

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra Antropologie a genetiky člověka**

**Charles University, Faculty of Science
Department of Anthropology and Human Genetics**

Doktorský studijní program: Antropologie a genetiky člověka
Doctoral study programme: Anthropology and Human Genetics

Autoreferát disertační práce
Summary of the Doctoral Thesis



**Úloha rudimentárních struktur v odontogenezi
The role of rudimentary structures in odontogenesis**

Mgr. Kateřina Lochovská

Tržkolitel/Supervisor: Mgr. Mária Hovová, PhD.

Praha, 2016

Abstrakt

Zubní vzorec *lovo* a *my-i* je proti společnému předkovci redukován, přesto se u obou skupin organismů objevují jak zuby jednoduché, tak i zuby vícehrbolkové. Zároveň byly u obou nalezeny struktury označené jako rudimentární. Tyto struktury jsou během ontogenetického vývoje potlačeny a nebývá jim přisuzována zásadní funkce. Proto jsme se rozhodli prostudovat zubní rudimenty detailněji a odhalit jejich funkci.

Tato práce předkládá nové interpretace v oblasti časně zubní normogeneze, na které by měl být brán zřetel při studiu vzniku dentálních patologií. Prokázali jsme, 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 (M1). Nesplynutí R2 s časným centrem M1 má za následek vznik nadpočetného zubu anteriorně od M1 u *Sprouty2/4 my-i*. V črčkové oblasti *my-i* horní čelisti jsme dokumentovali přítomnost rudimentárních struktur s vlastními signálními centry, je-li mají funkci iniciační o spouštění vývoje primordiálních črčků. S využitím sledování buněčných linií exprimujících Sonic hedgehog jako marker odontogeneze se nám podařilo dokumentovat přítomnost descendantních buněk z odontogenních zón ve vestibulárním epitelu, což vysvětluje výskyt patologií s přítomností dentálních tkání v této oblasti, jako například periferní odontomy.

Abstract

The dental formula of both: the human and the mouse is 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). The non-fusion of centres of R2 and the early M1 results in the formation of a supernumerary tooth anteriorly to M1 in *Sprouty2/Sprouty4* mutant mice. In the incisor area of the upper jaw we have documented the presence of rudimentary structures with their own signalling centres that possess an initiating function - triggering the development of primordia of functional incisors. The lineage tracing of cells expressing *Sonic hedgehog* as a marker of odontogenesis has documented the presence of descendant cells from the odontogenic zones in the vestibular epithelium, which explains the occurrence of pathologies with the occurring of dental tissues in this area, such as peripheral odontomas.

Obsah

1.	ÚVOD	5
2.	CÍLE	6
3.	MATERIÁL A METODY	7
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	9
5.	ZÁVĚRY	13
1.	INTRODUCTION.....	17
2.	AIMS	18
3.	MATERIAL AND METHODS	19
4.	RESULTS AND DISCUSSION.....	21
5.	CONCLUSIONS.....	25
6.	POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES.....	29
	CURRICULUM VITAE	34
	SEZNAM PUBLIKACÍ/SELECTED PUBLICATION	37

1. Úvod

Rudimentární orgány jsou orgány i struktury, které ztratily v t-ínu nebo ve-kerou svou ancestrální funkci u daných druh , ale p esto p etrvaly b hem procesu evoluce (Darwin, 1859). Rudimenty jsou áste n zformované nebo nekompletní transformace vývojových znak a objevují se pouze u embryí (Hall, 2003).

Zubní rudimenty byly identifikovány jak u lov ka, tak u my-i. U lov ka se bukáln od prvního maxilárního zárodku do asného moláru (m1) p echodn objevuje p ídatný epiteliální pohárek v míst molárové vestibulární li-ty (Bolk, 1924, Hovorakova *et al.*, 2005) a na úrovni druhého do asného moláru (Adloff, 1909). V literatu e byly tyto akcesorní struktury pozorované lateráln k dentální lamin interpretovány jako vestigiální primordia rudimentární dentice p edcházející do asné dentici nebo jako poz statky zubních flázek u plaz (Röse, 1895, Adloff, 1909, Bolk, 1924, Schour, 1929).

Embryonální elisti my-i nabízejí v pr b hu svého vývoje n kolik rudimentárních zubních primordií. V maxile 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). Mandibula vykazuje pouze dva velké rudimentární pupeny MS a R2 lokalizované anteriorn k M1 primordiu (Viriot *et al.*, 2000). Dal-í výzkum ukázal, fle i v ezákové oblasti dolní elisti my-ích embryí je mofné najít zubní primordium rudimentárního ezáku (Hovorakova *et al.*, 2011).

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 elisty z asového a prostorového hlediska na modelu myšeho embryonální dentice:
 - a. v ezákové oblasti horní elisti
 - b. v tvárove oblasti dolní elisti
 - c. v tvárove oblasti horní elisti
- II. Objasnit úlohu zubních rudimentů během normogeneze.
 - a. Sledovat buněnou linii signálních center rudimentárních struktur v tvárove oblasti a determinovat jejich vztah se signálním centrem funkčního zubu o primární sklovinný uzel (pEK).
 - b. Sledovat buko-lingvální dynamiku sklovinných uzlů v rámci složeného zubu vyvíjejícího se v myšeho 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 myšeho nadpoetných zuby v tvárove oblasti.

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

3. MATERIÁL A METODY

Modelovým organismem byla v této práci myš domácí (*Mus musculus*). Všechny použité myšičky pocházejí z oddělení Vývojové biologie, ÚEM AV ČR v.v.i. Veškeré manipulace a nakládání se zvířaty splňovaly požadavky Odborné komise pro zajištění dobrých životních podmínek pokusných zvířat při ÚEM AV ČR, v.v.i. Příslušné myšičky byly vždy připraveny přes noc, při emfyzému před detekcí vaginální zátky byla uražena jako ED0,0.

Disociace dentálního epitelu a fluorescenční mikroskopie

Vypreparované zubní segmenty tvářové oblasti dolníelisti EGFP pozitivních embryí *Sprouty2/4* linie byly za účelem oddělení epitelu zubních zárodků od mesenchymu umístěny do 1 % roztoku trypsinu (Difco Laboratories). *Shh* expresní domény byly determinovány podle zelené fluorescence v buňkách aktuálně exprimujících *Shh*. Celkem bylo zhodnoceno 629 vzorků dentálních epitelů.

In vitro kultivace tká ových ez

Dolní elisti *Shh*EGFP/Cre pozitivních my-í byly vypreparovány na ED14,5 a nasekány pomocí McIlwain Tissue Chopper (Intracel) na polotenké frontální ezy o tlou- ce 250 μm (Matalova *et al.*, 2005, Diep *et al.*, 2009, Alfaqeeh and Tucker, 2013). Pro sledování osudu specifických bun ných populací bylo vyuffito mikroinjek ní zna ení CM-Dil (Diep *et al.*, 2009). Tká ové ezy byly kultivovány technikou podle Trowella (Trowell, 1959).

Cre-loxP systém

Pro na-e ú ely jsme vyuffili dva Cre-loxP systémy: (1) systém pro sledování normogeneze v ezákové a tvá ové oblasti a (2) systém pro sledování vzniku nadpo etného zubu v dolní tvá ové oblasti.

Dávka 0,225 mg tamoxifenu (Sigma) na 1 g t lesné hmotnosti samice (Hayashi and McMahan, 2002) byla intraperitoneáln aplikována b ezí my-í. Hlavi ky odebraných embryí byly barveny X-galem (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside ó Sigma Aldrich) pro vizualizaci bun k a jejich potomk , u nichfl do-lo k rekombinaci. Vzorky byly standardn histologicky zpracovány.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

ezáková oblast

Obecně se předpokládalo, že *Shh* exprese v ezákové oblasti před ED13,5 je spojena výhradně s vývojem budoucího funkčního ezáku. V dolní elisti my-í však byla v raném vývoji prokázána přítomnost *Shh* exprese ve dvou oblastech, které jsou jak časově tak prostorově oddělené (Hovorakova *et al.*, 2011). Podobnou situaci se nám podařilo ukázat i v budoucí ezákové oblasti v horní elisti my-i (Hovorakova *et al.*, 2013). Anteriorní, superficiální *Shh* expresní doména vzniká dříve a odráží vývoj rudimentárního zuba předcházejícího vzniku zuba funkčního. Později, posteriorní a hlubší *Shh* expresní doména odpovídá signálnímu centru budoucího horního funkčního ezáku u WT my-í. Nadpočetné ezáky v my-í elisti by tedy mohly vznikat revitalizací rudimentárního zubního základu (Murashima-Suginami *et al.*, 2007) podobně jako je tomu v tvářové oblasti (Peterkova *et al.*, 2009, Lagronova-Churava *et al.*, 2013, Lochovska *et al.*, 2015).

Oblast před ústní *ó vestibulum oris*

Oblast zevně k dentici ohraničená dásní, rty a tvářemi se nazývá před dutiny ústní nebo *vestibulum oris*. *Shh* exprese nebyla detekována ve vestibulárním epitelu během asného vývoje dolní elisti (Hovorakova *et al.*, 2011). Sledování osudu linie buněk exprimujících *Shh* však ukázalo přítomnost pozitivně značených buněk

i v anteriorní části epiteliálního základu *vestibulum oris* (Hovorakova *et al.*, 2016).

Pomocí intraperitoneální aplikace tamoxifenu na ED11,5 byla spuštěna rekombinace v okamžiku přítomnosti asné superficiální *Shh* expresní domény v dolní elisti. Tím bylo potvrzeno, že zdrojem X-gal pozitivních buněk ve vestibulárním epitelu je asná *Shh* expresní doména lokalizovaná superficiálně v anteriorní části báze vznikajícího funkčního ezáku a exprimující *Shh* právě v době vzniku epitelového základu pedsín ústní - ED12,5 (Hovorakova *et al.*, 2011). Značené buňky byly lokalizovány v primordiu funkčního ezáku, ale také ve vnitřní ólingvální buněčné vrstvě vestibulárního epitelu. Pokud byl tamoxifen aplikován vase, kdy již superficiální anteriorní doména *Shh* neexprimuje (ED14.5), byl i epitelový základ pedsín ústní negativní. Naše výsledky tedy jasně ukazují, že buňky exprimující *Shh* v asné, rudimentární, anteriorní expresní doméně přispívají k tvorbě vestibulární lišty.

Tvářová oblast

Obecně se uvádí, že pEK se začíná objevovat na vrcholku zubního pupenu (ED13) a je jasně detekovatelný ve stádiu pohárku (ED14) (Vaahtokari *et al.*, 1996, 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). Zároveň jsme

prokázali, že dochází k fúzi těchto signálních center mezi ED14,5 a 14,7, čímž vzniká jedna složená *Shh* expresní doména v budoucím funkčním M1 primordiū, která odpovídá primárnímu EK (Lochovska *et al.*, 2015).

Asná *Shh* expresní doména v M1 není v kontextu těchto nových poznatků klastrem epiteliálních buněk nazývaných pEK. Na ED14,5 byl již v minulosti pozorován mesio-distální nářst 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 (Lochovska *et al.*, 2015). Zároveň je jasné, že na morfologické úrovni je vyloučeno nazývat pEK semknuté buňky epitelu v zárodku M1 ve stádiu pupenu (šbudō) a že obecně se signalizace v zubním zárodku před ED14,5 nemůže vztahovat k pEK, ale k R2 rudimentu.

Nutnost fúze mezi R2 a M1 *Shh* signálními doménami pro normální vznik pEK podporuje i fakt, že u embryí s genotypy s nížší dávkou *Spry* genů nesplynula signální centra R2 a asné M1, což znamenalo vznik nadpočetného zubu anteriorně k M1, jehož signálním centrem bylo perzistující signální centrum rudimentu R2 (Lochovska *et al.*, 2015).

Vývoj zubních hrbolků

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.*, 1996). Sekundární EK se objevuje v míst ohybu epitelu, ímfl ozna uje oblast iniciace vzniku hrbolk (Kettunen and Thesleff, 1998, Jernvall and Thesleff, 2000).

Sledovali jsme p ísp ní bun k exprimujících *Shh* a jejich potomk k signálním centr m EK pomocí tamoxifen indukovatelného Cre-loxP systému. Na základ na-ích výsledk se zdá, fle si pEK, vzniklý fúzí signálních center R2 a asné M1, udržel svou pozici v rámci zubního zárodku M1 a stává se z n j sEK na bukální stran , zatímco r stem lingvální ásti zubního základu vzniká na lingvální stran *de novo* sEK dal-ího hrbolku. To podporuje d ív j-í tvrzení, fle n které bu ky pEKu p eflívají a podílejí se na vzniku bukálního sEKu (Jernvall and Thesleff, 2000). Otázkou z stává, zda bu ky p vodního pEKu p íspívají do lingválního sEK, což je p edm tem n kolika protich dných studií (Coin *et al.*, 1999, Coin *et al.*, 2000, Matalova *et al.*, 2005).

Schéma následného vzniku hrbolk obecn odpovídá p edstav , fle mnohohrbolkový zub reprezentuje n kolik zub jednohrbolkových ó prenatalní konkrescence (Kükenthal, 1892, Bolk, 1922, Peyer, 1968, Peterkova *et al.*, 2000).

Na-e data ukazují, fle vývoj zubního zárodku je buko-lingváln asymetrický, což bylo ukázáno jifl d íve (Cam *et al.*, 2002). Lingvální CL se zano uje do mesenchymu mnohem progresivn ji. Bu ky z apexu této CL se od ED14,5 dostávají b hem vývoje afl do st edu vyvíjejícího se pohárku/zvonku zubního zárodku, zatímco bu ky v bukální CL setrvávají v apikální ásti

CL. Obdobn se chovají bu ky v CL my-ího ezáku (Harada *et al.*, 1999).

V obou elistech se bukální ada hrbolk zakládá d íve a jeví se tedy jako vývojov p vodn j-í. Lin *et al.* (2007) prezentovali ve své práci histologický materiál vyvíjejících se lidských zubních primordií premolár . Z obrazové dokumentace je tedy i u lov ka patrná buko-lingvální asymetrie CL u star-ích vývojových stádií (Lin *et al.*, 2007).

5. ZÁVĚRY

I. Rudimentární struktury se v pr b hu odontogeneze objevují jak v tvá ové, tak v ezákové oblasti embryonálních elistí my-í a mají svá vlastní signální centra, která exprimují *Shh* (marker odontogeneze). asné interakce mezi epitem a mesenchymem jsou tedy spojeny s vývojem zubních rudiment a ne s vývojem funk ních zub . P ítomnost více signálních domén v asné odontogenezi (do ED14,5) nemusí z tohoto hlediska znamenat patologický vývoj nadpo etného zubu v ezákové nebo v molárové oblasti, ale m fle pouze reflektovat signální centra ancestrálních rudimentárních struktur.

- a. V ezákové oblasti horní elisti jsme detekovali asnou, povrchovou *Shh* expresní doménu (ED11,5-13,5), která odpovídá primordiu rudimentárního ezáku. Signální centrum

budoucího funkčního zázaku se objevuje později (od ED13,5), posteriorně k první doméně .

b. *Shh* exprese v tvářové oblasti dolní elisty 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 vymizí. *Shh* signální doména R2 rudimentu následně přechodně koexistuje s vlastní *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 elisty 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 určení propojení *Shh* exprimujících buněk předního R2 rudimentu a vlastní 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 zubařského 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 myšeho 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 myšeho 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 myších embryí ukázal, že díky 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. Společně s vod ezák a základem vestibulum oris může vysvětlit vznik dentálních patologií v nedentální oblasti zevní od ezáku u člověka, jako jsou periferní odontomy.

III. Pí narušení regulace zubního vývoje může díky odontogennímu potenciálu rudimentárních zubních primordií dojít ke vzniku patologií, zejména nadpočetných zubů. Pí nespojení s vodními signálními domény R2 a M1 dochází k vývoji nadpočetného zubního primordia, které vzniká z R2 rudimentu anteriorně k zárodku M1.

- a. *Sprouty2* a *Sprouty4* mají vliv na *Shh* signalizaci v asexuálním prostoru během zubního vývoje. Snížením jejich dávky dochází k opožděné tvorbě pEKu. Ztráta funkce *Sprouty2* má mnohem větší dopad na zubní vývoj.
- b. Ztráta funkce *Sprouty* genů má vliv na fúzi *Shh* signálních domén R2 a susedné M1. Toto nesplynutí ústí v perzistenci a autonomní vývoj R2 rudimentu, což má za následek vývoj nadpočetného zubního základu anteriorně k M1.

1. INTRODUCTION

Rudimentary organs are organs or structures that have lost most or all of their ancestral function in majority of species, but have persisted during the evolution (Darwin, 1859). Rudiments are partially formed or incomplete transformations of developmental signs and occur only in embryos (Hall, 2003).

Dental rudiments were identified in both humans and mice. In humans, the accessory epithelial cup appears at the site of the molar vestibular lamina buccally from the primordium of the first maxillary temporary molar (m1) (Bolk, 1924, Hovorakova et al., 2005) and externally to the site of the second temporary molar (Adloff, 1909). In the literature, these accessory structures observed laterally to the dental lamina were interpreted as vestigial primordia of rudimentary dentition preceding temporary dentition or as remnants of tooth glands in reptiles (Röse, 1895, Adloff, 1909, Bolk, 1924, Schour, 1929).

The embryonic jaws of the mice offer several rudimentary dental primordia during their development. In the upper jaw, five small epithelial buds D1-D5 (Peterkova et al., 1995; Lesot et al., 1998) were detected and two large buds (R1 and R2) were located posteriorly to them (Peterkova et al., 1996). The mandibula shows only two large rudimentary buds MS and R2 located anteriorly to M1 primordium (Viriot et al., 2000). Further research has shown that the tooth primordium of the rudimentary incisor can be found in incisor area in the lower jaw (Hovorakova et al., 2011).

2. AIMS

- I. To complete the information about normogenesis of dental development in the mouse model and determine the presence of signaling centers of tooth rudiments using the marker of the odontogenesis - *Shh* expression during normal development of the upper and lower jaws from the temporal and spatial point of view in the model of the mouse embryonic dentition:
 - a. In the incisor area of upper jaw
 - b. In the cheek area of the lower jaw
 - c. In the cheek area of the upper jaw
- II. To clarify the role of tooth rudiments during normogenesis.
 - a. To trace the cells of signaling centers of rudimentary structures in the cheek area and determine their relationship with the center of the functional tooth ó primary enamel knot (pEK).
 - b. To monitor the bucco-lingual dynamics of enamel knots within the composite tooth developing in the mouse embryonic dentition - the first molar, and determine the relationship of the pEK to secondary EKs.
 - c. To trace the cells of signaling centers of rudimentary structures in the incisor area, and determine their relationship with non-dental structures that develop in the close relationship with dentition (vestibulum oris).

- III. To clarify the role of tooth rudiments in pathogenesis in the lower jaw of mice with supernumerary teeth in the cheek area.
- a. To clarify the temporal and spatial dynamics of signaling centers of rudimentary and functional tooth primordia in *Sprouty2/Sprouty4* mutant mice.
 - b. To determine the role of dental rudiments in the formation of a supernumerary tooth in mice with supernumerary teeth formation in the cheek area.

3. MATERIAL AND METHODS

The model organism in this work was the mouse (*Mus musculus*). All used mice originate from the department of Developmental Biology, IEM AS CR. The animals' treatment satisfied the requirements of the Institutional Review Board of the Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic.

The appropriate mice were mated overnight and the midnight before the morning detection of a vaginal plug was regarded as ED0.0.

Dissociation of dental epithelium and fluorescence microscopy

Sectioned tooth segments of lower cheek area of EGFP positive embryos of *Sprouty2/Sprouty4* lines were treated with 1% trypsin solution (Difco Laboratories) to separate the mesenchyme and epithelium of a tooth

germs. *Shh* expression domains were determined by green fluorescence in cells currently expressing *Shh*. In total, 629 samples of dental epithelium were evaluated.

In vitro slice culture

The lower jaws of *ShhEGFP/Cre* positive mice were excised at ED14,5 and cut using a McIlwain Tissue Chopper (Intracel) to 250 μ m semi-fine frontal sections (Matalova et al., 2005, Diep et al., 2009, Alfaqeeh and Tucker, 2013). To monitor the fate of specific cell populations, CM-Dil microinjection was used (Diep et al., 2009). Tissue sections were cultured by Trowell's technique (Trowell, 1959).

Cre-loxP system

For our purposes, we used two Cre-loxP systems: (1) a system for monitoring normogenesis in the incisor and cheek areas and (2) a system for monitoring of a supernumerary tooth formation in the lower cheek area. A dose of 0.225 mg of tamoxifen (Sigma) per gram of the body weight (Hayashi and McMahon, 2002) was administered intraperitoneally to pregnant mice. The embryonic heads were stained with X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl -D-galactopyranoside - Sigma Aldrich) for the visualization of recombinant cells and their descendants. Samples were routinely histologically processed.

4. RESULTS AND DISCUSSION

Incisor area

It has been generally assumed that the signaling in the incisor area before ED13.5 is associated exclusively with the development of a functional incisor. However, the presence of *Shh* expression in two regions, which are temporally and spatially separated (Hovorakova et al., 2011), was demonstrated in the early development of mice lower jaw. We have demonstrated similar situation in the future incisor area of the mouse upper jaw (Hovorakova et al., 2013). The anterior, superficial *Shh* expression domain originates earlier and reflects the development of the rudimentary tooth preceding the formation of a functional tooth. The later, posterior and deeper *Shh* expression domain corresponds to the signaling center of the prospective upper functional incisor in WT mice. Supernumerary incisors in mouse jaws could therefore be formed by revitalizing of the rudimentary dental primordia (Murashima-Suginami et al., 2007) similarly to the cheek area (Peterkova et al., 2009, Lagronova-Churava et al., 2013; Lochovska et al., 2015).

Oral vestibule area - *vestibulum oris*

The area outside the dentition bounded by the gums, lips and cheeks is called the oral vestibule or *vestibulum oris*. *Shh* expression has never been detected in the vestibular epithelium during the early development of the lower jaw (Hovorakova et al., 2011). However, the

tracing of the fate of the cell lineage expressing *Shh* showed the presence of positive labeled descendant cells in the anterior part of the epithelial anlage of *vestibulum oris* (Hovorakova et al., 2016).

Using the intraperitoneal application of tamoxifen at ED11.5 to the start the recombination at the time of the presence of the early superficial *Shh* expression domain in the lower jaw, we have proven that the source of X-gal positive cells in the vestibular epithelium was an early *Shh* expression domain located superficially in the anterior part of the primordium of the functional incisor expressing *Shh* at the time of the formation of the oral epithelium - ED12.5 (Hovorakova et al., 2011). Labeled cells were located primarily in the functional incisor, but also in the inner - lingual cellular layer of the vestibular epithelium. If tamoxifen was applied at a time when the superficial anterior domain did not express *Shh* (ED14.5), the epithelial anlage of the oral vestibule was negative. Our results clearly show that *Shh* expressing cells of the early anterior rudimentary expression domain contribute to the vestibular lamina formation.

Cheek area

It is generally accepted that pEK starts to appear at the top of the dental bud (ED13) and that it is clearly detectable at the cap stage (ED14) (Vaahtokari et al., 1996, Jernvall and Thesleff, 2000, Cho et al., 2007). According to our results, firstly, two isolated *Shh* expression domains in R2 and early M1 primordia

(Prochazka et al., 2010, Lochovska et al., 2015) appear in the cheek region of the mandible. We have also shown that these signaling centers fuse between ED14.5 and 14.7, resulting in one composite *Shh* expression domain that corresponds to the pEK in the prospective functional M1 primordium (Lochovska et al., 2015). The early *Shh* expression domain in M1 in the context of these new findings is not a cluster of epithelial cells called pEK. On ED14.5, a mesio-distal enlargement of the pEK compared to ED13.5 has been observed in the past (Shigemura et al., 2001), which can be also explained by fusion the active signaling center R2 with the early signaling center of M1 documented in our study (Lochovska et al ., 2015). It is also clear that from the morphological point of view, it is excluded to call the tight epithelial cells in M1 primordium pEK at the bud stage and that in general the signaling before ED14.5 can not be related to the pEK but to the R2 rudiment.

The necessity of the fusion between R2 and M1 *Shh* signaling domains for normal pEK formation also supports the fact that in embryos with genotypes with a lower dose of *Sprouty* genes the signal centers R2 and early M1 did not fuse. This was resulting in the formation of a supernumerary tooth anteriorly to M1 with the persisting signaling center of the rudimentary R2 (Lochovska et al., 2015).

Development of tooth cusps

The development of tooth cusps is controlled by signaling centers known as EKs. EK is a transient non-dividing epithelial cell cluster located at the center of the tooth primordium (Jernvall et al., 1994, Vaahtokari et al., 1996). Secondary EK occurs at the site of epithelial bending, indicating the area of initiation of the cusp (Kettunen and Thesleff, 1998, Jernvall and Thesleff, 2000).

We monitored the contribution of *Shh* expressing cells and their descendants to EK signaling centers using the tamoxifen inducible Cre-loxP system. Based on our results, it appears that the pEK that has arisen by fusion of R2 and early M1 signaling centers kept its position within the M1 primordium and became sEK on the buccal side. sEK of the cusp on the lingual side seems to arise *de novo* by the growth of the lingual part of the dental primordium. This supports the earlier statement that some pEK cells survive and participate in the formation of a buccal sEK (Jernvall and Thesleff, 2000). The question remains whether the cells of original pEK contribute to lingual sEK, which is the subject of several opposing studies (Coin et al., 1999, Coin et al., 2000, Matalova et al., 2005).

The pattern of the subsequent cusps formation generally corresponds to the idea that the multicusped tooth represents several unicusped teeth - prenatal concrescence (Kükenthal, 1892, Bolk, 1922, Peyer, 1968, Peterkova et al., 2000).

Our data show that the development of the tooth primordium is bucco-lingually asymmetric, as has been shown previously (Cam et al., 2002). Lingual CL invaginates into the mesenchyme more progressively. Cells from the apex of this CL are shifted to the center of the developing cup/bell during development from ED14.5, while the cells in the buccal CL remain in the apical part of CL. Cells in a CL of the murine incisor behave similarly (Harada et al., 1999).

In both jaws, the buccal row of cusps is established earlier and appears to be developmentally more original. Lin et al. (2007) presented in their work histological material of developing tooth primordia of human premolars. There is a distinct bucco-lingual CL asymmetry in older developmental stages in humans noticeable in the documentation (Lin et al., 2007).

5. CONCLUSIONS

I. Rudimentary structures appear during the odontogenesis both in the cheek and incisor area of the embryonic jaws of the mouse and have their own signaling centers that express *Shh* (marker of the odontogenesis). Early interactions between epithelium and mesenchyme are associated with the development of tooth rudiments and not with the development of functional teeth. The presence of multiple signaling domains in early odontogenesis (to ED14.5) may not, in this respect, mean a pathological development of the supernumerary

tooth in the incisor or molar region, but can only reflect the signaling centers of ancestral rudimentary structures.

- a. In the incisor area of upper jaw, we detected an early, superficial *Shh* expression domain (ED11.5-13.5) corresponding to primordium of rudimentary incisor. The signaling center of the future functional incisor appears later (from ED13,5), posteriorly to the first domain.
- b. *Shh* expression is continuous in time in the cheek area of the lower jaw of the mouse and it is not interrupted by any negative period. Only the positions of expressing domains are changed in connection with the development of rudimentary structures preceding the development of the first molar. The signaling center in MS rudiment appears as the first. After that it expresses *Shh* shortly together with the appearing *Shh* signaling domain in R2 rudiment, until it disappears. The *Shh* signaling domain of the R2 rudiment transiently coexists with the early M1 *Shh* signaling domain and then they fuse together at ED14.5 to 14.7 to give rise to the primary enamel knot (pEK).
- c. *Shh* is also expressed in the cheek area of the upper jaw, namely in the diastema, in R1 and R2 tooth rudiments, and in the center of the developing germ of the functional first molar. Also in the upper cheek region there is a certain connection of *Shh* expressing cells of the

original R2 rudiment with early M1. The incorporation of R2 into M1 in the upper jaw does not reach the same stage as in the lower jaw.

- II. Dental rudiments are involved in the development of functional dentition, for example in the incorporation into the germ of a functional tooth or induction of the successive tooth primordium, which in this case represents the next tooth generation. In addition, they are likely to be able to maintain their odontogenic potential, the reactivation of which leads to pathologies (supernumerary tooth). This odontogenic potential can also be transferred, for example, to the anlage giving rise to the oral vestibule (*vestibulum oris*).
 - a. The cell lineages of the signaling centers of original R2 rudiment and early M1 fuse to form the pEK in the area of the prospective functional M1. pEK of the first molar in the mouse mandible, in its generally accepted meaning (signaling center of the functional tooth), originates only after the fusion of the original signaling domains (ED14.5-14.7) in the R2 rudiment and in the early M1 primordium.
 - b. The development of the mouse multicusped tooth is bucco-lingually asymmetric. The buccal side of the mouse molar is more stable and it seems to be more original. After the formation of the pEK from which sEK becomes on the buccal side of the tooth, the SEK appears on the

lingual side (lingual from the original pEK). The cells of R2 rudiments thus contribute to the formation of the first buccal cusp. The lingual side of the tooth appears to be younger and more progressive.

- c. Development in the upper incisor area of mouse embryos has shown that *Shh* expressing cells in the early anterior expression domain contribute to the formation of vestibular lamina, and it can be said that the incisors and the inner layer of the vestibular epithelium share a common origin. Additionally, the rudimentary generation of *Shh* expressing cells appears to play a role in initiating the next generation of teeth, which is represented by a functional incisor. The common origin of incisors and oral vestibule can explain the formation of dental pathologies in the non-dental area externally to the incisors in humans, such as peripheral odontoms.

III. Dysregulation of the signaling during tooth development can cause pathologies, especially supernumerary tooth occurring due to the odontogenic potential of the rudimentary tooth primordia. When signaling domains of the original R2 and M1 do not fuse, a supernumerary tooth primordium develops from the R2 rudiment anteriorly to the M1 germ.

- a. *Sprouty2* and *Sprouty4* influence *Shh* signaling in time and space during dental development. The decrease of *Sprouty2/4* gene dose results in

- the delayed pEK formation. Loss of *Sprouty2* has a greater impact on the dental development.
- b. Loss of *Sprouty* genes has an effect on the fusion of *Shh* signaling domains of R2 and early M1. The non-fusion results in the persistence and autonomous development of the R2 rudiment, resulting in the development of the supernumerary tooth primordium anteriorly to M1.

6. POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES

- Adloff, P., 1909. Überreste einer prälaactealen Zahnreihe beim Menschen. *Deut. Monatschr. Zahnheilk.*, 11, 828-832.
- Alfaqueeh, 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.
- 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 Nebenleiste der Säugetiere und die Zahndrüsenleiste der Reptilien. *Deut Monatschr Zahnheilk*, 7, 129-137.
- 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.
- 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.
- 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*.
- 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.
- Fitzgerald, L., 1973. Deciduous incisor teeth of mouse (mus musculus). *Archives of Oral Biology*, 18, 381-389.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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.
- 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.
- 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.
- Kükenthal, W., 1892. Über den Ursprung und die Entwicklung der Säugtierzähne. *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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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., Viriot, L. & Lesot, H., 2000. Dentition development and budding morphogenesis. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, 20, 158-172.
- 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.
- Peyer, B., 1968. *Comparative Odontology: The University of Chicago Press*.
- 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.
- Röse, C., 1895. Überreste einer vorzeitigen prä-lactealen und einer vierten Zahnreihe beim Menschen. *Österreichisch-ungarische Vierteljahrschr Zahnheilk*, 2, 45-50.
- 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.
- 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.
- Trowell, O.A., 1959. The culture of mature organs in a synthetic medium. *Experimental Cell Research*, 16, 118-147.
- Vaahokari, A., Aberg, T., Jernvall, J., Keranen, S. & Thesleff, I., 1996. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mechanisms of Development*, 54, 39-43.
- 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.
- 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.

CURRICULUM VITAE

Adresa: Josefa Těv íka 950/13, 434 01, Most

Kontakt: +420 728 971 355,
kata.lochovska@seznam.cz

Vzd lání:

2012ódosud Doktorské studium, Antropologie a genetika lov ka, P írodov decká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, dizerta ní práce: Úloha rudimentárních struktur v odontogenezi, –kolitelka: Mgr. Mária Hovo áková, Ph.D.

2010ó2012 Magisterské studium, Antropologie a genetika lov ka, P írodov decká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, diplomová práce: Vznik lidských zubních anomálií na modelu odontogeneze u my-í s poruchami gen , –kolitelka: Mgr. Mária Hovo áková, Ph.D.

2007ó2010 Bakalá ské studium, Biologie, P írodov decká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, bakalá ská práce: Morfologická variabilita ezáku u mutantních my-í, –kolitelka: Mgr. Mária Hovo áková, Ph.D.

Zam stnání:

2011-2016 Odd lení teratologie, Ústav experimentální medicíny, Akademie v d eské Republiky, v.v.i.

2017-dosud Odd lení hematoonkologie, I. Interní klinika ó klinika hematologie, V-eobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. léka ské fakulty Univerzity Karlovy

Participace v projektech:

šCentre of orofacial development and regenerationö (GB14-37368G)

šRudiments in the mouse model of tooth developmentö (GAP305/12/176)

šDevelopment of incisor malformations in mouse modelö (GAP304/09/1579)

Stáfle:

2014 (kv ten) - Department of Craniofacial Development & Stem Cell Biology; King's College London, Velká Británie, prof. Abigail Tucker

Konference:

É šUpdated view of the formation of the primary enamel knot in the developing mouse molarö **Lochovska K**, Peterkova R, Pavlikova Z, Hovorakova M. Tooth morphogenesis and differentiation 2016, Porvoo, Finsko.

É šOdontogenic cells in the anlage of the mouse oral vestibuleö Hovorakova M, **Lochovska K**, Zahradnicek O. Tooth morphogenesis and differentiation 2016, Porvoo, Finsko.

É šSprouty genes ó key players in mouse tooth pattern developmentö **Lochovska K**, Peterkova R, Hovorakova M. EMBO Conference: Genetic Control of Development and Evolution, 2015, Pa ífl, Francie

É šShh expression in the early tooth primordia developing in the buccal area of mouse lower embryonic jawö **Lochovska K**, Peterkova R, Pavlikova Z, Hovorakova M. Morphology 2014, Brno, eská Republika

É šDynamics of Shh signaling during first molar development in mouseö **Lochovska K**, Peterkova R,

Smrckova L, Hovorakova M. 16th International Symposium on Dental Morphology and 1st Congress of the International Association for Paleodontology, 2014, Záh eb, Chorvatsko

É šMultiple Sonic hedgehog expression during early incisor development in wild-type miceõ Hovorakova M, **Lochovska K**, Smrckova L, Lesot H, Peterka M, Peterkova R. Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration, Gordon Research Conference, 2014, Lucca, Itálie

É šDifferences in the early development of the mouse upper and lower incisorsõ Smrckova L, **Lochovska K**, Lesot H, Peterkova R, Hovorakova M. Tooth morphogenesis and differentiation 2013, La Londe, Francie.

É šRudimentary structures associated with the mouse upper functional incisor developmentõ Hovorakova M, **Lochovska K**, Smrckova L, Peterkova R, Lesot H, Peterka M. Tooth morphogenesis and differentiation 2013, La Londe, Francie.

SEZNAM PUBLIKACÍ / SELECTED PUBLICATION

Hovorakova M, Smrckova L, Lesot H, **Lochovska K**, Peterka M, Peterkova R. Sequential *Shh* expression in the development of the mouse upper functional incisor. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2013. 320(7):455-64. doi: 10.1002/jez.b.22522. (IF: 2.083)

Lochovska K, Peterkova R, Pavlikova Z, Hovorakova M. Sprouty gene dosage influences temporal-spatial dynamics of primary enamel knot formation. *BMC Dev Biol.* 2015. 22:15-21. doi: 10.1186/s12861-015-0070-0. (IF: 2.096)

Hovorakova M, **Lochovska K**, Zahradnicek O, Domonkosova Tibenska K, Dornhoferova M, Horakova-Smrckova L, Bodorikova S. One odontogenic cell-population contributes to the development of the mouse incisors and of the oral vestibule. *PLoS One.* 2016. 11(9):e0162523. doi: 10.1371/journal.pone.0162523. (IF: 3.057)