

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



**Bc. Linda Dalecká**

***Eda gen ve vývoji zubů***

*Eda gene in the development of teeth*

Diplomová práce

**Vedoucí práce: RNDr. Mária Hovořáková PhD.**

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

V Praze, dne 12.8.2018

Podpis

**Poděkování:**

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Márii Hovořákové PhD. za vedení této práce, za její každodenní motivaci a podporu, za vynaložený čas a energii, za všechny cenné rady a zkušenosti z vědecké oblasti i ze života.

Dále děkuji svým kolegům z oddělení Teratologie, a to především Kláře Steklíkové, Oldovi Zahradníčkovi, Ivance Koppové a Kátě Ločovské za pomoc při mých vědeckých začátcích, odolnost vůči mým neutuchajícím otázkám, a především milou a podporující společnost.

V neposlední řadě patří můj dík také rodině a partnerovi za podporu a pochopení v průběhu celého studia.

# Obsah:

1	Úvod.....	11
2	Zuby a jejich vývoj.....	12
2.1	Obecná stavba zubu.....	12
2.2	Lidská dentice .....	13
2.3	Myší dentice.....	14
2.3.1	Specifika myší embryonální dentice .....	15
2.4	Morfogeneze zubu.....	16
2.4.1	Epitelové ztluštění.....	17
2.4.2	Zubní lišta .....	18
2.4.3	Zubní pupen .....	18
2.4.4	Zubní pohárek .....	19
2.4.5	Zubní zvonek.....	19
2.5	Molekulární regulace vývoje zubů.....	20
2.5.1	<i>Wnt</i> signální dráha:.....	20
2.5.2	<i>FGF</i> signální dráha: .....	21
2.5.3	<i>TGF β</i> signální dráha:.....	21
2.5.4	<i>Hh</i> signální dráha: .....	22
2.5.5	<i>TNF</i> signální dráha.....	23
3	<i>Eda</i> gen .....	23
3.1	<i>Eda</i> a vývoj zubů.....	24
3.2	<i>Eda</i> ve vztahu k dalším signálním drahám.....	25
3.3	Poruchy <i>Eda</i> signální dráhy .....	25
3.4	<i>Eda</i> mutantní myši (tabby).....	26
4	Cíle diplomové práce .....	29
5	Materiál .....	30
5.1	<i>Eda</i> mutantní myši (EDATa/0) .....	30
5.2	EDATa/0 x B6.Cg- <i>Shhtm1</i> (EGFP/cre)Cjt/J .....	31
5.3	EDATa/0/Rosa26LacZ a EDATa/0 /B6.129S6-Shh<tm2(cre/ERT2)Cjt>/J myši pro Cre-LoxP systém .....	31
5.4	CD1 myši .....	32
6	Metody .....	33
6.1	Připouštění myši a odběr embryí.....	33
6.2	Disociace epitelů.....	34
6.3	Sledování buněčných linií .....	34
6.4	Odběr embryí na western blot .....	36

6.5	Western blot .....	36
6.6	Histologické zpracování.....	38
6.7	Barvení histologických řezů jádrovou červení.....	39
6.8	Imunohistochemie.....	40
7	Výsledky .....	42
7.1	Morfologická studie s využitím fluorescenční mikroskopie na disociovaných epitelech .....	43
7.1.1	Vývoj dentálního epitelu u CD1 myší.....	43
7.1.2	Vývoj dentálního epitelu u <i>Eda</i> mutantních myší.....	45
7.1.3	Porovnání <i>Eda</i> mutantních myší s CD1 .....	48
7.2	Základní porovnání <i>Shh</i> exprese .....	50
7.3	Detekce <i>Shh</i> exprimujících buněčných linií.....	51
7.4	Kvantifikace SHH proteinu.....	61
7.5	Detekce SHH exprese .....	63
8	Diskuze.....	65
9	Závěry .....	71
10	Literatura.....	72

## Abstrakt

Ectodysplasin A (EDA) je transmembránový protein z rodiny TNF, který hraje důležitou roli ve vývoji ektodermálních derivátů, jako jsou zuby, vlasy či žlázy. Mutace v *Eda* genu způsobuje u člověka hypohidrotickou ektodermální dysplázi (HED). Sonic hedgehog (*Shh*), který je ovlivňován *Eda* signální dráhou je důležitou signální molekulou zapojenou v iniciaci zubního vývoje.

V rámci této studie bylo naším cílem zhodnotit vliv *Eda* genu na vývoj myších zubů a jeho vztah k *Shh* signalizaci, neboť *Shh* je důležitý ukazatel normálního zubního vývoje. Zaměřili jsme se na *Shh* expresi v zubech *Eda* mutantních myší, se spontánní mutací v *Eda* genu, které jsou přirozeným modelem pro X vázanou HED. Nejdříve jsme porovnávali *Shh* expresní vzorec v průběhu zubního vývoje u *Eda* mutantních myší s CD1 kontrolami pomocí metody disociace epitelů a fluorescenční mikroskopie. Následně jsme se zaměřili na pozorování buněčných linií exprimujících *Shh* pomocí Cre-LoxP systému. Také jsme vizualizovali SHH expresi pomocí imunohistochemie a kvantifikovali SHH protein v embryonálních čelistech pomocí western blotu.

Dle našich výsledků byl vývoj zubů u *Eda* mutantních myší přibližně o jeden den opožděn v porovnání s kontrolou. Můžeme shrnout, že *Eda* gen a jeho protein má vliv na oblast *Shh* exprese následujícího funkčního zubu, ve smyslu redukce její velikosti a délky jejího trvání, avšak u *Eda* mutantních myší jsme nepozorovali skutečný nedostatek SHH proteinu.

Klíčová slova: *Eda* gen, Hypohidrotická ektodermální displázie, vývoj zubů, zubní patologie, myš

## Abstract

Ectodysplasin A (EDA) is a transmembrane protein of the TNF family, which plays an important role in the development of ectodermal derivatives, such as teeth, hair or glands. Mutation in *Eda* gene causes the Hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED) in humans. Sonic hedgehog (*Shh*) as a downstream of *Eda* signalling pathway is an important signalling molecule involved in the initiation of tooth development.

In frame of the present study, we aimed to evaluate the involvement of *Eda* gene during the development of mice teeth and its relation to *Shh* signalling, since *Shh* is an important marker of the normal tooth development. We focused on *Shh* expression in *Eda* mutant mice teeth with spontaneous mutation in *Eda* gene, since these mice represent a natural model for X-linked HED. First, we compared the *Shh* expression pattern during the tooth development in *Eda* mutant mice with CD1 control using the dissociation of dental epithelia and fluorescent microscopy. Consequently, we focused on the cell line expressing *Shh* observation using Cre-loxP system. We also visualized SHH expression in *Eda* mutants using immunohistochemistry and quantified SHH protein in the embryonic jaws using western blot.

According to our results, the development of teeth in *Eda* mutants seems to be approximately one day delayed compared to controls. We can summarize that *Eda* gene with its protein seems to influence the region of successive *Shh* expressions formation in the sense of a reduction of its size and duration of the presence but we did not observe any deficiency of SHH protein in *Eda* mutant mice.

Keywords: *Eda* gene, Hypohidrotic ectodermal dysplasia, tooth development, pathology of teeth, mouse

## Seznam zkratek

Bmp/BMP	Kostní morfogenetický faktor ( <i>Bone morphogenic factor</i> )
C	Špičáky ( <i>Dentes canini</i> )
Cre	Rekombináza ( <i>Causes Recombination</i> )
Dhh	Desert hedgehog
ED	Embryonální den
Eda/EDA	Ectodysplasin
Edar/EDAR	Ectodysplasin receptor
EDARADD	Adaptérový protein pro EDAR ( <i>EDAR associated adapter protein</i> )
EGF	Epidermální růstový faktor
EGFP	Zelený fluorescenční protein ( <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> )
Fgf/FGF	Fibroblastový růstový faktor ( <i>Fibroblast growth factor</i> )
FGFR	Receptor fibroblastového růstového faktoru ( <i>Fibroblast growth factor receptor</i> )
GFP	Zelený fluorescenční protein ( <i>Green fluorescent protein</i> )
h	Hodina
HED	Hypohidrotická ektodermální dysplázie
Hh	Hedgehog
I	Řezáky ( <i>Dentes incisivi</i> )
IDE	Vnitřní zubní epitel ( <i>Inner dental epithelium</i> )
Ihh	Indian hedgehog
Int-1	Integrated
IκK	Inhibitor jaderného faktoru κB kináza (Inhibitor of nuclear factor κB kinase)
Lef-1	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
loxP	<i>Locus of chromosomal crossover (x) in the bacteriophage P1</i>
M	Stoličky ( <i>Dentes molares</i> )
M1	První molár
M2	Druhý molár
M3	Třetí molár
min	Minuta



MS	Mesiální segment
Msx	<i>Muscle segment homeobox gene</i>
NFκB	Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
Obr	Obrázek
ODE	Vnější zubní epitel ( <i>Outer dental epithelium</i> )
Opg	<i>Osteoprotegerin</i>
Osx	<i>Osterix</i>
P	Zuby třenové ( <i>Dentes praemolares</i> )
Pax9	<i>Paired box 9</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCP	<i>Planar cell polarity</i>
PDE	Fosfodiesteráza
pEK	Primární sklovinný uzel ( <i>Primary enamel knot</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PLC	Fosfolipáza C
R1	Maxilární rudimentární zubní základ
R2	Mandibulární rudimentární zubní základ
Rank	Receptor aktivující nukleární faktor kappa B ( <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i> )
Rankl	Ligand receptoru aktivující nukleární faktor kappa B ( <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> )
s	Sekunda
SDS	Sodium dodecyl sulfát
sEK	Sekundární sklovinný uzel ( <i>Secondary enamel knot</i> )
Shh/SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
Tab	Tabulka
TGF β	Transformující růstový faktor β ( <i>Transforming growth factor β</i> )
TNF	Tumor nekrotizující faktor ( <i>Tumor necrosis factor</i> )
TRAF	Faktor asociovaný s receptorem TNF ( <i>TNF receptor associated factor</i> )
USA	United States of America
Wnt	Wingless/Integrated – „ <i>Wint</i> “

WT	Wild-type
XEDAR	X-linked ectodermal dysplasia receptor
XLHED	X-vázaná hypohidrotická ektodermální dysplázie

# 1 Úvod

Zuby jsou pro většinu savců včetně člověka důležitým orgánem pro přijímání a zpracování potravy, slouží ke komunikaci, ale také k obraně i útoku. Zubní vady jsou sice se životem slučitelné, ale přesto mohou způsobit vážné potíže. U člověka je třeba vzít v potaz také jejich estetický význam. Je tedy v našem zájmu pochopit mechanismy zubního vývoje a tyto poznatky posléze uplatnit při možné léčbě dentálních patologií.

Z etických důvodů se k výzkumu používají modelové organismy, a to v současnosti nejčastěji nejrůznější myší kmeny s poruchami genů. Takovým případem je například i *Eda* mutantní myš, která vykazuje stejný fenotyp jako u člověka X-vázaná hypohidrotická ektodermální dysplázie (XLHED). Tento syndrom je u myši i u člověka způsoben mutací v genu pro ektodysplazín (*Eda*), který se vyskytuje na X-chromosomu. HED mimo jiných fenotypových projevů postihuje i zuby, jejichž vývoj je mutací v *Eda* genu zasažen a výsledkem jsou patologie dentice u pacientů s HED i *Eda* mutovaných myší. Srovnání vývoje zubů u *Eda* myši s normálním vývojem nám umožňuje sledování interakcí *Eda* genu s jinými geny či genovými rodinami s cílem pochopit roli *Eda* genu ve vývoji zubů i ve vývoji obecně, což je předpokladem k cestě za hledáním možnosti terapie či řešení HED jako geneticky podmíněného defektu.

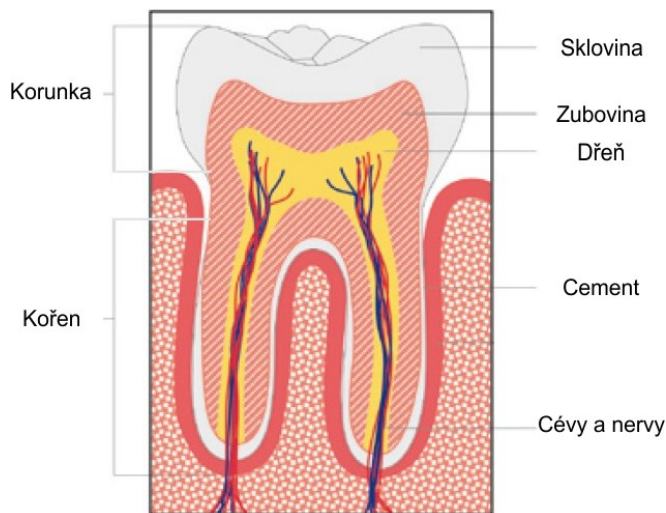
## 2 Zuby a jejich vývoj

Nejpoužívanějším experimentálním organismem pro studium vývoje zubů savců, a tedy i člověka je laboratorní myš. Kvůli nemožnosti přímého výzkumu na lidském materiálu byly vývojové studie o zubní iniciaci, morfogenezi, diferenciaci a o řízení těchto procesů provedeny na myším modelu odontogeneze. Výhodou myšího modelu jsou totožná morfologická stádia v procesu odontogeneze u myši a u člověka (Lesot *et al.*, 1996; Peterková *et al.*, 1996; Hovorakova *et al.*, 2005). U myši s genetickými poruchami navíc existují podobné variace v počtu a tvaru zubů, které můžeme najít i u člověka, a lze je tedy použít jako model pro studium geneticky podmíněných vad dentice u lidí. Ačkoli si je vývoj zubů myši a člověka v mnohém velmi podobný, lze mezi nimi najít i určité rozdíly, které je třeba při výzkumu zohledňovat.

### 2.1 Obecná stavba zubu

Funkční zub dospělého jedince se skládá ze 3 hlavní částí:

- korunka je část zubu, vyčnívající do dutiny ústní,
- krček je úsek mezi korunkou a kořenem, obklopený dásní,
- kořen, který kotví zub v alveolárním výběžku.



**Obr. 1: Stavba zubu** (upraveno dle Rodriguez et al., 2004)

Kořenů může být v závislosti na typu zubu i více a jsou v alveolech upevněny pojivovou tkání – ozubicí. Uvnitř každého zubu se nachází dřeňová dutina vyplněná zubní dřeví s cévami a nervy. Na stavbě zubu se podílí 3 typy tvrdé mineralizované tkáně: sklovina, zubovina a cement.

**Sklovina** – *enamelum* pokrývá povrch korunky zubu. Je to nejtvrďší tkáň v lidském těle. Obsahuje 95–98 % minerálních látek. Organickou složkou skloviny jsou proteiny neobsahující kolagen, zejména amelogeniny a enameliny. Sklovinotvorné buňky, ameloblasty, po prořezání zubu zanikají, sklovina proto nemůže regenerovat.

**Zubovina** – *dentinum* je hlavní hmota zubu obklopující dřeňovou dutinu. Dentin má vysoký podíl anorganické hmoty (70 %) a proto je tvrdší než kost. Organickou část dentinu tvoří kolagenní vlákna typu I a proteoglykany. Dentin se obnovuje po celý život díky odontoblastům, k jejichž stimulaci dochází i při poranění zubu.

**Cement** – *cementum* je svou strukturou podobný kosti. Pokrývá celý kořen a krček zubu a s povrchem dentinu je spojen kolagenními vlákny. Má obdobný poměr minerální složky jako kost, tedy přibližně 50 % hmoty. Na rozdíl od kosti však neobsahuje cévy ani nervy, obsahuje ale Sharpeyova vlákna (kolagenní vlákna), která jsou napojena na kost zubního alveolu a fixují zub.

## 2.2 Lidská dentice

U člověka rozlišujeme dentici dočasnou a trvalou.

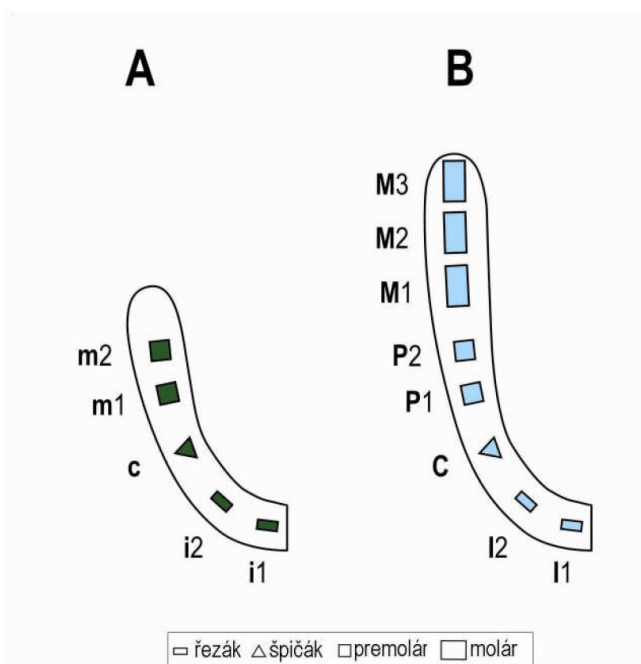
Dočasná dentice se vyvíjí od konce 5. týdne prenatálního vývoje a je tvořena 20 zuby (Obr. 2). Zuby se začínají prořezávat přibližně 6 měsíců po porodu a prvním prořezaným zubem je dolní mediální řezák. Jako poslední se prořezává druhá horní stolička, a to přibližně ve dvou letech věku dítěte (Nunn et al., 2011). Zuby dočasné dentice mají po prořezání plně zformovanou korunku, která je plně mineralizovaná a nejsou již tvořeny žádné další ameloblasty. V dalším vývoji pokračuje pouze kořen zubu.

Apoptózou buněk na povrchu i uvnitř kořene dochází k vypadnutí dočasného zubu – exfoliaci. Dochází k resorpci kořene za působení odontoklastů a osteoklastů. Mediátorem resorpce kostní tkáně je epidermální růstový faktor (EGF), který je ve velkém množství produkován v perikoronálním folikulu budoucího trvalého zubu. Při dostatečném přiblížení dočasného zubu a základu trvalého zubu dochází k urychlení a rozšíření resorpce v jednom směru. Molekuly EGF svým proliferčním efektem participují na vzniku nových buněk epitelové tkáně a zároveň, díky apoptóze, vzniká cesta pro trvalý zub (Consolaro, 2015).

Trvalá dentice začne plně nahrazovat a doplňovat dočasnou průměrně ve věku 5,5 až 6 let. Vývoj trvalé dentice je částečně závislý na dospívání a nástupu puberty. Za

běžných podmínek se trvalá dentice skládá z 32 zubů (Obr. 1). Prořezávání trvalé dentice je podstatně delší než u dočasné. Nejdříve se prořezává dolní mediální řezák, asi ve věku 6 let, a jako poslední se objevují třetí dolní i horní stoličky v rozmezí 17-21 let. Tyto se ale často buď neprořežou, nebo úplně chybí (Nunn *et al.*, 2011).

Velikost a tvar zubů jsou ovlivňovány genetickými faktory. Doba prořezávání je ovlivněna etnickým původem i působením hormonů. Dalšími faktory ovlivňující vývoj zubů jsou například životní styl matky, socioekonomický status, délka kojení či pohlaví dítěte (Ntani *et al.*, 2015).



**Obr. 2: Lidský zubní vzorec (A) dočasné a (B) trvalé dentice. Dočasná dentice obsahuje v každém kvadrantu 5 zubů. U trvalé je to 8 zubů. (Z archivu R. Peterkové)**

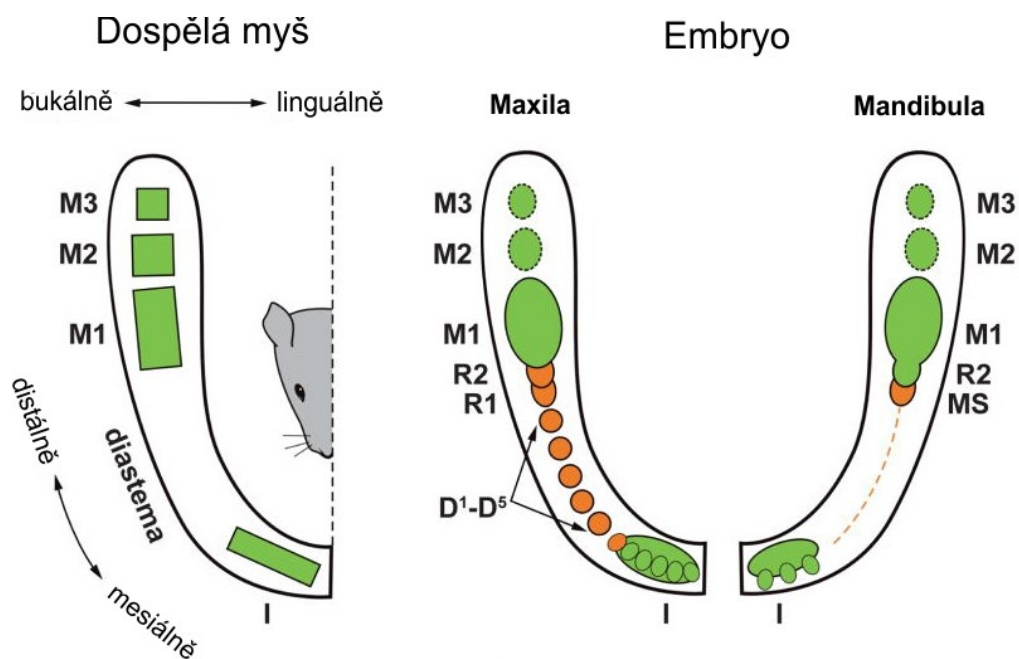
### 2.3 Myší dentice

Normální myší dentice je oproti lidské značně redukována. Je tvořena pouze 16 zuby. V každém kvadrantu se nachází jeden řezák a tři stoličky. Řezák je od stoliček oddělen diastematem (bezzubý úsek). Myši mají pouze jednu generaci zubů, ale jejich řezáky dorůstají po celý jejich život. Tento růst je způsoben přítomností kmenových buněk v proximální části zubu. Dalším specifikem myších řezáků je úbytek skloviny na linguální straně zubu. Obě tyto modifikace vedou k asymetrickému obrušování horních

i dolních řezáků a tím zůstává zachován tvar řezákové hrany, který je nezbytný pro zpracování jejich stravy (Wang *et al.*, 2004).

### 2.3.1 Specifika myší embryonální dentice

Oproti redukované dentici dospělé myši mandibuly a maxily, zubní vzorec myších embryí je v obou čelistech bližší vzorci lidské dentice. Během vývoje se totiž především v oblasti diastematu objevují rudimentární zubní základy, které nepřetrvávají do dospělosti. Díky tomu je myší embryonální vývoj dentice vhodným modelem pro vývoj dentice lidské navzdory značným rozdílům v dentici dospělců. Některé z embryonálních rudimentů v průběhu vývoje zanikají, jiné jsou inkorporovány do primordií funkčních zubů (Lesot *et al.*, 1996; Peterková *et al.*, 1996; Turečková *et al.*, 1996; Lochovská *et al.*, 2015). Rudimenty mají stejně jako zubní základy funkčních zubů svá signální centra, která řídí jejich vývoj. Existence rudimentů a jejich signálních center byla dokázána experimentálně (Prochazka *et al.*, 2010; Hovorakova *et al.*, 2011; 2013). Nejvýraznější zubní základy dolní čelisti se nacházejí v posteriorní části diastemy a jsou označovány jako MS (mesiální segment) a R2 (Viriot *et al.*, 2000). Tyto pupeny pravděpodobně odpovídají třenovým zubům, které ale u myši během evoluce vymizely (Peterková *et al.*, 2000; Viriot *et al.*, 2002) (Obr. 3). Bylo také zjištěno, že posteriorní rudiment R2 nezaniká, nýbrž je inkorporován do vyvíjejícího se prvního moláru M1 (Prochazka *et al.*, 2010) a jeho signální centrum se aktivně podílí na vzniku sklovinného uzlu M1 (Lochovská *et al.*, 2015). Byl také nalezen rudimentární zubní základ v řezákové oblasti dolní čelisti, jehož buňky exprimující markery zubního vývoje přispívají k vývoji základu *vestibulum oris* (Hovorakova *et al.*, 2016). Tento rudiment odpovídá tzv. mléčnému řezáku, který byl morfologicky popsán u myši i u potkana (Woodward, 1894; Moss-Salentijn, 1978).



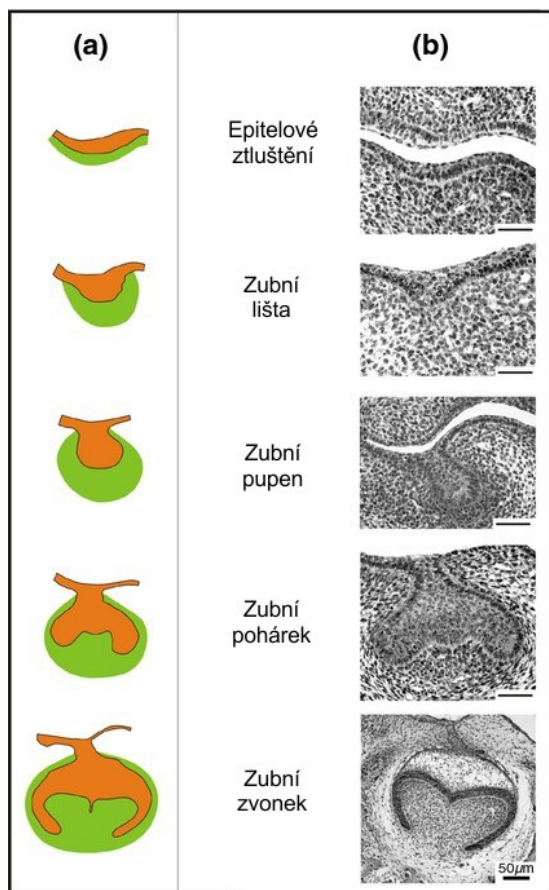
**Obr. 3: Porovnání funkčního a embryonálního zubního vzorce u myši.** Vlevo: Dentice dospělé myši. Každý kvadrant čelisti obsahuje jeden řezák (I), bezzubé diastema a tři moláry (M1, M2, M3). Vpravo: Uspořádání zubních základů v čelisti myšního embrya. V horní čelisti je pupen řezáku tvořen splynutím pěti až šesti zubních základů. Diastema obsahuje pět malých pupenů (D1-D5) a dva větší (R1, R2) (oranžová kolečka). V dolní čelisti splývají tři zubní základy v oblasti řezáku. V mesiální části diastematu lze nalézt jen epitelové ztlustění (přerušovaná čára), v distální části se nacházejí dva velké pupeny (MS, R2). R2 je postupně inkorporován do přední části prvního moláru (M1). Základy druhého a třetího moláru (M2 a M3) se objevují na pozdějších stádiích vývoje. (Upraveno podle Peterková et al., 2000).

## 2.4 Morfogeneze zubu

Prenatální vývoj zubu je komplexní multifaktoriální proces. Je založen na vzájemné interakci orálního epitelu ektodermálního původu a ektomezenchymu, které jsou od sebe odděleny bazální membránou.

V průběhu prenatálního vývoje prochází zubní zárodek několika stádii, jejichž název odráží tvar zubního epitelu na frontálním řezu v nejširší oblasti zubu (obr. 4). Nicméně v prostoru je tvar zubních zárodků odlišný od zavedeného názvosloví (Peterková et al., 2002a).





**Obr. 4: Stádia zubního vývoje stoličky (M1) u myši.** (a) Schéma frontálního řezu molárem ukazuje tvar zubního epitelu v centrální části moláru. Zubní mezenchym je znázorněn zeleně, zubní epitel je oranžový. (b) Frontální histologické řezy centrální částí moláru. (Upraveno podle Peterková et al., 2002a).

#### 2.4.1 Epitelové ztluštění

Za první známku morfologického vývoje zubu je považováno ztluštění orálního epitelu a vytvoření ektodermální plakody (Pispa and Thesleff, 2003). Tato epitelová vrstva je složena z cylindrických buněk uložených ve více vrstvách, které mají dlouhé osy jader orientovány kolmo k bazální membráně. U člověka dochází ke ztlušťování epitelu 27. – 29. den embryonálního vývoje v dolní i horní čelisti. Zesílený epitel je definitivně zformován přibližně v 32. – 34. dni vývoje a postupně dochází k prorůstání epitelu do okolního mezenchymu (Ooe, 1957; Tonge, 1969). K invaginaci epitelu do mezenchymu v anteriorní a posteriorní oblasti však nedochází zároveň. U dolní čelisti dochází nejdříve k invaginaci v posteriorní oblasti. U horní čelisti naopak v anteriorní části (Ooe, 1957).

U myši dochází ke ztluštění orálního epitelu v embryonálním dni (ED) 11,5 a je tak vymezeno místo tvorby zubu (Peterková et al., 1996; Peterková et al., 2002a).

V raných stádiích vývoje (do ED 12) se zde nachází signální centrum pro tvorbu zubu charakteristické expresí specifických transkripčních faktorů. Později se toto řídicí centrum přesouvá do ektomezenchymu (Jussila and Thesleff, 2012).

#### **2.4.2 Zubní lišta**

Vrstvy cylindrických buněk ztlustělého orálního epitelu se skládají na sebe a vzniká tak zubní lišta. Při tomto procesu se epitelová vrstva více zanořuje do mezenchymu. Překládáním vrstev epitelu vznikají žláby, které jsou posléze vyplněny menšími buňkami. U člověka se zubní lišta formuje 44. – 46. den prenatalního vývoje. Obvykle vzniká ze 4 – 5 vrstev epitelu, má tvar písmene U a její okraj vykazuje nerovnosti (Ooe, 1957; Tonge, 1969; Ruch, 1998; Pispá and Thesleff, 2003). Zevně od zubní lišty lze pozorovat vznik struktur lišty vestibulární, což je epitelová struktura dávající vznik přední ústní dutiny (*vestibulum oris*), která odděluje zuby od tváří a rtů. Ačkoli existuje mnoho teorií o původu dentální a vestibulární lišty, na základě longitudinální studie prenatalního vývoje člověka bylo prokázáno, že v horní čelisti se dentální a vestibulární struktury vyvíjejí samostatně (Hovorakova et al., 2005). V dolní čelisti byl jejich samostatný vývoj pozorován pouze v tvářové oblasti a v oblasti rtů vznikají obě struktury z jednoho epitelového ztlustění (Hovorakova et al., 2007)

Zubní lišta u myši se objevuje asi v ED 12,5 a liší se od lidské. Netvoří souvislou vrstvu ztlustělého epitelu, ale objevují se zde lokální nerovnosti. Ztlustělý epitel, formující zubní lištu, se objevuje v oblasti budoucích řezáků a stoliček. Formování vestibulární lišty probíhá podobně, jako u člověka (Peterkova, 1985; Peterková et al., 2002a).

#### **2.4.3 Zubní pupen**

Zubní pupen je tvořen vrstvou cylindrických buněk na bazální membráně, mezi nimiž se nacházejí menší buňky. Ke vzniku pupene a jeho správnému umístění v rámci ústní dutiny přispívá exprese SHH proteinu, který podporuje buněčnou proliferaci epitelálních buněk (Sarkar et al., 2000). U člověka se v tomto stádiu netvoří izolované zubní pupeny, ale ze zubního epitelu vzniká zubní val, na němž dochází k prostorovým zduřením epitelu podél předozadní osy čelistí (Hovorakova et al., 2007). Na vrcholu epitelu zubního pupenu dochází k tvorbě primárního sklovinného uzlu (pEK), který je charakteristický pro stádium zubního pohárku (Pispá and Thesleff, 2003).

U myšního modelu se zubní pupen objevuje v ED 13,5.

#### 2.4.4 Zubní pohárek

Zubní primordia můžeme u člověka na zubním valu zřetelně ohraničit až v tomto stádiu (Hovorakova *et al.*, 2007). Pro toto stádium je typická formace pEK. pEK je považován za řídicí centrum vývoje zubu a vzniká zahuštěním buněk vnitřního dentálního epitelu. Z histologického hlediska se jedná o skupinu semknutých buněk ve vnitřním sklovinném epitelu, které se nedělí, a které produkují specifické signální molekuly (Jernvall *et al.*, 1994; Vaahtokari *et al.*, 1996a). Rozdíly v proliferaci mezi pEK a okolím způsobuje změnu tvaru epitelu. Okolo pEK vniká epitel hlouběji do mezenchymu a vznikají tzv. cervikální kličky. Cervikální klička je oblast oddělující vnitřní a vnější dentální epitel a je tvořena hvězdicovitým retikulem. Jejich vzniku napomáhají mezenchymální faktory FGF stimulující buněčnou proliferaci v epitelu (Keränen *et al.*, 1998; Pispá & Thesleff, 2003). Dále probíhá diferenciací buněk, kdy epitel dává vznik sklovinnému orgánu, který se člení na vnitřní a vnější zubní epitel (IDE a ODE), hvězdicovité retikulum a *stratum intermedium*, které odděluje hvězdicovité retikulum a vnitřní zubní epitel. Vnitřní zubní epitel obklopuje kondenzovaný mezenchym tvoří zubní papilu, z níž později vzniká zubní dřev. Mezenchym vyskytující se kolem vnějšího zubního epitelu tvoří základ pro vznik ozubice (Ruch, 1998; Sarkar *et al.*, 2000). Zubní primordia můžeme na zubním valu zřetelně ohraničit až v tomto stádiu. V pozdní fázi zubního pohárku pravděpodobně dochází u buněk pEK k apoptóze (Vaahtokari *et al.*, 1996b).

U myši se stádium pohárku objevuje v ED 14,5 a při jeho vzniku se uplatňuje role signálního proteinu BMP4. Ten indukuje expresi markerů pro vznik pEK.

#### 2.4.5 Zubní zvonek

Ve stádiu zubního zvonku se začínají objevovat sekundární sklovinné uzly (sEK) na vrcholu každého hrbolku, které regulují tvar zubního zárodku a jeho hrbolků (Jernvall *et al.*, 1994; Vaahtokari *et al.*, 1996a). Ze zubní papily a z vnějšího zubního epitelu vznikají v pozdní fázi zubního zvonku odontoblasty a ameloblasty. Také zde lze pozorovat *stratum intermedium*, které odděluje hvězdicové retikulum od vnitřního zubního epitelu. *Stratum intermedium* nejdříve vzniká v blízkosti sekundárního sklovinného uzlu. Poté, co je tento uzel odstraněn pomocí apoptózy, *stratum intermedium* plně obsazuje jeho místo, dochází k jeho ztlustění a vytvoření 3 – 5 vrstev dlaždicového epitelu. Tomuto procesu zásadně napomáhá signální molekula *Shh* (Koyama *et al.*, 2001; Ruch, 1998). V pozdním stádiu zubního zvonku se iniciuje růst kořene. V místě

cervikální kličky vrůstá dentální epitel dál do mezenchymu a vytváří tzv. Hertwigovu epiteliální kořenovou pochvu. Ta iniciuje a řídí růst kořene.

Cervikální kličky se u řezáků nepřeměňují v Hertwigovu pochvu, ale jsou u nich přítomny po celý život, jelikož jim zuby kontinuálně dorůstají, a jsou obecně považovány za rezervoár kmenových buněk (Harada *et al.*, 1999). U zubů, které ukončují svůj růst, podléhají zubní kličky strukturální přeměně v Hertwigovu pochvu stejně jako u lidí. Stádium zubního zvonku se u myši vyskytuje v ED 16,5.

## 2.5 Molekulární regulace vývoje zubů

Interakce mezi buňkami a tkáněmi jsou hlavním mechanismem regulace vývoje všech mnohobuněčných organizmů. I vývoj zubů je řízen recipročními indukčními interakcemi mezi epitelem a mesenchymem. Tyto interakce zahrnují komplexní působení signálních molekul, transkripčních faktorů, růstových faktorů a jejich receptorů s prostorově a časově omezenými expresními vzory (Jernvall and Thesleff, 2000). S vývojem zubů jsou nejvíce spojeny konzervované signální dráhy *Wnt*, *FGF* (fibroblastový růstový faktor), *Bmp* (kostní morfogenetický protein), *TNF* (tumor nekrotizující faktor), *TGF β* (Transformující růstový faktor β), *Shh* (Sonic hedgehog) a *Notch*, které vzájemným spolupůsobením regulují tvary jednotlivých zubů, jejich počet či prostorovou lokalizaci (Thesleff and Sharpe, 1997).

### 2.5.1 *Wnt* signální dráha:

*Wnt* signální dráha je evolučně konzervovaná dráha. Geny *Wnt* rodiny kódují sekreční glykoproteiny, které jsou zodpovědné za správný embryonální vývoj a působí na řadu procesů jako je regulace determinace polarity, proliferace, diferenciace, migrace a apoptóza buněk (Moon and Shah, 2002; Willert *et al.*, 2003). Název této dráhy vznikl spojením názvů dvou genů, genu *wingless* – *Wg* („segment polarity gene“) vyskytujícího se u drozofily a jeho homologu u obratlovců – *int-1* („integrated) (Wainwright *et al.*, 1988; Nusse and Varmus, 1992). Narušení této dráhy je jedním z hlavních faktorů vzniku nádorů v tlustém střevě i v dalších tkáních (Polakis, 2000), hraje také roli ve skeletální dysplazii či osteoporóze (Clevers, 2006).

Extracelulární *Wnt* signál je podnětem pro vznik jedné ze dvou signálních kaskád. Prvním typem signální kaskády je dráha závislá na Wnt/β-*katenu*nu, kanonická dráha. Druhá dráha je nekanonická, nazývaná též Wnt/β-*katenu*n nezávislá dráha. Nekanonická dráha se dále dělí na PCP dráhu (Planar cell polarity), *Wnt/Ca<sup>2+</sup>* dráhu a dráhu aktivace

fosfolipázy C (PLC) a fosfodiesterasy (PDE) (Kohn and Moon, 2005; Moon, 2005; Komiya and Habas, 2008).

Nejlépe prozkoumaná je kanonická signální dráha. Je důležitá pro tvorbu chondrocytů a zodpovídá za vznik a diferenciaci buněk kostní tkáně prostřednictvím osteoblastů i osteoklastů. Uplatňuje se také při regeneraci kostní tkáně, kdy jsou pomocí  $\beta$ -katenin stimulovány pluripotentní buňky k diferenciaci na osteoblasty. Významná je také role této dráhy v odontogenezi. Jelikož se  $\beta$ -katenin podílí na vzniku primárního sklovinného uzlu, jeho zvýšená exprese může způsobit vývoj nadpočetného zuby, a to dokonce i mimo dentální epitel (Cobourne and Sharpe, 2010). Příčinou je tvorba nového sklovinného uzlu mimo již existující zubní základ (Liu and Millar, 2010). Naopak inhibice této dráhy je příčinou abnormálně tvarovaných zubů (Tamura and Nemoto, 2016) a v časně fázi vývoje zuby zastaví vývoj zuby před stádiem pupenu (van Genderon *et al.*, 1994).

### **2.5.2 FGF signální dráha:**

*FGF* signální dráha je rodina 22 polypeptidových růstových faktorů, které lze nalézt u obratlovců i bezobratlých. Hrají důležitou roli zejména jako mitogeny, ale podílí se také na proliferaci, diferenciaci a migraci buněk během embryonálního vývoje (Hongo, *et al.*, 1999; Koga *et al.*, 1999; Nutt *et al.*, 2001). V dalším vývoji se podílí na hojení ran a tvorbě nových kapilár (Yun *et al.*, 2010). Přenos FGF signálů do cytoplasmy buňky je zprostředkován skupinou čtyř transmembránových tyrosin-kinázových receptorů (Fibroblast growth factor receptors – FGFR 1/2/3/4), z nichž dva byly detekovány také ve vyvíjejícím se zuby (Peters *et al.*, 1992). FGF jsou také schopny vazebné interakce s heparinem. Tyto interakce ale neslouží k přenosu signálu, ale regulují a aktivují signální receptory (Ornitz *et al.*, 1996). *Fgf* signalizace je důležitá již v raných fázích vývoje zuby. Společně s *Bmp* dráhou aktivuje transkripční faktory *Msx1* a *Pax9*. Chybná funkce těchto faktorů způsobuje zastavení vývoje zuby ve stádiu zubního pupene.

### **2.5.3 TGF $\beta$ signální dráha:**

*TGF  $\beta$*  je velká, evolučně konzervovaná rodina pojmenovaná podle svého prvního identifikovaného člena *TGF $\beta$*  (Roberts *et al.*, 1981). Je tvořena více než 35 členy, kteří se dále dělí na jednotlivé sub-rodiny (Kingsley, 1994). Tyto signální molekuly významnou měrou přispívají k regulaci diferenciaci, proliferaci, apoptózy a dalších procesů (Glick

*et al.*, 1993; Motyl *et al.*, 1998). Zároveň se účastní tvorby tkáňové matrix a složek imunitního systému (Heldin *et al.*, 1997; Tompkins, 2006).

Tato rodina má svou důležitou úlohu i v odontogenezi. Interakce mezi *Bmp* a *Fgf* signalizací regulují prostorové aspekty formace zubu (Neubüser *et al.*, 1997). *Bmp4* indukuje apoptózu ve sklovinném uzlu, a tím sekundárně reguluje morfogenezi hrbolků (Jernvall *et al.*, 1998; Jernvall and Thesleff, 2000). Aktivin  $\beta A$  je nezbytný pro tvorbu řezáků a mandibulárních molárů (Ferguson *et al.*, 2001). Exprese genu Osterix (*Osx*), slouží jako hlavní regulátor diferenciacce cementoblastů a tvorby celulárního cementu. Také se podílí na vzniku zubních kořenů (Choi *et al.*, 2016).

#### **2.5.4 *Hh* signální dráha:**

Rodina signálních molekul *Hh* (hedgehog) Byla původně objevena u bezobratlých (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Název této rodiny byl odvozen od fenotypu *Hh* mutantní larvy drosophily. Zatím co u bezobratlých existuje pouze jeden *Hh* gen, u obratlovců můžeme nalézt 3 jeho homology, Sonic Hedgehog (*Shh*), Indian Hedgehog (*Ihh*) a Desert Hedgehog (*Dhh*). Tyto geny jsou mezi myší a člověkem vysoce konzervovány (Marigo *et al.*, 1995). *Hh* signální dráha je důležitá pro morfogenezi řady tkání a orgánů během vývoje organismů jak u bezobratlých, tak u obratlovců. Například reguluje osud buněk a jejich počet v mozku a míše a zasahuje do vývoje končetin a vnitřních orgánů (Ingham and McMahon, 2001). Zároveň se podílí na udržení kmenových buněk (Beachy *et al.*, 2004).

*Shh* signální dráha je součástí hedgehog rodiny a podílí se na vývoji orgánů u obratlovců. *Shh* je považován za marker časně odontogeneze (Bitgood and McMahon, 1995). Hraje důležitou roli v zubní iniciaci. Jeho signalizace je aktivována již ve stádiu epitelového ztlustění a je limitována pouze na epiteliální buňky (Iseki *et al.*, 1996; Hardcastle *et al.*, 1998). *Shh* je dále exprimováno také v signálním centru pEK, který řídí další vývoj zubu. Podílí se na přeměně zubního pohárku na zubní zvonek a ovlivňuje konečný tvar zubu a uspořádání zubních hrbolků (Dassule *et al.*, 2000). Narušení této dráhy vede u člověka k mnoha poruchám, jako jsou například Gorlinův syndrom či Greigova cefalopolysyndaktylie (McMahon *et al.*, 2003), u myších embryí s *Shh* deficiencí se vůbec nevyvíjí první žaberní oblouk (Chiang *et al.*, 1996).

### 2.5.5 *TNF* signální dráha

Rodina *TNF* se skládá z 18 cytokinových ligandů a jejich 29 receptorů (Richard *et al.*, 2016). Molekuly *TNF* jsou produkovány především makrofágy jako reakce imunitního systému na bakteriální produkty v těle. V menším množství jsou tvořeny i lymfoidními, žírnými a endoteliálními buňkami, fibroblasty a buňkami nervové tkáně. Tumor nekrotizující faktor (*TNF*) dostal název na základě své schopnosti vyvolat hemoragickou nekrózu v myších nádorech. Také má schopnost selektivně ničit buňky, které jsou transformované a podílí se na imunitních reakcích při zánětu (Marino *et al.*, 1997). V imunitních reakcích stimuluje zrání buněk a buněčnou smrt a má vliv na udržení kostní homeostázy, vývoj endokrinních žláz a nervové soustavy. Dlouhodobé vystavení organismu účinkům *TNF* může vést k celkové sešlosti neboli kachexii (Wajant *et al.*, 2003). Dalšími geny *TNF* dráhy, které hrají roli v odontogenezi jsou *Rank*, *Rank1* a *Opg*. Tyto geny jsou exprimovány v zubním epitelu i mezenchymu a jsou nezbytné pro diferenciaci osteoklastů a formování zubu (Ohazama *et al.*, 2004).

Členem *TNF* signální dráhy je ectodysplasin (*Eda*).

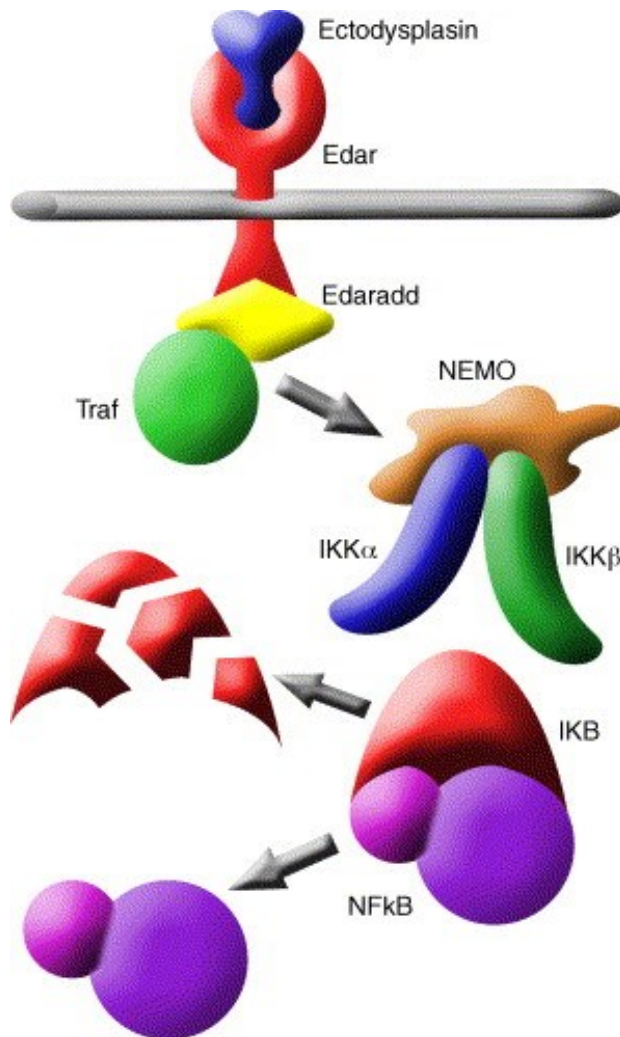
## 3 *Eda* gen

*Eda* gen kóduje transmembránový protein EDA, který patří do rodiny *TNF*.

Existují 2 sestříhové varianty *Eda* genu, které kódují funkční proteiny: *Eda-A1* a *Eda-A2*, lišící se pouze ve 2 aminokyselinách (Bayés *et al.*, 1998). Obě varianty kódují transmembránový protein. Ten je aktivován odštěpením od plasmatické membrány za vzniku solubilního ligandu, který interaguje s odpovídajícím receptorem. *Eda-A1* interaguje s receptorem EDAR (Ectodysplasin receptor) (Obr. 5) a *EDA-A2* interaguje s receptorem XEDAR (X-linked ectodermal dysplasia receptor).

Obecně platí, že *TNF* receptory bez tzv. „domény smrti“ (XEDAR) iniciují intracelulární signalizaci přímo pomocí TRAF (TNF receptor associated factor). Pokud receptor tuto doménu obsahuje (EDAR), pak je mezičlánkem mezi receptorem a TRAF ještě adapterový protein (Courtney *et al.*, 2005). Adaptérovým proteinem pro EDAR je EDARADD (EDAR associated adapter protein) (Headon *et al.*, 2001). Existuje 6 členů TRAF rodiny a zatím není zcela jasné, který je zodpovědný za přenos signálu EDA. Celá tato signální dráha vede k aktivaci NFκB transkripčních faktorů pomocí IκK kinázy. IκK inhibuje NFκB a ten zůstává v cytoplasmě buňky. Po aktivaci vstupují transkripční faktory z cytoplasmy do jádra a zde aktivují cílové geny. *Eda/NFκB* signální dráha je

evolučně vysoce konzervovaná a je zapojena do morfogeneze ektodermálních derivátů obratlovců. Podílí se i na tvaru zubů na mnoha různých úrovních (Courtney *et al.*, 2005).



**Obr. 5: Schéma *Eda* signální dráhy.** EDA protein interaguje s transmembránovým receptorem EDAR, který naváže intracelulární adaptorový protein EDARADD. Na EDARADD se prostřednictvím domény smrti váže TRAF, což vede k aktivaci NFκB transkripčních faktorů pomocí IκK komplexu. Transkripční faktory NFκB následně vstupují do jádra buňky, kde aktivují transkripci cílových genů (upraveno dle Courtney *et al.*, 2005).

### 3.1 *Eda* a vývoj zubů

Během vývoje zubů se exprese *Eda* nejdříve objevuje v ústním epitelu na ED 10, ještě před počátkem zubního vývoje. Během iniciace vývoje (ED 11) až do stádia pupenu (ED 12) je *Eda* stále exprimován v ústním epitelu v oblasti zubního epitelu chybí. Během dalšího zubního vývoje je *Eda* exprimován ve vnějším sklovinném epitelu (Tucker *et al.*, 2000). Hlavní úloha *Eda* signální dráhy pravděpodobně spočívá v kontrole epitelových



struktur, jejich velikosti, hustoty i množství (Sadier *et al.*, 2014), což odpovídá předchozím pozorováním, kdy bylo zjištěno, že *Eda* gen má vliv na velikost signálních center budoucí dentice (Mustonen *et al.*, 2004). Bylo také zjištěno, že *Eda* signalizace je nezbytná pro dobu před ED 11,0, kdy se ustavuje oblast budoucích molárů (Tucker *et al.*, 2004). Důležitá je zřejmě také interakce EDA/EDAR. Zdá se, že nadbytek aktivního EDA receptoru může ovlivnit počet zubů i zubních hrbolků (Tucker *et al.*, 2004). Přebytečný EDAR pravděpodobně vychytá EDA a vývoj dále pokračuje obdobně jako u *Eda* mutantních myší (viz dále kap. 8.1), tedy směrem k redukci dentice či tvorbě nadpočetných zubních základů.

### 3.2 *Eda* ve vztahu k dalším signálním drahám

*Eda* signální dráha získává v rámci vývoje ektodermálních derivátů čím dál více pozornosti. Důvodem je především její konzervovaná role v ovlivňování velikosti či vývoje jednotlivých ektodermálních derivátů, bez velmi vážných důsledků pro organismus (Sadier *et al.*, 2014). *Eda* i *Edar* signální dráha je regulována pomocí *Wnt* signální dráhy (Mikolla *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2009). *Edar* dráha je také regulována pomocí *Bmp* a Activin signální dráhy (Laurikkala *et al.*, 2002). Byly také identifikovány cílové dráhy pro *Edar* včetně *Shh*, *FGF20*, *Wnt* a další (Mikolla *et al.*, 2008). Ve všech těchto případech *Eda* může regulovat sílu a rozsah působení těchto signálních drah. Díky tomuto vlivu hraje pravděpodobně *Eda* signální dráha významnou roli v evoluci, protože na rozdíl od hlavních signálních drah není pro organismus esenciální a její efekt pro něj nebývá letální.

V rámci vývoje zubů byly zjištěny další interakce *Eda* signální dráhy s jinými drahami. Předpokládá se, že expresi *Eda* přímo stimuluje signální dráha *Wnt/β-catenin*. Členové *Wnt* signální dráhy *lef-1* a *Dkk1* mají totiž prokazatelný vliv na expresi *Eda* (Laurikkala *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008). *Eda* signální dráha má vliv také na *TGF β* signální dráhu tím, že inhibuje aktivitu *Bmp* což stimuluje expresi *Shh* (Pummila *et al.*, 2007).

### 3.3 Poruchy *Eda* signální dráhy

Mutace v *Eda* genu a dalších genů účastnících se stejné signální dráhy způsobuje syndrom hypohidrotické ektodermální dysplázie (HED). U člověka popsal tento syndrom v roce 1875 Charles Darwin. Projevuje se abnormálním vývojem ektodermálních

derivátů, jako jsou zuby, vlasy a exokrinní žlázy. Existuje X-vázaná forma HED (XLHED), která je způsobena mutací přímo v *Eda* genu lokalizovaném na X chromozomu a také autozomální formy, které jsou způsobeny mutací v genu pro receptor *Edar* a pro adaptorový protein EDARADD (Kere *et al.*, 1996; Headon and Overbeek, 1999; Headon *et al.*, 2001).

Pacienti s HED mají redukované ochlupení, řídké vlasy a tenkou suchou kůži. Vyskytují se u nich defekty nehtů a dochází k poruchám ve funkci exokrinních žláz. V důsledku postižení potních žláz dochází ke zhoršené schopnosti odolávat vysokým teplotám. Je znám také výskyt četných respiračních problémů, kvůli redukcii exokrinních žlázek ve sliznici bronchů a trachey (Fete, 2014). Postižené mohou být i další exokrinní žlázy včetně slzných, slinných, mazových a mléčných.

Mezi příznaky HED patří také postižení zubů, které je v centru našeho zájmu. Pacienti mají široký rozsah fenotypových variací, mohou trpět jak úplnou anodoncií (úplné chybění zubů), tak lehčí oligodoncií (chybění většího počtu zubů) či hypodoncií (chybění méně než 6 zubů) spojenou s anomáliemi ve tvaru i velikosti zubů. Nejčastěji bývá vyvinutých pouze 5-7 zubů, především špičáky a první stoličky. Zuby jsou menší než obvykle a mají kónický tvar (Clauss *et al.*, 2010). V méně závažných případech se kromě chybějících řezáků neobjevují žádné klinické příznaky (Tarpey *et al.*, 2007).

V současné době jsou již úspěšně testovány možnosti terapie HED pomocí intraamniální aplikace rekombinantního proteinu s receptor vážící doménou pro EDA (Schneider *et al.*, 2018).

Myší variantou HED trpí myší kmen se spontánní mutací v genu *Eda* nazývaný také Tabby podle klasického zabarvení heterozygotních samic (viz níže).

### **3.4 *Eda* mutantní myši (tabby)**

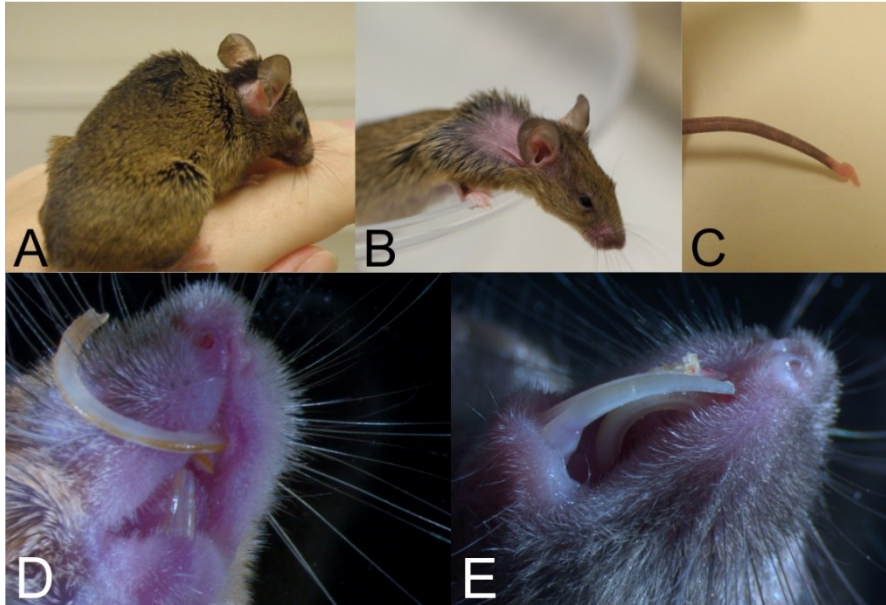
Stejný syndrom jako HED u člověka byl později popsán i u dalších obratlovců včetně myši (Falconer, 1952). *Eda* mutantní myši vznikly spontánní mutací. Jedná se o delecii v 5' oblasti *Eda* genu, který se nachází na chromozomu X a je homologní pro lidský *Eda* gen (Ferguson *et al.*, 1997; Srivastava *et al.*, 1997). V literatuře bývají tyto myši také označovány jako Tabby, tedy „mourovaté“, dle srsti heterozygotních samic (Obr. 6). Ačkoli u nich dochází k mutaci v *Eda* genu, nevykazují tyto myši plnou

deficienci EDA proteinu (Melnick *et al.*, 2009). Proto jsou v této práci, na rozdíl od dosud publikované literatury, nazývány jako *Eda* mutantní.

Fenotyp *Eda* mutantních myši je podobný jako u pacientů s HED. Můžeme u nich pozorovat hnědou řídkou srst, lysiny za ušima a četné vady dentice. Dále se u nich vyskytuje zalomení konce ocásku, snížená fertilita i množství mláďat ve vrhu (Gruneberg, 1965) (Ob. 7). Během vývoje zubních základů *Eda* mutantních myši dochází ke vzniku zubních malformací, a to především v dolní čelisti. Zuby dospělých *Eda* mutantních myši vykazují řadu abnormalit v počtu i tvaru. Postiženy bývají řezáky i stoličky, horní i dolní čelisti (Gruneberg, 1965; Kristenova-Cermakova *et al.*, 2002). Na pozdních stádiích prenatalního vývoje bývá řezák u *Eda* mutantních myši kratší a užší (Miard *et al.*, 1999). U dospělců však díky abnormalitám v postavení řezáků velmi často dochází k jejich přerůstání (obr. 7 – D,E). U molárů jsou tyto abnormality pozorovatelné již v dřívějších stádiích vývoje. Výsledkem bývá menší korunka a snížený počet zubních hrbolků (Pispa *et al.*, 1999). Dále u některých jedinců dochází ke vzniku nadpočetného moláru anteriorně od M1, či nevyvinutí M3. Rozdíly ve fenotypovém projevu v oblasti dentice jsou zapříčiněny různými morfotypy *Eda* mutantních myši (Kristenova *et al.*, 2003).



**Obr. 6: Heterozygotní samice *Eda* myši.** Fenotyp heterozygotní *Eda* samice, který se vyznačuje především mourovatou/pruhovanou srstí.



**Obr. 7: Zobrazení znaku *Eda* mutantních myší.** *Eda* mutantní samice s hnědou řídkou srstí (A) s lysinami za ušima (B) a zalomeným koncem ocásku (C). Jedna z vad dentice u *Eda* mutantních myší jsou také přerostlé, hypoplastické a hypomineralizované řezáky. Na obrázku (D) je ukázka přerostlého horního řezáku, na obrázku (E) je kombinace přerostlých horních i dolních řezáku s jejich hypoplasií.

## 4 Cíle diplomové práce

Pro pochopení abnormálního vývoje zubů a také ostatních ektodermálních derivátů u X-vázané ektodermální dysplázie, je třeba co nejpřesněji prozkoumat vliv *Eda* genu při normogenezi zubů a zjistit, jaké změny v zubním vývoji způsobuje porucha jeho exprese s důsledkem nedostatku EDA proteinu.

Cílem této diplomové práce bylo:

1. Porovnání morfogeneze dentálního epitelu v řezákové a molárové oblasti u *Eda* mutantních myší s CD1 kontrolou od ED 13,5 do ED 17,5 a porovnání dynamiky *Shh* exprese v signálních centrech jednotlivých zubních základů za využití metody fluorescenční mikroskopie a disociace dentálních epitelů.
2. Zhodnocení vlivu nedostatečné exprese *Eda* genu na expresi *Shh* coby odontogenického markeru s využitím *Eda* mutantních myší s typickým zubním fenotypovým projevem (nadpočetné stoličky, hypoplastické řezáky, hypomineralizace skloviny).

## 5 Materiál

Vývoj zubů byl sledován na myši domácí (mus musculus).

### 5.1 *Eda* mutantní myši (EDATa/0)

*Eda* mutantní myši (Obr. 8), podle klasického zbarvení srsti heterozygotních jedinců označované jako Tabby, vznikají spontánní mutací v genu *Eda*. Chovné páry generované z inbrední linie (B6CBACa-AW-J/A-EDATa/0) byly zakoupeny v Jackson laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). *Eda* gen se nachází na X chromozomu, takže mutantní samci budou vždy hemizygotní. Samice mohou být homozygotní pro mutovanou alelu, heterozygotní, nebo i hemizygotní v případě, že chybí nebo je inaktivovaný jeden X chromosom. Tento kmen se standardně používá jako model pro studium XLHED, přičemž jedinci pochází z křížení homozygotních či hemizygotních samic s hemizygotními samci, tudíž jsou vždy homo- nebo hemizygotní. V našem případě jako kontrola sloužily především CD1 myši, dále Rosa26LacZ myši a také myši pocházející ze stejného chovu jako sledované mutantní myši, jejichž fenotyp i genotyp odpovídá wild type myším.



**Obr. 8:** Samice *Eda* mutantní myši s typickým rezavým zbarvením srsti a lysinami za ušima.

## 5.2 EDATa/0 x B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J

Pro sledování pod fluorescenčním mikroskopem byla využívána embrya *Eda* mutantních samic zkřížených s *Eda-Shh(EGFP)* samci. Ti byli vygenerováni v naší laboratoři křížením *Eda* myši s B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J nesoucími gen pro fúzní produkt EGFP/Cre (Gagneten et al., 1997), který je vložen do lokusu *Shh*, což má za následek produkci GFP v buňkách, které normálně exprimují *Shh* mRNA (Harfe et al., 2004). Toto křížení nám umožnilo detekci signálních center *Shh* u zubních základů v embryonálních čelistech s pomocí vizualizace zelené fluorescence. Chovné páry B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J byly zakoupeny v Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA).

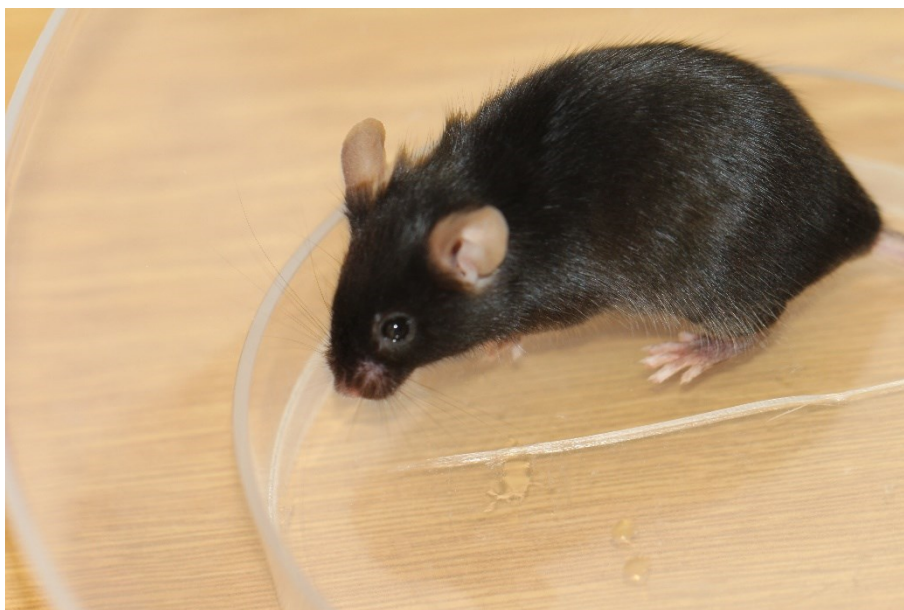
## 5.3 EDATa/0/Rosa26LacZ a EDATa/0 /B6.129S6-

### Shh<tm2(cre/ERT2)Cjt>/J myši pro Cre-LoxP systém

Pro vizualizaci descendentní linie buněk exprimujících *Shh* během embryonálního vývoje byl použit Cre/loxP systém s využitím detekce galaktosidázové aktivity barvením X-galem. Cre/loxP systém je založen na křížení myši se STOP sekvencí mezi 2 LoxP místy a genem pro *LacZ* (Rosa26LacZ) s myšmi nesoucími gen pro cre rekombinázu (B6.129S6-Shh<tm2(cre/ERT2)Cjt>/J). U potomstva tohoto křížení dojde k vyštěpení STOP sekvence a započne exprese *LacZ* ve všech buňkách, které transkribují gen pro cre rekombinázu. V našem případě v buňkách exprimujících *Shh*. Tento systém nám umožnil detekovat descendentní linie buněk exprimujících *Shh* od aplikace tamoxifenu do odběru embryonálního materiálu.

Byla použita opět *Eda* homozygotní a hemizygotní embrya, která vznikla křížením kmene EDATa/0/ B6.129S6-Shh<tm2(cre/ERT2)Cjt>/J samců a EDATa/0/Rosa26LacZ samic. Oba kmeny byly vygenerovány v naší laboratoři a vznikly křížením *Eda* myši s kmeny Rosa26LacZ (B6.129S4-Gt(ROSA)26Sortm1Sor/J) a B6.129S6-Shh<tm2(cre/ERT2)Cjt>/J. Chovné páry obou kmenů byly původně zakoupeny v Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA).

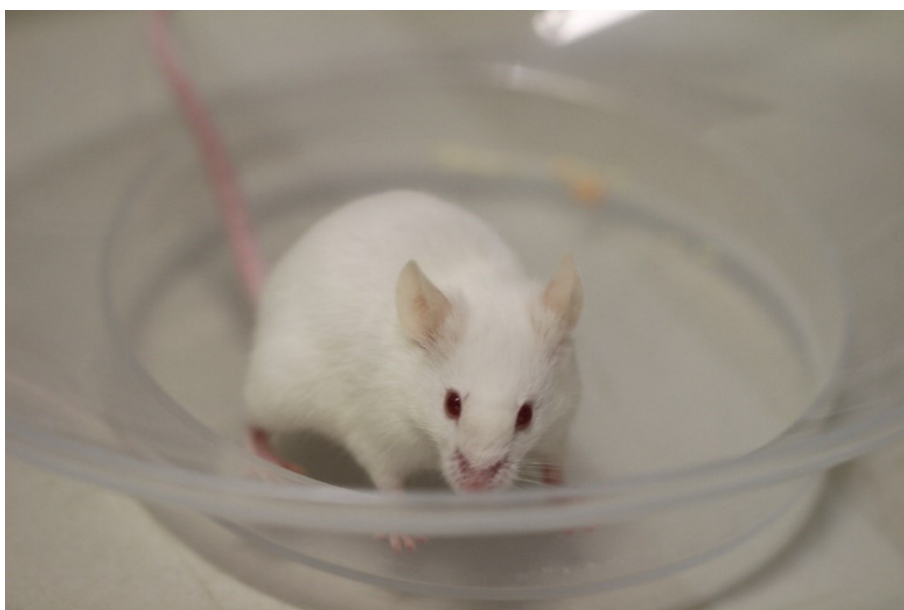
Jako kontrola nám v tomto případě sloužil embryonální materiál vygenerovaný křížením Rosa26LacZ myši se samci B6.129S6-Shh<tm2(cre/ERT2)Cjt>/J z archivu oddělení (Obr. 9).



**Obr. 9: Samice Rosa26LacZ myši**

#### **5.4 CD1 myši**

Kmen myši CD1 je užívaný jako univerzální model a kontrolní wild-type (WT), především díky vysokému množství potomků (Obr. 10). Chovné páry byly zakoupeny z Charles River (Germany). V našem případě byly tyto myši používány pro křížení se samci B6.Cg-Shhtm1(EGFP/cre)Cjt/J. Embrya z tohoto křížení byla použita jako kontrolní pro fluorescenční mikroskopii.



**Obr. 10: Samice CD1 myši**



Všechny použité myši pro připouštění za účelem experimentálního využití embryí pocházejí z vlastních chovů. Ustájení zvířat a provedení experimentů bylo v souladu s národními i mezinárodními pravidly (zákon č. 246/1992). Experimenty v rámci této studie byly schváleny Odbornou komisí Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i. na ochranu zvířat proti týrání a Komisí Akademie věd ČR (projekty pokusů č. 81/2017, 102/2013).

## 6 Metody

### 6.1 Připouštění myší a odběr embryí

Samice myší příslušných kmenů byly přes noc připuštěny k odpovídajícím samecům a druhý den ráno u nich byla zjišťována přítomnost vaginální zátky. Vaginální zátka se tvoří po oplození, a tedy slouží jako poměrně spolehlivý indikátor zabřeznutí. Půlnoc před odečtením vaginální zátky byla určena jako ED 0,0. Březí samice byly usmrceny cervikální dislokací a embrya byla odebrána na stádiích ED 12,5, 13,5, 14,5, 15,5, 16,5, 17,5 a 18,5 vždy mezi 10. a 14. hodinou. Embrya byla po usmrcení samice vyjmuta z dělohy a zárodečných obalů, zbavena přebytečné tekutiny a zvážena kvůli upřesnění jejich biologického věku. Jejich hmotnost totiž dobře koreluje se stádiem vývoje (Peterka *et al.*, 2002)

Celkově bylo zabito 73 samic myší a odebráno 498 embryí. Přesný popis jejich využití v této studii obsahuje tab. 1. Aktuálně nevyužitá embrya či jejich části byly po fixaci prosyceny methanolem a uchovány v -20°C pro pozdější využití.

	<i>Eda<sub>mut</sub></i>							CD1							<i>Eda</i> WT		
	12,5	13,5	14,5	15,5	16,5	17,5	18,5	12,5	13,5	14,5	15,5	16,5	17,5	18,5	12,5	13,5	14,5
<b>Disociace epitelů</b>	x	5	8	14	1	8	x	x	9	7	6	6	5	x	x	x	x
<b>Cre-LoxP</b>	14	8	9	11	7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Apotom</b>	x	x	4	x	x	x	x	x	x	7	x	x	x	x	x	x	4
<b>Western blot</b>	8	x	12	x	x	x	x	13	x	16	x	x	x	x	2	15	20
<b>Imunohistochemie</b>	x	x	2	x	x	x	x	x	14	31	12	14	7	11	x	1	2
<b>Celkem</b>	111							158							44		

**Tab.1: Tabulka odebraných embryí pro jednotlivé metody.**

## 6.2 Disociace epitelů

Na odebraných embryích pocházejících z křížení homozygotních či hemizygotních samic *Eda* myši se samci *Eda/ShhEgfp* byla pozorována pod fluorescenční lupou Zeiss (ZEISS Axio Zoom.V16) aktuální exprese *Shh*. Tato exprese je nejlépe viditelná ve vlasových folikulech v oblasti čumáku. Pro bližší pozorování této exprese v zubních základech byla zvolena metoda disociace epitelů. Embrya byla vložena do Hanksova média (Sigma) a dále tříděna pomocí fluorescenční lupy Zeiss (ZEISS Axio Zoom.V16) dle přítomnosti zelené fluorescence v chlupových folikulech. Pro další zpracování byla pro disociaci epitelů použita pouze GFP pozitivní embrya. Jednotlivým embryím byla oddělena hlavička a z dolní čelisti byly vypreparovány zubní zárodky z řezákové i z tvářové oblasti. Ty byly odebrány do plastové Petriho misky (Nunc) do 1 ml Hanksova média. Médium v miskách bylo poté nahrazeno 1% roztokem trypsinu (Difco Laboratories) (0,1 g trypsinu na 10 ml Hanksova média). Tkáň zubních zárodků byla v tomto roztoku inkubována ve 4°C po dobu přibližně jedné hodiny. Po uplynutí optimální doby inkubace (přibližně 1 hodina) byl epitel zubního zárodku opatrně oddělen od mezenchymu pomocí injekčních jehel a přenesen do plastové Petriho misky s Hanksovým médiem, v kterém byly epitely snímány pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Leica AF6000 (Leica Microsystems GmbH). *Shh* expresní domény byly determinovány díky zelené fluorescenci v buňkách aktuálně exprimujících *Shh*. Stejnou metodou byla jako kontrola zpracována embrya pocházejících z křížení CD1 samic s *CD1/ShhEGFP* pozitivními samci.

Byly zanalyzovány epitely z 37 embryí *Eda* mutantních myši a 33 embryí CD1 myši sloužících v tomto případě jako kontrolní (viz Tab. 1). Z nasnímaných epitelů byla vygenerována referenční longitudinální řada pro hodnocení morfogeneze zubního epitelu u mutantních a kontrolních myši a pro jejich vzájemné srovnání.

## 6.3 Sledování buněčných linií

Pro sledování dynamiky buněčných populací exprimujících byl využit Cre-LoxP systém. Systém je založen na detekci galaktosidázové aktivity pomocí X-Gal barvení. X-gal je organická sloučenina složená z galaktózy a indolu (5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), která je štěpena galaktosidázou (kódovanou genem *LacZ*). Dochází ke vzniku galaktózy a 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindolu, který je oxidován na modrou nerozpustnou sloučeninu, 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo. Toto nám umožnilo

sledovat všechny buňky u nichž došlo k transkripci *Shh* a jejich potomky, díky jejich modrému zbarvení.

Námi použitý systém byl Tamoxifenem indukovatelný, to znamená, že je nutné aplikovat březí myši dávku tamoxifenu (Sigma) v námi požadovaný den březosti, aby došlo k přepisu Cre-rekombinázy, a jsme schopni detekovat buněčné linie exprimující *Shh* od chvíle aplikace tamoxifenu až po odběr embrya.

Tamoxifen rozpuštěný v Corn oil (Sigma) byl myši injekční jehlou aplikován do peritoneální dutiny. Dávka tamoxifenu byla přibližně 0,225 mg na 1 g tělesné hmotnosti (Hayashi and McMahon, 2002) na ED 11,5; 12,5 a 13,5.

Odebraným embryím byly odděleny hlavičky a vloženy do sodného fosfátového pufru, následně byly fixovány po dobu 20 min. ve 4% PFA ve 4°C. Poté byly vzorky opět promyty v sodném fosfátovém pufru a inkubovány v barvicím roztoku při 37°C přes noc. Po detekci signálu byly hlavičky promyty v PBS a přes noc fixovány v 4% PFA. Další den byly opět promyty PBS a nafoceny pomocí stereolupy (Leica MZ6) a digitální kamery (Leica EC3). Po nafocení bylo třeba vzorky opět fixovat pro histologické zpracování. Byly fixovány po dobu 1 týdne v roztoku Bouin (Penta) a poté zality do parafínu, sériově frontálně nakrájeny na rotačním mikrotomu a dobarveny jádrovou červení.

### **Sodný fosfátový pufr**

Sodný fosfátový pufr je složený ze 115ml roztoku A a 385 ml roztoku B.

A: 6g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  v 500 ml destilované vody

B: 13,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  v 500 ml destilované vody

### **Barvicí roztok**

100 ml sodného fosfátového pufru

62,5 mg KCl

20,3 mg  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

126 mg  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

98,7 mg  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

Těsně před použitím přidáme na 10 ml barvicího roztoku 240  $\mu$ l X-gal (50 mg/ml DMF).

Pro metodu Cre-LoxP bylo odebráno 49 EDATa/0/Rosa26LacZ samic křížených s EDATa/0/B6.129S6-Shh<sup>tm2(cre/ERT2)</sup>Cjt<sup>></sup>/J samci (viz Tab. 1). Jako kontrola byl použit embryonální materiál z archivu Oddělení vývojové biologie.

#### 6.4 Odběr embryí na western blot

Za účelem kvantifikace exprese sledovaných proteinů byl využit western blot. Odběr embryí pro tuto metodu se liší od klasických odběrů především tím, že se tkáň vůbec nefixuje. Děloha vyndaná z myši byla otevřena v Petriho misce s chlazeným roztokem PBS:Depcová voda (1:1). Embrya vyndaná z plodových obalů byla rychle zvážena a v již zmíněném roztoku jim byly vypreparovány obě čelisti. Ty byly vloženy do mikroskopavky a okamžitě zmrazeny na suchém ledu. Takto odebrané vzorky byly uchovávány v -80°C.

#### 6.5 Western blot

Western blot byl použit ke kvantifikaci SHH a EDA proteinu u *Eda* mutantů a kontrol (viz Tab. materiál). Odebrané vzorky byly lyzovány pomocí lyzačního pufru (500  $\mu$ l na vzorek) a mechanického rozmělnování. Během lyzačního procesu byly vzorky stále drženy na ledu. Ke 100  $\mu$ l lyzátu bylo přidáno stejné množství 2x Laemmliho pufru. Směs byla inkubována po dobu 10 min v 95°C, následně zchlazena a pipetována na SDS-Page elektroforézu. SDS-Page elektroforéza probíhá vertikálně v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného. Zde dochází k separaci proteinů. Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut a vložen do blotovací aparatury. Pro zachycení proteinu byla použita polyvinylidifluoridová (PVDF) i nitrocelulózoová membrána. Membrány byly dále vloženy na 45 min do blokovacího roztoku a poté byla aplikována primární protilátka v požadované koncentraci (Tab. 2). Membrány s primární protilátkou byly inkubovány přes noc ve 4°C.

Další den byly membrány promývány 3 x 5 min v PBS (PVDF membrána) nebo v 0,05% PBS-T (nitrocelulózoová membrána). K membránám byla přidána fluorescenční/ peroxidázová sekundární protilátka (Tab. 2), v níž byly membrány inkubované 1 hodinu. Následovalo další promytí 3 x 5 min v PBS/ PBS-T a membrány byly vyvolány na

přístroji Li-cor Odyssey 9120 (LI-COR Biotechnology) případně pomocí chemoluminiscence. Při vyvolávání pomocí chemoluminiscence bylo nutné použít substrát Milipore Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Merck).

	<b>Primární protilátky</b>	<b>Koncentrace</b>	<b>Sekundární protilátky</b>	<b>Koncentrace</b>
Fluorescence	<b>Rabbit polyclonal SHH</b> (sc-9024, Santa Cruz Biotechnology)	1:250	Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (IRDye® 680RD) (ab216779, Abcam)	1:10000
	<b>Mouse monoclonal EDA</b> (sc-517135, Santa Cruz Biotechnology)	1:1000	Donkey anti-Mouse IgG H&L(IRDye® 800CW) (ab216774, Abcam)	1:10000
	<b>Rabbit polyclonal Actin</b> (SAB4301137, Sigma)	1:5000	Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (IRDye® 680RD) (ab216779, Abcam)	1:10000
Chemoluminiscence	<b>Mouse monoclonal EDA</b> (sc-517135, Santa Cruz Biotechnology)	1:1000	Sheep Anti-Mouse Peroxidase IgG (A6782, Sigma)	1:3000

**Tab. 2: Seznam protilátek využitých na western blot s požadovanými koncentracemi.**

### **Lyzační pufr**

Pro přípravu lyzačního pufru se rozpustí 1,5 g Trisu (Penta) v 70 ml destilované vody. Přidáme 1 ml koncentrované HCl, roztok necháme vychladnout a poté adjustujeme na pH 6,8. K roztoku přidáme 20 ml 20% SDS (dedecylsírán sodný), znovu adjustujeme pH a roztok doplníme do 100 ml destilovanou vodou.

### **2x Laemmliho pufr**

Bromfenolová modř (Sigma)	0,004%
2-mercaptoethanol (Sigma)	10%
Glycerol (Sigma)	40%
Tris-HCl 125mM, pH 6,8	

### **0,05% PBS-T**

Do 0,5 l PBS přidáme 250 µl tweenu (Fluka).

### **Blokovací roztok**

Pro fluorescenci: 1% BSA v PBS/ PBS-T

Pro chemoluminiscenci: 5% odtučněné mléko, pH 7,2

Western blot byl následně vyhodnocován v programu VisionCapt.

Na western blot bylo použito celkem 24 embryí, z toho 9 *Eda* mutantů, 4 *Eda* WT a 11 CD1 (Tab. 1).

## **6.6 Histologické zpracování**

Expresé SHH proteinů byla vyhodnocovaná také pomocí imunohistochemie. Pro imunohistochemii je nutné tkáň nakrájet na tenké histologické řezy, a proto byla tkáň histologicky zpracována. Z embryí CD1 a *Eda* mutantních myší byly vypreparovány dolní čelisti, které byly fixovány ve 4% paraformaldehydu (PFA) (Sigma) po dobu 24 hodin. Poté byly promyty PBS pufrem a vzestupnou alkoholovou řadou odvodněny a převedeny přes toluen do parafínu dle následující tabulky 3.

	<b>ED 13,5 - 15-5</b>	<b>ED 16,5 - 18,5</b>
<b>70% etOH</b>	1 h/přes noc	2 h/přes noc
<b>96% etOH</b>	1 h	1,5 h
<b>100% etOH</b>	30 min	1 h
<b>100% etOH</b>	30 min	1 h
<b>100% etOH</b>	30 min	1 h
<b>Toluen 1</b>	2 min	5 min
<b>Toluen 2</b>	2 min	5 min
<b>Parafin 1a</b>	30 min	30 min
<b>Parafin 1b</b>	30 min	1 h
<b>Parafin 2a</b>	30 min	1 h
<b>Parafin 2b</b>	30 min	1 h
<b>Rakev</b>	přes noc	přes noc

**Tab. 3: Převedení vzorků do parafínu**

Po vyjmutí z termostatu byl vzorek ještě před vychladnutím parafínu naorientován. Poté byl z parafínu vytvořen bloček a naorientovaná tkáň byla sériově frontálně nakrájena na rotačním mikrotomu (Leitz/ Leica RM2255) na řezy o tloušťce 10  $\mu\text{m}$ .

Tkáň bylo nutné zpracovat histologicky také pro analýzu vzorků získaných metodou Cre-LoxP. Protokol pro vytvoření parafinových řezů se lišil pouze v typu a délce fixace. V tomto případě byla tkáň po obarvení X-galem post-fixována po dobu jednoho týdne v roztoku Bouinu. Dále už bylo postupováno podle standardního protokolu.

## **6.7 Barvení histologických řezů jádrovou červení**

Barvení jádrovou červení bylo využíváno pro dobarvení histologických řezů zhotovených pro analýzu Cre-LoxP. Z parafinových řezů přilepených na podložní skla byl odstraněn parafin pomocí xylenu (2 x 5-7 min) a byla provedena re-hydratace řezů sestupnou alkoholovou řadou (100% EtOH 2 x 2 min, 96%EtOH 2 x 2 min, destilovaná voda 2 x 2 min). Řezy byly nabarveny jádrovou červení (10-30 s) a přebytečná barva byla vymyta v destilované vodě (3 x 2 min). Následně byly řezy opět odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou (96% ethanol 2 x 2 min, 100% etanol 2 x 2 min). Poté byly řezy projasněny v xylenu (2 x 4 min) a pomocí pryskyřice NeoMount překryty krycím sklíčkem.

## 6.8 Imunohistochemie

Nakrájené histologické řezy dolními čelistmi CD1 a *Eda* mutantních myší byly zpracovány pomocí imunohistochemie pro vizualizaci exprese proteinu SHH. Byla použita protilátka proti SHH (Santa Cruz Biotechnology SC-9024).

Nejprve byla provedena deparafinizace řezů pomocí xylenu (2 x 10 min) a posléze hydratace sestupnou alkoholovou řadou (100% EtOH 2 x 10 min; 96% EtOH 2 x 10 min). Řezy byly promyty v PBS pufri (2 x 5 min) a dále se pokračovalo dle následující tabulky 4.

2-3% roztok H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v methanolu	45 min
Promytí PBS	2 x 5 min
Inkubace ve vodní lázni v roztoku citrátu (pH 6) při 90°C	25 min
Chladnutí	
Promytí PBS	2 x 10 min
Blokovací roztok	2 h

**Tab. 4: Část protokolu pro imunohistochemii**

Poté byla aplikována primární protilátka (Tab. 6) přímo na skla, která byla přikryta parafilmem a inkubována ve vlhké komůrce při 4°C přes noc.

Další den byly řezy promyty v PBS (3 x 15 min) a inkubovány v blokovacím roztoku z předchozího dne (2 h). Následně byla aplikována sekundární protilátka přímo na skla, která byla stejně jako předchozí den přikryta parafilmem a inkubována 1h ve vlhké komůrce (Tab. 6). Řezy byly promyty v PBS (3 x 15 min) a poté obkrouženy PAP perem. Na skla byl aplikován avidin-biotinový komplex (ABC kit Vecstain, Vector Laboratories, Burlingame, USA) a byla ponechána v nezakryté vlhké komůrce po dobu 30 min. Poté byla opět promyta v PBS (3 x 15 min). Pro vizualizaci signálu byl použit diaminobenzidine (DAB) a jeho reakce byla zastavena destilovanou vodou.

Řezy byly následně dobarvovány hematoxylinem (viz tab. 5) a poté pomocí pryskyřice NeoMount překryty krycími sklíčky.



Hematoxylin	5-25 s
Tekoucí voda	10 min
Destilovaná voda	5 min
96% EtOH	2 x 2 min
100% EtOH	2 x 2 min
Xylén	2 x 3 min

**Tab. 5: Protokol pro dobarvení hematoxylinem**

Pro imunohistochemii byla použita následující koncentrace protilátek.

<b>Primární protilátka</b>	<b>Koncentrace</b>	<b>Sekundární protilátka</b>	<b>Koncentrace</b>
<b>Rabbit polyclonal SHH</b> (sc-9024, Santa Cruz Biotechnology)	1:150	Biotinylated Goat Anti-rabbit (BA-1000, Vector)	1:150

**Tab 6: Použité protilátky a jejich koncentrace**

### **Citrát (pH 6)**

Pro přípravu citrátového pufru smícháme 2,94 g citronanu sodného (dihydrát) (Sigma) s 1000ml destilované vody. Roztok adjustujeme na pH 6 pomocí HCl a poté přidáme 0,5 ml Tweenu (Fluka).

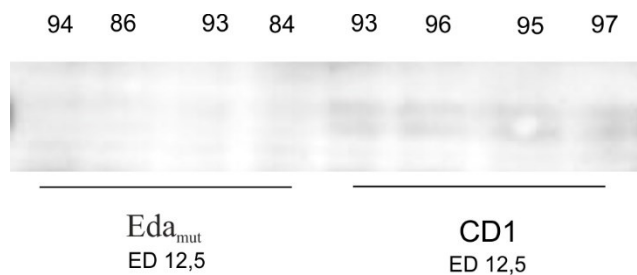
### **Blokovací roztok**

Pro přípravu blokovacího roztoku smícháme 0,25 ml 20% Cold fish gelatine, 0,5g Bovine serum albumine a 2,5 ml 10% Tritonu (vše Sigma). Směs doplníme do 50 ml PBS.

Imunohistochemicky bylo zpracováno 18 embryí CD1, 1 embryo *Eda* WT a 2 embrya *Eda* mutantních myší (viz. Tab. 1).

## 7 Výsledky

Pomocí metody western blot jsme se pokusili ověřit, že u *Eda* mutantních myší se EDA protein tvoří a tyto myši netrpí jeho úplnou deficiencí (Melnick *et al.*, 2009). Z výsledku je zřejmé, že u *Eda* mutantních embryí je hladina proteinu EDA výrazně redukována ve srovnání s kontrolními myšmi kmene CD1 stejného stáří, ale přítomnost EDA proteinu je patrná (Obr. 11). Tento fakt byl zohledněn při interpretaci dalších výsledků.



**Obr. 11: Detekce EDA proteinu pomocí metody Western blot u *Eda* mutantních myší.** Na western blotu je znázorněno množství EDA proteinu v tkáni *Eda* mutantních myší (*Eda<sub>mut</sub>*) a CD1 kontrol. Je vidět značné snížení hladiny EDA proteinu u *Eda* mutantních myší ve srovnání s kontrolou stejného stáří (embryonální den – ED) a srovnatelné tělesné hmotnosti, avšak ne jeho úplná deficience. Hmotnosti jednotlivých embryí použitých pro analýzu jsou udávány v miligramech.

## **7.1 Morfologická studie s využitím fluorescenční mikroskopie na disociovaných epitelech**

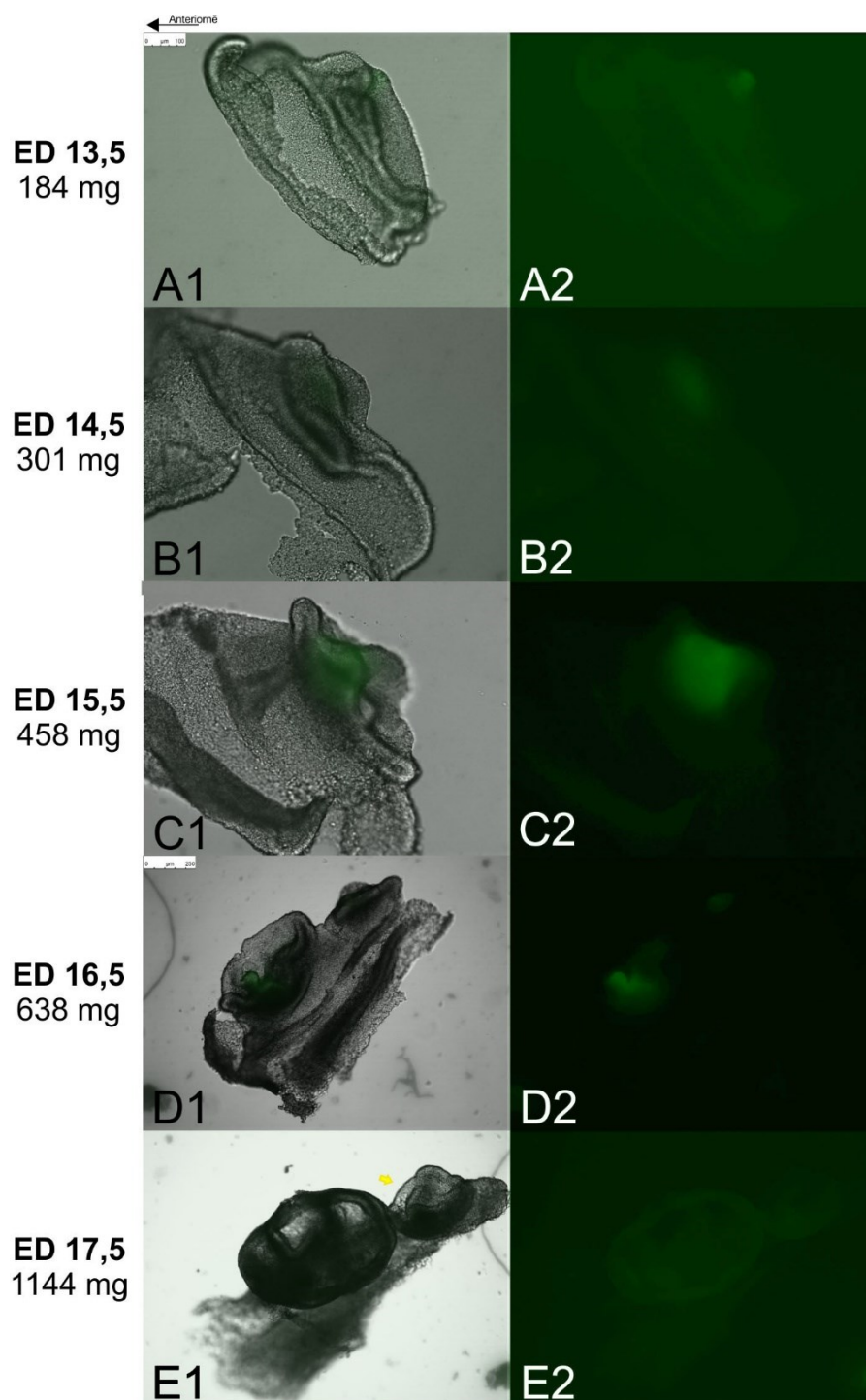
K vytvoření základní představy o zubním vývoji v řezákové i molárové oblasti u *Eda* mutantních myší v porovnání s kontrolou byly využity disociované epitely vyvíjejících se zubních zárodků. Byly vytvořeny vývojové řady dentálních epitelů vyvíjejících se řezáků a molárů dolní čelisti u *Eda* mutantních a CD1 myší od ED 13,5 po ED 17,5 (Obr. 12-17). Na dentálních epitelech byla sledována *Shh* signální centra zubních primordií reflektující příslušné stádium zubního vývoje a tato stádia byla porovnávána u *Eda* mutantních a kontrolních embryí odpovídajícího chronologického stáří (vyjádřeno v ED).

### **7.1.1 Vývoj dentálního epitelu u CD1 myší**

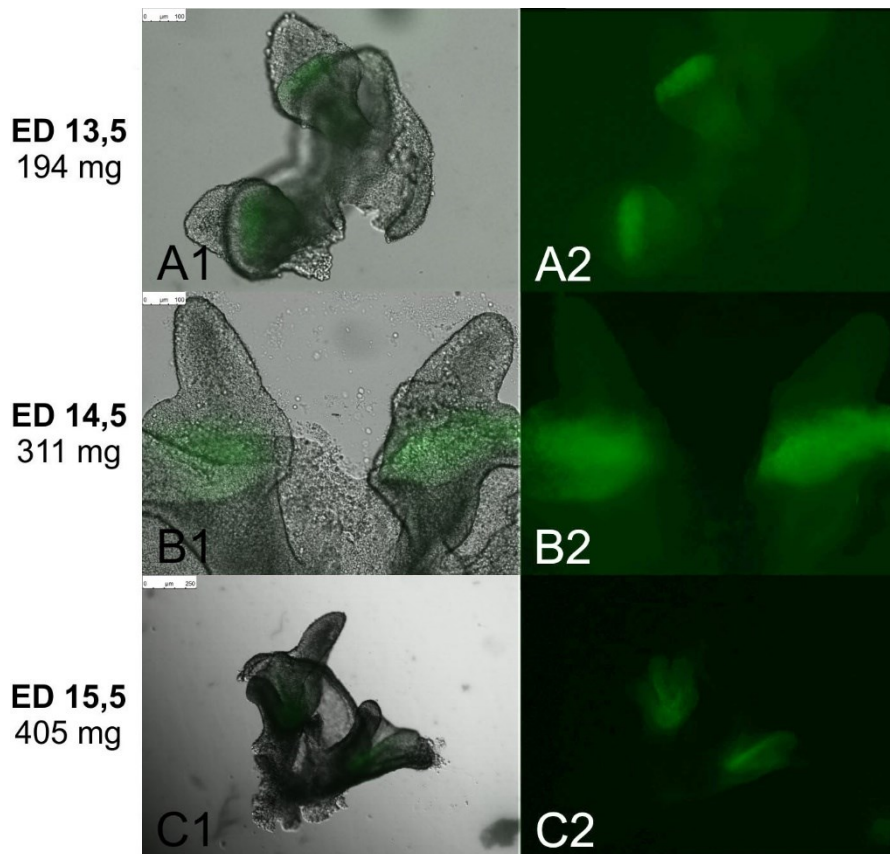
U CD1 embryí byla sledována exprese *Shh* (marker odontogeneze) v disociovaných dentálních epitelech bukální oblasti dolní čelisti. Na ED 13,5 bylo v anteriorní části pozorováno *Shh* signální centrum rudimentu R2, *Shh* exprese M1 nebyla u tohoto stádia detekována (Obr. 12 – A). Od ED 14,5 bylo již pozorováno signální centrum M1, jehož signál byl nejsilnější na ED 15,5 (Obr. 12 – B, C). Od ED 16,5 se signální centrum zmenšuje až je na ED 17,5 prakticky nedetekovatelné (Obr. 12 - E).

### **Vývoj dentálního epitelu v dolní labiální oblasti u CD1 myší**

V labiální oblasti na ED 13,5 – 15,5 se intenzita *Shh* exprese na jednotlivých ED příliš neliší. Expres *Shh* byla zachycena na všech stádiích ve funkčním řezáku. Pokročilost vývoje můžeme sledovat na samotném tvaru epitelů (Obr. 13).



**Obr. 12: Vývoj dentálního epitelu bukální oblasti dolní čelisti u CD1 myši. (A1 – E1)** Disociované dentální epitely tvářové oblasti ukazují morfogenezi od stádia časného pohárku první stoličky (M1) (A1) do pokročilého zvonku M1 a pohárku druhého moláru (M2, šipka) (E1). Prostorové uspořádání *Shh*-EGFP signálu u jednotlivých dentálních struktur od ED 13,5 – 17,5 je vizualizováno zeleně. (A2 – E2) *Shh*-EGFP vizualizace signálních center v dentálních primordiích na fluorescenčním kanálu.



**Obr.13: Vývoj dentálního epitelu labiální oblasti dolní čelisti u CD1 myši. (A1 – C1)** Disociované dentální epitely řezákové oblasti, znázorňující morfogenezi zubních zárodků řezáku a prostorové uspořádání *Shh*-EGFP signálu (zeleně) na ED 13,5 – 15,5. (A2 – E2) *Shh*-EGFP vizualizace signálních center řezáků na fluorescenčním kanálu.

### 7.1.2 Vývoj dentálního epitelu u *Eda* mutantních myší

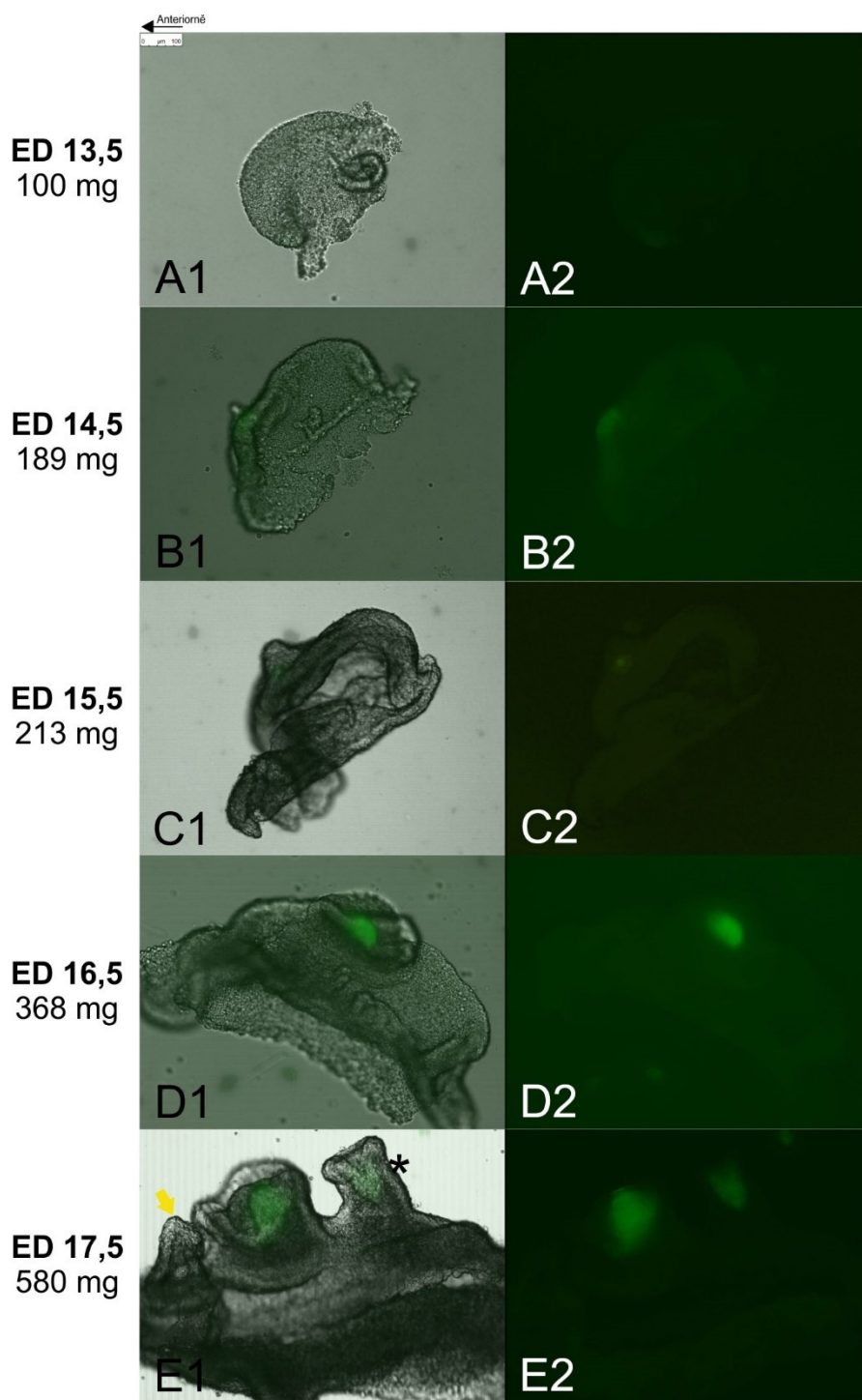
U *Eda* mutantních myší byla sledována signální centra obdobně jako u CD1 myší.

#### Vývoj dentálního epitelu v dolní tvářové oblasti u *Eda* mutantních myší

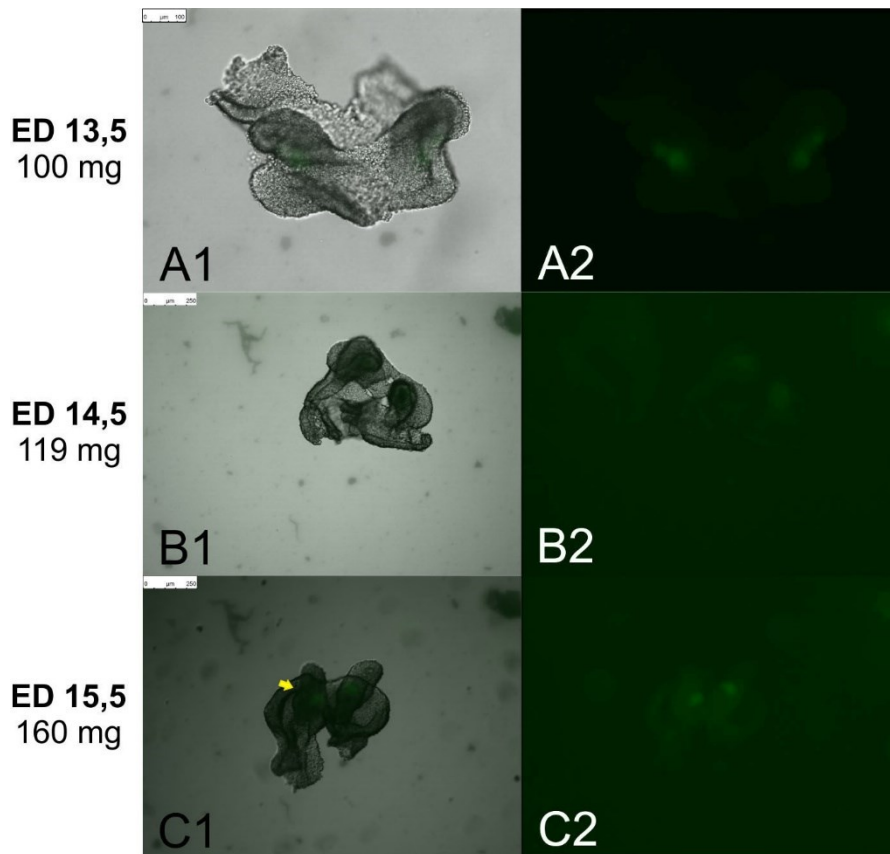
Byla vytvořena série disociovaných dentálních epitelů z bukální oblasti dolní čelisti na ED 13,5 – 17,5. Na ED 13,5 není pozorován žádný signál, ale tvarově epitel odpovídá rudimentu MS (Obr. 14 – A). Na ED 14,5 a 15,5 byl pozorován signál v rudimentárním signálním centru R2, který ale na ED 15,5 již ztrácí na intenzitě. Signální centrum M1 se zatím neobjevuje (Obr. 14 – B, C). Na ED 16,5 a 17,5 bylo pozorováno signální centrum M1 (Obr. 14 – D). Na dentálním epitelu ED 17,5 lze pozorovat počátek vývoje M2 (posteriorně) a také základ nadpočetného zubu (anteriorně) (Obr.14 - E).

### **Vývoj dentálního epitelu v dolní labiální oblasti u *Eda* mutantních myší**

Dále byla vytvořena vývojová série disociovaných dentálních epitelů z labiální oblasti dolní čelisti na ED 13,5 – 15,5. Na nejméně vývojově pokročilém sledovaném stádiu - ED 13,5 jsou detekovatelná 2 signální centra, anteriorní rudimentární signální centrum a více posteriorně signální centrum funkčního řezáku (Obr. 15 – A). Na ED 14,5 a 15,5 již lze pozorovat pouze signální centra funkčního řezáku. Obě pozdější vývojová stádia se od sebe opět liší především tvarem samotného epitelu, kdy řezáky na ED 14,5 jsou ve vývojovém stádiu zubního pupene, kdežto na ED 15,5 již epitel vykazuje morfologii časného pohárku s determinovatelnými cervikálními kličkami (Obr.15 – B, C).



**Obr.14: Vývoj dentálního epitelu bukální oblasti dolní čelisti u *Eda* mut. myši.** (A1 – E1) Disociované dentální epitely molárové oblasti dokumentují vývoj od zubního pupenu v oblasti MS rudimentu (A1), přes rudiment R2 na ED14,5 a 15,5 (B1-C1) až po zubní pohárek M1 na ED16,5 a 17,5 (D1-E1). Na ED17,5 se nám podařilo zachytit vyvíjející se M2 (hvězdička) a nadpočetný zub lokalizovaný anteriorně od M1 (šipka). Zeleně je vizualizováno prostorové uspořádání *Shh*-EGFP v signálních centrech zubních základů. (A2 – E2) *Shh*-EGFP vizualizace signálních center na fluorescenčním kanálu.



**Obr.15: Vývoj dentálního epitelu labiální oblasti dolní čelisti u *Eda* mut. myši.** (A1 – C1) Disociované dentální epitely řezákové oblasti znázorňují prostorové uspořádání *Shh*-EGFP signálu na ED 13,5 – 15,5 (zeleně). Na ED 13,5 se nám podařilo zachytit rudimentární struktury exprimující *Shh* v anteriorní oblasti od pupenů funkčních zubů v části epitelu přiléhající k vestibulárnímu epitelu zevně od řezáků (A1). Zubní pupeny funkčních řezáků na ED 14,5 již exprimují *Shh* ve strukturách sklovinných uzlů (B1). Morfologie základů funkčních řezáků se postupně mění na zubní pohárky s vyvíjejícími se cervikálními kličkami (šipka) (C1). (A2 – C2) *Shh*-EGFP vizualizace signálních center řezáků.

### 7.1.3 Porovnání *Eda* mutantních myší s CD1

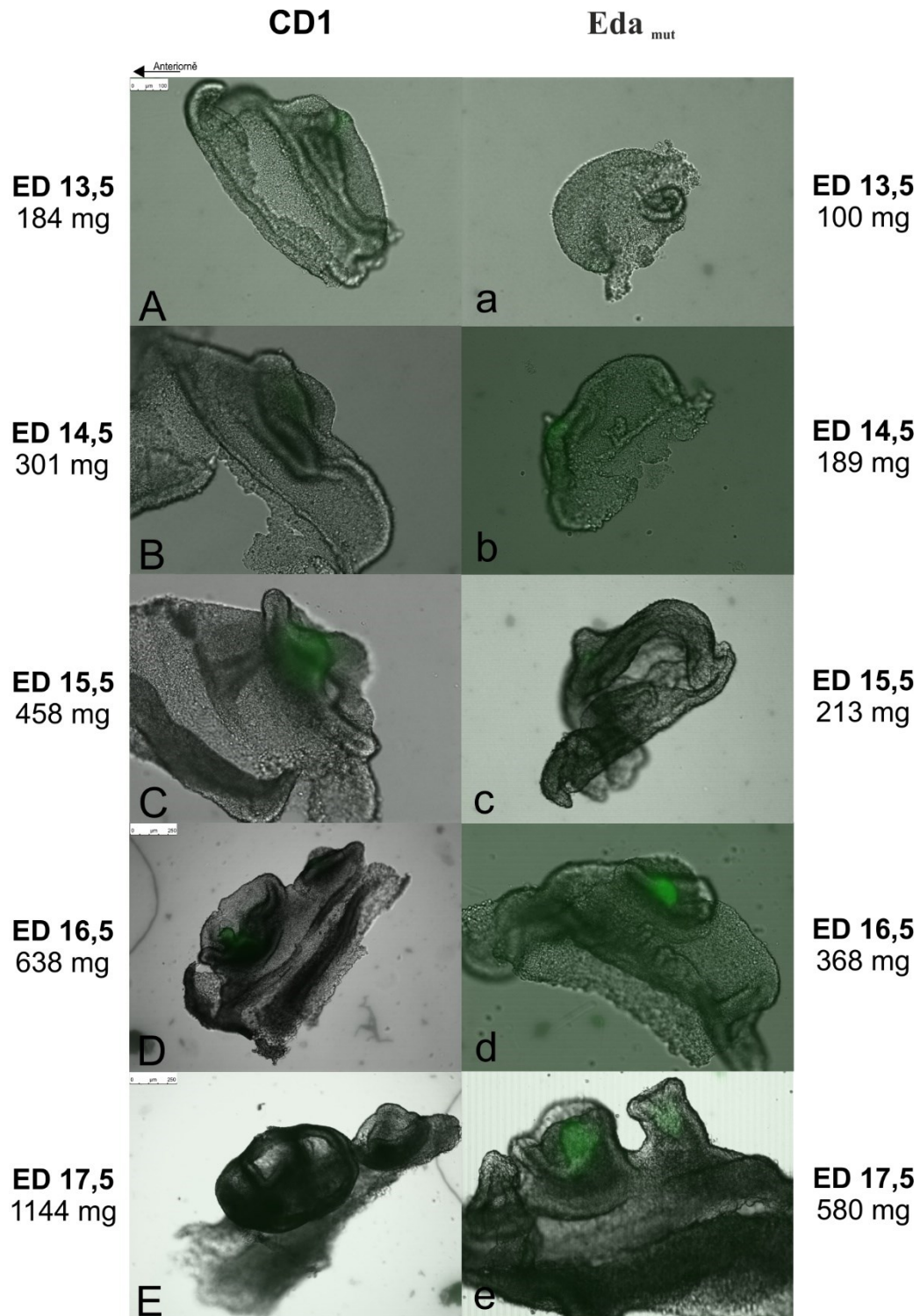
Při hodnocení morfogeneze *Eda* mutantních a CD1 myší je zřejmé, že embrya na jednotlivých ED vykazují značné rozdíly v tělesné hmotnosti, a to v neprospěch *Eda* mutantních myší. Tito jedinci jsou podstatně lehčí na odpovídajícím chronologickém stádiu vývoje.

Při porovnání vývojových řad *Eda* mutantních a CD1 myší lze vidět, že signální centrum rudimentu R2 se u CD1 myší objevuje již na ED 13,5, kdežto u *Eda* mutantních myší o jeden embryonální den později (obr. 16 – A,b). U M1 signálního centra je to v tomto případě dokonce o 2 embryonální dny později (obr. 16 – B,d). U *Eda* mutantních

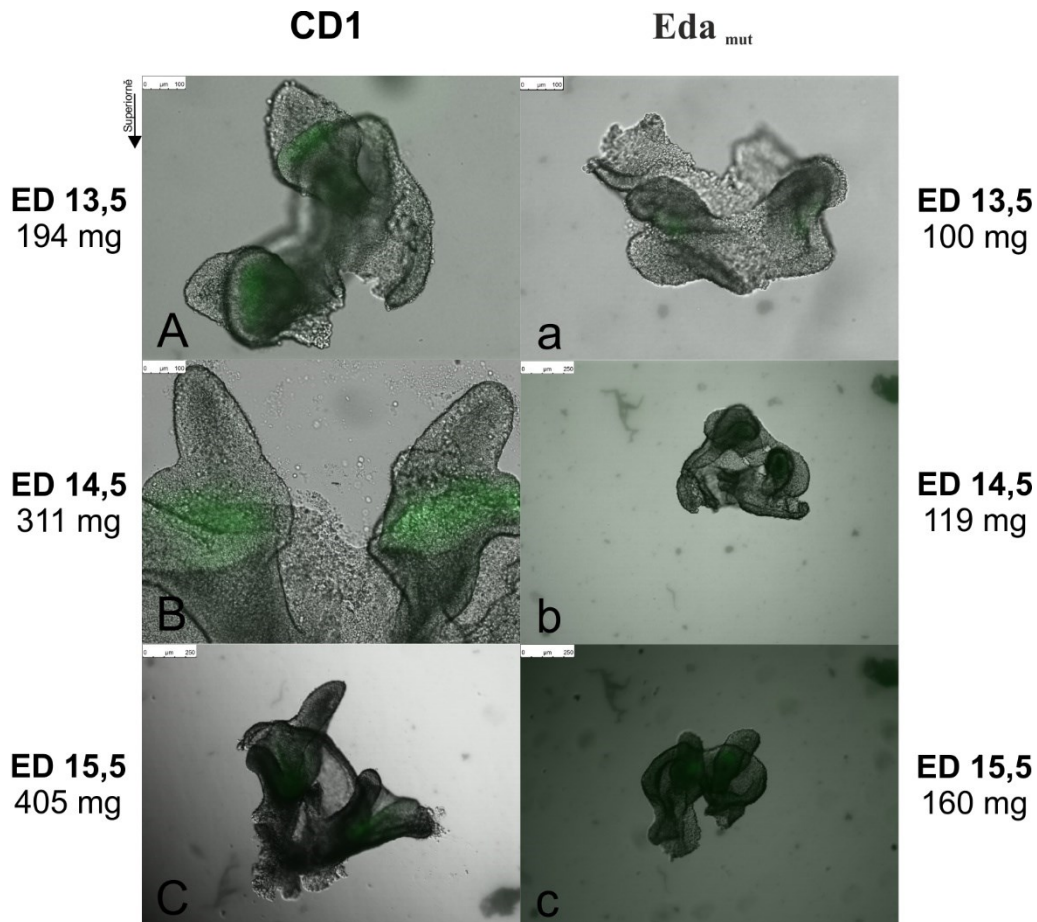


myší se nám v bukální oblasti u nejmladšího jedince podařilo ještě zachytit strukturu MS rudimentu, který vývojově předchází R2 (Obr. 16 – a).

V řezákové oblasti je nejvýznamnější rozdíl patrný na ED 13,5, kdy je u *Eda* mutantních myší zachycena exprese *Shh* ještě v anteriorním rudimentárním signálním centru, ale u CD1 již rudimentární oblast *Shh* aktivně neexprimuje a centra rudimentárních řezáků vidět nemůžeme (Obr. 17 – A,a).



**Obr. 16: Srovnání vývoje bukální oblasti CD1 a *Eda* mutantních myší od ED13,5 do ED17,5.** (A – E) Disociované dentální epitely molárové oblasti CD1 myši, znázorňující prostorové uspořádání *Shh*-EGFP signálu (zeleně) v epitelu na ED 13,5 – 17,5. (a-e) Disociované dentální epitely molárové oblasti *Eda* mutantních myší, znázorňující prostorové uspořádání *Shh*-EGFP signálu (zeleně) v epitelu na ED 13,5 – 17,5. Signální centrum rudimentu R2 se u kontroly objevuje již na ED 13,5 (A), oproti tomu u *Eda* mutantních myší se objevuje až na ED 14,5 (b). M1 signální centrum se u kontrol objevuje již na ED 14,5 (B), oproti tomu u *Eda* mutantních myší až o 2 dny později (d). Na ED 13,5 je u *Eda* mutantních myší možné ještě zachytit strukturu MS rudimentu, která vývojově předchází rudimentu R2 (a). A-C,a-e je měřítko 100  $\mu$ m, D a E 250  $\mu$ m.

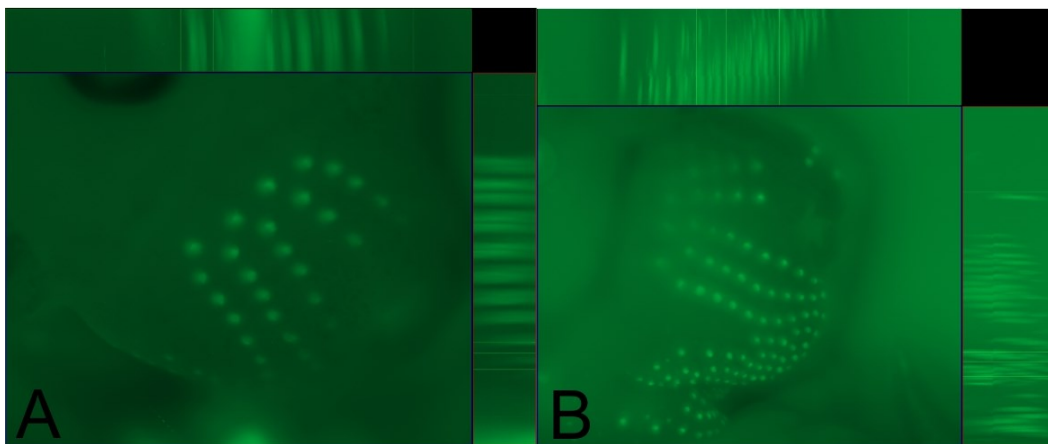


**Obr. 17: Srovnání vývoje řezákové oblasti CD1 a *Eda* mutantních myší od ED 13,5 do ED 17,5.** (A – C) Disociované dentální epitely řezákové oblasti CD1 myši, znázorňující prostorové uspořádání *Shh*-EGFP signálu (zeleně) v epitelu na ED 13,5 – 15,5. (a-c) Disociované dentální epitely molárové oblasti *Eda* mutantních myší, znázorňující prostorové uspořádání *Shh*-EGFP signálu (zeleně) v epitelu na ED 13,5 – 15,5. Nejvýznamnější rozdíl mezi kontrolou a *Eda* mutantní myší je patrný na ED 13,5. U mutantní myši můžeme detekovat expresi v anteriorním rudimentárním centru, která se již u kontroly nenachází (A,a).

## 7.2 Základní porovnání *Shh* exprese

Základní porovnání vlivu nedostatku *Eda* genu na expresi *Shh*, která je esenciální pro normální vývoj dentice, bylo provedeno pomocí fluorescenční mikroskopie na

mikroskopu Zeiss s přídavným zařízením ApoTome, který využívá ke generování obrazu optické skenování a skládání jednotlivých vrstev obrazu. Byly pozorovány vlasové folikuly, které podobně jako zuby v průběhu svého vývoje exprimují *Shh*, na čumáku *Eda* mutantního embrya a CD1 embrya (z křížení *Eda* mutantní a CD1 samice s GFP pozitivními samci, viz Metody), které nám sloužilo jako kontrola, na ED 14,5. *Shh* exprese je značena EGFP proteinem, a tudíž *Shh* exprimující buňky svítí zeleně. Na čumáku *Eda* mutantního embrya bylo pozorováno celkově menší množství vlasových folikulů v porovnání s kontrolou. Intenzita jejich exprese se také zdá být snížena. (Obr. 18).



**Obr. 18: *Shh* exprese ve vlasových folikulech na ED 14,5.** Čumák *Eda* mutantního embrya s expresí *Shh* (zeleně) ve vlasových folikulech (A). Čumák kontrolního CD1 embrya s expresí *Shh* (zeleně) ve vlasových folikulech (B). Celkový počet vlasových folikulů je u *Eda* mutantního jedince (A) redukován oproti kontrole (B) na stejném ED.

### 7.3 Detekce *Shh* exprimujících buněčných linií

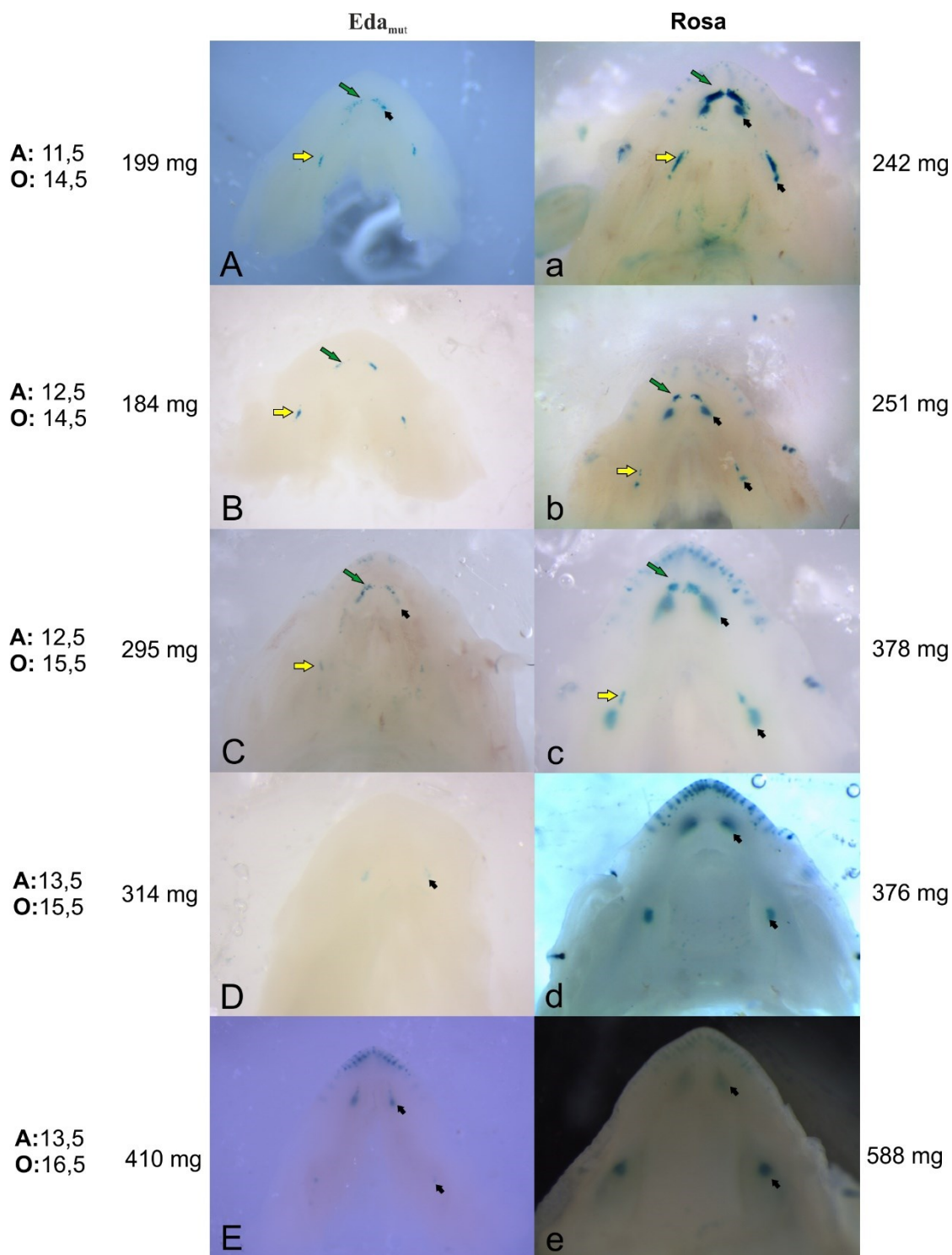
S využitím tamoxifenem aktivované Cre-LoxP technologie jsme sledovali buněčnou linii exprimující *Shh* v dentálním epitelu u *Eda* mutantních a kontrolních myší (křížení EDA/Ta0 a EDA/Ta0/B6.Cg-*Shhtm1*(EGFP/cre)Cjt/J respektive CD1 a B6.Cg-*Shhtm1*(EGFP/cre)Cjt/J). Dávka tamoxifenu aktivuje Cre rekombinázu, čímž dochází k následné produkci  $\beta$ -galaktosidasy reagující s X-galem během barvení. Toto barvení označí modře všechny buňky, u nichž došlo k aktivaci rekombinázy, v našem případě navázané v *Shh* lokusu, a také všechny jejich potomky od chvíle aplikace tamoxifenu až po odběr embryí.

Při odběru embryí 24 h po aplikaci tamoxifenu dochází pouze k označení buněk, jejichž expresi můžeme sledovat i jako aktuální pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zaměřili jsme se tedy na časové intervaly 2 – 3 dny. Jako kontrola k *Eda* mutantním

myším byla tentokrát použita reportérová Rosa26LacZ myš křížená na B6.Cg-*Shhtm1*(EGFP/cre)Cjt/J samce.

Při aplikaci tamoxifenu na ED 11,5 a 12,5 byla u mutantních embryí i kontrol zachycena populace *Shh* descendentních buněk v rudimentární oblasti anteriorně od funkčního řezáku (Obr. 19 – A-C, a-c), tato populace se u kontrol u pokročilejších stádií zmenšuje. Při aplikaci tamoxifenu na ED 13,5 se již tato populace buněk nebarví ani u *Eda* mutantních myší, ani u kontrol (Obr. 19 – D,d,E,e). Populace *Shh* descendentních buněk se v oblasti funkčního řezáku poprvé objevuje u kontrol již při aplikaci na ED 11,5 a se zvyšujícím se ED odběru se tato pozitivní oblast rozšiřuje posteriorně (Obr. 19 – a-e). U *Eda* mutantních myší se začíná objevovat nejdříve při aplikaci na ED 12,5 a zcela evidentní je až při aplikaci na ED 13,5 (Obr. 19 – C-E).

V oblasti tvářové se populace *Shh* descendentních buněk objevuje v oblasti rudimentů (MS a R2) u *Eda* mutantních myší i kontrol již při aplikaci tamoxifenu na ED 11,5 a u obou v těchto strukturách mizí při aplikaci na ED 13,5 (Obr. 19 – A-C, a-c). Populace buněk ze základu funkčního moláru se u kontrol objevuje jako pozitivní již při aplikaci na ED 11,5 (Obr. 19 – a-e), zatímco u *Eda* mutantních myší se velmi slabě objevuje při aplikaci na ED 13,5, vizuálně signál zesiluje až při delším působení tamoxifenu a odběru embryí na ED 16,5 (Obr. 19 – D,E).



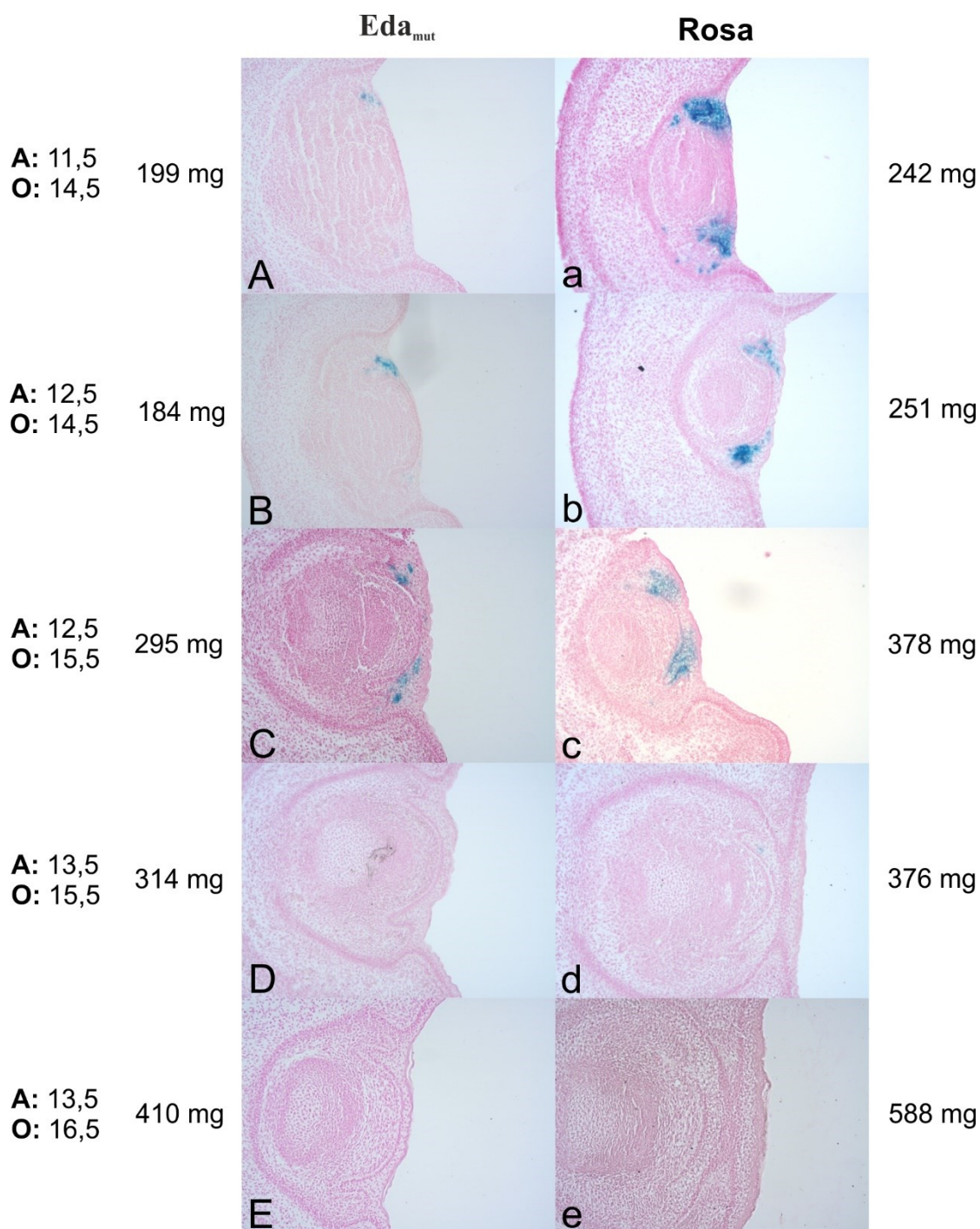
**Obr. 19: Detekce *Shh* exprimujících buněčných linií u *Eda* mutantních myší a kontrol.** Odpreparované dolní čelisti *Eda* mutantních (*Eda<sub>mut</sub>*) embryí (A – E) respektive kontrolních (*Rosa*) (a – e) vygenerovaných s využitím dvou Cre-LoxP systémů křížení (viz Metody) zabarvené X-galem ukazují modře linii buněk, ve kterých byla zahájena transkripce *Shh* a jejich dceřiných buněk vždy od termínu aplikace (A:) až do termínu odběru (O:), které jsou udávány v ED (embryonální den). Při aplikaci na ED 11,5 a 12,5 byla zachycena *Shh* exprimující populace buněk rudimentárního signálního centra anteriorně od funkčního řezáku (zelená šipka) a rudimentárního signálního centra anteriorně od funkčních molárů (žlutá šipka) u *Eda* mutantních myší i kontrol. Černá

šipka ukazuje na populace buněk ze signálních center funkčních zubů (řezáků i molárů), ty jsou přítomny u kontrol již od aplikace na ED 11,5 a postupně se pozitivní oblast zvětšuje posteriorně. U *Eda* mutantních myší začíná záchyt pozitivně zbarvené populace buněk ze signálních center funkčních zubů při aplikaci na ED 12,5. Zvětšeno 2x.

Abychom přesněji detekovali oblasti výskytu výše popsaných buněčných populací, byly odebrané a X-galem zbarvené dolní čelisti dále histologicky zpracovány, sériově nakrájeny a jednotlivé oblasti porovnány u mutantních embryí a kontrol a také mezi jednotlivými vývojovými stádii.

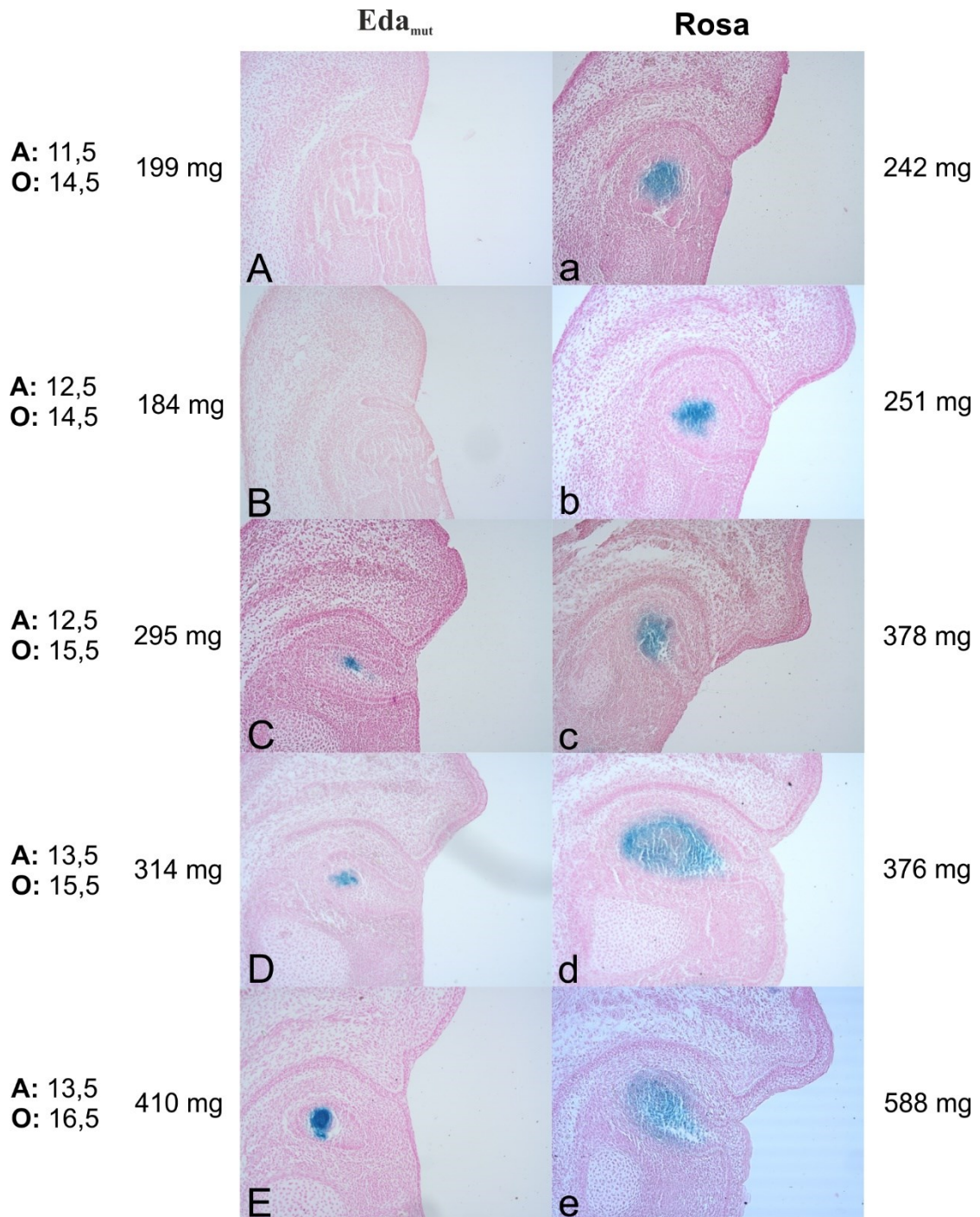
Populace *Shh* descendentních buněk v oblasti anteriorně od funkčního řezáku byla na frontálních histologických řezech zachycena při aplikaci na ED 11,5 a 12,5 u *Eda* mutantních myší i kontrol (Obr.20 – A-C, a-c). Velikost pozitivně zbarvené oblasti se u kontrol s pokročilejším vývojovým stádiem zmenšuje. U *Eda* mutantních myší se tato populace *Shh* descendentních buněk zdá být oproti kontrole prostorově redukována (Obr. 20 – A-C). U embrya po aplikaci tamoxifenu na ED 11,5 lze pozitivní *Shh* descendentní buňky u kontroly vidět i ve vestibulární liště (Obr. 20 – a), která dává vznik *vestibulum oris*. Při aplikaci tamoxifenu na ED 12,5 a odběru na ED 15,5 je tato populace rozdělena do několika menších oblastí (Obr 20 – C). Menší množství anteriorní populace pozitivních buněk byl zachycen u kontroly ještě při aktivaci Cre aplikací tamoxifenu na ED 13,5 a odběru na ED 15,5 (Obr. 20 – d), při aplikaci tamoxifenu v pozdějších vývojových stádiích se již žádné pozitivně zbarvené buňky v anteriorní řezákové oblasti neobjevují (Obr. 20 – D,E,e).

Modře zbarvené *Shh* descendentní buňky byly v posteriorní oblasti budoucího funkčního řezáku viditelné u kontrol na všech sledovaných stádiích (Obr. 21- a-e). U *Eda* mutantních embryí se první pozitivní buňky v této oblasti objevují až při aplikaci na ED 12,5 a odběru na ED 15,5, přičemž jejich lokalizace je izolovaná pouze na malou oblast vyvíjejícího se zubního základu řezáku (Obr 21 – C). Podobný vzor výskytu *Shh* descendentních buněk byl detekovatelný i u pokročilejších vývojových stádií u *Eda* mutantních myší (Obr. 21 – C-E), zatímco u kontrol se tato oblast postupně zvětšuje, pozitivních buněk přibývá (Obr. 21 – a-e).



**Obr. 20: Detekce *Shh* exprimujících buněčných linií u *Eda* mutantních myší a kontrol – oblast anteriorně od budoucího funkčního řezáku.** Frontální histologické řezy odpreparovaných dolních čelistí *Eda* mutantních ( $Eda_{mut}$ ) embryí (A – E) respektive kontrolních (Rosa) (a – e) vygenerovaných s využitím dvou Cre-LoxP systémů křížení (viz Metody) zabarvené X-galem ukazují modře linii buněk, ve kterých byla zahájena transkripce *Shh* a jejich dceřiných buněk vždy od termínu aplikace (A:) až do termínu odběru (O:), které jsou udávány v ED. Dobarveno jádrovou červení. Při aplikaci na ED 11,5 a 12,5 byla zachycena descendentní populace buněk časného rudimentárního signálního centra exprimujícího *Shh* anteriorně od funkčního řezáku (A-C, a-c). Množství pozitivních buněk se u kontrol při pozdější aplikaci tamoxifenu na ED 12,5 (b, c) mírně redukuje ve srovnání s aplikací na ED 11,5 (a). Při aplikaci tamoxifenu na ED 13,5

a odběru na ED 15,5 (d) lze detekovat ojedinělé pozitivní buňky. U *Eda* mutantních myší je při aktivaci Cre na ED 11,5 množství pozitivních *Shh* descendentních buněk nižší ve srovnání s kontrolou (A, a). Podobnou situaci ukazuje aplikace na ED 12,5 (B, b, C, c). Při aplikaci na ED 12,5 a odběru na ED 15,5 u *Eda* mutantní myši je populace *Shh* descendentních buněk rozdělena do více menších oblastí. Při aktivaci Cre na ED 13,5 je již anteriorní oblast  $\beta$ -gal negativní (D, E). Zvětšeno 200x.



**Obr. 21: Detekce *Shh* exprimujících buněčných linií u *Eda* mutantních myší a kontrol – oblast budoucího funkčního řezáku.** Frontální histologické řezy odpreparovaných dolních čelistí *Eda* mutantních (*Eda<sub>mut</sub>*) embryí (A – E) respektive

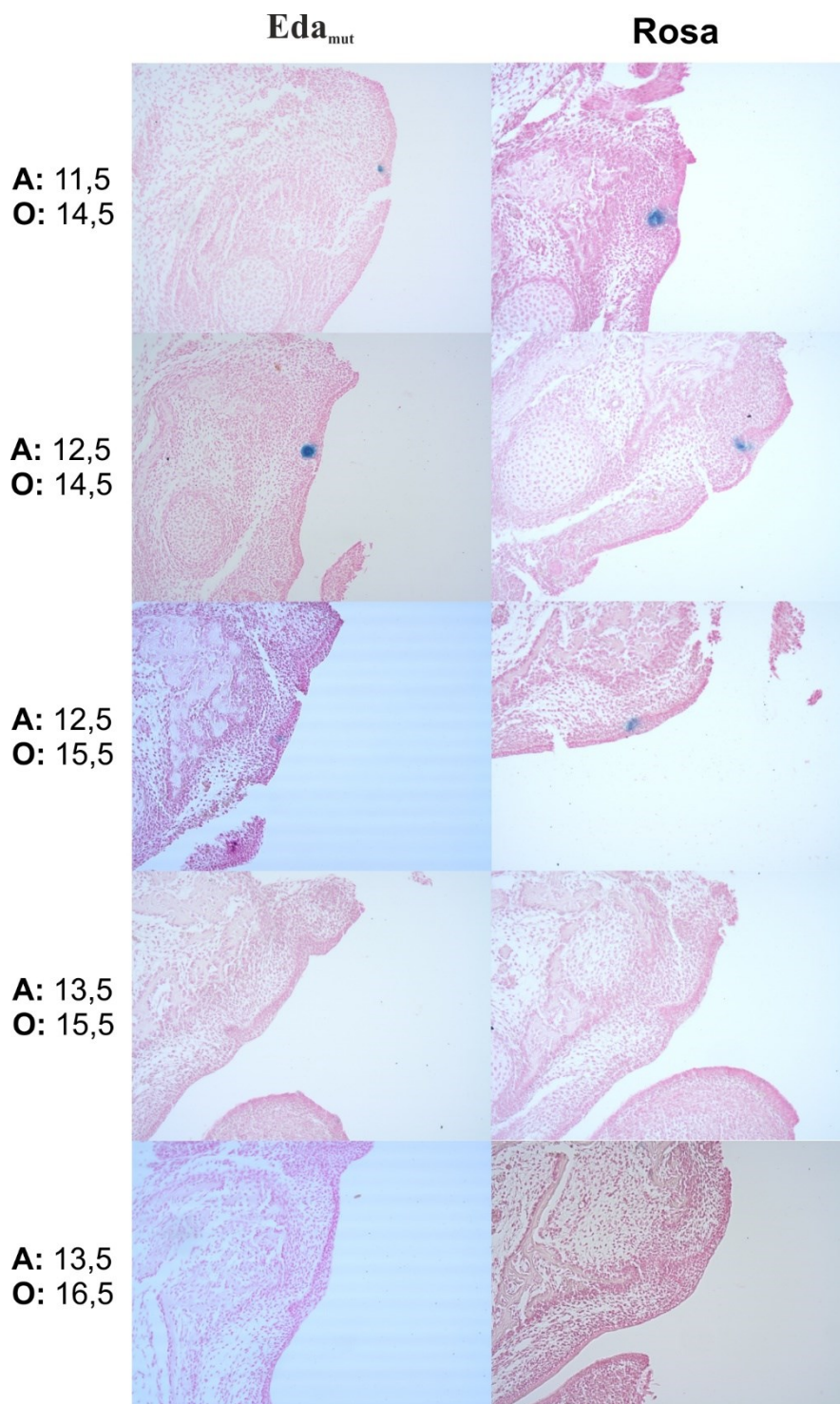


kontrolních (Rosa) (a – e) vygenerovaných s využitím dvou Cre-LoxP systémů křížení (viz Metody) zbarvené X-galem ukazují modře linii buněk, ve kterých byla zahájena transkripce *Shh* a jejich dceřiných buněk vždy od termínu aplikace (A:) až do termínu odběru (O:), které jsou udávány v ED. Dobarveno jádrovou červení. Při aktivaci Cre na ED 11,5 u *Eda* mutantních myši byla posteriorní oblast řezákového zubního základu negativní, nebyla zde zachycena žádná populace *Shh* descendentních buněk (A). Podobná situace nastala při aplikaci tamoxifenu na ED 12,5 a odběru na ED 14,5 (B). První pozitivní oblast *Shh* descendentních buněk byla detekována až při aplikaci tamoxifenu na ED 12,5 a odběru na ED 15,5 (C). Prostorová lokalizace této populace se s pokročilostí vývoje již příliš nemění (C-E). U kontrol byla populace *Shh* descendentních buněk detekována na všech sledovaných stádiích (a-e). Tato oblast se s vývojovou pokročilostí dále zvětšuje. Zvětšeno 200x.

V descendentní oblasti signálního centra rudimentárního zubního základu MS jsme detekovali *Shh* descendentní buňky při aktivaci Cre aplikací tamoxifenu na ED 11,5 jak u *Eda* mutantních myši, tak u kontrol (Obr. 22 – A,a). U obou kmenů byla tato populace buněk detekována také při aplikaci tamoxifenu na ED 12,5 (Obr. 22 – B,b,C,c). Po aktivaci Cre na pokročilejších stádiích vývoje (ED 13,5) již žádné pozitivní buňky v této oblasti nedetekujeme (Obr. 22 – D,E,d,e).

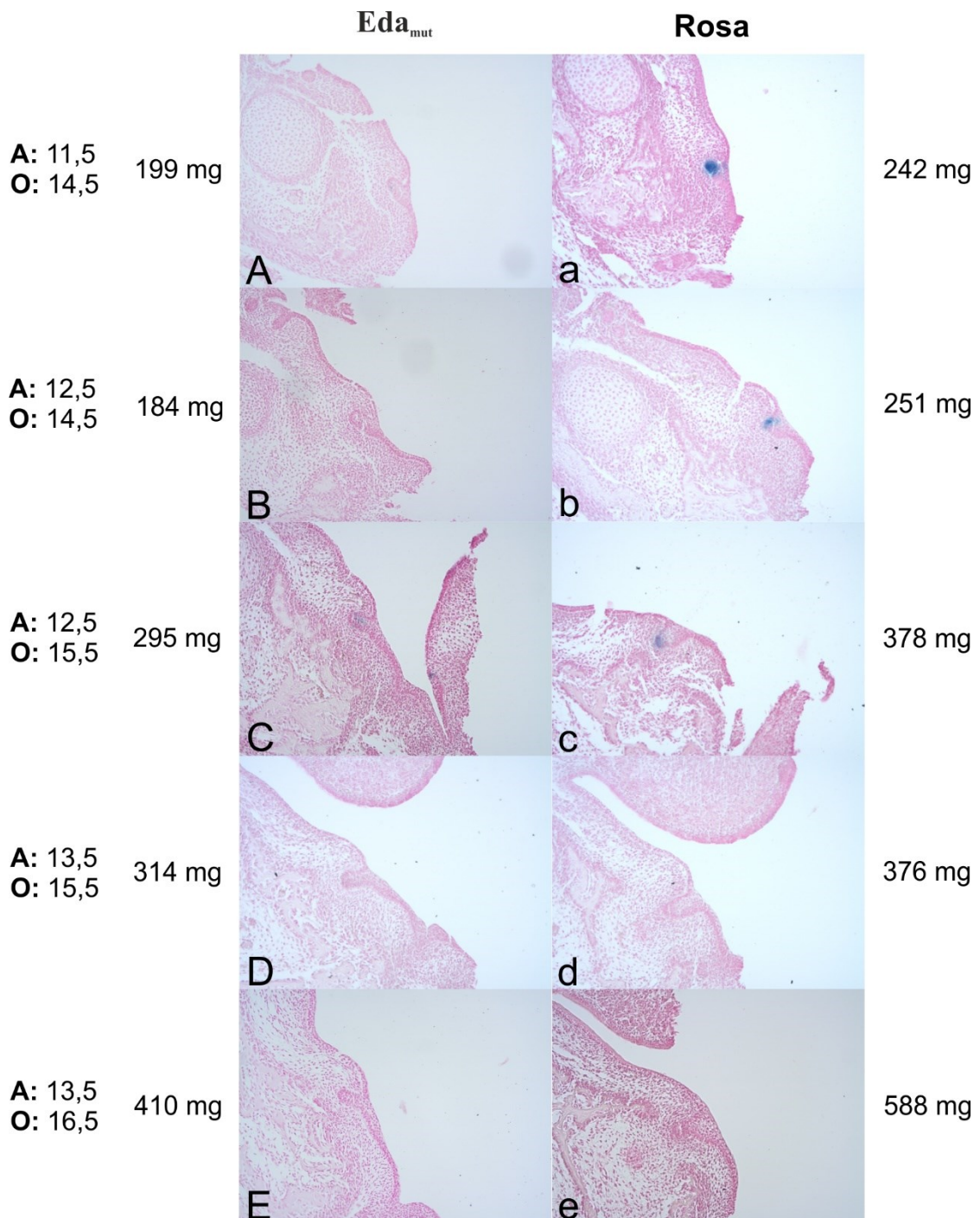
V oblasti původního rudimentárního signálního centra R2 byla detekována populace *Shh* descendentních buněk u kontrol při aplikaci na ED 11,5 a 12,5 (Obr. 23 – a-c). U *Eda* mutantních myši bylo sledováno pozitivní zbarvení při aplikaci tamoxifenu na ED 11,5 (Obr. 23 – A) a na ED 12,5 a odběru na ED 15,5 (Obr. 23 – C). Ostatní sledovaná stádia nevykazovala žádné modře zbarvené buňky.

*Shh* descendentní buňky byly detekovány také v oblasti sklovinného uzlu, tedy v centru budoucího prvního funkčního moláru M1. U všech sledovaných stádií kontrol byla detekována populace *Shh* descendentních buněk, která se u pokročilejších vývojových stádií přesouvala bukálním směrem (Obr. 24 – a-e). U *Eda* mutantních myši byly v této oblasti pozitivně zbarvené buňky nejdříve při aplikaci tamoxifenu na ED 13,5 a byly omezeny pouze na samotnou oblast sklovinného uzlíku (Obr. 24 – D,E).



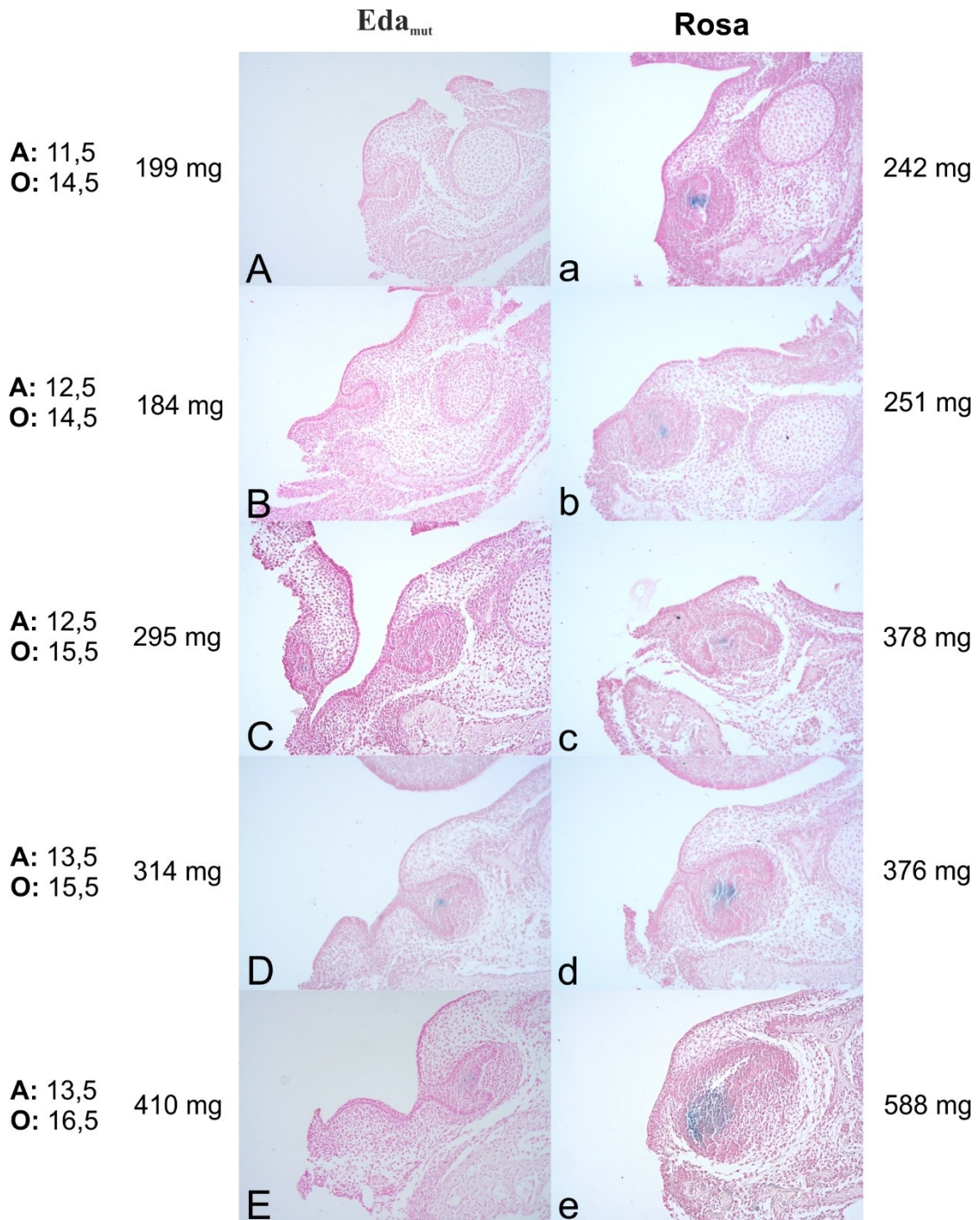
**Obr. 22: Detekce *Shh* exprimujících buněčných linií u *Eda* mutantních myší a kontrol – descendentní oblast rudimentárního signálního centra MS.** Frontální histologické řezy odpreparovaných dolních čelistí *Eda* mutantních (*Eda<sub>mut</sub>*) embryí (A – E) respektive kontrolních (*Rosa*) (a – e) vygenerovaných s využitím dvou Cre-LoxP systémů křížení (viz Metody) zabarvené X-galem ukazují modře linii buněk exprimujících *Shh* a jejich dceřiných buněk vždy od termínu aplikace tamoxifenu, která byla spouštěčem aktivace Cre rekombinázy (A:) až do termínu odběru (O:), které jsou udávány v ED. Dobarveno jádrovou červení. Při aplikaci tamoxifenu na ED 11,5 byly zachyceny populace *Shh* descendentních buněk u *Eda* mutantních myší i kontrol (A,a), stejně tak i při aplikaci na ED 12,5 (B,b,C,c). U ostatních sledovaných stádií po aktivaci

Cre na ED 13,5 žádné *Shh* descendenní buňky ve sledované oblasti detekovány nebyly (D,E,d,e). Zvětšeno 200x.



**Obr. 23: Detekce *Shh* exprimujících buněčných linií u *Eda* mutantních myši a kontrol – descendenní oblast rudimentárního signálního centra R2.** Frontální histologické řezy odpreparovaných dolních čelistí *Eda* mutantních (*Eda<sub>mut</sub>*) embryí (A – E) respektive kontrolních (*Rosa*) (a – e) vygenerovaných s využitím dvou Cre-LoxP systémů křížení (viz Metody) zabarvené X-galem ukazují modře linii buněk, ve kterých byla zahájena transkripce *Shh* a jejich dceřiných buněk vždy od termínu aplikace tamoxifenu (A:) až do termínu odběru (O:), které jsou udávány v ED (embryonální den). Dobarveno jádrovou červení. *Shh* descendenní buňky byly v této oblasti detekovány

u kontrol při aplikaci na ED 11,5 a 12,5 (a-c) a u *Eda* mutantních myší při aplikaci na ED 11,5 a při aplikaci na ED 12,5 a odběru na ED 15,5 (A,C). Ostatní sledovaná stádia nevykazovala žádné pozitivně zbarvené buňky. Zvětšeno 200x.



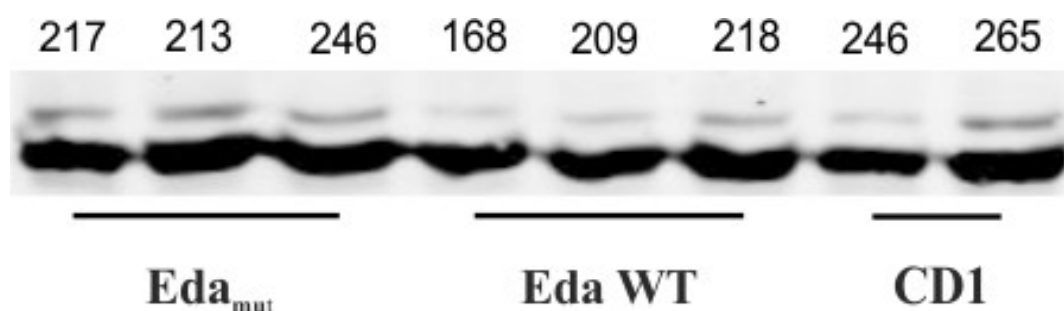
**Obr. 24: Detekce *Shh* exprimujících buněčných linií u *Eda* mutantních myší a kontrol – descendentní oblast sklovinného uzlíku v první stoličce M1.** Frontální histologické řezy odpreparovaných dolních čelistí *Eda* mutantních (*Eda<sub>mut</sub>*) embryí (A – E) respektive kontrolních (*Rosa*) (a – e) vygenerovaných s využitím dvou Cre-LoxP systémů křížení (viz Metody) zbarvené X-galem ukazují modře linii buněk, ve kterých byla zahájena transkripce *Shh* a jejich dceřiných buněk vždy od termínu aplikace tamoxifenu jako spouštěče aktivace Cre (A:) až do termínu odběru (O:), které jsou udávány v ED. Dobarveno jádrovou červení. Jak u kontrol, tak u *Eda* mutantních embryí

byly pozitivní buňky lokalizovány v oblasti sklovinného uzlu na všech sledovaných stádiích vývoje. U kontrolních embryí se oblast pozitivního barvení u pokročilejších vývojových stádií (e) plošně rozšiřuje a lokalizace pozitivní oblasti se posouvá bukálně. Zvětšeno 200x.

#### 7.4 Kvantifikace SHH proteinu

Na základě výsledků fluorescenční mikroskopie a sledování buněčných linií jsme se zaměřili na kvantifikaci SHH proteinu pomocí metody Western blot. Cílem bylo zjistit, zda snížení množství SHH proteinu může být u *Eda* mutantních myší jedním z faktorů patogeneze v dentálním vývoji. Bylo kvantifikováno množství SHH proteinu v dolní i horní embryonální čelisti. Byla využita embrya *Eda* mutantních myší, *Eda* WT myší a CD1 myší odebraná na ED 14,5, v případě *Eda* WT i ED 13,5, a jednotlivé kmeny myší byly porovnávány mezi sebou (viz. Tab. 1). Standardně se jako kontrola používá některý z produktů House keeping genů, protože jejich exprese je mezi vzorky uniformní. Jako kontrola množství nanesených proteinů v našem případě sloužil Aktin. Výsledné hodnoty jsou tedy relativní, vztažené k množství Aktinu ve vzorku.

Na western blotu byly pozorovány rozdíly v intenzitě bandů zobrazujících se na membráně. Tato intenzita odpovídá množství daného proteinu ve zkoumaném vzorku. Při vizuálním porovnání lze vidět vyšší intenzitu bandu u všech *Eda* mutantních myší oproti *Eda* WT kontrolám a také první z CD1 kontrol (Obr. 25). Velký rozdíl lze překvapivě také pozorovat i mezi oběma CD1 kontrolami.



**Obr. 25: Western blot SHH a Aktin.** Horní pruhy western blotu značí množství SHH ve vzorku. Spodní pruhy značí množství Aktinu ve vzorku. Hmotnosti jsou uvedeny v miligramech.

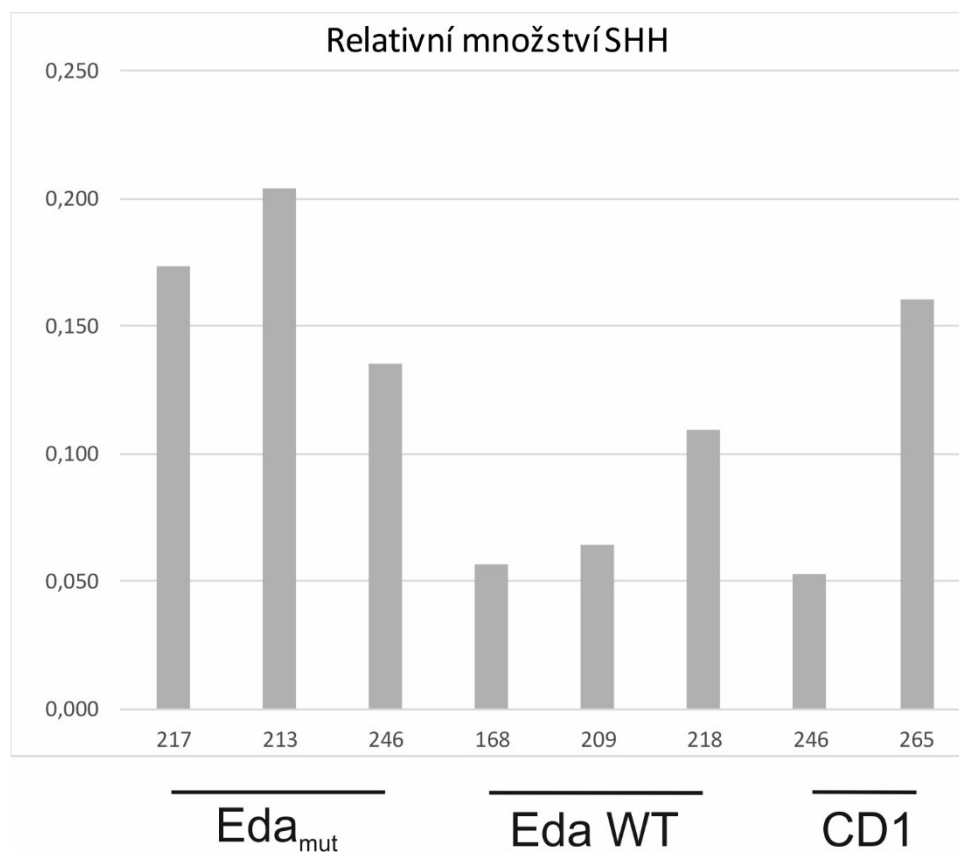
Intenzita bandů SHH byla dále kvantifikována pomocí programu VisionCapt a výsledné hodnoty byly vztaženy k množství Aktinu ve vzorku, tedy ke koncentraci proteinů ve vzorku. Tato kvantifikace se odvíjí od množství pixelů v oblasti bandu a jejich

intenzity (Tab. 7). Pokud tedy v našem případě zohledníme koncentraci proteinu v námi naneseném vzorku, relativní hodnoty SHH odpovídají vizuálnímu vyhodnocení western blotu. To znamená, že *Eda* mutantní myši mají relativně vyšší množství SHH než kontroly *Eda* WT i CD1 odpovídající hmotnosti (Tab. 7).

Genotyp	Hmotnost [mg]	Intenzita Aktinu	Intenzita SHH	Intenzita SHH vzhledem k Aktinu
<i>Eda</i> <sub>mut</sub>	217	93481	16182	0,173
<i>Eda</i> <sub>mut</sub>	213	103533	21089	0,204
<i>Eda</i> <sub>mut</sub>	246	109443	14803	0,135
<i>Eda</i> WT	168	83048	4740	0,057
<i>Eda</i> WT	209	88443	5702	0,064
<i>Eda</i> WT	218	99879	10910	0,109
CD1	246	75368	3999	0,053
CD1	265	101813	16363	0,161

**Tab. 7: Kvantifikace SHH proteinu ve vzorcích embryonálních čelistí**

Vypočtené hodnoty byly pro konkrétnější představu vyneseny také do grafu (Graf 1). Lze tedy konstatovat, že množství SHH proteinu v čelistech *Eda* mutantních myši není sníženo proti kontrolám.

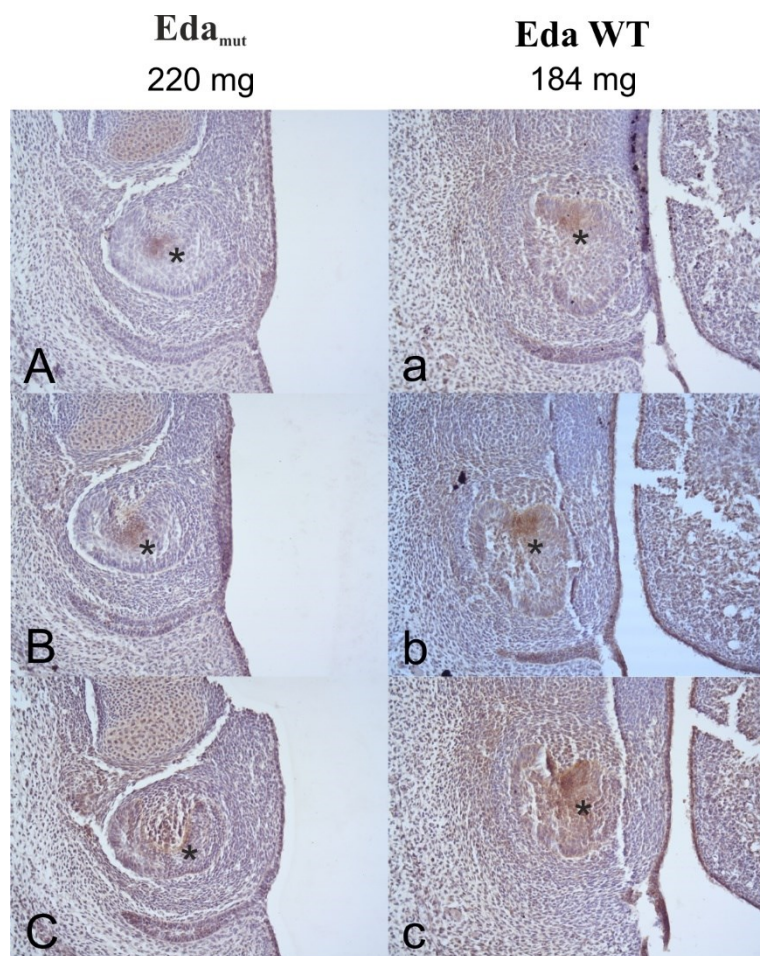


**Graf 1: Grafické znázornění relativního množství SHH proteinu ve vzorcích embryonálních čelistí.** Na ose x jsou vyneseny hmotnosti jednotlivých embryí v mg. Osa y znázorňuje relativní množství SHH ve vzorku vzhledem k množství aktinu (viz. Tab. 7).

## 7.5 Detekce SHH exprese

Pro zmapování exprese SHH proteinu u *Eda* mutantních myší byla využita metoda imunohistochemie. Jako kontrola sloužila embrya myší *Eda* WT.

U *Eda* mutantních i kontrolních embryí byla detekována přítomnost SHH proteinu v oblasti vyvíjejícího se funkčního řezáku na vnitřní straně dentálního epitelu. Na základě výsledků imunohistochemie lze konstatovat, že oblast exprese SHH byla u *Eda* mutantních myší oproti kontrole redukována. SHH protein byl detekován v oblasti zárodku funkčního řezáku u *Eda* mutantních myší i u kontrol, avšak u *Eda* mutantních myší na menším množství řezů a vzhledem ke kontrolám i na užší vymezené ploše v rámci vyvíjejícího se zubního zárodku řezáku na jednotlivých řezech (Obr. 26).



**Obr 26: Detekce exprese SHH proteinu pomocí imunohistochemie v řezákové oblasti u *Eda* mutantních myší.** Frontální histologické řezy řezákovou oblastí odpreparovaných dolních čelistí *Eda* mutantních (A-C) a *Eda* WT embryí na ED 14,5 (a-c). Dobarvováno hematoxylinem. SHH protein byl detekován v oblasti budoucího funkčního řezáku u obou sledovaných kmenů (A-C, a-c). U *Eda* mutantního embrya byl SHH protein zachycen v užší oblasti a antero-posteriorně na nižším počtu řezů než u kontroly odpovídajícího stáří (A-C). Zvětšeno 200x.



## 8 Diskuze

Předložená práce se zabývá vlivem *Eda* genu na fyziologický vývoj zubů především kvůli pochopení abnormálního vývoje zubů a dalších ektodermálních derivátů u X-vázané ektodermální dysplázie.

*Eda* myši, které jsou využívány pro studium HED, jsou označovány také jako *Eda* deficientní, i když bylo popsáno, že v případě *Eda* mutace exprese *Eda* není narušena stoprocentně, ale jen v cca 80%, tedy jedinci vykazují až 20% zachování zbytkové exprese *Eda* genu (Melnick *et al.*, 2009). V důsledku tohoto jsou projevy HED různé a závažnost postižení jedinců může být značně variabilní. Metodou western blot se nám podařilo prokázat, že u *Eda* myši lze skutečně detekovat EDA protein, a tedy, že netrpí úplnou deficiencí (obr. 11). Tento fakt je nutné samozřejmě zohlednit při interpretaci jednotlivých výsledků, neboť i redukované množství EDA proteinu může v konečném důsledku zabezpečit fungování některých procesů, které by při jeho deficienci znamenaly jednoznačný fenotypový projev. V případě *Eda* myši však může existovat variabilita ve fenotypových projevech souvisejících s různou hladinou EDA proteinu.

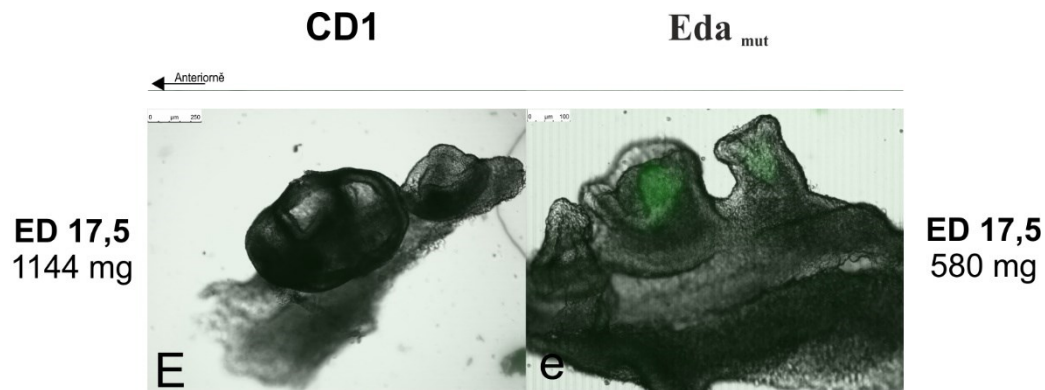
Základní odontogenetický marker v dentálním vývoji představuje *Shh*. *Shh* se vyskytuje v signálním centru vyvíjejícího se zubu, kde hraje roli při přežívání buněk na vrcholu zubního zárodku, má vliv na proliferaci buněk a je stěžejní pro vznik ameloblastů (Dassule *et al.*, 2000; Gritli-Linde *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Již dříve byl publikován vliv *Eda* signální dráhy na expresi *Shh* coby odontogenního markeru (Pispa *et al.*, 1999; Kangas *et al.*, 2004; Pummila *et al.*, 2007). *Shh* bylo tedy v našem případě využito jako marker pro sledování pokročilosti vývoje zubů. U WT myši se v tvářové oblasti dolní čelisti objevují zubní základy postupně v čase antero-posteriorním směrem, přičemž vývoji první stoličky (M1) předcházejí rudimentární struktury MS a R2 (Peterkova *et al.*, 2014). Bylo zjištěno, že rudimentární struktury tvoří vlastní signální centra exprimující *Shh* (Prochazka *et al.*, 2010). Podobně i v řezákové oblasti byly popsány rudimentární struktury exprimující *Shh* anteriorně od vyvíjejících se řezáků v superficiální oblasti epitelu (Hovorakova *et al.*, 2011, 2013). Naše výsledky ukázaly, že u *Eda* mutantních myši exprese *Shh* vykazuje obdobný vzor, avšak je zde jiné časoprostorové uspořádání jednotlivých signálních domén. Bylo zjištěno, že vývoj zubů v tvářové oblasti dolní čelisti u *Eda* mutantních myši je na námi sledovaných stádiích oproti kontrolním embryím opožděn, a to minimálně o jeden embryonální den (obr. 16). Opoždění se týká časového nástupu signálních center, ale také dosažené morfoloické pokročilosti dentálních

struktur. Toto opoždění bylo pozorováno již na ED 13,5, kdy se u kontrol vyskytuje již pupen rudimentárního zubního zárodku R2 se svým signálním centrem. U *Eda* mutantních myší jsme na tomto ED žádné signální centrum nezaznamenali. Signální centrum R2 se u *Eda* mutantních myší objevuje až na ED 14,5 a přetrvává ještě na ED 15,5. U kontrol je již na těchto embryonálních dnech detekováno signální centrum budoucího prvního moláru M1 (obr. 16 – B-E).

V dolní řezákové oblasti bylo na ED 13,5 u *Eda* mutantních myší možné zachytit signální centrum anteriorně od funkčního řezáku (obr. 17 - a) podobně, jak bylo popsáno u WT myší (Hovorakova *et al.*, 2011), které bylo ještě donedávna považováno za časnou expresi primordia funkčního řezáku (Cobourne *et al.*, 2004; Munne *et al.*, 2010). Bylo však prokázáno, že u raných stádií se nejedná o expresi budoucího funkčního řezáku, ale o lokalizaci buněk exprimujících *Shh* v superficiální oblasti dentálního epitelu anteriorně od vlastního zubního základu řezáku (Hovorakova *et al.*, 2011; Ahtiainen *et al.*, 2016). Tato skupina *Shh* exprimujících buněk byla popsána jako signální centrum rudimentárního řezáku (Hovorakova *et al.*, 2011). Rudimentární řezák jako struktura byl v myší dentici objeven a popsán více než před sto lety (Woodward, 1894). V našem souboru *Eda* mutantních myší se *Shh* exprese v rudimentárním základu řezáku objevuje na ED13,5, kdy však u kontroly již bylo možné detekovat pouze signální centrum budoucího funkčního řezáku (obr. 17 - A). Toto potvrzuje jisté zpoždění vývoje zubů u *Eda* mutantních myší.

Populace *Shh* descendentních buněk rudimentárních signálních center v řezákové oblasti a rudimentu MS v molárové oblasti byly detekovány u *Eda* mutantních myší i kontrol na stejných ED. Avšak výjimkou je signální centrum rudimentu R2. Populace *Shh* descendentních buněk R2 signálního centra byla v naší studii zachycena u *Eda* mutantních myší při aplikaci tamoxifenu na ED 11,5. Při aplikaci na ED 12,5 a odběru na ED 14,5 již zachycena nebyla, ale při odběru na ED 15,5 ji zase můžeme vidět. U kontrol byla zachycena u všech těchto stádií. Tento rozdíl by mohl být způsoben tím, že u *Eda* mutantních myší existuje několik odlišných morfotypů, které představují různé fenotypové projevy v oblasti dentice a liší se morfologií stoliček ale také přítomností či nepřítomností nadpočetného zoubku v ante-molárovém prostoru. *Eda* mutantní myši lze z hlediska morfologického i molekulárního zubního vývoje rozdělit na 2 hlavní morfotypy, které se dále dělí na další podskupiny (Kristenová *et al.*, 2003). Tyto morfotypy lze odlišit již v rámci prenatálního vývoje (Peterková *et al.*, 2002b). Je tedy pravděpodobně nutné počítat i s jistou variabilitou v rámci vývoje signálních center

odrážejících potom variabilitu v počtu a tvaru molárů (Obr. 27). U *Eda* mutantních myší byla pozorována jak redukce dentice asociovaná s úrovní aktivace receptorů pro TNF- $\beta$  (EDAR) (Tucker *et al.*, 2004), tak přítomnost nadpočetných zubů v antemolárním prostoru diastematu a abnormality tvaru molárů (Mustonen *et al.*, 2003).



**Obr. 27: Srovnání morfologie bukální oblasti dolní čelisti u *Eda* mutantních a CD1 myší na ED 17,5.** Disociované dentální epitely molárové oblasti CD1 myši (E) a *Eda* mutantní myši (e) s *Shh*-EGFP signálem (zeleně) v epitelu na ED 17,5. Anteriorně od budoucího funkčního moláru M1 *Eda* mutantní myši (e) se nachází základ nadpočetného zubu vzniklý pravděpodobně nespojením signálních center rudimentu R2 a časného základu M1 (Lochovska *et al.*, 2015).

Data získaná pomocí Cre-LoxP technologie také jasně hovoří pro zpoždění zubního vývoje u *Eda* mutantních myší ve srovnání s kontrolou. Opoždění nástupu signálních center, a tedy i zubního vývoje lze dobře pozorovat na *Shh* descendentních buňkách ze signálních center budoucích funkčních zubů, tedy M1 ve tvářové oblasti a funkčního řezáku. Nejdříve je možné detekovat *Shh* descendentní buňky v oblasti funkčního řezáku u *Eda* mutantních myší při aplikaci tamoxifenu na ED 12,5 a odběru na ED 15,5. U kontrol je tato populace pozitivní již při aplikaci tamoxifenu na ED 11,5 u všech sledovaných stádií. Obdobně je tomu i u *Shh* descendentních buněk budoucího funkčního moláru (M1), kdy byla populace těchto buněk u kontrol pozitivní již od aplikace tamoxifenu na ED 11,5 na všech sledovaných stádiích. U *Eda* mutantních myší lze tuto populaci sledovat až při aplikaci tamoxifenu na ED 13,5.

Při hodnocení morfogeneze u vývojových řad *Eda* mutantních a CD1 myší je zřejmé, že embrya na jednotlivých ED obecně vykazují značné rozdíly v tělesné hmotnosti v neprospěch *Eda* mutantních myší, jejichž jedinci jsou podstatně lehčí na stejném chronologickém stádiu vývoje. Tento fakt bude mít nepochybně také vliv na opoždění zubního vývoje u *Eda* mutantních myší. Je známo, že tělesná hmotnost

pozitivně koreluje se stádiem zubního vývoje (Peterka *et al.*, 2002). Pro upřesnění našeho pozorování opoždění vývoje by tedy bylo v budoucnu jako kontrolu vhodnější použít ještě jiný kmen myši než CD1 a Rosa26LacZ, s drobnější tělesnou konstitucí co nejvíce podobnou *Eda* mutantním myším například *Eda* WT (Obr. 28). V případě Cre-loxP technologií však vždy vlastnímu výzkumu předchází vygenerování potřebných kmenů myši pomocí vzájemného křížení, což je časově velmi náročný proces.



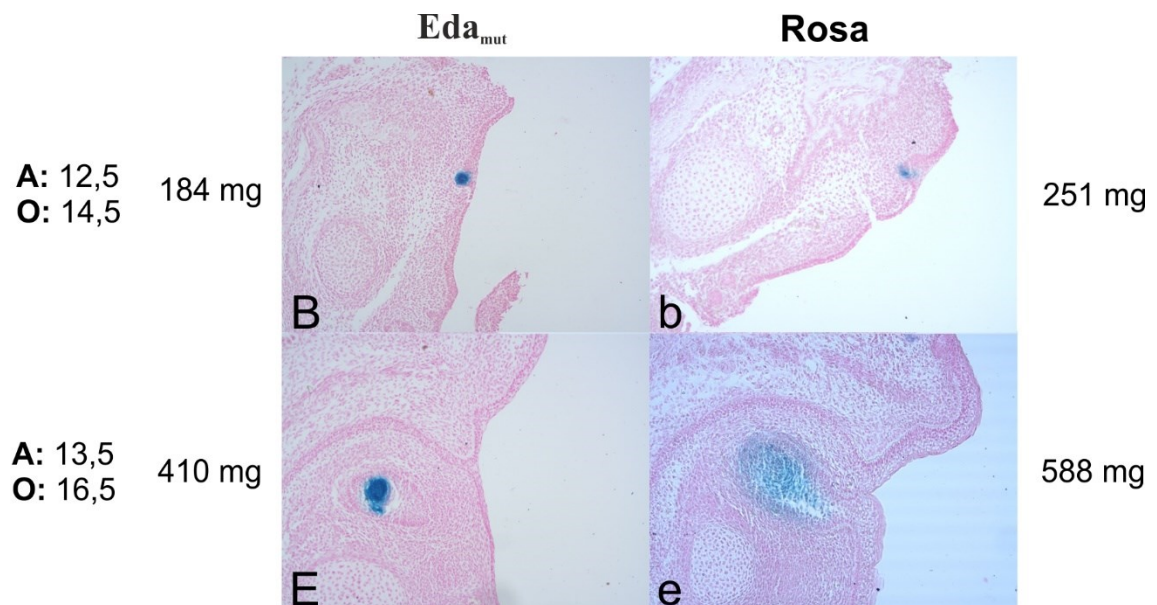
**Obr. 28: Porovnání tělesné velikosti kontrolních kmenů myši.** CD1 myš (bílá) s viditelně větší tělesnou konstitucí než *Eda* WT myš (hnědá).

Data získaná pomocí Cre-LoxP technologie nám dále také ukazují značně redukováný prostor, na kterém se nacházejí populace *Shh* descendentních buněk u *Eda* mutantních myši v porovnání s kontrolou, což by odpovídalo výsledkům dřívějších studií provedených v rámci naší laboratoře, tedy že *Shh* exprese v oblasti center funkčních řezáků *Eda* mutantních myši je v porovnání s kontrolou redukována (nepublikovaná data L. Horákové), a také, že nedostatečná exprese *Eda* genu reguluje velikost signálních center (Pispa *et al.*, 1999; Mustonen *et al.*, 2004). To nás dovedlo k myšlence potřeby kvantifikace SHH proteinu u *Eda* mutantních myši. Snížení úrovně SHH proteinu v důsledku poruchy *Eda* genu se však s pomocí metody Western blot neprokázalo. U *Eda* mutantních myši bylo množství SHH proteinu srovnatelné s kontrolou, dokonce lze říci, že bylo mírně vyšší. V tomto pokusu byl již eliminován faktor hmotnosti embryí, jelikož byla pro lepší srovnání kromě CD1 embryí použita i *Eda* WT embrya jako kontrolní. Pro

potvrzení výsledku a podrobnější statistické zpracování bude třeba analýzu provést na větším množství vzorků.

Na základě výsledků kvantifikace SHH byla dále zmapována exprese SHH proteinu u *Eda* mutantních myší také vizuálně pomocí imunohistochemie. Přítomnost SHH proteinu byla u *Eda* mutantních myší detekována v oblasti budoucího funkčního řezáku na vnitřní straně dentálního epitelu, což odpovídalo lokalizaci i u kontrol. Oblast exprese SHH proteinu u *Eda* mutantních myší však byla redukována plošně, což by odpovídalo i popsané redukci signálních center u *Eda* mutantních myší (Pispa *et al.*, 1999; Mustonen *et al.*, 2004). *Eda* má tedy pravděpodobně roli při determinaci budoucích signálních center.

Nabízí se tedy otázka, proč se se značným zmenšením oblasti exprese *Shh* genu i proteinu neredukuje podstatně také množství SHH proteinu. Pokud se znovu podrobněji podíváme na histologické řezy zachycující *Shh* descendentní buňky, lze si v oblasti budoucího funkčního řezáku a MS rudimentu všimnout vyšší intenzity modrého zbarvení u *Eda* mutantních myší v porovnání s kontrolami (Obr. 29).



**Obr. 29: Detekce *Shh* exprimujících buněčných linií u *Eda* mutantních myší a kontrol.**

Frontální histologické řezy odpreparovaných dolních čelistí *Eda* mutantních ( $Eda_{mut}$ ) embryí (B,E) respektive kontrolních (Rosa) (b,e) vygenerovaných s využitím dvou Cre-LoxP systémů křížení (viz Metody) zabarvené X-galem ukazují modře linii buněk, ve kterých byla zahájena transkripce *Shh* a jejich dceřiných buněk vždy od termínu aplikace tamoxifenu jako spouštěče aktivace Cre (A:) až do termínu odběru (O:), které jsou udávány v ED. Zvýšená intenzita modrého zbarvení u *Eda* mutantních myší v porovnání s kontrolou v oblasti MS (B,b) a budoucího funkčního řezáku (E,e).

Možné vysvětlení tohoto jevu je, že ačkoli je oblast buněk exprimujících *Shh* redukována na menší prostor, počet buněk exprimujících *Shh* by mohl zůstat přibližně stejný jako u kontrol, a tudíž by nedocházelo ke snížení produkce SHH proteinu. Abnormální vývoj zubů u *Eda* mutantních myší by tedy nemusel být způsoben sníženou expresí *Shh* genu, ale především redukcí signálního centra. Pro lepší objasnění by tedy bylo vhodné ještě vyčíslit množství *Shh* descendentních buněk v dané populaci např. metodou Tunel.

Dále je možné, že jsme pomocí western blotu zachytili volný či z nějakého důvodu nefunkční SHH protein, který se u *Eda* mutantních myší z důvodu mutace v *Eda* genu vyskytuje, i když jeho hladina exprimovaná v signálních centrech je u *Eda* mutantních myší opravdu snížena, což následně vede k abnormálnímu vývoji zubů. Zajímavým faktem je, že přestože u poměrně velkého procenta *Eda* mutantních myší dochází k abnormálnímu vývoji zubů, postnatálně se procento skutečně postižených funkčních zubů značně snižuje ve srovnání s prenatálně zachycenými abnormalitami v různých vývojových stádiích (Lesot *et al.*, 2004). Během vývoje zde pravděpodobně dochází k takzvanému „rescue“ efektu a vykompenzování původní vývojové nedostatečnosti. Je tedy možné, že k určité kompenzaci dochází i v této fázi vývoje a nedostatek *Shh* exprimujících buněk je kompenzován vyšší produkcí SHH proteinu. Skutečným poruchám v hladině či funkčnosti SHH proteinu odpovídá i existence různých fenotypových projevů v dentici u *Eda* myší (Kristenová *et al.*, 2003), tedy různé závažnosti malformací, což může reflektovat různý stupeň „rescue“ efektu, či odpovídat různému stupni snížení produkce funkčního SHH u různých jedinců.

## 9 Závěry

1. Bylo provedeno porovnání morfogeneze dentálního epitelu v řezákové a molárové oblasti *Eda* mutantních myší s CD1 kontrolou a také srovnána dynamika *Shh* exprese v signálních centrech jednotlivých zubních základů. Dynamika *Shh* exprese byla porovnáвана také na základě sledování *Shh* exprimujících buněčných populací. Pomocí těchto metod bylo prokázáno opoždění *Eda* mutantních myší ve vývoji zubů o minimálně jeden embryonální den.
2. a Dále bylo prokázáno, že vlivem nedostatku funkčního *Eda* genu u *Eda* mutantních myší dochází k prostorové restrikci signálních center zubních primordií, což může vést k abnormálnímu vývoji zubů, jako je hypomineralizace skloviny, nadpočetné či chybějící moláry, či změna jejich tvaru.
2. b Výsledky také naznačují, že produkce SHH proteinu coby odontogenického markeru, nebyla oproti kontrolním myším snížena.

Pro potvrzení, či vyvrácení těchto výsledků bude třeba analyzovat další materiál a výsledky následně statisticky zpracovat. Získaná data mohou posloužit k bližšímu pochopení následků X-vázané ektodermální dysplázie a také k pochopení úlohy a funkce *Eda* genu ve vlastním vývoji zubů.

## 10 Literatura

- Ahtiainen, L. *et al.* (2016) 'Early epithelial signaling center governs tooth budding morphogenesis', *The Journal of Cell Biology*, 214(6), p. 753 LP-767.
- Bayés, M. *et al.* (1998) 'The Anhidrotic Ectodermal Dysplasia Gene (EDA) Undergoes Alternative Splicing and Encodes Ectodysplasin-A with Deletion Mutations in Collagenous Repeats', *Human Molecular Genetics*, 7(11), pp. 1661–1669.
- Beachy, P. A., Karhadkar, S. S. and Berman, D. M. (2004) 'Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis', *Nature*. Nature Publishing Group, 432, p. 324.
- Bitgood, M. J. and 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(1), pp. 126–138.
- Chiang, C. *et al.* (1996) 'Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function', *Nature*. Nature Publishing Group, 383, p. 407.
- Choi, H. *et al.* (2016) 'TGF- $\beta$  Signaling Regulates Cementum Formation through Osterix Expression', *Scientific Reports*. The Author(s), 6, p. 26046.
- Clauss, F. *et al.* (2010) 'X-linked and autosomal recessive Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia: genotypic-dental phenotypic findings', *Clinical Genetics*. Wiley/Blackwell (10.1111), 78(3), pp. 257–266.
- Clevers, H. (2006) 'Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease', *Cell*, 127(3), pp. 469–480.
- Cobourne, M. T., Miletich, I. and Sharpe, P. T. (2004) 'Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development', *Development*, 131(12), p. 2875 LP-2885.
- Cobourne, M. T. and Sharpe, P. T. (2010) 'Making up the numbers: The molecular control of mammalian dental formula', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(3), pp. 314–324.
- Consolaro, A. (2015) 'Orthodontic movement in deciduous teeth', *Dental Press J Orthod*, 20(2), pp. 16–9.



- Courtney, J. M., Blackburn, J. and Sharpe, P. T. (2005) 'The Ectodysplasin and NF $\kappa$ B signalling pathways in odontogenesis', *Archives of Oral Biology*, 50(2 SPEC. ISS.), pp. 159–163.
- Dassule, H. R. *et al.* (2000) 'Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth', *Development*, 127(22), p. 4775 LP-4785.
- Falconer, D. S. (1952) 'A totally sex-linked gene in the house mouse', *Nature* 169, 664-665.
- Ferguson, B. M. *et al.* (1997) 'Cloning of Tabby, the murine homolog of the human EDA gene: Evidence for a membrane-associated protein with a short collagenous domain', *Human Molecular Genetics*, 6(9), pp. 1589–1594.
- Ferguson, C. A. *et al.* (2001) 'The role of effectors of the activin signalling pathway, activin receptors IIA and IIB, and Smad2, in patterning of tooth development', *Development*, 128(22), p. 4605 LP-4613.
- Fete, T. J. (2014) 'Respiratory problems in patients with ectodermal dysplasia syndromes', *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 164(10), pp. 2478–2481.
- van Genderon, C. *et al.* (1994) 'Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1 deficient mice', *Genes and Development*, 8, pp. 2691–703.
- Glick, A. B. *et al.* (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(13), pp. 6076–6080.
- Gritli-Linde, A. *et al.* (2002) 'Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization', *Development*, 129(23), p. 5323 LP-5337.
- Gruneberg, H. (1965) 'Genes and genotypes affecting the teeth of the mouse', *J. Embryol. exp. Morph.*, 14(2), pp. 137–159.
- Harada, H. *et al.* (1999) 'Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling', *Journal of Cell Biology*, 147(1), pp. 105–120.

- Hardcastle, Z. *et al.* (1998) 'The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants', *Development*, 125(15), p. 2803 LP-2811.
- Harfe, B.D., Scherz, P.J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A.P., & Tabin, C.J. (2004) 'Evidence for an Expansion-Based Temporal Shh Gradient in Specifying Vertebrate Digit Identities', *Cell*, 118, 517-528.
- Hayashi, S. and 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(2), pp. 305–318.
- Headon, D. J. *et al.* (2001) 'Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development', *Nature*, 414(6866), pp. 913–916.
- Headon, D. J. and Overbeek, P. A. (1999) 'Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction', *Nature Genetics*, 22(4), pp. 370–374.
- Heldin, C.-H., Miyazono, K. and ten Dijke, P. (1997) 'TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins', *Nature*. Macmillan Magazines Ltd., 390, p. 465.
- Hongo, I., Kengaku, M. and Okamoto, H. (1999) 'FGF Signaling and the Anterior Neural Induction in *Xenopus*', *Developmental Biology*, 216(2), pp. 561–581.
- Hovorakova, M. *et al.* (2005) 'The developmental relationship between the deciduous dentition and the oral vestibule in human embryos', *Anatomy and Embryology*, 209(4), pp. 303–313.
- Hovorakova, M. *et al.* (2007) 'Early development of the lower deciduous dentition and oral vestibule in human embryos', *European Journal of Oral Sciences*, 115(4), pp. 280–287.
- Hovorakova, M. *et al.* (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*, 316 B(5), pp. 347–358.
- Hovorakova, M. *et al.* (2013) 'Sequential Shh expression in the development of the mouse upper functional incisor', *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 320(7), pp. 455–464.

- Hovorakova M, Lochovska K, Zahradnicek O, Domonkosova Tibenska K, Dornhoferova M, Horakova-Smrckova L, et al. (2016) ‘One Odontogenic Cell-Population Contributes to the Development of the Mouse Incisors and of the Oral Vestibule’, *PLoS ONE* 11(9): e0162523.
- Ingham, P. W. and McMahon, A. P. (2001) ‘Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles’, *Genes & Development*, 15(23), pp. 3059–3087.
- Iseki, S. *et al.* (1996) ‘Sonic HedgehogIs Expressed in Epithelial Cells during Development of Whisker, Hair, and Tooth’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218(3), pp. 688–693.
- Jernvall, J. *et al.* (1994) ‘Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: Non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene’, *International Journal of Developmental Biology*, 38(3), pp. 463–469.
- Jernvall, J. *et al.* (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(2), p. 161 LP-169.
- Jernvall, J. and Thesleff, I. (2000) ‘Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis’, *Mechanisms of Development*, 92(1), pp. 19–29.
- 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(4), a008425.
- Kangas, A. T. *et al.* (2004) ‘Nonindependence of mammalian dental characters’, *Nature*. Macmillan Magazines Ltd., 432, p. 211.
- Keränen, S. V. E. *et al.* (1998) ‘Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents’, *Development Genes and Evolution*, 208(9), pp. 477–486.
- Kere, J. *et al.* (1996) ‘X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein’, *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 13, p. 409.

- Kingsley, D. M. (1994) 'The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms.', *Genes & Development*, 8(2), pp. 133–146.
- Koga, C. *et al.* (1999) 'Characterization of a Novel Member of the FGF Family, XFGF-20, in *Xenopus laevis*', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261(3), pp. 756–765.
- Kohn, A. D. and Moon, R. T. (2005) 'Wnt and calcium signaling:  $\beta$ -Catenin-independent pathways', *Cell Calcium*, 38(3), pp. 439–446.
- Komiya, Y. and Habas, R. (2008) 'Wnt signal transduction pathways', *Organogenesis*, 4(2), 68–75.
- Koyama, E. *et al.* (2001) 'Development of stratum intermedium and its role as a Sonic hedgehog-signaling structure during odontogenesis', *Developmental Dynamics*, 222(2), pp. 178–191.
- Kristenova-Cermakova, P. *et al.* (2002) 'Postnatal lower jaw dentition in different phenotypes of tabby mice.', *Connective tissue research*, 43(2–3), pp. 283–288.
- Kristenová, P. *et al.* (2003) 'Different morphotypes of functional dentition in the lower molar region of tabby (EDA) mice', *Orthodontics & Craniofacial Research*. Wiley/Blackwell (10.1111), 5(4), pp. 205–214.
- Laurikkala, J. *et al.* (2001) 'TNF Signaling via the Ligand–Receptor Pair Ectodysplasin and Edar Controls the Function of Epithelial Signaling Centers and Is Regulated by Wnt and Activin during Tooth Organogenesis', *Developmental Biology*, 229(2), pp. 443–455.
- Lesot, H. *et al.* (1996) 'Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. II. Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth', *International Journal of Developmental Biology*, 40(5), pp. 1017–1031.
- Lesot, H., Kristenova, P., Haze, A., Deutsch, D., Peterka, M., and Peterkova, R. (2004) 'Lower Incisors in the Tabby Mutant Mouse', Paper presented at: 18th ICCBMT (Alberta, Canada).

- Liu, F. *et al.* (2008) 'Wnt/ $\beta$ -catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis', *Developmental Biology*, 313(1), pp. 210–224.
- Liu, F. and Millar, S. E. (2010) 'Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in Oral Tissue Development and Disease', *Journal of Dental Research*, 89(4), pp. 318–330.
- Lochovska, K. *et al.* (2015) 'Sprouty gene dosage influences temporal-spatial dynamics of primary enamel knot formation', *BMC Developmental Biology*, 15(1), p. 21.
- Marigo, V. *et al.* (1995) 'Cloning, Expression, and Chromosomal Location of SHH and IHH: Two Human Homologues of the Drosophila Segment Polarity Gene Hedgehog', *Genomics*, 28(1), pp. 44–51.
- Marino, M. W. *et al.* (1997) 'Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. The National Academy of Sciences of the USA, 94(15), pp. 8093–8098.
- McMahon, A. P., Ingham, P. W. and Tabin, C. J. B. T.-C. T. in D. B. (2003) 'Developmental roles and clinical significance of Hedgehog signaling', in. Academic Press, pp. 1–114.
- Melnick, M. *et al.* (2009) 'Salivary gland branching morphogenesis: a quantitative systems analysis of the Eda/Edar/NF $\kappa$ B paradigm', *BMC Developmental Biology*, 9(1), p. 32.
- Miard, S. *et al.* (1999) 'Alterations in the incisor development in the Tabby mouse', *International Journal of Developmental Biology*, 43(6), pp. 517–529.
- Mikkola, M.L. (2008) 'TNF superfamily in skin appendage development', *Cytokine & growth factor reviews*, 19 3-4, 219-30.
- Moon, R. T. (2005) 'Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway', *Science's STKE*, 2005(271), p. cm1 LP-cm1.
- Moon, R. T. and Shah, K. (2002) 'Signalling polarity', *Nature*. Nature Publishing Group, 417, p. 239.
- Moss-Salentijn, L. (1978) 'Vestigial teeth in the rabbit, rat and mouse; their relationship to the problem of lacteal dentitions. Development, function and evolution of teeth', *Academic Press, London*, 13-29.

- Motyl, T. *et al.* (1998) 'Expression of bcl-2 and bax in TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells', *European Journal of Cell Biology*, 75(4), pp. 367–374. doi:
- Munne, P. M. *et al.* (2010) 'Splitting placodes: effects of bone morphogenetic protein and Activin on the patterning and identity of mouse incisors', *Evolution & Development*. Wiley/Blackwell (10.1111), 12(4), pp. 383–392.
- Mustonen, T. *et al.* (2003) 'Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1', *Developmental Biology*, 259(1), pp. 123–136.
- Mustonen, T. *et al.* (2004) 'Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages', *Development*, 131(20), p. 4907 LP-4919.
- Neubüser, A. *et al.* (1997) 'Antagonistic Interactions between FGF and BMP Signaling Pathways: A Mechanism for Positioning the Sites of Tooth Formation', *Cell*, 90(2), pp. 247–255.
- Ntani, G. *et al.* (2015) 'Maternal and early life factors of tooth emergence patterns and number of teeth at 1 and 2 years of age', *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 6(4), pp. 299–307.
- Nunn, R., Murray, A. and Sandler, J. (2011) 'Loss of deciduous teeth--is timing important to the GDP?', *Dental update*, 38(1), pp. 55-58,61-64.
- Nusse, R. and Varmus, H. E. (1992) 'Wnt genes', *Cell*, 69(7), pp. 1073–1087.
- Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980) 'Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*', *Nature*. Nature Publishing Group, 287, p. 795.
- Nutt, S. L. *et al.* (2001) 'Xenopus sprouty2 inhibits FGF-mediated gastrulation movements but does not affect mesoderm induction and patterning', *Genes and Development*, 15(9), pp. 1152–1166.
- Ohazama, A., Courtney, J.-M. and Sharpe, P. T. (2004) 'Opg, Rank, and Rankl in Tooth Development: Co-ordination of Odontogenesis and Osteogenesis', *Journal of Dental Research*. SAGE Publications Inc, 83(3), pp. 241–244.
- Ooe, T. (1956) 'On the development of position of the tooth germs in the human deciduous front teeth', *Okajimas Folia Anat Jpn* 28, 317–340.

- Ornitz, D. M. *et al.* (1996) 'Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family', *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), pp. 15292–15297.
- Peterka, M., Lesot, H. and Peterková, R. (2002) 'Body Weight in Mouse Embryos Specifies Staging of Tooth Development', *Connective Tissue Research*. Taylor & Francis, 43(2–3), pp. 186–190.
- Peterkova, R. *et al.* (2014) 'Three-dimensional analysis of the early development of the dentition', *Australian Dental Journal*, 59(SUPPL. 1), pp. 55–80.
- Peterková, R. *et al.* (1996) 'Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. I. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds', *International Journal of Developmental Biology*, 40(5), pp. 1009–1016.
- Peterková, R. *et al.* (2000) 'Dentition development and budding morphogenesis', *Journal of craniofacial genetics and developmental biology*, 20(4), p. 158—172.
- Peterková, R. *et al.* (2002a) 'Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis.', *Connective tissue research*, 43(2–3), pp. 120–128.
- Peterková, R. *et al.* (2002b) 'Different morphotypes of the tabby (EDA) dentition in the mouse mandible result from a defect in the mesio-distal segmentation of dental epithelium', *Orthodontics & Craniofacial Research*, 5(4), pp. 215–226.
- Peterkova R. (1985) 'The common developmental origin and phylogenetic aspects of teeth, rugae palatinae, and fornix vestibuli oris in the mouse', *J Craniofac Genet Dev Biol* 5:89–104.
- Peters, K. G. *et al.* (1992) 'Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse', *Development*, 114(1), p. 233 LP-243.
- Pispa, J. *et al.* (1999) 'Cusp Patterning Defect in Tabby Mouse Teeth and Its Partial Rescue by FGF', *Developmental Biology*, 216(2), pp. 521–534.
- Pispa, J. and Thesleff, I. (2003) 'Mechanisms of ectodermal organogenesis', *Developmental Biology*, 262(2), pp. 195–205.

- Polakis, P. (2000) 'Wnt signaling and cancer Wnt signaling and cancer', (650), pp. 1837–1851.
- Prochazka, J. *et al.* (2010) 'Patterning by heritage in mouse molar row development', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(35), p. 15497 LP-15502.
- Pummila, M. *et al.* (2007) 'Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression', *Development*, 134(1), p. 117 LP-125.
- Richard, A. C. *et al.* (2016) 'Targeted genomic analysis reveals widespread autoimmune disease association with regulatory variants in the TNF superfamily cytokine signalling network', *Genome Medicine*, 8(1), p. 76.
- Roberts, A. B. *et al.* (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*, 78(9), pp. 5339–5343.
- Rodriguez, A. *et al.* (2004) 'Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units.', *Genome research*, 14(10A), pp. 1902–10.
- Ruch, J. V. (1998) 'Odontoblast commitment and differentiation', *Biochemistry and Cell Biology*, 76(6), pp. 923–938.
- Sadier, A. *et al.* (2014) 'The ectodysplasin pathway: From diseases to adaptations', *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd, 30(1), pp. 24–31.
- Sarkar, L. *et al.* (2000) 'Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), pp. 4520–4524.
- Schneider, H., Faschingbauer, F., Schuepbach-Mallepell, S., Körber, I., Wohlfart, S., Dick, A., Wahlbuhl, M., Kowalczyk-Quintas, C., Vigolo, M., Kirby, N., Tannert, C., Rompel, O., Rascher, W., Beckmann, M.W., & Schneider, P. (2018) 'Prenatal Correction of X-Linked Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia', *The New England journal of medicine*, 378 17, 1604-1610.
- Srivastava, A. K. *et al.* (1997) 'The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains', *Proceedings of the National*



*Academy of Sciences*, 94(24), pp. 13069–13074.

Tamura, M. and Nemoto, E. (2016) ‘Role of the Wnt signaling molecules in the tooth’, *Japanese Dental Science Review*, 52(4), pp. 75–83.

Tarpey, P. *et al.* (2007) ‘A novel Gln358Glu mutation in ectodysplasin A associated with X-linked dominant incisor hypodontia’, *American Journal of Medical Genetics Part A*. Wiley-Blackwell, 143A(4), pp. 390–394.

Thesleff, I. and Sharpe, P. (1997) ‘Signalling networks regulating dental development’, *Mechanisms of Development*, 67(2), pp. 111–123.

Tompkins, K. (2006) ‘Molecular Mechanisms of Cytodifferentiation in Mammalian Tooth Development’, *Connective Tissue Research*. Taylor & Francis, 47(3), pp. 111–118.

Tonge, C. H. (1969) ‘The Time-Structure Relationship of Tooth Development in Human Embryogenesis’, *Journal of Dental Research*, 48(5), pp. 745–752.

Tucker, A. S. *et al.* (2000) ‘Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis’, *Development*, 127(21), p. 4691 LP-4700.

Tucker, A. S. *et al.* (2004) ‘The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development’, *Developmental Biology*, 268(1), pp. 185–194.

Turečková, J. *et al.* (1996) ‘Apoptosis is involved in the disappearance of the diastemal dental primordia in mouse embryo’, *International Journal of Developmental Biology*, 40(2), pp. 483–489.

Vaahokari, A, Aberg, T. and Thesleff, I. (1996b) ‘Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4.’, *Development (Cambridge, England)*, 122(1), pp. 121–9.

Vaahokari, A. *et al.* (1996a) ‘The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth’, *Mechanisms of Development*, 54(1), pp. 39–43.

Viriot, L. *et al.* (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(2), pp. 233–240.
- Viriot, L. *et al.* (2002) 'Evolutionary Implications of the Occurrence of Two Vestigial Tooth Germs During Early Odontogenesis in the Mouse Lower Jaw', *Connective Tissue Research*, 43(2–3), pp. 129–133.
- Wainwright, B. J. *et al.* (1988) 'Isolation of a human gene with protein sequence similarity to human and murine int-1 and the Drosophila segment polarity mutant wingless.', *The EMBO journal*, 7(6), pp. 1743–8.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003) 'Tumor necrosis factor signaling', *Cell Death And Differentiation*. Nature Publishing Group, 10, p. 45.
- Wang, X. P. *et al.* (2004) 'Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation', *Developmental Cell*, 7(5), pp. 719–730.
- Willert, K. *et al.* (2003) 'Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors', *Nature*. Macmillan Magazines Ltd., 423, p. 448.
- Woodward MF. (1894) 'On the milk dentition of the rodentia with a description of a vestigial milk incisor in the mouse (*Mus musculus*)', *Anatomischer Anzeiger* 9:619-631
- Wu, C. *et al.* (2003) 'Sonic Hedgehog Functions as a Mitogen During Bell Stage of Odontogenesis', *Connective Tissue Research*. Taylor & Francis, 44(1), pp. 92–96.
- Yun, Y.-R. *et al.* (2010) 'Fibroblast Growth Factors: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration', *Journal of Tissue Engineering*, 1(1), p. 218142.
- Zhang, Y., Tomann, P., Andl, T., Gallant, N. M., Huelsken, J., Jerchow, B., Schmidt-Ullrich, R. (2009) 'Reciprocal requirements for Eda/Edar/NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in hair follicle induction', *Developmental Cell*, 17(1), 49–61.