

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Autoreferát disertační práce

Časná morfogeneze dolních tvářových zubů u myši
s genovými defekty

Mgr. Svatava Lagronová

Praha, 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program:	Antropologie
Předseda oborové rady:	Prof. PhDr. Jan Sokol, CSc., Ph.D.
Školící pracoviště:	Oddělení teratologie ÚEM AVČR, v. v. i.
Autor:	Mgr. Svatava Lagronová
Školitel:	MUDr. Renata Peterková, CSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Cíle a hypotézy	7
3. Materiál a metody	7
4. Výsledky	8
5. Diskuze	9
6. Závěry	11
7. Introduction.....	12
8. Aims and hypothesis	13
9. Materials and Methods.....	14
10. Results.....	15
11. Discussion	16
12. Conclusions.....	17
13. Seznam publikací autora	19
14. Seznam použité literatury	20

Anotace

Lidská i myší dentice je redukována co do počtu zubů oproti původnímu zubnímu vzorci saveců. 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 porovnán 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 v zubním epitelu 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.

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 teeth 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.

1. Úvod

Více než 20% lidí trpí různými anomáliemi v počtu zubů včetně chybění třetího moláru (Fleischmannova et al., 2008). Příkladem takové anomálie je hyperodoncie – nadpočetné zuby. Nadpočetný zub se vyskytuje nejčastěji jako nadpočetný zevní řezák, nebo jako malý zub vklíněný mezi vnitřní řezáky v horní čelisti (mesiodens). V dolní čelisti se pak nadpočetný zub vyskytuje nejčastěji v oblasti premolárů. U lidí bývá hyperodoncie spojována s mutací v genu *Runx2*, který spolupracuje s Fgf a Wnt signální dráhou. Jeho mutace způsobuje autosomálně dominantně dědičný syndrom kleidokraniální dysplázie (Fleischmannova et al., 2008).

Anomálie v počtu zubů se vyskytují nejen u člověka, ale i u jiných savců. Díky sledování vzniku nadpočetných zubů na zvířecím modelu je možné hledat spojitosti v základním principu vzniku nadpočetného zubu a jeho genové regulaci v savčí a lidské dentici. K takovému výzkumu je výhodný myší model. Myš má ve své dentici jeden incisor oddělený bezzubou oblastí (diastemou) od tří molárů. V embryonální myší dentici se objevují také základy ztracených premolárů v podobě velkých diastemových pupenů (nazývaných MS, R1 a R2), (Peterkova et al., 1996, 2006). Nadpočetný zub v tvářové dentici dolní čelisti vzniká před prvním molárem např. u *Tabby* mutantních myší (Gruneberg, 1965; Sofaer, 1969) nebo *Sprouty* mutantních myší (Klein et al., 2006). Vývoj nadpočetných zubů je tedy typický u myší s poruchou v genech *Sprouty*, *Eda* (*Tabby* myši) apod., které ovlivňují Fgf i Wnt signální dráhu (Klein et al., 2006). Předpokládá se, že nadpočetný zub před prvním molárem (M1) vzniká z rudimentárního základu premolárové dentice (Peterkova, 1983; Peterkova et al., 2002, 2006).

Cíle disertační práce směřovaly k ověření hypotézy: Při vývoji nadpočetných zubů u mutantních myší se uplatňuje revitalizace rudimentárních primordií zubů potlačených během evoluce.

2. Cíle a hypotézy

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

3. Materiál a metody

Pro disertační práci byly použity myši CD1 (jako wild type) a myši s mutací v genech *Sprouty2* a/nebo *Sprouty4* a *Eda* (tzv. *Tabby* myši). Embrya a féty byly odebírány v přesných časových intervalech na embryonálním dnu (ED) 12,3 – 18,5 (poledne po ranní detekci vaginální zátky = ED 0,5). Zárodky byly váženy ihned po odběru (Peterka et al, 2002). Kombinace chronologického (ED) a biologického (tělesná hmotnost) stádiování umožnila získat detailní vývojovou řadu zubního vývoje. Hlavičky nebo čelisti embryí byly fixovány ve fixačních tekutinách Bouin, Bouin-Hollande nebo 4% paraformaldehyd (PFA), byly zality do parafínu a na mikrotomu byly zhotoveny sériové frontální řezy o síle 5-7 μ m. Sériové řezy byly

obarveny modifikovanou Maloryho metodou (alcianová modř- hematoxylin-eozin). Vybrané řezy byly snímány digitální kamerou pod zvětšením 200-500x. Hodnocen byl tvar a velikost zubního epitelu v tvářové oblasti dolní čelisti nebo v incisorové oblasti horní čelisti a počítána apoptotická tělíska, a mitotické buňky v zubním epitelu. V tvářové oblasti byly hodnoceny tři regiony - v rudimentárním primordiu MS a R2 a v prvním moláru (M1). V incisorové oblasti byl hodnocen každý pátý řez po celé délce dentálního epitelu. Část embryí byla použita k detekci exprese genu *Shh* v celých čelistech (metoda whole mount in situ hybridizace - WISH). U jiných embryí byla vytvořena 3D rekonstrukce zubního epitelu. Pro statistické hodnocení byla použita analýza ANOVA a Fisherův exaktní test.

4. Výsledky

Morfologická analýza raných stádií dolních tvářových zubů u myši *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}* potvrdila výskyt nadpočetného zubního primordia u obou mutantních kmenů. U *Spry4^{-/-}* se nadpočetný zub začal tvořit u všech embryí již na stádiu ED13,5, ale na stádiu ED14,5 bylo nadpočetné zubní primordium nalezeno již jen v 70% čelistních kvadrantů. Počet nadpočetných zubních primordií nadále klesal až k výsledné frekvenci 2% v dospělé myši dentici. U *Spry2^{-/-}* embryí byl nadpočetný zub bezpečně detekovatelný až na stádiu ED15,5, kdy se vyvíjel u všech embryí. Počet nadpočetných zubů u tohoto mutantního kmenu postupně klesal až na 26% v dospělé dentici.

Oproti kontrolním embryím byla u obou mutantních kmenů zjištěna signifikantně snížená apoptóza v epitelu rudimentárních zubních pupenů MS a R2 na stádiích ED12,5 a 13,5. U *Spry2^{-/-}* embryí byl navíc nalezen signifikantně zvýšený mitotický index v MS a R2 na ED12,5 a v R2 na ED13,5.

V období ED12,7-14,3 byla popsána exprese *Shh* u kontrolních myši, kde se objevuje postupně v MS, R2 a M1 pupenu. Tato období výskytu *Shh* exprese byla oddělena periodami, kdy exprese nebyla detekována (Prochazka et al., 2010). U *Spry*

mutantních myši jsme našli *Shh* expresi i v obou negativních periodách, což vypovídá o prodloužení exprese *Shh* v MS i R2 pupenu u mutant s vývojem nadpočetného zubního primordia před M1.

U myši s vyřazenými oběma geny *Spry2* i *Spry4* (*Spry2^{-/-}*; *Spry4^{-/-}*) se objevily dokonce dva pupeny nadpočetných zubů na stádiu ED16,5. Jejich poloha odpovídá poloze rudimentů MS a R2. Apoptotický i mitotický index se podobal jednoduchým *Spry* mutantům jen s rozdílem zvýšené proliferace v regionu MS na ED13,5.

V incisorové oblasti se vyskytuje u dospělých myši *Spry2^{+/-}*; *Spry4^{-/-}* zdvojený horní incisor. Změny vedoucí ke zdvojení řezáku se začaly projevovat na stádiu ED13,5. Na stejném stádiu u vývojově pokročilejších embryí byl také nalezen signifikantně zvýšený mitotický index a snížený apoptotický poměr v epitelu řezákového primordia u mutantních myši oproti myším kontrolám. U myši na mladších nebo starších vývojových stádiích nebyly nalezeny signifikantní změny proliferace v řezákovém epitelu ve srovnání s kontrolou.

Při porovnání morfogeneze raných stádií *Tabby* myši a *Spry* mutantních myši jsme našli podobnosti vývoje nadpočetného zubu. U *Spry4^{-/-}* myši (ED13,5) a *Tabby* myši (ED 14,5) se objevil pohárek nadpočetného tvářového zubu. Pohárek měl kulatý tvar a na histologických řezech vykazoval shodně u obou mutant linguální sklon.

5. Diskuze

V průběhu zubního vývoje hraje důležitou roli buněčná proliferace a buněčná smrt (apoptóza). V zadní části dolní diastemy je apoptóza specificky koncentrována a napomáhá zastavení růstu velkých rudimentárních (premolárových) pupenů MS a R2 (Viriot et al, 2000). Toto specifické zvýšení apoptózy nebylo přítomno u *Spry2^{-/-}* a *Spry4^{-/-}* embryí na ED12,5 v MS a v R2 a na ED13,5 v R2.

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 přední části

zubního epitelu a druhá je lokalizována více vzadu - na vrcholu zubního pupenu (Shigemura et al., 1999). Na základě našich nálezů lze tato data interpretovat tak, že přední a zadní BrdU negativní oblast popsána Shigemurou (1999) koresponduje s MS a R2 rudimentem. Při kvantitativní analýze jsme u kontrolních WT myši skutečně našli snížený mitotický index v MS a R2 rudimentu v porovnání s mitotickým indexem nalezeným ve vyvíjející se M1 oblasti. Naopak u *Spry2*^{-/-} myši se mitotický index v rudimentech i v oblasti M1 nelišil signifikantně od oblastí M1 u kontrolních embryí na stádiích ED12,5 i 13,5. Chybění snížení proliferace a/nebo chybění zvýšení apoptózy v rudimentárních pupenech naznačuje jejich revitalizaci, která je předpokladem pro vznik nadpočetného zubu u *Spry* mutantních myši. Na základě korelace těchto výsledků s literárními daty jsme navrhli hypotetický model o úloze *Spry2* při navození růstové zástavy rudimentárního zubního pupenu u WT myši a při jeho revitalizaci u *Spry* mutant.

Signifikantní snížení apoptózy a zvýšení proliferace jsme našli také při vývoji nadpočetného řezáku u myši *Spry2*^{+/-}; *Spry4*^{-/-}.

U myši se spontánní mutací v genu *Eda* (*Tabby* myši) byl již dříve popsán nadpočetný tvářový zub před M1 (Sofaer, 1969). Na raných stádiích jsme našli podobnost mezi morfologickým vývojem tvářové dentice v dolní čelisti u embryí *Tabby* a *Spry4*^{-/-} mutantních myši. Předčasně vytvořený pohárek zřetelně oddělený od zubního základu M1 u obou těchto myších kmenů nám naznačuje možnost, že vývoje nadpočetného pohárku se účastní především MS rudiment, který mírně potlačuje růst R2 a tím vzniká mezera mezi nadpočetným pohárkem a M1.

Velké rudimentární pupeny před M1 u myši jsou interpretovány jako rudimentární základy premolárů, které během evoluce myšovitých hlodavců vymizely (Peterkova et al., 1996, 2006), a které mohly být využity při tvorbě jejich komplexnějšího M1 (Adloff, 1898). Tomu nasvědčuje inkorporace a zapojení rudimentárního základu premolárů při vývoji M1 i jeho předpokládané znovu-osamostatnění při tvorbě nadpočetného zubu u myši (Peterkova, 1983; Peterkova et al., 2006). Proto jsme v této práci hodnotili také M1 z hlediska počtu hrbolků a jejich uspořádání v dospělé

dentici. *Spry* mutované dospělé myši měly buďto zvýšený nebo snížený počet hrbolků v přední části M1, což napovídá o dvou možnostech: buď začlenění revitalizovaného pupenu do přední části M1, nebo naopak jeho osamostatnění a autonomnímu vývoji za vzniku primordia nadpočetného zubu.

6. 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.

7. Introduction

More than 20% human suffer by disturbances in tooth number, including the absence of the third molar (Fleischmannova et al., 2008). An example of such a disturbance is hyperodontia – a presence of a supernumerary tooth. Supernumerary tooth most frequently appears in the human upper jaw - as a supernumerary lateral incisor or as a small tooth inserted between medial incisors (mesiodens). In lower jaw, the supernumerary tooth is most frequent in premolar area (Galluccio et al., 2012). In human, the hyperodontia is often related to a mutation in the *Runx2*, which cooperates with the Fgf and Wnt signalling pathway. Its mutation causes autosomally dominant syndrom of kleidocranial dysplasia in human patients (Fleischmannova et al., 2008).

Anomalies in tooth number occur not only in human, but also in other mammals. That is why studies on the origin of a supernumerary tooth using an animal model can help in finding general principles of supernumerary tooth development and a relationship between its morphogenesis and gene regulation in mammals or human dentition. The mouse odontogenesis is a very convenient model for such studies. Mouse has one incisor and three molars separated by toothless gap called diastema. In

addition, large rudimentary tooth primordia (called MS, R1, R2) appear in mouse embryos, presumably corresponding to premolars lost during murid evolution (Peterkova et al., 1996, 2006). Supernumerary tooth in the cheek region of mandible occurs anteriorly to the first molar (M1) for example in *Tabby* mouse (Gruneberg, 1965; Sofaer, 1969) or *Spry* mutant mice (Klein et al, 2006). Development of supernumerary teeth is typical for the mice with mutation in *Spry* or *Eda* (*Tabby* mice) genes, which cooperate with Fgf and Wnt signaling pathways (Klein et al., 2006). It is supposed that the supernumerary tooth located anteriorly to the M1 takes its origin from the rudimentary anlage of premolar dentition (Peterkova, 1983; Peterkova et al, 2002, 2006).

The aims of the thesis were focused to verifying the hypothesis: Development of the supernumerary teeth in mutant mice is based on the revitalization of the rudimentary primordia of the teeth suppressed during evolution.

8. Aims and hypothesis

1. To compare early development of the rudimentary (premolar) tooth primordia and the first molar in *Spry2*^{-/-} a *Spry4*^{-/-} mutant mice and wild type (WT) mice. To confirm the hypothesis, that the development of a supernumerary tooth in mutant mice is based on the revitalization of rudimentary tooth primordia accompanied by increase in proliferation and/or decrease in apoptosis.
2. To describe the morphogenesis of the supernumerary tooth in mice with missing both *Spry2* and *Spry4* genes (*Spry2*^{-/-};*Spry4*^{-/-} mice) and to compare the results with the origin of the supernumerary tooth in *Spry2*^{-/-} or *Spry4*^{-/-} mice.

3. To confirm the hypothesis, that increase in proliferation and/or decrease in apoptosis are implicated in the development of the double incisor in *Spry2*^{+/-}; *Spry4*^{-/-} mice.
4. To compare development of the cheek dentition with a supernumerary tooth in *Spry2*^{-/-} or *Spry4*^{-/-} mutant mice and in *Tabby* mice.

9. Materials and Methods

The CD1 mice (as controls) and the mice with mutant *Spry2* and/or *Spry4* genes or *Eda* gene (*Tabby* mice) were used for this thesis. Mouse embryos and foetuses were removed in precise time intervals during embryonic day (ED) 12.3 – 18.5 (noon after the morning detection of a vaginal plug = ED 0.5). Immediately after taking the embryo or foetus out of the uterus, its wet body weight was determined (Peterka et al, 2002). Combination of chronological (ED) and biological (body weight) staging helped us to get detailed series of stages of tooth development. Heads or jaws of embryos or foetuses fixed in Bouin, Bouin-Hollande or 4% PFA fluid were routinely embedded in paraffin and cut in series of 5-7 µm thin frontal sections coloured with alcian blue–hematoxylin–eosin or nuclear fast red. Selected sections were photographed (magnification 200 – 500x) by a digital camera. The shape and size of dental epithelium were evaluated in the cheek area of the lower jaw and incisor area of the upper jaw. The apoptotic cells and bodies and mitotic cells were counted in tooth epithelium. Three regions were evaluated in the cheek area of mandible representing the rudimentary primordium MS, rudimentary primordium R2, and primordium M1. Every fifth section along the whole length of dental epithelium was evaluated in incisor area. Representative samples were used for detection of *Shh* expression by whole mount *in situ* hybridization (WISH). Part of the specimens was used for making 3D models of dental epithelium using computer assisted method. ANOVA and Fisher's exact test were used for statistical evaluation.

10. Results

Morphological analysis of the early stages of the lower cheek teeth in *Spry2*^{-/-} and *Spry4*^{-/-} confirmed the presence of the supernumerary tooth primordium in both mutant strains. Supernumerary tooth started to develop in all *Spry4*^{-/-} embryos at stage ED13.5, but it was present only in 70% of jaw quadrants of *Spry4*^{-/-} embryos at the stage ED14.5. The number of the supernumerary tooth primordia decreased during further development till only 2% of quadrants with the supernumerary tooth in adult mice. The supernumerary tooth was undoubtedly detected in *Spry2*^{-/-} embryos at ED 15.5, where it was present in all lower jaw quadrants. Its number also progressively decreased to 26% of the lower jaw quadrants with the supernumerary tooth present in adult *Spry2*^{-/-} mice.

In contrast to the WT mice, there was significantly decreased apoptosis in dental epithelium of the rudimentary buds MS and R2 in both mutant strains at the stages ED12.5 and 13.5. Significantly increased mitotic index was found in MS and R2 at ED12.5 and R2 at ED13.5 in *Spry2*^{-/-} embryos.

Expression of *Shh* has been described in WT mice to progressively appear in MS, R2 and M1 during the stages ED12.7 – 14.3. The periods of the expression are separated by negative periods when no *Shh* expression appears in dental epithelium (Prochazka et al., 2010). We detected *Shh* expression in both negative periods in *Spry* mutant embryos, which gave evidence about prolongation of expression in MS and R2 buds in the embryos with developing supernumerary tooth primordia anteriorly to M1.

Two supernumerary tooth buds were found in *Spry* double knock out mice (*Spry* DKO mice) where the activity of both *Spry2* and *Spry4* genes is missing (*Spry2*^{-/-}; *Spry4*^{-/-}). The supernumerary tooth buds appeared in the area of the MS and R2 rudiments at ED16.5. Apoptotic rate and mitotic index were similar in *Spry* DKO mutants as in the simple *Spry2* and *Spry4* mutant mice; the only difference was the increased mitotic index in MS at ED13.5 in the *Spry* DKO mice.

Double incisor was present in the upper incisor area in *Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}* adult mice. The changes resulting in the origin of a double incisor started to be visible at ED13.5. Developmentally more advanced embryos at ED13.5 showed significantly increased mitotic index and significantly decreased apoptotic rate in comparison to WT embryos in the epithelium of the incisor bud. No significant changes in proliferation were found in younger or older embryos.

Similarities in development at early stages of odontogenesis were found in the cheek region of mandible of *Tabby* mice and *Spry* mutant mice. The supernumerary cheek tooth cap appeared at ED13.5 in *Spry4^{-/-}* mice and at ED14.5 in *Tabby* mice. This cap had a round shape and lingual inclination visible on histological sections.

11. Discussion

Cell proliferation and cell death (apoptosis) play an important role during tooth development in WT mice. In mouse embryonic mandible, the apoptosis is specifically concentrated in the posterior part of diastema and it helps to stop the growth of the large rudimentary (premolar) buds MS and R2 (Viriot et al, 2000). Such a specific concentration of apoptosis was not present in *Spry2^{-/-}* and *Spry4^{-/-}* embryos at ED12.5 in MS and in R2 and at ED13.5 in R2.

Mitotic cells are distributed along the whole dental epithelium in the cheek region of mandible at ED12.5 (Viriot et al., 1997). Cell division stops in two separated areas (BrDU negative) at ED13.5. The first area is located in the anterior part of the dental epithelium and the second area is located posteriorly at the top of a large dental bud (Shigemura et al., 1999). According our data the first and second areas described by Shigemura (1999) corresponded to the MS and R2 buds, respectively. In WT mice, we indeed found a decreased mitotic index in MS and R2 buds in comparison to mitotic index in developing M1 region. In contrast, the mitotic index in the MS, R2 or in M1 region in *Spry2^{-/-}* mice was as high as in the M1 area in WT embryos at stages ED12.5 and 13.5. In *Spry* mutant mice, the absence of decrease in proliferation and/or increase

in apoptosis in the rudimentary buds indicated their revitalization, implicated in the origin of the supernumerary tooth.

Significant decrease of apoptosis and increase of proliferation were also found during origin of the double incisor in *Spry2^{+/-}*; *Spry4^{-/-}* mice.

Mice with the spontaneous mutation in *Eda* gene (*Tabby* mice) have a supernumerary tooth anteriorly to the M1 in their cheek dentition (Sofaer, 1969). We found similarities in development of lower cheek teeth in *Tabby* mice and *Spry4^{-/-}* mice at early stages. Early cap of a supernumerary tooth was obviously separated from the M1 primordium in both mice strains. The existing gap between the supernumerary tooth and M1 suggests, that MS might play a major role in the supernumerary tooth development, while it slightly inhibits growth of the R2 rudiment.

The large rudimentary buds in front of the M1 in mice are interpreted as primordia of the premolars that had disappeared during evolution of Muridea (Peterkova et al., 1996, 2006), and that presumably might be utilized to make a more complex M1 (Adloff, 1898). This hypothesis is supported by the behaviour of the rudimentary premolar primordia: their incorporation into developing M1 in WT mice, as well as their getting independence back during supernumerary tooth development in mutant mice (Peterkova, 1983; Peterkova et al., 2006). That's why we also evaluated the shape and complexity of the M1 in adult dentition in *Spry* mutants. The M1 of these mice had either increased or decreased number of cusps. It suggested two possibilities: incorporation of the partly revitalized rudimentary premolar bud into M1 or independent (autonomous) development of the revitalized rudiment, which gives rise to a supernumerary tooth primordium.

12. Conclusions

1. Early development of rudimentary (premolar) tooth primordia and the first molar was compared in *Spry2^{-/-}* and *Spry4^{-/-}* mice and WT mice. During development of the supernumerary cheek tooth in *Spry2^{-/-}* and *Spry4^{-/-}* mice

the rudimentary tooth primordia revitalized and contributed to its development. The revitalization was associated with the increase of proliferation and/or decrease of apoptosis, and with a prolongation of the expression of the *Shh* gene in tooth epithelium.

2. Morphogenesis of supernumerary tooth in DKO mice with missing both *Spry2* and *4* gene (*Spry2*^{-/-};*Spry4*^{-/-}) was described and compared to the development of a supernumerary tooth in *Spry2*^{-/-} or *Spry4*^{-/-} mice. Although the DKO *Spry* mice do not survive till postnatal period. However, they exhibited two supernumerary tooth caps in front of the lower first molar during prenatal development. The results suggest that both MS and R2 become independent and give rise to two supernumerary tooth primordia.
3. Increase of proliferation and/or decrease of apoptosis were found during the development of a double incisor in *Spry*^{+/-}*Spry4*^{-/-} mice. Its whole volume of dental epithelium was not changed in comparison to WT mice. However, the epithelial septum was created inside the enamel organ, which thus comprised two papillae and gave rise to two incisors..
4. Development of the cheek dentition with the supernumerary tooth was compared in *Spry2*^{-/-} and *Spry4*^{-/-} mice and in *Tabby* mice. Development of the supernumerary tooth in *Tabby* mice was similar to the development of the supernumerary tooth in *Spry4*^{-/-} mice, which was connected to the revitalization of the MS rudiment.

The results of the thesis confirmed the hypothesis: Development of the supernumerary teeth in mutant mice is based on the revitalization of the rudimentary primordia of the teeth suppressed during evolution.

13. Seznam publikací autora

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. 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**
3. 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**
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**

14. Seznam použité literatury

Adloff P. 1898. Zur Entwicklungsgeschichte des Nagetiergebisses. Jenaer Zeitsch Naturwiss 32:347-411.

Edwin F, Patel TB. 2008. A novel role of sprouty 2 in regulating cellular apoptosis. Journal of Biological Chemistry 283:3181-3190.

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. Archives of Oral Biology 57:918-930.

Gruneberg H. 1965. Genes and genotypes affecting the teeth of the mouse. Journal of embryology and experimental morphology 14:137-159.

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.

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, 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, Kristenova P, Lesot H, Lisi S, Vonesch JL, Gendrault JL, Peterka M. 2002. 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.

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.

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.

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.

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.

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.