

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Antropologie a genetika člověka
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Mgr. Kateřina Lochovská

ÚLOHA RUDIMENTÁRNÍCH STRUKTUR V ODONTOGENEZI

THE ROLE OF RUDIMENTARY STRUCTURES IN ODONTOGENESIS

Dizertní práce

Vedoucí dizertní práce: Mgr. Mária Hovová, PhD.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohláuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Současně prohlašuji, že tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Kateřina Lochovská

Podkování

Ráda bych podkovala své kolitelce Mgr. Márii Hovovákové, Ph.D. za vedení této a p ede-lých prací, za její nekone nou podporu, pomoc, ochotu a trp livost a za léta strávená pod jejími kolitelskými k ídly.

Dále d kuji MUDr. Renat Peterkové, CSc. za cenné a bohaté rady, kritické p ipomínky od za átku afl do konce mého studia a za neutuchající nad-ení z v decké práce. Také d kuji bývalému vedoucímu odd lení Teratologie Doc. MUDr. Miroslavu Peterkovi, DSc. za mofnost zapojit se do práce na jeho odd lení.

Také d kuji v-em koleg m z odd lení Teratologie, bez kterých si své v decké za átky nedovedu p edstavit a kte í vytvo ili velmi p íjemné a zároveň motivující pracovní prost edí.

V neposlední ad pat í podkování mé rodin a p átel m za podporu, pochopení a shovívavost v pr b hu celého studia.

Finan ní podpora:

Tato práce vznikla na základ finan ní podpory Grantové agentury eské republiky (GAP305/12/1766).

Obsah

ABSTRAKT	7
KLÍČOVÁ SLOVA	8
ABSTRACT	9
KEY WORDS	10
SEZNAM ZKRATEK	11
1 ÚVOD	14
1.1 ZUBNÍ VÝVOJ - MORFOGENEZE	14
1.2 STRUKTURY ZUBNÍHO ZÁRODKU	17
1.2.1 ENAMEL KNOT – SKLOVINNÝ UZEL	18
1.2.2 CERVICAL LOOP – ZUBNÍ KLIČKA A KMENOVÉ BUŇKY	19
1.3 MOLEKULÁRNÍ KONTROLA VÝVOJE ZUBU	20
1.3.1 WNT SIGNALIZACE	20
1.3.2 FGF SIGNALIZACE	23
1.3.3 TGFB SIGNALIZACE	26
1.3.4 HH SIGNALIZACE	27
1.3.5 SKLOVINNÝ UZEL – SIGNÁLNÍ CENTRUM VÝVOJE ZUBU	29
1.4 ZUBNÍ VZOREC	31
1.4.1 TEORIE VZNIKU VÍCEHRBOLKOVÝCH ZUBŮ	33
1.4.2 LIDSKÁ DENTICE	34
1.4.3 MYŠÍ DENTICE	37
1.4.4 LIDSKÉ NADPOČETNÉ ZUBY	37
1.4.5 MYŠÍ DENTICE MODELEM PRO STUDIUM ODONTOGENEZE U ČLOVĚKA	39
1.5 RUDIMENTY	40
1.5.1 ZUBNÍ RUDIMENTY U ČLOVĚKA	41
1.5.2 ZUBNÍ RUDIMENTY U MYŠI	41
1.6 NEJASNOSTI V OBLASTI ZUBNÍHO VÝVOJE	43
2 CÍLE	45
3 MATERIÁL	46
3.1 POUŽITÉ KMENY MYŠÍ	46

4	METODY	51
4.1	ODBĚR EMBRYÍ	51
4.2	DISOCIACE DENTÁLNÍHO EPITELU A FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE	51
4.3	SLEDOVÁNÍ BUNĚČNÝCH LINIÍ	52
4.3.1	IN VITRO KULTIVACE TKÁŇOVÝCH ŘEZŮ	52
4.3.2	CRE-LOXP SYSTÉM	54
5	VÝSLEDKY	57
5.1	ŘEZÁKOVÁ OBLAST – NORMOGENEZE	57
5.2	BUŇKY ODONTOGENNÍHO EPITELU V ZÁKLADU <i>VESTIBULUM ORIS</i>	61
5.3	MOLÁROVÁ OBLAST – NORMOGENEZE	64
5.4	DYNAMIKA <i>SHH</i> EXPRESE JE OVLIVNĚNA <i>SPROUTY</i> GENY	66
5.4.1	NESPLYNUTÍ <i>SHH</i> EXPRESNÍCH DOMÉN PODMIŇUJE REVITALIZACI R2 RUDIMENTU	68
5.5	OSUD BUNĚK EXPRIMUJÍCÍCH <i>SHH</i> V NADPOČETNÉM ZUBNÍM PRIMORDIU	70
5.6	<i>SHH</i> EXPRESE V TVÁŘOVÉ OBLASTI BĚHEM EMBRYONÁLNÍHO VÝVOJE	71
5.6.1	HORNÍ ČELIST	72
5.6.2	DOLNÍ ČELIST	73
5.7	VÝVOJ ZUBNÍCH HRBOLKŮ	76
5.8	CERVIKÁLNÍ KLIČKA	81
6	DISKUZE	84
6.1	ŘEZÁKOVÁ OBLAST	84
6.1.1	DVĚ ODLIŠNÉ <i>SHH</i> POZITIVNÍ OBLASTI V OBLASTI BUDOUCÍCH ŘEZÁKŮ	85
6.2	OBLAST PŘEDSÍNĚ ÚSTNÍ – <i>VESTIBULUM ORIS</i>	88
6.3	MOLÁROVÁ OBLAST	94
6.3.1	VZNIK PRIMÁRNÍHO SKLOVINNÉHO UZLU	94
6.3.2	NARUŠENÁ FÚZE R2 A M1 <i>SHH</i> EXPRESNÍCH DOMÉN VEDE KE VZNIKU NADPOČETNÉHO ZUBNÍHO PRIMORDIA	96
6.3.3	VLIV DÁVKY <i>SPROUTY</i> GENŮ NA VZNIK NADPOČETNÉHO ZUBNÍHO PRIMORDIA	97
6.3.4	ZASTAVENÍ VÝVOJE NADPOČETNÉHO ZUBNÍHO PRIMORDIA U <i>SPRY</i> MUTANTNÍCH MYŠÍ	99
6.4	VÝVOJ ZUBNÍCH HRBOLKŮ	101
6.5	SHRnutí	106

7	ZÁVĚRY	108
8	SEZNAM PUBLIKACÍ A POPIS PARTICIPACE AUTORKY	111
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	113
9.1	INTERNETOVÉ ZDROJE	113
9.2	LITERÁRNÍ ZDROJE	113

ABSTRAKT

Organogeneze *in vivo* probíhá na základě časo-prostorových vývojových procesů, které závisí na chování buněk, například na jejich růstu, migraci, diferenciaci a mezibuněčných interakcích. Takové chování je regulováno patrně i novou péchodnou expresí různých signálních molekul. Navzdory výraznému pokroku terapeutických strategií, stále nebylo odhaleno tajemství vývoje biologické náhrady poškozeného nebo chybějícího zubu. V tomto kontextu poskytují zvířecí modely mocný nástroj umožňující studium normogeneze i patogeneze zubu jak v rámci základního tak i aplikovaného výzkumu.

Časný vývoj zubu sdílí podobné morfologické i molekulární znaky s ostatními ektodermálními orgány. Zároveň jsou tyto znaky do značné míry konzervovány také mezidruhově, což je výhodné z hlediska použití modelových organismů. Zubní vzorec člověka i myši je proti společnému předkovi redukován, přesto se u obou objevují jak zuby jednoduché, tak i zuby vícehrbkové. Zároveň byly u obou nalezeny struktury označené jako rudimentární. Tyto struktury jsou během ontogenetického vývoje potlačeny a nebývají jim tedy obecně přisuzována zásadní funkce. Základním cílem předložené práce tedy bylo prostudovat zubní rudimenty detailněji a odhalit jejich funkci v odontogenezi.

Tato práce předkládá nové interpretace v oblasti časně zubní normogeneze, na které by měl být brán zřetel při studiu vzniku dentálních patologií. Podařilo se nám prokázat, že během fyziologického vývoje se na vzniku primárního sklovinného uzlu (pEK) podílí buňky zubního rudimentu (R2) a teprve po zapojení těchto buněk vzniká pEK jako signální centrum první stoličky. Signální události v určité oblasti elistí tedy neodpovídají pouze základním budoucím funkcím zubu, což odporuje obecně přijímanému konceptu. Kromě přímého příspěvku buněk k vývoji funkčního zubu mohou mít zubní rudimenty a jejich signalizace také iniciační funkci, tedy, že iniciují vývoj primordia funkčního zubu, jako je zde ukázáno například v ezákové oblasti myši. Zubní rudimenty si zachovávají svůj odontogenní potenciál, který může být za patologických podmínek obnoven. Výsledkem může být perzistence základu zubního rudimentu, který by za normálních podmínek zanikl, s následným vznikem nadpočetného zubu. Tyto výsledky mohou pomoci při pochopení mechanismů regulace zubního vývoje nebo při tvorbě nových terapeutických přístupů k léčbě patologií dentice.

KLÍČOVÁ SLOVA

Vývoj zubu, nadpo etný zub, zubní rudiment, sklovinný uzel, Sonic Hedgehog

ABSTRACT

In vivo organogenesis is based on the temporal-spatial developmental processes that depend on cell behaviour, for example on their growth, migration, differentiation and intercellular interactions. Such behaviour is regulated by appropriate transient expression of various signalling molecules. Despite the significant advances in therapeutic strategies, the secret of the development of the biological replacement of a damaged or missing tooth has not yet been revealed. In this context, animal models provide a powerful tool for studying tooth normogenesis and pathogenesis in both basic and applied research.

Early development of the tooth shares similar morphological and molecular features with other ectodermal organs. At the same time, these features are largely preserved also between species, which is advantageous for the use of model organisms. The dental formula of both: the human and the mouse are reduced against a common ancestor, but both groups of organisms evince simple as well as multicusped teeth. In both, structures called rudimentary were found. These structures are suppressed during ontogenetic development and generally they are not attributed to essential functions. That is why we aimed to study dental rudiments in detail and reveal their function in odontogenesis.

This work presents new interpretations in the field of early dental normogenesis, which should be taken into account in studies on dental pathologies. We have shown that during the physiological development of the primary enamel knot (pEK), cells of tooth rudiment (R2) are involved in its formation, and only after the inclusion of these cells the pEK is formed as a signalling centre of the first molar (M1). Thus, signalling events in a certain area of jaws do not only correspond to the primordium of future functional teeth, what the generally accepted concept contradicts. Besides the direct contribution of cells to the development of the functional tooth, the dental rudiments and their signalling may also possess an initiating function. It means that they trigger the development of the primordium of future functional tooth, as has been shown here in the incisor region of mice. The tooth rudiments maintain their odontogenic potential, which can be reactivated under pathological conditions, resulting in the persistence of the rudimentary tooth primordium, which would disappear normally, with the consequent formation of a supernumerary tooth. These results can help with understanding the mechanisms of dental regulation or with developing new therapeutic approaches to the treatment of dental pathologies.

KEY WORDS

Tooth development, supernumerary tooth, tooth rudiment, enamel knot, Sonic Hedgehog

SEZNAM ZKRATEK

3D	Trojrozm rný (<i>Three-dimensional</i>)
-TrCP	<i>Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>
µm	Mikrometr
AC	Aksesorní zubní pohárek
AER	Apikální ektodermální výb flek/li-ta (<i>Apical ectodermal ridge</i>)
Ap	Aprismatický
APC	<i>Adematous polyposis coli</i>
BMP (Bmp2, 4, 7)	<i>Bone morphogenic protein</i>
Bp	pár báží (<i>base pair</i>)
BrdU	Bromodeoxyuridin
C	^T pi ák (<i>Caninus</i>)
c	Do asný (mlé ný) -pi ák
Ca ²⁺	Ionty vápníku
CCD	Kleidokraniální dysplasia
CFR	Epitelový základ tvá ového flábku (<i>Cheek-furrow ridge</i>)
Ci	<i>Cubitus interruptus</i>
CK1	<i>Casein kinase 1</i>
CL	Cervikální kli ka (<i>cervical loop</i>)
Cre	Cre recombináza
CVR	^T pi áková vestibulární li-ta (<i>Canine vestibular ridge</i>)
D1-5	Rudimentární primordia v oblasti horní diastemy (<i>Disappearing rudimental primordium 1-5</i>)
DAG	Diacylglycerol
dCFR	Epitelový základ tvá ového flábku dolní elisti (<i>cheek furrow ridge</i>)
DE	Dentální epitel
Dhh	<i>Desert Hedgehog</i>
DiI	<i>1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate</i>
DKO	<i>Double knock-out</i>
dM1	<i>Descendant M1</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dR2	<i>Descendant R2</i>
Dvl	<i>Dishevelled</i>
ED	Embryonální den
Eda	Ectodysplasin
Edar	Ectodysplasinový receptor
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EK	Sklovinný uzel (<i>enamel knot</i>)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
Ets	Rodina traksrip ních faktor (<i>E26 transformation-specific</i>)
<i>Evc</i>	Gen Ellis-van Creveld syndromu
f	Jáma (<i>Fossa</i>)
FGF (FGF3, FGF4, FGF10)	<i>Fibroblast growth factors</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factors receptor</i>
FI	Funk ní ezák

FRS2	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
Fz	Receptor <i>Frizzled</i>
g	Drážka, flábek (<i>groove</i>)
Gas1	<i>Growth arrest-specific protein 1</i>
GDF	<i>Growth differentiation factor</i>
Gli	<i>Glioma-associated oncogene family zinc finger</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK-3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
GTPázy	Enzymy schopné vázat a hydrolyzovat guanosintrifosfát (GTP)
HBD	<i>Hemoglobin subunit delta</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycan</i>
I	ezák (<i>Incisivus</i>)
Ihh	<i>Indian hedgehog homolog</i>
Int1	<i>Integrated1</i>
IP3	Inositol trisfosfát
ITVE	Nepravidelně ztlustlý vestibulární epitel (<i>Irregularly thickened vestibular epithelium</i>)
LacZ	-galaktosidasa
Lef	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LMVR	Laterální molárová vestibulární lišta (<i>Lateral molar vestibular ridge</i>)
LN	Laterální nasální výbůvek
LRP (Lrp5, Lrp6)	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein</i>
LVR	Labiální vestibulární lišta (<i>Labial vestibular ridge</i>)
M	Stolice/Molár (<i>Molar</i>)
M1	První molár
m ¹	Dočasný první molár horní čelisti
m ₁	Dočasný první molár dolní čelisti
M2	Druhý molár
m ²	Dočasný druhý molár horní čelisti
m ₂	Dočasný druhý molár dolní čelisti
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MC	Ústní koutek (<i>mouth corner</i>)
MD	Mandibula
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPK/ERK)</i>
mg	Miligram
MMVR	Mediální molární vestibulární lišta (<i>Medial molar vestibular ridge</i>)
MN	Mediální nasální výbůvek
mRNA	<i>Messenger ribonukleová kyselina</i>
MS	rudimentární primordium (<i>Mesial segment</i>)
MVR	Molární vestibulární lišta (<i>Molar vestibular ridge</i>)
MX	Maxila
ns	Nasální plakoda
o	Otvor
ORF	Otevřený čtecí rámec (<i>Open reading frame</i>)
P	Temporální zub (<i>Premolar</i>)

p	Prismatický
Pax9	<i>Paired box9</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCP	<i>Planar cell polarity</i>
PDE	Fosfodiesterasa
pEK	Primární sklovinný uzel (<i>primary enamel knot</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pi	Rudimentární ezák
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PKC	<i>Protein kinase C delta type</i>
PLC	Fosfolipáza C
PLC	<i>Phosphoinositide phospholipase C type</i>
PND	Postnatální den
PP2A	<i>Protein phosphatase 2</i>
Ptc	<i>Patched</i>
R1	Rudimentární primordium v horní elisti
R2	Rudimentární primordium v horní nebo dolní elisti
Raf	<i>Serine/threonine-protein kinase</i>
Ras	<i>Raspberry</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
Runx2	<i>Runt-related transcription factor2</i>
S	Nadpočetný zub (<i>supernumerary tooth</i>)
sEK	Sekundární sklovinný uzel (<i>secondary enamel knot</i>)
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
Smad (R-Smad, Co-Smad)	<i>Mothers against decapentaplegic (MAD) + small body size (SMA)</i>
Smo	<i>Smoothened</i>
Sos	<i>Son of Sevenless</i>
Sostdc1	<i>Sclerostin domain-containing protein 1, viz USAG-1, Wise</i>
Sox2	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
Spry (Spry2,Spry4)	<i>Sprouty</i>
st	Stomodeum
t	Hrbolek (<i>Tuberculum</i>)
Tbeta R (I a II)	<i>Transforming growth factor (TGF-) receptor</i>
TCF	<i>Transcription factor (hepatocyte nuclear factor)</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Tm	Tamoxifen
USAG-1	<i>Uterine Sensitization Associated Gene-1, viz Sostdc1, Wise</i>
UV	Ultra-fialové světlo (<i>Ultra violet (light)</i>)
VE	Vestibulární epitel
VL	Vestibulární lišta
VO	Přední ústní (<i>Vestibulum oris</i>)
Wg	<i>Wingless</i>
Wise	Ektodin, viz také Sostdc1, USAG-1
Wnt	<i>Wingless/Integrated óš Wintō</i>
WT	<i>Wild Type</i>
X-gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl- -D-galactopyranoside</i>
ZPA	<i>Zone of Polarizing Activity</i>

1 ÚVOD

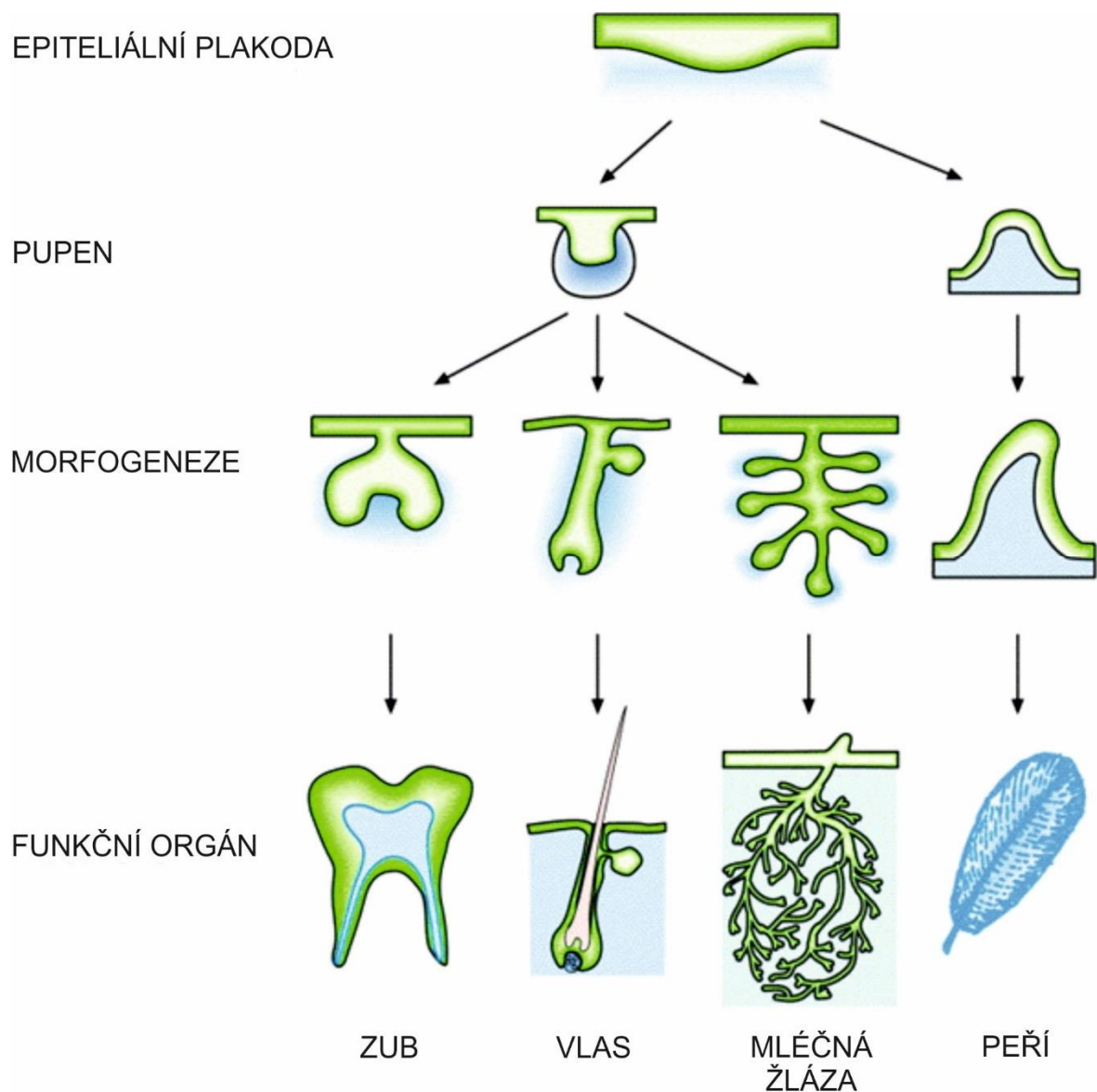
Zuby představují pro mnoho organismů nástroj pro zpracování potravy, pro obranu i útok. U člověka slouží také k artikulaci, dodávají obličeji výraz a mají i estetickou funkci. Během mnoha let studia zubů vzniklo odvětví nazývané se odontologie, které se zabývá jejich anatomií, vývojem ale i onemocněními a defekty. Vývoj dentice představuje obecný model pro studium mechanismů vývoje orgánových systémů a zároveň ostatních epitelových struktur, které procházejí podobnými morfogenetickými procesy jako zuby (vlasy, slinné, potní a mléčné flázy).

Bylo popsáno mnoho vývojových zubních vad nejen u člověka, například změna velikosti, tvaru, pozice a poloha zubů (Townsend *et al.*, 2012). U mnoha z dentálních patologií byli zároveň identifikováni původci v podobě genů (Klein *et al.*, 2013) a na základě těchto informací bylo vygenerováno mnoho nových modelů, umožňujících výzkum zubních vad bez nutnosti přímého studia lidského materiálu, což je například u lidského embryonálního materiálu v České republice nelegální a neetické.

Zuby mohou znamenat závažný problém i během pozdějších fází lidského života, proto se možnost bio-engineeringu zubu, který by nahradil chybějící nebo zničený zub, jeví jako velmi atraktivní a slibující. K tomu je nutné rozvíjet znalosti o embryonálním vývoji, molekulárních mechanismech, kmenových buňkách a také ověření inženýrství. Možnost špičkových zubní tkáň by mohla změnit stomatologii a nahradit dosud používané substituívané materiály. Navíc stejnou techniku by bylo možné použít k hojení ran a regeneraci kostí, kůže a svalů (Alfaqeeh and Tucker, 2013).

1.1 ZUBNÍ VÝVOJ - MORFOGENEZE

Epiteliální a mesenchymální interakce hrají zásadní roli v organogenezi mnoha tkání (například vlasy, mléčné flázy, končetinové pupeny, zuby) (Obrázek 1). Savčí zuby vznikají z mesenchymu odvozeného z buněk neurální lišty (Chai *et al.*, 2000) a epitelu, který je ektodermálního původu (Rothova *et al.*, 2012).



Obrázek 1: Schéma vývoje ectodermálních orgánů. Vývoj ectodermálních orgánů, jako jsou zuby, vlasy, chlupy, mléčné flázy nebo peří, je ovlivněn interakcemi mezi epitelem (zelené) a mesenchymem (modré) a v pozdějších fázích je velmi podobný. Tkáň epitelu pučí dovnitř (zuby, vlasy, flázy) nebo zevně okolního mesenchymu (peří) (upraveno podle Pispas and Thesleff, 2003).

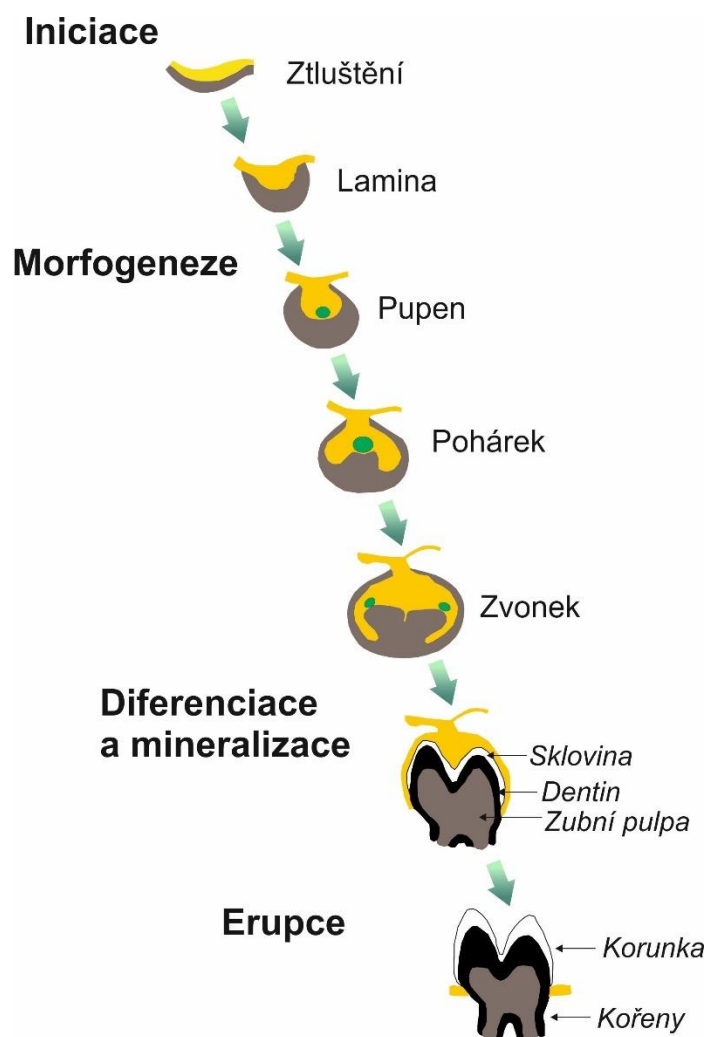
První morfologický znak zubního vývoje představuje invaginace části orálního epitelu do přilehlého kondenzujícího mesenchymu. Dentální epitel tak vytváří primární dentální lištu, která naznačuje budoucí zubní řadu. U myší je toto ztlučení orálního epitelu patrné okolo embryonálního dne (ED) 11,5 (Peterkova *et al.*, 1996, Peterkova *et al.*, 2002).

Dentální epitel zubní lišty se později zanojuje hlouběji do okolní tkáň mesenchymu a vytváří tak zubní pupen (Obrázek 2). Během této fáze se dentální epitel

rozděluje na dvě buněčné linie: (1) periferní bazální buňky, které zůstávají ve spojení s bazální membránou a (2) volně uspořádané buňky lokalizované ve středě dentálního epitelu, které později vytvářejí hvězdicovité retikulum (*stellate reticulum*). Zubní mesenchym se dále zhutňuje kolem zubního pupenu a také se během vývoje rozděluje na dvě buněčné populace. První obsahuje odontoblasty (produkující dentin) a utvářejí dentální papilu, která bude obklopena dentálním epitelem a později dá základ zubní dřeně uvnitř zubu. Druhá linie tvoří periferní dentální vak, ze kterého později vznikají cementoblasty a periodontální tkáň. Jakmile se začne mesenchym kondenzovat kolem utvářejícího se pupenu, přebírá od epitelu inštruktivní roli v iniciaci (Mina and Kollar, 1987, Lumsden, 1988).

Dentální epitel během vývoje zubu tvoří tedy jakousi formu nebo odlietek tvaru samotného zubního zárodku (Obrázek 2). Tvar zubní korunky se zatím utvářet během stádií pohárku (*cap*) a zvonku (*bell*) a je regulován signálními centry, tzv. sklovinnými uzly (*enamel knots* nebo EKs) (Jernvall *et al.*, 1994). Laterální strany epitelálního pupenu se zvedají a začínají obklopotvat níže položený mesenchym a od této chvíle se nazývají zubní smyčky (*cervical loops*) (Viriot *et al.*, 1997). Vrstva bazálních epitelálních buněk smyčky přiléhající k dentální papile se označuje jako vnitřní sklovinný epitel. Ostatní buňky ve vrstvě lemující dentální vak jsou známé jako vnější sklovinný epitel. Střed zubní smyčky je vyplněn volně uspořádanými buňkami hvězdicovitého retikula, které obklopuje tenká vrstva buněk ve *stratum intermedium* pod vrstvou vnitřního sklovinného epitelu. Struktura zubní smyčky je zachována do dospělosti u stále rostoucích zubů (čeláky hlodavců) a je považována za rezervoár epitelálních kmenových buněk (Harada *et al.*, 1999, Tummers and Thesleff, 2003, Tummers and Thesleff, 2008). U zubů, které ukončují svůj růst (včetně lidské zuby, moláry hlodavců), podléhají zubní kličky strukturální přeměně v Hertwigovu pochvu řídící růstkoence zubu. Ve stádiu zralého zubního zvonku se buňky na rozhraní dentálního epitelu a mesenchymu diferencují na ameloblasty a odontoblasty a vytvářejí základní matici pro sklovinu a dentin, resp. (Thesleff and Nieminen, 1996).

Jednotlivá stádia, kterými zub během svého vývoje prochází, byla pojmenována podle tvaru dentálního epitelu na frontálních řezech (Obrázek 2). Nicméně později se ukázalo, že v prostoru je tvar zubních zárodků na jednotlivých stádiích odlišný od zavedeného názvosloví (Peterkova *et al.*, 2002). Tímto stádiím procházejí během svého vývoje zuby včetně lidských zubů.



Obrázek 2: Schéma vývoje savčího zubu na frontálním řezu. Interakce mezi dentálním epitelem (flut) a mesenchymem (-ed) regulují postupující vývoj zubního zárodku. Sklovinný uzel (zelen) (viz níže) iniciuje morfogenezi a určuje po et zubních hrbolk (upraveno podle Jernvall and Thesleff, 2012).

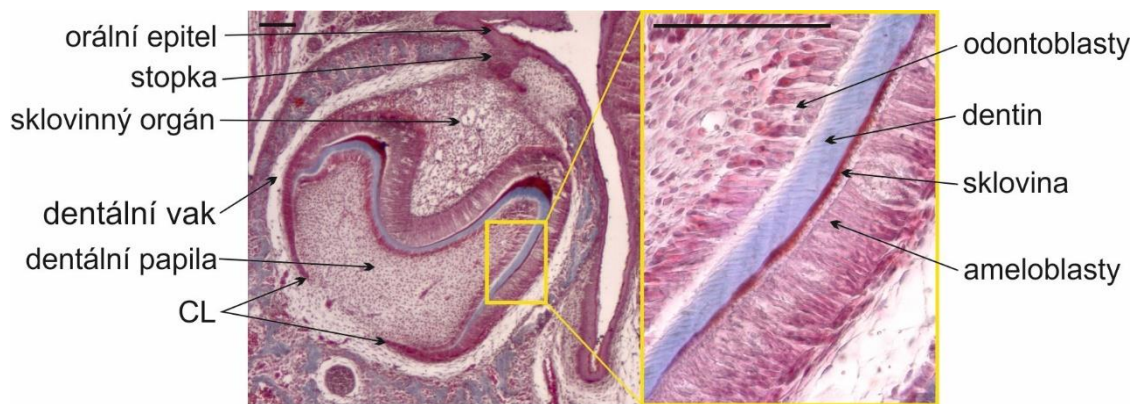
1.2 STRUKTURY ZUBNÍHO ZÁRODKU

Epitelová část zubního zárodku se nazývá sklovinný orgán, který se připojuje přes stopku k povrchovému orálnímu epitelu. Sklovinný orgán je ohraničen zhuštěným mesenchymem o dentální papila (Obrázek 3). Dentální papila pokračuje ve svém vývoji a později dává základ zubní denu uvnitř zubu.

Sklovinný orgán spolu se zubní papilou je obklopen dentálním vakem, který se posléze modifikuje v dentoalveolární závěsný aparát (Tencate *et al.*, 1971).

U sklovinného orgánu rozli-ujeme: vn j-í dentální epitel, vnit ní dentální epitel, hv zdicovité retikulum a stratum intermedium, cofil je tenká vrstva epitelových bun k mezi vnit ním zubním epitelem hv zdicovitým retikulem. Na rozhraní vnit ního dentálního epitelu a zubní papily dochází k diferenciaci odontoblast a ameloblast a tedy k následné tvorb dentinu a skloviny. Oblast odd lující vnit ní a vn j-í dentální epitel se nazývá cervikální smy ka (*šcervical loop*) (Obrázek 3).

S postupujícím vývojem zubního zárodku dojde na stádiu pohárku ve vnit ním dentálním epitelu ke zhu-t ní populace bun k a tím vzniká ídící centrum vývoje zubu, tzv. sklovinný uzel (*š enamel knot*).



Obrázek 3: Frontální histologický ez dolním molárem my-i (PND 3) ve stádiu pozdního zvonku. M ítko je 100 μm (ez z archivu odd lení Teratologie).

1.2.1 ENAMEL KNOT – SKLOVINNÝ UZEL

Sklovinný uzel je struktura, histologicky patrná ve stádiu pohárku a poprvé byl popsán p ed více nefl sto lety (Ahrens, 1913, Butler, 1956). Z histologického hlediska jde o skupinu semknutých bun k ve vnit ním sklovinném epitelu, které se ned lí (Jernvall *et al.*, 1994, Vaahtokari *et al.*, 1996b) a které produkují specifické signální molekuly podobn jako známá signální centra savc (ZPA, AER ó *šapical ectodermal ridge*õ, notochord) (Vaahtokari *et al.*, 1996a). Proto je sklovinný uzel obecn povařlován za signální centrum ídící zubního vývoj u savc (Jernvall *et al.*, 1994). Jelikoř se bu ky EK ned lí, p edstavují jakousi kotvu omezující pohyb bun k v zubu (Jernvall *et al.*, 1994, Vaahtokari *et al.*, 1996a). Vysoká proliferace mimo EK a nízká (tém řládná) proliferace uvnit EK tedy p sobí na epitel zubního zárodku tak, řle dojde ke zm n jeho tvaru (*šfolding*õ ó zano ování epitelu do p ilehlého mezenchymu). V poslední dob v-ak byla publikována

data dokládající, že buněná proliferace je nezbytná ke stratifikaci dentálního epitelu, nikoli k jeho invaginaci (Li *et al.*, 2016). Zubní zárodky jedno-hrbolkových zub (např. ezáky) mají pouze jeden sklovinný uzel, zatímco vícehrbolkové zuby (např. moláry) vytvářejí i sekundární (případně terciární) sklovinné uzly (Kettunen and Thesleff, 1998, Luukko *et al.*, 2003).

1.2.2 CERVICAL LOOP – ZUBNÍ KLIČKA A KMENOVÉ BUŇKY

Termín *cervical loop* (CL) neboli zubní smyčka označuje specifickou epiteliální strukturu na apikální straně zubního zárodku (Obrázek 3). Je tvořena hvězdicovitým retikulem, které je obklopeno vrstvou *stratum intermedium*. Během stádia pohárku a zvonku začínají okraje epiteliálního pupenu obklopot dentální mesenchym.

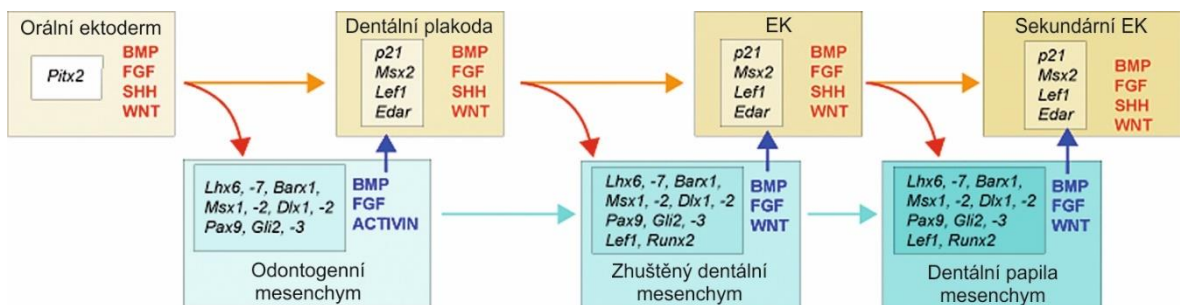
CL jsou přítomny po celý život u zubů, které kontinuálně dorůstají (např. myšičezáky). Obecně jsou považovány za rezervoár kmenových buněk. To již bylo potvrzeno u myšičezáků (Harada *et al.*, 1999). Tyto kmenové buňky jsou schopné zajistit kontinuální růst těchto zubů. U zubů, které vytvářejí kořeny, CL nakonec vymizí (např. lidské zuby). Postupně projdou strukturní modifikací, jakmile je iniciována tvorba kořene. Hvězdicité retikulum se *stratum intermedium* uvnitř vymizí, ale vnitřní a vnější dentální epitel pokračuje v růstu jako epitelová duplikatura známá jako Hertwigova epiteliální kořenová pochva (HERS).

U myšičezáků jsou lingvální a labiální CL asymetrické ve velikosti. Labiální CL je větší, pravděpodobně kvůli odlišným funkčním nárokům (Harada *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2004, Boran *et al.*, 2009). Tato oblast poskytuje progenitory pro specifické zubní buňky, epiteliální ameloblasty a mesenchymální odontoblasty, které produkují organické látky skloviny a dentinu, resp. (Harada *et al.*, 1999, Harada *et al.*, 2002).

Kromě CL myšičezáků, byly u dalších dospělých hlodavců i lidí identifikovány mesenchymální kmenové buňky v oblasti zubní dřeně (Gronthos *et al.*, 2000), periodontálních ligamentů (Seo *et al.*, 2004), zubní papily (Sonoyama *et al.*, 2006, Sonoyama *et al.*, 2008), ale i epiteliální kmenové buňky v oblasti dentálního epitelu (Tummers and Thesleff, 2003, Huysseune and Thesleff, 2004).

1.3 MOLEKULÁRNÍ KONTROLA VÝVOJE ZUBU

Vzhledem ke stejným vývojovým stádiím a nemohlosti přímého výzkumu na lidském materiálu bylo na myším modelu odontogeneze popsáno mnoho genetických vývojových studií o zubní iniciaci, morfogenezi a diferenciaci a o řízení těchto procesů recipročními indukčními interakcemi mezi epitelem a mesenchymem (Obrázek 4). Tyto interakce zahrnují syntézu signálních molekul a transkripčních faktorů s prostorovými a časovými omezenými expresními vzory (Jernvall *et al.*, 2000). Zprostředkovateli samotných interakcí jsou konzervované signální dráhy zahrnující FGF, Wnt, Hedgehog (HH) a TGFβ signalizace. Při vazbě na své specifické receptory na povrchu buněk iniciují intracelulární signální dráhu vedoucí k transdukci signálu do jádra. Zde se aktivují určité transkripční faktory, tedy proteiny, které nasedají přímo na DNA. Tyto transkripční faktory se váží do regulačních oblastí genomu a řídí expresi a represi specifických sad genů, které kontrolují chování buňky (Alberts *et al.*, 1998).



Obrázek 4: Interakce recipročné signalizace mezi epitelem (červen) a mesenchymem (modře) během vývoje zubního zárodku. Tyto interakce regulují expresi specifických transkripčních faktorů (kurzívou). Toto schéma ilustruje obecně přijímané kroky ve vývoji zubu. Chybí zde modulatory signalizace, zejména inhibitory, které podstatně zvyšují složitost (upraveno podle Jernvall and Thesleff, 2000).

1.3.1 WNT SIGNALIZACE

Wnt (Wingless/Integrin) signální dráha je evolučně konzervovaná dráha, která je tvořena velkou rodinou proteinových ligandů, které působí na rozmanité procesy jako je regulace determinace polarity, proliferace, diferenciace, migrace a apoptózy buněk (Moon and Shah, 2002, Willert *et al.*, 2003). Název této dráhy je odvozen z genu *wingless* (ó *Wg* (š *segment polarity gene*)) u drozofily a homologu u obratlovců ó *int-1* (š *integrated*)) (Nusse and Varmus, 1982, Komiyama and Habas, 2008).

Wnt udržují u dospělých organismů buky s osudem kmenových buněk v stěvním epitelu (Pinto and Clevers, 2005), kůži (Lowry *et al.*, 2005) a hematopoetické tkáni (Reya *et al.*, 2003), což spojuje tuto dráhu s obrovskou možností regenerace a buněčné specifikace (Polesskaya *et al.*, 2003, Stoick-Cooper *et al.*, 2007), diferenciace a hojení ran (Fathke *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2009), indukce tvorby tkání (Lewandowski *et al.*, 2016). Narušení této dráhy je jedním z hlavních faktorů onkogeneze v tlustém střevě, ale i v ostatních tkáních (Polakis, 2000), hraje také roli ve skeletální dysplazii i osteoporóze (Clevers, 2006).

Do této doby bylo odhaleno několik způsobů aktivace Wnt receptoru:

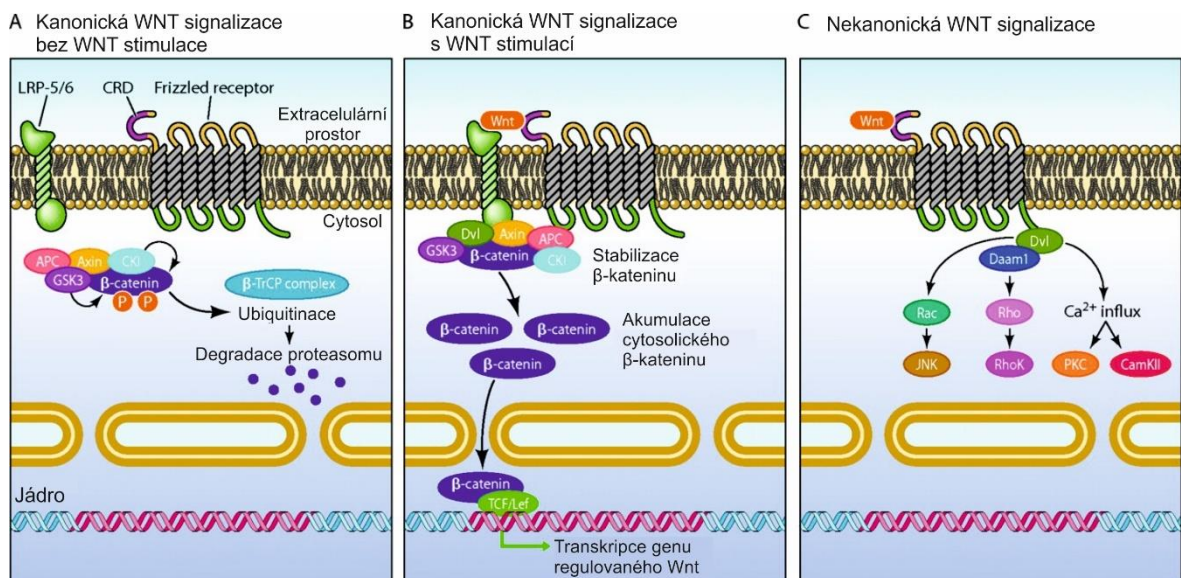
a) kanonická Wnt/ β -katenin kaskáda

b) především další tři nekanonické

I. dráha planární buněčné polarity (šplanar cell polarity) (PCP)

II. dráha Wnt/ Ca^{2+}

III. dráha aktivace fosfolipázy C (PLC) a fosfodiesterasy (PDE) (Kohn and Moon, 2005, Moon, 2005).



Obrázek 5: Transdukce Wnt signální dráhy. (A) Pokud nedojde k nasednutí Wnt proteinu na receptor Frizzled, cytosolický β -katenin je fosforylován a degradován tímto komplexem, následně ubiquitinylován ligázou β -TrCP a degradován v proteasomu. (B) V přítomnosti Wnt je kanonická dráha aktivována. Dishevelled (Dvl) zablokuje degradaci komplexu a β -katenin může být translokován do jádra, kde se spojuje s transkripčními faktory TCF/Lef. To vede k regulaci mnoha cílových genů. (C) Příklad nekanonických drah, které ovlivní například polarizaci buněk (PCP dráha) nebo hladinu

vápníku (Wnt/Ca²⁺ dráha) a nejsou závislé na β -kateninu (upraveno podle Masckauchan and Kitajewski, 2006).

Z těchto drah je nejlépe prostudovaná kanonická dráha. Kanonická kaskáda je závislá na translokaci β -kateninu do jádra. Při inhibici Wnt dráhy je cytoplasmatický β -katenin degradován šdegradacím komplexem, který je tvořen axin, APC (š*adenomatous polyposis coli*), PP2A (š*protein phosphatase 2A*), GSK-3 (glykogen syntáza kináza-3) a CK1 (š*casein kinase 1*) (Gordon and Nusse, 2006). Tento komplex fosforyluje β -katenin a β -TrCP ligáza (š*Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*) ho ubiquitinyluje. K úplné degradaci β -kateninu pak dojde v proteasomu (Obrázek 5A) (Masckauchan and Kitajewski, 2006).

Při aktivaci dráhy dojde k vazbě Wnt proteinu na jeho transmembránový receptor Fz (Frizzled) a koreceptor LRP-5/6. Tento komplex pak aktivuje intracelulární signalizaci zahrnující protein Dvl (Dishevelled), který inhibuje aktivitu části šdegradacního komplexu β -enzymu GSK-3. Inaktivovaný GSK-3 nebrání disociaci β -kateninu od APC proteinu, který ho ve fúzovaném stavu předurčuje k degradaci. Disociovaný β -katenin může vstoupit do jádra, kde vytvoří komplex s Lef a Tcf transkripčními faktory, což umožní aktivovat geny reagující s Wnt (Obrázek 5B) (Brunner *et al.*, 1997, Gilbert, 2003).

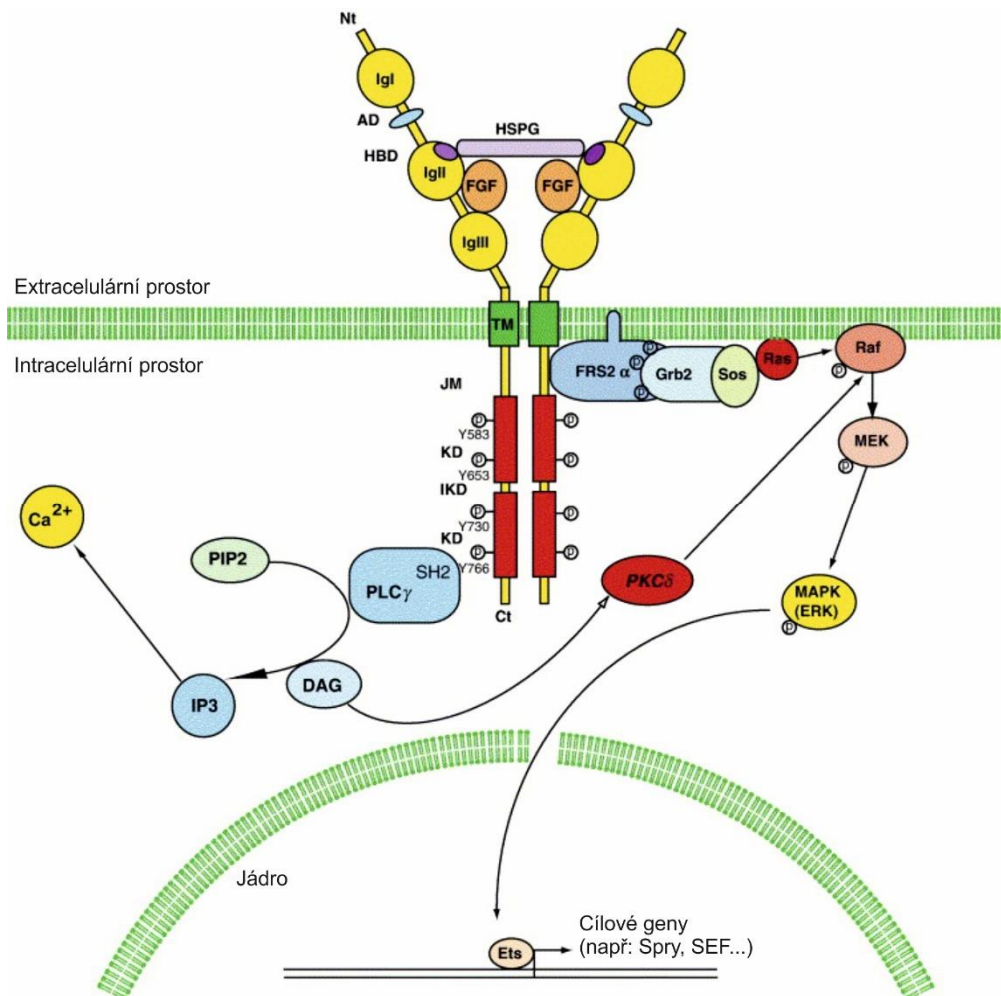
Dvě nejlépe prozkoumané nekanonické dráhy jsou PCP a dráha ovlivňující hladinu vápníku (Obrázek 5C). PCP dráha zahrnuje proteiny schopné regulace a restrukturalizace cytoskeletu. Wnt/kalcium dráha řídí hladinu intracelulárního vápníku a aktivuje dlefflité regulátory buněčné adheze, migrace a tkáňové separace. Vápník spouští transkripční faktory, které mohou narušovat kanonickou Wnt signalizaci (Komiya and Habas, 2008).

V odontogenezi má význam především kanonická Wnt dráha, protože β -katenin je pravděpodobně dlefflitým regulátorem po tu zub v dentálním epitelu. Zvýšená exprese složek této dráhy v embryonálním β -kateninu by mohla způsobit tvorbu nadpočetných zubů a to dokonce i v oblasti orálního nebo vestibulárního epitelu (Zhou *et al.*, 1995, Cobourne and Sharpe, 2010). Naopak inhibice Wnt exprese v rané fázi vývoje zubu zastaví proliferaci buněk před stádiem pupenu (van Genderen *et al.*, 1994).

1.3.2 FGF SIGNALIZACE

Šfibroblast growth factorů (FGF) je rodina pibližně 22 polypeptidových r stových faktorů nalezených od kmene Nematoda až po člověka (pro shrnutí Itoh and Ornitz, 2004). Osmnáct z nich funguje jako ligandy, které se váží na tyrosin kinázové receptory (RTK) u myši i člověka. Zbývající tyrosin (FGF11-14) jsou intracelulární proteiny, které neinteragují s FGF receptory (Smallwood *et al.*, 1996, Olsen *et al.*, 2003). FGF hrají důležitou roli zejména jako mitogeny, ale podílí se také na buněčné migraci a diferenciaci (Nutt *et al.*, 2001), například antero-posteriorní organogeneze těla (Slack *et al.*, 1987, Koga *et al.*, 1999), neurální indukci (Storey *et al.*, 1998, Hongo *et al.*, 1999), angiogenezi a procesu hojení (Yun *et al.*, 2010) nebo i formaci kostí (Rousseau *et al.*, 1994, Shiang *et al.*, 1994). Takže narušení této dráhy způsobí mnoho vývojových poruch a několik typů rakoviny a proto je snaha hledat terapeutické strategie modulací této dráhy (Carter *et al.*, 2015, Degirolamo *et al.*, 2016).

Všechny FGF molekuly sdílejí vysokou afinitu pro heparin (Burgess and Maciag, 1989). Transdukce FGF signálu do cytoplasmy buňky je zprostředkována skupinou tyrosin transmembránových tyrosin-kinázových receptorů, známých jako šfibroblast growth factor receptors (FGFR), přičemž dva (FGFR1 a FGFR2) byly detekovány ve vyvíjejícím se zubu myši (Peters *et al.*, 1992). Tyto receptory tvoří tři extracelulární imunoglobulinové domény (D1-D3) se sekvencí pro vazbu heparinu, jedna transmembránová a jedna intracelulární tyrosin-kinázová doména. FGF spolu s heparansulfátovými proteoglykany interagují s extracelulárními doménami, a tím aktivují receptory (Lee *et al.*, 1989, Johnson *et al.*, 1990). Hlavní dvě intracelulární dráhy FGF zahrnují fosfolipázu C a Ras/MAP kinázu (Obrázek 6).



Obrázek 6: Transdukcce FGF signálu. FGFR obsahuje doménu pro vazbu heparinu (HBD). FGF ligandy navázaný na heparin sulfát proteoglykan (HSPG) nasedá na FGFR. Signál může být přenesen přes dvě hlavní transdukční dráhy zahrnující fosfolipázu C (PLC) a Ras/MAP kinázu. Aktivní receptor interaguje s doménou PLC, která hydrolyzuje fosfatidyl-inositol-4,5-difosfát (PIP₂) na inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG). IP₃ uvolňuje Ca²⁺ ionty zatímco DAG aktivuje protein kinázu C (PKC), která aktivuje Raf a tím stimuluje dráhu nezávislou na Ras. Hlavní dráha zahrnuje interakce proteinu FRS2, Grb2, Sos a následnou aktivaci Ras. Ras pokračuje v transdukci signálu na Raf a MEK, který fosforyluje MAP kinázu (ERK). Tato poslední složka se translokuje do jádra a fosforyluje specifické transkripční faktory Ets rodiny a tím se spouští exprese cílových genů FGF dráhy (upraveno podle Thisse and Thisse, 2005).

Ve velké rodině FGF molekul je exprese jednotlivých signálů omezena buď na epitel nebo mesenchym. Například *FGF3* a *FGF10* jsou exprimovány v dentálním mesenchymu, zatímco *FGF4*, *FGF9* a *FGF20* jsou exprimovány v dentálním epitelu během zubní morfogeneze (Jernvall and Thesleff, 2000, Kratochwil *et al.*, 2002, Porntaveetus *et al.*, 2011). Epiteliální FGF indukují expresi mesenchymálních FGF,

například FGF4 v EK indukuje expresi *FGF3* v dentálním mesenchymu. Tato indukce je zprostředkována Runx2, což je transkripční faktor nezbytný pro tranzici ze stádia pupene do stádia pohárku (Aberg *et al.*, 2004). Inhibice FGF4 může za následek absenci jakéhokoli zubního fenotypu (Haara *et al.*, 2012).

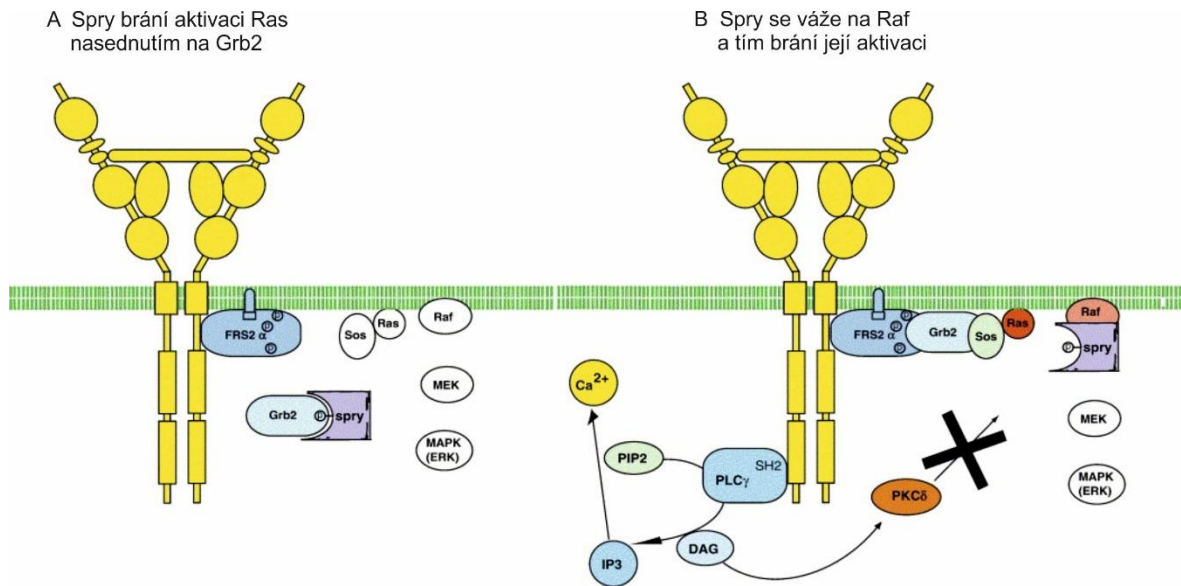
1.3.2.1 FGF signalizace a Sprouty

Tak velká rodina signálních molekul s tak širokým spektrem biologických funkcí, jako je FGF, musí být striktně regulována v čase i prostoru. To může být zajištěno pozitivní nebo negativní zpětnovazebnou smyčkou. Mnoho faktorů specificky reguluje aktivitu FGF dráhy přes její receptory (FGFR). Ustanovením negativní zpětnovazebné smyčky mohou inhibovat FGF signalizaci, ale mohou také regulovat i sebe sama.

Typickým příkladem zpětnovazebná inhibice FGF signalizace jsou Sprouty (Spry) proteiny. Spry byly poprvé identifikovány jako antagonisté FGF signalizace při tvorbě trachey u *Drosophily* (Hacohen *et al.*, 1998). Následně byly popsány i jako obecné inhibitory RTK signalizace (pro shrnutí (Kim and Bar-Sagi, 2004)). První člen Spry rodiny byl objeven u *Drosophily melanogaster*. Ukázalo se, že má karboxyterminální doménu bohatou na cystein na C-terminálním konci, která je nezbytná pro správnou funkci Spry (Hacohen *et al.*, 1998). Později byly nalezeny homology s touto sekvencí u žab *Xenopus laevis*, kůrkyšů a myši (Hacohen *et al.*, 1998, de Maximy *et al.*, 1999, Minowada *et al.*, 1999, Nutt *et al.*, 2001). Myš a lidský genom a také genomy ostatních savců obsahují tyto i evolučně konzervované členy - *Spry1*, *Spry2*, *Spry3* a *Spry4*. Blízká časová i prostorová závislost mezi FGF signalizací a expresí *Spry* genů byla zaznamenána v různých embryonálních tkáních savců, jako jsou plíce, mozek, srdce, střeva a svaly (Hacohen *et al.*, 1998, Minowada *et al.*, 1999, Chambers and Mason, 2000, Mailleux *et al.*, 2001). Regulace *Spry* exprese v dospělé tkáni zatím nebyla rozsáhleji popsána. Stimulace FGF indukuje expresi *Spry2* a *Spry4* přes aktivaci protein-kinázové kaskády ERK/MAPK a u endoteliálních buněk FGF indukuje *Spry1* a *Spry2* expresi (Impagnatiello *et al.*, 2001, Ozaki *et al.*, 2001, Sasaki *et al.*, 2001).

Spry proteiny mohou zasáhnout do FGF signální dráhy několika způsoby: (1) Spry se naváže na adaptorový protein GRB2, čímž brání aktivaci Ras, malé GTPázy, a tím vlastně celé stimulaci v nich downstream elementů. V podstatě tedy znemožní přenos signálu do jádra tímto způsobem v rámci FGF signální dráhy (Obrázek 7A). (2) Spry se připojí

rovnou na Raf kinázu, takže ji nemůže aktivovat Ras ani fosforylovat PKC. A signál se opět nepřenese do jádra (Obrázek 7B) (Thisse and Thisse, 2005).



Obrázek 7: Zeslabení transdukce FGF signalizace pomocí Spry. (A) Spry se naváže na adaptorový protein GRB2 a tím brání aktivaci malé GTPasy Ras a následné stimulaci dalších elementů dráhy. (B) Spry se naváže přímo na Raf kinázu, čímž zabráni jak její aktivaci od Ras tak i její fosforylaci od PKC (upraveno podle Thisse and Thisse, 2005).

Spry1 je exprimován jak v epitelu, tak v mesenchymu, s výjimkou neproliferujících buněk EK. *Spry2* se exprimuje pouze v epitelu přiléhajícím k dentálnímu mesenchymu, včetně EK, zatímco *Spry4* se exprimuje v dentálním mesenchymu (Zhang *et al.*, 2001, Klein *et al.*, 2006). Exprese *Spry3* v souvislosti se zubním vývojem zatím nebyla popsána. *Spry2* a *Spry4* deficientní myši vykazují abnormální dentici s obecným výskytem nadpočetných zubů lokalizovaných před prvním molárem (Klein *et al.*, 2006).

1.3.3 TGFβ SIGNALIZACE

Transforming growth factor je velká, evolučně konzervovaná rodina pojmenovaná podle svého prvního identifikovaného člena TGF (Roberts *et al.*, 1981). Je tvořena z více než 35 členů, včetně TGF, aktivin, inhibin, BMP (šbone morphogenetic protein) a GDF (šgrowth differentiation factor), kteří se dále dělí na sub-rodiny (Kingsley, 1994, Chang *et al.*, 2002). Tato rozsáhlá rodina signálních molekul hraje

dle jejího významu v regulaci diferenciace, proliferace, apoptózy a dalších procesů (Glick *et al.*, 1993, Motyl *et al.*, 1998, Guo and Kyprianou, 1999).

členové rodiny TGF β přenášejí svůj signál přes dva typy receptorů T β R-I a T β R-II a dále přes efektorové molekuly Smad (Derynck and Feng, 1997, Budi *et al.*, 2016). Jakmile se ligand naváže, aktivuje se komplex receptor-ligand, který fosforyluje Smad protein (R-Smad). Ten se váže na Smad4 (Co-Smad) a spolu se translokují do jádra, kde případně regulují transkripci cílových genů (Heldin *et al.*, 1997). Tímto způsobem tři známých R-Smad (Smad1, Smad5 a Smad8) zprostředkují BMP signalizaci, zatímco zbývající dva (Smad2 a Smad3) zprostředkují signalizaci aktivinu a TGF β (Massague and Wotton, 2000, Miyazono *et al.*, 2001, Ten Dijke *et al.*, 2002).

Tato rodina má svou důležitou úlohu i v odontogenezi. Antagonistické interakce mezi BMP a FGF signalizací regulují prostorové aspekty formace zubu (Neubuser *et al.*, 1997). Bmp4 (člen BMP sub-rodiny) indukuje apoptózu v EK, čímž sekundárně reguluje morfogenezi hrbolku (Jernvall *et al.*, 1998, Jernvall and Thesleff, 2000). Aktivin A je nezbytný pro tvorbu zoubků a mandibulárních molárů (Ferguson *et al.*, 1998, Ferguson *et al.*, 2001).

1.3.4 HH SIGNALIZACE

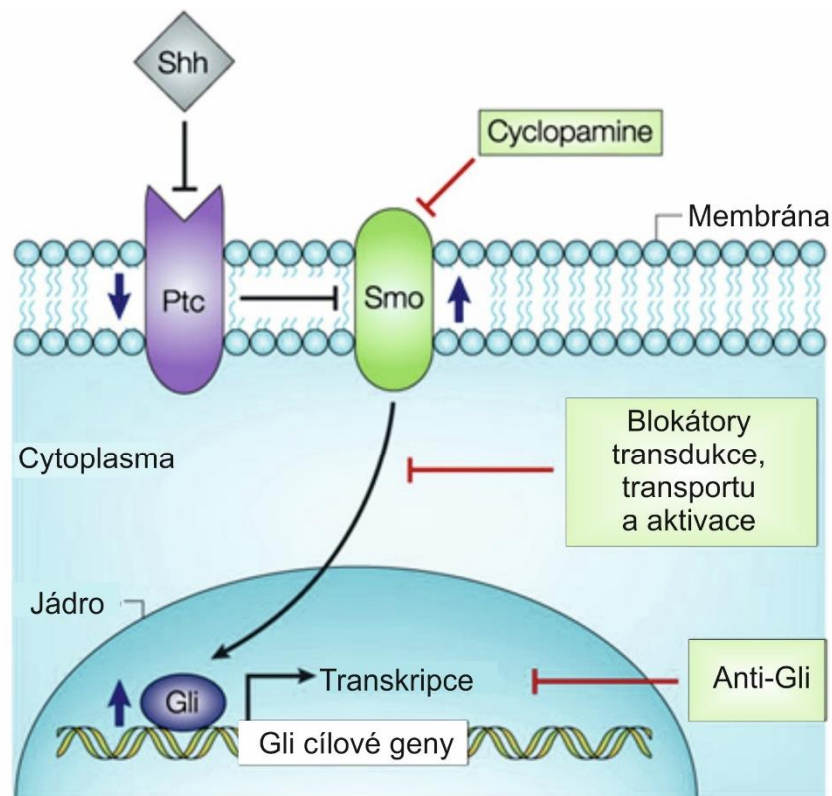
šHedgehog (HH) byl objeven před více než třiceti lety jako šsegment-polarity gen, který řídí organizaci kutikuly během embryonálního vývoje *Drosophily* (Nüsslein-Volhard, 1980). Později byly objeveny i savčí homology a význam Hh signalizace narostal. Zjistilo se, že je nezbytná pro různé procesy vývoje, kdy reguluje osud buněk a jejich počet v mozku a míše, zasahuje do vývoje končetin a vnitřních orgánů (Ingham and McMahon, 2001). Bylo prokázáno, že Hh signalizace se rovněž podílí na udržení kmenových buněk (Beachy *et al.*, 2004). Narušení této dráhy přispívá u člověka k mnoha poruchám včetně vývojových vad, jako jsou Gorlinův syndrom, Greigova cefalopolysyndaktylie, dále i některé druhy rakoviny (McMahon *et al.*, 2003, Nieuwenhuis and Hui, 2005).

Obecně se tvrdí, že během evoluce obratlovců proběhla dvě kola genové duplikace (Wada and Makabe, 2006). To je zřejmé i z toho, že zatímco u savců nalezneme pouze jeden Hedgehog gen, u octomilek je tomu naproti. Tyto tři homology představují

Sonic Hedgehog (Shh), *Indian Hedgehog (Ihh)*, *Desert Hedgehog (Dhh)*, a jsou vysoce konzervované mezi myšmi a člověkem (Marigo *et al.*, 1995).

Dráha Hh signalizace uplatňuje svůj biologický vliv přes kaskádu tvořenou transmembránovým receptorem Ptc (*Patched1 a 2*) (Goodrich *et al.*, 1996, Motoyama *et al.*, 1998) a transmembránovým proteinem Smo (*Smoothened*) jako pokračovatelem signálu přes plasmatickou membránu. Signalizace je zakončena transkripčními faktory z rodiny Gli (*Glioblastoma 1-3*), například Ci (*Cubitus interruptus*) u *Drosophily* (Obrázek 8) (Hardcastle *et al.*, 1998, Ingham and McMahon, 2001).

V případě absence Hh ligandu zablokuje Ptc aktivitu Smo, čímž znemožní transkripci cílových genů (Tempe *et al.*, 2006). Pokud se Hh ligand naváže na Ptc, spustí Smo aktivitu, která umožní aktivaci transkripčních faktorů Gli (McMahon, 2000, Ingham and McMahon, 2001).



Nature Reviews | Cancer

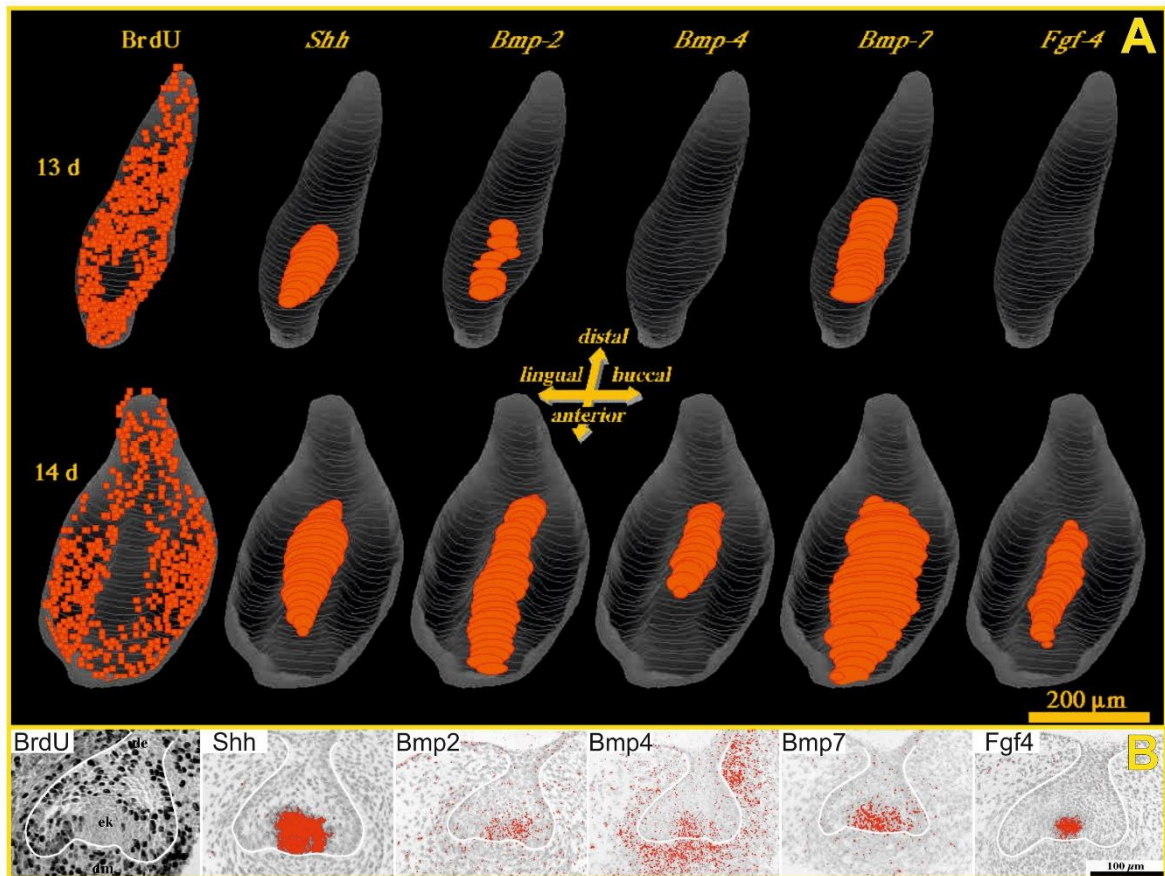
Obrázek 8: Hh signální dráha. Shh nasedá na membránový receptor Ptc, který tak přestává inhibovat aktivitu Smo. Smo pak intracelulárně vysílá signál přes několik transdukčních kroků, které vedou do jádra k transkripčním faktorům Gli. Ty dále regulují transkripci cílových genů (upraveno podle Altaba *et al.*, 2002).

Sonic Hedgehog (Shh) je považován za marker časné odontogeneze (Bitgood and McMahon, 1995). B hem časné odontogeneze je *Shh* exprese limitována na epiteliální buňky (Iseki *et al.*, 1996) a je možné ji detekovat ještě před invaginací epitelu, což napovídá úloze *Shh* v zubní iniciaci (Hardcastle *et al.*, 1998). Bylo prokázáno, že *Shh* stimuluje proliferaci epiteliálních buněk v oblasti časného zubního vývoje (Sarkar *et al.*, 2000) a že se exprimuje v signálním centru pEK (primární sklovinný uzel – viz níže), které řídí další vývoj zubu (Koyama *et al.*, 1996, Vaahtokari *et al.*, 1996a). *Shh* se také exprimuje v signálních centrech zubních rudimentů v tvářové oblasti dolní části myšního embrya (Prochazka *et al.*, 2010). U *Shh* deficientních myších embryí se vůbec nevytvoril první laberní oblouk, ze kterého vznikají obě elisty (Chiang *et al.*, 1996).

1.3.5 SKLOVINNÝ UZEL – SIGNÁLNÍ CENTRUM VÝVOJE ZUBU

Sklovinný uzel se objevuje během časné odontogeneze a je považován za signální centrum řídící vývoj zubního základu. Od okolního dentálního epitelu se odlišuje mimo jiné expresí specifických genů signálních molekul, které jsou nezbytné pro další vývoj zubního základu (Obrázek 9).

Primární sklovinný uzel (*primary enamel knot* – pEK) bývá označován jako samostatný transientní klastér epiteliálních buněk patrný již na stádiu pupenu (*šbudě*) (Obrázek 2 – *šPupeně*). V jeho místě dochází k expresi mnoha specifických signálních molekul jako například *Shh*, *Fgf4*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*, *Wnt10a* (Obrázek 9) (Niswander and Martin, 1992, Jernvall *et al.*, 1994, Vaahtokari *et al.*, 1996a, Thesleff and Sharpe, 1997, Dassule and McMahon, 1998).



Obrázek 9: Proliferace v zubním zárodku a p íklady exprese specifických signálních molekul v primárním sklovinném uzlu (pEK) prvního mandibulárního moláru my-i. (A) 3D rekonstrukce rozhraní epitelu a mesenchymu ve stádiích pupene (ED13) a pohárku (ED14) znázoruje distribuci proliferujících bun k (mimo pEK) a expresní domény signálních molekul (v pEK). (B) Detekce bun ěné proliferace (BrdU) a stejných signálních molekul na frontálních ezech zubního zárodku ve stádiu pohárku (ED14) (upraveno podle Vaahtokari *et al.*, 1996a).

V asné fázi stádia zvonku (šbellõ) vícehrbolkových zub se objevují sekundární sklovinné uzly (šsecondary enamel knotsõ ó sEKs) (Obrázek 2 ó šZvonekõ). To vede k dal-ímu tvarování dentálního epitelu, ímfl vzniká komplexní vícehrbolkový zub.

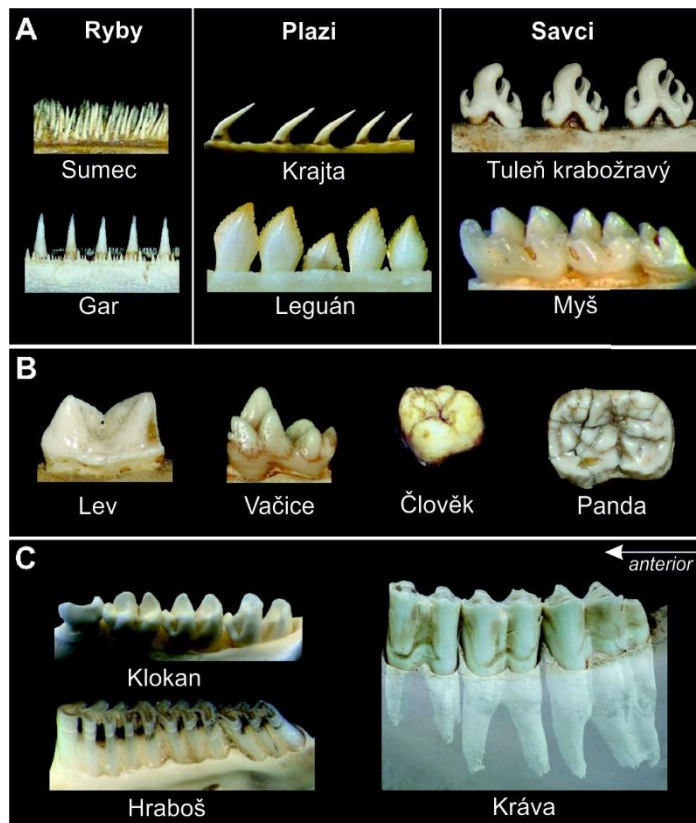
Vztah mezi primárním a sekundárními uzly nebyl doposud jednozna n popsán. P estofle exprese gen asociovaných s primárním sklovinným uzlem ó nap . *Shh*, *FGF4* (Bitgood and McMahon, 1995) nazna uje, fle ást jeho bun k p ispívá k sekundárnímu sklovinnému uzlu protokonidového hrbolku (Jernvall and Thesleff, 2000), toto nebylo jednozna n potvrzeno funk ními experimenty a sledováním bun ných linií. Analýza ned lících se bun k vnit ního dentálního epitelu po BrdU (šBromodeoxyuridineõ) zna ení odhalila, fle p effiv-í bu ky primárního sklovinného uzlu, které jsou v kontaktu s bazální

membránou, jsou redistribuovány na vrcholky tvořících se hrbolků. Předpokládá se, že takto oddělené skupiny buněk se významně podílí na formaci hrbolků (Coin *et al.*, 1999, Coin *et al.*, 2000). Ale DiI značení buněk primárního sklovinného uzlu později ukázalo, že se řádně jeho buňky nepohybují směrem k vyvíjejícím se sekundárním EK (Matalova *et al.*, 2005). Moláry vytvářejí i terciární sklovinné uzly, které se objevují na vrcholu zubních hrbolků (Luukko *et al.*, 2003). Počet sklovinných uzlů nejspíše determinuje uspořádání zubních hrbolků výsledného zubu (Vaahtokari *et al.*, 1996a).

Sklovinné uzly jsou podobné struktury, které zanikají apoptoticky (Lesot *et al.*, 1996, Vaahtokari *et al.*, 1996b, Jernvall *et al.*, 1998).

1.4 ZUBNÍ VZOREC

Dentice je jedním z charakteristických znaků druhu a tím pomáhá paleontologům při klasifikaci nalezených fosilií linie obratlovců. Počet zubů, tvar a jejich velikost se liší mezi jednotlivými druhy (Obrázek 10), což představuje specifické adaptace na různé druhy potravy a tím i různou funkci zubů.



Obrázek 10: Evoluční diverzita zub u souasných druhů. (A) živočišné patřící mezi obratlovce jako ryby a plazi mají velké množství jednoduchých zubů, zatímco savci zuby jsou obecně mnohem komplexnější a mají tendenci tvořit více zubních hrbolků. (B) Mezi savci ale také existují rozdíly. Moláry masožravých druhů (např. lvi) jsou spíše jednoduchí, na druhé straně moláry býložravců (např. pandy) mají složitější topografii zubní korunky. (C) Zuby savců mají omezenou kapacitu obnovy a limitovaný počet zubních generací. Pouze několik druhů (např. malé druhy klokanů) dokáží vytvářet posteriorně nové moláry. Mnohem častěji u nich jsou vysoké (hypsodontní) zuby (např. krávy), kde nad dásní není pouze část korunky. Na které druhy savců (např. hraboš) mají stále dorůstající (hypsodontní) moláry. Naproti tomu ryby a plazi mají nepřetržitě nahrazované zuby (např. nahrazovaný zub u leguána v A). Anteriorní směr je vlevo. Obrázky nejsou ve stejném měřítku (upraveno podle Jernvall and Thesleff, 2012).

Většina ryb, obojživelníků a plazů má velké množství jednoduchých zubů podobného tvaru (homodontní dentice), které jsou kontinuálně nahrazovány během života zvířete (Huyssseune and Sire, 1998). Ale evoluce zubní morfologie směřovala k větší komplexitě, což bylo dosaženo přidáním hrbolků (Obrázek 10A). Zubní hrbolky mohou mít tvar samostatných hrbolů nebo mohou být prodlouženy do tvaru šostů. U mnoha druhů jsou hrbolky spojeny dohromady, čímž vzniká složitější vzor na korunce zubu (Obrázek 10B). Vícehrbolkové zuby se objevují u většiny taxonomických skupin, ale nepřetržitě nahrazované zuby a nejrozmanitější tvary zubů se vyvinuly u savců (Obrázek 10). Spolu s tím se

u savců vyvinula regionalizovaná dentice (heterodontní dentice) (Luo, 2007). Základní dentice savců se skládá z různých typů zubů: řezáky (I), předpičáky (C), tenové zuby a premoláry (P), stoličky a moláry (M). Z těchto zubů dosáhly premoláry a moláry nejvyšší komplexity, zvláště pak u savců, kteří se specializovali na vláknitou stravu (Evans *et al.*, 2007). Oproti nesavcům druhým je počet zubů redukován a zuby se zpravidla objevují ve dvou generacích (diphyodontní dentice): primární (mléčná) a sekundární (trvalá) dentice. Výjimku tvoří například klokani nebo sloni, kteří jsou polyphyodontní, nebo delfíni, kteří jsou monophyodontní. Předpokládá se, že dentice soušasných placentálních savců vychází ze základního zubního vzorce, který tvoří tři řezáky, jeden předpičák, čtyři premoláry a tři moláry v každém kvadrantu čelisti (Peyer, 1968). Výjimkou se může objevit i čtvrtý molár.

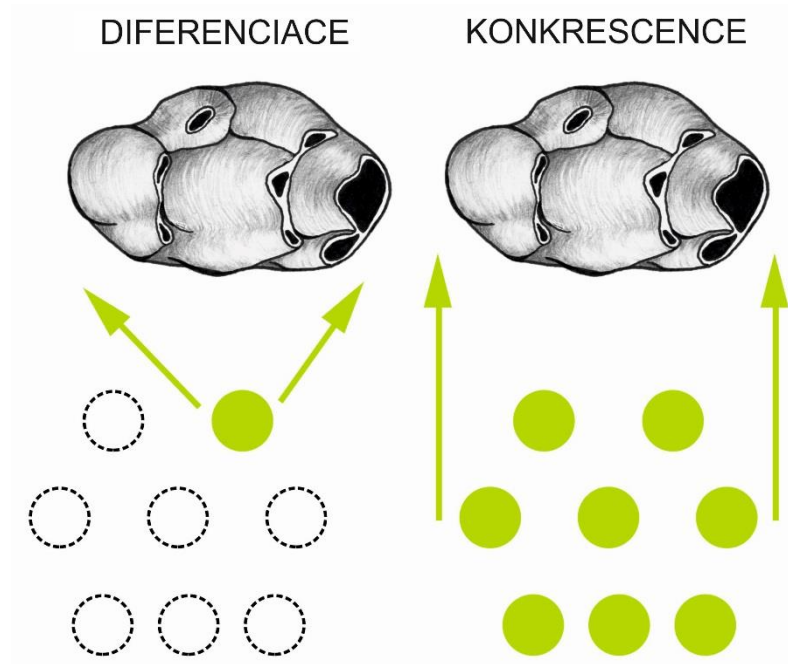
1.4.1 TEORIE VZNIKU VÍCEHRBOLKOVÝCH ZUBŮ

Před 100 lety byly definovány dvě teorie o vzniku vícehrbolkových zubů u savců. Diferenční teorie (také nazývaná Cope-Osbornova nebo trituberkulární teorie) byla podpořena paleontologickým výzkumem a srovnávací anatomii adultních zubů. Podle této teorie vznikly komplexní vícehrbolkové zuby savců diferenciací z jednoho jednoduchého zubu savců předků. Trojúhelníkový hrbol (protokon, parakon a metakon v horní čelisti), který vznikl tvorbou předních hrbolků, byl určen jako základní uspořádání moláru u soušasných savců (Osborn, 1888, Ungar, 2010). Následně se přidávaly i další hrbolky. Jelikož počet zubů během evoluce savců klesal, v čísla jednoduchých zubů byla potlačena a zbývající zuby se diferencovaly a vytvořily tak úplně nový materiál pro vícehrbolkové korunky (Obrázek 11). Nicméně tento proces se zdá být poněkud neohospodárný. Bez ohledu na pozdní kritiku je v současné době diferenční teorie obecně akceptovaná (Ungar, 2010).

Konkrescenční teorie je podpořena embryologickými daty ze zubního vývoje soušasných druhů. Tato teorie navrhuje vznik vícehrbolkových zubů u savců spojením několika primordií jednoduchých, předních samostatných zubů plaz (Obrázek 11), přičemž neopomíjí ani zkracování čelisti, které během evoluce došlo (Kükenthal, 1892). Přední bukové a lingvální řady hrbolků vícehrbolkových zubů savců byl vysvětlen fúzí různých generací zubních primordií jednoduchých zubů, tedy fúzí zubních primordií v buko-lingválním směru o dimerní (koncentrační) teorie (Bolk, 1922). Tento koncept je založen na uspořádání jednoduchých zubů v řadách a na nahrazování zubů

v polyphyodontní dentici jako je tomu například u fialok nebo i u některých obojživelníků a plazí. Konkrescenční teorie je obecně přijímána embryology a zubáři, ale naopak odmítána paleontology (Peyer, 1968).

Je možné, že obě teorie jsou platné: podkladem vzniku tvarové diferenciace zubních korunek u dospělce (diferenční teorie) bylo splývání primordií jednoduchých zubů prenatálně (konkrescence) (Peterkova *et al.*, 2000).



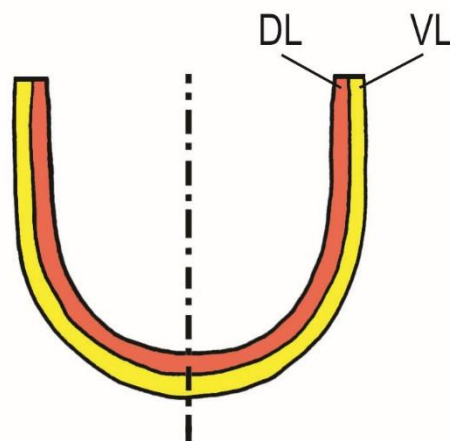
Obrázek 11: Schéma vzniku vícehrbolkového zubu u savců podle diferenciální a konkrescenční teorie. Kroužky představují jednoduché zuby plazí, zelené kroužky jsou zubní primordia zahrnutá v evoluci složených zubů podle jednotlivých teorií (upraveno podle Peterkova *et al.*, 2014).

1.4.2 LIDSKÁ DENTICE

Lidská dentice je jako u většiny ostatních savců diphyodontní a během svého vývoje procházejí lidské zuby klasickými vývojovými stádii (Obrázek 2) (viz kapitola 1.1 Zubní vývoj - morfogeneze). Primární (mléčná) dentice se zakládá již mezi šestým a osmým embryonálním týdnem.

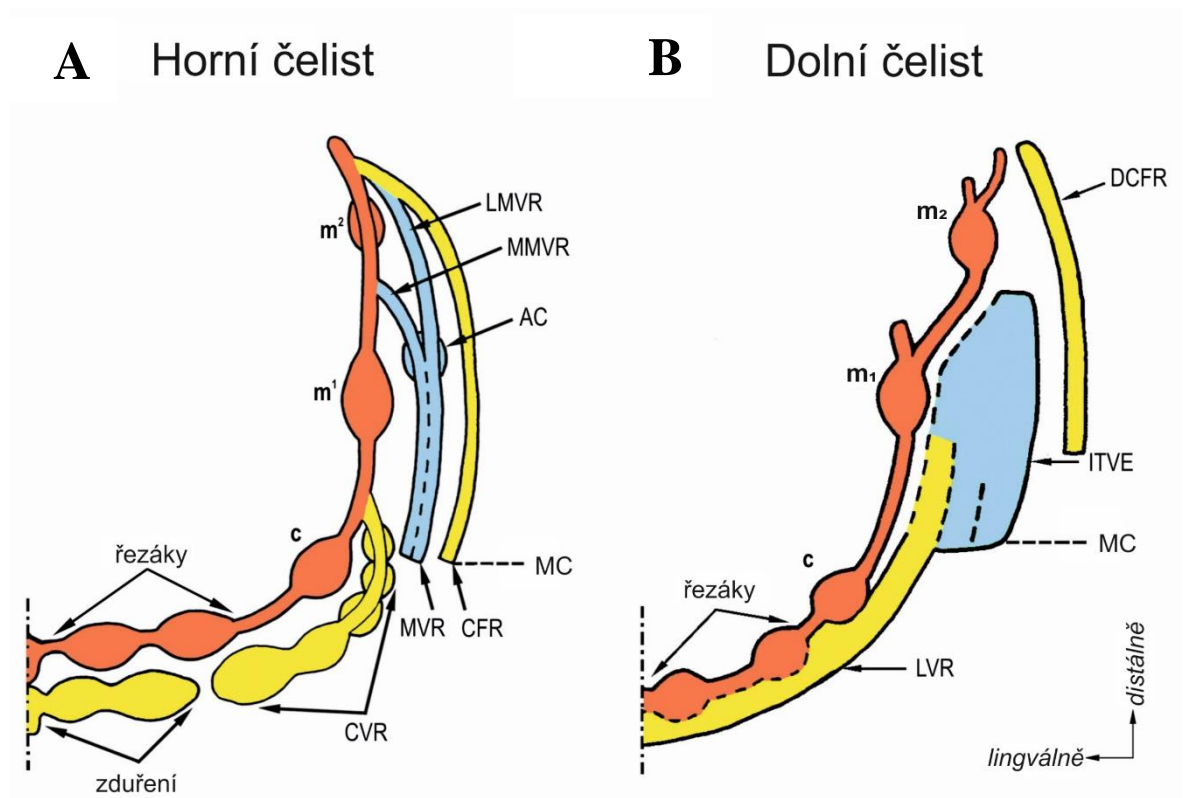
Během vývoje lidského embrya dochází v průběhu pátého prenatálního týdne k fúzi oblékových výbojků. Splynutím mediálních nasálních s maxilárními výbojků dochází následně ke splynutí dentálního epitelu (Moore and Persaud, 2002, Hovorakova *et al.*,

2005). Následně dochází k ztluštění dentálního epitelu a vzniku typické dentální laminy (Hovorakova *et al.*, 2005).



Obrázek 12: Vývoj dentice a p edší ústní u lidí. Embryologické u ebnice popisují u lidských embryí dvě paralelní lišty ve tvaru U: DL – dentální lišta, ze které vzniká primární dentice, a VL – vestibulární lišta nebo labio-gingivální pruh, kde později vzniká p edší ústní (p evzato z Hovorakova *et al.*, 2005).

Obecně byl přijímán fakt, že z dentální lišty, která má tvar podkovovité epitelální struktury (Obrázek 12), vznikají samostatná zubní primordia. A také že z vestibulární laminy, která probíhá zevně k dentální lamině, vzniká orální vestibulum (Obrázek 12). Bylo představeno několik teorií o jejich samostatném/společném vývoji (Bolk, 1921, Schour, 1929). Pomocí metod klasické histologie a 3D rekonstrukcí se ukázalo, že vývoj, obzvláště orálního vestibula, je daleko složitější, a že během samostatných stádií dochází k opakovanému splývání mezi zubním a vestibulárním epitelem v předozadním směru. A také, že zubní zárodky se neobjevují jako samostatné jednotky, ale spíše jako epitelální zduření (šwellings) na různých místech dentálního valu (Hovorakova *et al.*, 2005, Hovorakova *et al.*, 2007). Také bylo doloženo, že vestibulární lišta nemá podobu kontinuálně probíhající lišty, ale naopak tvoří epitelální hrboly a krátké lišty zevně k dentálnímu valu a na které se napojují na dentální val (Obrázek 13) (Hovorakova *et al.*, 2005).



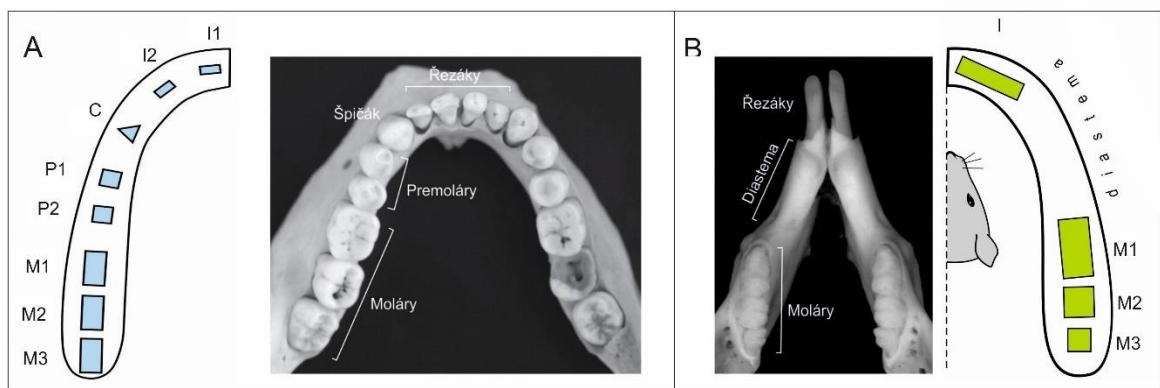
Obrázek 13: Schéma uspořádání dentálního a vestibulárního epitelu lidského embrya. červen je znázorněn dentální epitel, žlutá pak základ orálního vestibula. Zbývající vestibulární epitel je modře. **(A)** Epiteliální hrboly v horní čelisti, které se zakládají v dentálním epitelu v oblasti rtu, fúzí dohromady a vytvářejí pípkovou vestibulární lištu (CVR – *canine vestibular ridge*) v posteriorním směru. Tato lišta se napojuje na dentální epitel za primordií doasných pičků (c). Vestibulární epitel v tvárovech oblastech vytváří molárovou vestibulární lištu (MVR – *molar vestibular ridge*) a hrbol tvároveho fláčku *cheek-furrow ridge* (CFR). MVR se posteriorně rozděluje na mediální (MMVR) a laterální (LMVR) větve. Klenba orálního vestibula pochází z hrbolů a CVR v oblasti rtu a z CFR v tvárovech oblastech. AC – akcesorní epiteliální pohárek, m^1 a m^2 – horní první a druhý doasný molár. **(B)** Situace v dolní čelisti je trochu jiná. Úroveň koutku (MC – *mouth corner*) je označena. Zároveň jsou vyznačeny odlišné vestibulární struktury – oblast nepravidelně ztlustlého vestibulárního epitelu (ITVE – *irregularly thickened vestibular epithelium*), labiální vestibulární lišta (LVR – *labial vestibular ridge*) a mandibulární hrbol tvároveho fláčku (dCFR). Primordia doasných zubů v dolní čelisti jsou značeny m_1 – první molár, m_2 – druhý molár (upraveno podle Hovorakova *et al.*, 2007).

Kolem šestého měsíce života dítěte se začínají projevovat první zuby mléčné dentice, kterou tvoří dohromady 20 zubů: dva řezáky, jeden pičák a dva tenové zuby v každém kvadrantu čelisti. Sekundární (trvalá) dentice se formuje od dvacátého týdne embryonálního vývoje. Od šestého roku života dítěte je mléčná sada zubů nahrazována

permanentní denticí, která ufl je tvo ena 32 zuby: dva ezáky, jeden -pi ák, dva premoláry a t i moláry v kařdém elistním kvadrantu (Obrázek 14A).

1.4.3 MYŠÍ DENTICE

Normální dentice my-í je proti p vodnímu zubnímu vzorci placentálních savc (3I, 1C, 4P, 3M) vysoce redukováná a na rozdíl od lidské je monophyodontní. Tato skute nost áste n vysv tluje, pro je tak málo známo o mechanismech zubní vým ny. Sou asné studie se za aly více zam ovat na bun né a genetické mechanismy tohoto procesu. My-í dentice je tvo ena 16 zuby: jeden ezák a t i moláry v kařdém kvadrantu elisti. ezák odd luje od molár bezzubý úsek ó diastema (Obrázek 14B). P estofe má my-pouze jednu generaci zub , ezáky kontinuáln dor stají po celý flivot. Dal-í modifikací my-ích ezák je typická depozice skloviny pouze na labiální stran zubu. Ob tyto vlastnosti vedou k neustálému asymetrickému obru-ování a udrřování ezné hrany t chto zub .



Obrázek 14: Zubní vzorec. (A) V kařdém kvadrantu lidské elisti m flene najít dva ezáky (I), jeden -pi ák (C), dva premoláry (P) a t i molár (M) ze stálé dentice. (B) Kařdý kvadrant my-í elist nabízí pouze jeden ezák, t i moláry a bezzubou oblast nazývanou diastema (upraveno podle Jussila and Thesleff, 2012, Peterkova *et al.*, 2014).

1.4.4 LIDSKÉ NADPOČETNÉ ZUBY

Vzhledem ke složitosti signálních drah embryonálního vývoje se u lov ka objevuje ada patologií z d vodu naru-ení molekulární kontroly. Takové poruchy signálních kaskád

se mohou projevit i v dentálním vývoji a mohou znamenat vznik zubních defektů, jako jsou anomálie polohy, struktury, tvaru nebo i postavení zubů.

Pro tuto práci jsou významné především anomálie polohy zubů. Obecně se uvádí, že hypodontie a hyperdontie jsou extrémní protiklady ve vývoji dentice. V případě hypodontie chybí jeden nebo několik zubů a podle toho pak dále rozeznáváme ječt oligodontii, tedy vrozené chybění jednoho nebo více permanentních zubů, kromě těchto molárů, nebo anodontii, která je charakteristická vrozenou absencí všech primárních nebo permanentních zubů. V případě hyperdontie bývá jeden i několik zubů navíc.

Nadpočetné zuby představují jednu z nejčastějších lidských malformací a jejich prevalence je odhadována na 6% a více (Anthonappa *et al.*, 2013). Mohou být asociovány s více než dvaceti syndromy a vývojovými abnormalitami jako jsou například kleidokraniální dysplazie (CCD), familiární adenomatosní polyposa (včetně Gardnerova syndromu), Nance-Horan syndrom, Robinow syndrom, Hallermann-Streiff syndrom, Rothmund-Thomson syndrom atd., nebo se mohou vyskytovat nesyndromicky (Lee *et al.*, 1997, Garvey *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 2007, Diaz *et al.*, 2009, Ferres-Padro *et al.*, 2009). Pouze 1% nesyndromických případů vykazuje vícečetný výskyt nadpočetných zubů, které se objevují nejčastěji v premolárové oblasti mandibuly, následují molárové a anteriorní oblasti (Yusof, 1990, Batra *et al.*, 2005, Orhan *et al.*, 2006, Hyun *et al.*, 2008, Yagüe-García *et al.*, 2009, Inchingolo *et al.*, 2010). Nicméně většina nadpočetných zubů je idiopatických a manifestují se jako jediný, samostatný, nadpočetný zub (Lubinsky and Kantaputra Nik, 2016).

Existuje mnoho hypotéz zabývajících se etiologií nadpočetných zubů. Nadpočetný zub může vzniknout následkem dichotomie zubního pupenu (Liu, 1995), nebo lokální, nezávislé hyperaktivity dentální laminy (Liu, 1995, Scheiner and Sampson, 1997), nebo jako následek revitalizace zubního rudimentu, jehož vývoj byl během evoluce potlačen fylogenetickou teorií, či teorií evolučního návratu (Smith, 1969, Peterkova *et al.*, 2006). Dichotomická teorie byla rozdělena na dvě možnosti: dentální lina se během vývoje rozdělí na dvě rovnoměrné nebo nerovnoměrné části. Následkem toho, pak vznikají dva zuby podobné velikosti, nebo jeden normální a jeden dysmorfický zub (Liu, 1995, Garvey *et al.*, 1999). Bylo zjištěno, že horní laterální ezák člověka pochází z fúze epiteliálních ztlučení na mediálním nasálním a maxilárním výběžku. Tato dvě ztlučení vytváří po spojení kontinuální dentální laminu, která v tomto místě dává vznik primordiu horního laterálního ezáku. Tento zub u člověka má tudíž dvojí vývojový základ (Hovorakova *et*

al., 2006). Hyperaktivita dentální laminy je další přijímanou teorií. Jakmile je vytvořena korunka permanentního zubu, dochází k degeneraci dentální laminy. Zbytky této laminy mohou způsobit vznik cyst (Cohen, 1984). Zvýšená proliferace nebo opoždění degenerace dentální laminy může způsobit tvorbu nadpočetného zubu (Cohen, 1984, Diaz *et al.*, 2009, Jarvinen *et al.*, 2009). Fylogenetická teorie vychází z toho, že evoluční předci savců měli ve svém zubním vzorci více zubů, jejichž počet byl během evoluce redukován (viz kapitola Zubní vzorec).

1.4.5 MYŠÍ DENTICE MODELEM PRO STUDIUM ODONTOGENEZE U ČLOVĚKA

Přestože morfologie zubního zárodku se může u jednotlivých tvarů zubů lišit, stádia zubního vývoje jsou velmi dobře zakonzervována mezi ozubenými obratlovci a data z myšního modelu odontogeneze mohou poskytnout vodítka k zubnímu vývoji u rozmanitých skupin živočichů (Streelman *et al.*, 2003). V souladu s tím se expresní vzory některých molekul, klíčových pro zubní vývoj, jako je například *Shh*, také ukázaly jako vysoce konzervované v dentici myši, ryb nebo třeba hadů (Fraser *et al.*, 2006, Buchtova *et al.*, 2008).

Počet zubů je obvykle striktně determinován. Dříve bylo zaznamenáno, že existují základy tetrapodní dentice u některých savců (Leche, 1893). Přítomnost těchto epiteliálních útvarů byla potvrzena i u lovosky (Röse, 1895, Ahrens, 1913, Hovorakova *et al.*, 2005). Z analýzy sériových řezů zubních zárodků, které se objevily jako rudimentární základy tetrapodní (post-permanentní) dentice u některých delfínů a fetů vyplynulo, že tyto základy patří lingválně od permanentních zubů (Ooë, 1969).

Studie jiných modelových systémů s kontinuální výměnou dentice nebo s tvorbou sekundární dentice, jako jsou ryby, hadi, plazi nebo fretky, poskytují vhled do molekulárních a buněčných mechanismů zásadních pro úspěšný vývoj zubu a mohou pomoci ve studiích o tvorbě nadpočetných zubů u lidí. Zatímco nesavčí druhy mají více řad dentice a pouze obnovují svoje zuby, u některých hlodavců nedochází k řádné výměně dentice (Jarvinen *et al.*, 2009, Koussoulakou *et al.*, 2009, Mikkola, 2009, Tummers and Thesleff, 2009). Detailní histologická analýza zubní výměny u nesavčích modelů naznačuje, že následný zub je iniciován z epitelu dentální laminy, který roste na lingvální straně sklovinného orgánu do asných zubů a později se prodlužuje a patří do

okolního mesenchymu, čímž vytváří sekundární zub. Zachování nebo reaktivace slovek dentální laminy je tedy stejně pro zubní výměnu, ale také pro tvorbu nadpočetného zubu.

Do této chvíle bylo popsáno, a dokonce cíleně vygenerováno mnoho myších kmenů, které vykazují nadpočetné zuby a které tak poskytují náhled na normální a abnormální formování zubů. Z analýzy těchto myšů je jasné, že inhibice aktivity mnoha známých mediátorů zubního vývoje patří mezi klíčové procesy v zajištění náležitého počtu zubů u dospělého jedince.

Nadpočetné zuby v premolárové oblasti, která je nejastěji ulovka u nesyndromických výskytů, byly identifikovány například u *Gas1* deficientní myši se 100% penetrancí nadpočetného zubu (Ohazama *et al.*, 2009), *Spry2* a *Spry4* deficientní myši s výskytem zejména v mandibule (Klein *et al.*, 2006, Peterkova *et al.*, 2009), *Lrp4* deficientní myši (Ohazama *et al.*, 2008), *Eda* nebo *Edar* deficientní myši (Mustonen *et al.*, 2003, Tucker *et al.*, 2004), *Polaris* deficientní myši (Zhang *et al.*, 2003, Ohazama *et al.*, 2009) nebo *Ektodin* deficientní myši (Kassai *et al.*, 2005).

1.5 RUDIMENTY

Rudimentární a vestigiální orgány jsou orgány i struktury, které ztratily v číně nebo veškerou svou ancestrální funkci u daných druhů, ale přesto přetrvávají během procesu evoluce (Darwin, 1859). Některé z nich jsou nazývány šrudimentární nebo vestigiální orgány, přestože mnoho z nich orgánem vlastně není. Takovéto struktury jsou obvykle degenerované nebo atrofované a mohly ztratit některé nebo všechny své funkční úlohy, které hrály u předků (Peterkova *et al.*, 2006).

Přestože termíny *rudimentární* a *vestigiální* struktury/znaky jsou často používány jako synonyma, je mezi nimi značný rozdíl. Rudimenty jsou částečně zformované nebo nekompletní transformace vývojových znaků a objevují se pouze u embryí. U vestigiálních struktur jde o evoluční pozůstatky po předcích a objevují se u dospělce (Hall, 2003).

Takové orgány/struktury existují u nespočtu zvířecích zástupců. Například křídla pterosaura, emu a dalších nelétavých ptáků jsou zakrnělá, jde totiž o zbytky křídla jejich létajících předků (Darwin, 1859). Dalším příkladem mohou být přední končetiny u velryb, u kterých se během ontogenetického vývoje objevují zárodky předních končetin a později degenerují (Hall, 1984). Nebo organismy, které se reprodukuje nepohlavním

rozmnožováním, ztrácejí své sexuální vlastnosti, jako je schopnost lokalizovat i rozpoznat opačné pohlaví (van der Kooij and Schwander, 2014).

U člověka bylo popsáno více než 100 vestigiálních struktur, jako je *apendix, os coccygis*, svaly hýbající ušima, atd. (Gilbert, 2003).

Zubní rudimenty byly v minulosti popsány u mnoha živočišných druhů, například u ptactva - Monotremata (jeřáb australský) (Kükenthal, 1892, Röse, 1892), kosticovitých ryb (plejtvák myšok, velryba) (Kükenthal, 1892), ale také u člověka (Bolk, 1924) nebo u myši (Peterkova, 1983).

1.5.1 ZUBNÍ RUDIMENTY U ČLOVĚKA

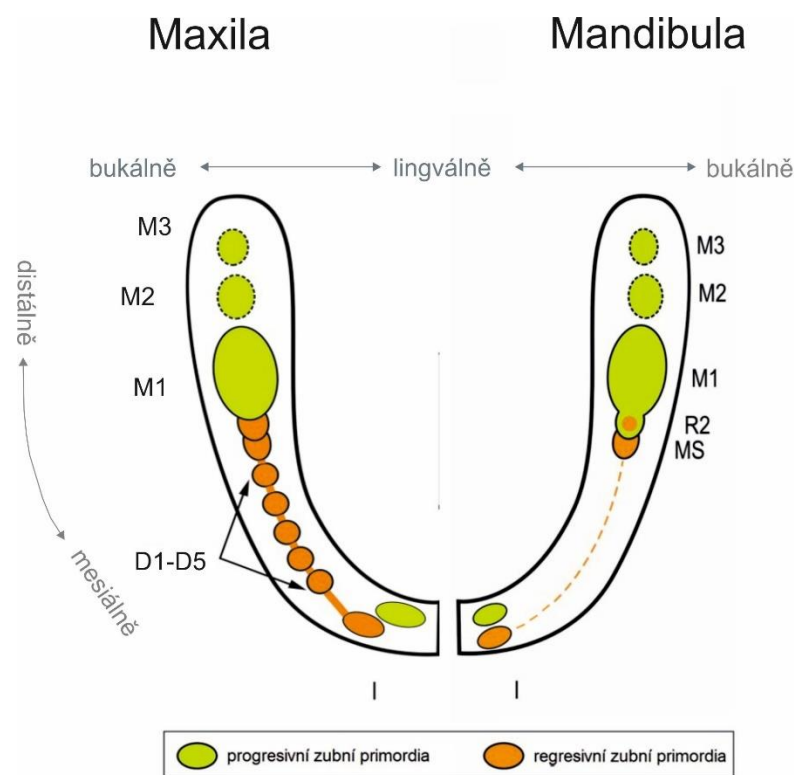
Bukálka od prvního maxilárního zárodku do asného moláru (m1) se periodicky objevuje pod epitelální pohárky v místě molárové vestibulární lišty (Obrázek 13A) (Bolk, 1924, Hovorakova *et al.*, 2005). Jiný akcesorní pohárek byl zaznamenán na úrovni druhého do asného moláru (Adloff, 1909). V literatuře byly tyto akcesorní struktury pozorované laterálně k dentální lamině interpretovány jako vestigiální primordia rudimentární dentice předcházející do asné dentice nebo jako pozůstatky zubních fláček u plazů (Röse, 1895, Adloff, 1909, Bolk, 1924, Schour, 1929). Na této pozici se u některých plazů mohou objevit celé rudimentární zubní generace (například aligátor) (Westergaard and Ferguson, 1987). Tato zubní primordia jsou rudimenty zubů zděděných od nižších obratlovců (Zahradnicek *et al.*, 2012).

1.5.2 ZUBNÍ RUDIMENTY U MYŠI

Laboratorní myš je v současnosti jedním z nejpoužívanějších experimentálních organismů pro studium vývoje zubů u savců a tedy i u člověka. Jedním z hlavních důvodů jsou totožná morfologická stadia v procesu odontogeneze (1.1 Zubní vývoj - morfogeneze) u myši (Lesot *et al.*, 1996, Peterkova *et al.*, 1996, Peterkova *et al.*, 2002) a člověka (Nery *et al.*, 1970, Hovorakova *et al.*, 2005, Hovorakova *et al.*, 2007).

Embryonální kmeny myši nabízejí v průběhu svého vývoje dva typy zubních primordií: (1) progresivní primordia, která dávají vznik budoucím funkčním zubům a (2) rudimentární zubní primordia, která se za normálních podmínek nerozvinou v samostatný funkční zub. Takové rudimentární zubní pupeny byly nalezeny v horní i dolní diastemové

oblasti, která za normálních okolností zuby neobsahuje. V maxilární diastem bylo detekováno p t malých epiteliálních pupen D1-D5 (Peterkova *et al.*, 1995, Lesot *et al.*, 1998) a posteriorn k nim je-t dva v t-í (R1 a R2) (Peterkova *et al.*, 1996). Mandibulární diastema vykazuje pouze dva velké rudimentární pupeny MS a R2 lokalizované anteriorn k M1 primordiu (Obrázek 15) (Viriot *et al.*, 2000). Dva v t-í rudimentární zárodky (nalezené v obou elistech) byly asociovány se zaniklými premoláry my-ích p edk (Peterkova *et al.*, 2000). Zárove se ukázalo, že posteriorní rudiment R2 v dolní elisti nezaniká, ale je inkorporován do vyvíjejícího se pupenu budoucího prvního moláru (Prochazka *et al.*, 2010).



Obrázek 15: Zubní vzorec my-ího embrya. Oranřová barva zna ní regresivní primordia zubních rudiment , zatímco zelená barva ozna uje progresivní primordia budoucích funk ních zub . V embryonální diastem horní elisti se p echodn objevuje p t malých D primordií (D1-D5) a dva velké R pupeny (R1, R2). Naopak v p ední ásti diastemy mandibuly je vid t pouze epitelové ztlu-t ní (árkovaná ára) a v zadní ásti je patrný mesiální segment (MS) a -íroký R2 pupen. V ezákové oblasti horní i dolní elisti je patrné jedno rudimentární primordium anteriorn k primordiu funk ního ezáku (upraveno podle Peterkova *et al.*, 2000, Hovorakova *et al.*, 2011, Hovorakova *et al.*, 2013).

Další výzkum ukázal, že i v ezákové oblasti dolní elisti myších embryí je možné najít rudimentární zubní primordium tzv. mléčného ezáku (Obrázek 15) (Hovorakova *et al.*, 2011), který byl morfologicky popsán v horní i dolní elisti u myši (Woodward, 1894, Fitzgerald, 1973) i u potkana (Moss-Salentijn, 1978).

Rudimenty nejsou pouze p echodné útvary v elistech, mají svá signální centra stejně jako primordia budoucích funkčních zubů, která řídí jejich vývoj (Prochazka *et al.*, 2010, Hovorakova *et al.*, 2011).

1.6 NEJASNOSTI V OBLASTI ZUBNÍHO VÝVOJE

Přestože se zdá, že o vývoji zubu již máme kompletní informace, existuje mnoho neznámých v této oblasti. Moderní věda se za pomoci nejnovějších technologií zaměřuje především na molekulární regulaci vývoje zubu jako modelu. Zásadní roli v tomto procesu hraje primární sklovinný uzel (pEK), jak již bylo napsáno výše. Definice této struktury se však stále jeví problematicky s objevem zubních rudimentů u myši (Peterkova, 1983) a jejich signálních center (Prochazka *et al.*, 2010). Otázkou tedy zůstává, **co je doopravdy pEK a jaký má vztah k t mto rudiment m**. Vzhledem k tomu, že rudimentární *Shh* expresní domény byly zachyceny, jak se aktivují a zase mizí postupně jedna za druhou v čas i prostoru, **jaký mají vliv na normální vývoj funkčního zubu?**

Existence samotných zubních rudimentů je v současnosti přijímána jen velmi pozvolna. A to i přesto, že jejich přítomnost již byla prokázána jak na morfologické, tak molekulární úrovni. Jejich signální centra stále bývají mylně označována za expresní domény funkčních zubních primordií nebo jako patologický stav nadpočetných zubních primordií. *Shh* exprese v signálních centrech rudimentárních struktur byla zachycena v tvářové oblasti dolní elisti myších embryí. Pro ucelený pohled na vývoj funkčního zubu u myšičího modelu odontogeneze obecně by bylo vhodné zjistit, **zda se signální centra v rudimentárních strukturách vyskytují také v tvářové a případně ezákové oblasti horní elisti**, kde byly rudimenty doposud dokumentovány pouze morfologicky.

Na základě vzniku nadpočetných zubů před první stoličkou v elisti myši s mutacemi v některých genech spojených s odontogenezí bývají dvě velká rudimentární primordia v horní i dolní tvářové oblasti myšičí elisti spojována s pozstatky po funkčních premolárech povodních savců (Viriot *et al.*, 2002, Peterkova *et al.*, 2004). Z tohoto úhlu pohledu jde o struktury, které z hlediska fylogeneze byly u předků schopné

dát vznik samostatnému zubu ve funkci dentici. **Je tedy možné, že si tyto struktury uchovávají odontogenní potenciál a jsou schopné dát vznik zubu i v nedentální oblasti?**

2 CÍLE

- I. Doplnit informace o normogenezi dentálního vývoje u myšeho modelu a determinovat přítomnost signálních center zubních rudiment pomocí markeru odontogeneze - *Shh* exprese během normálního vývoje horní i dolní elisti z časového a prostorového hlediska na modelu myších embryonální dentice:
 - a. v ezákové oblasti horní elisti
 - b. v tvářové oblasti dolní elisti
 - c. v tvářové oblasti horní elisti

- II. Objasnit úlohu zubních rudimentů během normogeneze.
 - a. Sledovat buněnou linii signálních center rudimentárních struktur v tvářové oblasti a determinovat jejich vztah se signálním centrem funkčního zubu - pEK.
 - b. Sledovat buko-lingvální dynamiku sklovinných uzlů v rámci složeného zubu vyvíjejícího se v myších embryonální dentici - prvního moláru a determinovat vztah pEK k sekundárním EK.
 - c. Sledovat buněnou linii signálních center rudimentárních struktur v ezákové oblasti a determinovat jejich vztah s nedentálními strukturami vyvíjejícími se v úzkém vztahu s denticí (*vestibulum oris*).

- III. Objasnit úlohu zubních rudimentů v patogenezi v dolní elisti u myších nadpočetných zubů v tvářové oblasti.
 - a. Objasnit časovou a prostorovou dynamiku signálních center rudimentárních i funkčních zubních základů u *Sprouty2/Sprouty4* mutantních myších.
 - b. Determinovat úlohu zubních rudimentů při vzniku nadpočetného zubu u myších s nadpočetnými zuby v tvářové oblasti.

3 MATERIÁL

Modelovým organismem byla v této práci myš domácí (*Mus musculus*). Všechny použité myši pocházejí z oddělení teratologie, ÚEM AV ČR v.v.i. Veškeré manipulace a nakládání se zvířaty splňovala požadavky Odborné komise pro zajištění dobrých životních podmínek pokusných zvířat při ÚEM AV ČR, v.v.i.

3.1 POUŽITÉ KMENY MYŠÍ

CD1 kmen

CD1 myši (Charles River, Německo) jsou obecným, víceúrovňovým, outbredním kmenem bez cílených mutací, a proto jsou často používány jako kontrolní (WT). Tento kmen byl využit pro křížení s transgenním kmenem *ShhEGFP/Cre*.

ShhEGFP/Cre kmen

CD1 myši byly kříženy s transgenním kmenem B6.Cg-*Shh*^{tm1(EGFP/cre)Cjt/J}, čímž jsme pro dosažení stanovených cílů získali embrya se zelenou fluorescencí GFP (šgreen fluorescent protein) v *Shh* exprimujících buňkách pro fluorescenční mikroskopii. Tento kmen nese fúzní produkt *EGFP/Cre* (Gagnetten *et al.*, 1997), který je vložen do endogenního lokusu *Shh*, což má za následek produkci GFP v buňkách, které normálně exprimují *Shh* mRNA (Harfe *et al.*, 2004). Chov těchto myší probíhá přes křížení heterozygotního nositele *EGFP/cre* alely s WT myší. Heterozygotní jedinci pro *ShhGfpCre* alelu nevykazují žádný zvláštní fenotyp, jsou životaschopní a produkují potomstvo v očekávaných Mendelovských poměrech. Homozygotní genotyp znamená prenatální letalitu s fenotypovým projevem kyklopie.

Sprouty2 kmen

Transgenní knock-outní (KO) kmen *Spry2*ORF-null allele má *Spry2* vyloučený z funkce vložením neomycinové rezistence a odstraněním celé sekvence ORF (šopen reading frame). Homozygotní genotyp je asi z 50% letální, jedinci vykazují několik vývojových abnormalit gastrointestinálního traktu. Některé z projevů homozygotů jsou signifikantně menší a mohou trpět ztrátou sluchu (Shim *et al.*, 2005). Heterozygotní jedinci jsou vitální a nevykazují žádné vývojové vady, proto jsou ideální pro udržení chovu.

Chovné páry laskav poskytl Dr. Ophir Klein, UCSF, USA. Tyto myši vykazují nadpočetný zub v tvářové oblasti (Klein *et al.*, 2005, Klein *et al.*, 2006).

Sprouty 4 kmen

Transgenní knock-outní (KO) kmen *Spry4*ORF-null allele byl vytvořen stejnou strategií jako *Spry2* kmen (Shim *et al.*, 2005, Klein *et al.*, 2006). Nicméně homozygotní jedinci jsou vitální a fertilní (Klein *et al.*, 2006). Chovné páry laskav poskytl Dr. Ophir Klein, UCSF, USA. Podobně jako *Spry2* deficientní myši, vykazují nadpočetný zub v tvářové oblasti (Klein *et al.*, 2006).

Sprouty2/Sprouty4 kmen

Pro studii disociovaným epitel byly vygenerovány kmeny *Spry2/Spry4/ShhEGFP/Cre*: p vodní kmen *ShhEGFP/Cre* byl křížený s *Spry2* a *Spry4*. Tím jsme získali model trojitého transgenního kmene myši s nadpočetnými zuby a GFP fluorescencí v místě *Shh* mRNA exprese. Samci *Spry2*ORF/*Spry4*ORF /B6.Cg-*Shh*^{tm1(EGFP/cre)Cjt}/J byli kříženi se samicemi *Spry2*ORF/ *Spry4*ORF nebo *Spry2*ORF nebo *Spry4*ORF s cílem získat embryonální materiál s různými dávkami *Spry2* a *Spry4* gen (Tabulka 1).

Tabulka 1: Počet zpracovaných vzorků pro jednotlivé genotypy v rámci diplomové práce (DP) a dizertační práce (DizP). Nízký počet *Spry2* / *Spry4* / mutantních embryí by mohl být způsoben jejich prenatální letalitou z důvodu vysoké incidence n kterých vývojových defektů kraniofaciální oblasti, končetin a plic (Taniguchi *et al.*, 2007).

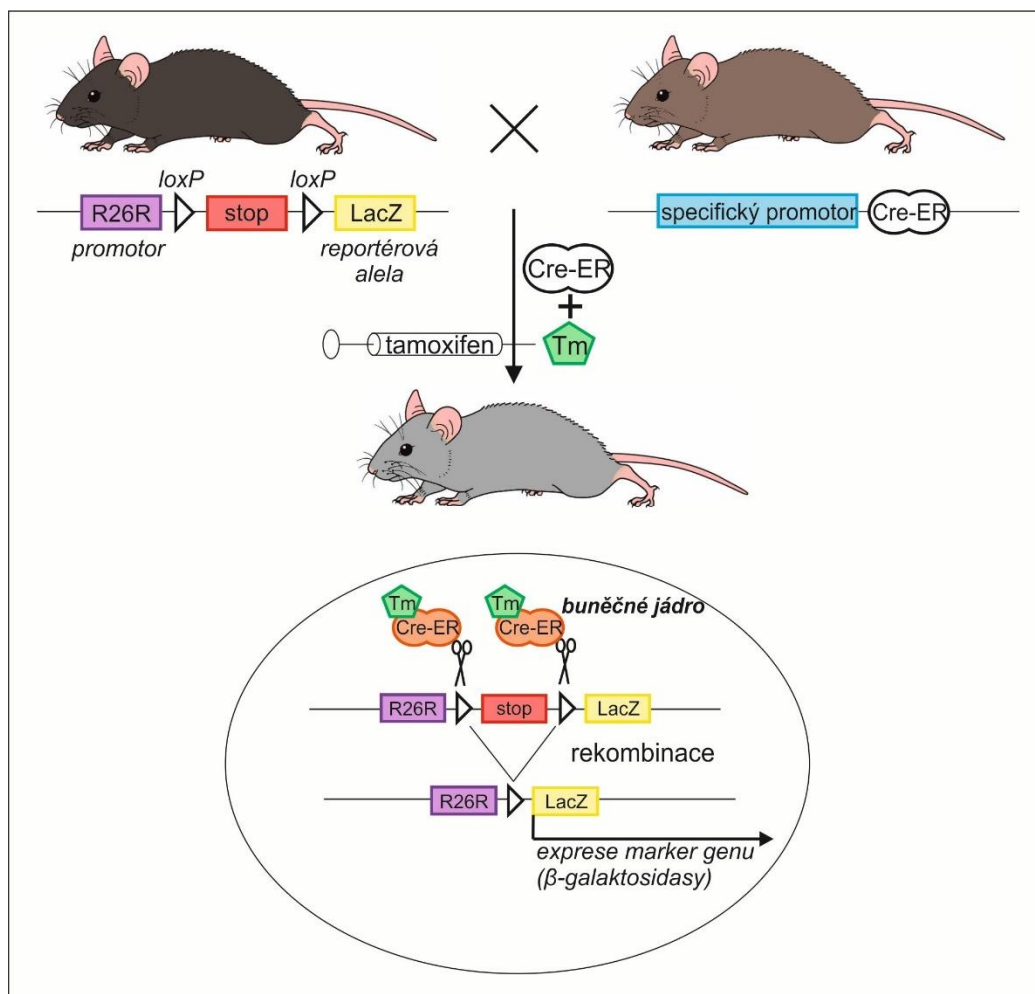
genotypy	počet vzorků DP	počet vzorků DizP	celkem
<i>Spry2</i> +/+; <i>Spry4</i> +/+	22	30	52
<i>Spry2</i> +/+; <i>Spry4</i> +/-	74	33	107
<i>Spry2</i> +/+; <i>Spry4</i> -/-	55	15	70
<i>Spry2</i> +/-; <i>Spry4</i> +/+	57	51	108
<i>Spry2</i> +/-; <i>Spry4</i> +/-	45	53	98
<i>Spry2</i> +/-; <i>Spry4</i> -/-	50	40	90
<i>Spry2</i> -/-; <i>Spry4</i> +/+	16	27	43
<i>Spry2</i> -/-; <i>Spry4</i> +/-	21	30	51
<i>Spry2</i> -/-; <i>Spry4</i> -/-	5	5	10
celkem	345	284	629

Cre-loxP systém

Obvykle jsou kmeny s Cre rekombinázou a loxP místy chovány odděleně a teprve jejich křížením se utváří Cre-lox systém (Nagy, 2000). Většina Cre a loxP kmenů spadá do těchto kategorií:

- Cre exprimující kmeny obsahují transgen, který exprimuje Cre pod kontrolou všeobecného nebo tkáňově specifického promotoru.
- loxP flanked (floxed) kmeny obsahují loxP místa lemující (z každé strany) kritickou část cílového genu nebo genomové oblasti zájmu.
- Indukovatelné Cre kmeny obsahují transgen, který exprimuje modifikovanou formu Cre rekombinázy. Ta je nefunkční dokud není podána indukční látka (jako doxycyklin, tetracyklin, RU486 nebo tamoxifen) v požadovaném časovém okamžiku embryonálního vývoje nebo postnatálního života.
- Cre reportérové kmeny obsahují loxP místa spolu s viditelnými (fluorescenčním nebo LacZ) markerovými proteiny umožňujícími sledování úspěšných Cre rekombinací a/nebo změn v genové expresi (<http://cre.jax.org/introduction.html>).

Pro naše účely jsme vytvořili transgenní kmen B6.129S6-*Shh*^{tm2(cre/ERT2)^{Cjt}/J}, nesoucí gen pro fúzní produkt *Shh* a Cre rekombinázy indukovatelný tamoxifenem. Tyto myši byli kříženi s B6.129S4-Gt(ROSA)26Sor^{tm1LacZ^{Sor}/J} kmenem, který je nositelem reportérového genu *LacZ* vloženého do *Gt(ROSA)26Sor* lokusu za účelem enzymatické detekce β-galaktosidasové aktivity (Obrázek 16). Při křížení těchto kmenů se vytvoří specifický Cre-lox systém, umožňující sledování osudu buněk exprimujících *Shh* v době aplikace tamoxifenu a jejich potomků. Tyto kmeny byly získány z Jackson Laboratory, Maine, USA a genotypovány dle standardního protokolu (Jackson Laboratory, Maine, USA).



Obrázek 16: Cre-lox systém sledování osudu specifické buněčné populace o expresující *Shh*. Exprese Cre rekombinázy může být prostorově omezena také ovládaná specifickým promotorem. Spatirové omezení je zajiřeno fúzí Cre rekombinázy s doménou estrogenového receptoru ($Cre-ER^{Tm}$), která váže hormon senzitivní na tamoxifen (Tm). Celý tento Cre konstrukt není aktivní v nepřítomnosti ligandu jako tamoxifenu. Jakmile je přidán tamoxifen, Cre se aktivuje a umístí se do buněčného jádra. V naší studii jsou tyto Cre konstrukty použity ve spojení s reportérovými geny (*LacZ*), jejichž exprese je pod kontrolou promotoru *ROSA26* (*R26R*) a které jsou umístěny za stop kodonem. Tento stop kodon obklopuje místa (loxP), která rozeznává Cre rekombináza. Následkem toho může být reportérový gen aktivován ve specifických buněčných typech a ve specifickém spatirovém okamžiku. Při absenci tamoxifenu nedojde k expresi reportérového genu (*LacZ*), protože je umístěn ař za stop sekvencí. Pokud je aplikován tamoxifen, Cre je aktivována a zprostředkuje rekombinaci mezi loxP místy v buněkách (expresujících *Shh*). Díky tomu dojde k vyřazení stop kodonu a buněky jsou permanentně značeny reportérovým marker genem (*LacZ*).

***Sprouty4* Cre-loxP systém**

*Sprouty4*ORF-null allele myši byli křířeny s B6.129S6-*Shh*^{tm2(cre/ERT2)Cjt/J} a také s kmenem B6.129S4-*Gt(ROSA)26Sor*^{tm1LacZSor/J}, čímž jsme vygenerovali transgenní kmény

*Spry4*ORF-null allele/B6.129S6-*Shh*^{tm2(cre/ERT2)Cjt}/J a *Spry4*ORF-null allele/ B6.129S4-*Gt(ROSA)26Sor*^{tm1LacZSor}/J. Tyto myši nesou fenotyp vykazující nadpočetné zuby a umožní vytvoření Cre-loxP systému indukovatelného tamoxifenem obdobným způsobem, jako je uvedeno výše. Tento systém se od výše zmíněného liší pouze přítomností nefunkčních kopií *Spry4* genu, což způsobuje nadpočetné zuby v dentici.

Myši byly genotypovány dle standardního protokolu (Jackson Laboratory, Maine, USA). Nakládání se v rámci laboratorními zvířaty splňuje požadavky odborné komise Ústavu experimentální medicíny Akademie věd České republiky.

4 METODY

4.1 ODBĚR EMBRYÍ

Příslušné myši byly vždy připraveny přes noc, příměsí před detekcí vaginální zátky byla určena jako ED0,0. Embrya byla odebírána v rozmezí ED11,5 až 18,5. Během samice byly usmrceny cervikální dislokací a embrya byla následně na ledu vyjmuta z uteru a z jejich zárodečných obalů, lehce osušena a zvážena pro přesnější jejich stádiování. Tělesná hmotnost velmi dobře koreluje se stádiem vývoje v různých fázích odontogeneze (Peterka *et al.*, 2002). Za účelem detailních sérií zubního vývoje a homogenity dat byla myšička embrya vždy odebírána v několika časových horizontech v každém ED: embrya na ED12,3; 13,3; 14,3; 15,3; 16,3; 17,3 a 18,3 byla odebírána mezi 6 a 9 hodinou; embrya na ED11,5; 12,5; 13,5; 14,5; 15,5; 16,5; 17,5 a 18,5 byla odebírána mezi 9 a 15 hodinou; a embrya na ED12,7; 13,7; 14,7; 15,7; 16,7 a 17,7 byla odebírána mezi 15 a 18 hodinou. Část tkání každého vzorku z transgenního kmene *Spry2;Spry4* byla genotypována podle příslušného protokolu.

Z oddělených hlav embryí byly mikropreparáty izolovány elisty, případně samostatné zubní regiony pod stereomikroskopem (Carl Zeiss, Stemi 305, Německo). V zájmu homogenizace získaných dat a případné korelace s dostupnou literaturou byla u všech odebraných vzorků zaznamenána jak jejich hmotnost, tak embryonální den vývoje.

4.2 DISOCIACE DENTÁLNÍHO EPITELU A FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Vypreparované zubní segmenty tvářové oblasti dolní elisty EGFP pozitivních embryí byly umístěny do Hank's solution (Sigma Aldrich) a následně do 1 % roztoku trypsinu (Difco Laboratories) při 4°C na jednu až dvě hodiny (v závislosti na vývojovém stupni embryí), abychom oddělili tkáň epitelu zubního zárodku od okolního mesenchymu. Disociované epitely byly zdokumentovány ve stopovacím roztoku (20% FCS od Sigma Aldrich) pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Leica AF6000 (Leica Microsystems GmbH, Německo). *Shh* expresní domény byly determinovány podle zelené fluorescence v buňkách aktuálně exprimujících *Shh*.

Hodnotili jsme dynamiku *Shh* exprese v dentálním epitelu dolní tvářové oblasti u všech genotypů založených na kombinacích alel *Spry2* a *Spry4* genů. Jako kontrolní genotyp byl použit genotyp *Spry2*^{+/+};*Spry4*^{+/+}. Celkem bylo zhodnoceno 629 vzorků

dentálních epitel (Tabulka 1). Sledována byla přítomnost *Shh* exprese v zubním základu prvního moláru (M1) a rudimentárních struktur před zubním základem prvního moláru (M1), dále pak přítomnost *Shh* exprese v zubním základu druhého moláru (M2) u pokročilejších stádií. Zubní primordium bylo označeno jako nadpočetné, když se jednalo o oddělenou epiteliální strukturu s vlastním signálním centrem. Tato struktura byla detekována před zárodkem prvního moláru (M1), ale byla mezi nimi patrná hranice.

4.3 SLEDOVÁNÍ BUNĚČNÝCH LINÍ

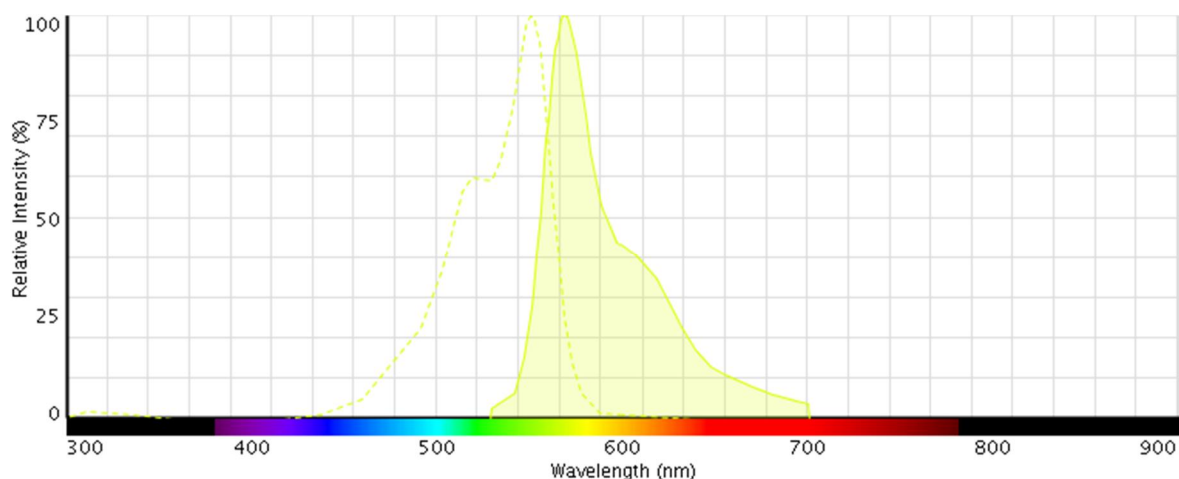
4.3.1 IN VITRO KULTIVACE TKÁŇOVÝCH ŘEZŮ

Dolní elisty *ShhEGFP/Cre* pozitivních myšů byly vypreparovány na ED14,5 a nasekány pomocí McIlwain Tissue Chopper (Intracel) na poloténké frontální ezy o tloušťce 250 μm (Matalova *et al.*, 2005, Diep *et al.*, 2009, Alfaqeeh and Tucker, 2013). Pro ezy celé dolní elisty a kultivaci zubních zárodků je ideální odebrat embrya mezi ED11,5 a ED15,5, protože po tomto časovém úseku již dochází k vývoji kostí. Kost mandibuly je pak příliš tvrdá k nasekání na Chopperu (Buchtova *et al.*, 2012).

ezy, na kterých byly zetele zubní zárodky, byly vybrány ke kultivaci. Zvolené ezy byly umístěny do stejné kultivační misky (Nunc) s 1 ml Hank's solution (Sigma Aldrich).

DiI mikroinjekční značení

Pro sledování osudu specifických buněčných populací bylo využito mikroinjekční značení CM-DiI. DiI (1,1-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchloride) (Molecular probes cell tracker CM-DiI, C-7000) je vitální barviva, která patří mezi karbocyaninová barviva. Jde o silně fluorescenční lipofilní barvivo, které značí buněčné membrány a je běžně používáno pro zkoumání osudu buněk. CM-DiI se přenáší na potomky značených buněk (obvykle 3 až 6 generací), ale zároveň neuniká do buněk sousedních. Navíc, je netoxické (Honig and Hume, 1986, Honig and Hume, 1989). Díky své chloromethylové skupině je CM-DiI v buňkách stálejší i během fixace, permeabilizace nebo parafinového zpracování tkáně a zároveň má i jiné fluorescenční spektrum (Obrázek 17) oproti klasické DiI.

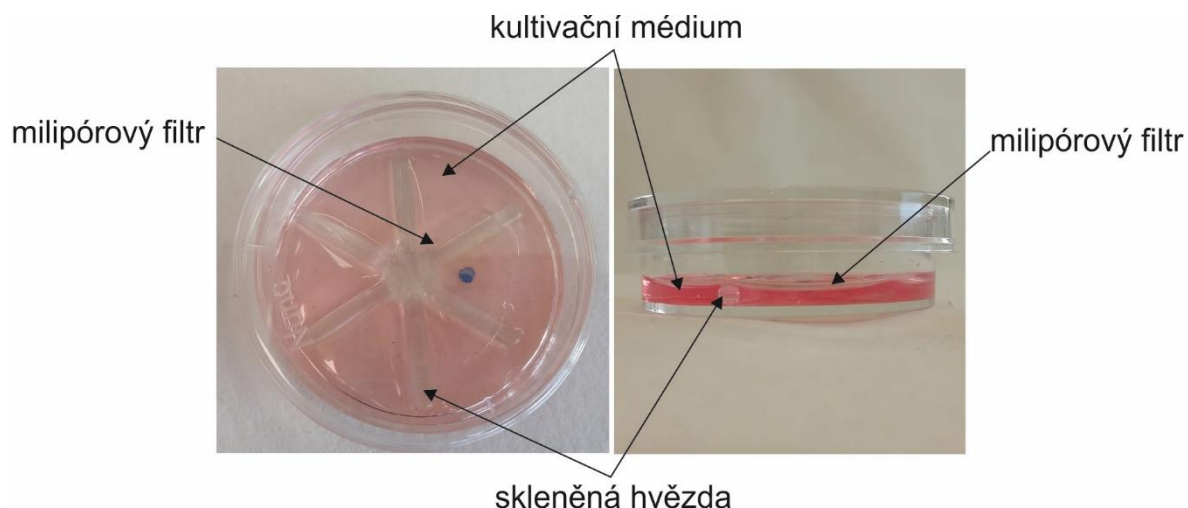


Obrázek 17: Fluorescen ní barevné spektrum CM-DiI (C7000). Fluorescen ní excita ní maximum pro CM-DiI (C7000) je 553 μm a emisní maximum je 570 μm (<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?ICID=svtool&UID=282lip>).

DiI bylo rozpu-t no v DMSO (1mg/1ml). Malé množství pak bylo injikováno do ezu pomocí ústní pipety a to je-t p ed kultivací (Diep *et al.*, 2009). Následn prob hla kontrola zna ení pod fluorescencí mikroskopu Leica AF6000 (Leica Microsystems GmbH, N mecko).

Úsp -n ozna ený tká ový ez byl umíst n na transparentní miliporový filtr (s velikostí pór 0,4 μm) (BD Biosciences), který byl dostate n velký pro usazení na sterilní sklen nou podporu ve tvaru hv zdy v kultiva ní misce (Nunc). Do misky byl p idán 1 ml kultiva ního média, které se skládalo z Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM F12) (Sigma Aldrich), 1% antibiotika - Gentamycin (Sigma Aldrich), 1% vitamin C (Sigma Aldrich), 1% L-glutamin (Sigma Aldrich), 20% Fetal Bovine Serum (Sigma Aldrich). Hladina média se t sn dotýkala spodní strany miliporového filtru (Obrázek 18). Technika kultivace byla modifikována podle Trowella (Trowell, 1959).

ezy byly kultivovány p i 37°C, 5% CO₂ po dobu 4-5 dní. Správnou teplotu a vlhkost zaji-ovala kultiva ní kom rka invertovaného fluorescen ního mikroskopu Leica AF6000 (Leica Microsystems GmbH, N mecko), který zárove zaji-oval snímání morfologie ezu po 1 hodin (*time-laps*) po dobu 4 a 5 dní. Vým na média probíhala p iblifn každých 48 hodin.



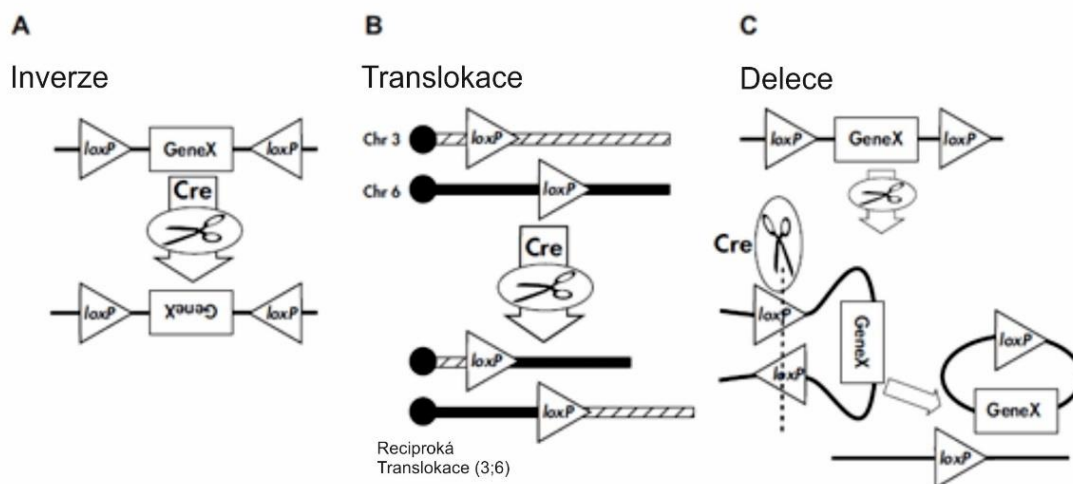
Obrázek 18: Poufítá kultiva ní technika. Kultivace tká ového ezu (p edstavován modrou te kou) usazeného na miliporovém filtru, který je udrflován na hladin média pomocí sklen ěné hv zdy. Ramena této hv zdy podpírají okraje filtru tak, aby tká ový ez mohl být snímán invertovaným mikroskopem.

4.3.2 CRE-LOXP SYSTÉM

Cre-loxP systém umohl uje sledování ur ité bun ěné linie. Tento mechanismus byl objeven b hem studia P1 bakteriofága jako b fná sou ást normálního fivotního cyklu tohoto viru (Sternberg and Hamilton, 1981, Sauer and Henderson, 1988). Jeho reproduk ní strategie byla p enesena do technologie umohl ující manipulaci genomu r zných organism za vyuffití dvou slofek:

- (1) Cre rekombináza je enzym, který katalyzuje rekombinaci mezi dv ma loxP místy.
- (2) LoxP místo je specifická sekvence 34 pár bází, tvo ená 8 páry základní sekvence, kde probíhá samotná rekombinace, a dv ma p ilehlými invertovanými repetitivy (2 x 13 bp) (Obrázek 16).

Vzhledem k tomu, že Cre gen a loxP místa nejsou p irozenou sou ástí myšho genomu, byla vytvo ena transgenní technologie. Orientace a pozice loxP míst ur uje, zda Cre rekombinace bude indukovat delecii, inverzi nebo chromosomální translokaci (Obrázek 19) (Nagy, 2000).



Obrázek 19: Možné způsoby Cre-loxP rekombinace. Výsledek je dán orientací a pozicí loxP míst. (A) Pokud jsou loxP místa v opačných směrech, výsledkem bude inverze cílového segmentu. (B) Přítomnost loxP míst na různých chromosomech znamená chromosomální translokaci. (C) Pokud jsou loxP místa orientována stejným směrem na chromosomálním segmentu, dojde k delecí cílového segmentu (<http://cre.jax.org/introduction.html>).

Pro naše účely jsme vyuffili dva Cre-loxP systémy:

(1) **systém pro sledování normogeneze** v ezákové a tváové oblasti: transgenní kmen B6.129S6 *Shhtm2(cre/ERT2)Cjt/J*, nesoucí gen pro fúzní produkt *Shh* a *Cre* rekombinázy indukovatelný tamoxifenem, který byl křížen s reportérovým B6.129S4-*Gt(ROSA)26Sortm1LacZSor/J* kmenem (Obrázek 16).

(2) **systém pro sledování vzniku nadpoetného zubu** v dolní tváové oblasti: transgenní kmen *Spry4ORF-null* allele/B6.129S6-*Shh^{tm2(cre/ERT2)Cjt/J}* byl křížen s reportérovým kmenem *Spry4ORF-null* allele/ B6.129S4-*Gt(ROSA)26Sortm1LacZSor/J*. Oba kmény jsou deficientní pro *Spry4*, což způsobuje nadpoetné zuby anteriorně k M1.

Administrace tamoxifenu

Dávka 0,225 mg tamoxifenu (Sigma) na 1 g tělesné hmotnosti samice (Hayashi and McMahon, 2002) byla intraperitoneálně aplikována bezúmyšlně na ED11,5; 12,5; 13,5 a 14,5. Tato dávka neohrofuje život samic ani embryí, ale je dostatečná pro aktivaci Cre rekombinázy. Embrya byla odebírána na ED12,5; 13,5; 14,5; 15,5; 16,5; 17,5 a 18,5 (nejméně 24 hodin po aplikaci tamoxifenu).

X-galové barvení a histologické zpracování

Hlavičky odebraných embryí byly barveny X-galem (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside od Sigma Aldrich) pro vizualizaci buněk a jejich potomků, u nichž došlo k rekombinaci. Koncentrace X-galu v barvicím pufru byla 3mM. Hlavy embryí s pozitivním barvením byly fixovány v 4% PFA přes noc. Po oplachu v PBS byla vypreparovaná elista zdokumentovaná pomocí stereomikroskopu Leica MZ6 s digitální kamerou Leica EC3 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Německo). Následně byly vzorky post-fixovány 3 dny v roztoku Bouinu (Penta) a histologicky zpracovány. Pokud byla hmotnost odebraných embryí vyšší než 700 mg, bylo nutné vzorek dekalcifikovat pomocí 0,5 M roztoku EDTA po dobu 3 až 6 dnů.

Vzorky byly standardně zality do parafinu - po fixaci následovalo odvodnění vzestupnou alkoholovou řadou, projasnění v toluenu a prosycení parafinem v několika stupních (s teplotou tání 54°C a 58°C) přes noc. Zhotovené bločky byly nakrájeny na rotačním mikrotomu (Leitz, Wetzlar, Německo) na sériové frontální řezy o tloušťce 10 μ m. řezy byly napnuty na podlovní sklenku a po deparafinizaci a následném zavodnění sestupnou alkoholovou řadou byly řezy dobarveny jádrovou červení (Fast red od Fluka). Jádrová červen se rozpouští za tepla (100 ml 5% roztoku síranu hlinitého, 0,5 g jádrové červeně), pak se nechává odstát do druhého dne a před pouflitím je nutné ji přefiltrovat. Histologické řezy pak byly opět odvodněny a zamontovány umlou pryskyčicí Neomount (Merck) a zakryty krycím sklenkem.

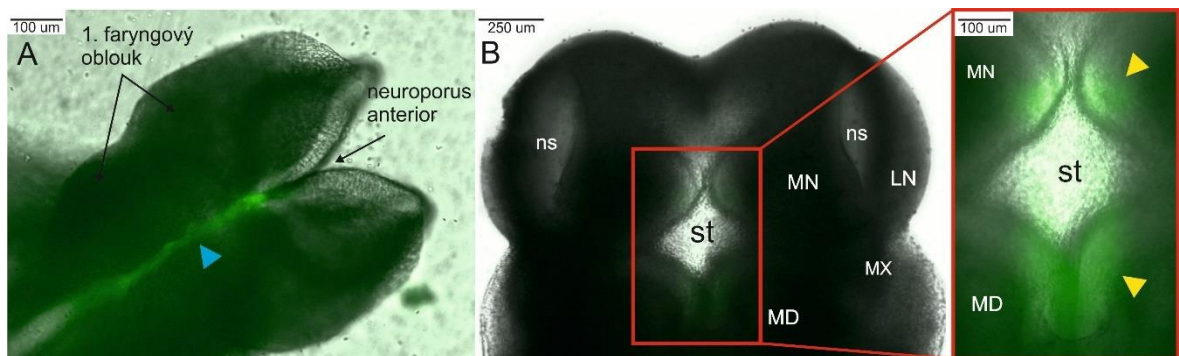
5 VÝSLEDKY

Jelikož již v minulosti byla zmapována normogeneze dolní ezákové oblasti, rozhodli jsme se výsledky doplnit o data z horní ezákové oblasti. V zájmu homogenizace získaných dat a případné korelace s dostupnou literaturou byla u všech odebraných vzorků zaznamenána jak jejich hmotnost, tak embryonální den vývoje.

5.1 ŘEZÁKOVÁ OBLAST – NORMOGENEZE

Shh exprese byla vizualizována pomocí fluorescenční mikroskopie. Tato metoda prokázala u EGFP pozitivních vzorků přítomnost *Shh* exprese již od velmiasných vývojových stádií (ED8,5) (Obrázek 20).

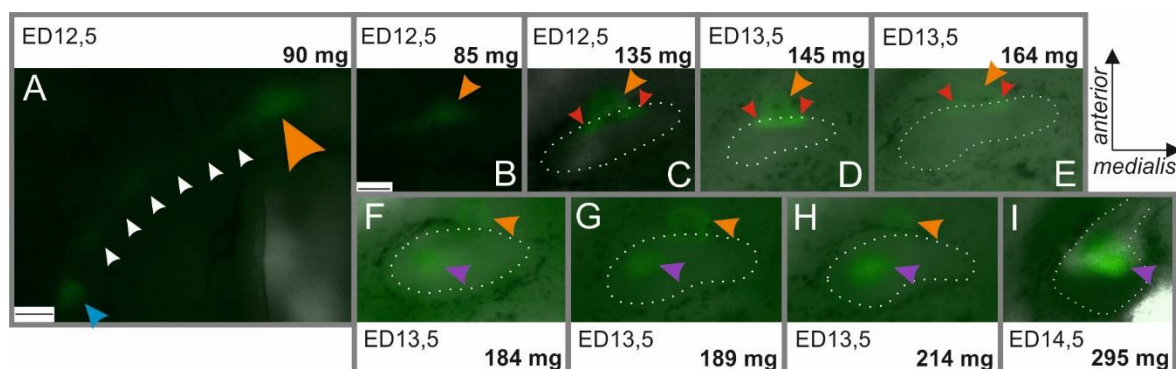
Na základě hodnocení vzorků embryonálních horních elistí jsme definovali dvě antero-posteriorně lokalizované *Shh* expresní domény v oblasti budoucího ezáku. První doména je lokalizována anteriorně, zatímco druhá se objevuje posteriorně.



Obrázek 20: Asná *Shh* exprese u EGFP pozitivních embryí. (A) *Shh* exprese v oblasti neurální lišty (modrá šipka) myšeho embrya na ED 8,5. (B) V apexu faciálních výbřesků se také exprimuje *Shh* (bílé šipky) u myších embryí na ED10,5. ns – nasální jamka; st – stomodeum; MN – mediální nasální výbřesk; LN – laterální nasální výbřesk; MX – základ pro maxilární výbřesk; MD – mandibulární výbřesk. Mřížka je 100 µm, resp. 250 µm.

V anteriorní ezákové oblasti horní elisti se objevil *Shh* signál teprve až na ED11,5. Tato signální doména měla trojúhelníkový tvar a byla spojena s *Shh* expresní doménou v tvářové oblasti (MS) tenkou *Shh* pozitivní linií v oblasti budoucí diastemy (Obrázek 21A,B). Následně se anteriorní ezáková doména diferencovala ve dva krátké prouhlky ležící vedle sebe v medio-laterálním směru v ED12,5-13,5 (Obrázek 21C, D, E).

U hmotnostně těžších a tedy vývojově pokročilejších embryí v ED13,5 se začíná objevovat i druhá, posteriorní *Shh* expresní doména (Obrázek 21F, G, H). Později, během ED14,5 anteriorní doména vymizela a bylo možné detekovat pouze posteriorní doménu (Obrázek 21I).



Obrázek 21: *Shh* exprese v pravé pažkové oblasti horní elisti. *Shh* exprese byla vizualizována u EGFP pozitivních embryí. (A, B) Na ranějších stádiích ED12,5 (u hmotnostně lehčích embryí) má anteriorní *Shh* expresní doména (oranžová šipka) trojúhelníkový tvar a je spojena s *Shh* expresní doménou v tvárové oblasti tenkou linií *Shh* pozitivních buněk (bílé šipky). Na ranějších stádiích je tato struktura funkčně nejasně determinovatelná. (C, D, E) V závěru ED12,5 a na počátku ED13,5 dochází ke změně tvaru této domény. Je možné detekovat dva krátké prouhlky (červené šipky) v medio-laterálním směru, přičemž lokalizace je na bázi vyvíjejícího se primordia funkčního pažku (vyznačeno tečkovaně). (F, G, H) U pokročilejších stádií ED13,5 se začíná objevovat posteriorní *Shh* expresní doména (fialová šipka), která je lokalizovaná přímo v pažkovém primordiu. (I) Během ED14,5 anteriorní *Shh* doména mizí a přetrvává pouze posteriorní doména v centru vyvíjejícího se pažku. Měřítko je 100 μm.

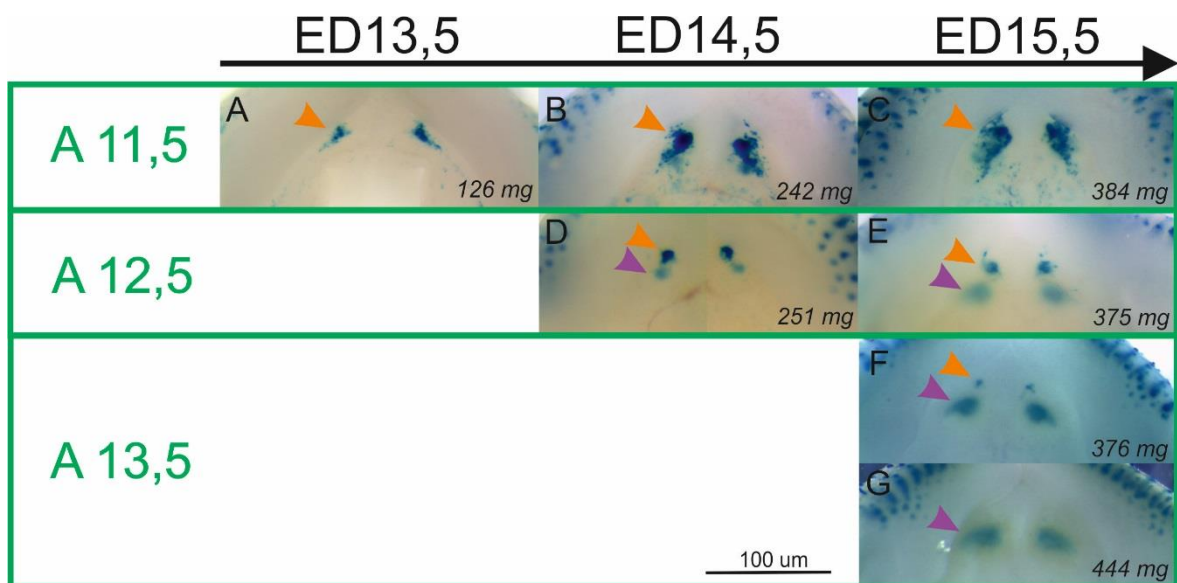
Tyto výsledky potvrzují i data získaná s využitím Cre-loxP technologie - tedy z křížení myších kmenů: (1) *Shh^{ERC}Cre* (B6.129S6-*Shh^{tm2(cre/ERT2)}Cjt/J) a (2) *RosaLacZ* (B6.129S4-*Gt(ROSA)26Sor^{tm1LacZSor}*/J). Účelem bylo známení a sledování osudu buněčných populací exprimujících *Shh* od začátku vývoje horních pažků. Toto známení probíhalo od okamžiku aplikace tamoxifenu do odběru embryí.*

Tamoxifen byl běžně aplikován intraperitoneálně na ED11,5, kdy by podle výsledků z fluorescenční mikroskopie měla *Shh* exprimovat pouze první anteriorní doména. Embrya pak byla odebrána na ED13,5, 14,5 a 15,5 (tedy 48/72/96 hodin po aplikaci tamoxifenu). Dávka tamoxifenu aktivovala Cre rekombinázu, čímž došlo k následné produkci β-galaktosidasy reagující s X-galem během barvení. Toto barvení označilo modře všechny buňky kódující β-galaktosidasu v lokusu *Shh* a také všechny jejich

potomky od aplikace tamoxifenu do odbru embryí (viz kapitola Cre-loxP systém). Na začátku byla patrná pouze anteriorní populace buněk exprimujících *Shh* (apl. 11,5; ED13,5) (Obrázek 22A). Odbor na pozdějších ED (ED14,5 a 15,5) ukázal ztvárnění této oblasti (Obrázek 22B, C).

Podobná sada vzorků byla vytvořena i s aplikací tamoxifenu na ED12,5 a odbory na ED14,5 a 15,5. Detekce buněk exprimujících *Shh* od ED12,5 a jejich potomků ukazuje již dvě samostatné populace buněk v anteriorní a posteriorní ezákové oblasti (Obrázek 22D, E).

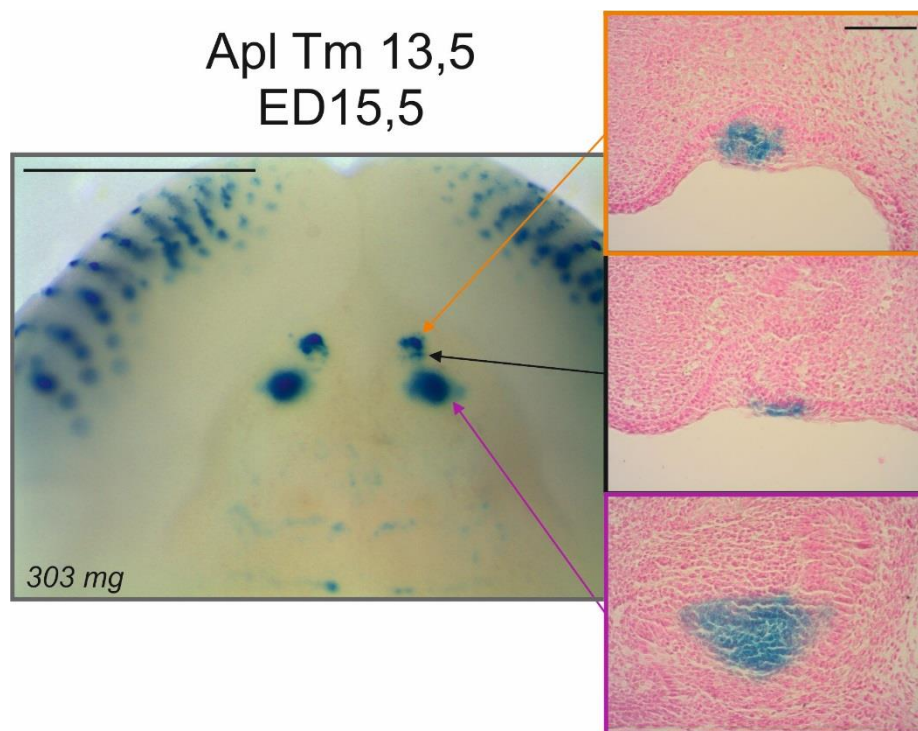
U dalších vzorků s aplikací tamoxifenu na ED13,5, kdy se podle výsledků fluorescenční mikroskopie objevuje posteriorní *Shh* doména v centru funkčního ezáku, předemfanti anteriorní postupně mizí, bylo při odboru na ED15,5 patrné, že posteriorní lokalizované modré bučky tvoří silněji zbarvenou oblast, zatímco anteriorní populace je zbarvená méně intenzivně (Obrázek 22F), což lze vysvětlit tím, že bylo zachyceno méně buněk aktivně exprimujících *Shh* v zanikající přední doméně. U těchto (vývojově pokročilejších) embryí je již anteriorní oblast negativní (Obrázek 22G).



Obrázek 22: Vizualizace osudu buněk exprimujících *Shh* v ezákové oblasti horní elisti myších embryí. Embryonální horní elisti ukazují (modré) potomky všech buněk exprimujících *Shh* po aplikaci tamoxifenu na ED11,5, 12,5 a 13,5, resp. (A) Při aplikaci tamoxifenu na ED11,5 byla přítomna jen jedna oblast modře zbarvených buněk (oranžová šipka) (ED13,5), odpovídající potomkům anteriorní *Shh* signální domény. (B, C) Tato modrá oblast se u pokročilejších embryí (ED14,5 a 15,5) postupně ztvárnila posteriorním směrem. (D) Při aplikaci tamoxifenu na ED12,5 byly patrné dvě oddělené populace modrých buněk (ED14,5), výše zmíněná přední a nová posteriorní (fialová šipka), (E)

kteřá u pokro ilej-ích stádií zv t-ovala sv j rozsah (ED15,5). (F) P i aplikaci tamoxifenu na ED13,5 byla u hmotnostn leh ích embryí stále p ítomna mén intenzivn zbarvená anteriorní populace bun k. (G) U pokro ilej-ích jedinc p ední oblast byla negativní, patrná z stala pouze posteriorní oblast mod e zbarvených bun k (ED15,5).

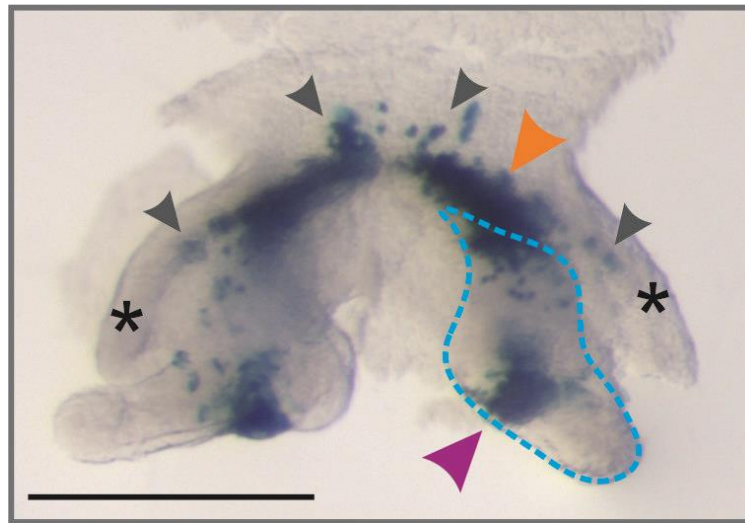
Histologické ezy t chto vzork ukázaly, že anteriorní oblast modřích bun k byla lokalizována v povrchové ásti epitelu. Naopak druhá posteriorní populace bun k se nacházela hluboko uprost ed epitelové struktury zárodku funk ního ezáku p íléhající k budoucí labiální cervikální smy ce (Obrázek 23).



Obrázek 23: Detekce *Shh* exprimujících bun ných linií v oblasti my-ího horního ezáku. Anteriorní oblast pozitivn (mod e) zbarvených bun k (oranřová ípka) byla na histologickém ezu lokalizována v povrchové ásti epitelu (oranřový ráme ek). Naopak druhá posteriorní populace bun k (fialová ípka) se nacházela uprost ed epitelové struktury zárodku funk ního ezáku (fialový ráme ek). M ítko je 0,1 mm pro histologické ezy a 1 mm pro elist.

Pro dopln ní informace a srovnání s dolní elistí jsme na ED14,5 disociovali epitel v dolní ezákové oblasti, p i emfl aplikace tamoxifenu prob hla na ED11,5. Dle o ekávání jsme našli pozitivní (modřé) bu ky ve dvou místech: (1) v primordiu funk ního ezáku a (2) anteriorn k tomuto primordiu, což koresponduje s fakty zji-t nými

v horní elisti. P ekvapiv se v-ak mod e zbarvily i bu ky v p ilehlém epitelu p edsín ústní (Obrázek 24).



Obrázek 24: Disociovaný epitel ezákové oblasti dolní elisti myšního embrya. Modrá barva označuje všechny buňky a jejich potomky exprimující *Shh* ode dne aplikace (ED11,5) do odběru embrya (ED14,5). ezákový epitel jasně ukazuje dvě oddělené populace buněk – anteriorní (oranžová šipka) a posteriorní v zárodku funkčního zubu (fialová šipka). Modrá periferovaná čára ohraničuje píblifný tvar ezákového epitelu. Modře zbarvené buňky lze pozorovat nejen v oblasti zubního zárodku, ale také v oblasti pílehlého vestibulárního epitelu (šedé šipky). Hvězdičky označují oblast vestibulárního epitelu. Mřítko je 0,5 mm.

5.2 BUŇKY ODONTOGENNÍHO EPITELU V ZÁKLADU VESTIBULUM ORIS

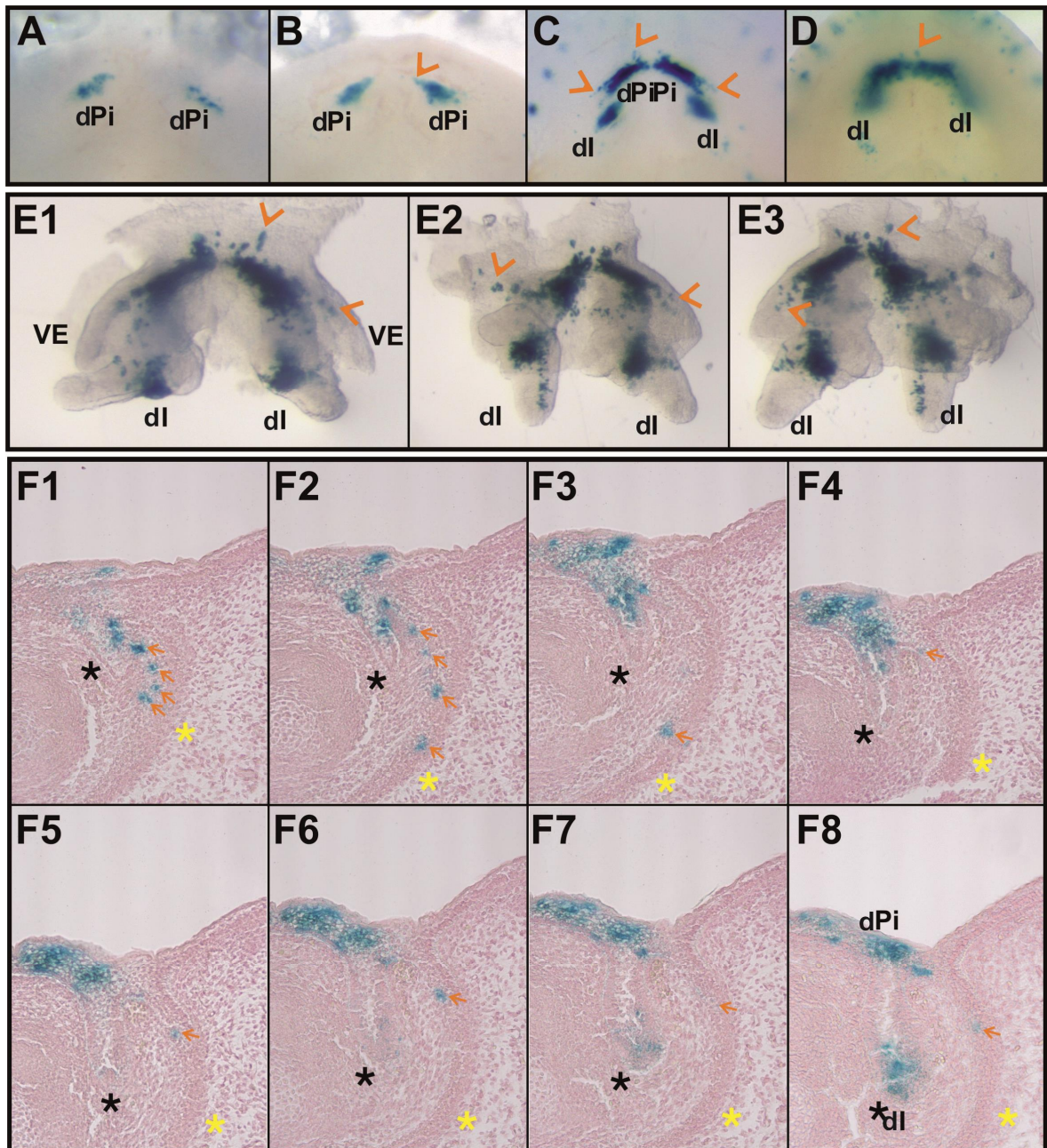
Výsledky ze vzorků ezákové oblasti ukázaly píítomnost pozitivně značených buněk nejen v anteriorní a posteriorní ezákové oblasti, ale také v oblasti epitelového základu píedsín ústní (*vestibulum oris*) (Obrázek 24). U dospělce se jako *vestibulum oris* označuje volný prostor, který ohraničují rty a tváře z labiálního/bukálního smru a dásně se zuby z lingvální strany (Obrázek 40). Lokalizace modrých buněk v epitelu této struktury, zevně od vyvíjejících se ezáků, evokovala otázku, jak jsou buňky exprimující *Shh* roz distribuovány během vývoje mandibulární ezákové oblasti v raných embryonálních stádiích.

Abychom ověřili píítomnost pozitivních buněk ve vyvíjejícím se vestibulárním epitelu, vyuffili jsme znovu Cre-loxP systém, který nám umožnil vizualizovat buňky exprimující *Shh* od námi zvoleného časového okamžiku (od aplikace dávky tamoxifenu)

do odb ru embrya. Tamoxifen byl aplikován b ezí samici na ED11,5 a 12,5, což je doba, kdy dochází k expresi *Shh* v oblasti asociované s vývojem rudimentárního ezáku (anteriorní signální doména) (Hovorakova *et al.*, 2011).

Po aplikaci tamoxifenu na ED11,5 jsme detekovali mod e zna ené bu ky v povrchové ásti orálního epitelu (p vodn odpovídající anteroorní signální domén) po 24 a 48 hodinách (odb ry na ED12,5 a 13,5) (Obrázek 25A, B). Po 72 a 96 hodinách (odb ry na ED14,5 a 15,5) byly jifl patrné pozitivní modré bu ky i v primordiu budoucího funk ního ezáku (Obrázek 25C, D, E1-E3).

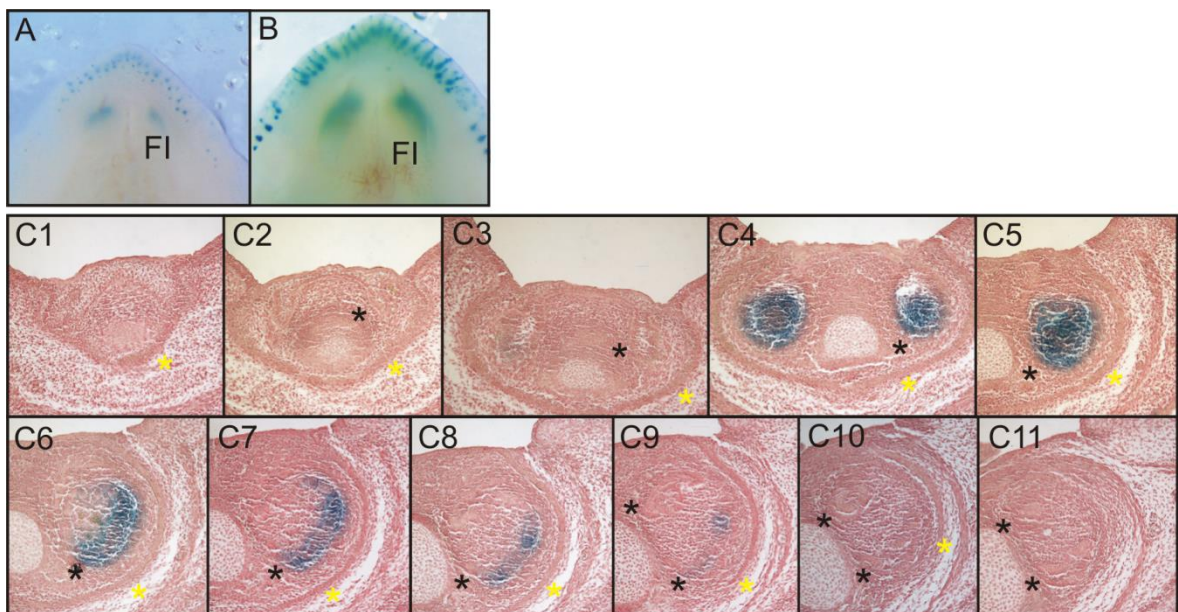
U vzork odebraných po 48 hodinách (ED13,5) jsme našli populaci mod e zna ených bun k také v embryonálním základu vyvíjejícího se orálního vestibula a to zejména ve vnit ní epitelové vrstv (Obrázek 25).



Obrázek 25: Bu ky exprimující *Shh* v primordiu rudimentárního ezáku pronikají do embryonálního základu orálního vestibula my-í mandibuly. Embryonální elisti s permanentn zna enými (mod e) bu kami ukázali descendentní linii bun k p vodn exprimujících *Shh* po intraperitoneální tamoxifenové injekci spou-t jící rekombinací na ED11,5 (viz Metody - Cre-loxP systém). U embryí v asných fázích vývoje (ED12,5 ó **A**, ED13,5 ó **B**) se objevila pouze jedna oblast mod e zna ených bun k reprezentující potomky povrchové anteriorní *Shh* exprese spojované s tvorbou rudimentárního ezáku (dPi) (Hovorakova *et al.*, 2011). Dv oblasti mod e zna ených bun k byly p ítomny na ED14,5 (**C**, **E1-E3**) a 15,5 (**D**), anteriorní související s rudimentárním prelakteálním ezákem a posteriorní související s funk ním ezákem (dl). Sériové frontální histologické ezy (**F1-F8**) u vzorku na ED15,5 po tamoxifenové injekci na ED11,5 odhalily, fle mod e zna ené bu ky byly lokalizovány nejen v dentálním epitelu (erná hv zdi ka), ale také

v epiteliálním základu orálního vestibula (flutá hv zdi ka) v jeho vnit ní epitelové vrstv (oranflové ípky). To potvrzuje p ísp vek *Shh* exprimujících bun k z první anteriorní *Shh* expresní domény primordia rudimentárního ezáku do vestibulárního epitelu (VE) (p evzato z Hovorakova *et al.*, 2016).

Naopak p i pozd j-í aplikaci tamoxifenu (ED14,5), kdy jifl *Shh* exprimuje pouze druhá doména v primordiu funk ního ezáku, jifl pozitivní modré bu ky ve vestibulárním epitelu nedetekujeme (Obrázek 26). To potvrzuje p ísp vek odontogenních bun k (pocházejících z odontogenní tkán primordia rudimentárního ezáku) k základu orálního vestibula v dolní elisti my-í.



Obrázek 26: Aktivace rekombinace Cre-loxP systému, detekujícího *Shh* exprimující bu ky a jejich potomky, na ED14,5. P i aplikaci tamoxifenu na ED14,5 se po 24 hodinách na ED15,5 (A) i po 48 hodinách na ED16,5 objevuje jifl jen jedna oblast pozitivn zbarvených bun k v primordiu funk ního ezáku (FI). Frontální histologické ezy (C1-C11) zárodku na ED15,5 ukazují potomky *Shh* pozitivních bun k koncentrované v epitelu primordia funk ního ezáku (erná hv zdi ka). Povrchová oblast v míst p vodního primordia rudimentárního ezáku, stejn jako vestibulární epitel (flutá hv zdi ka) jsou negativní. Bu ky exprimující *Shh* na ED14,5 a pozd ji nep íspívají k základu p edsín ústní (p evzato z Hovorakova *et al.*, 2016).

5.3 MOLÁROVÁ OBLAST – NORMOGENEZE

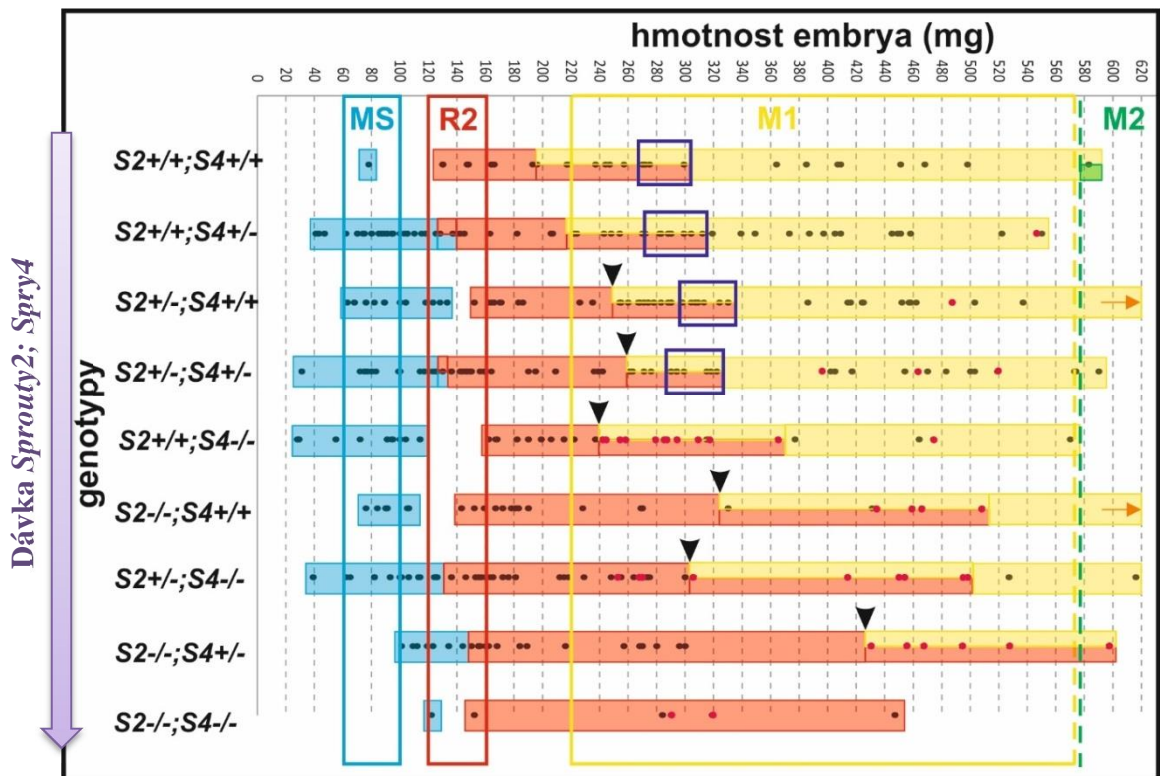
Normogeneze zub v tvá ové oblasti jifl byla nastín na v rámci mé diplomové práce. Nicmén kontrolní soubor (*Spry2*^{+/+}; *Spry4*^{+/+}) se v rámci dizerta ní práce

podáválo navýšení, což znamenalo zahnutí hmotnostní křivky vzorků. Toto navýšení způsobilo plovoucí výsledky.

Výsledky mé diplomové práce ukázaly, že *Shh* exprese je v tvárové oblasti dolní čelisti kontinuální a že se postupně objevuje v oblastech zubních rudimentů a vyvíjejícího se molárového základu. Bylo také prokázáno, že dochází k fúzi *Shh* signálních domén R2 a rané M1 v rámci normálního vývoje prvního moláru (Lochovská, 2012). Nicméně této fúzi předchází nejprve souasný výskyt obou samostatných domén (R2 a M1) zároveň (Obrázek 27).

Skupina vzorků s vyšší dávkou *Spry2;Spry4* genů, kterou tvořil kontrolní genotyp (*Spry2+/+;Spry4+/+*) a genotypy s jednou mutantní alelou na *Spry2* a/nebo *Spry4* genech (*Spry2+/-;Spry4+/+*, *Spry2+/+;Spry4+/-*, *Spry2+/-;Spry4+/-*), vykazovala podobnosti jak v dynamice *Shh* exprese tak i v morfologii dentálního epitelu (Obrázek 27) během sledovaného období vývoje.

U této skupiny byla první *Shh* expresní doména lokalizována v MS rudimentu od ED11,5 do ED13,5 (embrya s hmotností přibližně do 130 mg). Následně se objevila druhá signální doména v R2 rudimentu, která exprimovala *Shh* od ED13,5 do ED14,7 (embrya s hmotností 130 až 320 mg). U dvou genotypů ze skupiny s vyšší dávkou *Spry* genů (*Spry2+/+;Spry4+/-* a *Spry2+/-;Spry4+/-*) jsme zaznamenali souasnou přítomnost (koexistenci) obou těchto domén odpovídajících MS a R2 rudimentu na ED13,5 (embrya s hmotností přibližně 130 mg). Tato ko-exprese trvala jen krátký časový úsek a obě domény byly velmi slabé. Mezi ED14,3 a ED14,5 (embrya s hmotností v průměru 220 až 270 mg) vykazovaly disociované epitely dvě samostatné *Shh* expresní domény v R2 a M1 primordiích. Později, mezi ED14,5 a ED14,7 (embrya s hmotností v průměru 270 až 320 mg), byla patrná fúze těchto dvou (plovoucí izolovaných) domén (Obrázek 27), čímž vznikla jediná *Shh* expresní doména odpovídající signálnímu centru - pEK prvního moláru a tato doména přetrvávala od ED14,7 do ED16,5 (embrya s hmotností v průměru 320-580 mg). Všechny tyto parametry byly sumarizovány pro tyto i genotypy s vyšší dávkou *Spry2* a *Spry4* genů (detaily viz Obrázek 27).



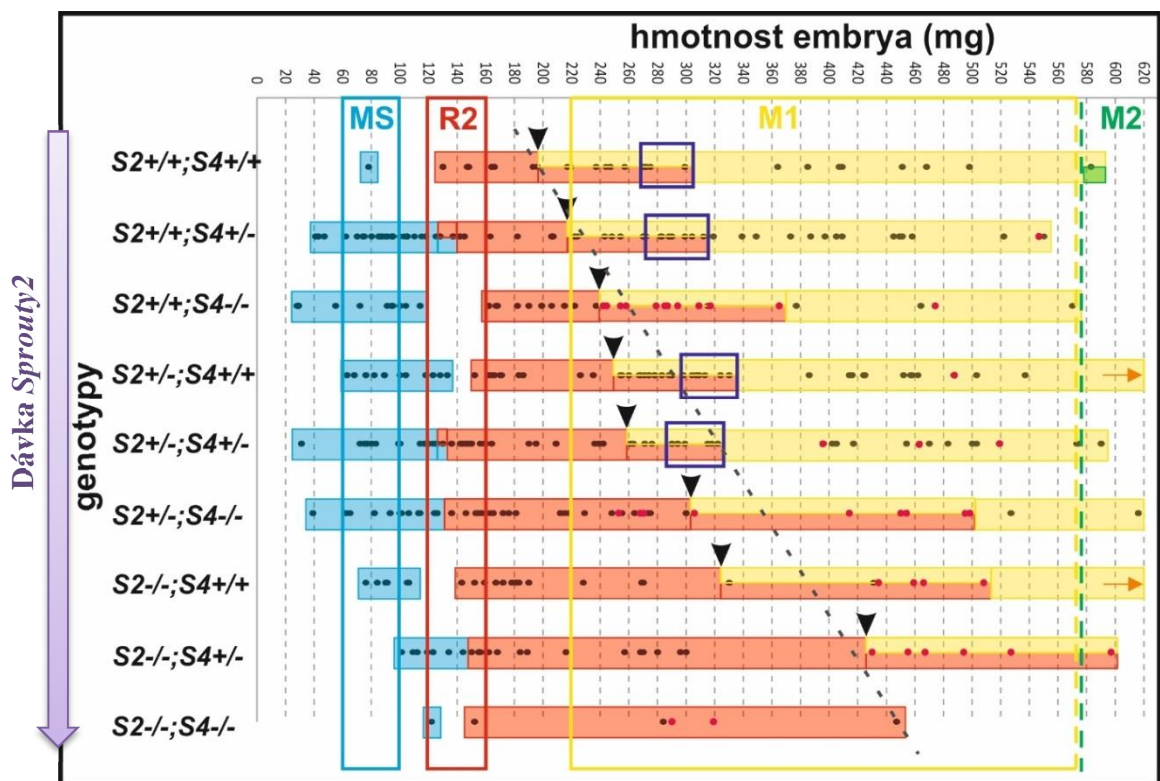
Obrázek 27: *Shh* exprese ve t ech r zných signálních doménách (MS, R2 a M1) u *Spry2;Spry4* vzork . *Shh* exprese ve t ech signálních doménách MS (modrý pruh), R2 (červený pruh) a M1 (flutý pruh) se objevovala postupn v tvá ové oblasti dolních elistí u embryí s devíti moflnými *Spry2;Spry4* genotypy v závislosti na t lesné hmotnosti. Vzorky s vy—í dávkou *Spry2;Spry4* gen vykazovaly splývání (fialové ráme ky) R2 a asné M1 *Shh* signální domény do jedné expresní domény (pEK) lokalizované uprost ed zárodku prvního moláru. Naopak u vzork s niží dávkou *Spry2;Spry4* gen nebylo pozorováno fládné splývání domén, ale R2 rudiment a jeho signální doména z staly lokalizovány samostatn , ímfl do-lo k tvorb primordia nadpo etného zubu p ed vyvíjejícím se základem M1. Barevné ráme ky (modrý, červený a flutý) reprezentují referen ní p ítomnost signálních domén MS (mod e), R2 (červen) a M1 (flut) pozorovaných u b flných WT my—í kmene CD1 (Prochazka *et al.*, 2010). Zelená p eru—ovaná ára zna í p ítomnost *Shh* signálního centra v M2 (druhý molár) u kontrolního genotypu (*Spry2+/+;Spry4+/+*). Zastoupení odebraných embryí pro jednotlivé genotypy zna í te ky v barevných pruzích. R fové te ky znázor ují embrya s tvorbou nadpo etného zubního primordia. Oranřová ípka nazna uje pokrač ování flutého pruhu, cofl je dáno materiálem s vy—í hmotností mimo pole grafu. Mezery mezi jednotlivými barevnými pruhy zna í chyb ní materiálu (p evzato z Lochovska *et al.*, 2015).

5.4 DYNAMIKA *SHH* EXPRESE JE OVLIVNĚNA *SPROUTY* GENY

U v-ech získaných vzork jsme hodnotili morfologii disociovaného dentálního epitelu, p ítomnost/nep ítomností *Shh* signálních domén a jejich lokalizaci. Vzorky byly

získány z dolní elisti od ED11,5 do ED16,5 (embrya s hmotností 30 ó 800 mg) od v-ech devíti *Spry2;Spry4* genotyp .

P t genotyp (*Spry2*^{-/-};*Spry4*^{+/+}, *Spry2*^{+/+};*Spry4*^{-/-}, *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{-/-}, *Spry2*^{-/-};*Spry4*^{+/+}, *Spry2*^{-/-};*Spry4*^{-/-}) bylo za azeno do skupiny s nif-í dávkou *Spry2* a *Spry4* gen , kde ob alely alespo jednoho ze *Spry2* nebo *Spry4* gen byly mutantní. Rozdíl proti vzork m ve skupin s vy-í dávkou *Spry* gen byl nalezen hlavn v aso-prostorové distribuci *Shh* signálních domén (Obrázek 28). *Shh* se exprimovalo v signálních doménách R2 a M1 primordia podobn jako u skupiny genotyp s vy-í dávkou *Spry2* a *Spry4* gen . Nicmén , do-lo k prodloužení *Shh* exprese v R2 rudimentu, cofl m lo za následek opofd ní nástupu *Shh* exprese v M1 ve srovnání s kontrolou (*Spry2*^{+/+};*Spry4*^{+/+}). Tento trend byl z eteln j-í s klesající dávkou *Spry2* gen , tedy s klesajícím po tem funkc ních *Spry2* alel (Obrázek 28). Navíc, u skupiny s nif-í dávkou *Spry2* a *Spry4* gen nikdy nesplynula *Shh* expresní doména v R2 s doménou v M1 (Obrázek 28).



Obrázek 28: *Shh* exprese ve t ech r zných signálních doménách (MS, R2 a M1) u *Spry2;Spry4* vzork . *Shh* exprese ve t ech signálních doménách MS (modrý pruh), R2 (červený pruh) a M1 (flutý pruh) se objevovala postupn v tvá ové oblasti dolních elistí u embryí s devíti mořnými *Spry2;Spry4* genotypy v závislosti na t lesné hmotnosti.

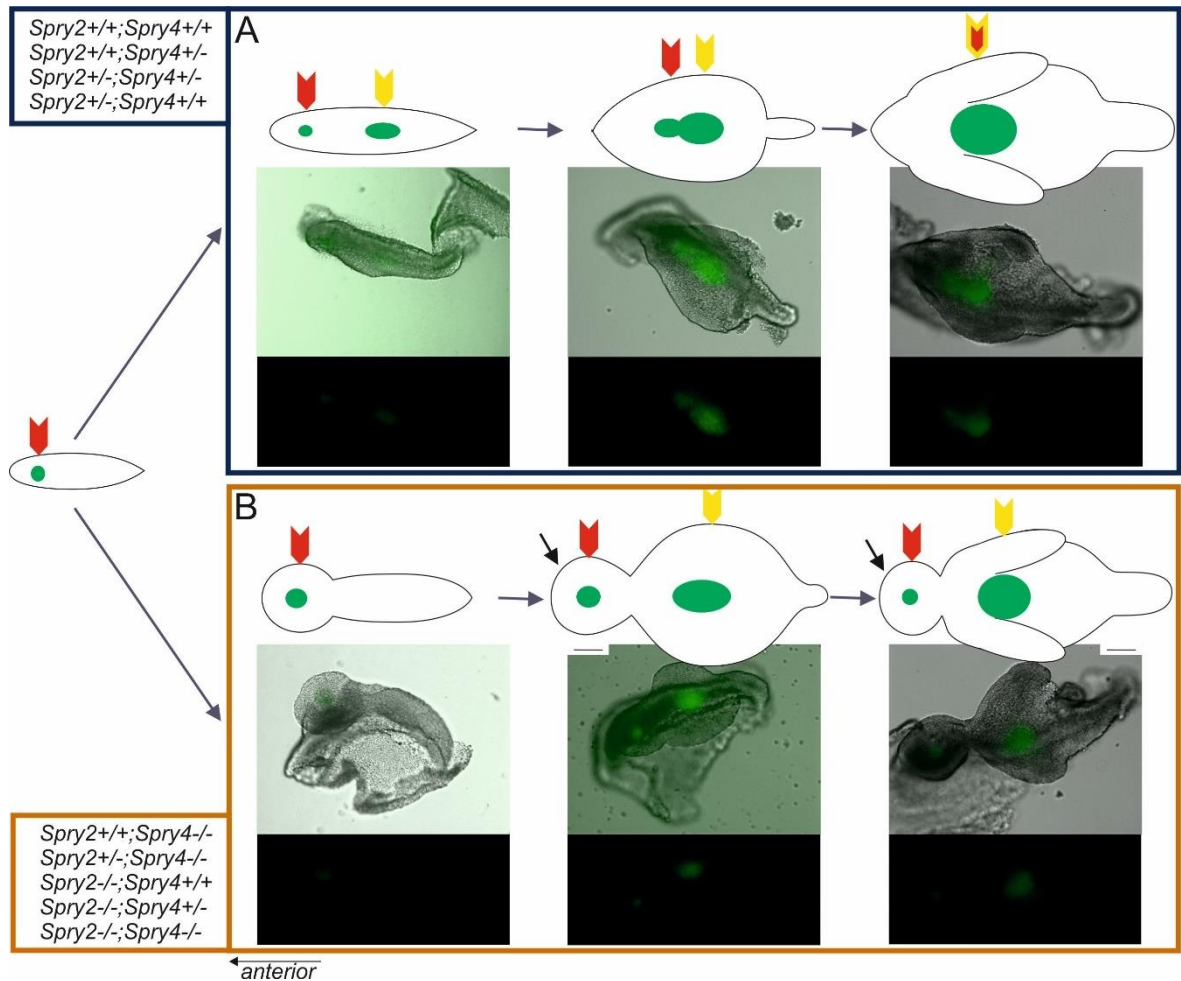
Prodloužení *Shh* exprese bylo posíleno se snížením dávky *Spry2* genu. Prodloužení *Shh* exprese v předlé signální doméně znamená pozdější nástup následné signální domény. Černá šipka označuje momenty, kdy se černá M1 *Shh* signální doména objevovala současně s přetrvávající *Shh* expresí v R2, tedy je to před případnou fúzí těchto domén (fialový rámeček) u některých genotypů. Černá přerušovaná čára naznačuje trend prodloužení *Shh* exprese v R2 rudimentu v závislosti na klesající dávce *Spry2* genu. Barevné rámečky (modrý, červený a flutý) reprezentují referenční přítomnost signálních domén MS (modrý), R2 (červený) a M1 (flutý) pozorovaných u WT myši (Prochazka *et al.*, 2010). Zelená přerušovaná čára značí přítomnost *Shh* signálního centra v M2 (druhý molár) u kontrolního genotypu (*Spry2*^{+/+};*Spry4*^{+/+}). Zastoupení odebraných embryí značí tečky v barevných pruzích. Růžové tečky znázorňují embrya s tvorbou nadpočetného zubního primordia. Oranžová šipka naznačuje pokračování flutého pruhu, což je dáno materiálem s vyšší hmotností mimo pole grafu. Mezery mezi jednotlivými barevnými pruhy značí chybění materiálu (převzato z Ločovská *et al.*, 2015).

5.4.1 NESPLYNUTÍ *SHH* EXPRESNÍCH DOMÉN PODMIŇUJE REVITALIZACI R2 RUDIMENTU

Navíc tímto vzorkem se nám podařilo jednoznačně potvrdit, případně vyloučit fúzi *Shh* signálních domén v R2 a M1 primordiích u všech devíti *Spry2*;*Spry4* genotypů. Získaná data ukazují, že non-fúze těchto *Shh* domén má za následek formaci nadpočetného zubního primordia z autonomního vývoje R2 rudimentu anteriorního zubního zárodku M1.

Vývoj dentálního epitelu v tvářové oblasti se lišil mezi vzorky s vyšší a nižší dávkou *Spry* genu. Embrya s vyšší dávkou *Spry2*;*Spry4* genu (*Spry2*^{+/+};*Spry4*^{+/+}, *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{+/+}, *Spry2*^{+/+};*Spry4*^{+/-}, *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{+/-}) vykazovala fyziologický/normální postup zubního vývoje v tvářové oblasti (Obrázek 29A). Naproti tomu, embrya s nižší dávkou *Spry2*;*Spry4* genu (*Spry2*^{-/-};*Spry4*^{+/+}, *Spry2*^{+/+};*Spry4*^{-/-}, *Spry2*^{-/-};*Spry4*^{+/-}, *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{-/-}, *Spry2*^{-/-};*Spry4*^{-/-}) se v zubním vývoji podobala kontrolám pouze v časných stádiích, kdy dentální epitel exprimoval pouze *Shh* signální doménu v MS (pokud nebereme v úvahu stádium embryonálního vývoje). Nicméně jakmile MS signální doména vymizela, anteriorní část epitelu se začala zvětšovat a zakulacovat (Obrázek 29B). Posteriovní část dentálního epitelu zůstala úzká a rovná. Uprostřed zvětšené anteriorní části byla patrná kruhová *Shh* expresní doména korespondující s R2 signální doménou, která však přetrvávala do pozdějších stádií jako signální centrum v samostatném nadpočetném zubním primordiu před vyvíjejícím se základem M1. Během následujícího vývoje se posteriovní část epitelu tvářové oblasti prodloužila a vytvořila základ M1 s eliptickou *Shh* expresní doménou. Dále se obě části

vyvíjely jako dvě samostatná primordia: nadpočetný zubní základ a základ M1 (Obrázek 29B).



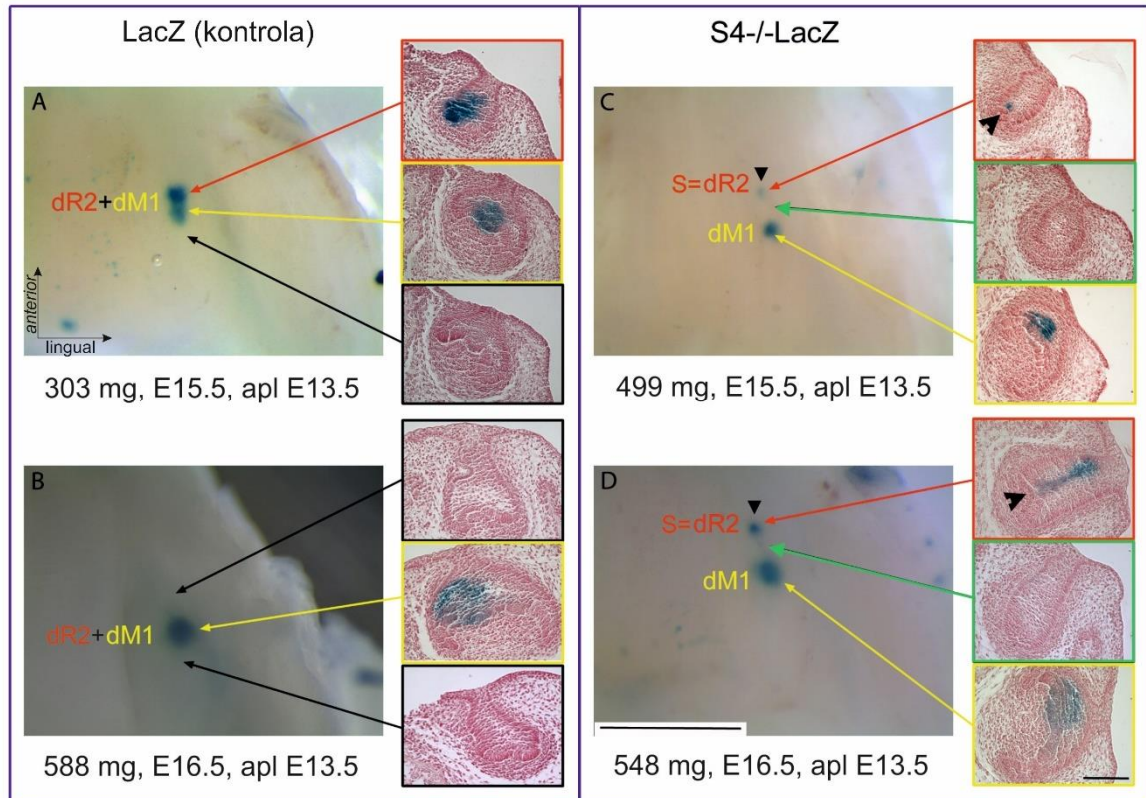
Obrázek 29: Fyziologický a patologický zubní vývoj u disociovaných epitelů z tvářové oblasti myši dolní elisti. (A) U vzorků s vysokou dávkou *Spry2;Spry4* genů (*Spry2*^{+/+};*Spry4*^{+/+}, *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{+/+}, *Spry2*^{+/+};*Spry4*^{+/-}, *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{+/-}) fúzovala R2 *Shh* signální doména (červená šipka) s vlastní M1 *Shh* signální doménou a tím vznikl pEK (dvojitá flutová- červená šipka) M1 primordia. **(B)** U vzorků s nízkou dávkou *Spry2;Spry4* genů (*Spry2*^{+/+};*Spry4*^{-/-}, *Spry2*^{+/-};*Spry4*^{-/-}, *Spry2*^{-/-};*Spry4*^{+/+}, *Spry2*^{-/-};*Spry4*^{+/-}, *Spry2*^{-/-};*Spry4*^{-/-}) přetrvávala R2 *Shh* signální doména (červená šipka) přibližně nad M1 signální doménou (flutová šipka) a stávala se signálním centrem nadpočetného zubního primordia (červená šipka). Měřítko je 100 μm (převzato z Lochovská *et al.*, 2015).

5.5 OSUD BUNĚK EXPRIMUJÍCÍCH *SHH* V NADPOČETNÉM ZUBNÍM PRIMORDIU

Abychom zjistili vztah R2 *Shh* signální domény a nadpočetného zubního primordia v embryonálním vývoji myš mandibuly, vygenerovali jsme *Spry4* deficientní myš s Cre-loxP systémem (viz kapitoly Materiál -

Poufity kmeny myš a Metody - Cre-loxP systém). Tyto myš vykazovaly fenotyp nadpočetného zubu v tvárove oblasti a zároveň umožnily sledovat osud buněk exprimujících *Shh* a všech jejich potomků nejen v R2 rudimentu. Nám vygenerovaný *Spry4* deficientní Cre-loxP systém byl poté používán v kombinaci s kontrolním bílým Cre-loxP systémem s cílem determinovat rozdíly způsobené právě přítomností mutace vyazující obě alely v *Spry4* genu.

Bezí samici byla podána dávka tamoxifenu na ED13,5, tedy před přednou fúzí R2 a asné M1 *Shh* signální domény před normálním vývoji. Embrya byla odebrána na ED15,5 a 16,5, kdy u kontrol exprimuje *Shh* pouze v pEK v míst M1 (Obrázek 30A, B). X-galové barvení umožnilo vizualizovat bučky a všechny jejich potomky, které exprimovaly *Shh* od aplikace tamoxifenu až do odběru embrya. U kontrolního Cre-loxP systému lze detekovat pouze jednu pozitivní oblast modrých buněk lokalizovanou v zubním základu M1, u nám vygenerovaného systému *Spry4* deficientních myš jsme našli dvě samostatné modré oblasti v tvárove části mandibuly lokalizované antero-posteriorně. Histologické zjevy ukázaly, že posteriorní oblast modrých buněk odpovídá M1 primordiu a anteriorní oblast modrých buněk byla lokalizována v centru nadpočetného zubního pohárku (Obrázek 30C, D). Toto dokazuje perzistenci buněk předvedn samostatné R2 *Shh* signální domény v centru nadpočetného zubního primordia. Modře značené bučky z R2 rudimentu byly odděleny od značených buněk v M1 negativní oblastí. To značí, že fúze předvední R2 *Shh* expresní domény s asnou M1 *Shh* expresní doménou neprobíhá a také že vznik pEK v oblasti M1 byl narušen. Následkem je patologický vývoj zubní řady (vznik nadpočetného zubu před M1).



Obrázek 30: Sledování bun k v zubním primordiu, které p vodn exprimovaly *Shh*, vizualizované X-galovým barvením (mod e) u kontrolního Cre-loxP (*LacZ* kontrola) systému v porovnání se *Spry4* deficientním systémem (*Spry4*^{-/-}*LacZ*). Vlevo ó barvení celé tkán dolní elisti, vpravo ó reprezentativní histologické ezy z oblastí ozna ených ípkami. Dávka tamoxifenu byla aplikována b ezím samicím *LacZ* (A, B) a *Spry4*^{-/-}*LacZ* (C, D) na ED13,5, protože v tomto embryonálním dni je *Shh* exprimováno v R2 rudimentu. (A) Na ED15,5 vykazoval tvá ový segment kontrolních embryí *LacZ* splývání dvou zna ených bun ných populací pocházejících z oblasti p vodního R2 (dR2, červená ípka) a M1 (dM1, flutá ípka). (B) Toto splývání vedlo ke vzniku jedné oblasti modrých bun k v M1 primordiu na ED16,5, kde již nelze odli-ít bu ky pocházející z p vodního R2 a M1 (dR2+dM1). (C) Naopak u *Spry4*^{-/-}*LacZ* embryí lze detekovat dv samostatné oblasti modrých bun k zna ící potomky bun ných populací z p vodního R2 (dR2) a M1 (dM1) primordia na ED15,5. (D) Situace z stala u *Spry4*^{-/-}*LacZ* stejná i na ED16,5. Ob modré oblasti byly odd leny negativní interdentální oblastí nevykazující fládnou *Shh* expresi (zelená ípka). Anteriorní populace modrých bun k byla lokalizována v centru vyvíjejícího se nadpo etného zubního primordia (S, erná ípka) pocházejícího z p vodního R2 rudimentu. M ítko je 2 mm na tká ových snímcích a 100 µm na histologických ezech (p evzato z Lochovska *et al.*, 2015).

5.6 SHH EXPRESE V TVÁŘOVÉ OBLASTI BĚHEM EMBRYONÁLNÍHO VÝVOJE

Dynamika signálních center b hem zubního vývoje v horní i dolní elisti byla zkoumána ur ením jejich pozice pomocí *Shh* exprimujících bun k zna ených metodou

Cre-loxP (viz kapitola Metody - Cre-loxP systém) ve vyvíjejícím se zubním zárodku od ED11,5 do ED18,5. Tamoxifen indukoval aktivitu Cre rekombinázy *cofl* v kombinaci s X-galovým barvením vedlo ke zna ení v-ech bun k exprimujících *Shh* v etn jejich potomk .

5.6.1 HORNÍ ČELIST

P i aplikaci tamoxifenu na ED11,5 a odb ru jifl po 48 hodinách (ED13,5) jsme zaznamenali pruh pozitivních modrých bun k v oblasti budoucí diastemy. Zárove se objevila populace mod e zna ených bun k také v prvním rudimentárním pupenu tvá ové oblasti (R1) (Obrázek 31A). P i odb ru po 72 hodinách (ED14,5) se pás modrých bun k roz-i oval posteriorním sm rem a jifl byla patrná i samostatná oblast zna ených bun k v rudimentu R2 a na vývojov pokro ilej-ích vzorcích i ohrani ená, slab pozitivní populace v centru vyvíjejícího se pohárku M1 (Obrázek 31C). Po 96 hodinách (ED15,5) do-lo k mírné dezintegraci pásu pozitivních bun k v oblasti diastemy. Populace pozitivních bun k z p vodního R2 rudimentu a primordia M1 byly jifl velmi blízko u sebe (Obrázek 31E). Na dal-ích ED se tato oválná populace *Shh* bun k zv t-uje (Obrázek 35).

Aktivace Cre rekombinázy tamoxifenem na ED12,5 ukázala stejné výsledky jako u aplikace na ED11,5 s tím rozdílem, fle pozitivní bu ky v oblasti diastemy jifl na ED 13,5 neutvo ily protáhlý pás (Obrázek 32A). Po 48 hodinách (ED14,5) detekce *Shh* exprimujících bun k jsme u vývojov star-ích zárodk zachytili t i samostatn ohrani ené populace ó v p vodním R1 (v etn p vodní diastemální populace), R2 a v pohárku M1 (Obrázek 32C). Po 72 hodinách (ED15,5) je patrné p iblížení p vodních populací R2 a M1, p i emfl pozitivní bu ky p vodního R1 z stávají samostatné anteriorn a vytvá í krátký pás (Obrázek 32E).

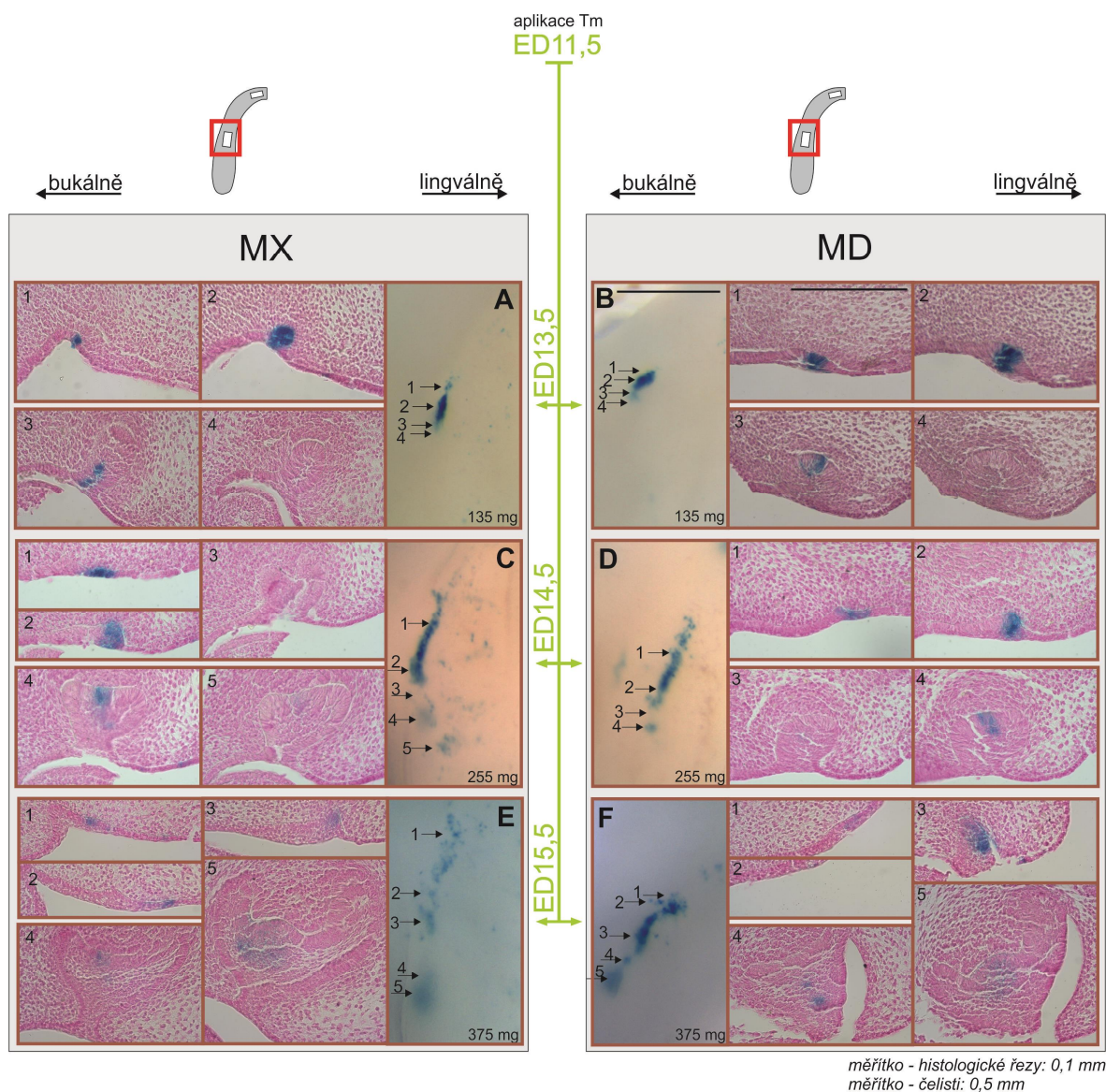
Pokud jsme dávku tamoxifenu podali afl na ED13,5, tak jsme po 24 a 48 hodinách (ED14,5 a 15,5) zachytili modré bu ky pouze v oblasti p vodního R2 a M1 primordia. Ob populace se k sob s postupem vývoje p iblířovaly (Obrázek 33A, C). Dal-í pozorování ukazovalo jejich kontakt afl propojení, nikoli v-ak p ímo fúzi (Obrázek 35).

5.6.2 DOLNÍ ČELIST

Obdobným způsobem v longitudinální ad aplikací a následných odběrů byly odebírány i vzorky dolních čelistí. Po aplikaci tamoxifenu na ED11,5 byla po 48 hodinách (ED13,5) na vzorcích patrná jedna protáhlá oblast modrých buněk v oblasti diastemy a v rudimentárním pupenu MS (Obrázek 31B). Postupně docházelo k protažení pásu modrých buněk posteriorním směrem, což je patrné i po 72 hodinách (ED14,5). Zároveň se objevila pozitivní modrá populace buněk v oblasti R2 rudimentu (Obrázek 31D). Po 96 hodinách (ED15,5) od tamoxifenové indukce Cre rekombinázy bylo stále možné pozorovat kontinuální pás modrých buněk. Posteriorně za tímto pásem jsme detekovali dvě oddělené oblasti pozitivních buněk, které se začaly objevovat v místě p vodního R2 rudimentu a v oblasti M1 (Obrázek 31F).

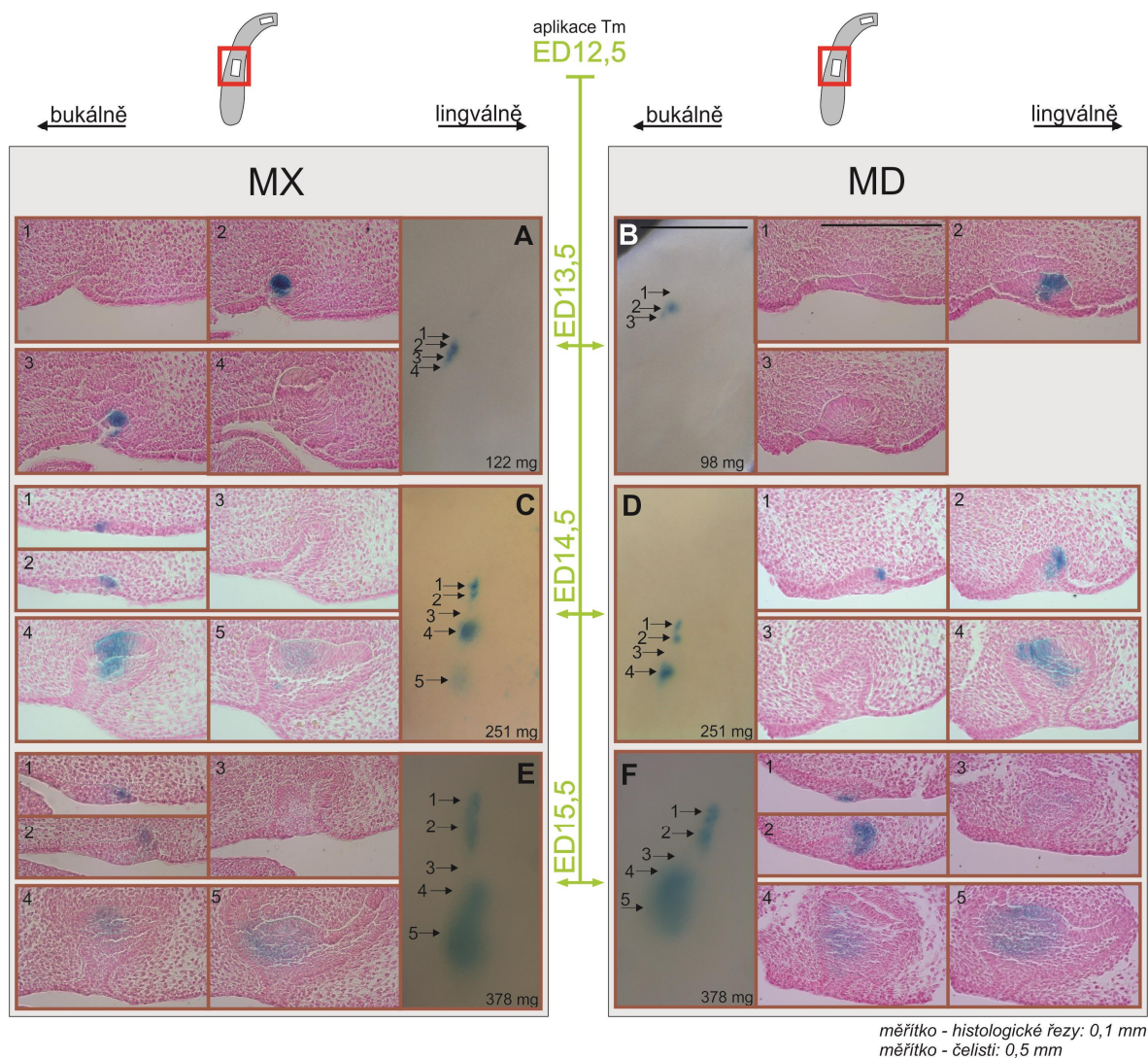
Při aplikaci tamoxifenu na ED12,5 jsme po 24 hodinách (ED13,5) podobně jako v horní čelisti již nedetekovali pás pozitivních buněk v oblasti diastemy, ale pouze menší populaci pozitivních buněk v oblasti p vodního MS rudimentu (Obrázek 32B). Vzorky po 48 hodinách (ED14,5) od aplikace vykazovali modré buňky v oblastech p vodních rudimentů MS a R2 (Obrázek 32D). Po 72 hodinách detekce (ED15,5) se posteriorně od pozitivních buněk p vodního R2 rudimentu objevila populace v centru pohárku M1, která těsně náležala na populaci p vodního R2 (Obrázek 32F).

Při aktivaci Cre rekombinázy tamoxifenem na ED13,5 jsme po 24 (ED14,5) i 48 hodinách (ED15,5) zaznamenali dvě populace pozitivních buněk velmi blízko u sebe, první pocházející z p vodního R2 a druhou z p vodního M1 (Obrázek 33B,D). U vývoje pokročilejších byla přítomna již jen jedna oválná populace modrých buněk v M1. Následně tato oblast nabývala na intenzitě a expandovala (Obrázek 34).

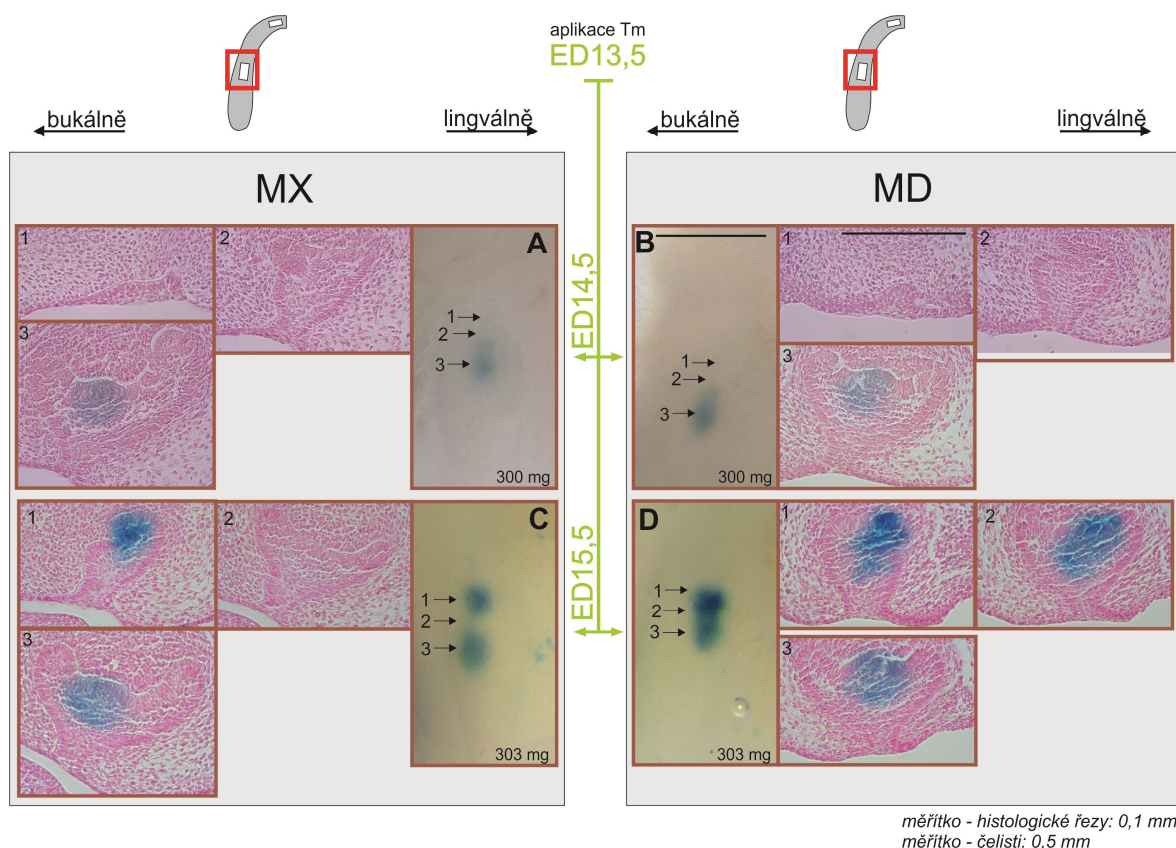


měřítka - histologické řezy: 0,1 mm
měřítka - čelisti: 0,5 mm

Obrázek 31: Linie potomků buněk exprimujících *Shh* ve vyvíjejícím se prvním moláru horní a dolní elisti myšho embrya. Embryonální elisti (získané pomocí Cre-loxP systému viz kapitola Metody - Cre-loxP systém) se zabarvenými buňkami (modrá) ukazují linii potomků buněk exprimujících *Shh* od intraperitoneální injekce tamoxifenu (Tm), kterým jsme spustili rekombinaci na ED11,5. V dolní elisti se v tomto okamžiku objevuje *Shh* exprese v rudimentu MS a případně i v R2 (Lochovska *et al.*, 2015). (**A**, **B**) Při odběru vzorku na ED13,5 se objevují v obou elistech (centrální část obrázku) krátké *Shh* pozitivní pruhy, případně v obou případech jde o rudimentární oblasti, jak dokládají frontální řezy (postranní části obrázku). (**A**) V horní elisti je tato oblast delší než v dolní elisti. (**C**, **D**) Na ED14,5 se tento modrý pruh prodlužuje a zároveň se již objevuje oddělená oblast pozitivních buněk v R2 rudimentu (šipka číslo 4) a (**C**) v horní elisti je patrná velice slabá linie *Shh* pozitivních buněk ve funkčním M1 (tedy asi M1 šipka číslo 5). (**E**, **F**) Na ED15,5 by již měla být dokončena fúze mezi *Shh* expresní doménou v R2 a M1 (Lochovska *et al.*, 2015). Je zřejmé, že obě populace pozitivních buněk z prvotního R2 rudimentu a M1 moláru se k sobě přiblížily a naléhají těsně na sebe (šipka 4 a 5). Měřítka jsou v horní části obrázku, pro histologické řezy je 0,1 mm a pro elisti je 0,5 mm.



Obrázek 32: Linie potomků bun k exprimujícím *Shh* ve vyvíjejícím se prvním moláru horní a dolní elisti myšeho embrya. Embryonální elisti (získané pomocí Cre-loxP systému) se zabarvenými buňkami (modrá) ukazují linii potomků buněk exprimujících *Shh* od intraperitoneální injekce tamoxifenu (Tm), kterým jsme spustili rekombinaci na ED12,5. V dolní elisti v tomto okamžiku je třeba pokračovat *Shh* expresí v rudimentu MS a plně se jí objevuje v rudimentu R2 (Lochovska *et al.*, 2015). (A, B) Při odběru vzorku na ED13,5 se objevují v obou elistech (centrální část obrázku) malé *Shh* pozitivní oblasti, zatímco v obou případech jde o rudimentární oblasti, jak dokládají frontální zrytky (postranní části obrázku). (A) V horní elisti je tato oblast delší než v dolní elisti. (C, D) Na ED14,5 se za touto oblastí objevuje oddělená oblast pozitivních buněk v R2 rudimentu (šipka číslo 4) a (C) v horní elisti je patrná velice slabá linie *Shh* pozitivních buněk ve funkčním M1 (tedy asi šipka číslo 5). (E, F) Na ED15,5 by již měla být dokončena fúze mezi *Shh* expresní doménou v R2 a M1 (Lochovska *et al.*, 2015). Je zřejmé, že obě populace pozitivních buněk z povodního R2 rudimentu a M1 moláru se k sobě přiblížily a naléhají těsně na sebe (šipka 4 a 5). Měřítko jsou v horní části obrázku, pro histologické zrytky je 0,1 mm a pro elisti je 0,5 mm.



Obrázek 33: Linie potomků buněk exprimujících *Shh* ve vyvíjejícím se prvním moláru horní a dolní elisti myšeho embrya. Embryonální elisti (získané pomocí Cre-loxP systému viz kapitola Metody - Cre-loxP systém) se zabarvenými buňkami (modrá) ukazují linii potomků buněk exprimujících *Shh* od intraperitoneální injekce tamoxifenu (Tm), kterým jsme spustili rekombinaci na ED13,5. V dolní elisti v tomto okamžiku je stále přítomná *Shh* exprese rudimentu R2 a začíná se objevovat exprese v rané M1 (Lochovská *et al.*, 2015). (C, D) Při odběru vzorku na ED15,5 se objevují v obou elistech (centrální část obrázku) dvě *Shh* pozitivní oblasti, přičemž anteriorní oblast odpovídá původnímu R2 rudimentu a posteriorní oblast je v centru vyvíjejícího se M1, jak dokládají frontální zrytky (postranní části obrázku). (C) V horní elisti jsou obě oblasti odděleny negativními buňkami, (D) zatímco v dolní elisti k sobě modře zbarvené oblasti těsně přiléhají. Měřítko jsou v horní části obrázku, pro histologické zrytky je 0,1 mm a pro elisti je 0,5 mm.

5.7 VÝVOJ ZUBNÍCH HRBOLKŮ

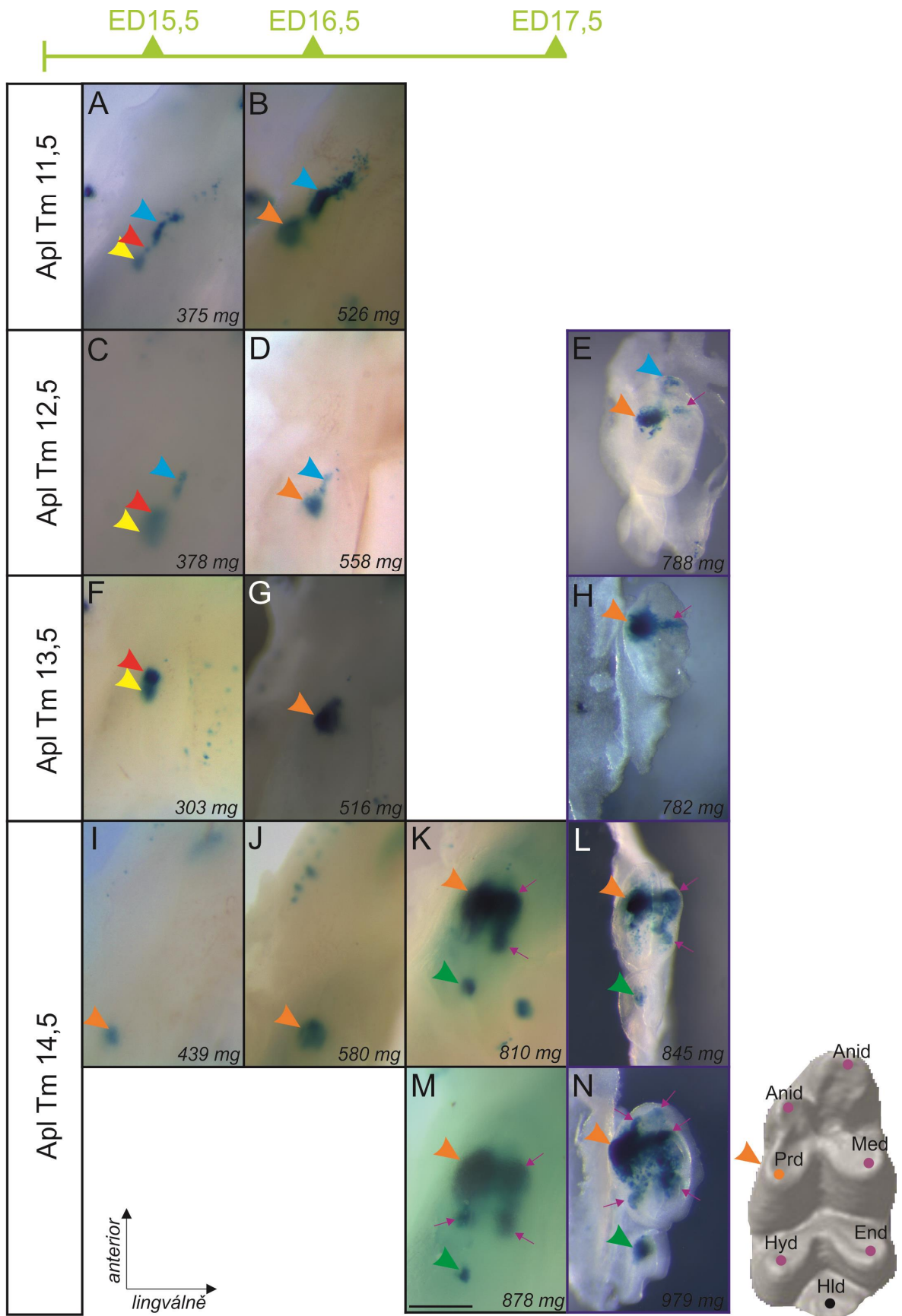
Vznik hrbolku u zubu je dán přítomností signálního centra omezeného enamel knotu. U jednohrbolkových zubů (např. ozáky) se objevuje pouze jeden (primární) enamel knot. U vícehrbolkových zubů dochází během vývoje ke vzniku dalšího (sekundárního) enamel knotu.

Vzhledem k výše prokázanému příspěvku *Shh* signálního centra R2 rudimentu ke vzniku primárního enamel knotu (viz kapitola Výsledky - Molárová oblast o normogeneze)

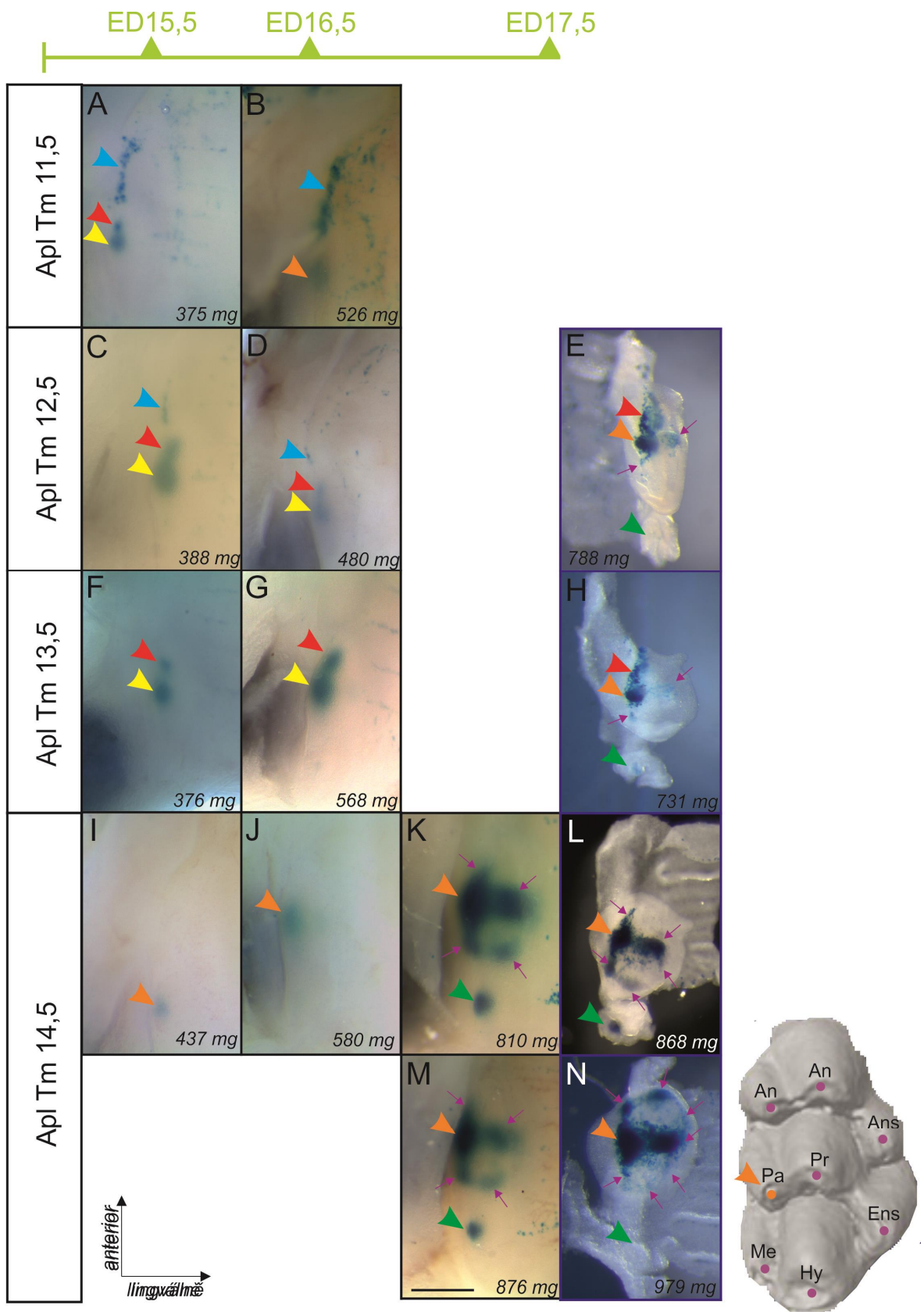
pomocí fluorescenční mikroskopie, jsme pokračovali ve sledování těchto buněk pomocí Cre-loxP technologie s cílem určit jejich další osud. Tamoxifenem indukovaný záznam buněk exprimujících *Shh* nám umožnil sestavit longitudinální sérii těchto vzorků. Pro vztahy jsme se rozhodli odebrat, vedle vzorků celé tkáně a následného histologického zpracování, také disociované dentální epitelové oblasti horní i dolní elisty.

V dolní elisti jsme byli schopni zachytit buňky p vodního MS a R2 rudimentu. Materiál potvrdil fúzi buněk p vodní exprimujících *Shh* v R2 rudimentu a v asném M1 a tím i vznik jedné pozitivně zbarvené oblasti buněk odpovídající pEK (Obrázek 34C,D,F,G). Oblast pozitivních buněk se následně rozšířila lingválním směrem (Obrázek 34E,H). A téměř synchronně se buňky objevily také posteriorně (Obrázek 34K,L). Podle získaných vzorků se po první lingvální populaci objevila další posteriorně a posléze se zakládaly další pozitivní oblasti na lingvální straně (Obrázek 34N). V této době začaly být patrné i první modré buňky také v primordiu M2 (Obrázek 34K,L,M,N). Zároveň se objevilo rozšíření p vodní pozitivní buňkové oblasti M1 anteriorním směrem, kde vznikaly postupně buňkové a následně lingválně dva shluky modrých buněk (Obrázek 34N). Bylo možné detekovat i potomky *Shh* exprimujících buněk p vodního MS rudimentu, jejichž pozice byla spíše v povrchovém orálním epitelu, anteriorně k pozitivním buňkám p vodního R2 (Obrázek 34A,B,C,D,E).

Situace v horní elisti se od té v dolní elisti lišila již od samého počátku. Oblasti *Shh* pozitivních buněk p vodního R2 a asného M1 nefúzovaly tak jako v dolní elisti, ale vytvořily podélný pruh na buňkové straně pohárku prvního moláru. Jeho posteriorní konec vytvořil kulovitý shluk pozitivně zbarvených buněk (Obrázek 35G,H). Modré zbarvení bylo detekováno v lingválním směru a téměř souasně i v posteriorním směru (Obrázek 35H). V této době začala objevovat modrá populace buněk v oblasti budoucího M2 (Obrázek 35H,K,L,M,N). Vzor *Shh* exprese v celé tkáni horní elisti naznačoval, že další posteriorně lokalizované populace se objevily až po druhé populaci modrých buněk na buňkové straně (Obrázek 35K,M), čemuž napovídala i data z disociovaných dentálních epitelů (Obrázek 35L,N). Pruh modrých buněk anteriorně od p vodního shluku se poté rozšířil, čímž vznikla doména na buňkové straně budoucího zubu a teprve sekundárně docházelo k výskytu pozitivních buněk v lingválních oblastech zubního základu (Obrázek 35K,L,M,N).



Obrázek 34: Detekce *Shh* pozitivních buněk v pr b hu vývoje dolní tvá ové oblasti my-i. Populace *Shh* exprimujících buněk a jejich potomků v tvá ové oblasti dolní elisti my-ího embrya byly detekovány pomocí Cre-loxP systému (viz kapitola Metody - Cre-loxP systém), který byl aktivován aplikací dávky tamoxifenu (Tm). Detekce probíhala jak na vzorcích elistí (**A, B, C, D, F, G, I, J, K, M**), tak na disociovaných epitelech tvá ové oblasti (**E, H, L, N**). Zachyceny byly populace v p vodním MS (modrá -ípka), R2 (červená -ípka), asném M1 (flutá -ípka), fúzované populace p vodního R2 a asného M1 (oranflová -ípka) a populace v primordiu M2 (zelená -ípka). Fúzovaná populace p vodního R2 a asného M1 (oranflová) odpovídá p vodnímu pEK (Lochovska *et al.*, 2015). Po vzniku této fúzované populace se objevují i dal-í (fialová -ípka) Prostorové uspo ádání jednotlivých populací odpovídá rozložení zubních hrbolk u funk ního M1. Poslední posteriorní populace odpovídající postavení hypokonulidu nebyla zachycena, pravd podobn vzniká po ED17,5. Anid ó anterokonid, End ó entokonid, Hyd ó hypokonid, Hld ó hypokonulid, Med ó metakonid, Prd ó protokonid. M ítko je 0,5 mm.



Obrázek 35: Detekce *Shh* pozitivních buněk v průběhu vývoje horní tváňové oblasti myši. Populace *Shh* exprimujících buněk a jejich potomků v tváňové oblasti horní elisty myšního embrya byly detekovány pomocí Cre-loxP systému (viz kapitola Metody - Cre-loxP systém), který byl aktivován aplikací dávky tamoxifenu (Tm). Detekce probíhala jak na vzorcích elistí (A, B, C, D, F, G, I, J, K, M), tak na disociovaných epitelech tváňové oblasti (E, H, L, N). Zachyceny byly populace v povodním R1 (modrá -ipka), R2 (červená -ipka), asněm M1 (flutá -ipka), spojené populace povodního R2 a asněho M1 (oranřová -ipka) a populace v primordiu M2 (zelená -ipka). Populace povodního R2 a asněho M1 (oranřová) neprošly fúzí jako odpovídající populace v dolní elisti, spíše se spojila jedna k druhé. Po vzniku této populace se objevují i další (fialová -ipka) Prostorové uspořádání jednotlivých populací odpovídá rozložení zubních hrbků u funkčního M1. Anó anterokon, Ansó anterostyl, Ensó enterostyl, Hyó hypokon, Meó metakon, Paó parakon, Pró protokon. Měřítko je 0,5 mm.

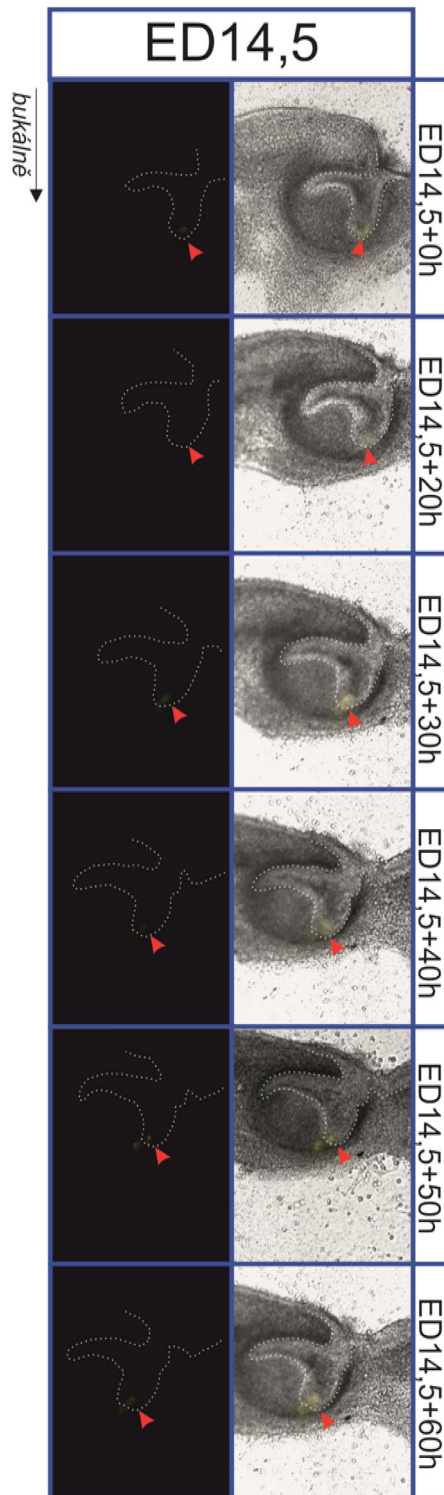
5.8 CERVIKÁLNÍ KLIČKA

Za účelem zmapování vývoje a dynamického růstu buňkální a lingvální CL jsme vytvořili polotenkové ezy embryonálního zubního zárodku s okolní tkání z tváňové oblasti dolní elisty embryí na ED14,5. Na tomto stádiu jsou již obě CL patrné a je tedy možné sledovat jejich vývoj. Během kultivace, která trvala přibližně 4-5 dní, se zubní zárodek vyvíjel ze stádia asněho pohárku do pozdního pohárku připadně do stádia zvonku. Dá se tedy konstatovat, že molárové ezy opravdu umožnily sledování normálního zubního vývoje vícehrbkového zubního základu.

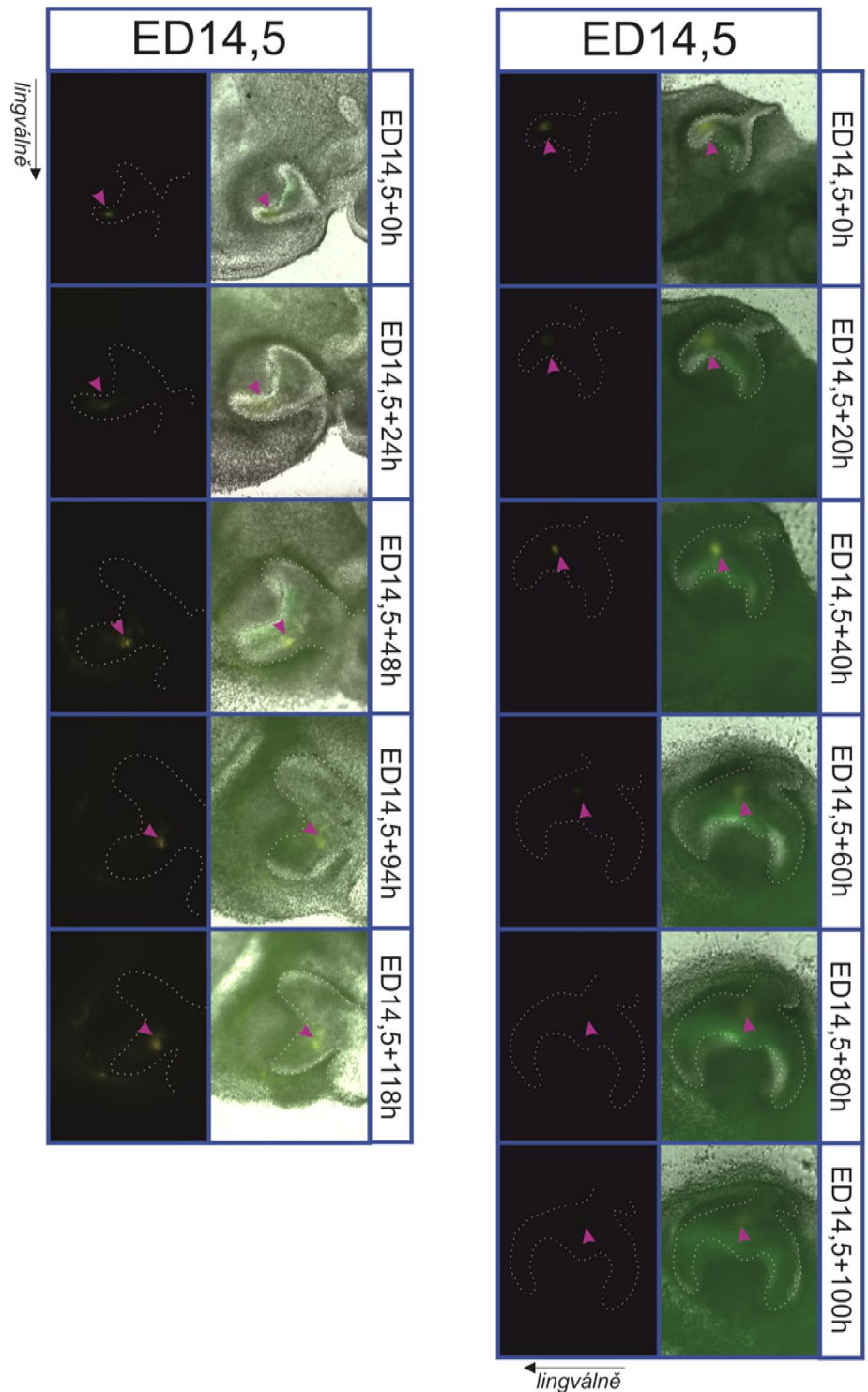
Naše pokusy byly zaměřeny na obě CL, přičemž na první pohled je zřejmé, že jejich vývoj je buko-lingválně asymetrický. Buňkální CL je menší a ve vývoji se opožďuje za lingvální CL a to v dolní i horní elisti (Obrázek 36, Obrázek 37). Jako marker k označení buněk jednotlivých CL jsme využili fluorescenční barvivo DiI, které jsme mikroinjekcí aplikovali do apikální části CL. a takto připravené explantáty jsme následně kultivovali a snímali každou hodinu pomocí časově závislé mikroskopie *in vitro* po dobu 4-5 dní.

Označené buňky buňkální CL přetrvávaly v apexu od ED14,5, kde udržovaly svou pozici po celou dobu kultivace bez jakýchkoli patných změn (Obrázek 36).

Ani lingvální CL nevykazovala po 24 hodinách kultivace odlišnosti. Teprve po 48 hodinách kultivace začalo docházet k posunu značených buněk z apikální části směrem do středu vyvíjejícího se sklovinného orgánu zubního zárodku a tato populace poté přetrvávala nad signalizujícím pEK (Obrázek 37).



Obrázek 36: Vývoj bukální cervical loop moláru v dolní elisti myšního embrya od ED14,5. Buněná linie v apexu bukální zubní kličky (červená šipka) prvního moláru byla sledována od ED14,5 pomocí fluorescenčního DiI značení během kultivace in vitro na frontálním poloténkovém řezu (250 µm). Tato populace zůstala i po 60 hodinách v apexu zubní kličky.



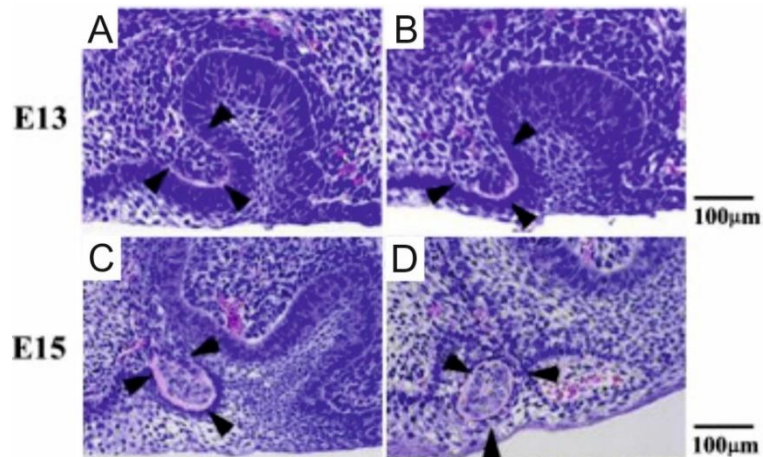
Obrázek 37: Vývoj lingvální cervical loop moláru v dolní elisti myšeho embrya od ED14,5. Buněná linie v apexu lingvální zubní kličky (fialová šipka) prvního moláru byla sledována od ED14,5 pomocí fluorescenčního DiI značení během kultivace in vitro na frontálním poloténovém řezu (250 μm). Tato populace se posouvala z apexu zubní kličky směrem do centra sklovinného orgánu. Tento posun byl patrný na řezu vedeném středem zubního primordia (vrchní série obrázků), ale i na řezu z okraje zubního primordia (spodní série obrázků).

6 DISKUZE

6.1 ŘEZÁKOVÁ OBLAST

Shh je dleffitá signální molekula zahrnutá v iniciaci zubního vývoje (Cobourne and Sharpe, 2010). Ú astní se jak epiteliální-mesenchymální tak epiteliální-epiteliální (planární) signalizace b hem asného vývoje zubu (Hardcastle *et al.*, 1998). Také reguluje r st a tvar zubu (Dassule *et al.*, 2000) a jeho aktivita b hem p echodu ze stádia pupenu do stádia pohárku stoupá v zárodku moláru i ezáku (Koyama *et al.*, 1996).

Obecn se p edpokládalo, fle *Shh* exprese v ezákové oblasti p ed ED13,5 je spojena výhradn s vývojem budoucího funk ního ezáku. V dolní elisti my-í v-ak byla v raném vývoji prokázána p ítomnost *Shh* exprese ve dvou oblastech, které jsou jak asov tak prostorov odd lené ó první *Shh* doména (prezentující se na ED11.5 ó 13.5) byla lokalizovaná v anteriorní více povrchov situované oblasti, kterou lze z fylogenetického hlediska asociovat s rudimentárním ezákem a druhá doména exprimující *Shh* pozd ji (afl od ED13.5) byla lokalizovaná v hlub-ích vrstvách zano eného epitelu p ímo v zárodku funk ního ezáku (Obrázek 24) (Hovorakova *et al.*, 2011). Podobnou situaci se nám poda ilo ukázat i v budoucí ezákové oblasti v horní elisti my-í (Obrázek 21, Obrázek 22, Obrázek 23) (Hovorakova *et al.*, 2013). Anteriorní, superficiální *Shh* expresní doména vzniká d íve a v kontextu fylogeneze lze íci, fle p sobí jako inicia ní centrum zubu dal-í generace a tedy odráflí vývoj rudimentárního zubu p edcházejícího vznik zubu funk ního. Pouze pozd j-í, posteriorní a hlub-í *Shh* expresní doména odpovídá signálnímu centru budoucího horního funk ního ezáku u WT my-í. Interpretaci dvou *Shh* domén odd lených v ase i prostoru jako dvou signálních center, reflektujících dv po sob jdoucí generace zub , z nichfl první je ve vývoji my-í rudimentární, podporují i výzkumy ukazující, fle patologickým vývojem nap . u *USAG-1* deficientních my-í m fle dojít k revitalizaci této zubní generace a k vývoji nadpo etných zub anteriorn od zub funk ních (Obrázek 38) (Murashima-Suginami *et al.*, 2007).



Obrázek 38: Rudimentární primordia ezák v maxile myšeho embrya. Sagitální ezy horní elisti na ED13 (A, B) a ED15 (C, D). U WT myš (B, D) rudimentární struktury (černé šipky) zanikají, zatímco u *USAG-1* deficientních myš (A, C) z nich vznikají nadpo etné ezáky (p evzato z Murashima-Suginami *et al.*, 2007).

6.1.1 DVĚ ODLIŠNÉ *SHH* POZITIVNÍ OBLASTI V OBLASTI BUDOUCÍCH ŘEZÁKŮ

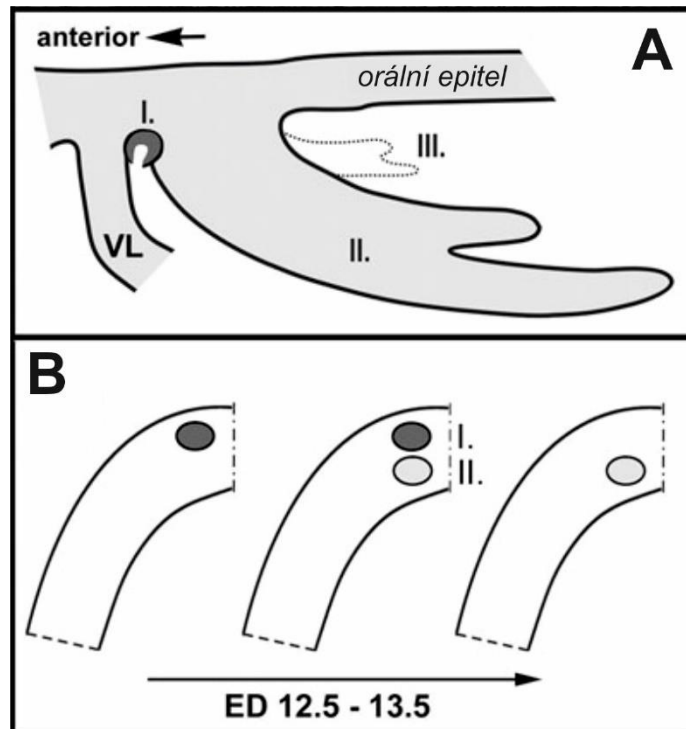
Shh expresní doména byla detekována v anteriorní ásti horní elisti na ED11,5. B hem asných fází prenatalního vývoje vytvá ela tato asná *Shh* exprese dva p echodné proufky v anteriorním sm ru. Na ED13,5 byla tato prodloužení *Shh* expresní domény lokalizována ve stejném míst jako takzvané antero-mediální a antero-laterální šprojekceø dentálního epitelu, které byly popsány anteriorn k vyvíjejícímu se zubnímu zárodku budoucího funk ního ezáku (Peterkova *et al.*, 1995). Zde se pozd ji vyvíjí rudimentární ezák, také nazývaný jako mlé ný, lakteální nebo do asný, který byl morfologicky popsán v horní i dolní elisti myš (Woodward, 1894, Fitzgerald, 1973, Peterkova *et al.*, 2002, Hovorakova *et al.*, 2011, Hovorakova *et al.*, 2013).

U vývojov pokro ilej-ích stádií se na ED13,5 objevila nová *Shh* expresní doména situovaná posteriorn k p vodní, superficiální domén . Druhá doména byla lokalizována hloub ji ve tkáni uprost ed vyvíjejícího se zárodku funk ního ezáku. Ob antero-posteriorn lokalizované *Shh* expresní domény náhodn zachytili na svých snímcích jifl d íve i jiní auto i (Pantalacci *et al.*, 2008). Existence obou domén byla potvrzena také sledováním linie bun k exprimujících *Shh* na ED11,5. Sledování bun ných linií v obou elistech ukázalo dv samostatné oblasti pozitivních descendentních bun k, anteriorní odpovídající povrchové oblasti p vodního rudimentárního zakladu a posteriorní lokalizovaná hloub ji v zano eném epitelu a p ímo v centru funk ního ezáku (Hovorakova

et al., 2011, Hovorakova *et al.*, 2013). Jejich vývojový vztah není doposud zcela objasněn. V dolní elisti bylo pomocí detekce proliferace zjištěno, že buňky anteriorního centra neproliferují a že se v této oblasti hojně vyskytuje apoptóza. Na základě těchto výsledků bylo vyhodnoceno, že signální centrum funkčního zubu vzniká *de novo*, nezávisle na úrovních *Shh* expresi a že buňky ústředního centra nepřispívají k jeho vzniku (Ahtiainen *et al.*, 2016). Toto je však potvrděno i funkčním experimentem.

Na bázi sklovinného orgánu (stopka) dolního čelistního zubu a v přilehlém orálním epitelu byla nalezena zóna apoptotických buněk od ED13,5 až do ED16,0 (Kieffer *et al.*, 1999). Lokalizace i vývojové stádium výskytu apoptózy odpovídá oblasti rudimentárního čelistního zubu a zániku jeho *Shh* signálního centra (Hovorakova *et al.*, 2011). Apoptóza ve stopce sklovinného orgánu naopak nebyla prokázána u *Sostdc1* mutantních myšů, které trpí nadpočetnými čelistními zuby (Munne *et al.*, 2009). V tomto případě by mohlo jít o perzistenci rudimentárního zubního základu a jeho revitalizaci ve smyslu tvorby zubu nadpočetného. Tento nadpočetný zub se vyskytoval lingválně k hlavnímu čelistnímu zubu a byl interpretován jako rudimentární zub k hlavnímu čelistnímu zubu, jehož lingvální epitel má schopnost formace zubu (Munne *et al.*, 2009). V podobném duchu dochází k potlačení apoptózy v rámci revitalizace rudimentárního premolárního zubního primordia a vývoji nadpočetného zubu u *Spry2* deficientních myšů (Peterkova *et al.*, 2009).

Tato data v obecné naznačují, že báze budoucího dolního čelistního zubu je na labiální straně místem pro vodu rudimentárního zubu labiálně a na lingvální straně možného náhradního čelistního zubu (Obrázek 39). Například v molárové oblasti myších embryí byla prokázána přítomnost rudimentální náhradní dentální lišty (*successional dental lamina*), která dává vznik další zubní generaci u diphyodontních a polyphyodontních druhů (Dosedelova *et al.*, 2015). To znamená, že čelistní oblast si fylogeneticky zachovává odontogenní kapacitu pro tvorbu další zubní generace (Hovorakova *et al.*, 2011). Tato latentní odontogenní kapacita může být stimulována k patologii vlivem některých genů (např. *NF-κB*) (Blackburn *et al.*, 2015). Předpokládáme, že podobný mechanismus vývoje bude zachován také v horní čelistní oblasti.



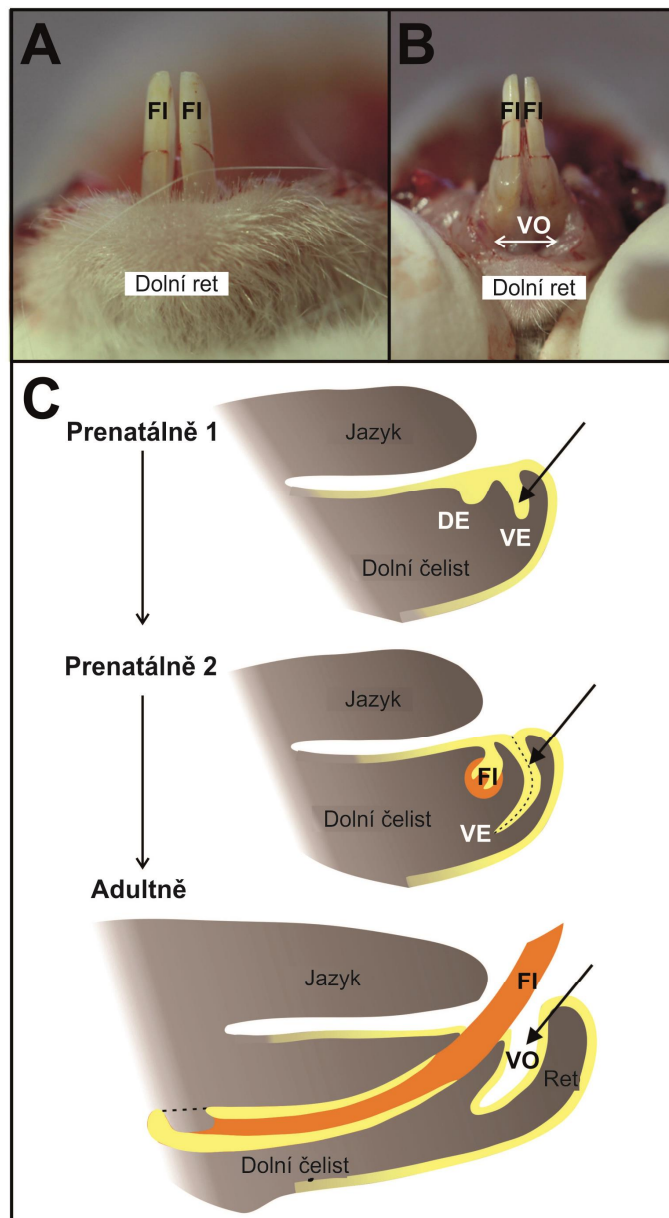
Obrázek 39: Rudimentární a budoucí funkční ezák v myš mandibule. (A) Schéma vývojového potenciálu k tvorbě tří generací zubů na sagitálním průřezu dolní ezákové oblasti myšeho embrya: rudimentární - prelakteální (I.), funkční (II.) a náhradní zub (III.). **(B)** Schéma dolní čelisti myšeho embrya shrnující asoprostorovou dynamiku *Shh* exprese v ezákové oblasti mezi ED12,5 a 13,5. Tmavě šedá plocha představuje anteriorní oblast *Shh* exprese, odpovídající rudimentárnímu ezáku (I.) a světle šedá plocha představuje posteriorní oblast *Shh* exprese, odpovídající funkčnímu ezáku (II.). VL - vestibulární lišta (upraveno podle Hovorakova *et al.*, 2011).

Myší funkční ezák je obecně pokládán za trvalý ezák a rudimentární ezák je považován za ten dočasný. Jiná teorie poukazuje na rudimentární ezák jako na pozůstatky dávných zubů savčích předků, které přetrvávají u současných savců (Woodward, 1894, Fitzgerald, 1973). Případně bývá spojován s časnou generací zubů (také rudimentární) u plazů (Fitzgerald, 1973, Peterkova *et al.*, 2002, Smith, 2003). Tomu napovídá jak morfologie, tak i umístění této struktury (Peterkova *et al.*, 2002, Hovorakova *et al.*, 2011). Proto bylo navrženo označovat rudimentární ezák u hlodavců jako součást prelakteální dentice a funkční ezák by pak odpovídal lakteální (mléčné) generaci (Peterkova *et al.*, 2002, Peterkova *et al.*, 2006, Hovorakova *et al.*, 2011). Prelakteální zuby byly popsány jako šminutové (miniaturní) primitivní zubní rudimenty lokalizované labiálně nebo bukálně od funkčního lakteálního zubu u mnoha druhů savců včetně člověka (Leche, 1893, Röse, 1895, Adloff, 1909).

Nadpo etné ezáky v my-í elisti by tedy mohly vznikat revitalizací rudimentárního zubního základu (Murashima-Suginami *et al.*, 2007) podobn jako je tomu v tvá ové oblasti (Peterkova *et al.*, 2009, Lagronova-Churava *et al.*, 2013, Lochovska *et al.*, 2015). P ípadn jiným dosud neobjasn ým mechanismem na lingvální stran funk ních ezák .

6.2 OBLAST PŘEDSÍŇĚ ÚSTNÍ – VESTIBULUM ORIS

Oblast zevn k dentici ohrani ená dásn mi, rty a tvá emi se nazývá p edsí dutiny ústní nebo *vestibulum oris* (Obrázek 40). asto se na tomto míst objevují patologie (nap íklad periferní odontomy nebo cysty). Periferní odontom bývá spojován s p ítomností nepro ezané (Ide *et al.*, 2000, Bernardes *et al.*, 2008, Ide *et al.*, 2008) nebo pro ezané struktury podobné zubu (nap . (Hanemann *et al.*, 2013). Tím vyvstává otázka, jak se mohou vyvíjet dentální anomálie v oblasti, kde není p ítomna struktura dentální li-ty. P vod t chto patologií byl vysv tlován poz statky m kké tkán odontogenního epitelu jako jsou gingivální zbytky Serres (v podstat zbytky dentální li-ty) (Bernardes *et al.*, 2008, Silva *et al.*, 2009), nebo patologickým vývojem zubního zárodku chyb jícího zubu v zubo adí (Hanemann *et al.*, 2013).

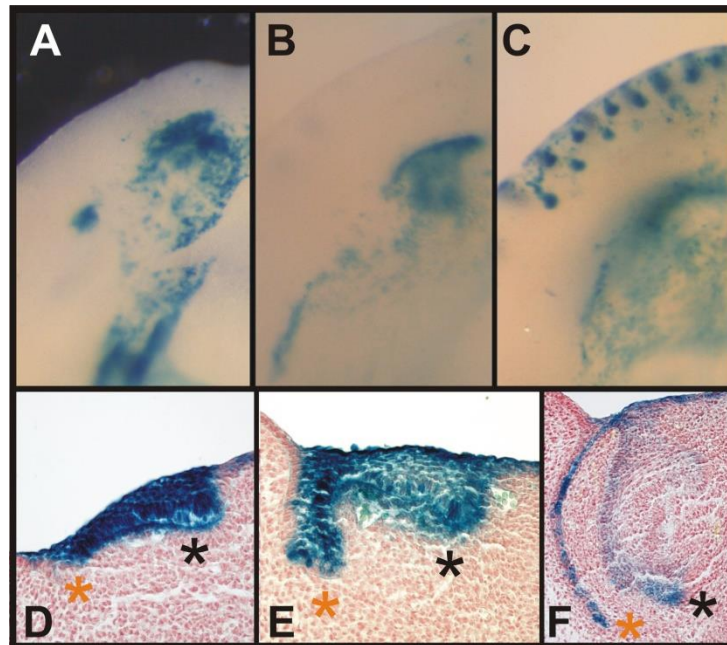


Obrázek 40: Vznik p edsí ústní u my-í. (A, B) V dolní elisti je anteriorní p edsí ústní (*vestibulum oris* - VO) volný prostor v dutin ústní ohrani ený labiáln sliznicí rt a lingváln sliznicí dásní, alveol a zuby. **(C)** Pochází z vestibulární laminy (VE) zevn p iléhající k dentálnímu epitelu (DE), který dává vzniknout funk ním ezák m (FI), jejichfl základ tvo í jednak tká epitelu (flut) a jednak mesenchymu (oranflov) (upraveno podle Hovorakova *et al.*, 2016).

Oproti obecn p ijímanému konceptu kontinuální vestibulární li-ty, ze které vzniká p edsí ústní u lidí, bylo dolofeno, fle je tvo eno sérií samostatných epiteliálních zdu ení a h eben , i li-t, které se vyvíjejí ve velmi blízkém vztahu s dentálním epitelem (Hovorakova *et al.*, 2005, Hovorakova *et al.*, 2007). U my-í se ezáková a diastemální

oblast orálního vestibula vyvíjí z anteriorní vestibulární li-ty (šlip-furrow band). V tvá ové oblasti se objevuje jiná epitelová li-ta (šcheek-furrow band), ze které vzniká distální ást orálního vestibula (Peterkova, 1985).

Shh exprese nebyla detekována ve vestibulárním epitelu během vývoje dolní elisti (Hovorakova *et al.*, 2011). Sledování osudu linie bun k exprimujících *Shh* ukázala přítomnost pozitivně zna ených bun k nejen v ezákové oblasti, ale p ekvapiv i v anteriorní ásti epiteliálního základu *vestibulum oris* (Obrázek 41). To vyvolalo otázku, jsou potomci bun né linie exprimující *Shh* přítomni ve vestibulárním epitelu, když vládné bu ky ve vestibulárním epitelu aktivně neexprimují *Shh*. Tyto bu ky by tak mohly pocházet z jiné ásti dutiny ústní (Hovorakova *et al.*, 2016).



Obrázek 41: Potomci bun k p vodně exprimujících *Shh* byly nalezeni v epitelovém základu dolního *vestibulum oris* u myšního embrya. (A-C) Embryonální elisti s permanentně X-gal zabarvenými bu kami (modře) ukazují linii potomků všech bun k exprimujících *Shh* od začátku vývoje embrya do doby jeho odběru. (D-F) Histologické řezy ukázaly modré bu ky v dentálním epitelu (černá hvězdička), ale i v epiteliálním základu *vestibulum oris* (oranžová hvězdička) na ED12,5 (A, D), 13,5 (B, E) a 14,5 (C, F). Modře zna ené bu ky byly koncentrovány ve vnitřní epiteliální vrstvě vestibulárního základu (F) a to potvrzuje přítomnost bun k exprimujících *Shh* v asné doméně rudimentárního ezáku k této epiteliální struktuře (převzato z Hovorakova *et al.*, 2016).

Jak již bylo zmíněno výše, na ED11,5 se u myši objevuje šasná, povrchová *Shh* expresní doména (ED11,5-13,5) v ezákové oblasti, která odpovídá primordiu rudimentárního ezáku v horní i dolní elisti a která pravděpodobně hraje roli v iniciaci následující generace zubů, kterou reprezentuje funkční ezák. Signální centrum budoucího funkčního ezáku se objevuje později (od ED13,5), posteriorně k první doméně (Hovorakova *et al.*, 2011, Hovorakova *et al.*, 2013).

Vzhledem k prostorové distribuci struktur v embryonální dolní elisti myši v raných stádiích vývoje bylo logické předpokládat, že zdrojem X-gal pozitivních buněk ve vestibulárním epitelu by mohla být právě šasná *Shh* expresní doména lokalizovaná superficiálně v anteriorní části báze vznikajícího funkčního ezáku a exprimující *Shh* právě v době vzniku epitelového základu předního ústní, který zatím není patrný jako samostatné epitelové ztlustění zevně od dentálního epitelu na ED12,5 (Hovorakova *et al.*, 2011). Distribuce a osud buněk z šasné *Shh* expresní domény byl během následujícího vývoje ezákové oblasti dokumentován pomocí Cre-loxP systému indukovatelného tamoxifenem. Rekombinace v populaci buněk exprimujících *Shh* v šasně *Shh* expresní doméně byla spuštěna intraperitoneální aplikací tamoxifenu na ED11,5, což odpovídá okamžiku přítomnosti šasné superficiální *Shh* expresní domény v dolní elisti. Značené buňky (modrá) byly i v tomto případě lokalizovány v primordiu funkčního ezáku, ale také ve vnitřní lingvální buněčné vrstvě vestibulárního epitelu. Výskyt pozitivní i negativní značených buněk v epitelu vestibula dokládá dvojí vývojový předod této struktury.

Pokud byl tamoxifen aplikován v šase, kdy již superficiální anteriorní doména *Shh* neexprimuje (ED14.5), byly i epitelový základ předního ústní negativní, řádné modě značené buňky se v něm nevyskytovaly v celém předod zadní části struktury. Oblast funkčního ezáku byla i v tomto případě oblastí výskytu pozitivních buněk, což dokládá, že signální centrum funkčního ezáku již *Shh* exprimujícími buňkami k tvorbě předního ústní nepřispívá.

Naše výsledky tedy jasně ukazují, že buňky exprimující *Shh* v šasně anteriorní expresní doméně nepřispívají k tvorbě vestibulární lišty a lze říci, že ezáky a vnitřní vrstva vestibulárního epitelu mají společný předod. Vnitřní strana vestibulárního epitelu by mohla pocházet z orální strany rtu a tváře.

Pacienti s Ellis-van Creveldovým syndromem (OMIM 225500) vykazují mimo jiné i patologie ve vestibulární oblasti jako je mnohočetná labiální frenula (Hattab *et al.*, 1998). U myších modelů tohoto syndromu (*Evc* deficientní myši) dochází k nedokonalému

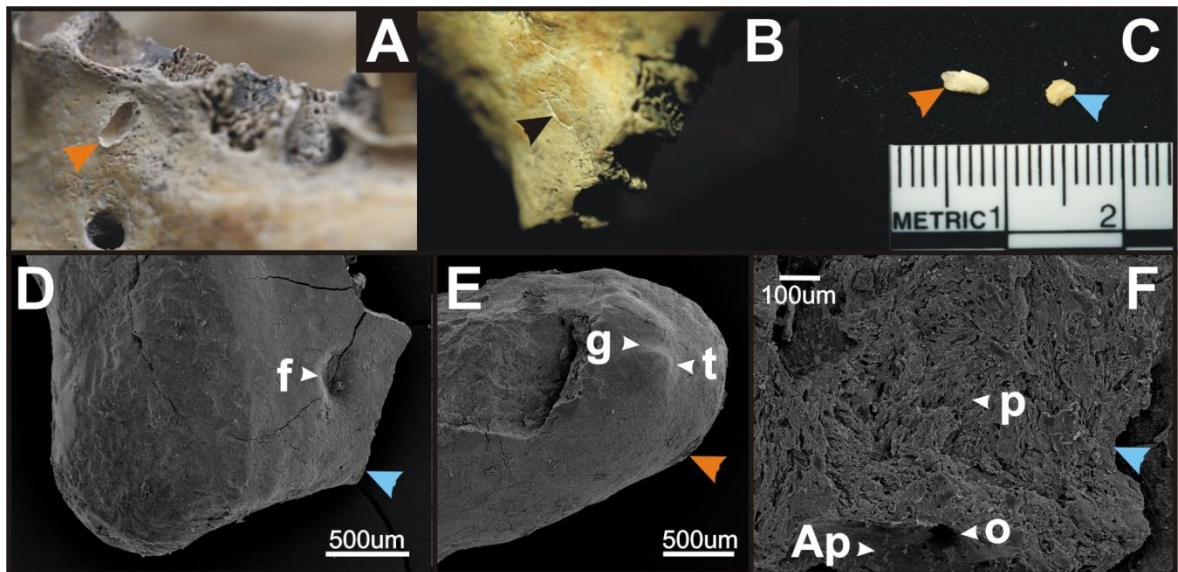
vývoji zubů a kostí vlivem narušené Shh a Ihh signalice (Ruiz-Perez *et al.*, 2007, Nakatomi *et al.*, 2013). Z tohoto úhlu pohledu by patologie p edsin ústní u Ellis-van Creveldova syndromu mohly potvrdit ú ast bun k p vodn exprimujících *Shh* na tvorbu vestibula. Narušení Shh signalizace by tak mohlo způsobovat u pacientů výše zmíněné defekty.

I ve vestibulární oblasti lze nalézt dentální patologie, i patologie s prezencí struktur přímo spojitelných s dentálním vývojem. Byly zdokumentovány například odontogenní ameloblasty u transgenních amelogenin deficientních myší (Fukumoto *et al.*, 2004). U lidí se objevují periferní odontomy v oblasti zevně k dentici (Giunta and Kaplan, 1990, Ledesma-Montes *et al.*, 1996, Ide *et al.*, 2000, Bernardes *et al.*, 2008, Ide *et al.*, 2008, Hanemann *et al.*, 2013). Vývojový původ odontomu je stále neznámý. Histogeneze tohoto typu odontomu byla spojena s pozstatky odontogenního epitelu z mkké tkáně jako jsou dásňové zbytky Serres, které si ponechaly schopnost epitel-mesenchymálních interakcí, které by mohly vést k tvorbě odontomu (Bernardes *et al.*, 2008, Silva *et al.*, 2009). V ostatních případech by společná lokalizace odontomu a chybějících zubů v zubním oblouku napovídala, že původ této patologie by mohl být abnormální vývoj zárodku chybějícího zubu (Hanemann *et al.*, 2013). Zároveň byl naznačen společný původ odontomu a nadpočetných zubů, kdy by mlo jít o výsledky stejného patologického procesu (Pippi, 2014).

Velmi vzácný případ periferního odontomu se strukturami podobnými jednoduchým kónickým zubům, které se dokonce proezaly do dutiny ústní, byl zaznamenán nedávno (Hanemann *et al.*, 2013). Histopatologická analýza ukázala, že tyto struktury byly složené ze skloviny, dentinu, cementu a měly i zubní d e ve stejném uspořádání jako u normálního zubu. Byly obklopeny tenkou vrstvou epitelu a uloženy ve fibrózní pojivové tkáni, což demonstruje jejich periferní původ. Rudimentární dentikly, které se proezaly z odontomu, byly lehce vloženy do dásně, což se klinicky potvrdilo zvýšenou zubní mobilitou (Hanemann *et al.*, 2013).

Obdobné struktury je možné najít také při studiu historického materiálu (Hovorakova *et al.*, 2016). V našem případě bylo analyzováno několik struktur podobných zubů externě k zubnímu oblouku nalezených na historické lebce feny. Elektronová mikroskopie potvrdila, že tkáň má vlastnosti zubní tkáně (přítomnost skloviny), což potvrdilo jejich vztah k dentici. I z tohoto hlediska lze konstatovat, že vestibulární oblast vykazuje určitý odontogenní potenciál (Obrázek 42). Tento potenciál

m může být aktivován i v patologických podmínkách a dává vznik zubním strukturám v oblasti zevní od zubní ady (Hovorakova *et al.*, 2016).



Obrázek 42: Struktury podobné zubu na historickém materiálu potvrzují odontogenní potenciál vestibulárního epitelu. (A-F) B hem archeologického výzkumu v roce 2007 a 2008 v lokalitě Gá (Galanta, Slovenská republika, 5.-6. století AD) byly nalezeny tyto struktury podobné zubům na lebce ženy vyzdvížená z hrobu AH19. (A, B) Dvě z těchto struktur byly lokalizovány v mandibule externí k alveolám: jedna na povrchu mandibulární kosti (oranžová šipka A, C, E) a jedna v rámci mandibulární kosti (černá šipka B). Tato dentální částice byla nalezena volně mezi kostními fragmenty (modrá šipka C, D, F). Elektronová mikroskopie odhalila aprismatickou (Ap) a prizmatickou sklovinu (p) s hrbolky (tuberculum ot), jamkami (fossa of) a drážkami (g) na povrchu. Byly objeveny také otvory (o) pravděpodobně pro cévy a nervy (p evzato z Hovorakova *et al.*, 2016).

Bylo prokázáno, že *Sox2* je asociován s tvorbou nadpočetného zubu u nádorů podobných odontomům, indukovaným Wnt signální aktivitou u myši. Exprese *Sox2* u těchto ameloblastomů byla spojena s jejich potenciálním původem v epitelu dentální laminy (Juuri *et al.*, 2013). *Sox2* byl detekován v dentálním epitelu, ale také v přilehlém orálním a vestibulárním epitelu (ukázáno, ale nediskutováno v Juuri *et al.*, 2012). *Sox2* byl identifikován jako marker epiteliálních kmenových buněk (Ellis *et al.*, 2004) a jeho exprese byla prokázána také v dentálním epitelu (Zhang *et al.*, 2012). *Sox2* je transkripční faktor nezbytný pro udržení obnovy nebo pluripotence nediferencovaných embryonálních kmenových buněk. Z tohoto hlediska a ve srovnání s předloženými výsledky sledování osudu buněčných linií, potvrzujícími půsopvek odontogenních buněk do vestibulárního

zárodku, potenciál buněk k diferenciaci a tvorbu odontogenní tkáně by také mohl být udržen ve vestibulární oblasti. A pokud by byl aktivován (např. za patologických podmínek), mohl by vytvořit vývojový základ pro odontogenní patologie jako jsou odontomy.

6.3 MOLÁROVÁ OBLAST

Přítomnost rudimentárních zubních primordií v antemolárním prostoru myších embryonálních elistech byla již dříve prokázána na základě kombinace histologie, morfometrie a 3D rekonstrukcí (Peterkova *et al.*, 1995, Peterkova *et al.*, 1996, Lesot *et al.*, 1998, Viriot *et al.*, 2000). Zároveň bylo ukázáno, že se v průběhu vývoje postupně objevují samostatné *Shh* expresní domény v jednotlivých strukturách (MS, R2, M1) v antero-posteriorním směru v tvářové oblasti myších embryonální mandibuly (Prochazka *et al.*, 2010).

6.3.1 VZNIK PRIMÁRNÍHO SKLOVINNÉHO UZLU

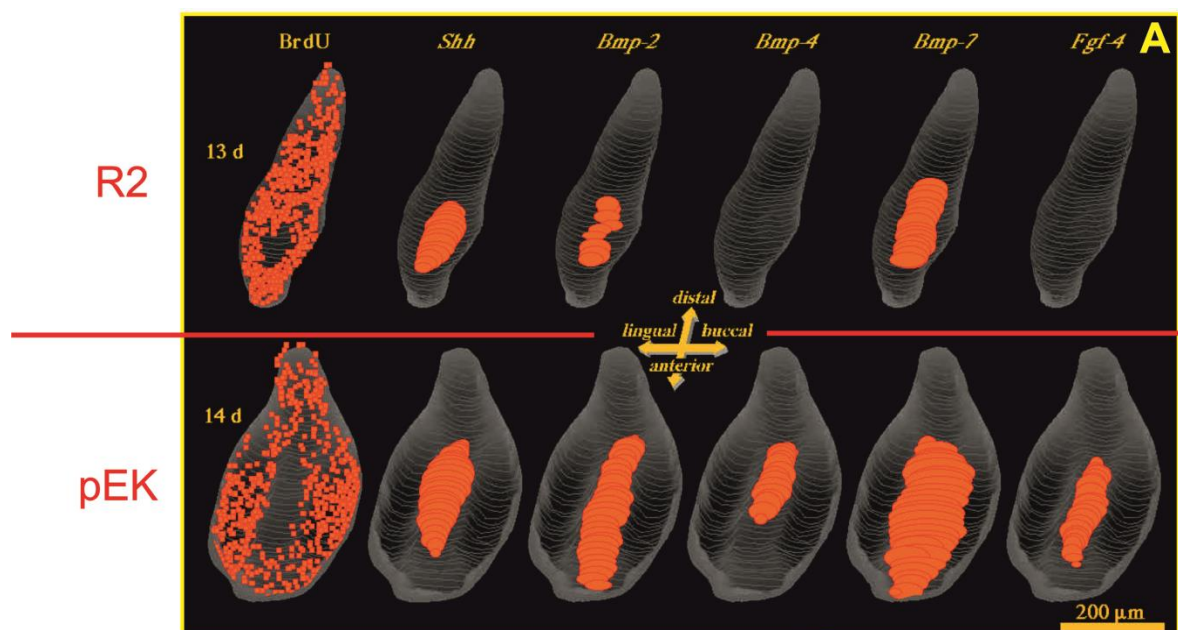
Obecně se ví, že pEK se začíná objevovat na vrcholku zubního pupenu (ED13) a je jasně detekovatelný ve stádiu pohárku (ED14) (Vaahtokari *et al.*, 1996a, Jernvall and Thesleff, 2000, Cho *et al.*, 2007).

Podle našich výsledků se v tomto časovém okamžiku objevují v tvářové oblasti mandibuly dvě izolované *Shh* expresní domény v R2 a M1 primordiích (Prochazka *et al.*, 2010, Lochovska *et al.*, 2015). Senzitivní detekce pomocí metody disociace epitel segmentu tvářové oblasti ukázala, že dochází ke krátké, přechodné ko-expresi *Shh* v R2 rudimentu a asněm M1 primordiu. Zároveň se ukázalo, že dochází k fúzi těchto signálních center mezi ED14,5 a 14,7, čímž vzniká jedna složená *Shh* expresní doména v budoucím funkčním M1 primordiu. A tedy ať tato složená *Shh* doména by měla být nazývána primárním EK (Lochovska *et al.*, 2015).

Asná *Shh* expresní doména v M1 není v kontextu těchto nových poznatků klastrem epiteliálních buněk nazývaných pEK. Typická oválná *Shh* doména pEKu v M1 zubním zárodku vzniká teprve ať po fúzi dříve samostatných signálních center lokalizovaných v R2 a M1 primordiích. Teprve od ED14,5 lze tedy hovořit o signálním centru budoucí M1 ó pEK. Na ED14,5 byl pozorován mesio-distální nárůst pEK ve srovnání ED13,5

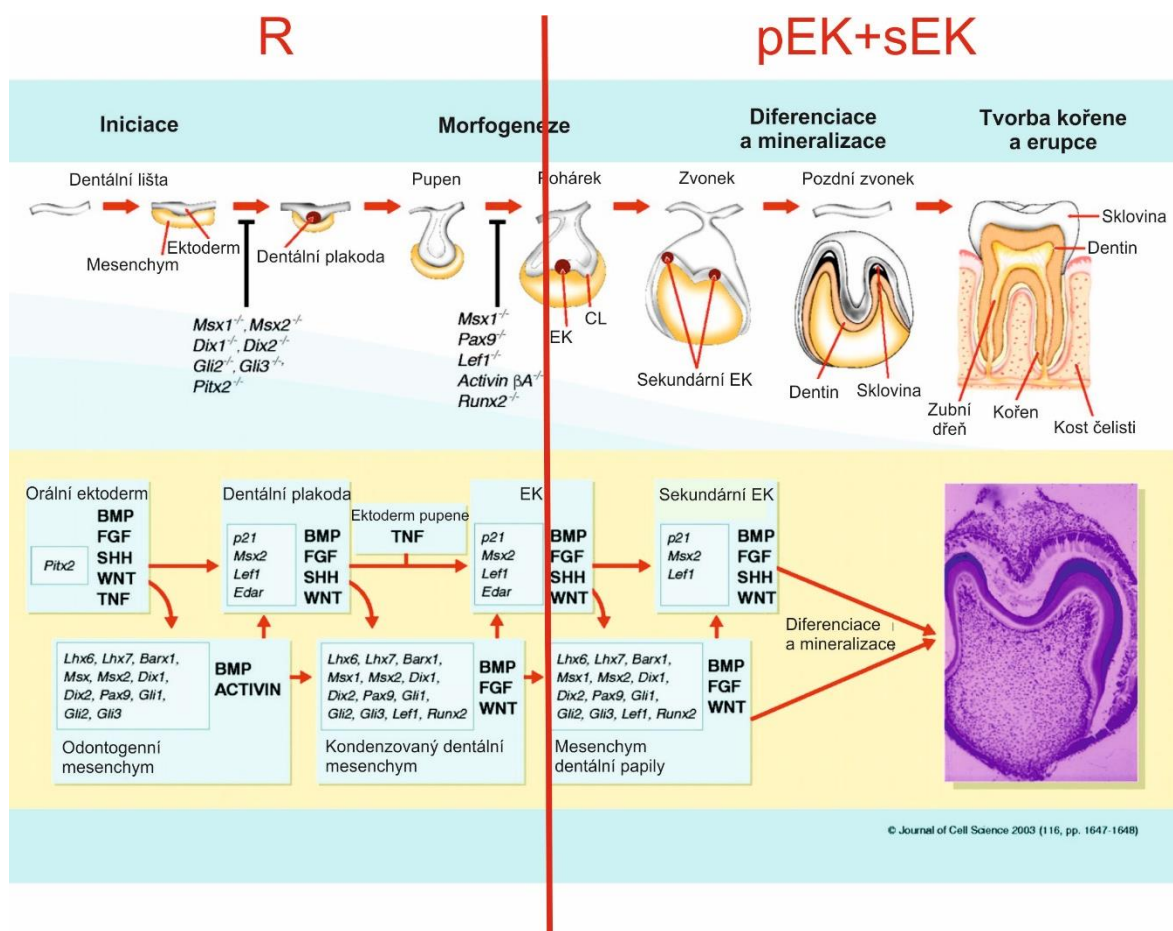
(Shigemura *et al.*, 2001), který lze vysvětlit právě spojením aktivního signálního centra R2 k asnému signálnímu centru M1 zaznamenanému v naší studii (Lochovská *et al.*, 2015). Zároveň je jasné, že na morfologické úrovni je vyloučeno nazývat pEK semknuté buňky epitelu v zárodku M1 ve stádiu pupeny (šbudě).

Z uvedeného je zřejmé, že obecně se signalizace v zubním zárodku před ED14,5 nemůže vztahovat k pEK, ale k R2 rudimentu. Je tedy velmi důležité při interpretaci exprese signálních molekul, které detekujeme, zachovat kontext vývojového stádia a tedy struktury, ke které se vývoj vztahuje (pro srovnání Obrázek 9 a Obrázek 43).



Obrázek 43: Příklady exprese některých signálních molekul v R2 rudimentu a v pEK zárodku mandibulárního moláru myši (upraveno podle Vaahtokari *et al.*, 1996a). Exprese signálních molekul na ED13 nemůže být vztahována k pEK, jelikož tento jako takový vzniká až později. Tato exprese je vzhledem k antero-posteriorní lokalizaci, velikosti domén a také ED spojena s R2 rudimentem. Naopak exprese signálních molekul na ED14 je již jistě spojena s pEK, tedy po fúzi signálních domén R2 a povodní M1.

To by znamenalo, že asné interakce mezi epitelem a mesenchymem se v oblasti tváří ových zubů u myši nevztahují výhradně k pEK M1, ale jsou spojeny s vývojem zubních rudimentů (MS a R2) a nikoliv s vývojem funkční dentice (Obrázek 44).



Obrázek 44: asná signalizace mezi epitem a mesenchymem nemusí mít vztah k pEK a tedy k vývoji funkčního zubu, ale může ovlivňovat signální centra rudimentárních zubních primordií (R). Při interpretaci výsledků spojených s raným zubním vývojem by na tyto skutečnosti měly být brány zřetel (upraveno podle Thesleff, 2003).

6.3.2 NARUŠENÁ FÚZE R2 A M1 SHH EXPRESNÍCH DOMÉN VEDE KE VZNIKU NADPOČETNÉHO ZUBNÍHO PRIMORDIA

Molekulární a genetické studie za posledních dvacet let ukázaly, že vývoj dentice je velmi dynamický a komplexní proces kontrolovaný po celém signálních drah. Tyto interakce pak určují přesný tvar a počet zubů a jejich vzorec (Lan *et al.*, 2014). Je jasné, že během tak komplikovaného procesu se mohou objevit chyby, které vedou ke vzniku orálních patologií (Townsend *et al.*, 2012). Přítomnost nadpočetného zubu mezi patologie rozhodně patří. Takové zuby byly nalezeny v antemolárním prostoru u několika kmenů myší (např. Mustonen *et al.*, 2003, Tucker *et al.*, 2004, Kassai *et al.*, 2005, Ohazama *et al.*, 2008,

Ohazama *et al.*, 2009). Nadpočetné zuby před prvním molárem se vyvíjejí také u *Spry2* nebo *Spry4* deficientních myši (Klein *et al.*, 2006).

Jak již bylo zřejmé, naše data ukázala fúzi mezi R2 a M1 *Shh* signálními doménami jako esenciální pro vznik signálního centra M1 pEK (Obrázek 29A). Tato fúze vedoucí k normálnímu vývoji byla detekovatelná standardně u kontrolního genotypu (*Spry2*^{+/+};*Spry4*^{+/+}) a u vzorků s vyšší dávkou *Spry* genu (viz Obrázek 27, Obrázek 29A). Naopak nesplynutí signálních center R2 a rané M1 znamenalo vznik nadpočetného zubu lokalizovaného anteriorně od M1, jehož signálním centrem bylo perzistující signální centrum rudimentu R2 (Lochovska *et al.*, 2015).

Tento fenomén vykazovala embrya s genotypy s níže dávkou *Spry* genu (Obrázek 28, Obrázek 29B). R2 *Shh* signální doména zůstala oddělená anteriorně k perzistujícímu vodnímu M1 *Shh* doméně. R2 pupen se pak progresivně vyvíjel a byl v nadpočetném zubní primordium (Obrázek 29B). Lze tedy říci, že u mutantních myši s nadpočetným zubem v antemolárním prostoru, indikuje perzistující R2 *Shh* signální doména signální centrum samostatně se vyvíjejícího nadpočetného zubu. R2 rudiment se v takových případech vyvíjí autonomně a dává vzniknout nadpočetnému zubnímu primordiu, místo aby byl inkorporován do M1. Důsledkem je i pozorované zkrácení zubu následujícího po nadpočetném zubu v předozadním směru (Lagronova-Churava *et al.*, 2013).

6.3.3 VLIV DÁVKY *SPROUTY* GENŮ NA VZNIK NADPOČETNÉHO ZUBNÍHO PRIMORDIA

Vliv dávky genu na fenotyp myši byl potvrzen již dříve. Variace *Pax9* mutantních alel způsobovaly oligodoncii, hypoplasii nebo úplnou absenci dolních řezáků a těchto molárů (Kist *et al.*, 2005). Podobně senzitivní na dávku *Spry2* je vývoj patra (Welsh *et al.*, 2007). Ztráta funkce *Spry* genu vede k vyššímu počtu řezáků v horní elisti (Charles *et al.*, 2011).

Spry patří do evolučně konzervované rodiny a jsou nezbytné pro normální vývoj kraniofaciálních struktur v etnodentice. Kódují negativní regulátory FGF a ostatních RTK signálních kaskád a nepřímo ovlivňují expresi *Shh* (Hacohen *et al.*, 1998, Kim and Barsagi, 2004, Shim *et al.*, 2005).

Naše data dokumentují, že přítomnost rudimentárních a funkčních zubních primordií není zcela narušena nepřítomností *Spry* genu. Nicméně dávka těchto genů postihuje nasouvání a tvorbu nových zubních primordií v tvářové oblasti myši

mandibuly. Postupný výskyt *Shh* expresních domén ve t ech r zných oblastech odpovídá situaci pozorované u kontrol, ale exprese jednotlivých domén byla na rozdíl od kontrolních genotyp prodloužená. Toto prodloužení m lo za následek opořd ní za átek *Shh* exprese v dal-ích oblastech. Tedy prodloužení *Shh* exprese v MS zp sobí opořd ní v R2 a M1, podobn dal-í prodloužení v R2, je-t více zpozdí nástup *Shh* exprese v M1. Zajímavé je, že prodloužení doby *Shh* exprese bylo více z ejmé (prodluřlovalo se) s klesající dávkou *Spry2* genu (Obrázek 28). To by nazna ovalo, že *Spry2* má v tomto smyslu v t-í dopad na zubní vývoj než *Spry4*.

Mutace *Spry2* nebo *Spry4* gen zp sobují tvorbu nadpo etného zubu v my-í diastem zvý-ením hladin FGF signalizace (Klein *et al.*, 2006, Peterkova *et al.*, 2009). FGF signální dráha je aktivní jak v epitelu, tak v mesenchymu a hraje roli ve stimulaci bun né proliferace (Jernvall *et al.*, 1994, Kettunen and Thesleff, 1998) a v potla ení apoptózy (Vaahtokari *et al.*, 1996b), která byla popsána jako jeden ze zásadních faktor vymizení rudimentárních struktur v pr b hu normogeneze (Peterkova *et al.*, 2003). P i ztrát funkce *Spry* gen a zvý-ení FGF signalizace (Hacohen *et al.*, 1998, Klein *et al.*, 2008) dochází ke snížení apoptózy a naopak ke zvý-ení bun né proliferace v oblasti zubních rudiment MS a R2 v my-í embryonální mandibule (Peterkova *et al.*, 2009). Taková revitalizace rudiment má za následek tvorbu nadpo etného zubního primordia (Peterkova *et al.*, 2009, Lagronova-Churava *et al.*, 2013). N kolik len FGF rodiny indukuje *Shh* expresi, která pak ovliv uje ostatní leny FGF rodiny (Hacohen *et al.*, 1998, Kettunen *et al.*, 2000, Kratochwil *et al.*, 2002, Klein *et al.*, 2006). Tento zp tnovazebný model byl potvrzen u nadpo etných zub *Spry2* deficientních my-í (Klein *et al.*, 2006) a také u vývoje kon etinových pupen u my-í (Sun *et al.*, 2000). Podle toho by zvý-ená FGF exprese mohla prodlouřit *Shh* expresi, jejíž prodloužení je podle prezentovaných výsledk práv jedním z faktor patogeneze v zubním vývoji (Lochovska *et al.*, 2015).

Spry dokáží inhibovat FGF signalizaci dv ma zp soby a to p es adaptorový protein Grb2 nebo p es Raf kinázu (Thisse and Thisse, 2005). Oba zp soby zamezí aktivaci MAPK/ERK dráhy a p enosu signálu do jádra bu ky. Nicmén v-echny *Spry* homology neinhibují tuto kaskádu stejn . V p ípad *Spry2* proteinu bylo zaznamenáno, že se váže, jak na Raf (Yang *et al.*, 2006), tak na Grb2 pomocí N-terminálního konce (Lao *et al.*, 2007). *Spry4* interaguje také s Raf kinázou, ale p es C-terminální konec, navíc je tato interakce zahrnuta zejména v regulaci Ras-nezávislé MAPK aktivace (Sasaki *et al.*, 2003). Navíc samotná inhibice MAPK aktivace p es Ras-dependentní dráhu se zdá být mnohem

úinn jí pomocí *Spry2* nefl pomocí *Spry4* (Yusoff *et al.*, 2002, Rathmanner *et al.*, 2013). Klasické studie ukazují, flé Ras/Raf/MEK/MAPK kaskáda m flé podpo it proliferaci a maligní transformaci zejména kv li stimulaci bun ěného r stu a zároveň kv li prevenci apoptózy, která je práv ě jedním z faktor ě normálního ústupu rudimentárních struktur v zubním vývoji. Dalším asto p ehlíflným aspektem této kaskády je produkce r stových faktor ě, které stimulují r st (McCubrey *et al.*, 2007). Ztráta funkce *Spry2* by mohla mít tedy výrazn ě jí efekt na patologii zubního vývoje nefl *Spry4* ve smyslu nadpo etných zub ě.

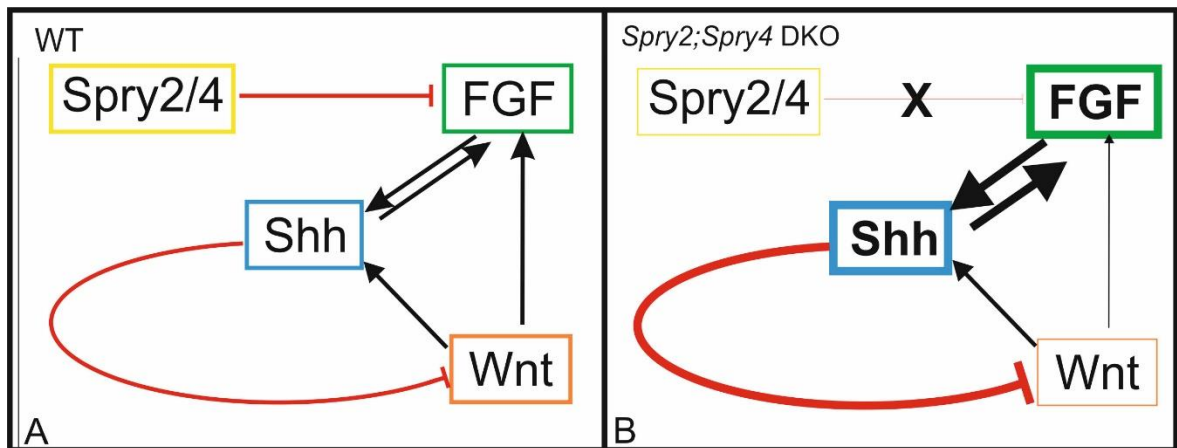
Zvýěená exprese *Spry* (zejména *Spry2*) vede k zastavení vývoje zprost edkovaného FGF (Minowada *et al.*, 1999, Maillieux *et al.*, 2001), naopak sníflená exprese *Spry* vede k nezvyklému nár stu pu ení epitelových orgán ě a struktur (plíce, kon etinové pupeny, zuby) (Tefft *et al.*, 1999, Klein *et al.*, 2005).

6.3.4 ZASTAVENÍ VÝVOJE NADPOĚETNĚHO ZUBNÍHO PRIMORDIA U *SPRY* MUTANTNÍCH MYŠÍ

Bylo zjiěeno, flé frekvence nadpo etných zub ě v pro ezané dentici je podstatn ě níflí nefl frekvence prenatalních nadpo etných zubních primordií (Lagronova-Churava *et al.*, 2013). Na základ ě naších výsledk ě jsme se pokusili vysv tlit tento jev a hypoteticky nastínit signální dráhy, které by mohly zastavit vývoj nadpo etného zubního primordia u *Spry2;Spry4* mutantních myší b ěm pozd ějšího prenatalního období.

Interakce mezi Shh a Wnt signalizací b ěm zubního vývoje jifl byly prokázány. Shh p sobí jako negativní zp tnovazebný regulátor Wnt v diastemálním zubním vývoji. Redukce Shh aktivity vedla ke kontinuálnímu vývoji R2 zvýěením Wnt signalizace u *Wise* deficientních myší (Ahn *et al.*, 2010). Za pomoci FGF/*Spry* zp tnovazebného modelu (Klein *et al.*, 2006, Klein *et al.*, 2008) m fléme navrhnout, flé Shh signalizace je siln ě up-regulovaná zvýěením FGF signalizace u *Spry2;Spry4* DKO myší. Shh je nezbytné pro separaci zub ě (Ohazama *et al.*, 2008) tím, flé funguje jako antagonist a Wnt signalizace (Ahn *et al.*, 2010). Za pouflití t chto záv r lze navrhnout model (Obrázek 45), který vysv tluje, pro ě nemohou být nadpo etná zubní primordia detekována v pozd ějších stádiích vývoje v diastem ě u n kterých genotyp ě (rozhodn ě u *Spry2^{+/+};Spry4^{-/-}*, *Spry2^{+/-};Spry4^{-/-}*). Zachování zvýěené Shh signalizace se na základ ě výěe uvedeného m flé podílet na separaci R2 rudimentu od vyvíjejícího se prvního moláru a podpo it tak tvorbu nadpo etného zubního primordia (Obrázek 27, Obrázek 29B). Vyěí hladiny Shh siln ě

antagonizují Wnt signalizaci, která je nezbytná pro správný vývoj zubu. Nižší hladina Wnt by pak mohla zastavit vývoj R2 a primordium nadpo etného zubu by tak podleгло regresi. To by znamenalo, že Shh moduluje hladiny Wnt signalizace během zubního vývoje (Obrázek 45B). Nicméně zůstává otázka, proč se i přes výše uvedené vyvinou na která primordia v proezané nadpo etné zuby (Klein *et al.*, 2006, Lagronova-Churava *et al.*, 2013).



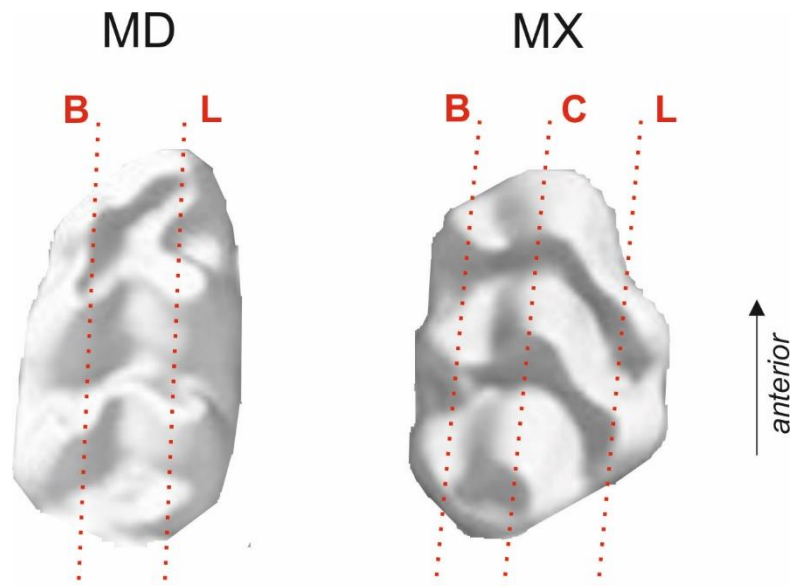
Obrázek 45: Hypotetický model molekulární kontroly aktivace a inhibice vývoje nadpo etného zubu v dolní části *Spry2;Spry4* mutantních myši. (A) U WT embryí *Spry2/Spry4* proezen redukují proenos FGF signálu (Klein *et al.*, 2006) a tím nepřímo ovlivňují hladinu Shh (Klein *et al.*, 2006, Klein *et al.*, 2008). Shh je negativním regulátorem Wnt (Ahn *et al.*, 2010) a hraje roli v separaci jednotlivých zubů (Ohazama *et al.*, 2008). (B) Ztráta funkce *Spry* genů u *Spry2;Spry4* mutantů vede ke zvýšení FGF signalizace (Hacohen *et al.*, 1998, Klein *et al.*, 2006, Klein *et al.*, 2008). To má za následek redukci apoptózy a naopak stimulaci buněčné proliferace v MS a R2 rudimentech, což vede k tvorbě nadpo etného zubního primordia (Peterkova *et al.*, 2009, Lagronova-Churava *et al.*, 2013). Vyšší hladiny FGF zvyšují hladiny Shh. To pomáhá R2 rudimentu, aby se oddělil od zubního zárodku M1. Nicméně zvýšená exprese *Shh* silně inhibuje Wnt signalizaci, která tak nemůže zachovat samostatný vývoj R2 rudimentu jako nadpo etného zubu a proto dochází k jeho regresi. Tloučka a rámeček symbolizuje úroveň signální aktivity ve smyslu zvýšení i snížení (převzato z Lochovska *et al.*, 2015).

Naše data dokládají, že zmínené dávky *Spry2* a *Spry4* genů mají následky pro vývojovou dynamiku a šattering zubních primordií a že zachování alespoň malé dávky *Spry2* a *Spry4* genů umožní udržet stav blízký normálnímu vývoji.

6.4 VÝVOJ ZUBNÍCH HRBOLKŮ

Základní zubní vzorec savců je tvořen různými typy zubů (ezáky, přední řezáky, premoláry, moláry). Z těchto zubů dosáhly premoláry a moláry největší komplexity, zejména u savců, kteří jsou specializováni na vláknitou stravu (Evans *et al.*, 2007). Adaptivní spojení se zpodobou stravování znamená, že se opakovaně vyvinuly i další hrbolky u savčích linií specializujících se na rostlinnou stravu. Například, evoluce těchto hrbolkových horních molárů z těchto hrbolkových předků probíhala nezávisle přidáním specifického hrbolku (hypokon) přinejmenším dvacetkrát (Hunter and Jernvall, 1995). Počet hrbolků může být ovlivněn i dnes pomocí genových modulací. Například snížená dávka *FGF3* u myši i lidí způsobuje redukci počtu hrbolků a změny v morfologii, které se podobají podmínkám u fosilních hlodavců nebo asijských antropoidních primátů, resp. (Charles *et al.*, 2009). Naopak zvýšená aktivita *FGF10* vede k zvýšení počtu hrbolků u myších molárů (Yokohama-Tamaki *et al.*, 2006).

Vývoj zubních hrbolků je řízen signálními centry známými jako EK. Jde o transientní klastr nedělicích se epiteliálních buněk, který je lokalizován v centru zubního zárodku (Jernvall *et al.*, 1994, Vaahtokari *et al.*, 1996a). Sekundární EK se objevuje v místě ohybu epitelu, čímž označuje oblast iniciace vzniku hrbolků (Kettunen and Thesleff, 1998, Jernvall and Thesleff, 2000).



Obrázek 46: Morfologie korunky myších molárů z dolní a horníelisti. Myšičí dolní moláry (MD) mají zubní hrbolky uspořádané ve dvou paralelních řadách o bukalní řadu

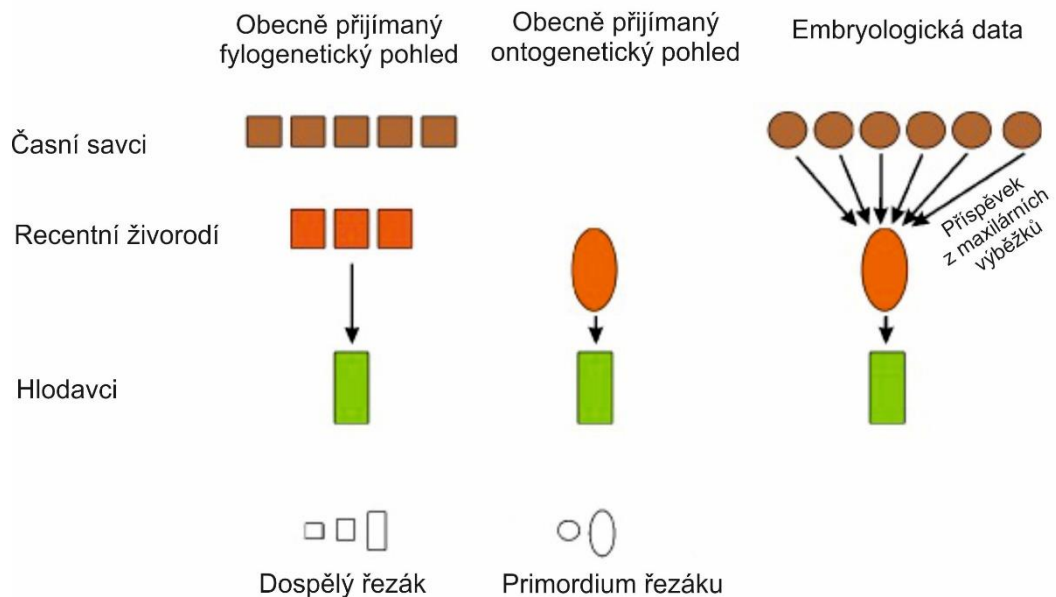
(B) a lingvální ada (L), zatímco horní moláry mají uprostřed ječ centrální adu hrbolk (C) (obrázky zubů z Mitsui *et al.*, 2016).

Myšlí linie si zachovaly počet hlavních hrbolků moláru po předcích, ale jejich uspořádání je jiné. Mají bukální a lingvální hrbolky ve dvou paralelních řadách v dolních molárech a ve třech řadách v horních molárech (Obrázek 46). Sledovali jsme pispívání buněk exprimujících *Shh* a jejich potomků signálním centrem EK pomocí tamoxifen indukovatelného Cre-loxP systému. Na základě našich výsledků je jasné, že ke vzniku pEK v dolní elisti myšlího embrya přispívají *Shh* exprimující bučky signálního centra R2 rudimentu (Obrázek 27, Obrázek 29A). Navíc se zdá, že si takto vzniklý pEK udržel svou pozici v rámci zubního zárodku M1 a stává se z něj sEK na bukální straně, zatímco v sternu lingvální části zubního základu vzniká na lingvální straně *de novo* sEK dalšího hrbolku. To podporuje dřívejší tvrzení, že bučky pEKu přetvářejí a podílejí se na vzniku bukálního sEKu (Jernvall and Thesleff, 2000). Otázkou zůstává, zda přispívají bučky pEKu do lingválního sEKu, což je v souvislosti s předem zmíněným kolikou protichůdných studií (Coin *et al.*, 1999, Coin *et al.*, 2000, Matalova *et al.*, 2005).

V dolní elisti by pEK mohl být základem pro budoucí vznik protokonidového hrbolku. Na základě Cre-loxP materiálu jsme zjistili, že *Shh* pozitivní bučky a jejich potomci se následně šíří lingválním směrem a později také posteriorním směrem. Dvě vzniklé pozitivní oblasti pravděpodobně leží v místě budoucích hrbolků prvního moláru o metakonid, resp. hypokonid. Bučky z lingválního metakonidu pak zřejmě přispívají ke vzniku dalšího lingválního hrbolku, což by mohl být vrcholek entokonidu. Teprve potom se začínají zakládat anteriorní hrbolky z buněk protokonidu, ale zřejmě přispívají i bučky metakonidu, čímž vznikají základy obou anterokonidů. Patrně se ale zakládá dříve anterokonid na bukální straně zubu. Zřejmě úplně na závěr by mohl vzniknout základ posledního hrbolku M1 o hypokonulidu, který se nám ale nepodařilo zachytit (Obrázek 34).

V horní elisti dává pEK pravděpodobně vznik parakonu. Opět se tedy vytváří jako první prostřední hrbolky bukální strany zubu. Schéma následného vzniku lingválního hrbolku v dolní elisti je zachováno pouze zčásti. Bučky se opravdu rozšířily lingválním směrem, ale vzhledem k jinému uspořádání hrbolků v horním moláru se dostávají do centrální řady a zakládá se protokon. Z obou základů se pak následně šíří bučky jak anteriorním tak posteriorním směrem, i když se zdá, že na bukální straně k tomu dochází

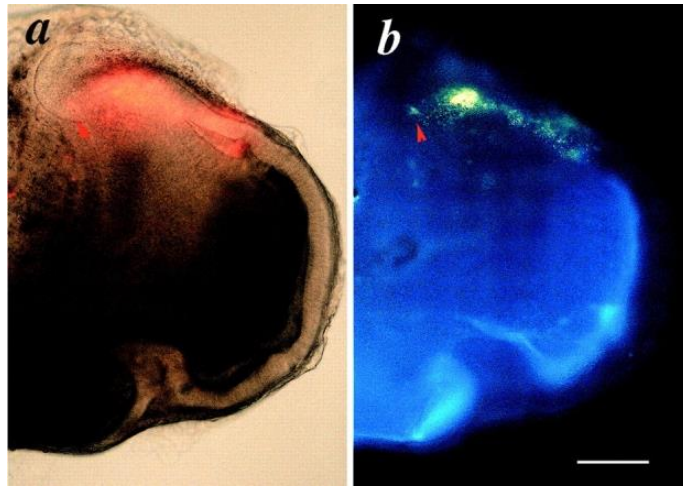
asn ji. Tím vzniká posteriorní metakon a následně hrbolky hypokonu a enterostylu. Na anteriorním konci je to jako první bukální anterokon, následuje centrální anterokon a nakonec anterostyl na lingvální straně (Obrázek 35). Toto obecně odpovídá představě, že mnohohrbolkový zub reprezentuje několik zubů jednohrbolkových (konkrescence) (Obrázek 47) (Kükenthal, 1892, Bolk, 1922, Peyer, 1968, Peterkova *et al.*, 2000).



Obrázek 47: Horní řezák – fylogenetické a ontogenetické aspekty. Podle obecně přijímaného názoru byl počet řezáků progresivně redukován během evoluce hlodavců. Jeden řezák u hlodavců by měl odpovídat druhému řezáku placentálních savců s nereduovaným počtem řezáků (levé schéma). Proto se považuje za samozřejmé, že se u myšičky vyvíjí pouze jeden řezákový základ a následně jeden funkční řezák (prostřední schéma). Nicméně, embryologická data ukazují integrovaný vývoj (konkrescence) prstí a předních plakodů, které společně dávají vzniknout pupenu horního řezáku u myšičích embryí (pravé schéma) (upraveno podle Peterkova *et al.*, 2014).

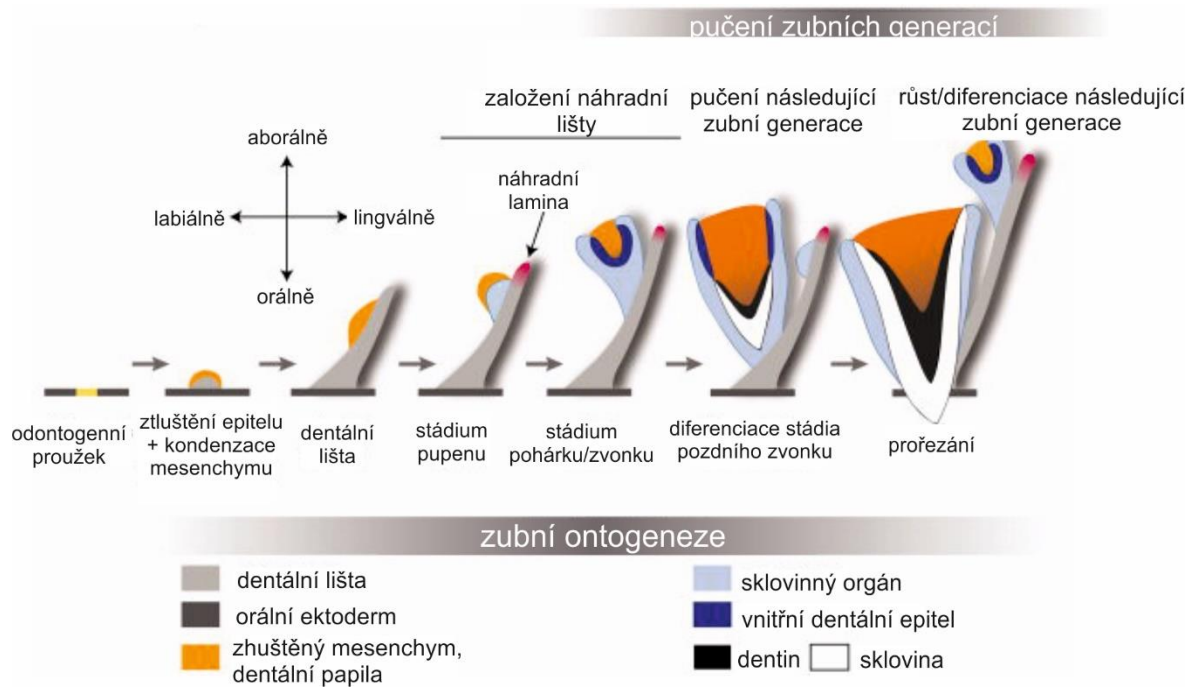
Následná data ukazují, že vývoj zubního zárodku je buko-lingválně asymetrický, což bylo ukázáno již dříve (Cam *et al.*, 2002). Lingvální CL se zanořuje do mesenchymu mnohem progresivněji. Buňky z apexu této CL se od ED14,5 dostávají během vývoje až do středně vyvíjejícího se pohárku/zvonku zubního zárodku, zatímco buňky v bukální CL setrvávají v apikální části CL. Obdobně se chovají buňky v CL myšičího řezáku (Obrázek 48) (Harada *et al.*, 1999). V oblasti lingvální CL myšičího moláru byla na ED15,5 prokázána také zvýšená buněčná proliferace (Obara and Lesot, 2007). Navrhujeme, že migrace buněk v lingvální CL by mohla být spojena s vznikem vyboulení (šbulge) na lingvální straně

vnitřního dentálního epitelu sklovinného orgánu na ED15,5. Toto vyboulení reprezentuje vznik lingválního sEK (Obara and Lesot, 2007).



Obrázek 48: Sledování osudu epitelálních buněk cervikální kličky myšeho zaku. DiI byla aplikována do centra labiální CL a explantát byl kultivován 5 dní. (a) Explantát byl dokumentován v procházejícím světle a (b) pod UV světle. Označené buňky se rozšířily od místa injekce (červená šipka) směrem z CL. Měřítko je 250 μm . (převzato z Harada *et al.*, 1999).

U monophyodontních myší se tvoří pouze jedna generace zubů, zatímco u polyphyodontních plaz se neustále vytváří nová generace jednoduchých zubů (Richman and Handrigan, 2011, Jernvall and Thesleff, 2012). Zubní vývoj u plaz je iniciován tvorbou epitelální dentální lišty, která se zanořuje do okolního mesenchymu. V případě mandibuly dochází k pučení zubního zárodku na labiální straně dentální lišty. Dentální lišta se pak prodlužuje lingválním směrem a skupina buněk na jejím volném konci o náhradní dentální lištu a proliferuje. Jak se dentální lišta prodlužuje, vytváří se na ní několik zubních generací (Obrázek 49) (Richman and Handrigan, 2011).



Obrázek 49: Schéma vývoje a výměny zubů plaz (-upinatí). *Shh* exprese v orálním epitelu označuje pozici tzv. odontogenního proužku, tedy místo, kde se bude vyvíjet zubní adá. Tyto *Shh* pozitivní proužky odpovídají zubním adám jak pozicí, tak po tem. Morfologie zubní iniciace je u plaz stejná jako u savc. Nová zubní generace pučí lingválně od proezaného zubu z útvaru známého jako náhradní dentální lišta. Jde o pokračování dentální lišty na volném konci dentálního epitelu (upraveno podle Richman and Handrigan, 2011).

Schopnost vytváření nových zubů je u rudimentárních zubních základů potlačena a primordia zanikají nebo jsou inkorporována po dosažení stádia pupenu. U zárodků funkčních vícehrbkových zubů dochází k epitelovému pučení, které naznačují cervikální kličky (Peterková et al, 2000). Na základě našich dat můžeme nalézt určité podobnosti mezi v obecném principu pučení dentálního epitelu u dvou generací jednoduchých zubů plaz a složeného moláru savců (myši). Vývojové stádia zubů se u primitivnějších plaz objevují labiálně (bukálně), zatímco lingválním směrem dorůstají nové zubní generace (Woerdeman, 1921, Edmund, 1960, Peterkova et al., 2004). Zjednodušeně lze obdobně chápat i postup následující *Shh* exprese (reprezentující v tomto smyslu postupující generace zubního vývoje) v ezákové oblasti myši dolní (Hovorakova et al., 2011) i horní (Hovorakova et al., 2013)elisti. Tomuto odpovídají i naše výsledky o předpokládaném vzniku zubních hrbků u myších molárů. V obou elistech se bukální adá hrbků zakládá dříve a jeví se tedy jako vývojové předvodní. Bukální strana zubu je stabilní oboustranně, bukální CL setrvávají v jejím apexu, pEK setrvává na svém místě a následně se

vytváří sEK. Zatímco sekundárně vzniká lingvální strana zubu o progresivní r st lingvální CL, vznik lingválního sEK. Tento mechanismus by se mohl projevat i u vícehrbolkových zubů lovka. Lin *et al.* (2007) prezentovali ve své práci histologický materiál vyvíjejících se lidských zubních primordií premolárů. Z obrazové dokumentace je patrná buko-lingvální asymetrie CL u starších vývojových stádií (Lin *et al.*, 2007).

6.5 SHRNUÍ

Zub je komplexní biologický orgán tvořený několika tkáněmi, včetně skloviny, dentinu, cementu, zubní pulpy a okolního závěsného aparátu. Poškozený zub je mnohdy značně bolestivý a spolu s chyběním jednoho či v určitém množství zubů jde o často se vyskytující problémy ve stárnoucí populaci. Současně přístupy řešení těchto defektů zahrnují fixní nebo odstranitelné protézy, autotransplantace a zubní implantáty. Takřka prozkoumání a vývoj nových strategií se dostal do popředí zájmu. Bylo navrženo několik rozdílných metod při hledání možnosti biologické zubní náhrady (Duailibi *et al.*, 2004, Ohazama *et al.*, 2004, Young *et al.*, 2005, Sartaj and Sharpe, 2006, Ferreira *et al.*, 2007, Nakao *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2008). Patří mezi ně například tvorba chimérického zubu, stimulace formace této dentice, zubní regenerace ovlivněná genovou manipulací atd. Myšlenka spojená s indukci této dentice je velmi atraktivní koncept (Sartaj and Sharpe, 2006, Takahashi *et al.*, 2008, Yu *et al.*, 2008). Tento přístup je obecně prezentován jako možný, pokud jsou přidány molekuly indukující *de novo* zubní iniciaci.

Předtím je ale potřeba vyřešit samotný fyziologický vývoj zubů. Stále ještě existuje mnoho neznámých a nezodpovězených otázek na toto téma. Například otázka kmenových buněk, otázka řízení morfologie zubů atd. Jak dokumentuje i tato práce, molekulární řízení zubů je velmi složitá a propletená síť, které možná nikdy plnohodnotně neporozumíme. Ale vzhledem k tomu, že principy odontogeneze mohou představovat obecné principy organogeneze, je nutné snažit se nalézt co možná nejvíce informací o regulaci vývoje zubů.

Je známo více než 200 genů, které jsou exprimovány během zubního vývoje (<http://bite-it.helsinki.fi/>). Zároveň existuje množství mutantních myšiček, které nám poskytují náhled na mechanismy tvorby patologií zubního vývoje, například nadpočetného zubu. Mnoho etných výskytů nadpočetných zubů může mít genetický podklad v jejich etiologii a často reprezentuje tuto dentici u lovka. Kandidátní molekuly nebo geny funkční při vzniku nadpočetných zubů budou pravděpodobně zahrnuty v indukci zubního vývoje,

v tvorbě sekundární dentice nebo v řízení po tu zub . To znamená, že může být možné indukovat tvorbu zubu *de novo* represí nebo aktivací jednotlivých kandidátních genů *in situ*.

7 ZÁVĚRY

- I. Rudimentární struktury se v průběhu odontogeneze objevují jak v tvářové, tak v ezákové oblasti embryonálních elistí myši a mají svá vlastní signální centra, která exprimují *Shh* (marker odontogeneze). Úspěšné interakce mezi epitelem a mesenchymem jsou tedy spojeny s vývojem zubních rudimentů a ne s vývojem funkčních zubů. Přítomnost více signálních domén v úspěšné odontogenezi (do ED14,5) nemusí z tohoto hlediska znamenat patologický vývoj nadpočetného zubu v ezákové nebo v molárové oblasti, ale může pouze reflektovat signální centra ancestrálních rudimentárních struktur.
- a. V ezákové oblasti horní elisti jsme detekovali úspěšnou, povrchovou *Shh* expresní doménu (ED11,5-13,5), která odpovídá primordiu rudimentárního ezáku. Signální centrum budoucího funkčního ezáku se objevuje později (od ED13,5), posteriorně k první doméně.
- b. *Shh* exprese v tvářové oblasti dolní elisti myši je v zásadě kontinuální a není přerušena žádnou negativní periodou. Mění se pouze pozice expresních domén v souvislosti s vývojem rudimentárních struktur předcházejících vývoji první stoličky. Nejprve se objevuje signální centrum v MS rudimentu, které posléze krátce exprimuje *Shh* spolu se signální doménou v R2 rudimentu a pak vymizí. *Shh* signální doména R2 rudimentu následně přechodně koexistuje s úspěšnou M1 *Shh* signální doménou a poté spolu splývají na ED14,5 a 14,7 a dávají tak vznik pEK.
- c. *Shh* se exprimuje také v tvářové oblasti horní elisti a to v diastemě, v R1 a R2 zubních rudimentech a v centru vyvíjejícího se zárodku funkčního prvního moláru. Také v horní tvářové oblasti dochází k ústímu propojení *Shh* exprimujících buněk předního R2 rudimentu a úspěšného M1. Inkorporace R2 do M1 v horní elisti však nedosahuje stejného stupně jako v dolní elisti.

- II. Zubní rudimenty jsou zahrnuty ve vývoji funkční dentice, například ve smyslu inkorporace do primordia funkčního zubu nebo indukce následujícího zubního základu, který v tomto případě představuje následující zubní generaci. Navíc jsou pravděpodobně schopny si zachovávat svůj odontogenní potenciál, při jehož reaktivaci dochází ke vzniku patologií (nadpočetný zub). Tento odontogenní potenciál mohou i předávat, například do struktury, ze které vzniká přední ústní (*vestibulum oris*).
- a. Buněčné linie centra předního R2 rudimentu a asného M1 splývají za vzniku primárního sklovinného uzlu (pEK) v oblasti budoucího funkčního M1. pEK prvního mandibulárního moláru myšského embrya, v obecně akceptovaném významu (signální centrum funkčního zubu), vzniká teprve po fúzi předních signálních domén (ED14,5 a 14,7) v R2 rudimentu a asném M1 primordiu.
 - b. Vývoj vícehrbolkového zubu myši je buko-lingválně asymetrický. Bukální strana myšského moláru je stálejší a jeví se jako vývojově přednější. Po vzniku pEKu, ze kterého se stává sEK na bukální straně zubu, se posléze objevuje sEK na lingvální straně (lingválně od předního pEKu). Díky R2 rudimentu se tedy podílí na vzniku prvního bukálního hrbolku. Lingvální strana zubu se jeví jako vývojově mladší a progresivnější.
 - c. Vývoj v horní ezákové oblasti myšských embryí ukázal, že buky exprimující *Shh* v asné anteriorní expresní doméně přispívají k tvorbě vestibulární laminy a lze říci, že ezáky a vnitřní vrstva vestibulárního epitelu má společný předek. Rudimentární generace *Shh* exprimujících buněk navíc pravděpodobně hraje roli v iniciaci následující generace zubů, jífl reprezentuje funkční ezák. Společný předek ezáků a základu *vestibulum oris* může vysvětlit vznik dentálních patologií v nedentální oblasti zevně od ezáku ulovka, jako jsou periferní odontomy.
- III. Při narušení regulace zubního vývoje může díky odontogennímu potenciálu rudimentárních zubních primordií dojít ke vzniku patologií, zejména

nadpo etných zub . Při nespojení p vodních signálních domén R2 a M1 dochází k vývoji nadpo etného zubního primordia, které vzniká z R2 rudimentu anteriorn k zárodku M1.

- a. *Sprouty2* a *Sprouty4* mají vliv na *Shh* signalizaci v ase i prostoru b hem zubního vývoje. Snížením jejich dávky dochází k opořdné tvorb pEKu. Ztráta funkce *Sprouty2* má mnohem větší dopad na zubní vývoj.
- b. Ztráta funkce *Sprouty* gen má vliv na fúzi *Shh* signálních domén R2 a asné M1. Toto nesplynutí ústí v perzistenci a autonomní vývoj R2 rudimentu, což má za následek vývoj nadpo etného zubního základu anteriorn k M1.

8 SEZNAM PUBLIKACÍ A POPIS PARTICIPACE AUTORKY

I. **Sequential *Shh* expression in the development of the mouse upper functional incisor.**

Hovorakova M, Smrckova L, Lesot H, **Lochovska K**, Peterka M, Peterkova R. J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2013. 320(7):455-64. doi: 10.1002/jez.b.22522.

Journal of Experimental Zoology: Part B Molecular and Developmental Evolution

IF: 2.083

P ísp vek autorky k publikaci: Sb r materiálu GFP pozitivních vzork , jejich dokumentace a analýza, korekce textu publikace.

II. **Sprouty gene dosage influences temporal-spatial dynamics of primary enamel knot formation.**

Lochovska K, Peterkova R, Pavlikova Z, Hovorakova M. BMC Dev Biol. 2015. 22:15-21. doi: 10.1186/s12861-015-0070-0.

BMC Developmental Biology

IF: 2.096

P ísp vek autorky k publikaci: Odpov dná autorka, design studie, sb r materiálu disociovaných epitel , dokumentace - fluorescen ní mikroskopie, sb r materiálu X-galových elistí a jejich dokumentace, analýza dat, interpretace výsledk , psaní textu publikace, tvorba obrazové dokumentace.

III. One odontogenic cell-population contributes to the development of the mouse incisors and of the oral vestibule.

Hovorakova M, **Lochovska K**, Zahradnicek O, Domonkosova Tibenska K, Dornhoferova M, Horakova-Smrckova L, Bodorikova S. PLoS One. 2016. 11(9):e0162523. doi: 10.1371/journal.pone.0162523.

PLoS One

IF: 3.057

Příspěvek autorky k publikaci: Sbírka Cre-loxP materiálu, jeho dokumentace, editace textu publikace, příprava části obrazové dokumentace.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

9.1 INTERNETOVÉ ZDROJE

The Jackson Laboratory

<http://cre.jax.org/introduction.html>

ThermoFisher Scientific

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?ICID=svtool&UID=282lip>

Gene expression in tooth - Tooth and Craniofacial Development Group of the Developmental Biology Programme, Institute of Biotechnology, University of Helsinki

<http://bite-it.helsinki.fi/>

9.2 LITERÁRNÍ ZDROJE

- Aberg, T., Wang, X.P., Kim, J.H., Yamashiro, T., Bei, M., Rice, R., Ryoo, H.M. & Thesleff, I., 2004. Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. *Developmental Biology*, 270, 76-93.
- Adloff, P., 1909. Überreste einer prälaetealen Zahnreihe beim Menschen. *Deut. Monatschr. Zahnheilk.*, 11, 828-832.
- Ahn, Y., Sanderson, B.W., Klein, O.D. & Krumlauf, R., 2010. Inhibition of Wnt signaling by Wise (Sostdc1) and negative feedback from Shh controls tooth number and patterning. *Development*, 137, 3221-3231.
- Ahrens, K., 1913. Die Entwicklung der menschlichen Zahne. *Arb Anat Inst Wiesbaden*, 48, 169-266.
- Ahtiainen, L., Uski, I., Thesleff, I. & Mikkola, M., 2016. Early epithelial signaling center governs tooth budding morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 214, 753-767.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P., 1998. *Základy bun ěné biologie: Úvod do molekulární biologie bu ky* Ústí nad Labem. : Espresso Publishing, Ústí nad Labem.
- Alfaqueh, S.A. & Tucker, A.S., 2013. The Slice Culture Method for Following Development of Tooth Germs In Explant Culture. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, 6.
- Altaba, A.R., Sanchez, P. & Dahmane, N., 2002. Gli and hedgehog in cancer: Tumours, embryos and stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 2, 361-372.
- Anthonappa, R.P., King, N.M. & Rabie, A.B.M., 2013. Prevalence of Supernumerary Teeth Based on Panoramic Radiographs Revisited. *Pediatric Dentistry*, 35, 257-261.
- Batra, P., Duggal, R. & Parkash, H., 2005. Non-syndromic multiple supernumerary teeth transmitted as an autosomal dominant trait. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 34, 621-625.
- Beachy, P.A., Karhadkar, S.S. & Berman, D.M., 2004. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, 432, 324-331.
- Bernardes, V.D.F., De Miranda Cota, L.O., Costa, F.D.O., Mesquita, R.A., Gomez, R.S. & Ferreira De Aguiar, M.C., 2008. Gingival peripheral odontoma in a child: Case report of an uncommon lesion. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 7, 1624-1626.

- Bitgood, M.J. & McMahon, A.P., 1995. Hedgehog and BMP genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Developmental Biology*, 172, 126-138.
- Blackburn, J., Kawasaki, K., Porntaveetus, T., Kawasaki, M., Otsuka-Tanaka, Y., Miake, Y., Ota, M.S., Watanabe, M., Hishinuma, M., Nomoto, T., Oommen, S., Ghafoor, S., Harada, F., Nozawa-Inoue, K., Maeda, T., Peterkova, R., Lesot, H., Inoue, J., Akiyama, T., Schmidt-Ullrich, R., Liu, B., Hu, Y., Page, A., Ramirez, A., Sharpe, P.T. & Ohazama, A., 2015. Excess NF-kappa B Induces Ectopic Odontogenesis in Embryonic Incisor Epithelium. *Journal of Dental Research*, 94, 121-128.
- Bolk, L., 1921. Odontological Essays. First Essay - On the development of the palate and alveolar ridge in man. *Journal of Anatomy*, 55, 138-152.
- Bolk, L., 1922. Odontological Essays. Fourth Essay - On the relation between reptilian and mammalian teeth. *Journal of Anatomy*, 56, 107-136.
- Bolk, L., 1924. Die öNebenleisteö der Säugetiere und die öZahndrüsenleisteö der Reptilien. *Deut Monatschr Zahnheilk*, 7, 129-137.
- Boran, T., Peterkova, R., Lesot, H., Lyons, D.B., Peterka, M. & Klein, O.D., 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.
- Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L. & Basler, K., 1997. pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in Drosophila. *Nature*, 385, 829-833.
- Buchtova, M., Handrigan, G.R., Tucker, A.S., Lozanoff, S., Town, L., Fu, K., Diewert, V.M., Wicking, C. & Richman, J.M., 2008. Initiation and patterning of the snake dentition are dependent on Sonic Hedgehog signaling. *Developmental Biology*, 319, 132-145.
- Buchtova, M., Stembirek, J., Glocova, K., Matalova, E. & Tucker, A.S., 2012. Early Regression of the Dental Lamina Underlies the Development of Diphyodont Dentitions. *Journal of Dental Research*, 91, 491-498.
- Budi, E.H., Xu, J. & Derynck, R., 2016. Regulation of TGF-beta Receptors. In X.H. Feng, P. Xu & X. Lin (eds.) *Tgf-Beta Signaling: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press Inc, 1-33.
- Burgess, W.H. & Maciag, T., 1989. The Heparin-Binding (Fibroblast) Growth-Factor Family of Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 58, 575-606.
- Butler, P.M., 1956. The ontogeny of molar pattern. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 31, 30-70.
- Cam, Y., Fausser, J.L., Vonesch, J.L., Peterkova, R., Peterka, M., Halaskova, M. & Lesot, H., 2002. Asymmetrical morphogenesis and medio-lateral positioning of molars during mouse development. *European Journal of Oral Sciences*, 110, 35-43.
- Carter, E.P., Fearon, A.E. & Grose, R.P., 2015. Careless talk costs lives: fibroblast growth factor receptor signalling and the consequences of pathway malfunction. *Trends in Cell Biology*, 25, 221-233.
- Chai, Y., Jiang, X.B., Ito, Y., Bringas, P., Han, J., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P. & Sucov, H.M., 2000. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127, 1671-1679.
- Chambers, D. & Mason, I., 2000. Expression of sprouty2 during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling. *Mechanisms of Development*, 91, 361-364.

- Chang, H., Brown, C.W. & Matzuk, M.M., 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocrine Reviews*, 23, 787-823.
- Charles, C., Hovorakova, M., Ahn, Y., Lyons, D.B., Marangoni, P., Churava, S., Biehs, B., Jheon, A., Lesot, H., Balooch, G., Krumlauf, R., Viriot, L., Peterkova, R. & Klein, O.D., 2011. Regulation of tooth number by fine-tuning levels of receptor-tyrosine kinase signaling. *Development*, 138, 4063-4073.
- Charles, C., Lazzari, V., Tafforeau, P., Schimmang, T., Tekin, M., Klein, O. & Viriot, L., 2009. Modulation of Fgf3 dosage in mouse and men mirrors evolution of mammalian dentition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 22364-22368.
- Chiang, C., Ying, L.T.T., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H. & Beachy, P.A., 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, 383, 407-413.
- Cho, S.W., Lee, H.A., Cai, J.L., Lee, M.J., Kim, J.Y., Ohshima, H. & Jung, H.S., 2007. The primary enamel knot determines the position of the first buccal cusp in developing mice molars. *Differentiation*, 75, 441-451.
- Clevers, H., 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127, 469-480.
- Cobourne, M.T. & Sharpe, P.T., 2010. Making up the numbers: The molecular control of mammalian dental formula. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21, 314-324.
- Cohen, R., 1984. Clinical perspectives on premature tooth eruption and cyst formation in neonates. *Pediatric Dermatology*, 1, 301-306.
- Coin, R., Lesot, H., Vonesch, J.L., Haikel, Y. & Ruch, J.V., 1999. Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *International Journal of Developmental Biology*, 43, 261-267.
- Coin, R., Schmitt, R., Lesot, H., Vonesch, J.L. & Ruch, J.V., 2000. Regeneration of halved embryonic lower first mouse molars: correlation with the distribution pattern of non dividing IDE cells, the putative organizers of morphogenetic units, the cusps. *International Journal of Developmental Biology*, 44, 289-295.
- Darwin, C., 1859. *On the origins of species by means of natural selection*.
- Dassule, H.R., Lewis, P., Bei, M., Maas, R. & McMahon, A.P., 2000. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development*, 127, 4775-4785.
- Dassule, H.R. & McMahon, A.P., 1998. Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Developmental Biology*, 202, 215-227.
- De Maximy, A.A., Nakatake, Y., Moncada, S., Itoh, N., Thiery, J.P. & Bellusci, S., 1999. Cloning and expression pattern of a mouse homologue of Drosophila sprouty in the mouse embryo. *Mechanisms of Development*, 81, 213-216.
- Degirolamo, C., Sabba, C. & Moschetta, A., 2016. Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15, 51-69.
- Derynck, R. & Feng, X.H., 1997. TGF-beta receptor signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1333, F105-F150.
- Diaz, A., Orozco, J. & Fonseca, M., 2009. Multiple hyperodontia: Report of a case with 17 supernumerary teeth with non syndromic association. *Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, 14, E229-E231.

- Diep, L., Matalova, E., Mitsiadis, T.A. & Tucker, A.S., 2009. Contribution of the Tooth Bud Mesenchyme to Alveolar Bone. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution*, 312B, 510-517.
- Dosedelova, H., Dumkova, J., Lesot, H., Glocova, K., Kunova, M., Tucker, A.S., Vesela, I., Krejci, P., Tichy, F., Hampl, A. & Buchtova, M., 2015. Fate of the molar dental lamina in the monophyodont mouse. *PLoS One*, 10, e0127543.
- Duailibi, M.T., Duailibi, S.E., Young, C.S., Bartlett, J.D., Vacanti, J.P. & Yelick, P.C., 2004. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *Journal of Dental Research*, 83, 523-528.
- Edmund, A., 1960. Tooth replacement phenomena in the lower vertebrates. *Contrib Life Sci Div R Ont Mus*, 52, 52-190.
- Ellis, P., Fagan, B.M., Magness, S.T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M. & Pevny, L., 2004. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Developmental Neuroscience*, 26, 148-165.
- Evans, A.R., Wilson, G.P., Fortelius, M. & Jernvall, J., 2007. High-level similarity of dentitions in carnivorans and rodents. *Nature*, 445, 78-81.
- Fathke, C., Wilson, L., Shah, K., Kim, B., Hocking, A., Moon, R. & Isik, F., 2006. Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. *Bmc Cell Biology*, 7, 9.
- Ferguson, C.A., Tucker, A.S., Christensen, L., Lau, A.L., Matzuk, M.M. & Sharpe, P.T., 1998. Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. *Genes & Development*, 12, 2636-2649.
- Ferguson, C.A., Tucker, A.S., Heikinheimo, K., Nomura, M., Oh, P., Li, E. & Sharpe, P.T., 2001. The role of effectors of the activin signalling pathway, activin receptors IIA and IIB, and Smad2, in patterning of tooth development. *Development*, 128, 4605-4613.
- Ferreira, C.F., Magini, R.S. & Sharpe, P.T., 2007. Biological tooth replacement and repair. *Journal of Oral Rehabilitation*, 34, 933-939.
- Ferres-Padro, E., Prats-Armengol, J. & Ferres-Amat, E., 2009. A descriptive study of 113 unerupted supernumerary teeth in 79 pediatric patients in Barcelona. *Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, 14, E146-E152.
- Fitzgerald, L., 1973. Deciduous incisor teeth of mouse (*Mus musculus*). *Archives of Oral Biology*, 18, 381-389.
- Fraser, G.J., Berkovitz, B.K., Graham, A. & Smith, M.M., 2006. Gene deployment for tooth replacement in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a developmental model for evolution of the osteichthyan dentition. *Evolution & Development*, 8, 446-457.
- Fukumoto, S., Kiba, T., Hall, B., Iehara, N., Nakamura, T., Longenecker, G., Krebsbach, P.H., Nanci, A., Kulkarni, A.B. & Yamada, Y., 2004. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *Journal of Cell Biology*, 167, 973-983.
- Gagneten, S., Le, Y.Z., Miller, J. & Sauer, B., 1997. Brief expression of a GFPcre fusion gene in embryonic stem cells allows rapid retrieval of site-specific genomic deletions. *Nucleic Acids Research*, 25, 3326-3331.
- Garvey, M., Barry, H. & Blake, M., 1999. Supernumerary teeth--an overview of classification, diagnosis and management. *Journal Canadian Dental Association*, 65, 612-616.

- Gilbert, S., 2003. *Developmental biology*, 7th edition ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., Publisher.
- Giunta, J.L. & Kaplan, M.A., 1990. Peripheral, soft-tissue odontomas. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 69, 406-411.
- Glick, A.B., Kulkarni, A.B., Tennenbaum, T., Hennings, H., Flanders, K.C., Oreilly, M., Sporn, M.B., Karlsson, S. & Yuspa, S.H., 1993. Loss of expression of transforming growth-factor-beta in skin and skin tumors is associated with hyperproliferation and a high-risk for malignant conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 6076-6080.
- Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Milenkovic, L., McMahon, J.A. & Scott, M.P., 1996. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: Induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes & Development*, 10, 301-312.
- Gordon, M.D. & Nusse, R., 2006. Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 22429-22433.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G. & Shi, S., 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13625-13630.
- Guo, Y.P. & Kyprianou, N., 1999. Restoration of transforming growth factor beta signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. *Cancer Research*, 59, 1366-1371.
- Haara, O., Harjunmaa, E., Lindfors, P.H., Huh, S.H., Fliniaux, I., Aberg, T., Jernvall, J., Ornitz, D.M., Mikkola, M.L. & Thesleff, I., 2012. Ectodysplasin regulates activator-inhibitor balance in murine tooth development through Fgf20 signaling. *Development*, 139, 3189-3199.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y. & Krasnow, M.A., 1998. sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. *Cell*, 92, 253-263.
- Hall, B., 2003. Descent with modification: the unity underlying homology and homoplasy as seen through an analysis of development and evolution. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 78(3), 409-433.
- Hall, B.K., 1984. Developmental mechanisms underlying the formation of atavisms. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 59, 89-124.
- Hanemann, J.A.C., Oliveira, D.T., Garcia, N.G., Santos, M.R.G. & Pereira, A.A.C., 2013. Peripheral compound odontoma erupting in the gingiva. *Head & Face Medicine*, 9, 4.
- Harada, H., Kettunen, P., Jung, H.S., Mustonen, T., Wang, Y.A. & Thesleff, I., 1999. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with notch and FGF signaling. *Journal of Cell Biology*, 147, 105-120.
- Harada, H., Toyono, T., Toyoshima, K., Yamasaki, M., Itoh, N., Kato, S., Sekine, K. & Ohuchi, H., 2002. FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development*, 129, 1533-1541.
- Hardcastle, Z., Mo, R., Hui, C.C. & Sharpe, P.T., 1998. The Shh signalling pathway in tooth development: Defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development*, 125, 2803-2811.
- Harfe, B.D., Scherz, P.J., Nissim, S., Tian, F., McMahon, A.P. & Tabin, C.J., 2004. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell*, 118, 517-528.

- Hattab, F.N., Yassin, O.M. & Sasa, I.S., 1998. Oral manifestations of Ellis-van Creveld syndrome: report of two siblings with unusual dental anomalies. *The Journal of clinical pediatric dentistry*, 22, 159-65.
- Hayashi, S. & McMahon, A.P., 2002. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental Biology*, 244, 305-318.
- Heldin, C.H., Miyazono, K. & Tendijke, P., 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390, 465-471.
- Hongo, I., Kengaku, M. & Okamoto, H., 1999. FGF signaling and the anterior neural induction in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 216, 561-581.
- Honig, M.G. & Hume, R.I., 1986. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *Journal of Cell Biology*, 103, 171-187.
- Honig, M.G. & Hume, R.I., 1989. DiI and DiO - Versatile fluorescent dyes for neuronal labeling and pathway tracing. *Trends in Neurosciences*, 12, 333-&.
- 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., Lesot, H., Vonesch, J.L., Peterka, M. & Peterkova, R., 2007. Early development of the lower deciduous dentition and oral vestibule in human embryos. *European Journal of Oral Sciences*, 115, 280-287.
- Hovorakova, M., Lochovska, K., Zahradnicek, O., Tibenska, K.D., Dornhoferova, M., Horakova-Smrckova, L. & Bodorikova, S., 2016. One Odontogenic Cell-Population Contributes to the Development of the Mouse Incisors and of the Oral Vestibule. *Plos One*, 11, 16.
- 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.
- Hovorakova, M., Smrckova, L., Lesot, H., Lochovska, K., Peterka, M. & Peterkova, R., 2013. Sequential Shh Expression in the Development of the Mouse Upper Functional Incisor. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution*, 320, 455-464.
- Hunter, J.P. & Jernvall, J., 1995. The hypocone as a key innovation in mammalian evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 10718-10722.
- Huyseune, A. & Sire, J.Y., 1998. Evolution of patterns and processes in teeth and tooth-related tissues in nonmammalian vertebrates. *European Journal of Oral Sciences*, 106, 437-481.
- Huyseune, A. & Thesleff, I., 2004. Continuous tooth replacement: the possible involvement of epithelial stem cells. *Bioessays*, 26, 665-671.
- Hyun, H.K., Lee, S.J., Ahn, B.D., Lee, Z.H., Heo, M.S., Seo, B.M. & Kim, J.W., 2008. Nonsyndromic multiple mandibular supernumerary premolars. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66, 1366-1369.

- Ide, F., Mishima, K., Saito, I. & Kusama, K., 2008. Rare peripheral odontogenic tumors: report of 5 cases and comprehensive review of the literature. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*, 106, E14-E20.
- Ide, F., Shimoyama, T. & Horie, N., 2000. Gingival peripheral odontoma in an adult: Case report. *Journal of Periodontology*, 71, 830-832.
- Impagnatiello, M.A., Weitzer, S., Gannon, G., Compagni, A., Cotten, M. & Christofori, G., 2001. Mammalian sprouty-1 and-2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *Journal of Cell Biology*, 152, 1087-1098.
- Inchingolo, F., Tatullo, M., Abenavoli, F.M., Marrelli, M., Inchingolo, A.D., Gentile, M., Inchingolo, A.M. & Dipalma, G., 2010. Non-syndromic multiple supernumerary teeth in a family unit with a normal karyotype: case report. *International Journal of Medical Sciences*, 7, 378-384.
- Ingham, P.W. & McMahon, A.P., 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*, 15, 3059-3087.
- 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.
- Itoh, N. & Ornitz, D.M., 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics*, 20, 563-569.
- Jarvinen, E., Tummers, M. & Thesleff, I., 2009. The Role of the Dental Lamina in Mammalian Tooth Replacement. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution*, 312B, 281-291.
- 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., Keranen, S.V.E. & Thesleff, I., 2000. Evolutionary modification of development in mammalian teeth: Quantifying gene expression patterns and topography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 14444-14448.
- Jernvall, J., Kettunen, P., Karavanova, I., Martin, L.B. & Thesleff, I., 1994. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation - nondividing cells express growth-stimulating FGF-4 gene. *International Journal of Developmental Biology*, 38, 463-469.
- Jernvall, J. & Thesleff, I., 2000. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mechanisms of Development*, 92, 19-29.
- Jernvall, J. & Thesleff, I., 2012. Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development*, 139, 3487-3497.
- Johnson, D.E., Lee, P.L., Lu, J. & Williams, L.T., 1990. Diverse forms of a receptor for acidic and basic Fibroblast growth-factors. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 4728-4736.
- Jussila, M. & Thesleff, I., 2012. Signaling Networks Regulating Tooth Organogenesis and Regeneration, and the Specification of Dental Mesenchymal and Epithelial Cell Lineages. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, 13.
- Juuri, E., Isaksson, S., Jussila, M., Heikinheimo, K. & Thesleff, I., 2013. Expression of the stem cell marker, SOX2, in ameloblastoma and dental epithelium. *European Journal of Oral Sciences*, 121, 509-516.

- Juuri, E., Saito, K., Ahtiainen, L., Seidel, K., Tummers, M., Hochedlinger, K., Klein, O.D., Thesleff, I. & Michon, F., 2012. Sox2+ Stem Cells Contribute to All Epithelial Lineages of the Tooth via Sfrp5+ Progenitors. *Developmental Cell*, 23, 317-328.
- Kassai, Y., Munne, P., Hotta, Y.H., 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.
- 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, J.L., Ruch, J.V., 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.
- Kim, H.J. & Bar-Sagi, D., 2004. Modulation of signalling by sprouty: A developing story. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 441-450.
- Kingsley, D.M., 1994. The TGF-BETA superfamily - new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development*, 8, 133-146.
- Kist, R., Watson, M., Wang, X.M., Cairns, P., Miles, C., Reid, D.J. & 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, O., Kangas, A., Jernvall, J., Peterkova, R., Peterka, M., Martin, G. & Herve, L., 2005. Loss of Sprouty2 leads to development of supernumerary teeth by modulating FGF signaling. *Mechanisms of Development*, 122, S75-S75.
- Klein, O., Oberoi, S., Huysseune, A., Hovorakova, M., Peterka, M. & Peterkova, R., 2013. Developmental disorders of the dentition: an update. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics.*, 163C, 318-332.
- Klein, O.D., Lyons, D.B., Balooch, G., Marshall, G.W., Basson, M.A., Peterka, M., Boran, T., Peterkova, R. & Martin, G.R., 2008. An FGF signaling loop sustains the generation of differentiated progeny from stem cells in mouse incisors. *Development*, 135, 377-385.
- Klein, O.D., Minowada, G., Peterkova, R., Kangas, A., Yu, B.D., Lesot, H., Peterka, M., Jernvall, J. & Martin, G.R., 2006. Sprouty genes control diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling. *Developmental Cell*, 11, 181-190.
- Koga, C., Adati, N., Nakata, K., Mikoshiba, K., Furuhata, Y., Sato, S., Tei, H., Sakaki, Y., Kurokawa, T., Shiokawa, K. & Yokoyama, K.K., 1999. Characterization of a novel member of the FGF family, XFGF-20, in *Xenopus laevis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261, 756-765.
- Kohn, A.D. & Moon, R.T., 2005. Wnt and calcium signaling: beta-Catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 38, 439-446.
- Komiya, Y. & Habas, R., 2008. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4, 68-75.
- Koussoulakou, D.S., Margaritis, L.H. & Koussoulakos, S.L., 2009. A Curriculum Vitae of Teeth: Evolution, Generation, Regeneration. *International Journal of Biological Sciences*, 5, 226-243.

- Koyama, E., Yamaai, T., Iseki, S., Ohuchi, H., Nohno, T., Yoshioka, H., Hayashi, Y., Leatherman, J.L., Golden, E.B., Noji, S. & Pacifici, M., 1996. Polarizing activity, Sonic hedgehog, and tooth development in embryonic and postnatal mouse. *Developmental Dynamics*, 206, 59-72.
- Kratochwil, K., Galceran, J., Tontsch, S., Roth, W. & Grosschedl, R., 2002. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in *Lef1(-/-)* mice. *Genes & Development*, 16, 3173-3185.
- Kükenthal, W., 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, O.D. & 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*, 320B, 307-320.
- Lan, Y., Jia, S.H. & Jiang, R.L., 2014. Molecular patterning of the mammalian dentition. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 25, 61-70.
- Lao, D.H., Yusoff, P., Chandramouli, S., Philp, R.J., Fong, C.W., Jackson, R.A., Saw, T.Y., Yu, C.Y. & Guy, G.R., 2007. Direct binding of PP2A to Sprouty2 and phosphorylation changes are a prerequisite for ERK inhibition downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 9117-9126.
- Leche, W., 1893. Studien über die Entwicklung des Zahnsystems bei den Säugetieren. *MorphJb*, 19, 502-574.
- Ledesma-Montes, C., Perez-Bache, A. & Garces-Ortiz, M., 1996. Gingival compound odontoma. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 25, 296-297.
- Lee, B., Thirunavukkarasu, K., Zhou, L., Pastore, L., Baldini, A., Hecht, J., Geoffroy, V., Ducy, P. & Karsenty, G., 1997. Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nature Genetics*, 16, 307-310.
- Lee, P.L., Johnson, D.E., Cousens, L.S., Fried, V.A. & Williams, L.T., 1989. Purification and complementary-DNA cloning of a receptor for basic Fibroblast Growth-Factor. *Science*, 245, 57-60.
- Lesot, H., Peterkova, R., Viriot, L., Vonesch, J.L., Tureckova, J., Peterka, M. & Ruch, J.V., 1998. Early stages of tooth morphogenesis in mouse analyzed by 3D reconstructions. *European Journal of Oral Sciences*, 106, 64-70.
- Lesot, H., Vonesch, J.L., Peterka, M., Tureckova, J., Peterkova, R. & Ruch, J.V., 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.
- Lewandowski, J., Kolanowski, T. & Kurpisz, M., 2016. Techniques for the induction of human pluripotent stem cell differentiation towards cardiomyocytes. *J Tissue Eng Regen Med*, 1616.
- Li, J., Chatzeli, L., Panousopoulou, E., Tucker, A.S. & Green, J.B.A., 2016. Epithelial stratification and placode invagination are separable functions in early morphogenesis of the molar tooth. *Development*, 143, 670-681.
- Lin, D.H., Huang, Y.D., He, F.L., Gu, S.P., Zhang, G.Z., Chen, Y.P. & Zhang, Y.D., 2007. Expression survey of genes critical for tooth development in the human embryonic tooth germ. *Developmental Dynamics*, 236, 1307-1312.
- Liu, D.G., Zhang, W.L., Zhang, Z.Y., Wu, Y.T. & Ma, X.C., 2007. Three-dimensional evaluations of supernumerary teeth using cone-beam computed tomography for 487

- cases. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*, 103, 403-411.
- Liu, J.F., 1995. Characteristics of premaxillary supernumerary teeth - a survey of 112 cases. *Journal of Dentistry for Children*, 62, 262-265.
- Lochovska, K., 2012. Vznik lidských zubních anomálií na modelu odontogeneze u myší s poruchami gen . Universita Karlova v Praze.
- Lochovska, K., Peterkova, R., Pavlikova, Z. & Hovorakova, M., 2015. Sprouty gene dosage influences temporal-spatial dynamics of primary enamel knot formation. *Bmc Developmental Biology*, 15.
- Lowry, W.E., Blanpain, C., Nowak, J.A., Guasch, G., Lewis, L. & Fuchs, E., 2005. Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes & Development*, 19, 1596-1611.
- Lubinsky, M.K. & Kantaputra Nik, P., 2016. Syndromes with supernumerary teeth. *American Journal of Medical Genetics*, 170, 2611-2616.
- Lumsden, A.G.S., 1988. Spatial-organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development*, 103, 155-169.
- Luo, Z.X., 2007. Transformation and diversification in early mammal evolution. *Nature*, 450, 1011-1019.
- Luukko, K., Loes, S., Furmanek, T., Fjeld, K., Kvinnsland, I.H. & Kettunen, P., 2003. Identification of a novel putative signaling center, the tertiary enamel knot in the postnatal mouse molar tooth. *Mechanisms of Development*, 120, 270-276.
- Mailleux, A.A., Tefft, D., Ndiaye, D., Itoh, N., Thiery, J.P., Warburton, D. & Bellusci, S., 2001. Evidence that SPROUTY2 functions as an inhibitor of mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Mechanisms of Development*, 102, 81-94.
- Marigo, V., Roberts, D.J., Lee, S.M.K., Tsukurov, O., Levi, T., Gastier, J.M., Epstein, D.J., Gibert, D.J., Copeland, N.G., Seidman, C.E., Jenkins, N.A., Seidman, J.G., McMahon, A.P. & Tabin, C., 1995. Cloning, Expression, and Chromosomal Location of SHH and IHH - 2 Human Homologs of the Drosophila Segment Polarity Gene Hedgehog. *Genomics*, 28, 44-51.
- Masckauchan, T.H.N. & Kitajewski, J., 2006. Wnt/Frizzled signaling in the vasculature: New angiogenic factors in sight. *Physiology*, 21, 181-188.
- Massague, J. & Wotton, D., 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo Journal*, 19, 1745-1754.
- Matalova, E., Antonarakis, G.S., Sharpe, P.T. & Tucker, A.S., 2005. Cell lineage of primary and secondary enamel knots. *Developmental Dynamics*, 233, 754-759.
- Mccubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M. & Franklin, R.A., 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1773, 1263-1284.
- McMahon, A.P., 2000. More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell*, 100, 185-188.
- McMahon, A.P., Ingham, P.W. & Tabin, C.J., 2003. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol 53, 53, 1-114.
- Mikkola, M.L., 2009. Controlling the Number of Tooth Rows. *Science Signaling*, 2, 4.

- Mina, M. & Kollar, E.J., 1987. The induction of odontogenesis in nondental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Archives of Oral Biology*, 32, 123-127.
- Minowada, G., Jarvis, L.A., Chi, C.L., Neubuser, A., Sun, X., Hacohen, N., Krasnow, M.A. & Martin, G.R., 1999. Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development*, 126, 4465-4475.
- Mitsui, S.N., Yasue, A., Masuda, K., Naruto, T., Minegishi, Y., Oyadomari, S., Noji, S., Imoto, I. & Tanaka, E., 2016. Novel human mutation and CRISPR/Cas genome-edited mice reveal the importance of C-terminal domain of MSX1 in tooth and palate development. *Scientific Reports*, 6, 8.
- Miyazono, K., Kusanagi, K. & Inoue, H., 2001. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 187, 265-276.
- Moon, R.T., 2005. Wnt/ -Catenin Pathway. *Science's STKE*, 2005, cm1.
- Moon, R.T. & Shah, K., 2002. Developmental biology - Signalling polarity. *Nature*, 417, 239-240.
- Moore, K.L. & Persaud, T., 2002. *Zrození cloveka, Embryologie s klinickým zaměřením.*, 1. eské vydání ed. Praha: ISV nakladatelství. .
- Moss-Salentijn, L., 1978. Vestigial teeth in the rabbit, rat and mouse; their relationship to the problem of lacteal dentitions. In J.K. Butler Pm (ed.) *Development, function and evolution of teeth*. London: Academic Press, 13-29.
- Motoyama, J., Takabatake, T., Takeshima, K. & Hui, C.C., 1998. Ptch2, a second mouse patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. *Nature Genetics*, 18, 104-106.
- Motyl, T., Grzelkowska, K., Zimowska, W., Skierski, J., Wareski, P., Ploszaj, T. & Trzeciak, L., 1998. Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells. *European Journal of Cell Biology*, 75, 367-374.
- Munne, P.M., Tummers, M., Jarvinen, E., Thesleff, I. & Jernvall, J., 2009. Tinkering with the inductive mesenchyme: Sostdc1 uncovers the role of dental mesenchyme in limiting tooth induction. *Development*, 136, 393-402.
- Murashima-Suginami, A., Takahashi, K., Kawabata, T., Sakata, T., Tsukamoto, H., Sugai, M., Yanagita, M., Shimizu, A., Sakurai, T., Slavkin, H.C. & Bessho, K., 2007. Rudiment incisors survive and erupt as supernumerary teeth as a result of USAG-1 abrogation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359, 549-555.
- Mustonen, T., Pispá, J., Mikkola, M.L., Pummila, M., Kangas, A.T., Pakkasjarvi, L., Jaatinen, R. & Thesleff, I., 2003. Stimulation of ectodermal organ development by ectodysplasin-A1. *Developmental Biology*, 259, 123-136.
- Nagy, A., 2000. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 26, 99-109.
- Nakao, K., Morita, R., Saji, Y., Ishida, K., Tomita, Y., Ogawa, M., Saitoh, M., Tomooka, Y. & Tsuji, T., 2007. The development of a bioengineered organ germ method. *Nature Methods*, 4, 227-230.
- Nakatomi, M., Hovorakova, M., Gritli-Linde, A., Blair, H.J., Macarthur, K., Peterka, M., Lesot, H., Peterkova, R., Ruiz-Perez, V.L., Goodship, J.A. & Peters, H., 2013. Evc Regulates a Symmetrical Response to Shh Signaling in Molar Development. *Journal of Dental Research*, 92, 222-228.
- Nery, E., Kraus, B. & Croup, M., 1970. Timing and topography of early human tooth development *Arch Oral Biol*, 15, 1315-1326.

- Neubuser, A., Peters, H., Balling, R. & Martin, G.R., 1997. Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: A mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell*, 90, 247-255.
- Nieuwenhuis, E. & Hui, C.C., 2005. Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clinical Genetics*, 67, 193-208.
- Niswander, L. & Martin, G.R., 1992. Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development*, 114, 755-768.
- Nusse, R. & Varmus, H.E., 1982. Many tumors induced by the mouse mammary-tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31, 99-109.
- Nutt, S.L., Dingwell, K.S., Holt, C.E. & Amaya, E., 2001. Xenopus Sprouty2 inhibits FGF-mediated gastrulation movements but does not affect mesoderm induction and patterning. *Genes & Development*, 15, 1152-1166.
- Nüsslein-Volhard, C., E, 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287, 7956801.
- 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, C.J., Seppala, M., Blackburn, J., Ghafoor, S., Cobourne, M., Martinelli, D.C., Fan, C.M., Peterkova, R., Lesot, H., Yoder, B.K. & Sharpe, P.T., 2009. Primary cilia regulate Shh activity in the control of molar tooth number. *Development*, 136, 897-903.
- Ohazama, A., Johnson, E.B., Ota, M.S., Choi, H.J., Porntaveetus, T., Oommen, S., Itoh, N., Eto, K., Gritli-Linde, A., Herz, J. & Sharpe, P.T., 2008. Lrp4 Modulates Extracellular Integration of Cell Signaling Pathways in Development. *Plos One*, 3, 11.
- Ohazama, A., Modino, S.A.C., Miletich, I. & Sharpe, P.T., 2004. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *Journal of Dental Research*, 83, 518-522.
- Olsen, S.K., Garbi, M., Zampieri, N., Eliseenkova, A.V., Ornitz, D.M., Goldfarb, M. & Mohammadi, M., 2003. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 34226-34236.
- Ooë, T., 1969. Epithelial anlagen of human third dentition and their migrations in the mandible and maxilla. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 46(5), 243-51.
- Orhan, A., Ozer, L. & Orhan, K., 2006. Familial occurrence of nonsyndromal multiple supernumerary teeth. A rare condition. *Angle Orthodontist*, 76, 891-897.
- Osborn, H., 1888. The evolution of mammalian molars to and from the tritubercular type. *Am Naturalist*, 22, 106761079.
- Ozaki, K., Kadomoto, R., Asato, K., Tanimura, S., Itoh, N. & Kohno, M., 2001. ERK pathway positively regulates the expression of Sprouty genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285, 1084-1088.
- Pantalacci, S., Prochazka, J., Martin, A., Rothova, M., Lambert, A., Bernard, L., Charles, C., Viriot, L., Peterkova, R. & Laudet, V., 2008. Patterning of palatal rugae through sequential addition reveals an anterior/posterior boundary in palatal development. *Bmc Developmental Biology*, 8, 17.
- 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. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, 3, 133-142.

- Peterkova, R., 1985. The common developmental origin and phylogenetic aspects of teeth, rugae palatinae, and fornix vestibuli oris in the mouse. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, 5, 89-104.
- Peterkova, R., Churava, S., Lesot, H., Rothova, M., Prochazka, J., Peterka, M. & Klein, O.D., 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., Hovorakova, M., Peterka, M. & Lesot, H., 2014. Three-dimensional analysis of the early development of the dentition. *Australian Dental Journal*, 59, 55-80.
- Peterkova, R., Lesot, H. & Peterka, M., 2004. Phylogenetic memory of developing mammalian dentition. *Integrative and Comparative Biology*, 44, 621-621.
- 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., Vonesch, J.L., Peterka, M. & Ruch, J.V., 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. *Apoptosis: from Signaling Pathways to Therapeutic Tools*, 1010, 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., 2002. Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connective Tissue Research*, 43, 120-128.
- Peterkova, R., Peterka, M., Vonesch, J.L. & Ruch, J.V., 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.
- Peters, K.G., Werner, S., Chen, G. & Williams, L.T., 1992. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development*, 114, 233-243.
- Peyer, B., 1968. *Comparative Odontology*: The University of Chicago Press.
- Pinto, D. & Clevers, H., 2005. Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biology of the Cell*, 97, 185-196.
- Pippi, R., 2014. Odontomas and Supernumerary Teeth: Is There a Common Origin? *International Journal of Medical Sciences*, 11, 1282-1297.
- Pispa, J. & Thesleff, I., 2003. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Developmental Biology*, 262, 195-205.
- Polakis, P., 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes & Development*, 14, 1837-1851.
- Poleskaya, A., Seale, P. & Rudnicki, M.A., 2003. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45(+) adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*, 113, 841-852.
- Porntaveetus, T., Otsuka-Tanaka, Y., Basson, M.A., Moon, A.M., Sharpe, P.T. & Ohazama, A., 2011. Expression of fibroblast growth factors (Fgfs) in murine tooth development. *Journal of Anatomy*, 218, 534-543.

- 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.
- Rathmanner, N., Haigl, B., Vanas, V., Doriguzzi, A., Gsur, A. & Sutterluty-Fall, H., 2013. Sprout2 but not Sprout4 is a potent inhibitor of cell proliferation and migration of osteosarcoma cells. *Febs Letters*, 587, 2597-2605.
- Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. & Weissman, I.L., 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423, 409-414.
- Richman, J.M. & Handrigan, G.R., 2011. Reptilian Tooth Development. *Genesis*, 49, 247-260.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, L.C., Smith, J.M. & Sporn, M.B., 1981. New class of Transforming Growth-Factors potentiated by Epidermal Growth-Factor - isolation from non-neoplastic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 78, 5339-5343.
- Rothova, M., Peterkova, R. & Tucker, A.S., 2012. Fate map of the dental mesenchyme: Dynamic development of the dental papilla and follicle. *Developmental Biology*, 366, 244-254.
- Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeaimallet, L., Pelet, A., Rozet, J.M., Maroteaux, P., Lemerrer, M. & Munnich, A., 1994. Mutations in the Gene Encoding Fibroblast Growth-Factor Receptor-3 in Achondroplasia. *Nature*, 371, 252-254.
- Ruiz-Perez, V.L., Blair, H.J., Rodriguez-Andres, M.E., Blanco, M.J., Wilson, A., Liu, Y.N., Miles, C., Peters, H. & Goodship, J.A., 2007. Evc is a positive mediator of Ihh-regulated bone growth that localises at the base of chondrocyte cilia. *Development*, 134, 2903-2912.
- Röse, C., 1892. Über die Zahnentwicklung der Bauteltiere. *Anat Anz*, 7, 693-707.
- Röse, C., 1895. Überreste einer vorzeitigen prä-lactealen und einer vierten Zahnreihe beim Menschen. *Österreichisch-ungarische Vierteljahrschr Zahnheilk*, 2, 45-50.
- Sarkar, L., Cobourne, M., Naylor, S., Smalley, M., Dale, T. & Sharpe, P.T., 2000. Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 4520-4524.
- Sartaj, R. & Sharpe, P., 2006. Biological tooth replacement. *Journal of Anatomy*, 209, 503-509.
- Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M. & Yoshimura, A., 2003. Mammalian Sprout4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nature Cell Biology*, 5, 427-432.
- Sasaki, A., Taketomi, T., Wakioka, T., Kato, R. & Yoshimura, A., 2001. Identification of a dominant negative mutant of sprouty that potentiates fibroblast growth factor-but not epidermal growth factor-induced ERK activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 36804-36808.
- Sauer, B. & Henderson, N., 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian-cells by the Cre recombinase of bacteriophage-P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 5166-5170.
- Scheiner, M.A. & Sampson, W.J., 1997. Supernumerary teeth: A review of the literature and four case reports. *Australian Dental Journal*, 42, 160-165.

- Schour, I., 1929. Early Human Tooth Development, with Special Reference to the Relationship Between the Dental Lamina and the Lip-Furrow Band. *Journal of Dental Research*, 9, 699-717.
- Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y. & Shi, S.T., 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364, 149-155.
- Shiang, R., Thompson, L.M., Zhu, Y.Z., Church, D.M., Fielder, T.J., Bocian, M., Winokur, S.T. & Wasmuth, J.J., 1994. Mutations in the Transmembrane Domain of FGFR3 Cause the Most Common Genetic Form of Dwarfism, Achondroplasia. *Cell*, 78, 335-342.
- Shigemura, N., Kiyoshima, T., Sakai, T., Matsuo, K., Momoi, T., Yamaza, H., Kobayashi, I., Wada, H., Akamine, A. & Sakai, H., 2001. Localization of activated caspase-3-positive and apoptotic cells in the developing tooth germ of the mouse lower first molar. *Histochemical Journal*, 33, 253-258.
- Shim, K., Minowada, G., Coling, D.E. & Martin, G.R., 2005. Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling. *Developmental Cell*, 8, 553-564.
- Silva, A.R.S., Carlos-Bregni, R., Vargas, P.A., De Almeida, O.P. & Lopes, M.A., 2009. Peripheral developing odontoma in newborn. Report of two cases and literature review. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 14, e612-e615.
- Slack, J.M.W., Darlington, B.G., Heath, J.K. & Godsave, S.F., 1987. Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by Heparin-binding Growth-Factors. *Nature*, 326, 197-200.
- Smallwood, P.M., Munozsanjuan, I., Tong, P., Macke, J.P., Hendry, S.H.C., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. & Nathans, J., 1996. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: New members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 9850-9857.
- Smith, J.D., 1969. Hyperdontia - report of case. *Journal of the American Dental Association*, 79, 1191-&.
- Smith, M.M., 2003. Vertebrate dentitions at the origin of jaws: when and how pattern evolved. *Evolution & Development*, 5, 394-413.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.-M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.-Y., Shi, S. & Wang, S., 2006. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *Plos One*, 1.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R.S., Wang, S., Shi, S. & Huang, G.T.J., 2008. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study. *Journal of Endodontics*, 34, 166-171.
- Sternberg, N. & Hamilton, D., 1981. Bacteriophage-P1 site-specific recombination. 1. recombination between loxP sites. *Journal of Molecular Biology*, 150, 467-486.
- Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Riehle, K.J., Hubbert, C., Major, M.B., Fausto, N. & Moon, R.T., 2007. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development*, 134, 479-489.
- Storey, K.G., Goriely, A., Sargent, C.M., Brown, J.M., Burns, H.D., Abud, H.M. & Heath, J.K., 1998. Early posterior neural tissue is induced by FGF in the chick embryo. *Development*, 125, 473-484.
- Streelman, J.T., Webb, J.F., Albertson, R.C. & Kocher, T.D., 2003. The cusp of evolution and development: a model of cichlid tooth shape diversity. *Evolution & Development*, 5, 600-608.

- Sun, X., Lewandoski, M., Meyers, E.N., Liu, Y.H., Maxson, R.E. & Martin, G.R., 2000. Conditional inactivation of Fgf4 reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nature Genetics*, 25, 83-86.
- Takahashi, K., Sakata, T., Murashima-Suginami, A., Tsukamoto, H., Kiso, H., Bes & Sho, K., 2008. Tooth regeneration: Potential for stimulation of the formation of a third dentition by one gene. *Current Topics in Genetics*, 3, 77-82.
- Taniguchi, K., Ayada, T., Ichiyama, K., Kohno, R., Yonemitsu, Y., Minami, Y., Kikuchi, A., Maehara, Y. & Yoshimura, A., 2007. Sprouty2 and Sprouty4 are essential for embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352, 896-902.
- Tefft, J.D., Lee, M., Smith, S., Leinwand, M., Zhao, J.S., Bringas, P., Crowe, D.L. & Warburton, D., 1999. Conserved function of mSpry-2, a murine homolog of Drosophila sprouty, which negatively modulates respiratory organogenesis. *Current Biology*, 9, 219-222.
- Tempe, D., Casas, M., Karaz, S., Blanchet-Tournier, M.F. & Concordet, J.P., 2006. Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3 beta phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCF beta TrCP. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 4316-4326.
- Ten Dijke, P.T., Goumans, M.J., Itoh, F. & Itoh, S., 2002. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 191, 1-16.
- Tencate, A.R., Mills, C. & Solomon, G., 1971. Development of periodontium - transplantation and autoradiographic study. *Anatomical Record*, 170, 365-&.
- Thesleff, I., 2003. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *Journal of Cell Science*, 116, 1647-1648.
- Thesleff, I. & Nieminen, P., 1996. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Current Opinion in Cell Biology*, 8, 844-850.
- Thesleff, I. & Sharpe, P., 1997. Signalling networks regulating dental development. *Mechanisms of Development*, 67, 111-123.
- Thisse, B. & Thisse, C., 2005. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental Biology*, 287, 390-402.
- Townsend, G., Bockmann, M., Hughes, T. & Brook, A., 2012. Genetic, environmental and epigenetic influences on variation in human tooth number, size and shape. *Odontology*, 100, 1-9.
- Trowell, O.A., 1959. The culture of mature organs in a synthetic medium. *Experimental Cell Research*, 16, 118-147.
- Tucker, A.S., Headon, D.J., Courtney, J.M., Overbeek, P. & Sharpe, P.T., 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., 2003. Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. *Development*, 130, 1049-1057.
- Tummers, M. & Thesleff, I., 2008. Observations on continuously growing roots of the sloth and the K14-Eda transgenic mice indicate that epithelial stem cells can give rise to both the ameloblast and root epithelium cell lineage creating distinct tooth patterns. *Evolution & Development*, 10, 187-195.
- 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.

- Ungar, P.S., 2010. *Mammal teeth: Origin, Evolution, and Diversity* Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- Vaahtokari, 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.
- Vaahtokari, 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.
- Van Der Kooi, C.J. & Schwander, T., 2014. On the fate of sexual traits under asexuality. *Biological Reviews*, 89, 805-819.
- Van Genderen, C., Okamura, R., Fariñas, I., Quo, R., Parslow, T., Bruhn, L. & Grosschedl, R., 1994. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-1 deficient mice. *Genes & Dev*, 8, 269162703.
- Viriot, L., Lesot, H., Vonesch, J.L., Ruch, J.V., 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. *Connect Tissue Res*, 43, 129-133.
- Viriot, L., Peterkova, R., Vonesch, J.L., Peterka, M., Ruch, J.V. & 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.
- Wada, H. & Makabe, K., 2006. Genome duplications of early vertebrates as a possible chronicle of the evolutionary history of the neural crest. *International Journal of Biological Sciences*, 2, 133-141.
- Wang, X.P., Suomalainen, M., Jorgez, C.J., Matzuk, M.M., Werner, S. & Thesleff, I., 2004. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Developmental Cell*, 7, 719-730.
- Welsh, I.C., Hagge-Greenberg, A. & O'brien, T.P., 2007. A dosage-dependent role for *Spry2* in growth and patterning during palate development. *Mechanisms of Development*, 124, 746-761.
- Westergaard, B. & Ferguson, M.W.J., 1987. Development of the dentition in Alligator-Mississippiensis. Later development in the lower jaws of embryos, hatchlings and young juveniles. *Journal of Zoology*, 212, 191-222.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R. & Nusse, R., 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423, 448-452.
- Woerdeman, M., 1921. Beitrage zur Entwicklungsgeschichte von Zähnen und Gebiss der Reptilien. Beitrage IVUeber die Anlage des Ersatzgebiss. *Arch Mikrosk Anat* 95, 265-395.
- Woodward, M., 1894. On the milk dentition of the rodentia, with a description of a vestigial milk incisor in the mouse (*Mus musculus*). *Anat Anz*, 9, 6196631.
- Yagüe-García, J., Berini-Aytés, L. & Gay-Escoda, C., 2009. Multiple supernumerary teeth not associated with complex syndromes: a retrospective study. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 14, 331-336.

- Yang, X., Webster, J.B., Kovalenko, D., Nadeau, R.J., Zubanova, O., Chen, P.Y. & Friesel, R., 2006. Sprouty genes are expressed in osteoblasts and inhibit fibroblast growth factor-mediated osteoblast responses. *Calcified Tissue International*, 78, 233-240.
- Yokohama-Tamaki, T., Ohshima, H., Fujiwara, N., Takada, Y., Ichimori, Y., Wakisaka, S., Ohuchi, H. & Harada, H., 2006. Cessation of Fgf10 signaling, resulting in a defective dental epithelial stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development*, 133, 1359-1366.
- Young, C.S., Abukawa, H., Asrican, R., Ravens, M., Troulis, M.J., Kaban, L.B., Vacanti, J.P. & Yelick, P.C., 2005. Tissue-engineered hybrid tooth and bone. *Tissue Engineering*, 11, 1599-1610.
- Yu, J.H., Shi, J.N. & Jin, Y., 2008. Current approaches and challenges in making a bio-tooth. *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 14, 307-319.
- Yun, Y., Won, J., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J., Shin, U. & Kim, H., 2010. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissuregeneration. *J Tissue Eng* 7, 218142.
- Yusof, W., 1990. Non-syndrome multiple supernumerary teeth: literature review. *Journal Canadien Dental Association*, 56, 147-149.
- Yusoff, P., Lao, D.H., Ong, S.H., Wong, E.S.M., Lim, J., Lo, T.L., Leong, H.F., Fong, C.W. & Guy, G.R., 2002. Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of raf. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 3195-3201.
- Zahradnicek, O., Horacek, I. & Tucker, A.S., 2012. Tooth development in a model reptile: functional and null generation teeth in the gecko *Paroedura picta*. *Journal of Anatomy*, 221, 195-208.
- Zhang, D.L., Gu, L.J., Liu, L., Wang, C.Y., Sun, B.S., Li, Z. & Sung, C.K., 2009. Effect of Wnt signaling pathway on wound healing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378, 149-151.
- Zhang, L., Yuan, G.H., Liu, H., Lin, H., Wan, C.Y. & Chen, Z., 2012. Expression pattern of Sox2 during mouse tooth development. *Gene Expression Patterns*, 12, 273-281.
- Zhang, Q.H., Murcia, N.S., Chittenden, L.R., Richards, W.G., Michaud, E.J., Woychik, R.P. & Yoder, B.K., 2003. Loss of the Tg737 protein results in skeletal patterning defects. *Developmental Dynamics*, 227, 78-90.
- Zhang, S.B., Lin, Y.F., Itaranta, P., Yagi, A. & Vainio, S., 2001. Expression of Sprouty genes 1, 2 and 4 during mouse organogenesis. *Mechanisms of Development*, 109, 367-370.
- Zhou, P.B., Byrne, C., Jacobs, J. & Fuchs, E., 1995. Lymphoid Enhancer Factor-1 directs hair follicle patterning and epithelial-cell fate. *Genes & Development*, 9, 700-713.