplývá, že součástí odontogeneze u normálních myších embryí je dočasný výskyt rudimentárních zubních primordií v tvářové i řezákové oblasti čelistí.

Cíle disertační práce budou směřovat k ověření následující hypotézy: Při vývoji nadpočetných zubů u mutantních myši se uplatňuje revitalizace rudimentárních primordií zubů potlačených během evoluce.

6. Cíle práce

1. Porovnat časný vývoj rudimentárních (premolárových) zubních primordií a prvního moláru u *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}* mutantních myší a u myší kontrolních (WT). Potvrdit hypotézu, že při vzniku nadpočetného tvářového zubu u *Spry2^{-/-}* i *Spry4^{-/-}* myší dochází k revitalizaci rudimentárních zubních primordií na základě zvýšení proliferace a/nebo snížení apoptózy.
2. Popsat morfogenezi nadpočetného zubu u myší s chyběním obou genů *Spry2* a *4* (*Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}* myši) a tyto výsledky porovnat se vznikem nadpočetného zubu u *Spry2^{-/-}* nebo *Spry4^{-/-}* myší.
3. Potvrdit hypotézu, že zvýšení proliferace a/nebo snížení apoptózy provázejí vznik zdvojeného řezáku u myší *Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}*.
4. Porovnat vývoj tvářové dentice s nadpočetným zubem u *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}* mutantních myší a u Tabby myší.

7. Materiál a metody

7.1. Myši a odběr embryí

Laboratorní myši CD1 pocházejí z outbredního chovu a byli zakoupené v Charles River (Sulzfeld, Německo). CD1 myši nemají žádné genetické modifikace. Z tohoto důvodu byly využívány na všechny studie, kde bylo zapotřebí srovnání s přirozeným myším vývojem. V dalším textu nazýváme CD1 myši „wild type“ (WT) nebo myši kontrolní. Myši s vyřazenými geny *Sprouty2* a/nebo *Sprouty4* nám byly poskytnuty Prof. Ophirem Kleinem (UCSF, San Francisco, USA). Způsob genetické modifikace použité u *Spry* mutantních myší se nazývá „Knock out“ (KO), vyřazení funkce genu. V případě, že se jedná o současné vyřazení obou *Spry2* a *4* genů, nazývá se tato modifikace „Double knock out“ (DKO). Genotyp myši potom určuje, kolik alel jednotlivých *Spry* genů má vyřazenou funkci.

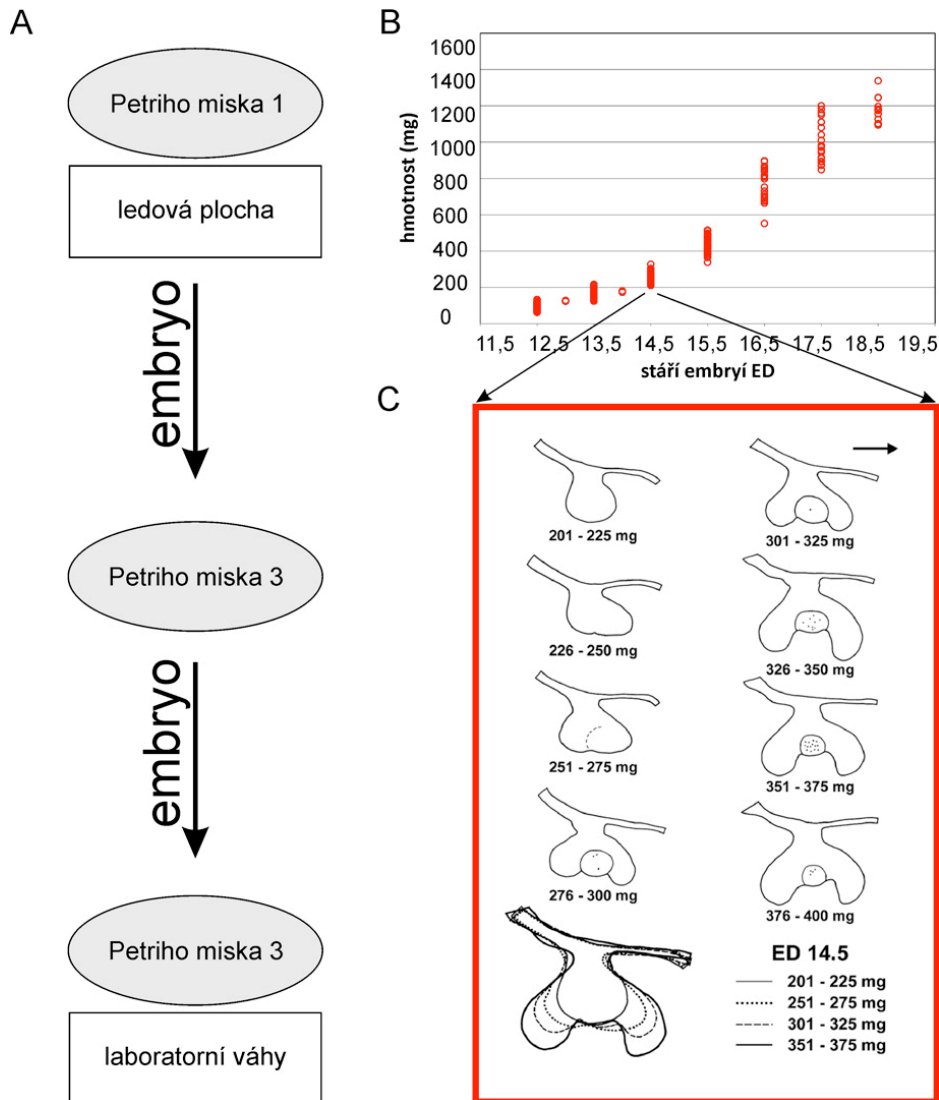
Darována nám byla embrya různých genotypů pocházející z chovu v San Francisku a dospělé myši *Spry2*^{+/-} a *Spry4*^{-/-}, které byly využity k založení našeho vlastního chovu. U nás byl chov *Spry* mutantních myší oživen křížením s CD1 myší.

Samice byly připouštěny mezi 16-18 hodinou, druhý den ráno byla odečtena vaginální zátka. Poledne po ranním odečtení vaginální zátky je považováno za embryonální den 0,5. Na požadovaných stádiích březosti byly samice usmrceny cervikální dislokací a odebírána embrya/féty v embryonálních dnech (ED) 12,3-18,5. Ranní odběr (7-8hod) odpovídal ED -,3, polední ED -,5 a večerní (16-17hod) ED -,7.

Stáří embryí v ED bylo upřesněno jejich hmotností, která se odečítá bezprostředně po vyjmutí z dělohy matky a po lehkém osušení amniové tekutiny na Petriho misce nebo filtračním papíru (Obr. 7A). Hmotnost embrya je prokazatelně spoluurčující faktor pokročilosti zubního vývoje společně s chronologickým stářím embrya (Peterka et al., 2002) (Obr. 7B, C). Podle hmotnosti jsme seřadili embrya v jednotlivých ED do skupin po 10mg a tyto skupiny vyhodnocovali jako jednotlivá stádia vývoje.

Hlavičky nebo čelisti embryí byly fixovány ve fixačních tekutinách Bouin, Bouin-Hollande nebo 4% paraformaldehyd (PFA).

Zacházení se zvířaty v experimentech probíhalo v souladu s předpisy EU, tak jak je požadováno Odbornou komisí Ústavu experimentální medicíny Akademie věd České republiky.



Obr. 7: Schéma vážení embryí.

A – postup vážení, B – graf distribuce hmotností WT myši na jednotlivých ED, C – rozdíl ve vývoji primordia prvního dolního moláru u embryí stejného stáří (ED), ale různé hmotnosti. (B, C upraveno podle Peterka et al., 2002)

7.2. Histologie

Embrya byla fixována ve fixačním činidle Bouin nebo Bouin-Hollande. Hlavičky embryí byly zalaty do parafínu a rozřezány na mikrotomu na sériové frontální řezy. Tloušťka řezů byla 5-7 μ m. Sériové řezy byly obarveny modifikovanou Maloryho metodou (alciánová modř- hematoxylin-eozin).

7.3. Kvalitativní analýza zubního vývoje na histologických řezech

Obarvené řezy byly hodnoceny pod mikroskopem Jenaval (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Německo) nebo Leica DMLB (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Německo). Vybrané řezy byly snímány digitální kamerou DC450 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Německo) pod zvětšením 200-500x. Hodnocen byl tvar a velikost zubního epitelu, tvar mesenchymové papily zubu a zubního váčku.

7.4. 3D rekonstrukce

Zubní a přilehlý ústní epitel byl rekonstruován do trojrozměrných modelů. Pod mikroskopem značky Jenaval nebo Leica DMLB vybaveným kreslicím zařízením byla ze sériových řezů obsahujících zubní zárodky překreslena bazální membrána oddělující zubní a ústní epitel od mesenchymu čelisti. Povrch epitelu odpovídal rozhraní epitelu a ústní dutiny. Postranní hranice rekonstruovaného epitelu byly určovány až po následné superpozici. Na tyto nákresy bylo použito zvětšení 250x. Pro určení správné orientace zubního epitelu v prostoru byl každý pátý řez doplněn o střední čáru vedoucí středem hlavičky embrya viditelnou pod menším zvětšením (32x) než se kreslil vlastní zubní epitel. Zaznamenána byla také vzdálenost mezi střední čarou a slizničním záhybem tvořícím dno předsíně ústní (fornix vestibuli superior nebo inferior) a vzdálenost mezi střední čarou a místem, kde se zubní epitel připojoval k ústnímu epitelu.

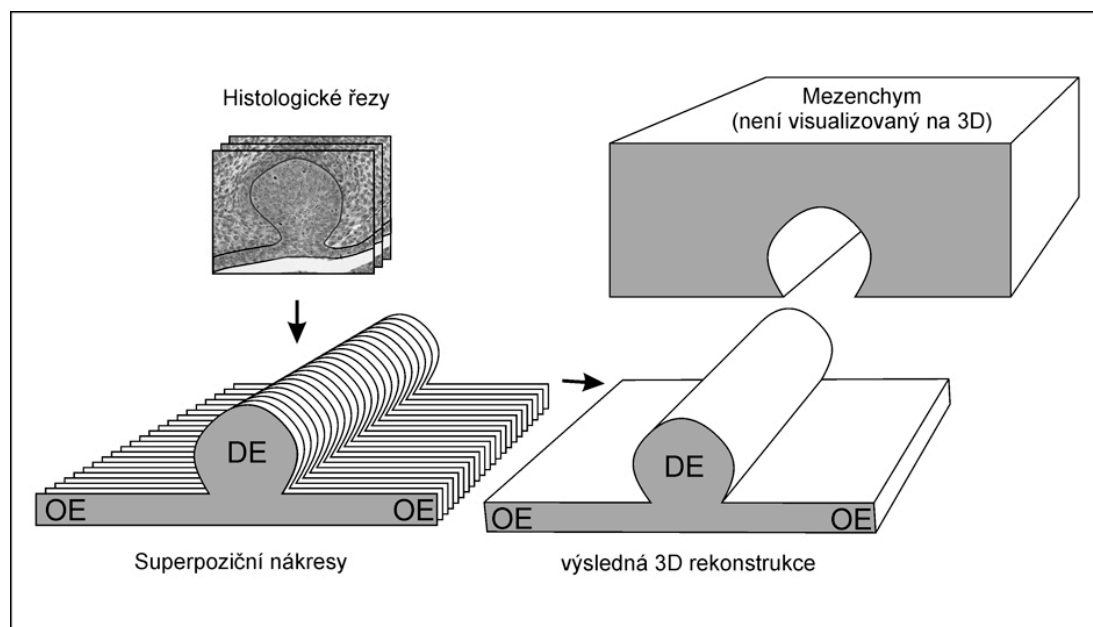
Nákresy jednotlivých řezů byly na světelném panelu superponovány modifikovanou „best fit“ metodou (Gaunt, 1978). Jedná se o navrstvení nákrasů na sebe podle nejlepší tvarové shody modelovaných struktur. Při prosvětlení bylo možno vidět kontury několika nákrasů najednou. Nákresy byly na sebe přikládány tak, aby rozdíly mezi nimi byly co nejmenší a pravidelné, tj. struktury byly pravidelně se zvětšující nebo zmenšující. Zároveň byla hlídána správná prostorová orientace zubního primordia vzhledem ke střední čáře a vzdálenosti slizničního záhybu a také místo spojení zubního a ústního epitelu od střední čáry. Každý nově přiložený nákras byl okřížkován podle předlohy. Křížky určovaly přesnou polohu nákrasu při následné memorizaci do počítače.

Špatný nebo chybějící nákras byl interpolován. Interpolací se rozumí nakreslení linie mezi epitelovými konturami předcházejícího a následného nákrasu.

Do nákresů se také zakreslovaly přídatné informace jako například apoptotická tělíska nebo expresní domény, které byly výsledně vizualizované v 3D modelu jinou barvou.

Vlastní memorizace nákresů a zhotovování 3D modelů a jejich obrázků jsme prováděli na pracovišti ve Štrasburku (Francie), s nímž probíhá dlouholetá spolupráce. Kontury nákresů byly snímány (memorizovány) digitální kamerou Hamamatsu C2400 spojenou se zobrazovacím systémem. Kontury byly umístěny do polohy určené křížky. Jejich další zpracování probíhalo s pomocí softwaru Sun Voxel a Sun Microsystems adaptovaného k tomuto účelu (Lesot et al., 1996) a od roku 2009 pomocí softwaru VG Max (Heidelberg, Německo). Počítačově vytvořený 3D model nám poskytl představu o prostorovém tvaru sledované struktury. Sledování takového modelu v počítači bylo možné ze všech úhlů pohledu.

Výsledné 3D rekonstrukce pak byly analyzovány a vyhodnoceny pomocí zpětné korelace s původními histologickými řezy. Kombinací těchto dvou metod jsme získali představu o prostorovém uspořádání zubního epitelu a o jeho změnách v jednotlivých stádiích vývoje u embryí a fétů kontrolních a geneticky modifikovaných myší. Postupný vývoj zubů jsme dokumentovali na zárodcích různého stáří od 12,5 ED do 18,5 ED.



Obr. 8: Schéma vytváření 3D rekonstrukcí.

Zubní (dentální) epitel (DE) společně s přilehlým ústním (orálním) epitelem (OE) jsou z histologických řezů překresleny na nákresy, které jsou následně superponovány. Výsledná 3D rekonstrukce zobrazuje pouze zubní a přilehlý ústní epitel. Mesenchym patrný na histologických řezech není na 3D rekonstrukci vizualizovaný.

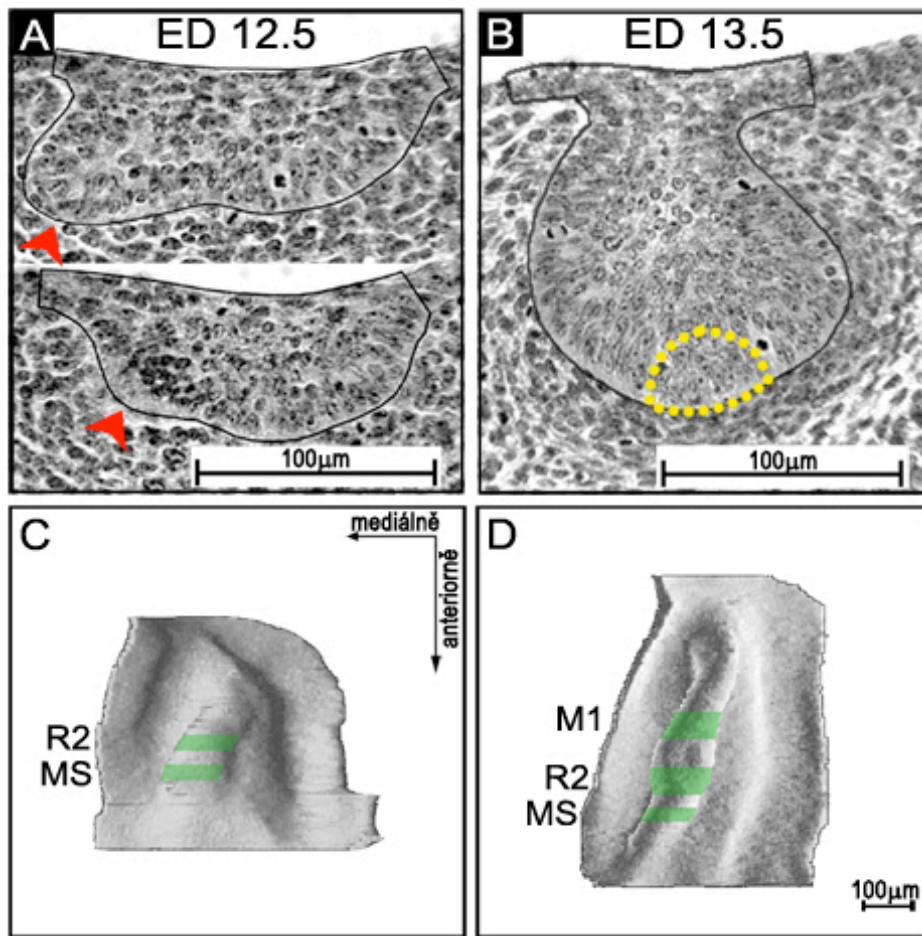
7.5. Kvantitativní analýza zubního vývoje na histologických řezech

7.5.1. Určení regionů pro kvantitativní analýzu

Kvantitativní analýza byla provedena na předem určených řezech ze série frontálních řezů hlavičkou kontrolních (WT) a *Spry2* a 4 KO a DKO embryí. Záměrem analýzy bylo zhodnotit vývoj jednotlivých zubních základů pomocí základních morfogenetických buněčných mechanismů (proliferace a apoptózy) a pomocí velikosti zubního epitelu. V horní incisorové oblasti byl analyzován každý pátý řez po celé předozadní délce zubního epitelu. V tvářové oblasti byly morfologicky určeny regiony (série řezů pro analýzu) tak, aby odpovídaly určitému zubnímu zárodku a zároveň se nepřekrývaly s jiným zubním zárodkem (Obr. 9C, D). Podle stáří embrya byly definovány dva respektive tři regiony. MS region byl morfologicky určen podle svého posledního řezu (Obr. 9A). Charakteristický tvar MS rudimentárního zubního primordia je na řezu dvouhrbolkový (Obr. 9A). Poslední řez, kde byl patrný přídatný linguální hrbolík byl označen jako poslední řez regionu MS. Celý hodnocený MS region výsledně čítal 5 řezů (35 μ m) vpředu od posledního řezu MS včetně. Od takto stanoveného zadního konce MS byla směrem do zadní části ústní dutiny odpočítána mezera 5 řezů (35 μ m) a dalších 5 řezů (35 μ m) odpovídalo hodnocenému regionu rudimentu R2 u embryí stáří ED12,5. U starších embryí stáří ED13,5 není již MS na řezech morfologicky patrný. Pupenovitý tvar s výrazným sklovinným uzlem na vrcholku je charakteristický pro R2 zubní primordium (Obr. 9). U těchto embryí jsme morfologicky určili řez s největším sklovinným uzlem a označili ho středním řezem regionu R2 (Obr. 9B). Celý R2 region výsledně čítal 10 řezů (70 μ m), směrem dopředu byla odpočítána mezera 5 řezů (35 μ m) a dalších 5 předních řezů (35 μ m) bylo označeno jako MS region. Směrem dozadu byla odpočítána mezera 10 řezů (70 μ m) a dalších deset řezů (70 μ m) bylo zahrnuto do regionu M1.

Každý vybraný řez byl vyfotografován kamerou Leica DC480 spojenou s mikroskopem Leica DMLB (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Německo) pod zvětšením 500x s použitím imerzního oleje. Na monitoru LG Flatron IPS224 počítače Asus byl ohraničen zubní epitel. Vnitřní hranici tvořila bazální membrána mezi zubním epitelem a přilehlým mesenchymem, zevně byl epitel ohraničen dutinou ústní. Při stanovení mediální a laterální hranice mezi zubním a přilehlým ústním epitelem byl

určen průsečík mezi liniemi bazální membrány ústního a zubního epitelu. Průsečíkem byla vedena kolmice k linii basální membrány ústního epitelu (Obr. 9A, B).



Obr. 9: Určení regionů pro kvantitativní analýzu velkých diastemových rudimentů v dolní čelisti myších embryí.

A, B - histologické řezy s vymezenými hranicemi analyzovaného zubního epitelu. A – charakteristický tvar předního diastemového rudimentu, tzv. mediálního segmentu (MS) s ustupujícím akcesorním linguálním pupenem (červená šipka) na dvou následujících řezech na stádiu ED12,5. B - Charakteristický tvar zadního diastemového rudimentu (R2 pupenu) s výrazným sklovinným uzlem (žlutá tečkovaná čára) na jeho vrcholu na stádiu ED13,5. C, D - 3D rekonstrukce zubního epitelu s přilehlým ústním epitelem. Zeleně – úseky řezů na kvantitativní analýzu na stádiu ED12,5 (C) a 13,5 (D). (Lagronova-Churava *et al.*, 2013)

7.5.2. Kvantitativní analýza apoptózy a proliferace

Na obrazovce počítače byla na snímcích změřena plocha ohraničené části řezu odpovídající zubnímu epitelu (Obr. 9A, B) pomocí počítačového programu Image J (<http://imagej.en.softonic.com/>).

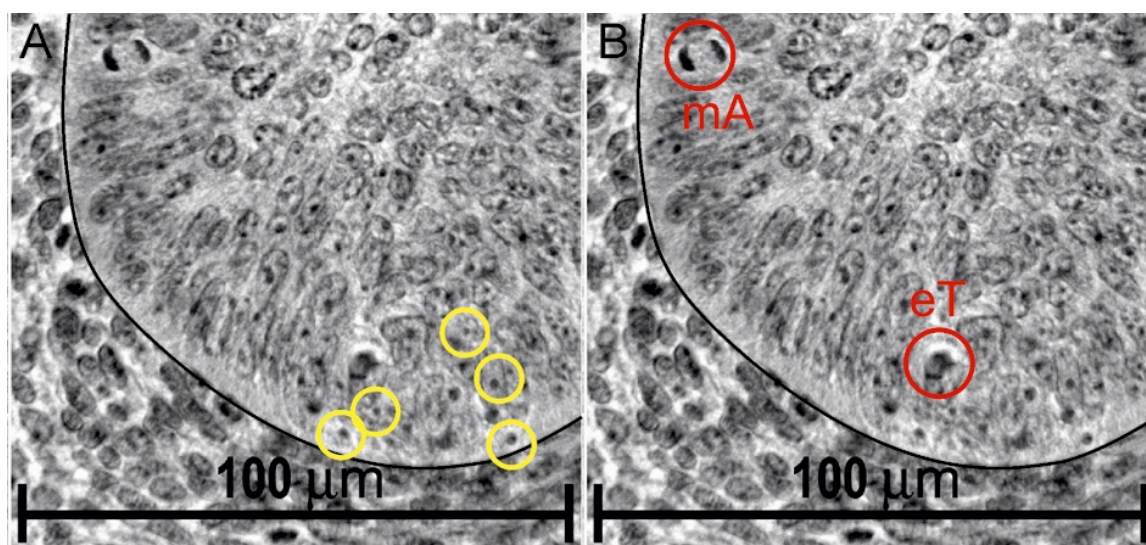
Apoptotické buňky a tělíska (Obr. 10A) byly spočítány v ohraničeném úseku zubního epitelu (Obr. 9A, B) přímo pod mikroskopem (pod zvětšením 500x s použitím imerzního oleje). K určení apoptotických buněk a tělísek bylo použito morfologických

kritérií (Tureckova et al., 1996). Při detekci apoptotických elementů pod mikroskopem bylo zapotřebí měnit ostření obrazu. Při postupném proostřování se pouze apoptotické buňky a tělíška jeví jako tmavší pravidelné sférické útvary.

Hustota apoptózy na jednotku plochy epitelu byla vypočítána tak, že celkový počet apoptotických tělísek a buněk v daném regionu zubních primordií byl vydělen součtem ploch naměřených na příslušných řezech.

Na snímcích řezů byly spočítány všechny buňky zubního epitelu v ohraničeném úseku a označeny buňky pravděpodobně se nacházející ve fázi buněčného dělení (mitózy) (Obr. 10B). Tyto buňky byly následně detailně analyzovány pod mikroskopem (pod zvětšením 500x s použitím imerzního oleje). S pomocí proostření byly upřesněny jednotlivé fáze mitózy. Při stanovení proliferačního indexu byly započítávány pouze buňky nacházející se ve fázi rané metafáze až rané telofáze (Elalfy and Leblond, 1987).

Mitotický index byl počítán jako poměr buněk v mitóze ke všem buňkám v dané oblasti zubního epitelu.



Obr. 10: Příklady apoptotických tělísek a buněk a buněk v různých fázích mitózy

A, B – část ohraničeného zubního epitelu histologického řezu. Žlutý kruh – označuje apoptotické buňky a tělíška, červený kruh – značí buňky ve fázi mitózy, mA – střední anafáze (middle anaphasis), eT – raná telofáze (early telophasis).

7.5.3. Měření plochy a objemu

Plocha ohraničeného zubního epitelu na řezech tvářovou i incisorovou oblastí byla změřena s pomocí volně dostupného počítačového programu Image J (<http://imagej.en.softonic.com/>). Průměrná plocha zubního epitelu v jednotlivých

regionech v tvářové oblasti byla spočítána součtem všech měřených ploch vydělených jejich počtem.

Objem hodnoceného zubního epitelu byl spočítán jako součin délky (počet řezů x 7 μ m) a průměru plochy zubního epitelu. V případě řezákového zubního základu se délka hodnoceného epitelu rovnala součinu tloušťky řezů (7 μ m) a celkového počtu řezů, kde zubní epitel převyšoval přilehlý ústní epitel.

7.6. Statistické metody

Pro statistické hodnocení byly použity celkové plochy ohraničených částí zubního epitelu na jednotlivých řezech, celkový počet buněk, počet apoptotických buněk a tělísek, a počet buněk ve fázi mitózy v zubním epitelu. Každý sledovaný soubor zahrnoval 6-10 čelistních kvadrantů u 3-5 jedinců. Jednoduchou analýzou variance (ANOVA) nebo Fischerovým exaktním testem jsme vyhledávali statisticky významné rozdíly ve velikosti, v míře apoptózy a v proliferačním indexu mezi jednotlivými regiony MS, R2 a M1 u jednotlivých skupin mutantních a kontrolních embryí. Do analýzy vstupovala zvlášť data naměřená na embryích ED12,5 a ED13,5. Pravé a levé strany čelisti byly brány jako nezávislé jednotky (Kristenova et al., 2002). Pokud rozložení dat neodpovídalo normálnímu rozložení, byla použita logaritmická nebo mocninná transformace. Data byla zpracována s pomocí programu R 2.13 (CRAN, freeware) s balíčkem "MASS" a "nlme". Výsledné grafické znázornění bylo vytvořeno v programu MS Excel 10.0.

7.7. *In situ* hybridizace celých mandibul (WISH)

Příprava roztoků

Embrya odebíraná pro studii exprese *Shh* byla zvážena, vypreparovaná horní a dolní čelist byla přes noc fixována v Bouinu nebo v 4%PFA. Druhý den po odběru byly čelisti převedeny vzestupnou metanolovou koncentrační řadou až do 100% metanolu, ve kterém byly uchovány zmražené na -20°C do dalšího zpracování. Další postup WISH proběhl podle protokolu s použitím následujících roztoků:

- PBS

4g NaCl

0,1 g KCl
0,77 g Na₂HPO₄·12H₂O
0,12 g KH₂PO₄
0,5 ml dietyl pyrocarbonát (DEPC)
doplnit injekční vodou do 500 ml
pH 7,5

- STOP roztok Glycin (2 mg/ml)

10 ml glycinu
50 ml PBS
200 µl tween 25%
doplnit injekční vodou do 50 ml

- HYB

25 ml formamidu
12.5 SSC 20x
3 ml kyseliny citrónové 1M
200 µl tween 25%
250 µl SDS 20%
50 µl kvasinková tRNA
doplnit injekční vodou do 50 ml

- SOL I

25 ml formamidu
12.5 ml SSC 20x
3 ml 1M kyseliny citrónové
2.5 ml SDS 20%
doplnit injekční vodou do 50 ml

- SOL II

25 ml formamidu
5 ml SSC 20x
1.2 ml kyseliny citrónové 1M
500 µl SDS 20%
200 µl tween 25%
doplnit injekční vodou do 50 ml

- MAB

5.8 g kyseliny maleové
17 ml NaCl 5M
3 g NaOH
2 ml tween 25%
doplnit injekční vodou do 500 ml
pH na 7.5

- Levamisol

0.5 g
10 ml destilované vody

- Blokovací roztok

45 ml MAB
5 ml 10% ovčí sérum
500 µl levamisol 100x

- TRIS HCl (0,1M)

12,1 g tris
doplnit do 1000 ml injekční vodou
pH 9,5

- Roztok s protilátkou

3 mg drceného myšního embrya inkubováno 30 min při 70°C v 500 µl MAB, poté odstředěno na centrifuze při 4°C rychlostí 18000 rpm po dobu 10 min

0,2 µl/vzorek Protilátka Anti-Digoxigenin-AP (zakoupená u firmy Roche s.r.o., Praha, ČR)

500 µl/vzorek Blokovací roztok

- Proteináza K 10 µg/ml (zakoupená u firmy Sigma Aldrich, s. r. o., Praha, ČR)
- BM-Purple (zakoupená u firmy Roche s.r.o., Praha, ČR)

Postup práce:

Na třepačce s termoblokem pro 40 mikrozkušavek 1,5 ml vzorku byla nastavena rychlost 800 rpm a teplota na 4°C. Pipetou se ze vzorků postupně odebíraly a přidávaly následující roztoky po 500 µm na určitou dobu.

- 75% Metanol 5 min
- 50% Metanol 5 min
- 25% Metanol 5 min
- PBS 2x5 min
- 6% peroxid vodíku (roztok v PBS) 1 hodina
- PBS 3x5 min

snížit rychlost otáček na 700 rpm a zvýšit teplotu na 20°C

- Proteináza K (1:2000 v PBS) 4-5 min
- Stop roztok Glycin 5 min
- PBS 5 min
- 0.2% glutaraldehyd v 4% PFA 1 hodina
- PBS 5 min

zvýšit rychlost otáček na 800 rpm

- HYB:PBS 1:1 10 min
- HYB 10 min

zvýšit teplotu na 70°C

- HYB 2 hod
- HYB + 1,5 µl sondy na 1 vzorek přes noc
- HYB 5 min
- SOL I 5 min
- SOL I 2x30 min

snížit teplotu na 65°C

- SOL I 30 min
- SOL II 2x 30 min

snížit teplotu na 20°C

- SOL II 30 min
- MAB 3x 5 min
- Blokovací roztok 1.5 hodiny

snížit teplotu na 4 °C

- Protilátka přes noc
- MAB: levamisol 100:1 3x5 min
- MAB: levamisol 100:1 3x60 min
- TRIS HCl: levamisol 100 :1 přes noc
- TRIS HCl: levamisol 100 :1 2x10 min
- BM-Purple přes noc
- 0.2% glutaraldehyd v 4% PFA 1 hod

Výsledkem WISH byla horní a dolní čelist myšího zárodku s modře obarveným úsekem obsahující m-RNA genu *Shh* - tudíž buňky, které v době odběru exprimovaly *Shh*. Čelisti byly následně zdokumentovány pod binokulární lupou Leica MZ6 vybavenou kamerou Leica EC3 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Německo). Čelisti původně fixované ve 4%PFA byly zamražené v roztoku v poměru 1:1 OCT a Hanksův

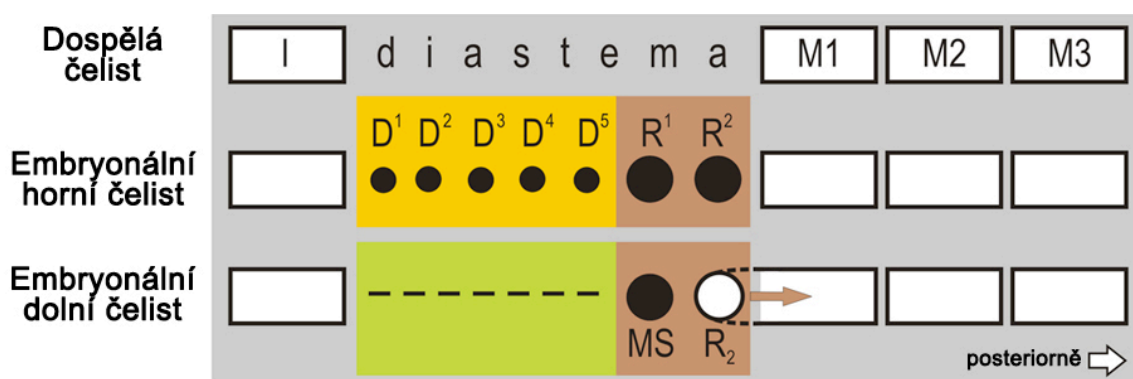
vyvážený solný roztok (HBSS) (Sigma- Aldrich, Saint Luis, USA) na -70°C , a krájeny na $10\mu\text{m}$ silné řezy na Kryostatu HM 560 (Microm International GmbH, Walldorf, Německo). Řezy byly obarveny jádrovou červení.

Čelisti fixované v roztoku Bouin byly zality do parafínu, krájeny na mikrotomu na řezy o tloušťce $10\mu\text{m}$ a obarveny byly též jádrovou červení.

8. Výsledky

8.1. Normální vývoj dentice v tvářové oblasti mandibuly

V embryonálním vývoji myši se před plně funkčními zuby vyvíjejí takzvané rudimentární základy zubů. Doposud byla jejich přítomnost dokazována pouze morfologickými nálezy na histologických řezech a 3D rekonstrukcích (Peterkova et al., 1996; 2000; 2002b) (Obr. 11).



Obr. 11: Schématický popis funkčního a embryonálního zubního vzorce u myši.

Obdélníky značí funkční zuby u dospělé myši nebo jejich základy v embryonální čelisti, kruhy značí rudimentární zubní primordia. Ve žlutém poli jsou zubní primordia malých rudimentárních pupenů v přední části diastemy horní čelisti. V zeleném poli je oblast přední části diastemy v dolní čelisti, kde se krátce vyskytuje jen ztluštění zubního epitelu. V hnědém poli jsou velké rudimentární pupeny v zadní části diastemy horní i dolní čelisti. Hnědou šipkou je naznačena inkorporace R2 do budoucího M1 v dolní čelisti. (Upraveno podle Peterkova et al., 2009)

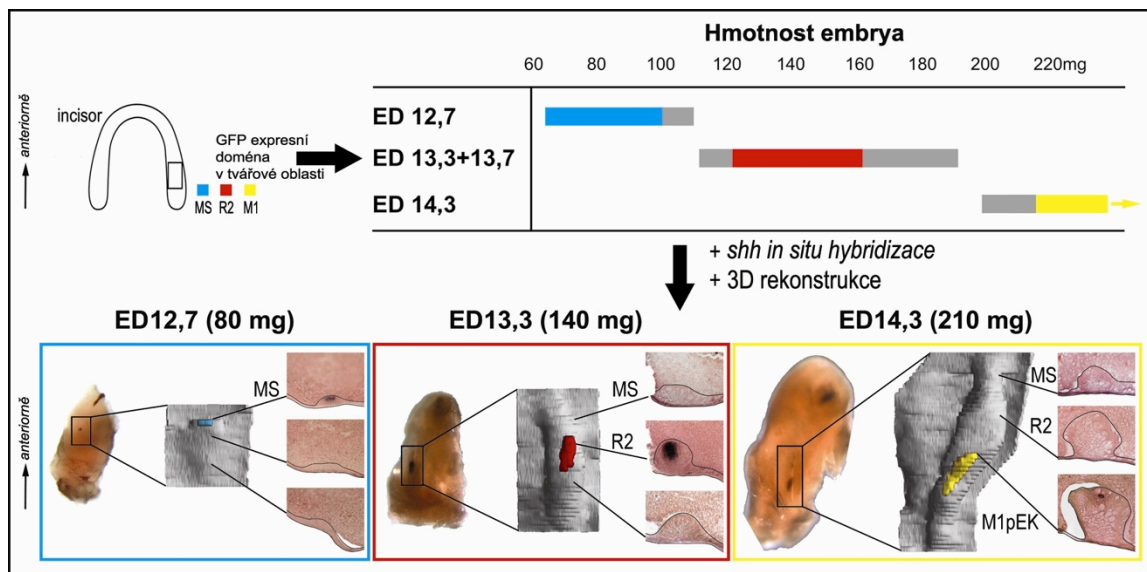
V rámci disertační studie byla použita kombinace metody WISH a 3D rekonstrukcí výsledné *Shh* expresní domény v mandibule WT myších embryí s cílem prokázat, že oba dva rudimentární pupeny mají svoje vlastní *Shh* signální centrum, které je považováno za marker časného zubního vývoje.

Embrya byla odebírána v přesnou denní dobu odpovídající stádiím ED12,7; 13,3; 13,7 a 14,3. Po zvážení byla embrya rozdělena do skupin po 10mg. Mandibuly z těchto skupin byly hybridizovány, zmrazeny, nakrájeny a nabarveny. Analýzou histologických řezů bylo určeno, ve kterém ze zubních zárodků se vyskytla expresní doména. Poté byla vytvořena 3D rekonstrukce k ověření histologických nálezů. První *Shh* expresní doména se objevila u embryí stáří ED12,7 patřících do hmotnostních kategorií 80-100mg. Tato expresní doména se vyskytla prokazatelně na vrcholu rudimentu MS, který byl identifikován podle charakteristického tvaru zubního epitelu na histologických řezech (Obr. 9A a Obr. 12). I z 3D rekonstrukce bylo zřejmé, že expresní doména leží v přední

části zubního epitelu tvářového úseku mandibuly, což odpovídalo poloze MS v tomto stádiu vývoje (Obr. 12). Expresní doména na tomto stádiu měla na řezech tvar pravidelného kruhu, na 3D rekonstrukci pak měla tvar koule. Na mandibulách embryí stejného stáří ale vyšší hmotnosti nebyla nalezena žádná expresní doména v tvářové oblasti. Hmotnostní interval 100-120mg byl proto nazván 1. negativní interval.

Na mandibulách patřících do hmotnostních kategorií 120-160 mg na stádiu ED13,3 a 13,7 se objevila další *Shh* expresní doména. Na histologických řezech bylo prokázáno, že tato expresní doména se vyskytuje na vrcholu pupenu R2, který byl identifikován podle jeho charakteristického kulovitěho tvaru s výrazným sklovinným uzlem v místě exprese (Obr. 9B a Obr. 12). Zubní epitel na 3D rekonstrukci tvoří prodloužený val s plochým širokým pupenem MS ležícím nejvíce vpředu. Vzadu od MS se klene do výšky oblý pupen R2, který nese *Shh* expresní doménu na svém vrcholu. Zadní část zubního epitelu je místem vývoje molárů. Oproti expresní doméně v MS je R2 expresní doména přezadně rozšířená do tvaru podlouhlého válce. Rozdíl v tvaru expresní domény byl patrný už na hybridizovaných mandibulách (Obr. 12).

Podobný tvar expresní domény jako byla ta v R2 rudimentu měla i třetí expresní doména nalezená v mandibulách stáří ED14,3 o hmotnostech embryí od 210mg. Třetí expresní doména ležela vzadu od MS i R2 pupenu - na vrcholu valu zubního epitelu, kde se vytvářel pupen M1, a měla opět tvar podlouhlého válce. Mezi výskytem druhé a třetí expresní domény byl zaznamenán hmotnostní interval embryí, u kterých nebyla nalezena žádná *Shh* expresní doména v zubním epitelu tvářové oblasti. Tento interval zahrnoval embrya o hmotnosti 160-220mg a byl nazván 2. negativní interval (Obr. 12).



Obr. 12: Přítomnost Shh exprese v dolní čelisti myších embryí na ED12,7-14,3.

Nahore - schéma přítomnosti Shh expresní domény v závislosti na hmotnosti embrya na jednotlivých chronologických stádiích vývoje (ED12,7; 13,3+13,7; 14,3). Dole - v barevném rámečku je nalevo fotografie části mandibuly s Shh expresní doménou v incisorové části a tvářové oblasti (v černém rámečku), uprostřed 3D rekonstrukce zubního epitelu a přilehlého ústního epitelu s barevně vyznačenou expresní doménou, napravo příklady histologických řezů mandibuly, které byly podkladem k vytvoření 3D rekonstrukce. Modrá barva značí expresní doménu v MS rudimentu, červená barva značí expresní doménu v R2 rudimentu, žlutá barva značí expresní doménu v M1 zubním základu. Upraveno podle Prochazka et al., 2010.

8.2. Vývoj dentice v tvářové oblasti mandibuly u myši *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}*

Prvním krokem k popisu zubního vývoje u mutantních myší bylo vytvoření referenčního souboru dat o zubním vývoji u příslušných WT myší na histologických řezech a 3D rekonstrukcích.

Na stádiu ED12,5 -13,5 se u WT embryí objevují v tvářové oblasti mandibuly postupně dvě boulovité struktury (rudimenty MS a R2) na vyvýšeném valu zubního epitelu. MS byl patrný jako linguálně vystupující přídatný hrbolík (Obr. 13, ED12,5 WT). Na histologických řezech měl MS tvar dvouhrbolkového pupenu. O den později se výrazně rozšířil a zmohtněl pupen R2, zatímco MS se díky buněčné apoptóze zmenšil tak, že na 3D rekonstrukci přestal být patrný. Na žádném histologickém řezu se už neobjevila klasická dvouhrbolková struktura MS. Epitelový val se distálně prodlužoval a vytvářel tak prostor pro pupen prvního moláru (Obr. 13, ED13,5 WT).

Na stádiu ED14,5 se zvětšilo primordium prvního moláru natolik, že se jeho vznikající pohárek morfologicky propojil s R2 pupenem a proběhla tak inkorporace rudimentu R2 do přední stěny pohárku M1 (Obr. 13, ED14,5 WT). Na dalším stádiu

ED15,5 byl vidět pouze velmi dobře vyvinutý pohárek M1 s R2 plně inkorporovaným do přední stěny tohoto pohárku, který posléze začal procházet transformací na zubní zvonek (Obr. 13, ED15,5 WT).

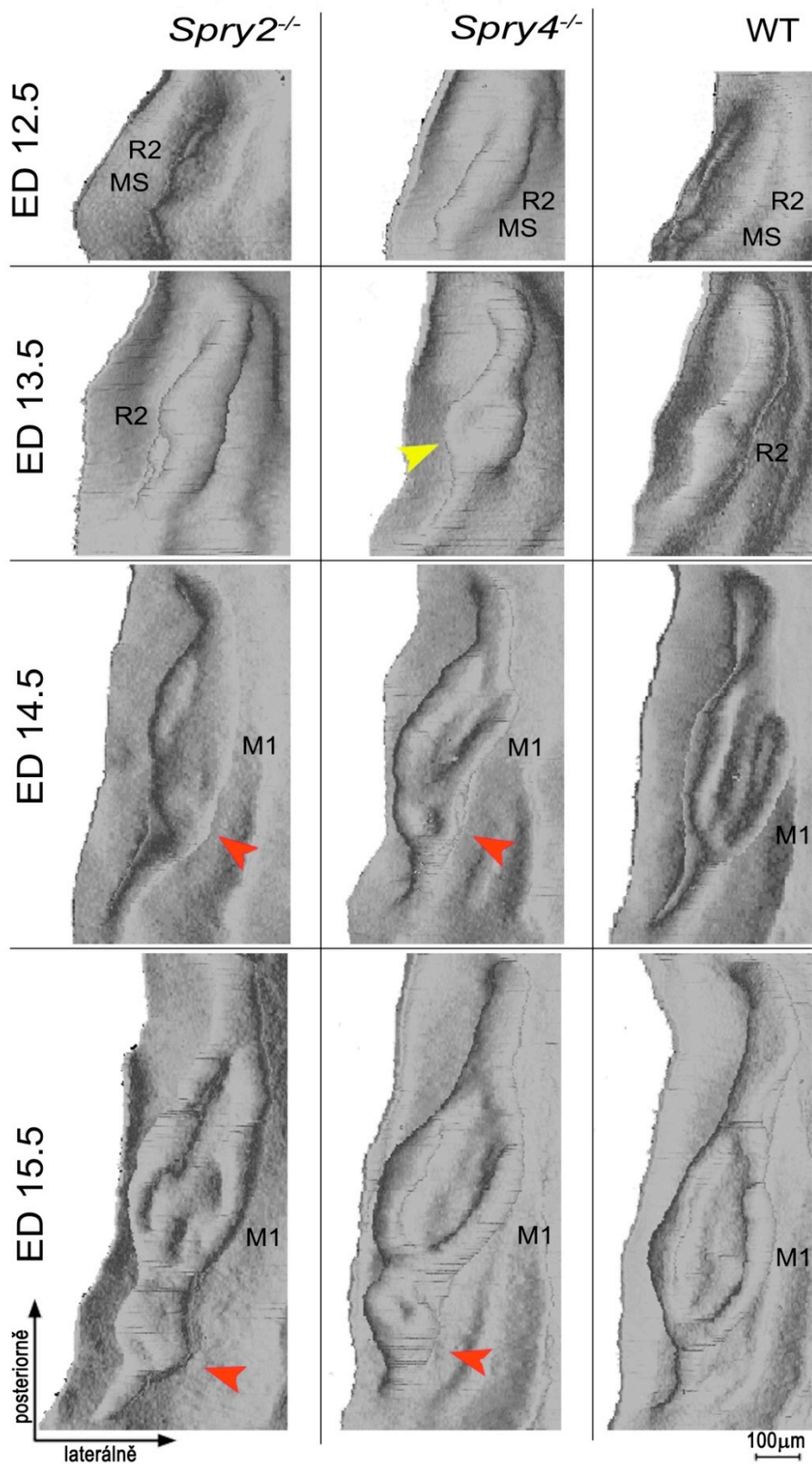
Zubní epitel u mutantních embryí *Spry4^{-/-}* vypadal v ED12,5 podobně jako u WT embrya, jen MS rudiment byl o něco výraznější. Na dalším stádiu (ED13,5) byl však zubní epitel už překvapivě mnohem rozdílnější. Zatímco u WT myši se objevuje jako první zubní pohárek prvního moláru na ED14,5, tak u *Spry4^{-/-}* embryí jsme našli již na stádiu ED13,5 místo zanikajícího MS a vystupujícího R2 pupene malý kulatý pohárek nadpočetného zubu. Tento pohárek s malým sklovinným uzlem a náznakem histodiferenciace se objevil u všech sledovaných embryí *Spry4^{-/-}* myši. Na tomto pohárku nebylo možné morfologicky rozpoznat podíl MS a R2 (Obr. 13, žlutá šipka). Směrem dozadu do ústní dutiny ležela za pohárkem úzká zubní lišta bez viditelného rozšíření do pupenu M1.

O další den později (ED14,5) byly přítomny dva oddělené pohárky na místo jednoho u WT myši. Nadpočetný pohárek ležící vpředu byl malý kulatý, pevně ohraničený, zatímco vzadu se formoval podlouhlý pohárek M1 s neuzavřenou zadní stěnou. Oproti WT embryím byl pohárek M1 opožděný ve vývinu. Přesto byly sklovinné uzly znatelné v obou pohárcích. Na stádiu ED15,5 se M1 pohárek postupně přeměňoval v zubní zvonek vytvářející základ pro sklovinný orgán funkčního zubu. Nadpočetný pohárek oddělený úzkou epiteliální lištou se zmenšoval a v některých případech (25%) zcela vymizel (Obr. 13, ED15,5 *Spry4^{-/-}*).

U druhého mutantního kmene *Spry2^{-/-}* probíhal vývoj trochu odlišně, přestože také směřoval k vytvoření nadpočetného pohárku. Na stádiu ED12,5 tvořily oba rudimentární pupeny MS a R2 výrazné vybouleniny na zubní lamině. Na stádiu ED13,5 tvořil R2 rudiment největší strukturu z celé zubní lišty. Oproti WT embryím byl MS stále rozpoznatelný a přímo nasedal na R2 z přední strany. Val zubního epitelu vzadu za R2 vykazoval mírné rozšíření naznačující pupen M1. Sklovinný uzel se nacházel pouze na vrcholu pupenu R2, v MS ani v M1 nebyl formován. I o den později (ED14,5) zůstal R2 velkou prominující strukturou s výrazným sklovinným uzlem viditelným na histologických řezech. Vzadu od R2 se začal formovat pohárek M1, ale oproti WT embryím a dokonce i *Spry4^{-/-}* embryím byl jeho vývoj velmi opožděný. Nicméně sklovinný uzel na histologických řezech byl již na tomto stádiu pohárku patrný.

Na stádiu ED15,5 se z prominujícího R2 vyvinul mělký pohárek se začínající histodiferenciací a širokou epitelovou lištou. Nadpočetný pohárek byl propojen s velkým, hlubokým pohárkem M1. Oba dva pohárky měly ve svém středu typickou strukturu sklovinného uzlu. Analýza histologických řezů znovu potvrdila opoždění ve vývoji M1 pohárku, který stále vykazoval známky časného stádia pohárku oproti pokročilé transformaci pohárku M1 do stádia zvonku u WT embryí (Obr. 13 WT, *Spry2*^{-/-}).

Morfologie raných stádií odontogeneze potvrdila rozdíly mezi jednotlivými mutanty a jejich odlišný vývoj oproti WT embryím. Hlavním rozdílem oproti WT myším byla tvorba nadpočetného zubního primordia před M1 u obou mutantních kmenů, mezi nimiž byl rozdíl v tvorbě nadpočetného zubu v načasování přeměny pupenu v pohárek. První známky morfologických odlišností se objevovaly již na stádiu ED13,5, kdy vznikl malý nadpočetný pohárek u *Spry4*^{-/-} myší namísto zmožutnění pupenu R2 a zmenšení MS, jak tomu bylo u *Spry2*^{-/-} a WT myší. Tento pohárek vznikl pravděpodobně splynutím obou rudimentárních struktur MS a R2. U *Spry2*^{-/-} se na vzniku nadpočetného zubu podílel spíše přerůstající pupen R2 a to až mezi stádii ED14,5 a 15,5, zatímco MS zanikalo.



Obr. 13: 3D rekonstrukce časných stádií zubního vývoje v tvářové oblasti u Sprouty mutant a WT myši.

Rekonstrukce zubního a přilehlého ústního epitelu. MS – mesiální segment, R2 – rudimentární pupen, M1 – pupen nebo pohárek prvního moláru, červená šipka ukazuje primordium nadpočetného zubu u mutantních embryí, žlutá šipka označuje rudimentární zubní pohárek u *Spry4^{-/-}* embryí. (Upraveno podle Lagronova-Churava et al., 2013)

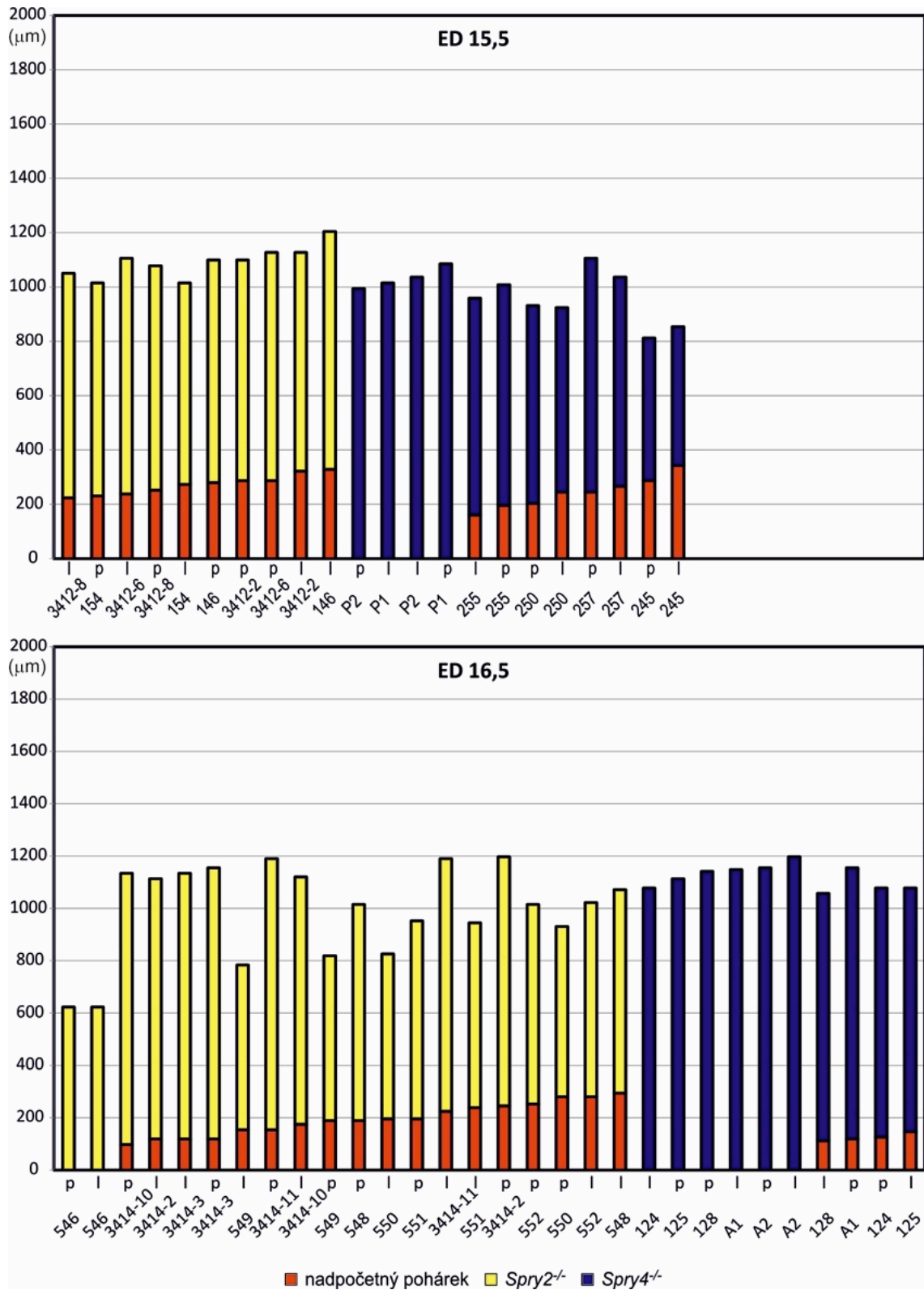
8.2.1. Frekvence nadpočetných zubů na pozdějších stádiích odontogeneze

Po analýze raných stádií odontogeneze jsme pokračovali ve sledování dalšího osudu nadpočetného zubu u mutantních myší na pozdějších stádiích prenatalního vývoje.

Na frontálních histologických řezech jsme mohli s jistotou tvrdit, že se jedná o nadpočetný zub pouze tehdy, pokud jsme našli M1 a zároveň před ním strukturu ve stádiu pohárku s dobře strukturovaným sklovinným uzlem nebo ve stádiu zvonku. Na základě těchto kritérií jsme sledovali frekvenci nadpočetných zubů od ED13,5 u *Spry4^{-/-}* a od ED15,5 u *Spry2^{-/-}* až do ED18,5. Rovněž jsme hodnotili frekvenci nadpočetného zubu ve funkční dentici na odebraných a fixovaných hlavách dospělých myší u obou mutant.

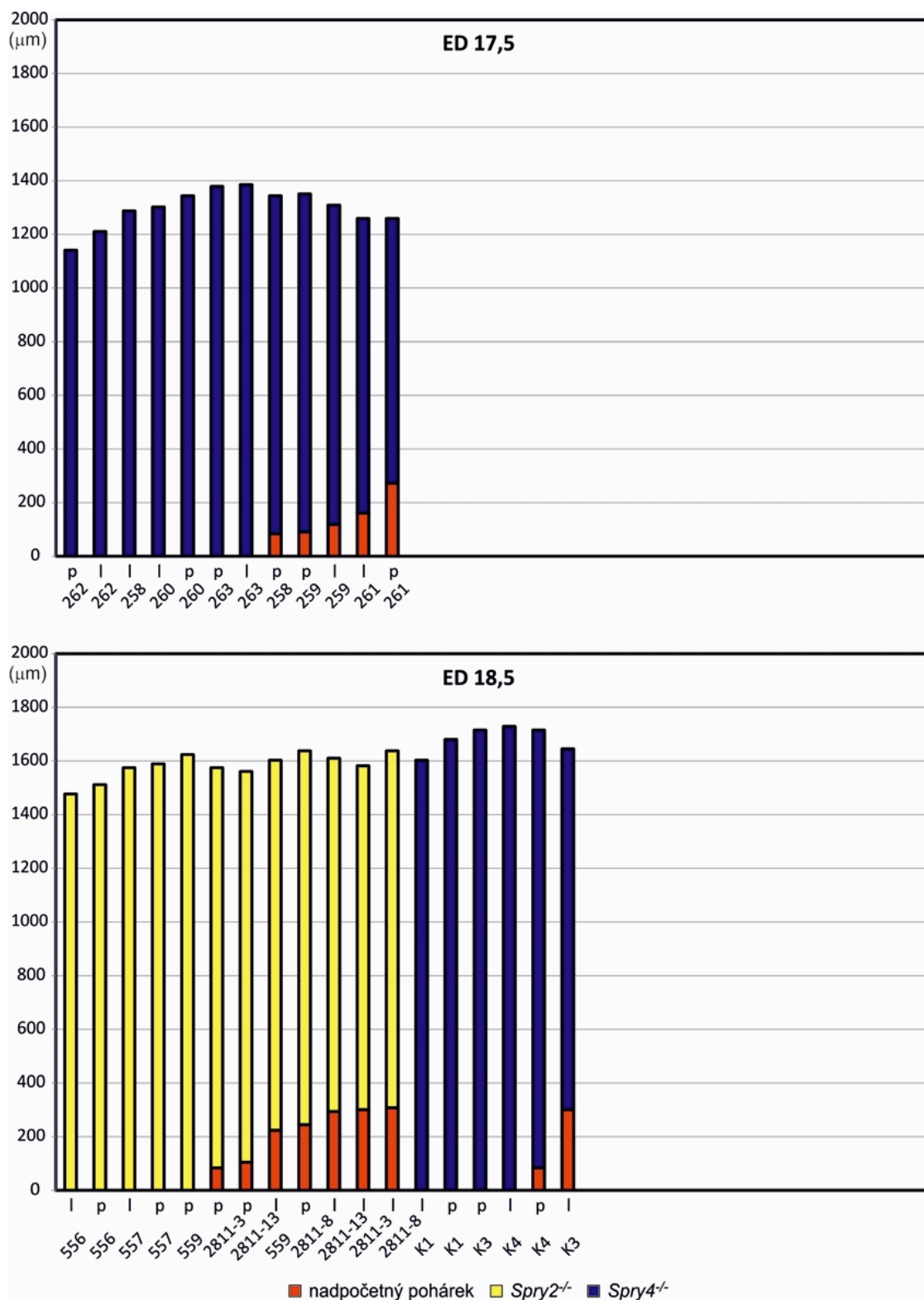
Studiem sérií histologických řezů jsme zjistili, že u *Spry* mutantních kmenů klesá frekvence výskytu nadpočetného zubu během pozdějších stádií prenatalního vývoje. U *Spry4^{-/-}* jsme zaznamenali 100% výskyt nadpočetného pohárku na stádiu ED13,5, ale už na ED14,5 byl nalezen pouze u 70% fetů. Postupně frekvence výskytu klesala až k 13% u ED18,5 (tj. těsně před narozením) a u dospělých *Spry4^{-/-}* myší jsme prořezaný nadpočetný zub našli pouze u 2% mandibulárních kvadrantů. Podobně tomu bylo u *Spry2^{-/-}* mutantních myší, kde frekvence klesala z původních 100% na stádiu ED15,5 až k 42% na stádiu ED18,5. U dospělých *Spry2^{-/-}* myší byl nadpočetný zub přítomný v 26% mandibulárních kvadrantů.

Výsledky předchozí kvalitativní studie o zanikání primordia nadpočetného zubu byly doplněny o grafické znázornění na základě měření délky zubního epitelu spolu s délkou případného nadpočetného pohárku v jednotlivých sériích histologických řezů *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}* embryí (Obr. 14 a 15). Z grafů je patrné postupné vymizení nadpočetných pohárků v průběhu prenatalního života myši. Na ED15,5 byl nadpočetný pohárek nalezen ve všech mandibulárních kvadrantech *Spry2^{-/-}* embryí a jeho velikost se pohybovala okolo 200-300 μ m; velikost zadního úseku zubního epitelu byla u všech *Spry2^{-/-}* sérií téměř shodná. *Spry4^{-/-}* embrya měla nadpočetný pohárek pouze v necelých 70% sérií.



Obr. 14: Předozadní délky zubního epitelu v tvářové oblasti mandibuly u *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}* embryí na stádiu ED15,5 a 16,5.

Celková výška sloupců značí předozadní délku zubního epitelu v μm. Červený sloupec ukazuje předozadní délku nadpočetného zubního pohárku, barva navazujícího sloupce označuje genotyp embrya podle legendy.

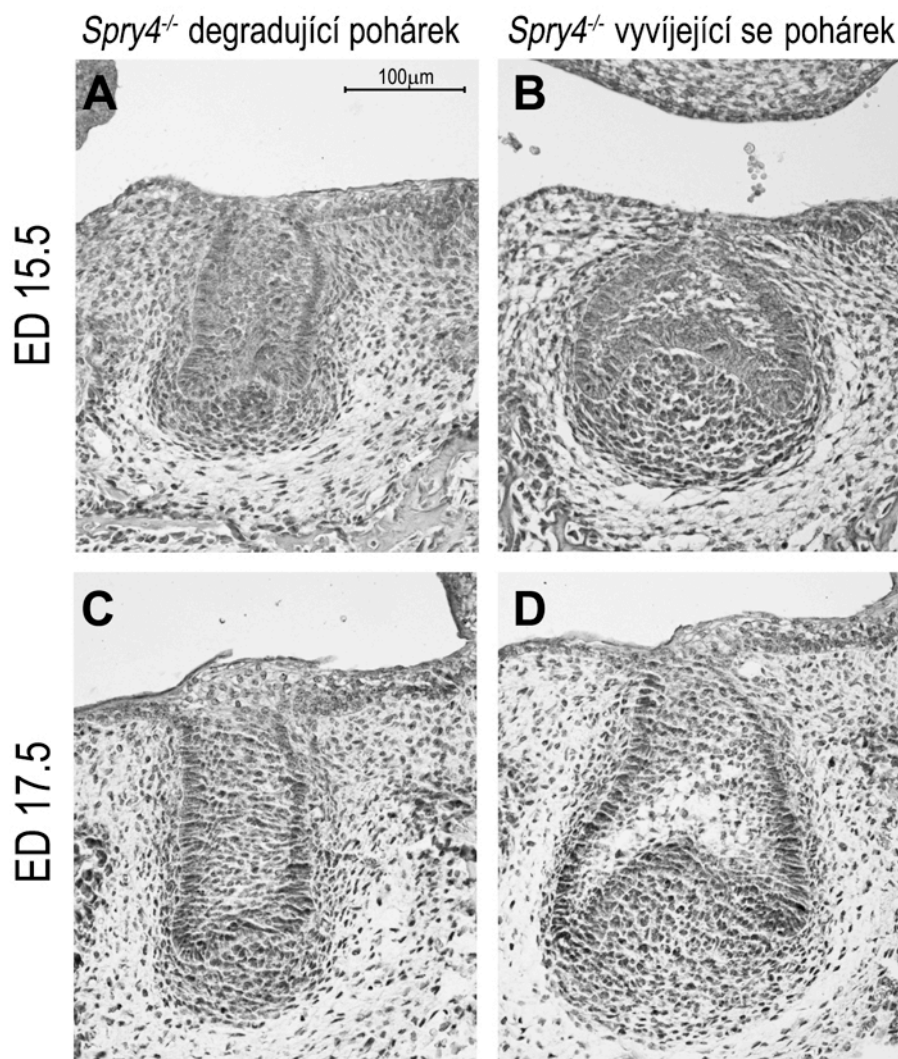


Obr. 15: Předozadní délky zubního epitelu v tvářové oblasti mandibuly u *Spry2*^{-/-} a *Spry4*^{-/-} embryí ED17,5 a 18,5.

Celková výška sloupců značí předozadní délku zubního epitelu v μm. Červený sloupec ukazuje předozadní délku nadpočetného zubního pohárku, barva navazujícího sloupce označuje genotyp embrya podle legendy.

Na ED16,5 vymizel nadpočetný zubní pohárek v některých dolních kvadrantech *Spry2^{-/-}* fétů a velikost téměř poloviny zbylých nadpočetných pohárků klesla pod 200 μ m. U *Spry4^{-/-}* embryí se vytratila další část nadpočetných pohárků, velikost zbylých nadpočetných pohárků klesla pod 200 μ m. Na ED17,5 jsme neměli k dispozici embrya *Spry2^{-/-}* myší. Vývoj zubního epitelu *Spry4^{-/-}* pokračoval stejným trendem jako o den dříve. Ubyla další část nadpočetných pohárků, pouze jeden ze zbylých nadpočetných pohárků přesahoval 200 μ m délku. Na stádiu ED18,5 u *Spry2^{-/-}* embryí došlo k další degeneraci nadpočetných pohárků. Asi 40% nadpočetných pohárků *Spry2^{-/-}* embryí si udrželo svou délku mezi 200-300 μ m, což se přibližovalo k výsledné frekvenci funkčních nadpočetných zubů u dospělých *Spry2^{-/-}* myší. Počet nadpočetných pohárků větších než je kritická velikost 200 μ m klesl na jeden ze šesti sérií u *Spry4^{-/-}* myší na ED18,5 (Obr. 14). Zajímavým nálezem bylo, že nezávisle na přítomnosti/nepřítomnosti nadpočetného zubního primordia byla celková předo-zadní délka zubního epitelu v tvářové oblasti dolních čelistních kvadrantů velmi podobná.

Všechna tato data prokázala, že nadpočetný zub se začal vyvíjet u všech jedinců *Spry2* a *4* mutantních myší, nicméně jeho růst, vývoj a histodiferenciace se mohou zastavit kdykoliv v průběhu dalšího vývoje. U přežívajících a největších nadpočetných zubních primordií jsme našli histodiferenciaci zubního epitelu ve vnitřním a vnějším zubním epitelu, mezi nimiž leží síť hvězdicovitých buněk (Obr. 16).



Obr. 16: Pohárky nadpočetného zubu u *Spry4^{-/-}* embryí.

Vlevo - pohárky, jejichž vývoj byl zastaven a podléhá degradaci. Vpravo – pohárky pokračující ve vývoji a histodiferenciaci, z nichž se pravděpodobně vyvine funkční nadpočetný zub. Měřítka značí 100µm. (Lagronova-Churava *et al.*, 2013)

8.2.2. Kvantitativní analýza zubního epitelu na histologických řezech

Pro bližší charakterizaci rudimentárních zubních primordií vzhledem k jejich účasti při vzniku nadpočetného zubu jsme sledovali buněčné procesy apoptózu a proliferaci v zubním epitelu obou rudimentů MS a R2 na kritických stádiích jejich vývoje - ED12,5 a 13,5. Výsledky jsme porovnali s proliferací a apoptózou v zubním epitelu základu M1 na ED13,5 (Obr. 9).

Velikost plochy WT zubních primordií byla na stádiu ED12,5 prakticky stejná, o den později převažovala velikost plochy R2 oproti MS a dokonce i M1 pupenu. V porovnání s nezanikajícím primordiem M1 byl apoptotický poměr (AP) zvýšený v MS

na stádiích ED12,5 a 13,5 a v R2 pouze na ED13,5. Mitotický index (MI) byl v obou rudimentech na obou ED snížený oproti hodnotám zjištěným v molárovém epitelu. Výsledky naznačují počáteční progresivní vývoj a poté zástavu růstu epitelu zubních rudimentů s pomocí zvýšené apoptózy a snížené proliferace. Vývojová zástava MS započala v ED12,5 a zástava R2 o den později v ED13,5.

U mutantních embryí jsme předpokládali revitalizační proces rudimentů MS a R2. Ověřovali jsme hypotézu, že u mutantních myší nevykazoval epitel rudimentů známky růstové zástavy (zvýšenou apoptózu a sníženou proliferaci) a mohl tak dosahovat stejných hodnot jako u progresivně se vyvíjejícího M1 primordia u WT myší.

MS rudiment u *Spry2^{-/-}* embryí měl počáteční velikost zubního epitelu na stádiu ED12,5 stejnou jako u WT embryí. Apoptotický poměr v jeho epitelu však nebyl zvýšený a proliferační index nebyl snížený tak, jak tomu bylo u WT embryí. Proto u embryí *Spry2^{-/-}* stáří ED13,5 byla velikost MS signifikantně vyšší než u WT embryí. K typickému zvýšení apoptózy a snížení proliferace došlo u MS až na ED13,5, tedy minimálně o den později než u WT myší (Obr. 17).

R2 rudiment u *Spry2^{-/-}* embryí byl na ED12,5 signifikantně menší než u WT embryí stejného stáří. Menší velikost mohla naznačovat slabou inhibici růstu, kterou vyvolávala revitalizace rudimentu MS. V R2 rudimentu však nedošlo ke zvýšení apoptózy a ke snížení proliferace ani na ED12,5 ani na ED13,5, což vysvětlovalo jeho větší velikost na stádiu ED13,5, a také jeho prominující strukturu patrnou morfologicky na 3D rekonstrukcích ED14,5 (Obr. 13).

Vývoj rudimentů u *Spry4^{-/-}* myší se lišil od *Spry2^{-/-}* i WT embryí. Hodnoty proliferačních indexů v MS a R2 na obou sledovaných stádiích byly podobné jako u kontrolních WT myší (snížená proliferace oproti rostoucímu primordiu M1). Signifikantní rozdíl však vykazoval apoptotický poměr v R2 na stádiu ED13,5 u *Spry4^{-/-}* embryí, který byl oproti kontrolním embryím signifikantně nižší (nedošlo k jeho fyziologickému zvýšení). U ostatních sledovaných stádií a rudimentů (MS na stádiích ED12,5 a 13,5, a R2 na stádiu ED12,5) byl apoptotický poměr slabě nižší oproti kontrolám. Tyto výsledky naznačují, že proces zástavy růstu nebyl tak výrazný díky slabšímu nárůstu apoptózy. Přesto jsme zaznamenali signifikantní zvětšení velikosti epitelu MS na stádiu ED12,5 a následně R2 na stádiu ED13,5. Z těchto výsledků vyplývá, že nárůst MS musel započít již před ED12,5. Předpokládáme, že díky slabšímu

potlačení růstu na ED12,5-13,5 se mohl tento rudiment podílet na vytvoření pohárku R2 na ED13,5 (Obr. 13).

Na následujících grafech (Obr. 17) jsou znázorněny hodnoty velikosti zubního epitelu, apoptotického poměru a proliferačního indexu. Hvězdičky označují všechny hodnoty, které se statisticky signifikantně ($p < 0,01$) liší. Výsledky jsou zpracovány v tabulkách 1 a 2 souhrnně, a dále pro jednotlivé série v příloze 1.

Tabulka 1: Hodnoty kvantitativní analýzy naměřené a vypočtené u embryí stáří ED12,5.

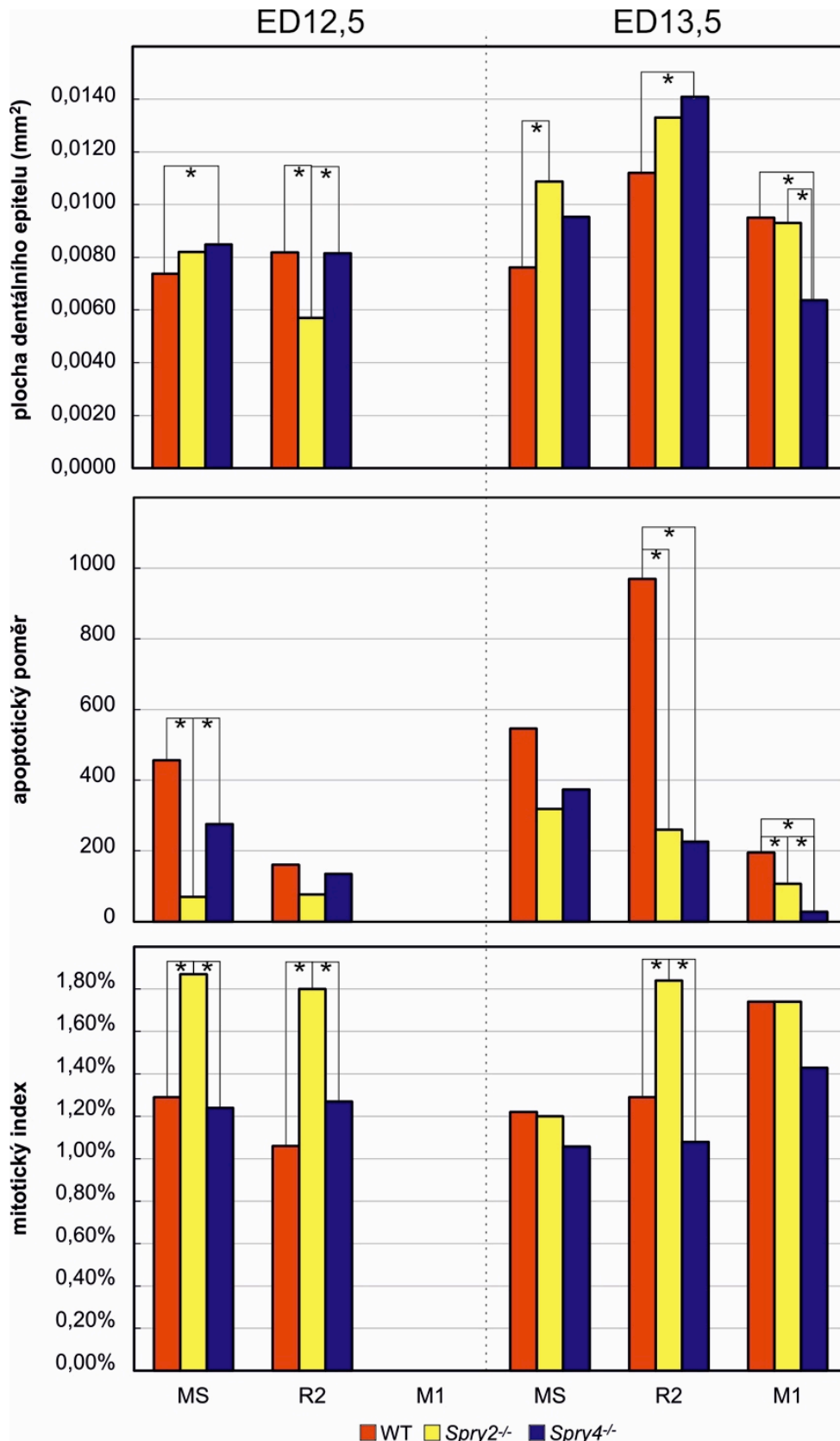
genotyp	region	počet řezů	Σ plochy DE (mm ²)	Σ počtu buněk	Σ počtu apopt. tělísek	Σ počtu mit. buněk	průměr plochy DE (mm ²) (SO)	AP (SO)	MI (SO)
WT	MS	50	0,3687	6046	78	168	0,0074 (0,001)	456 (274)	1,29% (0,54%)
WT	R2	50	0,4087	6970	74	66	0,0082 (0,0012)	161 (98)	1,06% (0,41%)
<i>Spry2^{-/-}</i>	MS	50	0,4134	6958	130	29	0,0083 (0,0009)	70 (49)	1,87% (0,54%)
<i>Spry2^{-/-}</i>	R2	50	0,2851	5236	94	22	0,0057 (0,0009)	78 (79)	1,80% (0,76%)
<i>Spry4^{-/-}</i>	MS	50	0,4244	7581	94	117	0,0085 (0,0009)	276 (222)	1,24% (0,49%)
<i>Spry4^{-/-}</i>	R2	50	0,4078	7317	93	55	0,0082 (0,0007)	135 (123)	1,27% (0,52%)

MS – mesiální segment, R2 – rudimentární pupen, DE – dentální epitel, AP – apoptotický poměr, MI – mitotický index, SO – směrodatná odchylka.

Tabulka 2: Hodnoty kvantitativní analýzy naměřené a vypočtené u embryí stáří ED13,5.

genotyp	region	počet řezů	Σ plochy DE (mm ²)	Σ počtu buněk	Σ počtu apopt. tělísek	Σ počtu mit. buněk	průměr plochy DE (mm ²) (SO)	AP (SO)	MI (SO)
WT	MS	50	0,381	6465	208	79	0,0076 (0,0012)	546 (252)	1,22% (0,33%)
WT	R2	100	1,117	18709	1084	241	0,0112 (0,0015)	970 (363)	1,29% 0,27%
WT	M1	100	0,954	15269	186	266	0,0095 (0,0009)	195 (64)	1,74% (0,35%)
<i>Spry2^{-/-}</i>	MS	30	0,330	5256	105	63	0,0110 (0,0021)	319 (133)	1,20% (0,40%)
<i>Spry2^{-/-}</i>	R2	60	0,800	13064	208	240	0,0133 (0,0019)	260 (67)	1,84% (0,28%)
<i>Spry2^{-/-}</i>	M1	60	0,559	9531	60	166	0,0093 (0,0014)	107 (41)	1,74% (0,14%)
<i>Spry4^{-/-}</i>	MS	50	0,476	7471	178	79	0,0095 (0,0033)	374 (223)	1,06% (0,52%)
<i>Spry4^{-/-}</i>	R2	100	1,409	22244	319	240	0,0141 (0,0035)	226 (100)	1,08% (0,20%)
<i>Spry4^{-/-}</i>	M1	100	0,510	7557	14	108	0,0064 (0,0035)	27 (22)	1,43% (0,62%)

MS – mesiální segment, R2 – rudimentární pupen, M1 – základ prvního moláru, DE – dentální epitel, AP – apoptotický poměr, MI – mitotický index, SO – směrodatná odchylka.



Obr. 17: Grafy kvantitativní analýzy.

Nahoře - velikost plochy zubního epitelu. Uprostřed - graf apoptotického poměru. Dole - graf mitotického indexu. Všechny hodnoty byly zpracovány zvlášť pro jednotlivé rudimenty MS a R2 a základ M1 na stádiu ED12,5 a 13,5. Hvězdičky značí statisticky signifikantní ($p < 0,01$) rozdíl dvou označených hodnot. (Upraveno podle Lagronova-Churava et al., 2013)

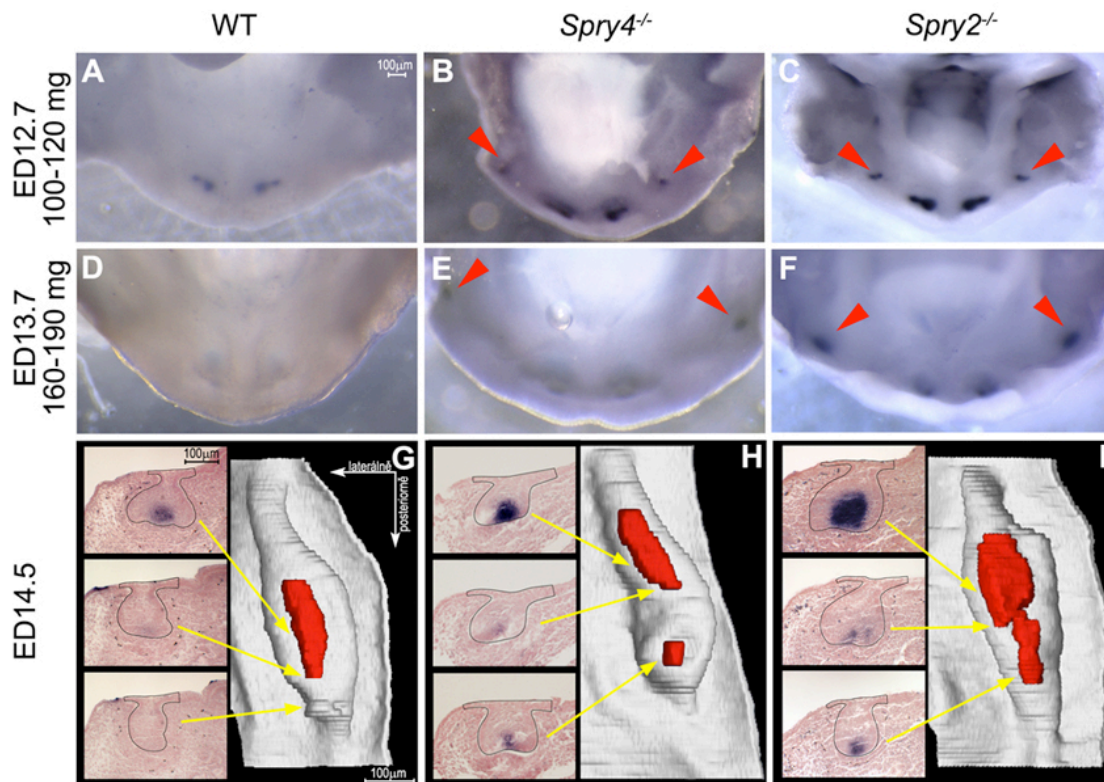
8.2.3. *Shh In situ* hybridizace celých mandibul

Experimentálně byla dokázána přítomnost *Shh* expresní domény (signálního centra) i v rudimentárních pupenech u WT myši (Prochazka et al., 2010). Výše byla popsána revitalizace a opožděná degradace rudimentárních pupenů *Spry* mutantních myši. Proto jsme porovnali časově-prostorovou dynamiku exprese *Shh* u *Spry* mutantních myši s kontrolními WT myšmi (Obr. 18).

Embrya byla odebírána v přesném časovém horizontu v rozmezí dvou hodin, přesto vykazovala široké váhové rozpětí. Je známo, že na časných stádiích vývoje tělesná hmotnost přesně koreluje s pokročilostí zubního vývoje (Peterka et al., 2002) (viz 7.1, Obr. 7). Embrya stejného stáří byla proto rozdělena do skupin podle své tělesné hmotnosti tak, že skupiny představovaly různá vývojová stádia kontinuálně na sebe navazující.

U kontrolních myši se vyskytuje vždy jedna expresní doména na dnech 12, 13 a 14, ale pouze u určitého hmotnostního rozpětí. První expresní doména leží na vrcholu MS pupenu na stádiu ED12,7 u hmotnostní kategorie 80-100mg. Druhá expresní doména odpovídá sklovinnému uzlu na vrcholu R2 na ED13,3 – 13,7 u hmotnostních kategorií 120-160mg. Třetí expresní doména leží ve středu M1 pohárku a postupně se prodlužuje směrem dopředu od ED14,3 a hmotnosti 220mg (Obr. 12). Zbylé hmotnostní kategorie, ve kterých není přítomna žádná expresní doména, se nazývají „negativní intervaly“. První negativní interval tvoří hmotnostní rozmezí 100-120mg u embryí stáří ED12,7 a druhý negativní interval hmotnostní rozmezí 160-220mg u embryí stáří 13,7 a 14,3.

Při použití stejné metody (Prochazka et al., 2010) jsme potvrdili postupné objevení všech tří expresních domén v MS, R2 a M1 u mutantních embryí stejných hmotností, v jakých se objevovaly u WT embryí. Nicméně rozdíl mezi kontrolními a mutantními embryi byl patrný především v negativních periodách. Zaznamenali jsme expresní doménu v MS i v R2 rudimentu také u mutantních embryí stejných hmotností, kde kontrolní embrya nevykazovala *Shh* expresi (negativní intervaly) (Obr. 18A-F). Navíc expresní doména v R2 rudimentu byla stále patrná u obou mutantních kmenů i u embryí o hmotnostech, kde se u kontrolních embryí vyskytovala již M1 expresní doména. Výsledkem takového expresního vzorce byly dvě domény ležící antero-posteriorně za sebou u embryí *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}* stáří ED14,5 (Obr. 18G-I).



Obr. 18: *Shh* in situ hybridizace celých mandibul

A - F: dolní čelisti WT a mutantních embryí stáří ED12,7 a 13,7 po *Shh* WISH *Shh* metodě, s viditelnými *Shh* expresními doménami (tmavě modře) v incisorové i tvářové oblasti. G - I: 3D rekonstrukce zubního a přilehlého ústního epitelu tvářové oblasti WT a mutantních embryí stáří ED14,5 s vizualizovanými *Shh* expresními doménami a přiřazenými příklady histologických řezů, z nichž byla rekonstrukce vytvořena. Červený trojúhelník ukazuje na expresní doménu v tvářové oblasti, žlutá šipka – ukazuje na místo 3D rekonstrukce, ve kterém leží daný histologický řez, červená oblast 3D rekonstrukce zobrazuje *Shh* expresní doménu, která je na histologických řezech patrná jako tmavě modrá oblast. (Lagronova-Churava et al. 2013)

Obr. 18H a I také naznačuje rozdíl nejen ve velikosti expresních domén, ale také v morfologii rudimentů u dvou rozdílných mutantních genotypů. U *Spry4^{-/-}* embryí stáří ED14,5 vznikl nadpočetný pohárek následovaný pohárkem M1 mírně opožděným ve vývoji. V obou základech zubů se objevila *Shh* expresní doména. Obě domény byly od sebe výrazně prostorově oddělené. U *Spry2^{-/-}* embryí sice také vznikal nadpočetný zub, ale na ED14,5 byl viditelný pouze velmi prominující R2 pupen vpředu od M1 pohárku (Obr. 13). I v tomto případě, kdy ještě nedošlo k úplnému oddělení nadpočetného zubu, se objevily dvě *Shh* expresní domény, které se ale téměř propojily (Obr. 18).

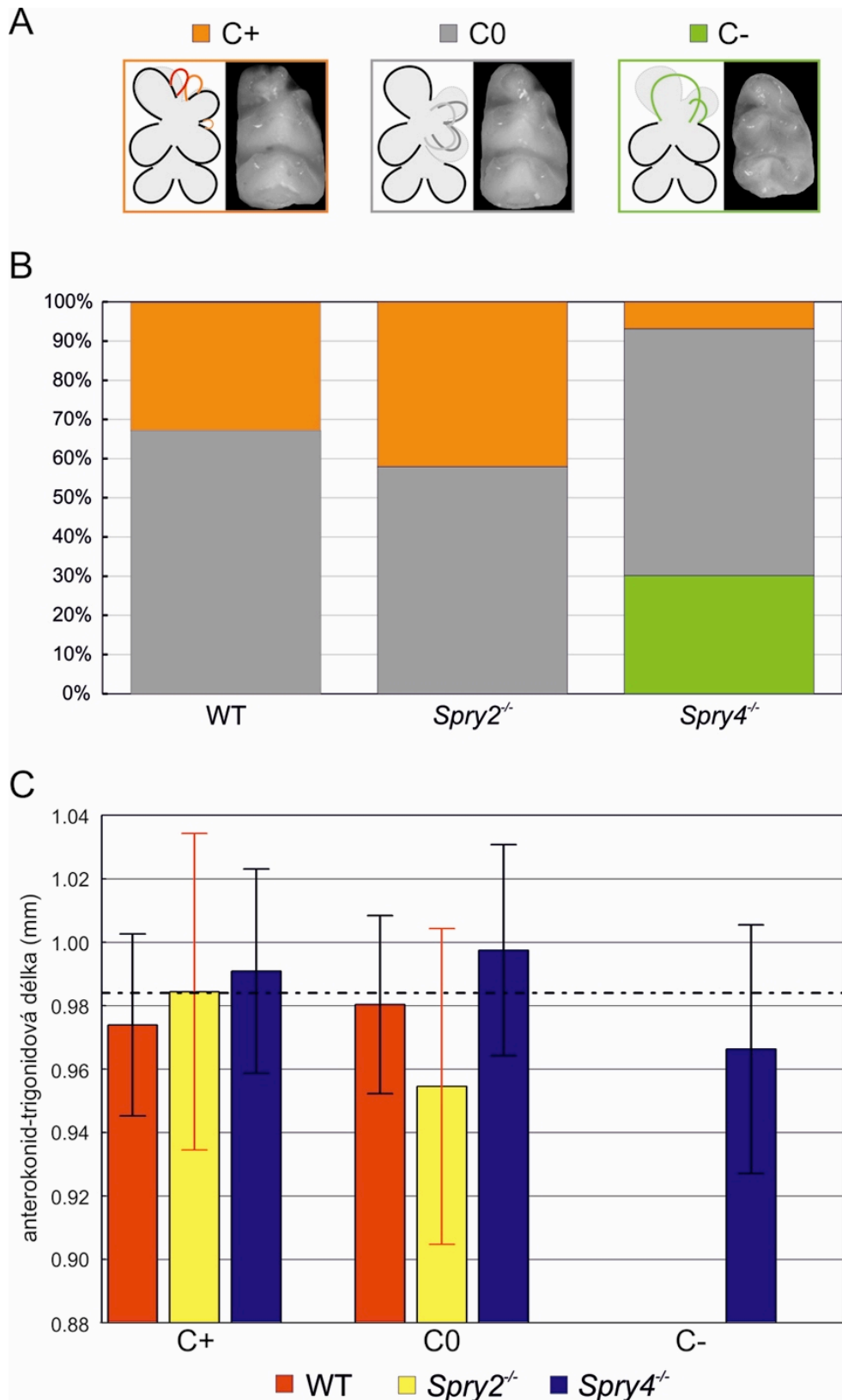
Prodloužené *Shh* exprese v MS a R2 rudimentech u obou *Spry* mutantních myší podporují hypotézu o revitalizaci rudimentů a jejich účasti při vzniku nadpočetného zubu.

8.2.4. Funkční dentice u dospělých *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}* myší

Předpokládá se, že existuje nepřímá závislost mezi stupněm vývoje nadpočetného zubu a velikostí a komplexitou přední části M1 (anterokonid) u myších mutantů. Taková závislost by tedy odrážela stupeň autonomního vývoje rudimentárního základu dentice v předmolárové oblasti či jeho inkorporace do M1 (Peterkova, 1983; Peterkova et al., 2002a). Vliv vývoje nadpočetného zubu na fenotyp molárů jsme studovali na dospělé dentici *Spry* mutantních myší.

Dospělé myši *Spry2^{-/-}* měly přítomný nadpočetný zub pouze v 27% mandibulárních kvadrantů a u myší *Spry4^{-/-}* se nadpočetný zub vyvinul dokonce jen v 2% sledovaných mandibulárních kvadrantů. Nicméně navzdory takto nízké frekvenci výskytu funkčního nadpočetného zubu, výsledky výše uvedené vývojové studie dokumentovaly, že nadpočetný zub ležící před M1 se na počátku začal vyvíjet ve 100% mandibulárních kvadrantů *Spry* mutantních embryí. Přestože většina z těchto primordií nadpočetného zubu je ve vývoji zastavena a nedává vznik funkčnímu nadpočetnému zubu, zajímal nás důsledek jejich dočasného vývoje na velikost a morfologii přední části (anterokonidu) přilehlého funkčního zubu (M1) a na předozadní délku celé molárové řady u mutantních myší, které neměly funkční nadpočetný zub.

Pro naše morfologické sledování jsme vytvořili tři skupiny morfotypů anterokonid-trigonidové oblasti funkčního M1 pojmenované C0, C+ a C-. C0 odpovídalo základnímu rozestavení hrbolků podle Gaunta (1955); C+ značilo, že se objevil hrbolk navíc a C- znamenalo, že jeden nebo více hrbolků chybělo (Obr. 19). Sledovali jsme jednotlivé čelistní kvadranty mutantních i kontrolních myší bez nadpočetného zubu. Nadpoloviční většina prvních molárů mutantních i kontrolních myší vykazovala morfotyp C0. Zbytek WT (32,9%) a *Spry2^{-/-}* (42,1%) myších M1 patřilo do morfotypu C+. U *Spry4^{-/-}* myší byla situace odlišná: většina (62,9%) M1 vykazovala rovněž morfotyp C0, ale pouze 6,9% M1 patřila k morfotypu C+. Téměř třetina (30,2%) prvních molárů *Spry4^{-/-}* myší se však řadila ke skupině C-, která se u WT ani *Spry2^{-/-}* nevyskytovala (Obr. 19 A, B).



Obr. 19: Hrbolkové vzory dolního M1 a jejich výskyt ve WT a mutantní funkční dentici.
 A – ukázka uspořádání hrbolků podle stupně jejich komplexity (skupiny C+, C0, C-) v oblasti trigonidu M1. B – graf frekvence výskytu různých skupin komplexity u *Spry* mutantních a WT myši. C – graf anterokonid-trigonidové délky M1 u *Spry* mutantních a WT myši v rámci jednotlivých skupin komplexity. (Upraveno podle Lagronova-Churava et al., 2013)

Morfometrická analýza M1 u dospělých myší nám přinesla další překvapivé výsledky. V rámci C0 skupiny byly proměřeny anterokonid-trigonidové oblasti, které se ukázaly signifikantně delší ($p=0,041$) u *Spry4^{-/-}* myší a signifikantně kratší ($p=0,023$) u *Spry2^{-/-}* myší oproti myším kontrolním. V souladu s redukcí hrbolků anterokonidu u *Spry4^{-/-}* myší, M1 s morfotypem C- měly signifikantně kratší ($p<0,001$) anterokonid-trigonid než *Spry4^{-/-}* myší s morfotypem C0 (Obr. 19).

Další morfometrické výsledky prokázaly zkrácení celé molárové zubní řady u *Spry* mutantních myší (*Spry2^{-/-}* $p<0,001$; *Spry4^{-/-}* $p<0,001$) a zkrácení celé délky M1 (*Spry2^{-/-}* $p=0,001$; *Spry4^{-/-}* $p<0,001$), které bylo způsobeno především zkrácením talonidové části (*Spry2^{-/-}* $p=0,004$; *Spry4^{-/-}* $p<0,001$). Pro doložení správné interpretace zkrácení M1 a celé zubní řady byla naměřena také kondylobazální délka, abychom se ujistili, že nedošlo ke zkrácení celé čelisti a tudíž relativní délka zubní řady vzhledem k čelisti by byla stejná u mutant jako u kontrolních myší. Kondylobazální délka naopak prokázala signifikantní prodloužení u mutantních myší (*Spry2^{-/-}* $p=0,016$; *Spry4^{-/-}* $p<0,001$) oproti WT myším.

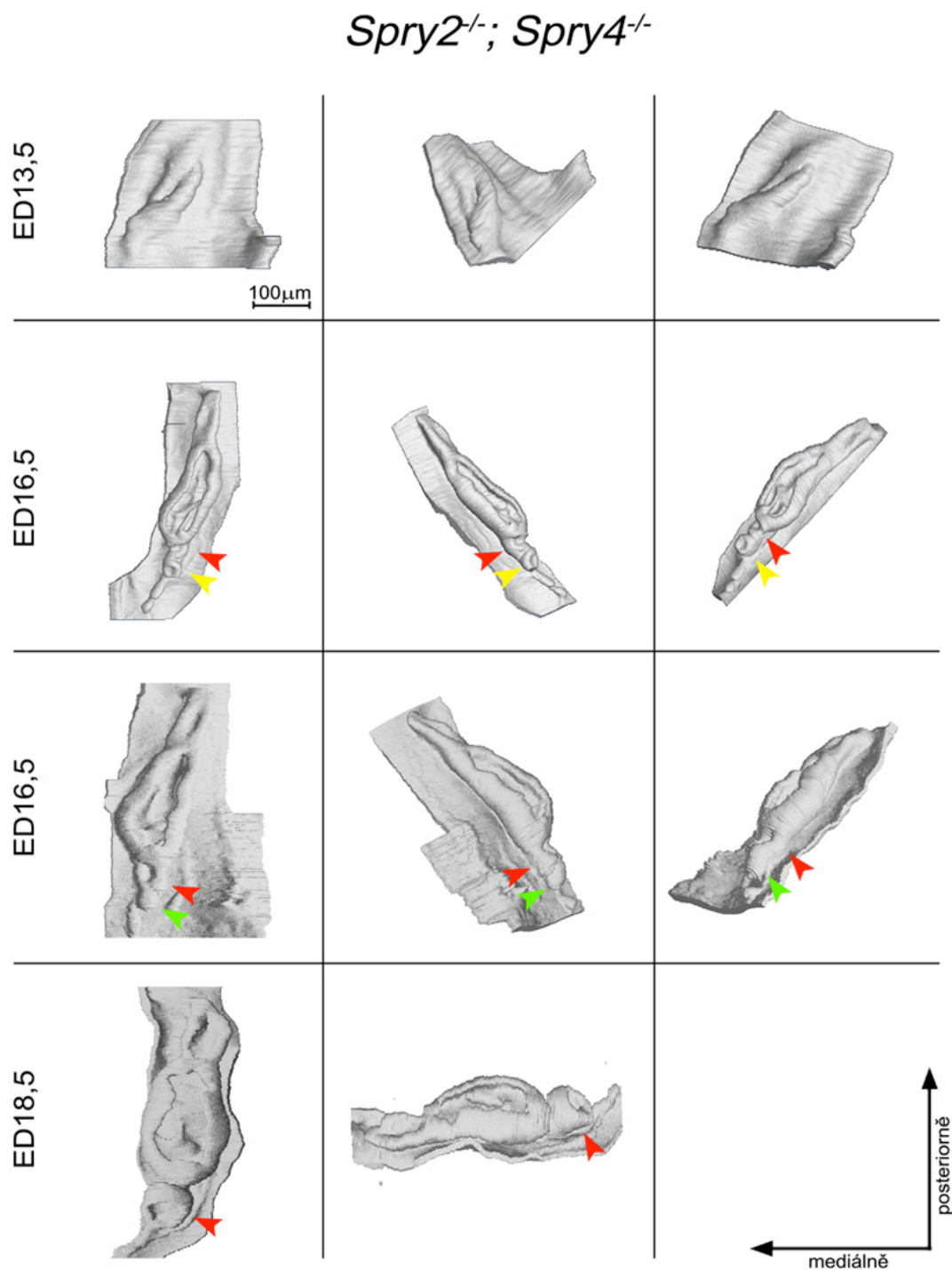
Výsledky prokázaly, že vyvíjející se nadpočetný zub měl určitý dopad na velikost a morfologii molárů v dospělé myší dentici.

8.3. Vývoj nadpočetného tvářového zubu u *Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}* myší

Stejnou studii nadpočetného tvářového zubu jsme započali i u dalších myších mutant, které jsou geneticky modifikované v obou sledovaných *Spry2* i *4* genech s různým rozložením mutantních a kontrolních alel. Hlavním cílem bylo prostudovat rozdíly vývoje nadpočetného zubu u dvojitých knock-out *Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}* myší, které jsou ale často potráceny během prenatalního vývoje, nebo umírají perinatálně. Proto nebylo možné sestavit dostatečně velký soubor dospělých myších hlav myší se 4 chybějícími *Spry* alelami (*Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}*), které by sloužily ke srovnání s výsledky prenatalní studie u tohoto genotypu.

Nejdříve jsme provedli longitudinální morfologické sledování časného zubního vývoje spolu s vytvořením 3D rekonstrukcí vyvíjející se dentice v tvářové oblasti myší *Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}* (Obr. 20). Morfologicky se vývoj takto mutovaných embryí nejvíce podobal vývoji *Spry4^{-/-}* embryí, kde se na stádiu ED13,5 objevil pohárek namísto pupenů

MS a R2. U *Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}* embryí se ve všech sledovaných mandibulárních kvadrantech objevil pohárek nadpočetného zubu od ED13,5 až po ED18,5.



Obr. 20: 3D rekonstrukce vyvíjející se dentice v tvářové oblasti mandibuly u *Spry2^{-/-}; Spry4^{-/-}* myši.

3D rekonstrukce dentálního a přilehlého orálního epitelu u myši *Spry2^{-/-}; Spry4^{-/-}* v různých stádiích vývoje s vyznačenými primordií nadpočetných zubů. Červená šipka ukazuje zadní nadpočetný zub, žlutá šipka ukazuje přední nadpočetný zub, zelená šipka ukazuje rudiment předního nadpočetného zubu na stádiu pupene.

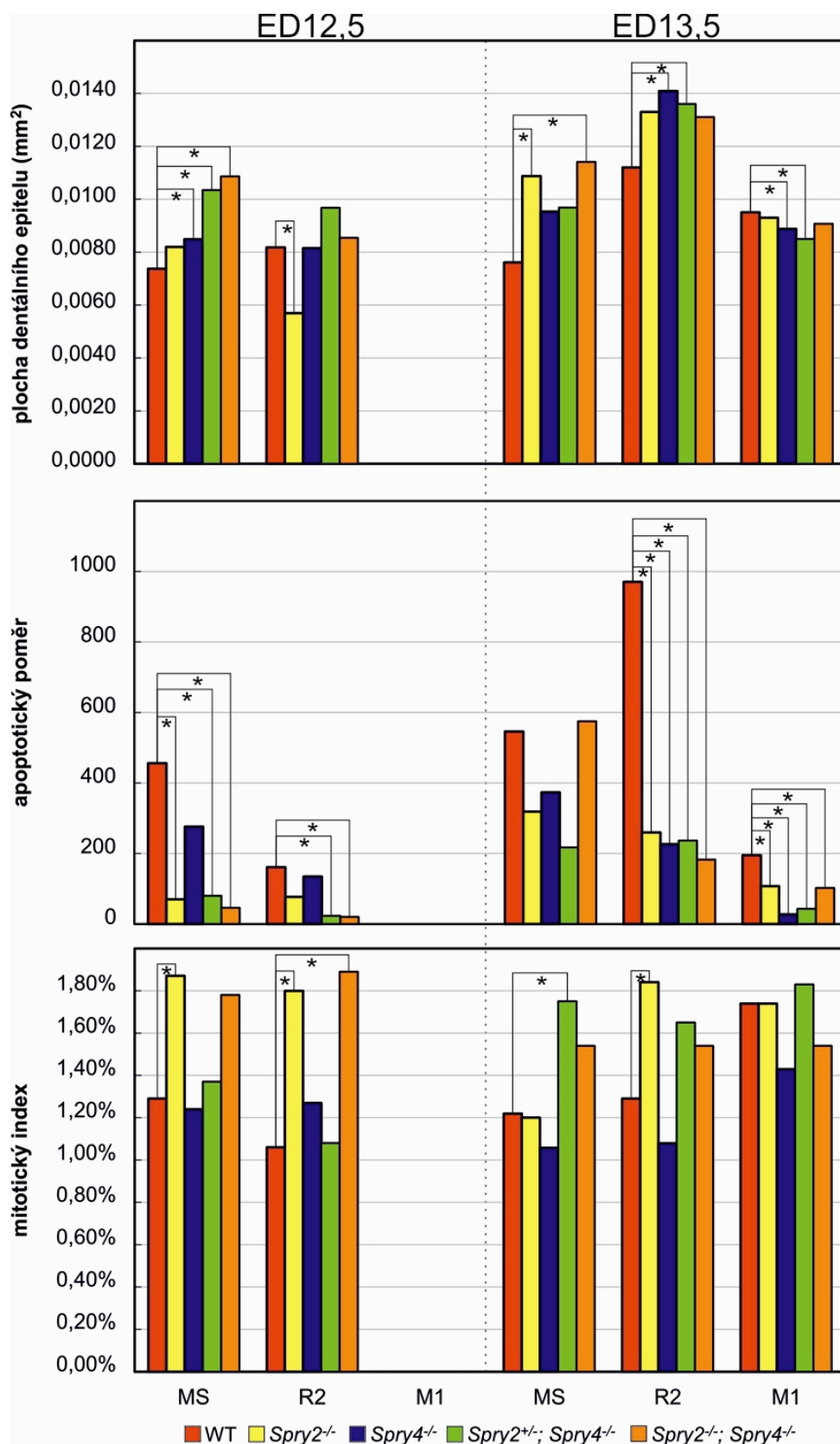
Kromě nadpočetného zubu byla na 3D rekonstrukcích patrná i prodloužená epitelová lišta s mírně prominujícím pupenem, která naznačovala vývoj další struktury vpředu od nadpočetného zubu a M1. Na stádiu ED16,5 se v přední oblasti před nadpočetným zubem objevil další pohárek patřící druhému nadpočetnému zubu (Obr. 20 - žlutá šipka). Druhý nadpočetný pohárek byl na dalších stádiích degradován na pupenovitou strukturu bez výrazné papily, která se podobala degenerovaným nadpočetným zubním primordiím u části embryí *Spry4^{-/-}* (Obr. 16 A, C).

Na časných stádiích jsme u jednotlivých mutovaných embryí sledovali i morfometrické parametry velikosti zubního epitelu, apoptotický poměr a mitotický index. Pro lepší představu o vývoji ovlivněném absencí genů *Spry2* a *4* jsme stejnou metodu použili i u myši se třemi postiženými alelami *Spry* genů (*Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}*). V dalším textu jsou myši se 3 nebo 4 chybějícími alelami označovány jako DKO (double knock-out).

Z hlediska velikosti plochy výsledky ukázaly přerostlé rudimentární základy MS (ED12,5 i 13,5) a R2 (ED13,5) u *Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}* embryí a R2 na stádiu ED13,5 u *Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}* podobně, jak se to projevilo u *Spry4^{-/-}* embryí. Žádný signifikantní rozdíl nebyl nalezen ve velikosti plochy zubního epitelu mezi DKO mutantními embryi a WT embryi v R2 na stádiu ED12,5.

Apoptotický poměr byl stabilně u obou DKO mutantních embryí signifikantně ($p < 0,001$) snížen oproti kontrolním hodnotám WT myši. Opět byla nalezena jediná výjimka v MS v ED13,5, kde se objevilo pouze nesignifikantní snížení apoptózy.

Mitotický index přinesl zajímavé výsledky. Na stádiu vývoje ED12,5 byl mitotický index signifikantně ($p < 0,001$) zvýšen u *Spry2^{-/-}* embryí v obou rudimentárních strukturách MS a R2, zatímco *Spry4^{-/-}* embrya nevykazovala žádné signifikantní změny oproti hodnotám kontrolních embryí. DKO mutantí ve všech čtyřech alelách *Spry2* a *4* genů se chovali stejně jako *Spry2^{-/-}* embrya, tudíž jejich mitotický index byl signifikantně ($p < 0,001$) zvýšen jak v MS tak v R2 rudimentech. DKO embrya s jednou chybějící alelou *Spry2* a se dvěma chybějícími alelami *Spry4* tedy *Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}*, se v případě mitotického indexu chovala stejně jako *Spry4^{-/-}* embrya a nedošlo u nich k signifikantnímu rozdílu v mitotickém indexu ani v MS ani v R2 rudimentu.



Obr. 21: Grafy kvantitativní analýzy.

Nahoře - velikost plochy zubního epitelu. Uprostřed - graf apoptotického poměru. Dole - graf mitotického indexu. Všechny hodnoty byly zpracovány zvlášť pro jednotlivé rudimenty MS a R2 a základ M1 na stádiu ED12,5 a 13,5. Hvězdičky značí statisticky signifikantní rozdíl dvou označených hodnot ($p < 0,01$).

O den později (na ED13,5) byl mitotický index u obou *Spry* DKO mutantních skupin embryí vyšší (signifikantně pouze u *Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}*) než u kontrolní skupiny v rudimentu MS i R2. To napovídalo o výrazném nástupu mitotické aktivity u *Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}* embryí v obou rudimentárních základech.

Hodnoty, které se staly podkladem ke grafům, byly přehledně zpracovány v Tabulka 3 a Tabulka 4. Podrobnější výsledky celé kvantitativní studie jsou uspořádány v příloze 2.

Tabulka 3: Hodnoty kvantitativní analýzy naměřené a vypočtené u DKO embryí stáří ED12,5.

genotyp	region	počet řezů	Σ plochy DE (mm ²)	Σ počtu buněk	Σ počtu apopt. tělísek	Σ počtu mit. buněk	průměr plochy DE (mm ²) (SO)	AP (SO)	MI (SO)
<i>Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}</i>	MS	40	0,414	5772	33	79	0,0103 (0,0008)	80 (66)	1,37% (0,42%)
<i>Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}</i>	R2	40	0,387	5664	9	61	0,0097 (0,0008)	23 (28)	1,08% (0,45%)
<i>Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}</i>	MS	30	0,326	5160	15	92	0,0109 (0,0013)	46 (35)	1,78% (0,30%)
<i>Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}</i>	R2	30	0,256	4225	5	80	0,0085 (0,0013)	20 (19)	1,89% (0,46%)

MS – mesiální segment, R2 – rudimentární pupen, DE – dentální epitel, AP – apoptotický poměr, MI – mitotický index, SO – směrodatná odchylka.

Tabulka 4: Hodnoty kvantitativní analýzy naměřené a vypočtené u DKO embryí stáří ED13,5.

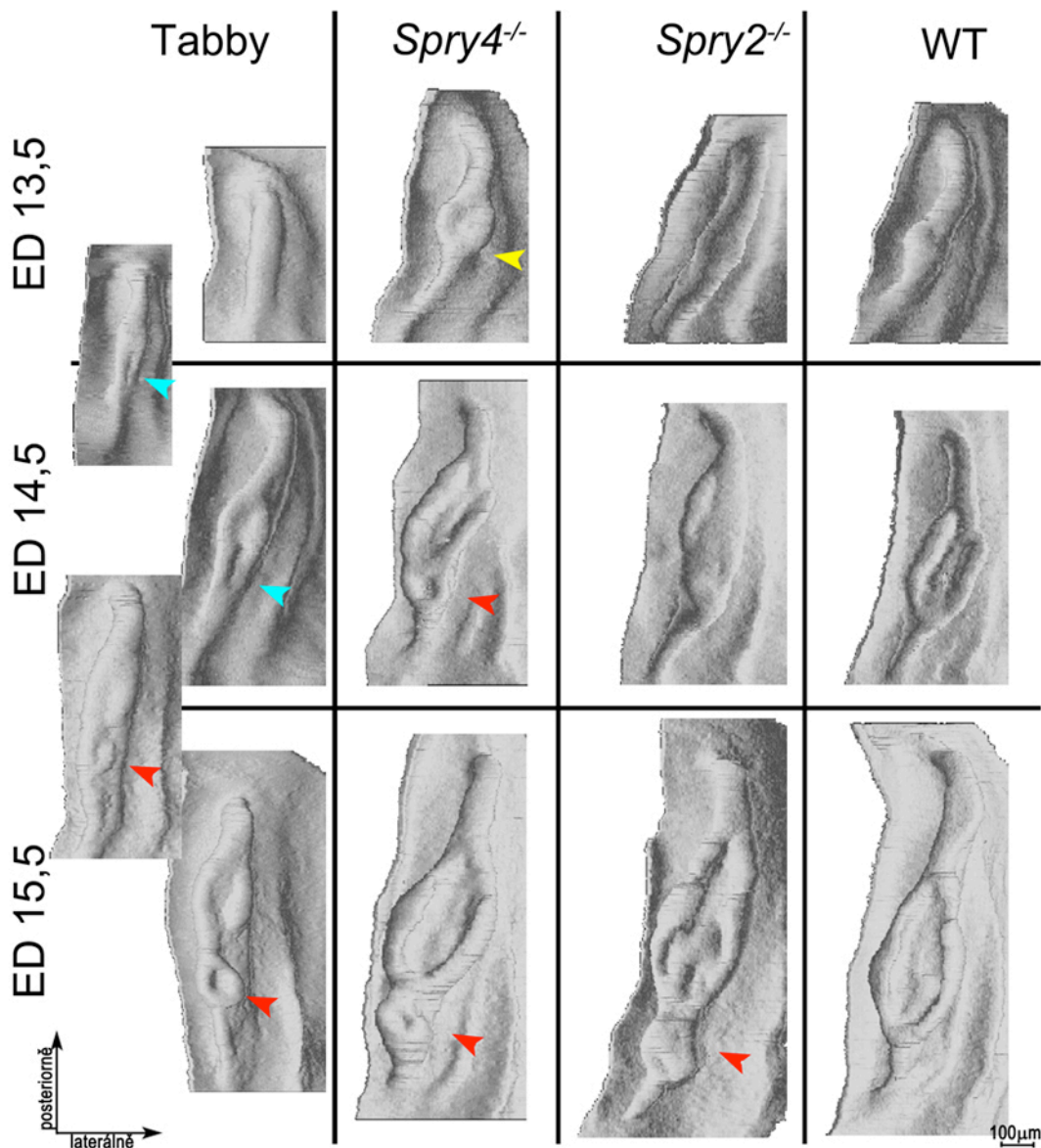
genotyp	region	počet řezů	Σ plochy DE (mm ²)	Σ počtu buněk	Σ počtu apopt. tělísek	Σ počtu mit. buněk	průměr plochy DE (mm ²) (SO)	AP (SO)	MI (SO)
<i>Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}</i>	MS	30	0,291	4336	63	76	0,0097 (0,0012)	217 (63)	1,75% (0,40%)
<i>Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}</i>	R2	60	0,816	11590	193	191	0,0136 (0,0012)	237 (100)	1,65% (0,24%)
<i>Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}</i>	M1	60	0,510	6849	22	125	0,0085 (0,0008)	43 (18)	1,83% (0,32%)
<i>Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}</i>	MS	30	0,343	5392	147	79	0,0114 (0,0013)	429 (328)	1,47% (0,34%)
<i>Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}</i>	R2	60	0,787	12941	125	174	0,0131 (0,0013)	159 (132)	1,34% (0,39%)
<i>Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}</i>	M1	60	0,544	9247	40	135	0,0091 (0,0015)	73 (56)	1,46% (0,23%)

MS – mesiální segment, R2 – rudimentární pupen, M1 – základ prvního moláru, DE – dentální epitel, AP – apoptotický poměr, MI – mitotický index, SO – směrodatná odchylka.

8.4. Porovnání vývoje rudimentárních základů zubů u *Spry* a Tabby myši

Základním popisem časného vývoje zubů u myši Tabby (*Eda^{-/-}*) jsem se zabývala ve své diplomové práci. Dospělá dentice Tabby myši má pět různých morfotypů velikosti a tvaru tvářových zubů v jednom kvadrantu mandibuly. Dvě základní zastřešující skupiny těchto morfotypů se liší počtem zubů v tvářové oblasti. U morfotypu I se

vyskytují tři zuby v tvářové oblasti, přičemž podle velikosti prvního tvářového zubu se rozlišuje morfotyp Ia, Ib, Ic. U morfotypu II se vyskytují pouze dva tvářové zuby a opět podle velikosti prvního z nich se rozlišuje morfotyp IIa a IIb (Kristenova et al., 2002; Kristenova-Cermakova et al., 2002; Peterkova et al., 2002a). Z výsledků mé diplomové práce vyplývá, že tyto morfotypy jsou na časných vývojových stádiích rozeznatelné již od stádia ED15.0.



Obr. 22: Porovnání morfologického vývoje zubů Tabby myši se *Spry2^{-/-}*, *Spry4^{-/-}* a WT myši.

3D rekonstrukce zubního epitelu v oblasti dolní tvářové dentice a přilehlého orálního epitelu. Vlevo – Tabby zárodky stáří ED13,5 – 15,5. Nejstarší zárodek vykazuje morfotyp dentice Ic, kde je patrný nadpočetný zub. 3D rekonstrukce vloženy na úroveň na černou čáru odpovídají mezistádiím (ED14,0 a 15,0). V dalších sloupcích je porovnání vývoje nadpočetného zubu u Sprouty mutant a vývoje dentice u kontrolních myši. Červená šipka označuje nadpočetný zub, žlutá šipka ukazuje nadpočetný zubní pohárek, modrá šipka označuje místo, kde se vyskytují dvě epitelové lišty místo R2 rudimentu.

Při porovnání vývoje tvářových zubů u Tabby a Spry myších mutant jsme se potýkali s několika komplikacemi. Především hmotnost Tabby embryí přesně neodpovídala hmotnostem WT a *Spry* mutantních embryí stejného stáří, tedy stejného ED. Tohoto fenoménu už si povšimli autoři dřívějších prací a ke studiu odchylek zubního vývoje Tabby myši využívali místo kontrolních CD1 myši příslušné WT-Tabby (*Eda*^{+/+}) kontroly (Cermakova et al., 1998).

Cílem této disertační práce bylo porovnat vývoj nadpočetného zubu u Tabby myši s vývojem nadpočetného zubu u *Spry2* nebo *4* mutantních myši. Pro srovnání jsme použili embrya stejného stáří, ale přihlíželi jsme k jejich hmotnostem. Tabby myši se ukázaly hmotnostně a tudíž i vývojově přibližně o 0,5 – 1 den opožděné. Porovnání morfologie na jednotlivých stádiích je vidět na Obr. 22. Hmotnosti jednotlivých embryí, u nichž se prováděly 3D rekonstrukce zubního epitelu v tvářové oblasti, byly zaznamenány v tabulce 5.

Tabulka 5: Hmotnost myších zárodků, jejichž histologické řezy byly použity k vytvoření 3D rekonstrukce.

ED	Tabby (<i>Eda</i> ^{-/-})	<i>Spry4</i> ^{-/-}	<i>Spry2</i> ^{-/-}	WT
13,5	116 mg	160 mg	182 mg	167 mg
14,0	164 mg	-	-	-
14,5	216 mg	314 mg	359 mg	304 mg
15,0	284 mg	-	-	-
15,5	312 mg	520 mg	549 mg	511 mg

ED – embryonální den.

Na ED13,5 se u Tabby embryí neobjevil žádný výrazný R2 rudiment tak, jako tomu bylo u stejně starých WT a *Spry* mutantních embryí. MS rudiment, který dominuje na váhově podobném stádiu ED12,5 u WT a *Spry* mutantních embryí, byl patrný v přední tvářové oblasti zubního epitelu. U Tabby embryí na stádiu ED14,0, které hmotnostně odpovídá stádiu ED13,5 u WT a *Spry* mutantních embryí, byla část zubního epitelu ležící vzadu od MS rozpadlá ve dvě lišty. Zadní část zubního epitelu byla oploštělá a buko-linguálně rozšířená. Ani na tomto stádiu nebyl patrný vyvyšující se pupen R2 rudimentu. Na ED14,5 se již objevil pohárek v zadní části zubního epitelu u Tabby embryí. Přítomnost pohárku by odpovídala M1 u stejně starých embryí WT, avšak jeho tvar se od kontroly velmi lišil. Pohárek Tabby myši byl kulatý, vzadu uzavřený a vpředu navazující na dvě epitelové lišty v místě R2 rudimentu. Pohárek WT myši byl oproti tomu oválný,

uzavřený z přední strany, kde přední stěna byla tvořena inkorporovaným R2 rudimentem, zatímco vzadu zůstal otevřený, připravený k dalšímu prodlužování při tvorbě zadní části M1 (talonidu). *Spry* mutantní myši stejného stáří, ale vyšších hmotností už vykazovaly vývoj nadpočetného pohárku společně s vzadu navazujícím pohárkem dalšího zubu, který se výrazně podobal vyvíjejícímu se M1 u WT myši, ale byl mírně vývojově opožděn.

Rozdíl mezi *Spry4^{-/-}* a *Spry2^{-/-}* byl patrný u nadpočetného pohárku. Zatímco pohárek *Spry4^{-/-}* myši se vyznačoval hlubokou prohlubní vyplněnou mesenchymovou papilou a byl zřetelně oddělený od M1, u *Spry2^{-/-}* myši se dal vývoj nadpočetného pohárku detekovat díky překypujícímu R2 rudimentu přerůstajícím přes papilu M1. O oddělení nadpočetného zubu od M1 se na tomto stádiu u *Spry2^{-/-}* myši ještě nedalo mluvit.

Ve srovnání se *Spry* mutantami bylo možné u Tabby mutant rozlišit několik morfotypů dentice na stádiu ED15,0 a 15,5. Nadpočetný zub byl nejvýrazněji viditelný u morfotypu Ic, který se v dospělosti vyznačoval velmi malým vpředu postaveným tzv. nadpočetným zubem následovaným druhým tvářovým zubem větší velikosti. Stejně uspořádání bylo patrné již v prenatálním vývoji v ED15,0 a 15,5. V zubním epitelu jsme našli dva zubní pohárky, menší kulatý vpředu a větší oválný vzadu. Pohárky byly zřetelně oddělené tenkou epitelovou lištou ležící na linguální straně. Zajímavostí je, že větší pohárek měl stále otevřenou přední stěnu a téměř uzavřenou zadní stěnu. Tento fenomén se neobjevil ani u jedné ze *Spry* mutant (Obr. 22).

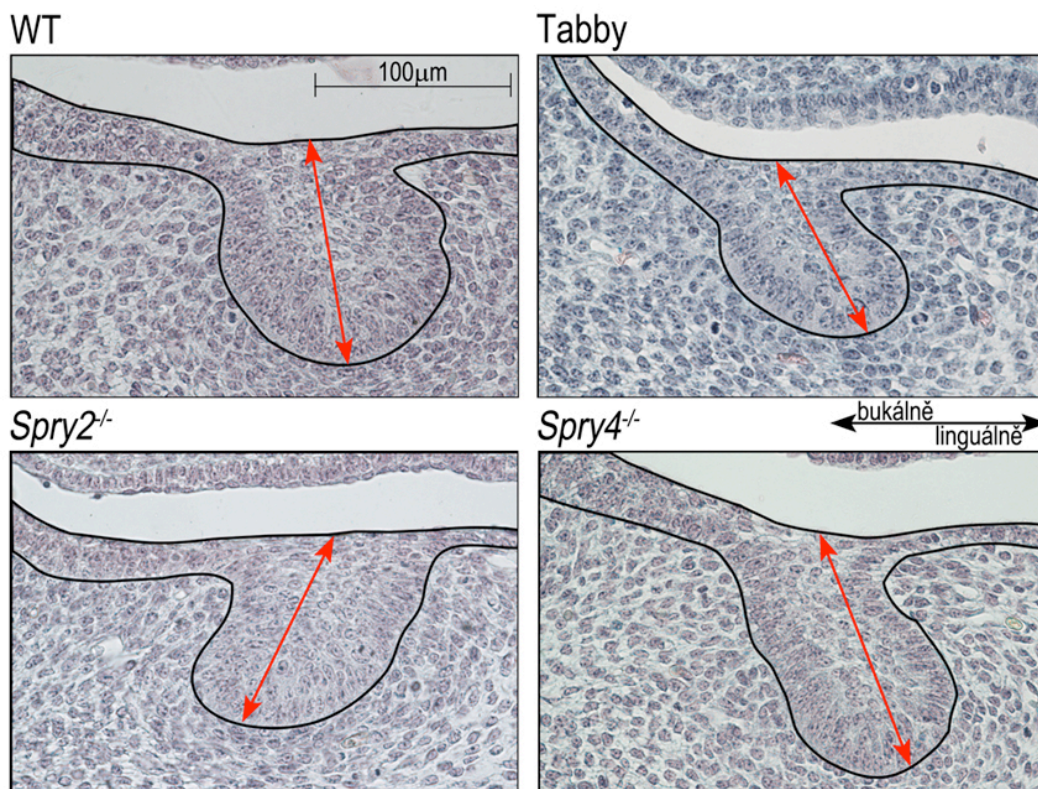
Na stádiu ED15,5 se objevil u obou *Spry* mutantních myši jasně oddělený nadpočetný pohárek s hlubokou prohlubní vyplněnou zubní papilou. U *Spry4^{-/-}* zárodků byla však papila nadpočetného pohárku jednoduchá a od M1 byl tento nadpočetný zubní pohárek oddělen podobně jako u Tabby myši tenkou epitelovou lištou ležící na linguální straně. Nadpočetný pohárek *Spry2^{-/-}* zárodků byl tvořen dvojitou papilou a místem komunikace s M1 byl tlustý centrálně postavený pruh zubního epitelu znatelně nižší než stěny obou pohárků.

Z výše zmíněného vyplývá určitá podobnost mezi Tabby a *Spry4^{-/-}* denticí. K tomu lze ještě připomenout časovou dynamiku vývoje M1 a nadpočetného pohárku. Pohárek M1 se u všech sledovaných genotypů shodně objevil na stádiu ED14,5. Nicméně takto staré zárodky Tabby myši váhově odpovídaly spíše embryím stáří ED14,0 *Spry*

mutantních myší a jejich WT kontrolám. Nadpočetný pohárek se však vůbec neobjevil u kontrolních myší WT, u *Spry4*^{-/-} myší byl výrazný již od stádia ED13,5, u Tabby myší od stádia ED15,0 (hmotnostně odpovídající mladší ED14,5) a u *Spry2*^{-/-} až od stádia ED15,5. To znamená, že stejně jako jsme mluvili o předčasně vyvinutém nadpočetném pohárku u *Spry4*^{-/-} myší, mohli jsme nyní mluvit o předčasně vyvinutém pohárku M1 u Tabby myší.

Posledním důkazem o vývojové podobnosti mezi Tabby a *Spry4*^{-/-} zubním vývojem byl tvar epitelu na histologických řezech. Histologické řezy zubním epitelem raných stádií vývoje naznačují stejné asymetrické vyklenutí k linguální straně v přední oblasti u Tabby myší a *Spry4*^{-/-} myší. U *Spry2*^{-/-} myší docházelo k opačné, bukální asymetrii a u WT myší nebyla asymetrie téměř patrná (Obr. 23).

Pro kvantitativní hodnocení proliferace a apoptózy u Tabby myší se nám nepodařilo morfologicky vyhledat regiony odpovídající MS, R2 a M1 (Obr. 9C, D), které jsme hodnotili u zbylých myších kmenů.



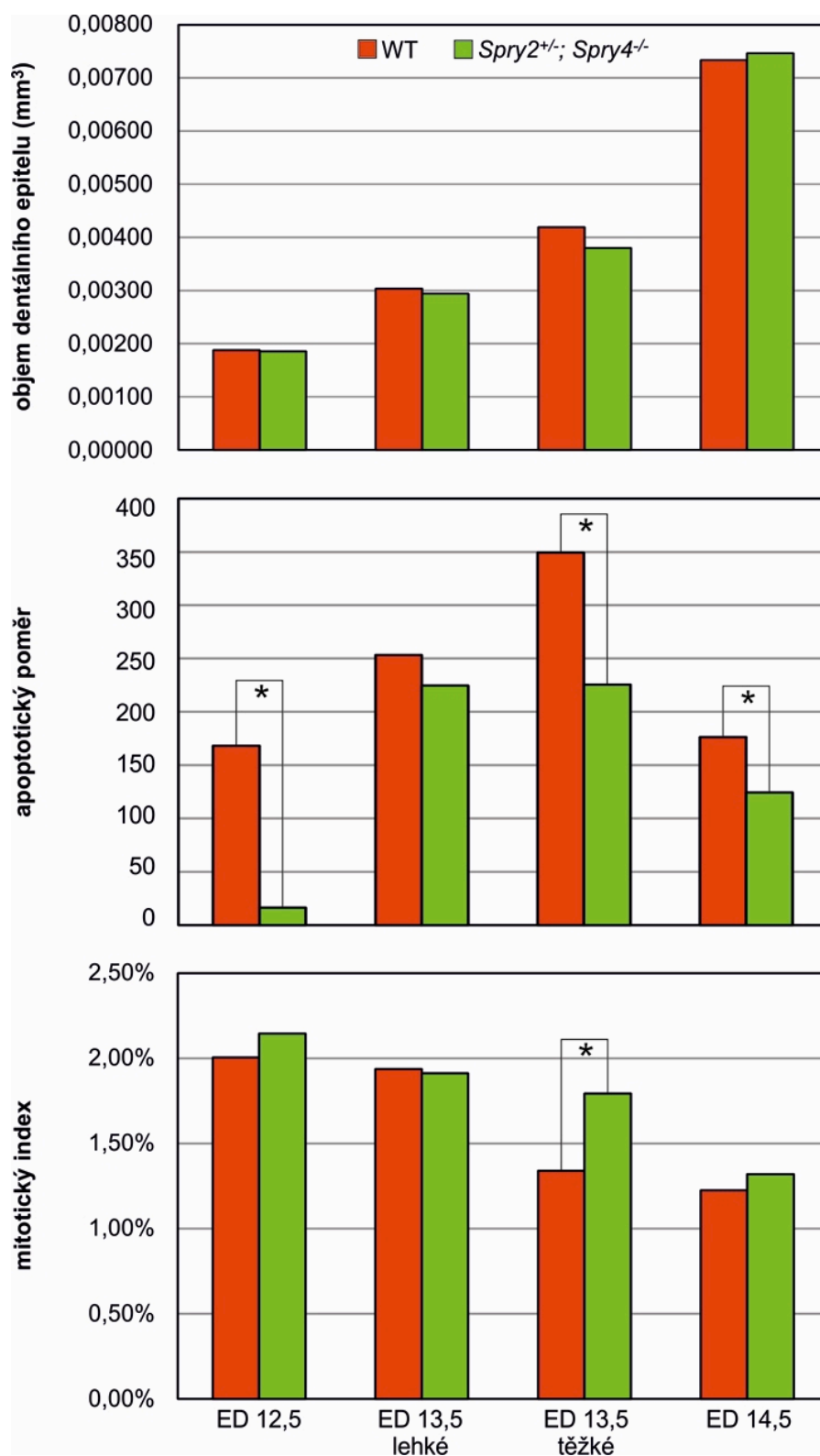
Obr. 23: Ukázka asymetrie zubního epitelu v oblasti mezi MS a R2 u myší stáří ED13,5. Histologické řezy tvářovou oblastí mandibuly embryí různých genotypů na stádiu ED13,5 v oblasti mezi MS a R2 rudimentem. Červená šipka spojuje střed dentálního epitelu při ústním povrchu a jeho vrchol a ukazuje směr asymetrického postavení dentálního epitelu.

8.5. Zdvojený incisor u *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{-/-} myši

Myši s mutací v obou genech *Spry2* i *4* (*Spry2*^{+/-};*Spry4*^{-/-}) mají ve své dentici nejen nadpočetný tvářový zub, ale také zdvojené horní incisory. Díky morfologické analýze bylo prokázáno, že k největším změnám vedoucím ke zdvojení incisoru docházelo v průběhu ED13,5 (Charles et al., 2011). Na stádiu ED12,5 není patrný morfologický rozdíl mezi zubním epitelem mutantních incisorů a incisorů u WT embryí – zubní primordia mají tvar raného stádia pupenu. O den později, na ED13,5, se epitelový pupen zvětšuje u mutantních i WT embryí. Ale u mutantního embrya se objevuje tenký zářez ve střední ose pupenu. Na stádiu ED14,5 už je zjevný rozdíl mezi tvarem řezákového primordia u mutantních a WT zárodků. Zubní primordium je na stádiu pohárku, ale zatímco u WT pohárku je patrná CL - jedna na labiální a druhá na linguální straně pohárku, u mutantních embryí je CL na linguální straně pohárku trojitá. Od prostřední CL vede septum směřující k labiální CL. Toto septum rozděluje zubní epitel na dva oddělené prostory každý s vlastním sklovinným uzlem a zubní papilou. Tři linguální CL stejně jako dva oddělené prostory přetrvávají i v dalších stádiích až do ED17,5 a provázejí vznik zdvojeného řezáku u *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{-/-} embryí.

Cílem studie bylo potvrdit hypotézu, že zvýšení proliferace a/nebo snížení apoptózy provázejí také vznik zdvojeného horního řezáku u myši *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{-/-}.

Zaměřili jsme se proto opět na kvantitativní hodnocení proliferace a apoptózy a to především v období ED12,5-14,5. Vytvořili jsme dvě skupiny myši *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{-/-} a WT myši pro porovnání výsledků. U obou skupin jsme sledovali stádia ED12,5; 13,5 lehké (s hmotností 134-167mg); 13,5 těžké (s hmotností 178-206mg) a 14,5. U všech těchto skupin byly v zubním epitelu hodnoceny počty buněk, mitotický index, apoptotický poměr a objem (viz 7.5.1).



Obr. 24: Grafy kvantitativní analýzy buněčných procesů u *Spry2*^{+/-}; *Spry4*^{-/-} a WT embryí. Nahoře - velikost objemu zubního epitelu. Uprostřed - graf apoptotického poměru. Dole - graf mitotického indexu. Všechny hodnoty byly zpracovány zvlášť pro jednotlivá stádia ED12,5; 13,5 lehké; 13,5 těžké a 14,5. Hvězdičky značí statisticky signifikantní ($p < 0,05$) rozdíl dvou označených hodnot.

Výsledky analýzy ukázaly, že k největším rozdílům dochází ve skupině vývojově pokročilejších (těžších) embryí na stádiu ED13,5, kde byl signifikantně nižší apoptotický poměr ($p < 0,01$) a zároveň signifikantně vyšší mitotický index ($p < 0,05$) u mutantních embryí oproti WT embryím. Signifikantně snížený apoptotický poměr u mutantních embryí byl také zjištěný i ve skupině ED12,5 a ED14,5 (v obou případech $p < 0,01$). Překvapivě se však nelišila velikost celého zubního epitelu u WT a mutantních embryí ani na jednom ze sledovaných stádií (Obr. 24). Data použita k souhrnnému grafickému znázornění jsou uvedena v tabulce 6, ostatní data podle jednotlivých sérií jsou uvedena v příloze 3.

Tabulka 6: Hodnoty kvantitativní analýzy naměřené a vypočtené u embryí *Spry2*^{+/-}; *Spry4*^{-/-} a WT na stádiu ED12,5; 13,5 nižší tělesná hmotnost (lehké); 13,5 vyšší tělesná hmotnost (těžké) a 14,5.

stáří	genotyp	počet řezů	Σ plochy DE (mm ²)	Σ počtu buněk	Σ počtu apopt. tělísek	Σ počtu mit. buněk	AP (SO)	MI (SO)	objem DE (mm ³) (SO)
ED12,5	WT	42	0,375	4990	63	100	168 (39)	2,00% (0,41%)	0,00188 (0,00012)
ED12,5	<i>Spry2</i> ^{+/-} ; <i>Spry4</i> ^{-/-}	42	0,369	4803	6	103	16 (10)	2,14% (0,37%)	0,00185 (0,00017)
ED13,5 lehké	WT	41	0,632	6816	160	132	253 (90)	1,94% (0,46%)	0,00303 (0,00044)
ED13,5 lehké	<i>Spry2</i> ^{+/-} ; <i>Spry4</i> ^{-/-}	45	0,565	6800	127	130	225 (103)	1,91% (0,45%)	0,00294 (0,00038)
ED13,5 těžké	WT	42	0,862	9331	301	125	349 (72)	1,34% (0,27%)	0,00419 (0,00041)
ED13,5 těžké	<i>Spry2</i> ^{+/-} ; <i>Spry4</i> ^{-/-}	48	0,585	7031	132	126	225 (28)	1,79% (0,17%)	0,00380 (0,00042)
ED14,5	WT	52	1,487	17967	262	220	176 (47)	1,22% (0,14%)	0,00733 (0,00069)
ED14,5	<i>Spry2</i> ^{+/-} ; <i>Spry4</i> ^{-/-}	61	1,471	17583	183	232	124 (28)	1,32% (0,12%)	0,00747 (0,00042)

ED – embryonální den, DE – dentální epitel, AP – apoptotický poměr, MI – mitotický index, SO – směrodatná odchylka.

9. Diskuze

Zubní vady tvoří hlavní složku vývojových vad u člověka a jejich výskyt se pohybuje okolo 20-25%. Většina z nich má spíše nezávažnou povahu jako například ageneze třetího moláru a jejich výskyt se může přičítat sekulárnímu trendu vývoje člověka. Závažnější jsou však jiné případy hypodoncie, hyperodoncie nebo dokonce anodoncie. Často se vyskytuje spojení těchto vad s dalšími vývojovými anomáliemi a hovoří se pak o syndromickém postižení. V malém procentu případů se však závažnější hypodoncie nebo hyperodoncie nemusí vázat k dalšímu postižení a vyskytuje se samostatně často i bez viditelné genetické predispozice. Studium morfologie zubů u různých druhů obratlovců napříč jejich evolucí stejně jako studiem funkce jednotlivých genů v rámci vývoje dentice jedince jakéhokoliv druhu můžeme přispět k objasnění mechanismu vzniku vývojových anomálií u člověka.

Společně s popisem časného zubního vývoje myši s genetickou modifikací vedoucí ke vzniku vývojových vad dentice je nutné zaměřit se při interpretaci těchto zubních anomálií na porovnání dentice myšovitých s jejich předky a příbuznými kmeny.

9.1. Časný vývoj incisorů

9.1.1. Normogeneze incisorové oblasti

Myš má oproti ostatním savcům výrazně redukovanou dentici na jeden incisor a tři moláry v jednom zubním kvadrantu. Incisor myši má, stejně jako u ostatních hlodavců, tu zvláštnost, že je trvale rostoucím zubem pokrytým z labiální strany tvrdou sklovinou, která na palatinální/linguální straně chybí. Toto uspořádání zajišťuje neustálé nerovnoměrné obrušování jeho funkční hrany, a trvalý růst je pak možný díky přítomnosti kmenových buněk v místě CL po celý život zubu (Harada et al., 1999; Parsa et al., 2010; Seidel et al., 2010). K prvním morfologickým známkám epitelového ztlustění v incisorové oblasti dochází na stádiu ED11,5. Ztlustění probíhá na dvou místech, jednak v oblasti budoucího zubu a jednak v oblasti vestibulární lišty. Vestibulární lišta dává vznik tzv. „vestibulum oris“, což je prostor mezi dásní se zuby a tváří nebo rty v přední oblasti (Kieffer et al., 1999; Peterkova et al., 1993). Časný pupen horního řezáku vzniká spojením šesti zubních plakod (Peterkova et al., 1993; 1995; 2002b). V dolní řezákové oblasti je situace poněkud odlišná (viz. níže).

V literatuře je často popisována exprese *Shh* v incisorové oblasti v různých stádiích vývoje. Už od ED11 byla jediná *Shh* exprese v přední části mandibuly považována za signální centrum budoucího funkčního řezáku (Dassule and McMahon, 1998). K podobnému závěru došli i při nalezení jediné *Shh* domény v průběhu ED12 u kontrolních myší s vloženým GFP proteinem na *Shh* lokus, a považovali toto ztluštění epitelu za základ funkčního řezáku (Munne et al., 2010). Longitudinální studie morfogeneze a zároveň exprese *Shh* na histologických řezech a 3D rekonstrukcích objasnila časný vývoj řezákové oblasti a přilehlého „vestibulum oris“ v mandibule WT myší, a tvoří základ pro další výzkum - např. vzniku nadpočetných incisorů u myší s genetickými modifikacemi. Tato studie potvrdila existenci epitelového ztluštění v mandibule ED11,75. V dalším vývoji, ED12,5, se vytvořila před původním ztluštěním souvislá vestibulární lišta, zatímco až vzadu od původního ztluštění vznikl pupen budoucího funkčního incisoru. Pupen incisoru a vestibulární lišta spolu byly spojeny třemi epitelovými můstky, které vznikly z původního epitelového ztluštění. Primordium funkčního incisoru tedy vzniklo posteriorně od původního epitelového ztluštění, postupně rostlo směrem dozadu a v jeho basální části se koncentrovala apoptóza stejně jako v oblasti epitelových můstků. Oblast epitelových můstků při bázi primordia funkčního incisoru je místem vzniku tzv. rudimentárního mléčného incisoru, který je u myší přechodně patrný od stádia ED16,5 (Hovorakova et al., 2011).

Výše uvedená morfologická data korelují s časoprostorovým vzorcem *Shh* exprese. V průběhu vývoje se v incisorové oblasti mandibuly vyskytují dvě *Shh* exprese v oblasti epitelových můstků a v oblasti a na vrcholu incisorového pupenu. Expresní doména v oblasti můstků se dokonce rozdvouje tak, že v určitém stádiu jsou patrné dvě expresní domény ležící vedle sebe, které se však později znovu propojí v jednu a odpovídají vývoji rudimentárního mléčného incisoru, nikoli incisoru funkčímu. Až druhá expresní doména na vrcholu incisorového pupenu předcházela morfologicky definované struktuře sklovinného uzlu budoucího funkčního incisoru (Hovorakova et al., 2011).

Navzdory těmto několika prokázaným expresním doménám, které se fyziologicky vyskytují u kontrolních myší, funkční studie na geneticky modifikovaných myších interpretují nález několika *Shh* expresních domén jako znak specifický pro tvorbu nadpočetného řezáku (Munne et al., 2010).

U horních řezáků CD1 kontrolního myšního kmenu byla také sledována prostorová distribuce apoptózy a kvantitativně hodnocen výskyt apoptózy a proliferace. Distribuce

apoptózy byla doposud popsána pouze v dolním řezáku u myši, kde byla detekována morfologicky pod mikroskopem na jednotlivých histologických řezech. V dolním řezáku je malá koncentrace apoptózy lokalizována na časných stádiích (ED12,5 a 13,0) antero-labiálně v zubním epitelu a v ústním epitelu. Více apoptózy se nachází ve stopce incisoru a v ústním epitelu na pozdějších stádiích. Po transformaci epitelu v pohárek se akumulace apoptózy objevuje i v zubním epitelu (sklovinném uzlu) naléhajícím na vrchol mesenchymové zubní papily (Kieffer et al., 1999; Miard et al., 1999).

Na rozdíl od apoptózy jsou proliferující buňky, tedy buňky nacházející se ve stádiu mitózy, morfologicky zaznamenány všudypřítomně v zubním epitelu i mesenchymu v průběhu celé časně odontogeneze dolních řezáků (Kieffer et al., 1999). Odpovídající literární data pro porovnání výsledků kvantitativního hodnocení apoptózy a proliferace v zubním epitelu během časného vývoje řezákové oblasti jsme nenalezli.

9.1.2. Zdvojený incisor u *Spry2^{+/-}*; *Spry4^{-/-}* myši

Zdvojené horní incisory se vyskytovaly u téměř poloviny *Spry2^{+/-}*; *Spry4^{-/-}* dospělých myši. Oba incisory ležely vedle sebe ve společném kostním lůžku, což naznačovalo, že jejich vývoj nebyl nezávislý (Charles et al., 2011).

Skutečně na ED18,5 oba incisory sdílejí jeden sklovinný orgán, rozdělený epitelovým septem, vzniklým duplikací vrstvy vnitřního zubního epitelu. Na povrchu epitelového septa mezi dvěma incisory se později diferencují ameloblasty, které se u WT myši vyskytují pouze na labiální straně budoucího řezáku (Charles et al., 2011). Výsledkem takového vývoje je přítomnost skloviny i na linguální straně obou horních incisorů, zatímco u dospělých WT myši je sklovina přítomna pouze na labiální straně horních i dolních incisorů. Již dříve byl publikován nález ektopické přítomnosti skloviny (Klein et al., 2008) a diferenciací ameloblastů na linguální straně dolních incisorů u *Spry4^{-/-}* a *Spry2^{+/-}*; *Spry4^{-/-}* myši (Boran et al., 2009).

Trvalý růst myších incisorů je spojen s přítomností kmenových buněk v apikální části zubního primordia (Harada et al., 1999; Parsa et al., 2010; Seidel et al., 2010). Zatímco u WT myši je pouze jeden okrsek kmenových buněk, v linguální CL u mutantních myši jsou v této oblasti nalezeny tři okrsky. Data naznačují, že vývoj a trvalý růst nadpočetného incisoru u mutantních myši je podporován zmnožením okrsků kmenových buněk (Charles et al., 2011).

Vývoj jednotlivých zubů je řízen tzv. signálním centrem zubu, umístěným ve sklovinném uzlu (Jernvall et al., 1994). Částečná autonomie obou řezáků u myši s genotypem *Spry2*^{+/-}; *Spry4*^{-/-} embryí koreluje se vzorci *Shh* a *Fgf4* exprese, která je považována za marker signálního centra sklovinného uzlu. Po in situ hybridizaci se expresní doména *Shh* neliší mezi mutantními a WT embryi na stádiu ED11,5. O den později, na stádiu ED12,5, tvar expresní domény zůstává stejný u mutantních a WT embryí, ale její intenzita měřená qPCR je signifikantně vyšší u mutantních myší. Dvě expresní domény *Shh* a *Fgf4* na pozdějším stádiu (ED14,5) u mutantních zárodků místo jedné nalezené u WT zárodků potvrzují přítomnost dvou signálních center ve zdvojeném řezáku mutantních myší. Z morfologických dat je zase patrná přítomnost dvou specifických struktur, sklovinných uzlů, které se signálním centrem zubu velmi úzce souvisí. Tato data byla považována za důkaz dalšího nezávislého (autonomního) vývoje nadpočetného incisoru u *Spry2*^{+/-}; *Spry4*^{-/-} myší (Charles et al., 2011).

Tato morfologická a *Shh* data o vývoji zdvojeného horního incisoru u myši *Spry2*^{+/-}; *Spry4*^{-/-} jsme korelovali s kvalitativním a kvantitativním hodnocením apoptózy v zubním epitelu. Prostorové rozložení apoptózy na řezech a 3D rekonstrukcích upřesnilo výsledky kvantitativního hodnocení a pomohlo vysledovat, kde dochází k akumulaci případně snížení apoptózy. Na stádiu ED12,5 byla apoptóza koncentrována antero-labiálně u WT myší, zatímco téměř žádná apoptóza se neobjevila u mutantních myší, což odpovídalo signifikantnímu snížení zjištěnému díky kvantitativní analýze (viz. 8.5). Apoptóza zůstala signifikantně nižší také na stádiu ED13,5 u těžších embryí *Spry2*^{+/-}; *Spry4*^{-/-}, zatímco u lehčích embryí stejného stáří nebylo snížení apoptózy statisticky signifikantní (viz. 8.5). V tomto stádiu byla podle 3D rekonstrukcí apoptóza rozmístěna rovnoměrně ve střední části zubního epitelu a opět na jeho antero-labiálním konci WT embryí. K podobnému rozložení podél střední osy zubního epitelu došlo u mutantních zárodků až o den později na stádiu ED14,5 v místě, kde se objevuje epitelové septum, i když byla apoptóza opět signifikantně snížena u mutantních embryí oproti WT embryím (viz. 8.5). V téže době se apoptóza objevila pouze ve středu pohárku a v oblasti přilehlého ústního epitelu v antero-labiální části u WT pohárků. Opožděná koncentrace apoptózy v oblasti septa mezi zdvojenými řezáky u mutantních embryí může naznačovat poruchu ve fúzi pravé a levé části incisoru, ke které pravděpodobně dochází při normálním vývoji. Tato porucha má za následek zdvojení incisoru u *Spry2*^{+/-}; *Spry4*^{-/-} myší.

Jediná signifikantní změna v buněčné proliferaci se objevila na stádiu ED13,5 u těžších embryí, kde byl mitotický index signifikantně vyšší v řezákovém epitelu u mutantních embryí oproti WT embryím.

Výsledky hodnocení velikosti řezákového epitelu ukázalo, že celková velikost zubního epitelu se nelišila u mutantních embryí ani na jednom sledovaném stádiu. Přesto se začaly manifestovat výrazné morfologické změny ve tvaru zubního zárodku u mutant od stádia ED14,5 (Charles et al., 2011). Epitel WT embryí je vnořený hlouběji do mesenchymu, kde uzavírá malou mesenchymální papilu. Epitel mutantních embryí se rozprostírá do šířky a vytvořené septum odděluje dvě výrazné papily (Charles et al., 2011).

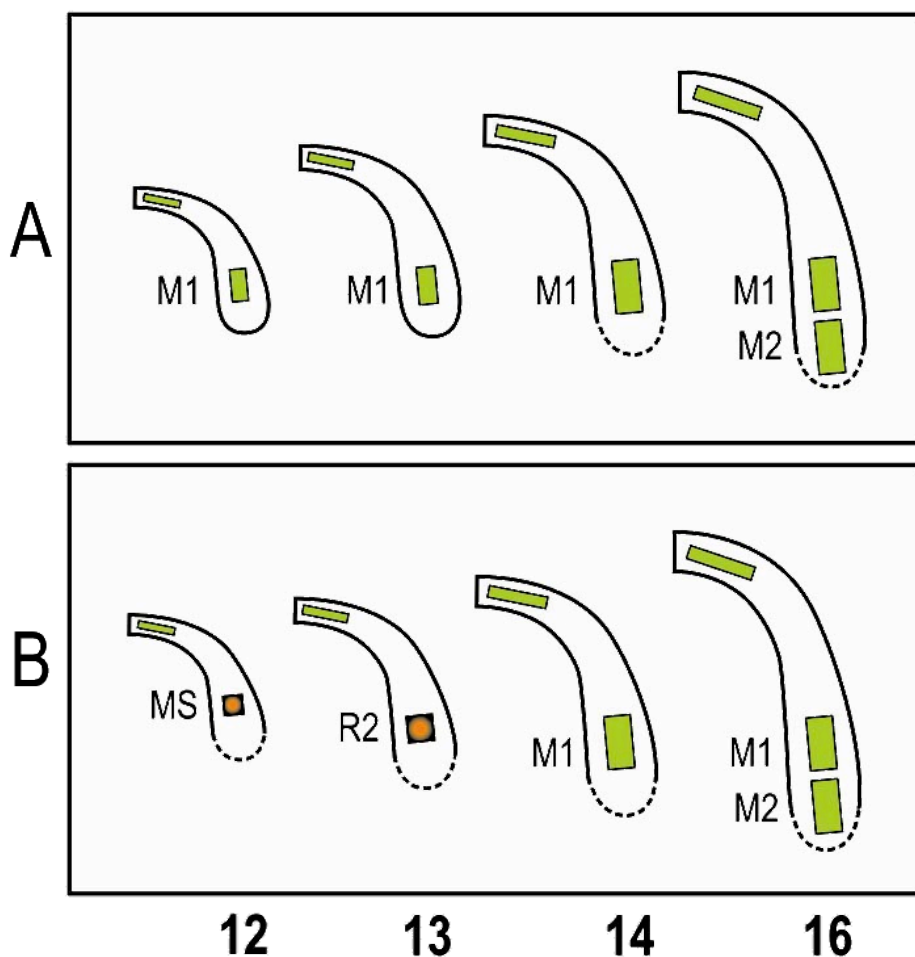
Výsledky naznačují, že zdvojený řezák u mutantních myší vzniká druhotnou septací epitelového sklovinného orgánu, který se na počátečních stádiích vývoje neliší od kontrol. Vytvoření středního septa oddělujícího mesenchymové papily zdvojených řezáků souvisí s pozdějším nástupem apoptózy a zároveň zvýšením proliferace v řezákovém epitelu na stádiu ED13,5.

9.2. Vývoj dentice v tvářové oblasti dolní čelisti

Představu o jednoduchém vývoji prvního myšího moláru z jednoho zubního primordia, které se postupně vyvíjí v období ED12,5-14,5, prezentují klasická morfologická data v literatuře. Z této představy pak vycházeli autoři vývojových studií na myším modelu odontogeneze při interpretaci molekulárních dat o regulaci zubního vývoje (Peterkova et al., 2000; 2002b). Při sledování časné odontogeneze je používána exprese Shh jako marker vyvíjejícího se zubního primordia (Prochazka et al., 2010). Expres Shh je detekována na různých stádiích vývoje myšího zubu (nejčastěji dolního M1). Dlouhodobě se při tom nebralo v úvahu detailní stádiování jeho vývoje ani existence premolárových zubních primordií, která byla donedávna chybně považována za časná stádia vyvíjejícího se M1. Pokud se na nějakém stádiu expresní doména neobjeví, je to přičítáno oslabení signalizace a jejímu následnému obnovení (Koyama et al., 1996; Keranen et al., 1998; 1999). Tuto klasickou představu o časoprostorové dynamice exprese Shh v signálním centru M1 od ED12 až do ED16 ukazuje Obr. 25.

Výše zmíněná „klasická“ představa byla zpochybněna a vyvrácena již na základě morfologických dat (Peterkova, 1983; Peterkova et al., 2000; 2002b). Kromě drobných a

později zcela zanikajících „D“ primordií v přední části horní diastemy, byla objevena dvě velká rudimentární zubní primordia v zadní části horní i dolní diastemy – před M1 (Obr. 11). Tato dvě primordia dosahují postupně stádia zubního pupenu - na ED12,5 a 13,5 (Peterkova et al., 1996; Viriot et al., 2000). Zastavení jejich růstu a počátek degradace s pomocí apoptózy byl datován na stádium ED12,5 v případě předního rudimentu a stádium ED13,5 v případě zadního rudimentu (Lesot et al., 1998; Viriot et al., 2000). Degradace však byla jen částečná a díky přesným morfologickým analýzám spojeným s prostorovou vizualizací apoptózy i proliferace na 3D modelech byla popsána přeměna obou rudimentů horní čelisti a předního rudimentu dolní čelisti v epitelové lišty navazující na M1. Byla také přijata hypotéza o inkorporaci těchto pupenů do přední stěny dolního M1 (Obr. 5 a Obr. 11), (Peterkova et al., 1995; 1996; 2000; 2002b; Tummers and Thesleff, 2009).



Obr. 25: Dvě interpretace vývoje dolního myšního M1

A – „klasická“ představa vývoje M1 z jednoho zubního primordia, B – „hypotéza rudimentárních pupenů“, dva rudimentární pupeny MS a R2 jsou přítomny v čelisti dříve před vznikem zubního primordia M1. (Upraveno podle Prochazka et al., 2010)

Disertační studie přinesla kvantitativní data o úloze nejen zvýšení apoptózy, ale i snížení proliferace při růstové zástavě rudimentů a jejich přeměně ve struktury vztahující se k přední části M1.

K experimentálnímu prokázání přítomnosti a sledování dalšího osudu rudimentárních premolárových primordií v dolní čelisti byla použita detekce *Shh* a to jak WISH metodou tak sledováním myších embryí s vloženým GFP (zelený fluorescenční protein) v lokusu *Shh* genu. Expres *Shh* byla sledována longitudinálně v průběhu celého vývoje rudimentárních zubních základů na stádiích ED12,7 – 14,3 (Obr. 12). Pro potvrzení byla zároveň použita timelaps mikroskopie embryí GFP myši (Prochazka et al., 2010). Každá z těchto metod má určité výhody i nevýhody. Výhodou WISH metody je sledování expresní domény v rámci celé mandibuly a zároveň se z této mandibuly dají vytvořit histologické řezy, které poskytují další informace a možnost vytvoření 3D rekonstrukcí. Nevýhodou WISH metody je dlouhá příprava a tudíž možnost zpracování malého množství vzorků v krátkém čase. Naopak použití GFP myši umožní sledovat velké množství vzorků v krátkém čase, protože jejich příprava není nijak časově náročná. Vzorky pro fluorescenční mikroskop nejsou fixované, čímž odpadá nutnost následné přípravy histologických řezů. Avšak GFP exprese je vidět pouze pod fluorescenčním mikroskopem, takže možnost dalšího využití těchto vzorků pro vizualizaci signálu na řezech a 3D rekonstrukcích odpadá. Timelaps mikroskopie má výhodu v přenosu kontinuálního procesu vývoje, ale zároveň in vitro vývoj neodpovídá přesnému časování in vivo. Kombinace zmíněných tří metod umožňuje sledovat vývoj signálních center ve 4D časoprostoru a navíc přenést tyto poznatky i do dalších studií.

V naší studii byla embrya WT myši odebrána v přesně vymezených časových intervalech ED12,7; 13,3; 13,7 a 14,3 (viz metody) a zvážena. Toto detailní stádiování na základě chronologického (ED) a biologického (hmotnost v mg) stáří umožňuje získat skupiny embryí a fětů, které odrážejí jemné progresivní rozdíly ve vývoji (Peterka et al., 2002). Díky takto rozlišeným skupinám byly popsány tři postupně se objevující *Shh* exprese, které byly odděleny tzv. „negativními intervaly“ (tj. obdobím, kdy se *Shh* doména neobjevila v celé tvářové oblasti mandibuly). Na histologických řezech a s pomocí 3D rekonstrukcí jsme analyzovali umístění všech třech *Shh* domén (Obr. 12). První z nich vyskytující se u embryí stáří ED12,7 o hmotnosti 60-100mg, ležela na vrcholu MS rudimentu, druhá pak na vrcholu R2 rudimentu (ED13,3 a 13,7 o hmotnosti

120-160mg) a třetí ve sklovinném uzlu ve středu prvního moláru M1 (od ED14,3 a hmotnosti 220mg) (Obr. 12).

Výskyt tří po sobě jdoucích expresních domén *Shh* umístěných antero-posteriorně za sebou potvrdila timelaps mikroskopie GFP myši. V některých případech je možné vysledovat dvě expresní domény najednou, v případě, že jedna z nich právě dohasínala a druhá začíná signalizovat (Prochazka et al., 2010).

Shh exprese v prvním moláru se poprvé objevuje, jak již bylo řečeno, na stádiu ED14,3, tedy v době, kdy M1 dosahuje stádia pozdního pupenu, kdy se začíná formovat sklovinný uzel. Zajímavostí je, že tato M1 expresní doména se postupně rozšiřuje směrem dopředu až k místu, kde před tím dohasla exprese na vrcholu R2 pupenu. Toto anteriorní rozšíření je považováno za důkaz inkorporace R2 pupenu do přední části M1 (Procházka et al., 2010), která byla popsána již dříve podle morfologických dat (Peterkova et al., 2006).

9.2.1. Vývoj nadpočetného tvářového zubu u *Sprouty* myši

V průběhu myši odontogeneze jsou krátkodobě patrné dvě rudimentární zubní primordia struktury v tvářové zubní oblasti horní i dolní čelisti. Jejich autonomní vývoj je postupně zastaven před začátkem tvorby pohárku prvního moláru. Oba rudimenty jsou dobře rozpoznatelné od stádia ED12,5 (Lesot et al., 1996; Peterkova et al., 1996; 2000; 2002b; 2003; 2006; Viriot et al., 2000), (Obr. 5 a Obr. 11). Na základě deskriptivních morfologických nálezů byla vyslovena hypotéza, že nadpočetný tvářový zub u myších mutant vzniká autonomním vývojem rudimentárního zubního základu, který během evoluce myšovitých vymizel z funkční dentice, protože byl inkorporován do přední části M1 (Peterkova et al., 1993; Peterkova et al., 2002a). Jedním z cílů této disertační práce bylo prokázat, že při vzniku nadpočetného tvářového zubu skutečně dochází k revitalizaci rudimentárních zubních primordií.

Prenatální studie s kvantitativní analýzou

V rámci disertační práce jsme se v naší první studii vzniku nadpočetného zubu u *Sprouty* mutantních myši soustředili na úlohu R2 rudimentu u *Spry2^{-/-}* mutantních myši na stádiu ED13,5 (Peterkova et al., 2009). V pozdější studii jsme se zaměřili na úlohu MS při tvorbě nadpočetného zubu a na další poznatky o R2 u *Sprouty* myších mutant v období ED12,5-18,5 (Lagronova-Churava et al., 2013).

Oba rudimenty jsme podrobně studovali na stádiích ED12,5 a 13,5 u celkem pěti rozdílných myších genotypů (WT, *Spry2*^{-/-}, *Spry4*^{-/-}, *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{-/-} a *Spry2*^{-/-};*Spry4*^{-/-}). Morfologická data potvrdila viditelné zvětšení (revitalizaci) rudimentů MS a R2 u všech mutantních genotypů myší oproti WT myším na raných stádiích, a vývoj nadpočetného zubu v místě rudimentů na starších stádiích. Kromě morfologie a velikosti rudimentů byly patrné změny také v základních morfogenetických procesech, v proliferaci a apoptóze.

Apoptózu lze na histologických řezech jednoduše odhalit pomocí morfologických kritérií (Tureckova et al., 1996) nebo imunodetekcí (Shigemura et al., 1999). Apoptóza v zubním epitelu hraje jednu z klíčových rolí při fyziologické tvorbě diastemové bezzubé oblasti (Peterkova et al., 2003). U kontrolních embryí je buněčná smrt specificky koncentrovaná v posteriorní části horní a dolní diastemové oblasti, kde velké rudimenty zastavují svůj vývoj a nadále přetrvávají v podobě epitelových lišt (Peterkova et al., 1995; 1996; 1998; Lesot et al., 1996; Viriot et al., 2000). Další výrazná koncentrace apoptózy se objevuje později ve sklovinném uzlu prvního moláru (Lesot et al., 1996; Vaahtokari et al., 1996b; Matalova et al., 2004; 2012) a v anteriorní oblasti M1 epitelu od ED14,5 (Lesot et al., 1996; Viriot et al., 2000), kde přetrvává až do narození (Boran et al., 2005). Apoptóza je u WT myší akumulovaná právě v oblastech rudimentů a je tak zvýšena oproti oblasti, kde se vyvíjí M1 v ED13,5.

Takovou míru akumulace apoptózy v rudimentech jsme nenalezli u *Spry2*^{-/-} embryí na ED12,5 v MS ani v R2 a na ED13,5 v R2. Výsledky potvrzují fakt, že *Spry2* protein byl popsán jako regulátor apoptózy. Oslabení lidského *Spry2* bylo dokonce přímo spojeno s antiapoptotickou funkcí v krevním séru (Edwin and Patel, 2008).

Nicméně se zdá, že tato antiapoptotická funkce je časově a místně omezená, jelikož v MS rudimentu byla v naší studii na stádiu ED13,5 již nalezena klasická akumulace apoptózy u *Spry2*^{-/-} myší jako tomu je u WT myší.

Prostorová distribuce mitotických buněk je dokumentována na 3D rekonstrukcích v průběhu časného vývoje M1 (Jernvall et al., 1994; Lesot et al., 1996; Shigemura et al., 1999). Kvantitativní hodnocení četnosti dělicích se buněk je popsáno na různých prenatalních stádiích in vivo (Osman and Ruch, 1975; Nso et al., 1992; Lesot et al., 1999) a in vitro (Ahmad and Ruch, 1987). Buňky jsou detekovány Tritio-thyamidem (Osman and Ruch, 1975), prostřednictvím imunodetekce látkou BrdU (Vaahtokari et al.,

1991; Casasco et al., 1989; Lisi et al., 2003; Obara and Lesot, 2007) nebo látkou PCNA (proliferating cell mitotic antigen) (Setkova et al., 2006). Buňky v mitóze se dají nalézt jednoduchým způsobem na rutinních histologických řezech (Lesot et al., 1996) podle přesných morfologických kritérií (Elalfy and Leblond, 1987).

Mitotické buňky jsou distribuovány po celém zubním epitelu mandibulární tvářové oblasti na ED12,5 (Viriot et al., 1997). Na stádiu ED13,5 se buněčné dělení zastavuje ve dvou oddělených (BrdU negativních) oblastech. První leží v nejvíce anteriorní části zubního epitelu a druhá na vrcholu zubního pupenu (Shigemura et al., 1999). V porovnání s dnešními daty by se dalo říci, že anteriorní a posteriorní BrdU negativní oblast popsána Shigemurou (1999) koresponduje s MS a R2 rudimenty.

Během vývoje premolárových rudimentárních zubních primordií nebyla doposud proliferace hodnocena ani u kontrolních ani u mutantních myší. Při kvantitativní analýze v naší studii jsme u kontrolních WT myší skutečně našli snížený mitotický index v MS a R2 rudimentu v porovnání s mitotickým indexem nalezeným ve vyvíjející se M1 oblasti. U *Spry2*^{-/-} myší byl mitotický index stejný v rudimentech i v oblasti M1 a srovnatelný (bez signifikantního rozdílu) s oblastí M1 u kontrolních embryí na stádiích ED12,5 i 13,5.

Očekávali jsme, že hodnoty apoptózy a mitózy budou u *Spry4*^{-/-} embryí podobné hodnotám nalezeným u *Spry2*^{-/-} embryí. Avšak hodnoty mitotického indexu v MS (ED12,5) a R2 (ED13,5) u *Spry4*^{-/-} embryí se výrazně nelišily od hodnot zjištěných u kontrolních myší a byly signifikantně nižší než u *Spry2*^{-/-} embryí (Obr. 17).

Takové rozdíly mezi *Spry2*^{-/-} a *Spry4*^{-/-} mezi hodnotami mitotického indexu současně se zvětšením zubního epitelu MS rudimentu na ED12,5 naznačovaly, že revitalizace a zvýšený růst MS rudimentu u *Spry4*^{-/-} myší musel započít ještě před ED12,5, kde byl pupen MS už signifikantně zvětšený. Zároveň byla nalezena signifikantně snížená apoptóza v R2 a M1 regionu na stádiu ED13,5 v porovnání s kontrolními embryi (Obr. 17). Nedostatek apoptózy v R2 regionu tak mohl napomáhat MS/R2 pohárku vyrůst v nadpočetný zub u *Spry4*^{-/-} embryí.

Z hlediska kvantitativní analýzy výsledky DKO mutantních myší přinesly zajímavé poznání. Embrya se třemi postiženými alelami *Spry* genů se chovala téměř ve všech parametrech podobně jako *Spry4*^{-/-} mutantní embrya, zatímco při ztrátě i poslední funkční *Spry2* alely přejala embrya chování *Spry2*^{-/-} mutantních embryí. Jedinou

výjimkou byla zvýšená proliferace v MS rudimentu na stádiu ED13,5 u obou DKO skupin embryí, která mohla zapříčinit vznik ne jednoho, ale dvou nadpočetných zubů v jejich tvářové oblasti (Obr. 20, Obr. 21).

***Shh* exprese**

Kromě očekávané exprese *Shh* ve sklovinném uzlu M1 na stádiu ED14,5 (Jernvall et al., 1994; Iseki et al., 1996; Koyama et al., 1996) je prokázána také existence *Shh* exprese na ranějších stádiích ED12,5 a 13,5 v signálních centrech rudimentárního zubního epitelu v incisorové oblasti (Hovorakova et al., 2011), v zanikajících malých rudimentech přední diastemy v maxile (Keranen et al., 1999), i v oblasti velkých premolárových rudimentů v mandíbule (Prochazka et al., 2010).

U kontrolních myší jsou v tvářové oblasti mandibuly tři postupně se objevující *Shh* expresní domény oddělené negativními intervaly – tj. stádii vývoje, kdy se v této oblasti neobjevila žádná *Shh* expresní doména (Prochazka et al., 2010). Naše disertační studie ukázala, že u sledovaných *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}* myší se všechny tři expresní domény objevily také, ale exprese byla prodloužená a částečně přetrvávala i na stádiích, kdy u kontrolních myší již vymizela (Obr. 18).

Shh exprese může být nepřímo ovlivněna *Sprouty* geny, což vyplývá i z hypotézy o úloze *Fgf*, které zvyšují *Shh* expresi a zároveň jsou inhibovány *Sprouty* geny (Klein et al., 2006).

Shh hraje velmi důležitou úlohu právě při morfogenezi zubních primordií (Dassule et al., 2000). Zajímavé je, že se potvrdilo, že stejně jako ztráta funkce *Shh*, tak i jeho nadbytek působí pokles proliferace buněk a v obou případech se zubní vývoj funkčních zubů zastaví na stádiu pupenu (Cobourne et al., 2001; Cobourne et al., 2009; Ohazama et al., 2009). Zdá se, že správná regulace *Shh* signalizace je nesmírně důležitá pro udržení homeostáze buněk v průběhu odontogeneze (Cobourne et al., 2009). Navíc *Shh* se zdá být inhibítorem tvorby hrbolkového vzoru molárů (Harjunmaa et al., 2012).

Literární údaje naznačují, že *Shh* může za normálních okolností spolupracovat při snížení proliferace v místě sklovinného uzlu a *Fgf* může podporovat proliferaci buněk v okolních oblastech zubního epitelu a tím vyvolat transformaci pupene v pohárek (Jernvall et al., 1994; Jernvall et al., 1998; Vaahtokari et al., 1996a).

Z našich výsledků můžeme odvodit hypotézu, že nadbytečná (déle trvající) *Shh* exprese a zároveň zvýšená funkce *Fgf* v rudimentárních pupenech u *Spry4* mutantních myší by mohla vést ke stimulaci přerodu pupenu v pohárek nadpočetného zubu, který se objevil o den dříve, než začal vývoj pohárku M1 – tedy již na stádiu ED13,5 (Obr. 13). Zvýšená exprese *Shh* byla však zaznamenána i u *Spry2*^{-/-} embryí, kde k tvorbě časného pohárku nedochází. Z toho vyplývá otázka o časování působení *Spry2* a *Spry4* genu v průběhu časně odontogeneze. Data této disertační studie naznačují, že ztráta genu *Spry4* se projevuje dříve - již před ED12,5 a souvisí se zvětšením MS rudimentu (ED12,5) a vznikem časného pohárku nadpočetného zubu (ED13,5) tvořeným oběma rudimenty MS a R2 (Obr. 13). Nicméně *Spry4* gen se zdál mít minimální vliv na růst nadpočetného zubního primordia na pozdějších stádiích. U většiny *Spry4*^{-/-} myší totiž došlo během pozdějšího prenatálního vývoje k degradaci vyvinutého pohárku nadpočetného zubu a výslednému malému procentu funkčních nadpočetných zubů v dospělosti (Obr. 16, viz 8.2.4).

Ztráta genu *Spry2* byla také spojena se vznikem nadpočetného zubu. Ten vznikl sice o den až dva dny později, ale jeho přežívání bylo vyšší než u *Spry4*^{-/-} mutant. Chybění *Spry2* genu tedy podporovalo vývoj nadpočetného zubu i během pozdějších stádií prenatálního vývoje. Nedocházelo pak v takové míře k degradaci nadpočetných zubních primordií. Výsledkem bylo mnohem vyšší procento nadpočetných zubů v dospělé dentici *Spry2*^{-/-} myší než u *Spry4*^{-/-} myší.

Je známo, že *Spry2* gen působí v zubním epitelu zatímco *Spry4* v zubním mesenchymu (Klein et al., 2006). Proto jsme navrhli hypotézu, že právě toto tkáňově odlišné působení *Sprouty* genů má za následek odlišnosti v revitalizaci rudimentárních pupenů a ve vzniku a přežití nadpočetných zubů u *Spry* mutantních myší.

Při porovnání vývoje *Spry* mutantních myší s Tabby myšmi jsme zaznamenali určitou podobnost z hlediska morfologie nadpočetného zubu a asymetrie rudimentárních pupenů mezi *Spry4*^{-/-} a Tabby myšmi. Morfologie časných stádií zubů u Tabby myší naznačuje nepřítomnost nebo opoždění vývoje R2 rudimentu, místo něhož se objevují v přední části zubního epitelu dva zřetelné epitelové valy. Nadpočetný zub Tabby myší vzniká později z linguálního valu a jeho tvar na 3D rekonstrukcích je velmi podobný nadpočetnému zubu *Spry4*^{-/-} myší (Obr. 22). U *Spry4*^{-/-} myší jsme zaznamenali revitalizaci MS a R2 rudimentu ve chvíli, kdy se ještě nezačal tvořit pohárek M1 a tím pádem se z rudimentů vytvořil samostatný nadpočetný zub. U Tabby myší se mohl

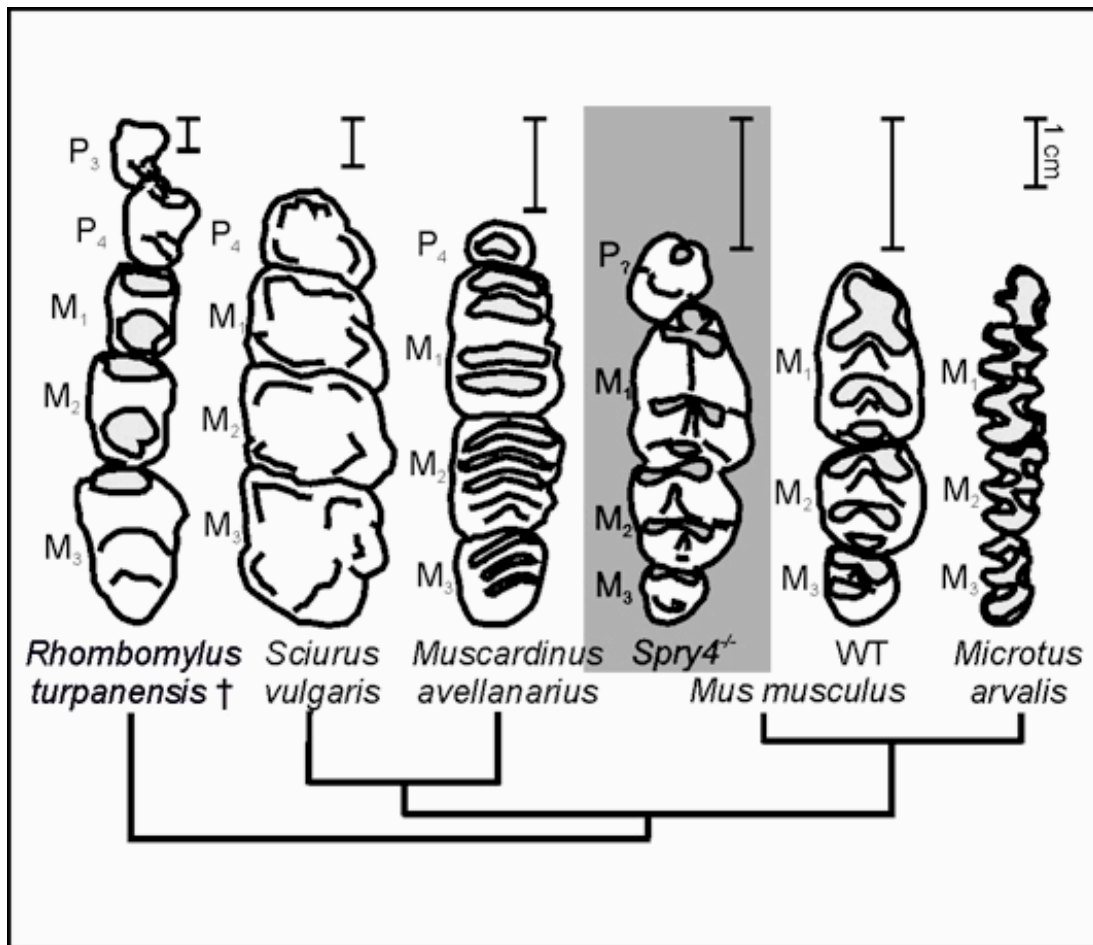
nadpočetný zub vytvořit také z obou těchto rudimentů ne díky revitalizaci, ale díky opožděnému vývoji R2, který se nestačil připojit k M1 během kritické periody vývoje. Nadpočetný zub u Tabby myši je výsledně menší a výrazně ovlivňuje velikost a hrbolkové uspořádání následujících zubů (Kristenova et al., 2002; Kristenova-Cermakova et al., 2002; Peterkova et al., 2002a).

Tyto výsledky o účasti rudimentárních (premolárových) zubních primordií při vývoji nadpočetného tvářového zubu v myši mandibule byly potvrzeny dalšími studii u jiných myších mutant (Ohazama et al., 2009; Cobourne and Sharpe, 2010; Ahn et al., 2010; Porntaveetus et al., 2012).

9.3. Evolučně-vývojové aspekty

Od fosilních hlodavců až k moderní čeledi myšovití může být sledováno postupné vytrácení premolárů z jejich tvářové dentice. Členové kmenové linie hlodavců z časných třetihor (*Eurymylidae*) měli stále přítomny dva až tři premoláry z původních čtyř, které se nacházejí v neredukovaném zubním vzorci savců. Zároveň jejich M1 má velmi jednoduchý hrbolkový vzorec bez přítomnosti anteroconidu (Meng et al., 2003; Meng et al., 2005). Později v evoluci hlodavců došlo ke ztrátě dalšího premoláru a při oddělení podřádu myšovců byly již všechny premoláry redukováné, a ve funkční dentici se vůbec neobjevovaly (Obr. 26).

Nicméně základy některých premolárů se nevytratily úplně, ale zůstaly v podobě velkých rudimentárních pupenů v embryonální čelisti (Peterkova et al., 1996; 2000; 2002b; Viriot et al., 2002). Již je experimentálně dokázáno, že v myši mandibule byly oba tyto rudimentární pupeny částečně inkorporovány do přední stěny M1 primordia na stádiu pohárku (Prochazka et al., 2010; Ahn et al., 2010). Tato data potvrzují klasickou hypotézu, že materiál z premolárů ztracených v evoluci, může být použit na tvorbu komplexnějšího prvního moláru, která byla navržena již před více než 100 lety (Adloff, 1898) a byla podpořena jednak morfologickými (Peterkova, 1983; Peterkova et al., 2002b; 2005) a jednak paleontologickými (Viriot et al., 2002) daty.



Obr. 26: Schéma vytrácení premolárů během evoluce myšovitých.

Postupně mizející premolárová dentice u různých fosilních druhů hlodavců se znovu objevuje v dentici *Spry4⁺* myši (v šedém rámečku). Schéma také znázorňuje hrbolkové uspořádání molárů v denticích s přítomnými nebo vytracenými premoláry. Škálová úsečka u každého druhu představuje 1cm. (Lagronova-Churava et al., 2013)

Míra inkorporace rudimentů do M1 primordia u normálních myší, nebo jejich nevčlenění do M1 a samostatný vývoj v podobě nadpočetného zubu u mutantních myší, se může odrážet ve velikosti a morfologickém uspořádání přední části M1 (anterokonidu) u laboratorních myší (Peterkova, 1983; Peterkova et al., 1995; 2006) i u divoce žijících myší (Renaud et al., 2011).

Proto jsme sledovali také dopad vývoje nadpočetného zubu na tvorbu M1 u *Spry* mutantních myší. U jiných myších kmenů byl vliv nadpočetného zubu na tvar a velikost M1 již popsán (Gruneberg, 1965; Sofaer, 1969; Kristenova et al., 2002; Tucker et al., 2004). Mírné zkrácení přední oblasti M1 bez výrazného ubývání hrbolků je popsáno u *Spry2^{-/-}* myší (Klein et al., 2006). Fúze dvou molárů M1 s M2 v důsledku vzniku nadpočetného zubu se vyskytuje u *Lrp4^{-/-}* a *Wise* myší (Ohazama et al., 2008; Haara et al., 2012). Téměř oddělený přední hrbolek společně s mediální nebo bukální lištou

propojující hrbolky byly popsány u *K14-Eda* myši (Kangas et al., 2004) a *Ectodin*^{-/-} myši (Kassai et al., 2005; Ahn et al., 2010).

Dříve popsané frekvence nadpočetných zubů u *Spry2*^{-/-} a *Spry4*^{-/-} dospělých mutant (Klein et al., 2006) nesouhlasí s frekvencí výskytu nadpočetného zubu u dospělých myši v naší studii. Rozdíl je pravděpodobně způsoben zpětným nakřížením mutantních myši s CD1 kmenem outbredních myši, díky čemuž mohlo být mírně oživeno genetické pozadí. Nicméně i přes nízkou frekvenci funkčních nadpočetných zubů v dospělosti jsme zaznamenali iniciaci vývoje nadpočetného zubu u 100% *Spry* mutovaných embryí. Proto jsme sledovali vliv revitalizace premolárových rudimentů zárodků zubů v počátečních stádiích vývoje nadpočetného zubu na výsledný vzhled M1 u dospělců, u kterých se nadpočetný zub nevyskytoval, protože byl již v zárodku degradován. M1 byl stejně jako celý zubní blok výrazně zmenšen u *Spry2*^{-/-} i *Spry4*^{-/-} myši. Zajímavé bylo, že anteroconid-trigonidový komplex nebyl co do délky postižen a nelišil se od M1 kontrolních embryí. Co se ale lišilo, byla hrbolková komplexita prvního moláru. Data ukázala, že i u WT myši se objevila zvýšená komplexita (nadpočetný hrbolek – C+) u 30% jedinců. Což také potvrzuje fakt, že anteroconid-trigonidový komplex je u současných myšovitých ještě evolučně nestabilní (Boran et al., 2005). Nicméně zvýšená komplexita se projevila u více než 40% *Spry2*^{-/-} jedinců a pouze u necelých 7% *Spry4*^{-/-} jedinců. Zbytek jedinců WT a *Spry2*^{-/-} měl hrbolkovou komplexitu M1 normální (C0), ale M1 *Spry2*^{-/-} myši byly výrazně zmenšené. Oproti tomu *Spry4*^{-/-} s molárovou komplexitou C0 měly M1 výrazně zvětšený; zmenšené byly pouze ty moláry, které spadaly do molárové komplexity C-, tedy s menším počtem hrbolků. Komplexitu C- vykazovalo více jak 30% *Spry4*^{-/-} jedinců, ale žádná z WT nebo *Spry2*^{-/-} myši. Tato data dokazují výrazný vliv revitalizace rudimentárních primordií na velikost a tvar prvního moláru. Dá se usuzovat, že u *Spry* mutant dochází buď k přijetí zvětšeného revitalizovaného pupenu do přední části M1, nebo k nepřijetí rudimentu, který si udržel autonomii díky revitalizaci.

Výsledky disertace tedy podpořily hypotézu o variabilitě tvaru a velikosti M1 v závislosti na stupni inkorporace rudimentárních struktur (Peterkova, 1983; Renaud et al., 2011), která byla také popsána u Tabby myši (Kristenova et al., 2002; Kristenova-Cermakova et al., 2002; Peterkova et al., 2002a) a na speciálním myším endemitu z Korsiky (Renaud et al., 2011).

Kromě stupně inkorporace nebo autonomního vývoje jednotlivých zubních rudimentů může hrát také významnou roli čas nástupu jejich revitalizace. Předpokládáme, že u *Spry4^{-/-}* embryí se objevila velmi časná revitalizace MS a R2, které se pravděpodobně spojily v jeden pohárek, který brzy zanikl nebo se ještě stihl inkorporovat do M1 a prodloužil tak jeho anteroconid-trigonidový komplex v rámci C0 komplexity. U *Spry2^{-/-}* započala revitalizace spíše později a zasáhla tak více R2 rudiment, který měl již dostatek síly na osamostatnění nebo tvorbu nadpočetného hrbolku M1.

Dalším případem pak je situace u *Spry2^{-/-}*; *Spry4^{-/-}* embryí, kde se osamostatnil jak MS rudiment, tak R2 rudiment a daly vzniknout dvěma nadpočetným pohárkům.

Z výše zmíněného by se dalo usuzovat, že pokud dojde k narušení rovnováhy regulátorových genů, premoláry ztracené v evoluci se mohou znovu objevit v podobě nadpočetných zubů.

9.4. Antropologický přínos

Lidská dentice, jak už bylo řečeno výše, je co do počtu zubů redukována oproti předpokládanému výchozímu vzorci savčí dentice. (Stock et al., 1997). Místo původních třech řezáků se u lidí normálně vyskytují dva a místo čtyř třenových zubů také pouze dva v jednom čelistním kvadrantu. V současné populaci jsme dokonce svědky možné další redukce dentice, která se týká třetího moláru, jehož chybění se vyskytuje až ve 25% (Rozkocová et al., 2004; Fleishmanova et al., 2008).

Jak vyplývá z výsledků naší práce na myším modelu, rudimentární primordia zubů vymizelých během evoluce mohou revitalizovat a vytvořit nadpočetný zub. Výsledky disertační práce tak podporují teorii atavismů, která mluví o nadpočetném zubu i v lidské dentici jako o atavismu s možností návratu v zubní evoluci (Smith, 1969). V lidské dentici se nadpočetný zub nejčastěji objevuje v horní čelisti v řezákové a v dolní čelisti v premolárové oblasti (Kawashita et Saito, 2010; Galluccio et al., 2012), což jsou právě místa, kde byly zuby redukovány během evoluce.

Tato práce přináší rovněž důkazy o důležitosti genů *Spry* pro potlačení růstu zubních primordií redukováných zubů. Zjistili jsme, že poškození genů *Spry* u myši má za následek změny v buněčné proliferaci a apoptóze vedoucí k revitalizaci primordií potlačených zubů, které se objevují jako nadpočetné zuby v oblasti řezákové i oblasti tvářové.

V další části se tato práce zabývá srovnáním vývoje zubů u Tabby myši, u kterých se vyskytuje zároveň hypodontie i hyperodontie, a jejich fenotyp se podobá lidskému syndromu hypohidrotické ektodermální dysplázie (Ferguson et al., 1997).

Spry i Tabby mutantní myši, použité pro tuto disertační práci, představují tedy zvířecí modely vhodné pro studium vzniku hypo- i hyperodontie, a také pro studium vrozených syndromů vyskytujících se u člověka.

Studium regulačních mechanismů vzniku zubů na základě revitalizace rudimentárních zubních primordií u myši může pomoci při objasňování některých vývojových vad lidské dentice a přináší cenné poznatky pro vývoj metod biologických zubních náhrad u člověka.

10. Závěry

1. Byl porovnán časný vývoj rudimentárních (premolárových) zubních primordií a prvního moláru u *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}* myši a u myši kontrolních (WT). Při vzniku nadpočetného tvářového zubu u *Spry2^{-/-}* i *Spry4^{-/-}* myši došlo k revitalizaci rudimentárních zubních primordií, která přispívají k jeho vzniku. Revitalizace byla spojena se zvýšením proliferace a/nebo snížením apoptózy a s prodloužením exprese Shh genu v zubním epitelu.
2. Byla popsána morfogeneze nadpočetného zubu u DKO myši s chyběním obou genů *Spry2* a *4* (*Spry2^{-/-};Spry4^{-/-}*) a porovnána se vznikem nadpočetného zubu u *Spry2^{-/-}* nebo *Spry4^{-/-}* myši. DKO *Spry* mutantní myši nejsou životaschopné, nicméně prenatalně se před jejich prvním dolním molárem objevují dva malé nadpočetné zubní pohárky. Výsledky naznačují, že v tomto případě dochází k osamostatnění a autonomnímu vývoji obou rudimentárních pupenů MS a R2 za vzniku dvou nadpočetných zubních primordií.
3. Zvýšení proliferace a/nebo snížení apoptózy provázely také vznik zdvojeného řezáku u myši *Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}*. Celkový objem dentálního epitelu se však nelišil oproti WT myším. U mutantních myši se však od stádia ED13,5 začala tvořit epitelová přepážka uvnitř sklovinného orgánu. Ke zdvojení řezáku tedy došlo rozčleněním stávajícího sklovinného orgánu, v němž místo jedné zubní papily vznikly papily dvě.
4. Byl porovnán vývoj tvářové dentice s nadpočetným zubem u *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}* myši a u Tabby mutantních myši. Vývoj nadpočetného zubu u Tabby myši se podobá vývoji nadpočetného zubu u *Spry4^{-/-}* myši, jehož vznik je spojen především s revitalizací MS rudimentu.

Výsledky disertační práce potvrdily, že při vývoji nadpočetných zubů u mutantních myši se uplatňuje revitalizace rudimentárních primordií zubů potlačených během evoluce.

11. Seznam publikací, které jsou podkladem disertační práce

1. **Lagronova-Churava S**, Spoutil F, Vojtechova S, Lesot H, Peterka M, Klein OD, Peterkova R. 2013. The dynamics of supernumerary tooth development are differentially regulated by Sprouty genes. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 320:307-320. **IF=2.123**
2. Charles C, Hovorakova M, Ahn Y, Lyons DB, Marangoni P, **Churava S**, Biehs B, Jheon A, Lesot H, Balooch G, Krumlauf R, Viriot L, Peterkova R, Klein OD. 2011. Regulation of tooth number by fine-tuning levels of receptor-tyrosine kinase signaling. *Development* 138:4063-4073. **IF=6.208**
3. Hovorakova M, Prochazka J, Lesot H, Smrckova L, **Churava S**, Boran T, Kozmik Z, Klein O, Peterkova R, Peterka M. 2011. *Shh* expression in a rudimentary tooth offers new insights into development of the mouse incisor. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 316B:347-358. **IF=2.123**
4. Prochazka J, Pantalacci S, **Churava S**, Rothova M, Lambert A, Lesot H, Klein O, Peterka M, Laudet V, Peterkova R. 2010. Patterning by heritage in mouse molar row development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:15497-15502. **IF=9.737**
5. Peterkova R, **Churava S**, Lesot H, Rothova M, Prochazka J, Peterka M, Klein OD. 2009. Revitalization of a diastemal tooth primordium in *spry2* null mice results from increased proliferation and decreased apoptosis. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 312B:292-308. **IF=2.123**

12. Seznam příloh

1. Hodnoty kvantitativní analýzy naměřené a vypočtené u jednotlivých sérií u embryí WT, *Spry2*^{-/-} a *Spry4*^{-/-} stáří ED 12,5 a 13,5.
2. Hodnoty kvantitativní analýzy naměřené a vypočtené u jednotlivých sérií u embryí *Spry2*^{+/-}; *Spry4*^{-/-} a *Spry2*^{-/-}; *Spry4*^{-/-} stáří ED 12,5 a 13,5.
3. Hodnoty kvantitativní analýzy naměřené a vypočtené u jednotlivých sérií u embryí *Spry2*^{+/-}; *Spry4*^{-/-} a WT stáří ED 12,5; 13,5 l (lehké); 13,5 t (těžké) a 14,5.
4. Publikace: Lagronova-Churava et al, 2013; Charles et al, 2011; Hovorakova et al, 2011; Prochazka et al, 2010; Peterkova et al, 2009.

13. Reference

- Adloff P. 1898. Zur Entwicklungsgeschichte des Nagetiergebisses. *Jenaer Zeitsch Naturwiss*: 32:347-411
- Ahmad N, Ruch JV. 1987. Comparison of growth and cell-proliferation kinetics during mouse molar odontogenesis *invivo* and *invitro*. *Cell and Tissue Kinetics* 20:319-329.
- Ahn Y, Sanderson BW, Klein OD, Krumlauf R. 2010. Inhibition of wnt signaling by *wise* (*sostdc1*) and negative feedback from *shh* controls tooth number and patterning. *Development* 137:3221-3231.
- Bei M, Kratochwil K, Maas RL. 2000. *Bmp4* rescues a non-cell-autonomous function of *msx1* in tooth development. *Development* 127:4711-4718.
- Bergman J. 1998. Are wisdom teeth (third molars) vestiges of human evolution. *Technical Journal* 12:297-304.
- Bolk L. 1912. On the structure of the dental system of reptiles. *Proceedings of the Koninklijke Akademie Van Wetenschappen Te Amsterdam* 14:950-961.
- Bolk L. 1922. *Odontological essays*. *Journal of Anatomy* 56:107-136.
- Boran T, Lesot H, Peterka M, Peterkova R. 2005. Increased apoptosis during morphogenesis of the lower cheek teeth in *tabby/eda* mice. *Journal of Dental Research* 84:228-233.
- Boran T, Peterkova R, Lesot H, Lyons DB, Peterka M, Klein OD. 2009. Temporal analysis of ectopic enamel production in incisors from *sprouty* mutant mice. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 312B:473-485.
- Casasco A, Calligaro A, Marchetti C, Poggi P, Brugnattelli S, Danova M, Fiocca R. 1989. Immunocytochemical detection of proliferating cells in the rat tooth germ by monoclonal antibodies against 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Archives of Oral Biology* 34:65-69.

- Cermakova P, Peterka M, Capkova J, Tureckova J, Ruch JV, Lesot H, Peterkova R. 1998. Comparison of the tooth shape and size in tabby and non-tabby mice. *Acta Veterinaria Brno* 67:3-14.
- Charles C, Hovorakova M, Ahn Y, Lyons DB, Marangoni P, Churava S, Biehs B, Jheon A, Lesot H, Balooch G, Krumlauf R, Viriot L, Peterkova R, Klein OD. 2011. Regulation of tooth number by fine-tuning levels of receptor-tyrosine kinase signaling. *Development* 138:4063-4073.
- Chen J, Lan Y, Baek JA, Gao Y, Jiang R. 2009. Wnt/beta-catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development. *Developmental Biology* 334:174-185.
- Clauss F, Chassaing N, Smahi A, Vincent MC, Calvas P, Molla M, Lesot H, Alembik Y, Hadj-Rabia S, Bodemer C, Maniere MC, Schmittbuhl M. 2010. X-linked and autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia: Genotypic-dental phenotypic findings. *Clinical Genetics* 78:257-266.
- Clauss F, Maniere MC, Obry F, Waltmann E, Hadj-Rabia S, Bodemer C, Alembik Y, Lesot H, Schmittbuhl M. 2008. Dento-craniofacial phenotypes and underlying molecular mechanisms in hypohidrotic ectodermal dysplasia (hed): A review. *Journal of Dental Research* 87:1089-1099.
- Cobourne MT, Hardcastle Z, Sharpe PT. 2001. Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *Journal of Dental Research* 80:1974-1979.
- Cobourne MT, Sharpe PT. 2010. Making up the numbers: The molecular control of mammalian dental formula. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21:314-324.
- Cobourne MT, Xavier GM, Depew M, Hagan L, Sealby J, Webster Z, Sharpe PT. 2009. Sonic hedgehog signalling inhibits palatogenesis and arrests tooth development in a mouse model of the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Developmental Biology* 331:38-49.

- Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. 2000. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 127:4775-4785.
- Dassule HR, McMahon AP. 1998. Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Developmental Biology* 202:215-227.
- Edwin F, Patel TB. 2008. A novel role of sprouty 2 in regulating cellular apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 283:3181-3190.
- Elalfy M, Leblond CP. 1987. Long duration of mitosis and consequences for the cell-cycle concept, as seen in the isthmal cells of the mouse pyloric antrum. 1. Identification of early and late steps of mitosis. *Cell and Tissue Kinetics* 20:205-213.
- Ferguson BM, Brockdorff N, Formstone E, Ngyuen T, Kronmiller JE, Zonana J. 1997. Cloning of tabby, the murine homolog of the human eda gene: Evidence for a membrane-associated protein with a short collagenous domain. *Human Molecular Genetics* 6:1589-1594.
- Fitzgerald LR. 1973. Deciduous incisor teeth of the mouse (*mus musculus*). *Archive of Oral Biology* 18:381-389.
- Fleischmannova J, Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT. 2008. Mouse models of tooth abnormalities. *European Journal of Oral Sciences* 116:1-10.
- Galluccio G, Castellano M, La Monaca C. 2012. Genetic basis of non-syndromic anomalies of human tooth number. *Archive of Oral Biology* 57:918-930.
- Gaunt PN. 1978. Three dimensional reconstruction in biology. Gaunt WA, editor. Baltimore: University Park Press.
- Gaunt WA. 1955. The development of the molar pattern of the mouse (*mus musculus*). *Acta Anatomica* 24:249-268.
- Gruneberg H. 1965. Genes and genotypes affecting the teeth of the mouse. *Journal of embryology and experimental morphology* 14:137-159.

- Haara O, Harjunmaa E, Lindfors PH, Huh SH, Fliniaux I, Aberg T, Jernvall J, Ornitz DM, Mikkola ML, Thesleff I. 2012. Ectodysplasin regulates activator-inhibitor balance in murine tooth development through Fgf20 signaling. *Development* 139:3189-3199.
- Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. 1999. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with notch and Fgf signaling. *Journal of Cell Biology* 147:105-120.
- Harjunmaa E, Kallonen A, Voutilainen M, Hamalainen K, Mikkola ML, Jernvall J. 2012. On the difficulty of increasing dental complexity. *Nature* 483:324-327.
- Headon DJ, Emmal SA, Ferguson BM, Tucker AS, Justice MJ, Sharpe PT, Zonana J, Overbeek PA. 2001. Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature* 414:913-916.
- Headon DJ, Overbeek PA. 1999. Involvement of a novel tnfr receptor homologue in hair follicle induction. *Nature Genetics* 22:370-374.
- Hovorakova M, Lesot H, Peterka M, Peterkova R. 2005. The developmental relationship between the deciduous dentition and the oral vestibule in human embryos. *Anatomy and Embryology* 209:303-313.
- Hovorakova M, Lesot H, Peterkova R, Peterka M. 2006. Origin of the deciduous upper lateral incisor and its clinical aspects. *Journal of Dental Research* 85:167-171.
- Hovorakova M, Prochazka J, Lesot H, Smrkova L, Churava S, Boran T, Kozmik Z, Klein O, Peterkova R, Peterka M. 2011. Shh expression in a rudimentary tooth offers new insights into development of the mouse incisor. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 316B:347-358.
- Iseki S, Araga A, Ohuchi H, Nohno T, Yoshioka H, Hayashi F, Noji S. 1996. Sonic hedgehog is expressed in epithelial cells during development of whisker, hair, and tooth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218:688-693.

- Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keranen S, Thesleff I. 1998. The life history of an embryonic signaling center: Bmp-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 125:161-169.
- Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I. 1994. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: Non-dividing cells express growth stimulating fgf-4 gene. *International Journal of Developmental Biology* 38:463-469.
- Kangas AT, Evans AR, Thesleff I, Jernvall J. 2004. Nonindependence of mammalian dental characters. *Nature* 432:211-214.
- Kasai Y, Munne P, Hotta YH, Penttila E, Kavanagh K, Ohbayashi N, Takada S, Thesleff I, Jernvall J, Itoh N. 2005. Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin. *Science* 309:2067-2070.
- Kawashita Y, Saito T. 2010. Nonsyndromic multiple mandibular supernumerary premolars: a case report. *Journal of dentistry for children* 77:99-101.
- Keranen SVE, Aberg T, Kettunen P, Thesleff I, Jernvall J. 1998. Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Development Genes and Evolution* 208:477-486.
- Keranen SVE, Kettunen P, Aberg T, Thesleff I, Jernvall J. 1999. Gene expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Development Genes and Evolution* 209:495-506.
- Kere J, Srivastava AK, Montonen O, Zonana J, Thomas N, Ferguson B, Munoz F, Morgan D, Clarke A, Baybayan P, Chen EY, Ezer S, Saarialho-Kere U, de la Chapelle A, Schlessinger D. 1996. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nature Genetics* 13:409-416.
- Kettunen P, Laurikkala J, Itaranta P, Vainio S, Itoh N, Thesleff I. 2000. Associations of fgf-3 and fgf-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Developmental Dynamics* 219:322-332.

- Kettunen P, Thesleff I. 1998. Expression and function of fgfs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Developmental Dynamics* 211:256-268.
- Kieffer S, Peterkova R, Vonesch JL, Ruch JV, Peterka M, Lesot H. 1999. Morphogenesis of the lower incisor in the mouse from the bud to early bell stage. *International Journal of Developmental Biology* 43:531-539.
- Kist R, Watson M, Wang X, Cairns P, Miles C, Reid DJ, Peters H. 2005. Reduction of pax9 gene dosage in an allelic series of mouse mutants causes hypodontia and oligodontia. *Human Molecular Genetics* 14:3605-3617.
- Klein OD, Lyons DB, Balooch G, Marshall GW, Basson MA, Peterka M, Boran T, Peterkova R, Martin GR. 2008. An fgf signaling loop sustains the generation of differentiated progeny from stem cells in mouse incisors. *Development* 135:377-385.
- Klein OD, Minowada G, Peterkova R, Kangas A, Yu BD, Lesot H, Peterka M, Jernvall J, Martin GR. 2006. Sprouty genes control diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal fgf signaling. *Developmental Cell* 11:181-190.
- Koyama E, Yamaai T, Iseki S, Ohuchi H, Nohno T, Yoshioka H, Hayashi Y, Leatherman JL, Golden EB, Noji S, Pacifici M. 1996. Polarizing activity, sonic hedgehog, and tooth development in embryonic and postnatal mouse. *Developmental Dynamics* 206:59-72.
- Kristenova P, Peterka M, Lisi S, Gendrault JL, Lesot H, Peterkova R. 2002. Different morphotypes of functional dentition in the lower molar region of tabby (eda) mice. *Orthodontics and Craniofacial Research* 5:205-214.
- Kristenova-Cermakova P, Peterka M, Lisi S, Lesot H, Peterkova R. 2002. Postnatal lower jaw dentition in different phenotypes of tabby mice. *Connective Tissue Research* 43:283-288.
- Kukenthal WG. 1892. Über den Ursprung und die Entwicklung der Säugertierzähne. *Jenaer Zeitsch Naturwiss* 26:469-489.

- Lagronova-Churava S, Spoutil F, Vojtechova S, Lesot H, Peterka M, Klein OD, Peterkova R. 2013. The dynamics of supernumerary tooth development are differentially regulated by sprouty genes. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 320:307-320.
- Lesot H, Peterkova R, Schmitt R, Meyer JM, Viriot L, Vonesch JL, Senger B, Peterka M, Ruch JV. 1999. Initial features of the inner dental epithelium histomorphogenesis in the first lower molar in mouse. *International Journal of Developmental Biology* 43:245-254.
- Lesot H, Peterkova R, Viriot L, Vonesch JL, Tureckova J, Peterka M, Ruch JV. 1998. Early stages of tooth morphogenesis in mouse analyzed by 3d reconstructions. *European Journal of Oral Sciences* 106:64-70.
- Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Tureckova J, Peterkova R, Ruch JV. 1996. Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction .2. Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth. *International Journal of Developmental Biology* 40:1017-1031.
- Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, Lesot H. 2003. Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. *Connective Tissue Research* 44:167-170.
- MacKenzie A, Ferguson MW, Sharpe PT. 1992. Expression patterns of the homeobox gene, *hox-8*, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape. *Development* 115:403-420.
- Matalova E, Fleischmannova J, Sharpe PT, Tucker AS. 2008. Tooth agenesis: From molecular genetics to molecular dentistry. *Journal of Dental Research* 87:617-623.
- Matalova E, Svandova E, Tucker AS. 2012. Apoptotic signaling in mouse odontogenesis. *Omics-a Journal of Integrative Biology* 16:60-70.
- Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT. 2004. Death in the life of a tooth. *Journal of Dental Research* 83:11-16.

- Menezes R, Vieira AR. 2008. Dental anomalies as part of the cleft spectrum. *Cleft Palate-Craniofacial journal* 45:414-419.
- Meng J, Hu YM, Li CK. 2003. The osteology of rhombomylus (mammalia, glires): Implications for phylogeny and evolution of glires. *Bulletin of the American Museum of Natural History*:pp.1-247.
- Meng J, Wyss AR, Hu YM, Wang YQ, Bowen GJ, Koch PL. 2005. Glires (mammalia) from the late paleocene bayan ulan locality of inner mongolia. *American Museum Novitates*:pp.1-25.
- Miard S, Peterkova R, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV, Lesot H. 1999. Alterations in the incisor development in the tabby mouse. *International Journal of Developmental Biology* 43:517-529.
- Monreal AW, Ferguson BM, Headon DJ, Street SL, Overbeek PA, Zonana J. 1999. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nature Genetics* 22:366-369.
- Munne PM, Felszeghy S, Jussila M, Suomalainen M, Thesleff I, Jernvall J. 2010. Splitting placodes: Effects of bone morphogenetic protein and activin on the patterning and identity of mouse incisors. *Evolution and Development* 12:383-392.
- Nakamura T, de Vega S, Fukumoto S, Jimenez L, Unda F, Yamada Y. 2008. Transcription factor epiprofin is essential for tooth morphogenesis by regulating epithelial cell fate and tooth number. *Journal of Biological Chemistry*. 283:4825-4833.
- Nso M, Senger B, Ruch JV. 1992. Scoring mitotic activity in longitudinal sections of mouse embryonic incisors: Significant differences exist for labial and lingual inner dental epithelia. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology* 12:159-166.
- Obara N, Lesot H. 2007. Asymmetrical growth, differential cell proliferation, and dynamic cell rearrangement underlie epithelial morphogenesis in mouse molar development. *Cell and Tissue Research* 330:461-473.

- Ohazama A, Haycraft CJ, Seppala M, Blackburn J, Ghafoor S, Cobourne M, Martinelli DC, Fan CM, Peterkova R, Lesot H, Yoder BK, Sharpe PT. 2009. Primary cilia regulate shh activity in the control of molar tooth number. *Development* 136:897-903.
- Ohazama A, Johnson EB, Ota MS, Choi HJ, Porntaveetus T, Oommen S, Itoh N, Eto K, Gritli-Linde A, Herz J, Sharpe PT. 2008. Lrp4 modulates extracellular integration of cell signaling pathways in development. *Plos One* 3:1-11.
- Osborn HF. 1888. The evolution of mammalian molars to and from the tritubercular type. *The American Naturalist* 22:1067-1079.
- Osman A, Ruch JV. 1975. Topographical distribution of mitosis in odontogenic fields of lower jaw in mice embryos. *Journal De Biologie Buccale* 3:117-132.
- Parsa S, Kuremoto K, Seidel K, Tabatabai R, Mackenzie B, Yamaza T, Akiyama K, Branch J, Koh CJ, Al Alam D, Klein OD, Bellusci S. 2010. Signaling by fgfr2b controls the regenerative capacity of adult mouse incisors. *Development* 137:3743-3752.
- Peterka M, Lesot H, Peterkova R. 2002. Body weight in mouse embryos specifies staging of tooth development. *Connective Tissue Research* 43:186-190.
- Peterkova R. 1983. Dental lamina develops even within the mouse diastema. *J Craniofac Genetics and Developmental Biology* 3:133-142.
- Peterkova R, Churava S, Lesot H, Rothova M, Prochazka J, Peterka M, Klein OD. 2009. Revitalization of a diastemal tooth primordium in spry2 null mice results from increased proliferation and decreased apoptosis. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 312B:292-308.
- Peterkova R, Kristenova P, Lesot H, Lisi S, Vonesch JL, Gendrault JL, Peterka M. 2002a. Different morphotypes of the tabby (eda) dentition in the mouse mandible result from a defect in the mesio-distal segmentation of dental epithelium. *Orthodontics and Craniofacial Research* 5:215-226.

- Peterkova R, Lesot H, Peterka M. 2006. Phylogenetic memory of developing mammalian dentition. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 306B:234-250.
- Peterkova R, Lesot H, Viriot L, Peterka M. 2005. The supernumerary cheek tooth in tabby/eda mice - a reminiscence of the premolar in mouse ancestors. *Archives of Oral Biology* 50:219-225.
- Peterkova R, Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV. 1996. Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction .1. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *International Journal of Developmental Biology* 40:1009-1016.
- Peterkova R, Peterka M, Lesot H. 2003. The developing mouse dentition - a new tool for apoptosis study. In: Diederich M, editor. *Apoptosis: From signaling pathways to therapeutic tools*: pp 453-466.
- Peterkova R, Peterka M, Viriot L, Lesot H. 2000. Dentition development and budding morphogenesis. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology* 20:158-172.
- Peterkova R, Peterka M, Viriot L, Lesot H. 2002b. Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connective Tissue Research* 43:120-128.
- Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV. 1993. Multiple developmental origin of the upper incisor in mouse: Histological and computer assisted 3-d-reconstruction studies. *International Journal of Developmental Biology* 37:581-588.
- Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV. 1995. Contribution of 3-d computer-assisted reconstructions to the study of the initial steps of mouse odontogenesis. *International Journal of Developmental Biology* 39:239-247.
- Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Tureckova J, Viriot L, Ruch JV, Lesot H. 1998. Correlation between apoptosis distribution and bmp-2 and bmp-4 expression in vestigial tooth primordia in mice. *European Journal of Oral Sciences* 106:667-670.

- Peters H, Balling R. 1999. Teeth - where and how to make them. *Trends in Genetics* 15:59-65.
- Peyer B. 1968. *Comparative odontology*. Zangerl R, editor: University of Chicago Press.
- Porntaveetus T, Ohazama A, Choi HY, Herz J, Sharpe PT. 2012. Wnt signaling in the murine diastema. *European Journal of Orthodontics* 34:518-524.
- Primosch RE. 1981. Anterior supernumerary teeth--assessment and surgical intervention in children. *Pediatric Dentistry* 3:204-215.
- Prochazka J, Pantalacci S, Churava S, Rothova M, Lambert A, Lesot H, Klein O, Peterka M, Laudet V, Peterkova R. 2010. Patterning by heritage in mouse molar row development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:15497-15502.
- Rajab LD, Hamdan MA. 2002. Supernumerary teeth: Review of the literature and a survey of 152 cases. *International Journal of Paediatric dentistry* 12:244-254.
- Reif WE. 1982. Evolution of dermal skeleton and dentition in vertebrates - the odontode regulation theory. *Evolutionary Biology* 15:287-368.
- Renaud S, Pantalacci S, Auffray JC. 2011. Differential evolvability along lines of least resistance of upper and lower molars in island house mice. *Plos One* 6:1-9.
- Rozkovicová E, Marková M, Láník J, Zvářová J. 2004. Agenesis of third molars in young czech population. *Prague Medical Report* 105:35-52.
- Sarkar L, Sharpe PT. 1999. Expression of wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mechanisms of Development* 85:197-200.
- Seidel K, Ahn CP, Lyons D, Nee A, Ting K, Brownell I, Cao T, Carano RA, Curran T, Schober M, Fuchs E, Joyner A, Martin GR, de Sauvage FJ, Klein OD. 2010. Hedgehog signaling regulates the generation of ameloblast progenitors in the continuously growing mouse incisor. *Development* 137:3753-3761.

- Setkova J, Lesot H, Matalova E, Witter K, Matulova P, Misek I. 2006. Proliferation and apoptosis in early molar morphogenesis voles as models in odontogenesis. *International Journal of Developmental Biology* 50:481-489.
- Shigemura N, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Yamaza H, Akamine A, Sakai H. 1999. The distribution of brdu- and tunel-positive cells during odontogenesis in mouse lower first molars. *Histochemical Journal* 31:367-377.
- Smith JD. 1969. Hyperdontia: Report of case. *Journal of American Dental Association* 79:1191-1192.
- Smith MM, Coates MI. 1998. Evolutionary origins of the vertebrate dentition: Phylogenetic patterns and developmental evolution. *European Journal of Oral Science* 106 Suppl 1:482-500.
- Sofaer JA. 1969. Aspects of the tabby-crinkled-downless syndrome. I. The development of tabby teeth. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 22:181-205.
- Stock DW, Weiss KM, Zhao Z. 1997. Patterning of the mammalian dentition in development and evolution. *Bioessays* 19:481-490.
- Taylor GS. 1972. Characteristics of supernumerary teeth in the primary and permanent dentition. *The Dental Practitioner and Dental Record* 22:203-208.
- Tucker AS, Headon DJ, Courtney JM, Overbeek P, Sharpe PT. 2004. The activation level of the tnf family receptor, edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Developmental Biology* 268:185-194.
- 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* 312b:309-319.
- Tureckova J, Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Peterkova R, Ruch JV. 1996. Apoptosis is involved in the disappearance of the diastemal dental primordia in mouse embryo. *International Journal of Developmental Biology* 40:483-489.

- Ungar PS. 2010. Mammal teeth: Origin, evolution, and diversity. Baltimore, USA: Johns Hopkins University Press.
- Vaahokari A, Aberg T, Jernvall J, Keranen S, Thesleff I. 1996a. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mechanisms of Development* 54:39-43.
- Vaahokari A, Aberg T, Thesleff I. 1996b. Apoptosis in the developing tooth: Association with an embryonic signaling center and suppression by *egf* and *fgf-4*. *Development* 122:121-129.
- Vaahokari A, Vainio S, Thesleff I. 1991. Associations between transforming growth factor beta 1 rna expression and epithelial-mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. *Development* 113:985-994.
- Viriot L, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV, Peterka M, Peterkova R. 2000. The presence of rudimentary odontogenic structures in the mouse embryonic mandible requires reinterpretation of developmental control of first lower molar histomorphogenesis. *International Journal of Developmental Biology* 44:233-240.
- Viriot L, Peterkova R, Peterka M, Lesot H. 2002. Evolutionary implications of the occurrence of two vestigial tooth germs during early odontogenesis in the mouse lower jaw. *Connective Tissue Research* 43:129-133.
- Viriot L, Peterkova R, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV, Lesot H. 1997. Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction .3. Spatial distribution of mitoses and apoptoses up to bell-staged first lower molar teeth. *International Journal of Developmental Biology* 41:679-690.
- Woodward MF. 1894. On the milk dentition of the rodentia with a description of a vestigial milk incisor in the mouse (*Mus musculus*). *Anatomischer Anzeiger* 9:619-631
- Zonana J, Jones M, Browne D, Litt M, Kramer P, Becker HW, Brockdorff N, Rastan S, Davies KP, Clarke A, et al. 1992. High-resolution mapping of the x-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (*eda*) locus. *American Journal of Human Genetics* 51:1036-1046.