

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

**Katedra antropologie a genetiky člověka**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory



**Wnt signální dráha v zubním vývoji**  
Wnt signaling pathway in the tooth development

**Martina Pasovská**

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Mária Hovořáková, Ph.D

Praha, 2017

## **Prohlášení**

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

V Praze dne 10.5.2017

Podpis

## **Poděkování**

Mé poděkování patří Mgr. Márii Hovořákové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

## Abstrakt

Signální dráhy hrají důležitou roli ve vývoji orgánů a tkání v těle, včetně zubů. Signály jsou přenášeny z buňky na buňku a vytvářejí signální kaskády. Na začátku dráhy stojí ligand, který se váže na specifický receptorový protein. Po interakci ligandu s receptorem dochází k exprimaci transkripčních faktorů a ke genové expresi. Poruchy v těchto drahách se vyznačují vývojovými vadami. Molekulární podstata těchto procesů v rámci zubního vývoje je zkoumána především na myši dentici, neboť zubní vývoj myši a člověka se v základních stádiích neliší.

Předložená práce je zaměřená především na Wnt signální dráhu v zubním vývoji a její vztah s ostatními drahami během odontogeneze.

V rámci lidské dentice rozlišujeme dočasný a trvalý chrup, jejichž správný vývoj závisí na expresi a vzájemné interakci signálních molekul. Na zubním vývoji se podílejí signální dráhy Wnt, Notch, TNF, Bmp, FGF, Shh a TGF $\beta$ . Jednotlivé dráhy spolu interagují a jejich narušení může mít za následek úplné zastavení zubního vývoje nebo vznik dentálních defektů. Mezi zubní patologie u člověka řadíme zubní ageneze, anomálie ve tvaru a velikosti zubů či poruchy tvorby tvrdých tkání. Tyto poruchy se mohou vyskytovat jako součást syndromatických onemocnění, nebo jako ojedinělé defekty.

Při vývoji zubu se Wnt signály objevují již ve stádiu epitelového ztlustění a regulují celý průběh odontogeneze. Kanonická Wnt signální dráha je také zodpovědná za správný tvar zubů. Poruchy ve Wnt signalizaci byly prokázány v souvislosti s některými syndromatickými onemocněními s prezencí dentálních vad, jako například mutace ve *WNT10A* u pacientů se Schöpf–Schulz–Passarge syndromem nebo Odonto-onycho-dermální dysplázií. Prezentovaná rešerše ukazuje, že v současnosti se výzkum v oblasti Wnt dráhy a jejích komponent dostává do centra zájmu a stává se atraktivní oblastí pro výzkum i v rámci odontogeneze.

## Klíčová slova

Odontogeneze, Wnt, Signální dráhy, Zuby, Lidská dentice, Dentální vady, Člověk, Myš

## **Abstract**

Signalling pathways play an important role in the development of organs and tissues in the body, including teeth. Signals are transmitted from one cell to another cell and generate signalling cascades. The signalling pathway starts by a ligand binding to a specific receptor protein. Interaction of the ligand with the receptor is responsible for expression of transcription factors and genes. The abnormalities in the signalling pathways lead to developmental disorders. The molecular mechanisms of these processes in the tooth development are investigated on the mouse dentition, because there is no difference in the basic stages of the dental development of mouse and humans.

The presented thesis focuses mainly on the Wnt signalling pathway and its relationship with other signalling pathways during dental development.

In human dentition, we differentiate temporary and permanent dentitions, whose correct normal development depends on the expression and interactions of signalling molecules. Signalling pathways Wnt, Notch, TNF, Bmp, FGF, Shh and TGF $\beta$  are involved in the dental development. Signalling pathways interact with each other and their disruption can cause stopping the dental development or dental defects. The common dental pathologies in humans are dental agenesis, anomalies in the shape and size of the teeth or disorders of hard tissue formation. These disorders can exist as a part of syndromic diseases or as sporadic defects.

During the tooth formation Wnt signals appear at the stage of epithelial thickening and regulate the entire process of odontogenesis. The canonical signalling pathway is also responsible for the normal shape of teeth. The failure of Wnt signalling has been shown as a part of several syndromic diseases with dental pathologies presence, as for example mutation in *WNT10A* in patients with Schöpf–Schulz–Passarge syndrome or Odonto-onycho-dermal dysplasia. The presented literary survey shows that recently, the research on Wnt pathway and its components starts to be attractive also in the field of the dental development.

## **Keywords**

Odontogenesis, Wnt, Signalling pathways, Teeth, Human dentition, Dental disorders, Human, Mouse

## Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Obsah.....	6
1. Úvod.....	10
2. Lidská dentice .....	11
2.1 Dočasná dentice.....	11
2.2 Trvalá dentice.....	12
3. Stádia odontogeneze.....	14
3.1 Epitelové ztlustění .....	14
3.2 Zubní lišta.....	15
3.3 Stádium zubního pupenu .....	15
3.4 Stádium zubního pohárku.....	16
3.5 Stádium zubního zvonku .....	17
3.6 Stádium apozice (mineralizace) .....	18
3.7 Stádium prořezávání.....	19
4. Molekulární regulace vývoje zubů .....	20
4.1 Notch signální dráha.....	20
4.2 TNF signální dráha.....	21
4.3 FGF signální dráha .....	22
4.4 Shh signální dráha .....	22
4.5 Bmp signální dráha.....	23
4.6 TGF $\beta$ signální dráha.....	23
4.7 Wnt signální dráha .....	24
4.7.1 Kanonická Wnt signální dráha .....	24
4.7.2 Nekanonická Wnt signální dráha.....	25
4.7.3 Wnt signální dráha v odontogenezi u myši .....	26
4.7.4 Wnt signální dráha a zubní malformace u myši .....	27

5.	Vývojové vady zubů u člověka .....	29
5.1	Numerické vady zubů.....	29
5.1.1	Hypodoncie .....	29
5.1.2	Oligodoncie .....	30
5.1.3	Anodoncie .....	31
5.1.4	Hyperdoncie .....	31
5.2	Anomálie tvaru a velikosti zubů.....	32
5.2.1	Tvarové anomálie .....	32
5.2.2	Velikostní anomálie.....	33
5.2.3	Heterotopie .....	33
5.2.4	Srostlice .....	34
5.3	Anomálie tvrdých tkání.....	34
5.3.1	Hypoplázie skloviny.....	34
5.3.2	Amelogenesis imperfecta .....	34
5.3.3	Dentinogenesis imperfecta .....	35
5.3.4	Dysplázie dentinu .....	36
5.3.5	Hypofosfatázie.....	36
5.3.6	Hypercementóza.....	36
5.4	Wnt a vývojové vady zubů u člověka .....	37
5.4.1	Porucha Wnt dráhy jako součást syndromu .....	37
5.4.2	Wnt v nesyndromatické patogenezi dentice .....	37
6.	Závěr .....	39
7.	Seznam použité literatury.....	40

## Seznam zkratek

3D	Trojrozměrný (Tree dimensional)
APC	Adenomatózní polyposis coli (Adenomatous polyposis coli)
AXIN	Axis inhibitor
Bmp	Kostní morfogenetický protein (Bone morphogenetic protein)
CamKII	Vápník/kalmodulin dependentní kináza II
Cbfa1	Korový vazebný faktor 1 (Core binding factor 1)
CHH	Konkomitantní (souběžná) hypo-hyperdoncie (Concomitant hypo-hyperdontia)
CSF-1	Kolonie stimulující faktor 1 (Colony stimulating factor 1)
Daam1	Aktivátor morfogeneze asociovaný s dishevelled (Dishevelled associated activator of morphogenesis 1)
DD	Doména smrti (Death domain)
DED	Efaktorová doména smrti (Death effector domain)
DG	Dentinogenesis imperfecta
DKK	Dickkopf
DSPP	Dentinový sialofosfoprotein (Dentin sialophosphoprotein)
DVL/Dsh	Disheveled
Eda	Ektodysplazin
Edaradd	Doména smrti asociovaná s receptorem Eda (Edar-associated death domain)
EGF	Epidermální růstový faktor (Epidermal growth factor)
ENPP/NPP	Ektonukleotid pyrofosfatáza fosfodiesteráza (Ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase)
EVC	Ellis van Creveld syndrom
FGF	Fibroblastový růstový faktor (Fibroblast growth factor)
Fz/FZD	Frizzled
Gli-1	Onkogen asociovaný s gliomy (Glioma-associated oncogene homolog 1)
GSK-3	Glykogen syntáza kináza 3 (Glycogen synthase kinase 3)
HSPG	Heparan sulfan proteoglykany
IDE	Vnitřní zubní epitel (Inner dental epithelium)
IKK	IκB kináza
JNK	Jun N-terminální kináza
LEF1	Lymfoidní zesilující vazebný faktor 1 (Lymphoid Enhancer-binding Factor 1)
Leu17	Leucin17
LRP	Nízkodenzitní lipoprotein-related protein (Low density lipoprotein receptor-related protein)



LTa	Lymfotoxin-a
MAPK	Mitogen-aktivovaná protein kináza (Mitogen-activated protein kinases)
MMTV	Virus nádoru mléčné žlázy u myší (Mouse mammary tumor virus)
Msx	Muscle segment homeobox gene
NLK	Nemo-like kináza
ODE	Vnější zubní epitel (Outer dental epithelium)
OEZ	Odontogenní epiteliální zóna (Odontogenic epithelial zone)
OODD	Odonto-onycho-dermální dysplázie (Odonto-onycho-dermal dysplasia)
OPG	Osteoprotegerin
Osx	Osterix
PAX9	Paired box 9
PCNT	Pericentrin
PCP	Planární buněčná polarita (Planar cell polarity)
PKC	Protein kináza C
Pro17	Prolin17
Ptc	Patched
RANKL	Receptor aktivující nukleární faktor kappa B (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)
RTKs	Tyrosin kinázový receptor (Receptor tyrosine kinase)
ROCK	Rho-asociované kinázy
Shh	Sonic hedgehog signální dráha
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus (Single nucleotide polymorphism)
SSPS	Schöpf-Schulz-Passarge syndrom (Schöpf-Schulz-Passarge syndrome)
STHAG	Selektivní zubní ageneze (Selective tooth agenesis)
Tab2	Tak1-vazebný protein 2 (Tak1-binding protein 2)
Tak1	TGF $\beta$ -aktivovaná kináza 1 (TGF $\beta$ -activated kinase 1)
TCF	T-cell faktor
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$ (Transformující růstový faktor $\beta$ )
TNAP	Tkáňově nespecifická alkalická fosfatáza (Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase)
TNF	Faktor nádorové nekrózy (Tumor necrosis factor)
TRAF	Faktory asociované s TNF receptory (TNF receptor-associated factors)
TRAP	Tartarát rezistentní kyselá fosfatáza (Tartrate-resistant acid phosphatase)
Wnt	Wingless/Int-1
Wg	Wingless

## 1. Úvod

Zubní vývoj neboli odontogeneze je nepostradatelnou součástí embryonálního vývoje většiny obratlovců. Celý proces je regulován signálními drahami, které zodpovídají za správný tvar, velikost a počet zubů v ústní dutině. Vývoj savčích zubů je zahájen již v raných fázích prenatálního období a je výsledkem vzájemného působení ektodermu a mezenchymu. V první fázi vývoje dochází ke ztlustění epitelu a jeho prorůstání do okolního mezenchymu. Vrstvy epitelu dávají vznik zubní liště, která tvoří základ pro budování zubních pupenů. Následují stádia zubního pohárku a zvonku, jenž jsou pojmenovaná podle svého specifického vzhledu. Po dokončení morfogeneze (vývoj morfologických znaků) dochází k ukládání tvrdých tkání a následnému prořezávání.

Zkoumání zubního vývoje se nejčastěji provádí na dentici u myši, která představuje model odontogeneze savčí dentice. I v této práci byly použity poznatky o molekulárních procesech zubního vývoje myši. Především jsem se zaměřila na jednotlivé signální dráhy a jejich vzájemné působení v odontogenezi. Během odontogeneze je esenciální správné fungování signálních drah. Chyby v těchto drahách mohou být příčinou vývojových vad zubů a jiných tkání v těle. Mezi nejrozšířenější dentální vady u člověka patří numerické anomálie, při nichž některé zuby chybí, nebo naopak přebývají. Další skupinou jsou anomálie ve tvaru a velikosti zubů a defekty tvorby tvrdých tkání.

V předložené práci jsou popsána základní stádia odontogeneze, molekulární regulace normálního zubního vývoje a také jsem se zaměřila na patogenezi, přičemž v centru zájmu byly dentální vady, které jsou způsobené mutacemi genů signálních molekul. Největší důraz byl kladen na Wnt signální dráhu a její interakci s ostatními signálními drahami. Cílem práce bylo popsat, jakým způsobem ovlivňuje Wnt dráha vývoj zubů a jak se ve funkční dentici projevuje její chybná funkce.

## 2. Lidská dentice

### 2.1 Dočasná dentice

Dočasná dentice se u člověka vyvíjí od konce 5. týdne prenatalního vývoje a je tvořena 20 zuby, jejichž prořezávání začíná v průměru 6. měsíc po porodu. Průměrně se první mléčné zuby u dětí vyskytují ve věku 30,4 týdnů a poslední mléčný zub se objeví 29. měsíc věku dítěte. U chlapců začíná prořezávání o týden dříve než u dívek. 1. až 16. mléčný zub v pořadí můžeme dříve pozorovat u chlapců, nicméně od 17. zubu probíhá prořezávání rychleji u dívek (Hagg et Taranger, 1985; Ntani et al., 2015). V prořezávání mléčných zubů panují i další mezipohlavní rozdíly. U chlapců se dříve vyvíjí přední část chrupu, kdežto u dívek se dříve vyvíjí zadní dentice (Manjunatha et Soni, 2014 - review). První prořezaný zub z dočasné dentice obecně je dolní centrální řezák, následovaný dolním laterálním řezákem a horním centrálním řezákem. V 9. měsíci se objevuje horní laterální řezák, ve 12. měsíci lze pozorovat první dolní stoličku. Ve 14. měsíci vystupuje na povrch první horní stolička, o dva měsíce později ji následuje dolní špičák. V 18. měsíci se objevuje horní špičák, ve 20. měsíci druhá dolní stolička a nakonec, ve věku dvou let dítěte, se objevuje druhá horní stolička (Nunn et al., 2011).

Takto prořezávané zuby mají plně zformovanou korunku a již prošly kompletním procesem mineralizace. Sklovina zaujímá svou definitivní podobu a další ameloblasty se netvoří. Kořen zubu naopak pokračuje ve vývoji dalších 18 měsíců po prořezávání (Ntani et al., 2015). Ve srovnání s trvalými zuby je vrstva skloviny a dentinu u dočasných zubů o polovinu tenčí. Liší se stoličky, jež mají u mléčných zubů vyboulený krček, a styčné plochy mezi stoličkami a dalšími zuby jsou rovné. Mléčné zuby obsahují více zubní dřevě než ty trvalé, přičemž v primárních stoličkách se dřevě nachází v každém hrbolku korunky. Dřeňová dutina dočasných zubů je větší u dolních stoliček oproti horním. Dočasné zuby jsou celkově mnohem menší a vykazují bělejší barvu korunky než trvalé zuby (Cleghorn et al., 2010).

Vypadnutí dočasného zubu neboli exfoliace je způsobena apoptózou buněk na povrchu i uvnitř kořene. Dochází k resorpci kořene za působení odontoklastů a osteoklastů. Perikoronální folikul budoucího trvalého zubu obsahuje velké množství epidermálního růstového faktoru (EGF), který slouží jako mediátor resorpce kostní tkáně. Pokud se budoucí trvalý zub přiblíží k dočasnému zubu, mediátor v kořeni způsobí urychlení a rozšíření resorpce v jednom směru. Mezera, která vzniká mezi oběma zuby, je vyplněna pojivovou tkání kolem dočasného zubu a tkání folikulu kolem skloviny trvalého zubu. Molekuly epidermálního růstového faktoru působí i v okolní kostní tkáni, kde apoptotické buňky vytváří cestu pro trvalý zub a zároveň neustále produkují nové buňky epitelové tkáně. Kořeny trvalých zubů jsou před zmiňovanou resorpcí chráněny bariérou z cementoblastů. Cementoblasty pokrývají povrch kořene a jelikož nemají na svém povrchu vázané receptory pro resorpční mediátory, nemohou s nimi interagovat (Consolaro, 2015).

Předčasná ztráta mléčných zubů může mít mnoho příčin. V případě stoliček se nejčastěji jedná o kazy. Centrální řezáky u dětí dříve vypadávají v důsledku poranění a předčasná kořenová resorpce může způsobit brzkou ztrátu laterálních řezáků se špičáky. Důsledkem předčasné ztráty zubu může vznikat zjizvený povrch sliznice nebo kompaktní kost, přes kterou se následný trvalý zub hůře prořezává (Nunn et al., 2011).

## 2.2 Trvalá dentice

Trvalá dentice nahrazuje a doplňuje dočasné zuby a objevuje se průměrně ve věku 5,7 let u dívek a 6 let u chlapců. Zde je patrný mírný náskok v prořezávání zubů u dívek, který trvá po celou dobu dalšího vývoje. U jednotlivých zubů je rozdíl mezi pohlavími 4–6 měsíců. 28. trvalý zub v pořadí se v průměru objevuje u dívek ve věku 12,5 let, u chlapců o půl roku déle. Časnější vývoj zubů u dívek je spojován s dřívějším dospíváním a nástupem puberty. Mezipohlavní rozdíly panují i v pořadí prořezávaných zubů. U chlapců se objevuje druhý horní třenový zub před horním špičákem. A druhá dolní stolička se objevuje před druhým dolním třenovým zubem. U dívek může dojít k obrácenému pořadí. Na pravé i levé straně se zuby prořezávají ve stejnou dobu. Zuby dolní čelisti se obvykle objevují dříve než příslušné zuby v horní čelisti nezávisle na pohlaví. Výjimku tvoří jen druhé třenové zuby, které se dříve vyskytují v horní čelisti (Hagg et Taranger, 1985; Diamanti et Townsend, 2003; Almonaitiene et al., 2010).

Trvalá dentice člověka za běžných podmínek sestává z 32 zubů. Ústní dutina je rozdělena do čtyř kvadrantů, z nichž každý obsahuje po 8 zubech. Běžně se zuby prořezávají v následujícím pořadí. Průměrně v 6 letech se objeví dolní centrální řezák. Během 6.–7. roku přibude první dolní stolička a první horní stolička. V 7 až 8 letech se prořezou dolní laterální řezáky a horní centrální řezáky, následované horními laterálními řezáky v 8 až 9 letech. V 9.–10. roce se objevují dolní špičáky, do dvanácti let jsou prořezané první a druhé dolní i horní třenové zuby. Mezi 11 a 12 lety vystupují horní špičáky a do třináctého roku se prořezávají dolní i horní druhé stoličky. V rozmezí 17–21 let se objevují třetí dolní i horní stoličky (Nunn et al., 2011), u nichž je však častá retence (neprořezání) či ageneze (chybění).

Velikost a tvar zubů je předurčen genetickými faktory. Uplatňují se zde autosomální geny i geny vázané na pohlaví. Studie dokazují, že u jednovaječných dvojčat se vyskytuje největší shoda společných znaků ve vývoji i prořezávání dentice. O něco méně shodných znaků je u dvouvaječných dvojčat a sourozenců. Doba prořezávání je ovlivněna i typem lidské rasy. U afrických a afroamerických dětí se trvalá dentice objevuje podstatně dříve než u europoidních dětí a Asiatů. Prořezávání zubů ovlivňuje i hormonální působení. Nadledviny produkují androgeny, které ve větším množství urychlují vývoj zubu (Almonaitiene et al., 2010).

Na správný vývoj zubů a jejich prořezávání mají nezanedbatelný vliv i vedlejší faktory, především životní styl matky, pohlaví dítěte či délka kojení (Ntani et al., 2015). Výživa ovlivňuje odontogenezi a mineralizaci zubů jen velmi málo. U obézních dětí můžeme pozorovat rychlejší růst dentice, neboť mají urychlený i růst celého těla. Podobné výsledky jsou u vyšších dětí, které mají rovněž mírně pokročilou dentici ve srovnání s vrstevníky. Příznivý vliv na brzký vývoj dentice má rovněž předčasné spojování kostí či předčasná sexuální vyzrállost. Dobrým ukazatelem je proximální epifýza holenní kosti, jejíž osifikace koreluje se zubním vývojem bez ohledu na pohlaví. U dívek souvisí dřívější vývoj zubů s dřívějším věkem nástupu menarche, tedy první menstruace (Garn et al., 1965).

Pozdní vývoj trvalých zubů může mít mnoho příčin. Nejčastěji se jedná o ankylózu, nadbytek zubů v dutině ústní nebo genetické onemocnění. Ankylóza znamená srůst cementu nebo dentinu s alveolární kostí a může způsobit nedostatečný vývoj alveolárního výběžku (Andersson et al., 1984; Nunn et al., 2011).

### 3. Stádia odontogeneze

#### 3.1 Epitelové ztlustění

Za první doloženou známku vývoje zubu můžeme pokládat zesílení epitelové vrstvy a vytvoření ektodermální plakody (Pispa et Thesleff, 2003). Buňky ztlustělého epitelu mají cylindrický tvar s orientací dlouhých os jader kolmo k bazální membráně. Tyto buňky jsou uloženy ve více vrstvách, na rozdíl od okolního orálního epitelu, který obsahuje 1-2 vrstvy plochých peridermálních buněk (Peterkova et al., 1996). U člověka začíná ztlustění epitelu v oblasti dolní i horní čelisti 27. - 29. den prenatálního vývoje, u embryí s tělesnou délkou 8–9 mm (Ooe, 1957; Tonge, 1969). 32. – 34. den prenatálního vývoje je již definitivně zformován zesílený epitel a lze u něho rozlišit cylindrické buňky uložené ve 2 až 3 vrstvách (Tonge, 1969). V průběhu vývoje dochází u embryí s tělesnou délkou 11 – 14 mm k prorůstání epitelu do okolního mezenchymu (Ooe, 1957). Touto invaginací se pevně vymezují oblasti pro budoucí řezáky, špičáky a první stoličky u obou čelistí (Tonge, 1969). K invaginaci epitelu do mezenchymu v anteriorní a posteriorní oblasti čelisti nedochází zároveň. U dolní čelisti můžeme jako první pozorovat prorůstání v zadní oblasti mezenchymu, u horní čelisti je to naopak (Ooe, 1957).

U myši se epitelové ztlustění objevuje již v embryonální den 11,5 a vymezuje místo, kde se bude zub tvořit (Sarkar et al., 2000). U myšičího modelu bylo navíc prokázáno, že řídicí signalizační centrum pro tvorbu zubu se do 12. embryonálního dne nachází v epitelu. Později se toto řídicí centrum přesouvá do ektomezenchymu. Přičemž ektomezenchym v molární oblasti se liší od ektomezenchymu v oblasti řezáků (Kjaer, 2014 - review). Ve stádiu epitelového ztlustění se řídicí centrum dočasně nachází v ektodermální plakodě a exprimuje mezenchymální transkripční faktory. Epitelové signální proteiny rodiny BMP (kostní morfogenetický protein) zvyšují regulaci mezenchymálního faktoru Bmp4 za pomoci *Msx1* a *Msx2* (Muscle segment homeobox gene). Mezenchymální Bmp4 poté zvyšuje regulaci transkripčního faktoru Lef1 (lymfoidní zesilující vazebný faktor) v mezenchymu (Pispa et Thesleff, 2003).

Způsob invaginace epitelu do mezenchymu nebyl doposud jednoznačně objasněn. U myšičího modelu mluvíme o tzv. pasivní invaginaci, kdy přilehlý mezenchym roste směrem k ústní dutině (Peterkova, 1985; Peterkova et al., 2002). V recentních pracích bylo popsáno, že invaginace epitelu je pod kontrolou tzv. kontraktilní struktury, která vzniká v důsledku dynamických přesmyků suprabazálních buněk zubní plakody. Suprabazální tkáň k sobě přibližuje obě ramena invaginace a dává vznik zubnímu pupenu s úzkým krčkem. V tomto procesu se uplatňují dvě signální dráhy. FGF signalizace (fibroblastový růstový faktor) řídí buněčné dělení a následnou stratifikaci suprabazálních buněk. Shh (sonic hedgehog) signální dráha reguluje invaginaci a tvar zubního pupene (Li et al., 2016; Panousopoulou et Green, 2016). Ztlustělá epitelová vrstva (obr. 1a) na povrchu horní čelisti se nazývá

odontogenická epiteliální zóna (OEZ). Již 12. – 13. embryonální den se OEZ rozpadá na oblasti patra, zubní lišty a vestibulární lišty (Peterkova, 1985; Peterkova et al., 2002).

### 3.2 Zubní lišta

Vrstvy cylindrických buněk ztlustělého epitelu se skládají na sebe a dávají vznik zubní liště – epitelová vrstva se více zanořuje do mezenchymu. Žlábký, vzniklé překládáním vrstev epitelu, jsou pak vyplněny menšími buňkami. K mezenchymu přivrácené plochy epitelu zubní lišty svírají úhel roven nebo větší 90° vůči přilehlému orálnímu epitelu (obr. 1b) (Peterkova et al., 1996). Zubní lišta u člověka se formuje 44. – 46. den prenatalního vývoje, u embryí s tělesnou délkou 15 mm (Ooe, 1957; Tonge, 1969). Zubní lišta obvykle vzniká ze 4–5 vrstev epitelu a má tvar písmene U (Ruch, 1998; Pispas et Thesleff, 2003). Okraj zubní lišty však není rovný a vykazuje určité nerovnosti a vybouleniny (Ooe, 1957). Zubní lišta je základem pro tvorbu jednotlivých zubních zárodků, které můžeme pozorovat 46. – 48. den prenatalního vývoje (Ooe, 1962; Tonge, 1969). Na myším modelu bylo prokázáno, že se v této fázi vývoje výrazně uplatňuje Shh signální dráha, která aktivuje transkripční faktory Ptc (Patched) a Gli-1 (Onkogen asociovaný s gliomy 1). Na základě exprese Shh proteinu je stanoveno místo, kde se tvoří zubní zárodky (Sarkar et al., 2000).

U lidského embrya můžeme zevně od zubní lišty pozorovat vznik struktur vestibulární lišty (Hovorakova et al., 2005), což je epitelová struktura dávající vznik výstelce předsíně ústní (vestibulum oris). O původu dentální a vestibulární lišty existuje několik teorií. První teorie tvrdí, že se obě lišty vyvíjí nezávisle na sobě (Tonge, 1969), druhá naopak, že mají stejný původ (Bolk, 1922). Podle třetí teorie se obě lišty vyvíjí ze stejného základu pouze v přední oblasti a v zadní oblasti se vyvíjí každá zvlášť (Schour, 1929). Na základě longitudinální studie prenatalního vývoje člověka s využitím 3D rekonstrukcí bylo prokázáno, že v horní čelisti se dentální a vestibulární struktury vyvíjejí samostatně (Hovorakova et al., 2005). V dolní čelisti však samostatný vývoj byl pozorován pouze v oblasti tváří. V oblasti rtů vznikají obě struktury z jednoho epitelového ztlustění (Hovorakova et al., 2007). Z vestibulární lišty vzniká předsín dutiny ústní, která odděluje zuby od tváří a rtů.

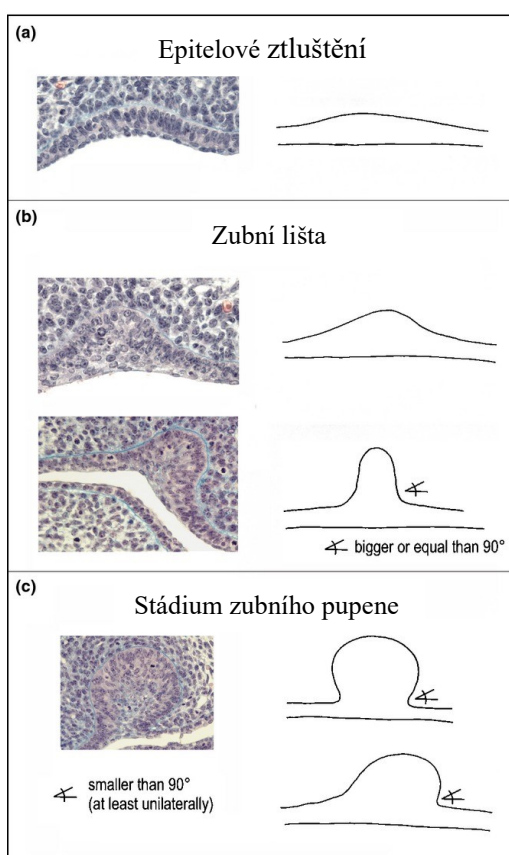
Zubní lišta u myši se poněkud liší. Netvoří souvislou vrstvu ztlustělého epitelu, ale vykazuje lokální nerovnosti. Výrazně ztlustělý epitel, formující zubní lištu, se vyskytuje pouze v oblasti řezáků a v tvářové oblasti. Podobně jako u člověka můžeme u myši pozorovat formování vestibulární lišty (Peterkova, 1985; Peterkova et al., 2002).

### 3.3 Stádium zubního pupenu

Zubní pupen je tvořen vrstvou velkých cylindrických buněk na bazální membráně, které obklopují menší buňky uprostřed. Epitel zubního pupene svírá s přilehlým orálním epitelem úhel menší než 90° (obr. 1c) (Peterkova et al., 1996). Během vývoje zubních pupenů se uplatňuje signální role *Wnt-7b*, která reguluje expresi Shh. Shh podporuje buněčnou proliferaci epiteliálních buněk,

kteřá vede ke vzniku zubních pupenů a jejich správnému umístění v dutině ústní (Sarkar et al., 2000). Pomocí 3D rekonstrukcí bylo zjištěno, že v tomto stádiu se u člověka netvoří izolované zubní pupeny, ale zubní epitel vytváří zubní val. Zubní pupeny jsou jen prostorová zduření epitelu zubního valu podél předozadní osy čelistí. Zubní primordia můžeme na zubním valu zřetelně ohraničit až ve stádiu zubních pohárků, které vznikají 44. – 46. den embryonálního vývoje. Během diferenciacce zubních pohárků můžeme však v mezizubních prostorech stále pozorovat zubní val, který si zachovává na průřezu tvar zubních pupenů (Hovorakova et al., 2007).

U myšího modelu se ve stádiu pupene uplatňuje Shh signální dráha. Shh se začíná exprimovat již v embryonální den 11.5 (Hardcastle et al., 1998).



Obrázek 1

**Schéma raných stádií odontogeneze u myšího modelu** – (adaptováno podle Peterkova et al., 2014)

(a) Epitelové ztluštění, (b) zubní lišta a (c) stádium zubního pupene. Schéma (b) a (c) ukazuje velikost úhlů svíraných bazální membránou zubních základů a přilehlým orálním epitelem.

### 3.4 Stádium zubního pohárku

Na vrcholku epitelu zubního pupenu dochází k tvorbě primárního sklovinného uzlu, který je charakteristický pro stádium zubního pohárku. Okolo sklovinného uzlu vrůstá epitel hlouběji do mezenchymu a vznikají tzv. cervikální smyčky. Vzniku cervikálních smyček napomáhají mezenchymální faktory FGF, které stimulují buněčnou proliferaci v epitelu (Keranen et al., 1998; Jernvall et Thesleff, 2000 - review; Pispá et Thesleff, 2003). Ve sklovinném uzlu se objevují i apoptotické buňky. Předpokládá se, že buňky sklovinného uzlu jsou odstraňovány pomocí mechanismu apoptózy poté, co se zubní pohárek dostane do pozdní fáze (Vaahtokari et al., 1996). Ve stádiu zubních



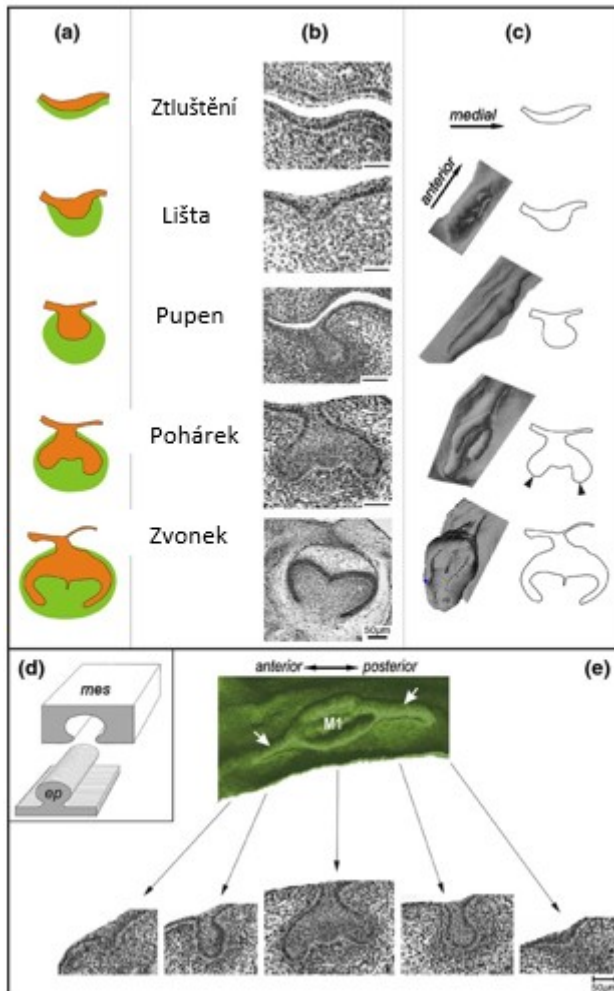
pohárků navíc probíhá diferenciaci buněk. Epitel dává vznik sklovinnému orgánu, který se člení na vnitřní zubní epitel (IDE), vnější zubní epitel (ODE), hvězdicovité retikulum a později stratum intermedium (obr. 2). Hvězdicové retikulum od sebe odděluje vnitřní a vnější zubní epitel. Vnitřní zubní epitel obklopuje kondenzovaný mezenchym, zvaný zubní papila. Zubní papila později formuje zubní dřev. Mezenchym kolem vnějšího zubního epitelu je prekurzorem pro vznik ozubice (Ruch, 1998; Sarkar et al., 2000; Koyama et al., 2001)

Při diferenciaci zubních pupenů na zubní pohárky u myši se uplatňuje role signálního proteinu BMP4, který indukuje expresi *p21* a *Msx2*, což jsou markery pro vznik sklovinného uzlu. Za správný vývoj zubního pohárku je dále zodpovědný transkripční faktor *Cbfa1* (Jernvall et Thesleff, 2000 - review).

Apoptóza – programovaná buněčná smrt – slouží k likvidaci buněk, které již nejsou potřeba. Jedná se např. o odstranění struktur, které zakrněly během fylogeneze – tzv. rudimentů. Dále se podílí na formování tvaru zuby. Nejvíce se uplatňuje během stádia zubního pohárku a zvonku, kde likviduje sklovinné uzly (Vaahtokari et al., 1996; Peterkova et al., 2002).

### 3.5 Stádium zubního zvonku

V tomto stádiu se objevují sekundární sklovinné uzly na vznikajících zubních hrbolcích. Sekundární sklovinné uzly mají za úkol regulovat tvar zubního zárodku a hrbolků (Jernvall et al., 1994; Vaahtokari et al., 1996). U myšičího modelu můžeme pozorovat výskyt sekundárního sklovinného uzlu první dolní stoličky již 15. embryonální den, první zubní hrbolček se formuje 16. embryonální den (Keranen et al., 1998). V pozdní fázi zubního zvonku vznikají odontoblasty ze zubní papily a ameloblasty z vnějšího zubního epitelu. Také zde můžeme pozorovat stratum intermedium, které odděluje hvězdicové retikulum od vnitřního zubního epitelu. Nejprve se stratum intermedium tvoří v těsné blízkosti sklovinného uzlu. Ten je opět odstraněn pomocí apoptózy a stratum intermedium zcela obsazuje jeho místo. Dochází k jeho ztlustění a vytvoření 3–5 vrstev epitelových buněk dlaždicového tvaru. Tento proces je možný především díky signální molekule *Shh*, která mimo jiné umožňuje komunikaci mezi epitelovými a mezenchymálními buňkami. Předpokládá se, že stratum intermedium má úzký vztah s vývojem ameloblastů, protože produkuje velké množství alkalické fosfatázy. Apikálním růstem cervikální smyčky se formuje zubní kořen (Ruch, 1998; Koyama et al., 2001).



Obrázek 2

**Vývoj zubní korunky u savců** – (adaptováno podle Peterkova et al., 2014)

Ve sloupci (a) je znázorněn tvar zubního epitelu v jednotlivých stádiích zubního vývoje. Epitel oranžový, mezenchym zelený. Sloupec (b) ukazuje frontální histologické řezy. Sloupec (c) znázorňuje v levé části 3D rekonstrukce odpovídající jednotlivým stádiím s korespondující kresbou tvaru epitelu na frontálním histologickém řezu v pravé části sloupce. (d) Schéma 3D rekonstrukce povrchu epitelu – ep přilehlého k mezenchymu - mes. (e) Změna tvaru epitelu na frontálních řezech napříč předozadní osy čelisti.

### 3.6 Stádium apozice (mineralizace)

Proces vzniku skloviny se nazývá amelogeneze. Jak už bylo zmíněno, sklovinný orgán je tvořen vrstevnatým epitelem, jehož vnitřní vrstva produkuje ameloblasty. Tyto buňky jsou zodpovědné za produkci a sekreci proteinů, které tvoří organickou matrix skloviny. Mineralizovaná vrstva skloviny se postupně ztlušťuje, a nakonec se zvyšuje podíl minerálních látek na konečnou hodnotu. V první fázi vývoje skloviny dochází k mineralizaci dentinu, který je formován odontoblasty (Smith et Nanci, 1995).

Za tvorbu kořene zubu je zodpovědná tzv. Hertwigova pochva, která se skládá ze dvou vrstev epitelu, a indukuje tvorbu odontoblastů produkujících kořenový dentin. Dentin vzniká v nepravidelných intervalech na různých místech kořene zubu, a tím předurčuje místo dalšího ukládání cementu po rozpadu Hertwigovy pochvy. Tímto procesem se vzájemně propojují všechny tři vrstvy tvrdých tkání zubu – sklovina, dentin a cement (Astekar et al., 2014). Mineralizace je mimo jiné regulována tkáňově nespecifickou alkalickou fosfatázou (TNAP) a ektonukleotid pyrofosfát fosfodiesterázou (ENPP/NPP). Oba geny upravují poměr anorganického fosfátu a pyrofosfátu v extracelulárním prostoru. Anorganický fosfát tvoří krystalky hydroxyapatitu, zatímco pyrofosfát tento proces inhibuje. Gen pro TNAP je

exprimován v odontoblastech a osteoblastech v okolí alveolární kosti. Genová rodina NPP obsahuje 7 enzymů, označovaných číslem 1-7. (Zweifler et al., 2015).

Další důležitou komponentu v mineralizaci tvoří cementoblasty. Tyto buňky jsou příbuzné buňkám kostní tkáně, osteoblastům, se kterými sdílejí např. expresi genů. Cementoblasty mají za úkol ukládání cementové matrix a mineralizaci podél zubního kořene. Diferenciace cementoblastů a odontoblastů se děje za pomoci transkripčního faktoru *Osx*. Ten je navíc důležitý i pro elongaci zubního kořene (Choi et al., 2016). Zubní cement můžeme rozlišit na dva odlišné typy tkáně. Acelulární cement je tvořen tenkou vrstvou vnějších cementových vláken. Obklopuje krček kořene a upevňuje vazivová vlákna z ozubice do cementové matrix. Na správný vývoj acelulárního cementu má vliv TNAP. Celulární cement se nachází v apikální části kořene (Zweifler et al., 2015).

U myši je cementogeneze zahájena 8. den postnatálního vývoje. Na cementoblastech se objevují NPP1 již 14. den postnatálního vývoje v blízkosti krčku kořene. 26. den jsou plně vyvinuty stoličky a NPP1 se nachází v acelulární cementové vrstvě na krčku kořene, jen malé množství NPP1 se vyskytuje v celulárním cementu apikálního kořene (Zweifler et al., 2015).

### **3.7 Stádium prořezávání**

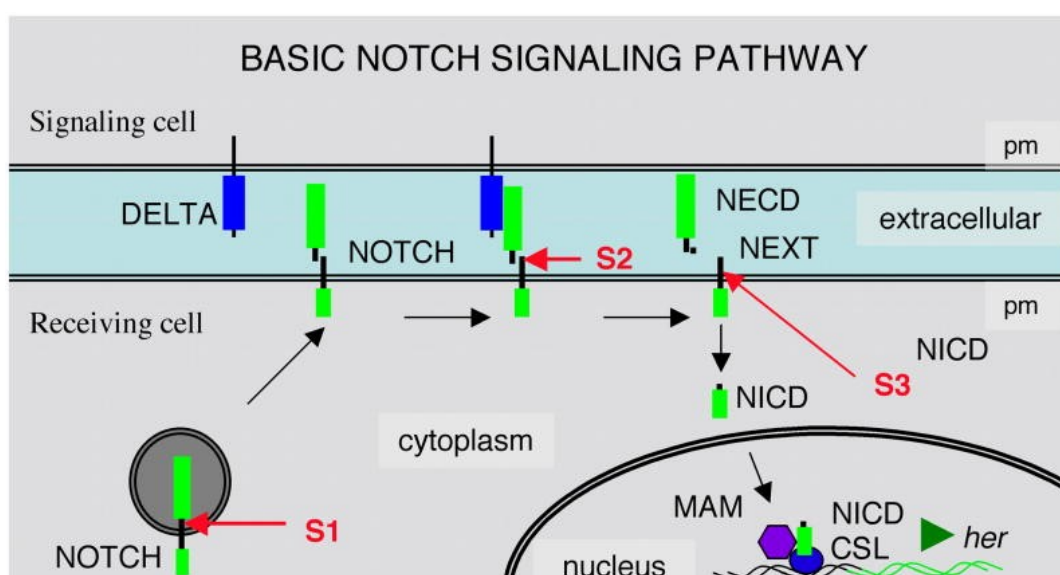
K prořezávání zubu dochází, když zub dosáhne 2/3 délky kořene. U člověka je toto stádium zahájeno až v postnatální fázi vývoje. Zde je velmi důležitý zubní folikul, který obklopuje zubní korunku a zahajuje prořezávání. Jelikož je zub prořezáván skrze kost ležící nad korunkou, je zde nutná alveolární kostní resorpce. Ta vytváří cestu pro korunku skrze kost. Před nástupem resorpce dochází k velkému přísunu TRAP (tartalát rezistentní kyselá fosfatáza) pozitivních mononukleárních buněk do zubního folikulu. Tyto buňky jsou prekurzory osteoklastů, které vstupují v ohromném množství do kostní alveolární krypty a zahajují zde osteoklastogenezi. Osteoklastogeneze je proces vzniku osteoklastů a úzce souvisí s osteogenezí, při níž se tvoří kosti. V osteoklastogenezi se uplatňuje ligand pro receptor aktivující nukleární faktor kappa B (RANKL), pro osteogenezi je významná exprese faktoru BMP-2 (kostní morfogenní protein 2). Prořezávání zubu tedy závisí na regulaci genové exprese v zubním folikulu (Wise, 2009 - review; Kjaer, 2014 - review).

## 4. Molekulární regulace vývoje zubů

Transdukční signální dráhy, ve kterých jsou signály přenášeny buňkami, jsou nezbytnou složkou vývoje všech mnohobuněčných organismů. Tyto dráhy sestávají z ligandů, receptorů a transkripčních faktorů, které dohromady tvoří signální rodiny. S vývojem zubů jsou nejvíce spjaty dráhy Wnt, FGF (fibroblastový růstový faktor), Bmp, TNF (tumor nekrotizující faktor), TGF $\beta$ , Shh a Notch, které regulují tvary jednotlivých zubů, jejich počet a prostorovou lokalizaci (Thesleff et Sharpe, 1997 - review; Lan et al., 2014 - review). Signální dráhy zprostředkovávají komunikaci mezi epitelem a mezenchymem, neboť tyto interakce jsou zapotřebí pro správný vývoj zubů (Plikus et al., 2005).

### 4.1 Notch signální dráha

Signální rodina Notch se skládá z transmembránových receptorů a jejich ligandů. První Notch gen byl objeven u *Drosophily* a ligandy byly pojmenovány Delta a Serrate. Homologní ligandy u savců se nazývají Delta a Jagged (Brou et al., 2000). U obratlovců můžeme nalézt čtyři izoformy receptorů, které nazýváme Notch1, Notch2, Notch3 a Notch4. U *Drosophily* byla objevena pouze jedna izoforma. Notch receptory se vyznačují velkou extracelulární doménou, která obsahuje značné množství EGF-like repetice (epidermální růstový faktor) a cytoplazmatické domény vyžadované pro signální transdukcí. Ligandy rovněž obsahují EGF-like motivy a DSL doménu (Delta/Serrate/Lag-2) ve své extracelulární části proteinu. Notch signalizace je aktivována vazbou transmembránového ligandu na receptor a signál je veden skrz intracelulární část receptoru (obr. 3). Přenos signálu zahrnuje proteolýzu a vzájemné působení cytoplasmatických a jaderných proteinů. Předpokládá se, že signalizace skrze Notch dráhu vyžaduje aktivaci dalších signálních drah (Mitsiadis et al., 2010).



Obrázek 3

**Notch signální dráha** – (adaptováno podle Chitnis, 2006 - review)

NECD – Notch extracelulární doména, NEXT – Notch extracelulární truncated (zkrácená) doména, NICD – Notch intracelulární doména, MAM – Mastermind gen, her – hairy E(spl) related cílové geny

Na myším modelu bylo prokázáno, že Notch signalizace je důležitou složkou ve vývoji zubů. Během rané odontogeneze můžeme pozorovat slabou expresi genu *Delta1* v zubním epitelu. Ve fázi zubního pupene je exprimován gen *Jag2* ve vnitřním a vnějším zubním epitelu, v pozdějších fázích vývoje ho můžeme pozorovat pouze v buňkách vnitřního epitelu (Mitsiadis et al., 1998). V embryonální den 11,5 je gen *Jag2* exprimován v zubním epitelu nezávisle na signálech odvozených z mezenchymu. Signály z mezenchymu jsou pro *Jag2* klíčové od embryonálního dne 12,5 (Mitsiadis et al., 2010). Ve stádiu zubního zvonku je velké množství *Delta1* exprimováno ve vnitřním sklovinném epitelu a ve stratum intermedium. Menší množství se nachází ve hvězdicovém retikulu a vnějším sklovinném epitelu. Gen *Notch1* je exprimován ve stratum intermedium, v cervikální smyčce a cévních částech zubní papily. *Notch2* se vyskytuje ve stratum intermedium, ve hvězdicovém retikulu a vnějším sklovinném epitelu. Gen *Notch3* je aktivní ve stratum intermedium, ve vnějším sklovinném epitelu a v cervikální smyčce (Mitsiadis et al., 1998).

## 4.2 TNF signální dráha

Tumor nekrotizující faktor (TNF) dostal název na základě své schopnosti vyvolat hemoragickou nekrózu v myších nádorech. Pozoruhodná je i jeho schopnost selektivně ničit buňky, které jsou transformované a podílí se na imunitních reakcích při zánětu (Marino et al., 1997). Molekuly TNF jsou produkovány zejména makrofágy jako reakce na lipopolysacharidy a další bakteriální produkty v těle. V menším množství je vytváří i lymfoidní buňky, žírné b., endoteliální b., fibroblasty a buňky nervové tkáně. TNF je nezbytný pro vznik septického šoku v organismu, přičemž dlouhodobé vystavení jeho účinkům může vést k celkové sešlosti, neboli kachexii (Wajant et al., 2003 - review). V imunitních reakcích stimuluje zrání buněk a buněčnou smrt. Kromě toho má vliv na udržení kostní homeostázy, na vývoj endokrinních žláz a nervové soustavy. Rodina TNF se skládá z 18 cytokinových ligandů a jejich 29 receptorů (Richard et al., 2016). Extracelulární domény TNF membránových receptorů obsahují repetice bohaté na cystein, společně s cysteinovými můstky. Receptory TNF-R1 a TNF-R2 mohou interagovat nejen s ligandy zanořenými v membráně (memTNF), ale i s rozpustnými TNF (sTNF) a homotrimerní molekulou lymfotoxinem-a (LTa). Receptor TNF-R1 se účastní reakcí ve většině tkání v těle. Receptor TNF-R2 je svou činností omezen pouze na buňky imunitního systému a je plně aktivován pouze membránovými ligandy (Wajant et al., 2003 - review). Signalizaci zajišťují cytoplazmatické domény TRAF (TNF receptor-associated factor) a DD (death domain). Proces je vysoce specifický na základě domény receptoru. Fas receptor s DD doménou interaguje s FADD (Fas-associated DD protein), což má za následek aktivaci kaspázy-8 nebo kaspázy-10. FADD obsahuje doménu DED (death effector domain), která ve spolupráci s kaspázami spouští buněčnou smrt (Locksley et al., 2001 - review). Další signální dráhy vedou přes NF- $\kappa$ B a MAP kinázy, nebo kinázy RIP1 a RIP3 (Richard et al., 2016).

Pro nás zajímavější je z hlediska zubního vývoje TNF dráha pro ektodysplazin (Eda). Ligand Eda se váže na receptor Edar a jeho doménu Edaradd (Edar-associated death domain). Eda-A1 izoforma, která se váže na Edar aktivuje transkripční faktor NF- $\kappa$ B. V této dráze se Edaradd váže na molekuly Traf (TNFR-associated factor), zejména Traf6. Za pomoci Tab2 (Tak1-binding protein 2) je aktivován Tak1 (TGF $\beta$ -activated kinase 1), který stimuluje IKK (I $\kappa$ B kináza) komplex a aktivuje NF- $\kappa$ B signalizaci. Mutace v genu pro ektodysplazin způsobuje ektodermální dysplázii, zubní agenezi a špatný vývoj žláz. U myšího modelu je spontánní mutace genu *Eda* označována jako *Tabby*, defektní gen pro *Edar* je nazýván *downless/Sleek* a pro *Edaradd* *crinkled* (Mikkola, 2008 - review). TNF ligand Rank1 se váže na receptor Rank nebo osteoprotegerin (OPG) a je nezbytný v diferenciaci osteoklastů a formování zubů. Ve stádiu zubního pupene jsou geny *Rank* a *Opg* exprimovány v zubním epitelu i mezenchymu (Ohazama et al., 2004).

### 4.3 FGF signální dráha

FGF (fibroblast growth factor) signální dráha má významnou roli v proliferaci, diferenciaci a migraci buněk během embryonálního vývoje. Zároveň se podílí na hojení ran, vzniku nádorů a tvorbě nových kapilár. U savců rozlišujeme čtyři typy FGF receptorů – FGFR1, FGFR2, FGFR3 a FGFR4, které se váží na receptory tyrosin kinázy (RTKs). FGF receptory obsahují extracelulární vazebnou doménu pro ligandy, transmembránovou doménu a cytoplazmatickou tyrosin-kinázovou doménu. Kromě toho jsou FGF schopny vazebné interakce s heparinem a heparan sulfan proteoglykany (HSPG), které se váží na extracelulární doménu receptoru. Tyto interakce neslouží k přenosu signálu, nýbrž regulují a aktivují signální receptory (Ornitz et al., 1996; Eswarakumar et al., 2005 - review). Vazba ligandu na receptor způsobí dimerizaci receptoru, přičemž nové homodimery se vzájemně autofosforylují. Signál je přenesen na Ras/Raf/MAPK dráhu, která aktivuje transkripční faktory (Tompkins, 2006). Fgf signalizace je nezbytná již v raných fázích vývoje zubu. Společně s Bmp dráhou aktivuje transkripční faktory *Msx1* a *Pax9*. Chybná funkce těchto faktorů má na svědomí zastavení vývoje zubu ve stádiu zubního pupene u myší. Během vývoje zubního pohárku je v primárním sklovinném uzlu exprimováno velké množství Fgf ligandů, zatímco dochází k downregulaci Fgf receptorů (Lan et al., 2014 - review). Během odontogeneze jsou v zubním epitelu exprimovány geny *FGF4*, *FGF8*, *FGF9* a *FGF20*. V mezenchymu jsou exprimovány *FGF3*, *FGF7* a *FGF10* (Tompkins, 2006).

### 4.4 Shh signální dráha

Signální dráha Shh (sonic hedgehog) je součástí rodiny hedgehog a podílí se na vývoji orgánů u obratlovců. Shh ligandy se váží na transmembránový komplex složený z receptoru Patched (Ptc) a Smoothened (Smo). Aktivita Smo je bez navázaného ligandu inhibována receptorem Ptc. Po interakci ligandu s Ptc je inhibice potlačena a dochází k expresi transkripčních faktorů rodiny Gli. U myší rozlišujeme 3 typy těchto faktorů – Gli1, Gli2 a Gli3, přičemž Gli2 a Gli3 jsou nezbytné pro vývoj

organismu. Mutantní faktor Gli2 u myši je příčinou zubních defektů týkajících se převážně horních řezáků. Mutace faktoru Gli3 nevykazuje změny od normálního zubního vývoje (Hardcastle et al., 1998).

Shh je považován za časný marker odontogeneze a Shh signalizace je aktivována již při ztluštění a invaginaci epitelu do mezenchymu. Podílí se také na přeměně zubního pohárku na zubní zvonek a ovlivňuje konečný tvar zubů (Dassule et al., 2000; Zhang et al., 2006). Účastní se i diferenciaci odontoblastů, přičemž tento děj není na Shh signalizaci závislý a inhibice Shh signálů nevede k zastavení procesu. Dále přispívá k diferenciaci ameloblastů a formování zubních hrbolků (Zhang et al., 2008).

#### 4.5 Bmp signální dráha

Rodina signálních molekul Bmp (bone morphogenetic protein) je příbuzná rodině Tgf $\beta$ , se kterou sdílí strukturální podobnost. Obě dráhy jsou společnými členy Tgf superrodiny. Signální dráha je zahájena vazbou Bmp ligandu na transmembránový serin-threonin kinázový receptor. Rozlišujeme dvě třídy těchto receptorů, typ I a typ II. Předpokládá se, že ligand se nejprve váže na receptor II, který interaguje s receptorem I a dohromady tvoří heteromerní komplex (Hogan, 1996 - review). Vytvořený komplex vede k fosforylaci receptor-regulujícího Smad-1, Smad-5 nebo Smad-8. Fosforylovaný Smad se váže na Smad-4 a spouští genovou expresi. Tato dráha se nazývá Smad-závislá kanonická Bmp dráha. Existuje i Smad-nezávislá nekanonická dráha, která je regulována mitogen-aktivovanou protein kinázou (MAPK).

Bmp signální dráha napomáhá vývoji zubního pohárku ze zubního pupenu (Wang et al., 2012). Geny *Bmp2*, *Bmp4* a *Bmp7* jsou exprimovány v zubním epitelu již raných fázích odontogeneze a zodpovídají za správnou interakci mezi epitelem a mezenchymem. Zároveň jsou exprimovány ve sklovinném uzlu a regulují diferenciaci odontoblastů a ameloblastů. Gen *Bmp5* je aktivní pouze v ameloblastech (Thesleff et Sharpe, 1997 - review).

#### 4.6 TGF $\beta$ signální dráha

Jak už bylo zmíněno, dráhy Tgf $\beta$  a Bmp patří do společné cysteinové superrodiny. Proto se příliš neliší ani mechanismus, který tyto signální dráhy spouští. Aktivace Tgf $\beta$  dráhy začíná vazbou ligandu na receptor se serin-threonin kinázovou aktivitou. Receptory dělíme do dvou tříd – I a II. Extracelulární doména receptoru obsahuje oblasti bohaté na cystein a intracelulární doména zahrnuje kinázové oblasti. Ligandy Tgf $\beta$  se častěji vážou na receptor typu II než na komplex obou receptorů. V případě Tgf $\beta$  dochází k fosforylaci intracelulárních Smad-2 a Smad3, které se váží na Smad-4. Celý komplex se přesouvá do jádra, kde interaguje s DNA vazebnými proteiny a řídí transkripci cílových genů.

Molekuly z rodiny Tgf $\beta$  významnou měrou přispívají k embryonálnímu vývoji a diferenciaci buněk. Zároveň se účastní tvorby tkáňové matrix a složek imunitního systému (Heldin et al., 1997; Tompkins, 2006). Smad-závislá Tgf $\beta$  dráha ovlivňuje expresi genu *Osterix* (*Osx*), který slouží jako

hlavní regulátor diferenciacie cementoblastů a tvorby celulárního cementu. *Osx* se navíc podílí na vzniku zubních kořenů (Choi et al., 2016).

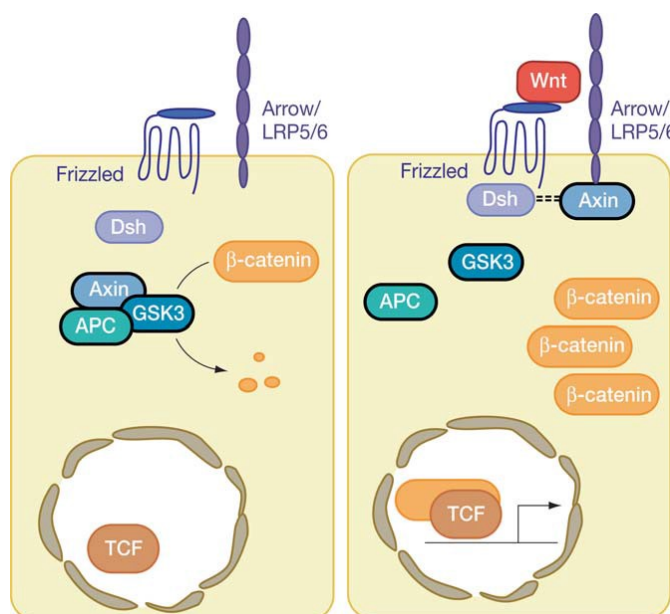
#### 4.7 Wnt signální dráha

Geny z Wnt signální rodiny kódují sekreční glykoproteiny, které jsou zodpovědné za správný embryonální vývoj a diferenciaci buněk. Mimo jiné se podílí i na vzniku nádorů. První Wnt gen, který působí jako proto-onkogenní faktor, byl získán z myšího genomu. Gen byl aktivován v nádorových buňkách myši, které byly nakaženy retrovirem MMTV (mouse mammary tumor virus) (Nusse et Varmus, 1992 - review). Gen byl pojmenován *int-1* a bylo zjištěno, že je homologní s genem *wingless (wg)* u *Drosophily* (Wainwright et al., 1988). Spojením zkratk názvů obou genů vznikl název Wnt (Nusse et Varmus, 1992 - review).

Extracelulární Wnt signál slouží jako podnět ke vzniku jedné ze dvou signálních kaskád. Prvním typem signální kaskády je dráha závislá na Wnt/ $\beta$ -kateninu neboli kanonická dráha. Druhá dráha je nekanonická, nazývaná též Wnt/ $\beta$ -katenin nezávislá dráha. Ta se dělí na PCP dráhu (Planar cell polarity) a Wnt/ $Ca^{2+}$  dráhu (Komiya et Habas, 2008).

##### 4.7.1 Kanonická Wnt signální dráha

Wnt/ $\beta$ -katenin je regulován komplexem serin-threonin kinázy (GSK-3) a proteinů Axinu a Adenomatous Polyposis Coli (APC). Za normálních okolností je  $\beta$ -katenin fosforylován a následně degradován ubiquitin-proteazomálním systémem. Přítomnost Wnt ligandů však inhibuje degradaci a  $\beta$ -katenin je defosforylován. Ligandy se váží na receptory Frizzled (Fz/FZD) a rodinu koreceptorů nízkodenzních lipoprotein-related protein (LRP), což má za následek aktivaci proteinů Disheveled (DVL/Dsh) (obr. 4) (Aurrekoetxea et al., 2016). Hromadící se  $\beta$ -katenin tvoří komplexy s transkripčními faktory LEF/TCF (Lymphoid enhancer-binding faktor/T-cell faktor) a aktivuje cílové



Obrázek 4

**Kanonická signální dráha** –  
(adaptováno podle Logan et Nusse, 2004 - review)

V levém sloupci degradace  $\beta$ -kateninu. V pravém sloupci navázání Wnt ligandů na komplex Fz/LRP a následná aktivace Dsh. Negativní regulátory procesu jsou ohrazeny černě.

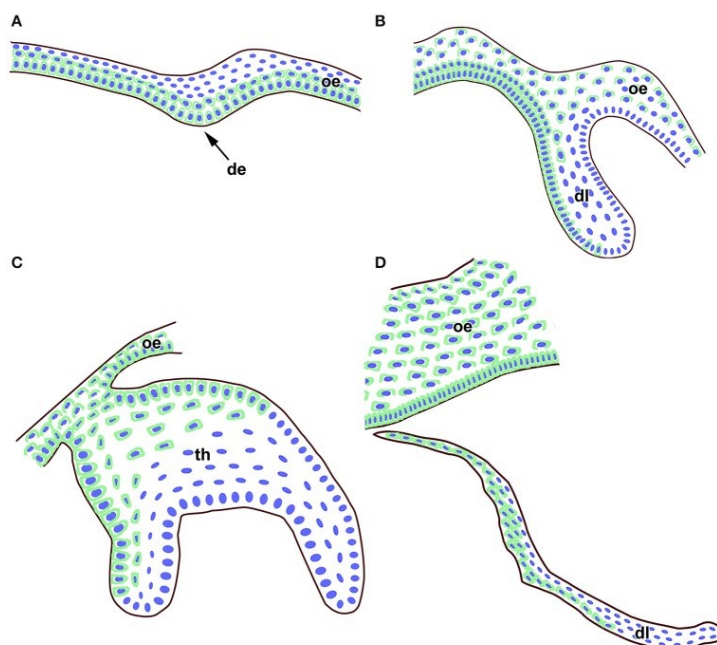


geny (Duan et Bonewald, 2016 - review). Mezi hlavní inhibitory Wnt genů patří proteinové rodiny Dickkopf (DKK) a Wise/SOST. Protein Dkk1 je specifickým inhibítozem Wnt/ $\beta$ -katenin signální dráhy, neboť narušuje komplex receptorů Fz a LRP6 (MacDonald et al., 2009 - review).

Kanonická signální dráha je důležitá pro tvorbu chondrocytů a zodpovídá za vznik a diferenciaci buněk kostní tkáně prostřednictvím osteoblastů i osteoklastů. Navíc se uplatňuje při regeneraci tkáně v kostních zlomeninách, kdy  $\beta$ -katenin stimuluje pluripotentní buňky k diferenciaci na osteoblasty. Neméně významná je role  $\beta$ -kateninu ve vývoji zubů. Chyba v této signální dráze může zastavit vývoj zubu již ve stádiu zubního pupene (Duan et Bonewald, 2016 - review).

#### 4.7.2 Nekanonická Wnt signální dráha

Receptorem pro PCP dráhu je rovněž Frizzled (Fz) (obr. 5), který se pojí s odlišnými koreceptory. Pravděpodobně se jedná o rodiny koreceptorů NRH1, Ryk, PTK7 a ROR2. Výsledkem je aktivace proteinu Dsh, který se skládá ze dvou domén – PDZ a DEP. Domény jsou potřebné k vytvoření dvou drah, které aktivují malé GTPazy Rho a Rac. Na vytvoření Rho dráhy je nezbytný komplex DSH-Daam1, který aktivuje protein Daam1 (Dishevelled associated activator of morphogenesis 1). Za pomoci Rho guaninových výměnných faktorů dochází k aktivaci Rho GTPazy, která spouští činnost Rho-asociované kinázy (ROCK) a myozinu. Následkem toho dochází k modifikaci aktinového cytoskeletu. Rac dráha je aktivována doménou DEP a stimuluje činnost JNK



Obrázek 5

**Expresi genu *Fzd6*** – (adaptováno podle Putnova et al., 2017)

Obrázek ukazuje expresi genu *Fzd6* v jednotlivých fázích odontogeneze. Zelenou barvou je označen exprimovaný gen, modrá jsou jádra. a) epitelové ztlustění, *Fzd6* exprimován na bazální membráně. b) zubní lišta, c) stádium zubního zvonku, d) sekundární zubní lišta

(Jun N-terminální kináza). PCP signální dráha ovlivňuje strukturu a orientaci řasinek smyslového epitelu ve vnitřním uchu, uspořádání vlasových folikulů a ovlivňuje dorzální mezodermální buňky, které se podílejí na gastrulaci (Komiya et Habas, 2008).

Wnt/Ca<sup>2+</sup> dráha se vyznačuje tím, že využívá intracelulární Ca<sup>2+</sup> z endoplazmatického retikula a je závislá na G-proteinech. K uvolnění vápníku dochází při interakci některých Wnt ligandů s Fz receptorem. Mezi takové ligandy patří Wnt5a a Wnt11, které se váží na krysí receptor Fz2 (RFZ-2). Vazba způsobí uvolnění vápníku za pomoci trimerních G-proteinů, aniž by byl aktivován β-kenin. Zvýšená hladina vápníku aktivuje protein kinázu C (PKC) a vápník/kalmodulin dependentní kinázu II (CamKII). CamKII dále ovlivňuje transkripční faktor NFAT, TGFβ aktivovanou kinázu (TAK1) a Nemo-like kinázu (NLK). Wnt/Ca<sup>2+</sup> dráha mimo jiné reguluje kanonickou dráhu při formování tělní osy na dorzální straně. Podílí se na gastrulačních procesech a na tvorbě srdce (Komiya et Habas, 2008).

#### 4.7.3 *Wnt signální dráha v odontogenezi u myši*

Během zubního vývoje u myši dochází k expresi genů *Wnt3*, *Wnt4*, *Wnt6*, *Wnt7b* a *Wnt10b* v zubním epitelu. Gen *Wnt5a* je exprimován v mezenchymu a zubní papile (Tamura et Nemoto, 2016 - review). Odontogeneze je zahájena 11. – 12. embryonální den ztluštěním orálního epitelu. Již v epitelovém ztluštění dochází k expresi genů *Wnt3* a *Wnt7b*. Gen *Wnt10b* se objevuje již v embryonální den 11,5 v zubním ztluštělém epitelu tvářové oblasti. Geny *Wnt6*, *Wnt4* a Wnt receptor MFz6 se společně objevují v orálním i zubním epitelu. V zubním mezenchymu je exprimován receptor MFrzb1 a gen *Wnt5a* v obou čelistech (Sarkar et Sharpe, 1999; Liu et Millar, 2010; Yu et al., 2016). V tomto stádiu je možné pozorovat signál receptoru FZD6, hrajícího důležitou úlohu v determinaci planární polarity buněk, na labiální straně orálního epitelu, v bazální vrstvě zubního epitelu i v okolním mezenchymu. Silný signál je exprimován na labiální straně zubní lišty (Putnova et al., 2017).

V rané fázi zubního pupenu je Wnt signalizace zprostředkována potlačením genové exprese *Msx1* a *Bmp4*, a β-kenin je exprimován v zubním epitelu i mezenchymu (Tamura et Nemoto, 2016 - review). V embryonální den 13,5 můžeme pozorovat expresi *Wnt10b* ve vznikajícím zubním pupenu (Yu et al., 2016). V tomto stádiu se objevuje gen *Wnt7b* a *Wnt4* v epitelu budoucích stoliček, a *Wnt6* je detekován v orálním epitelu bukálně od zubního pupene (Sarkar et Sharpe, 1999).

Během diferenciacce zubních pupenů na pohárky se signalizační centrum přesouvá z ektomezenchymu do vznikajícího sklovinného uzlu za podpory faktoru LEF1. Transkripční faktor Fgf4 ve sklovinném uzlu vyvolává přenos signálů Wnt signální dráhy (Pispa et Thesleff, 2003). Nepřítomnost transkripčního faktoru LEF1 u myši je příčinou zastavení vývoje ve fázi zubního pupenu v embryonální den 14,5. Předpokládá se, že LEF1 slouží k přenosu signálů z epitelu do mezenchymu v klíčovém období embryonálního dne 13,5. LEF1 navíc propojuje signály dvou signálních drah, a to Wnt a FGF (Kratochwil et al., 2002).

Pro stádium zubního pohárku je typická tvorba primárního sklovinného uzlu. Ve sklovinném uzlu se v embryonální den 14,5 objevuje exprese genu *Wnt10b*, u stoliček je exprimován gen *Wnt3*. Ve sklovinném orgánu můžeme pozorovat exprese genů *Wnt7b* a *Wnt4*, v samotném sklovinném uzlu se však neexprimují. *Wnt6* můžeme detekovat ve vnějším i vnitřním sklovinném epitelu a ve sklovinném uzlu. *MFrzb1* a *Wnt5a* se v tomto stádiu exprimují v mezenchymu obklopujícím zubní folikul a na vrcholcích zubní papily (Sarkar et Sharpe, 1999; Liu et Millar, 2010; Yu et al., 2016).

V embryonální den 15,5 začíná přeměna zubního pohárku na zubní zvonek. V tomto procesu se uplatňují geny *Wnt10b* a *Wnt3*, které jsou aktivovány pouze ve vnitřním sklovinném epitelu. V primárním i sekundárním sklovinném uzlu je exprimován gen *Wnt10a*. Signál je postupně přenášen ze sekundárního uzlu na vrstvu preodontoblastů pod ním, kde indukuje expresi dentinového sialofosfoproteinu. Na diferenciaci odontoblastů se rovněž podílí gen *Wnt1*, který inhibuje aktivitu alkalické fosfatázy a vytváří mineralizované uzly v kmenových buňkách zubní dřene. Tyto procesy regulují diferenciaci kmenových buněk zubní dřene na odontoblasty v průběhu celé odontogeneze (Kim et al., 2011; Tamura et Nemoto, 2016 - review). *Wnt6* se exprimuje ve vnitřním i vnějším sklovinném epitelu. V epitelu zubních zárodků můžeme pozorovat signál genů *Wnt4* a *Wnt7b*. Signální molekuly *Wnt5a* a *MFrzb1* jsou podobně jako v předchozím stádiu exprimovány v mezenchymu zubního folikulu a zubní papily. V této fázi vývoje ovlivňují Wnt signály velikost stoliček a vznik zubních hrbolků (Sarkar et Sharpe, 1999; Liu et Millar, 2010; Yu et al., 2016; Putnova et al., 2017). Ve stádiích zubního pohárku a zvonku je signál receptoru FZD6 detekován pouze v okolním epitelu, a dále se šíří do cervikální smyčky ve stádiu zubního zvonku. Dosud nebylo prokázáno, že by porucha v genu *Fzd6* způsobovala zubní vady u myši či člověka (Putnova et al., 2017).

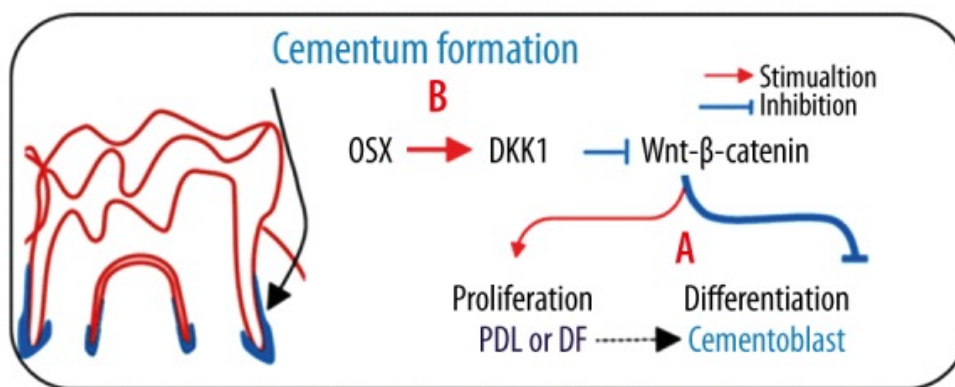
Wnt signalizace je regulována i za pomoci Plakophilinu 1 (Pkp1), který se podílí především na diferenciaci ameloblastů. Pkp1 je ve velkém množství exprimován 13. embryonální den ve stádiu zubního pupene. 14. embryonální den ho můžeme pozorovat v buňkách hvězdicového retikula. V buňkách vnitřního zubního epitelu a stratum intermedium se Pkp1 objevuje již 16. embryonální den. Z experimentů vyplývá, že Pkp1 je exprimován pouze v buňkách zubního epitelu, nikoliv mezenchymu (Miyazaki et al., 2016). Kanonická Wnt dráha stabilizuje množství  $\beta$ -kateninu v zubním mezenchymu během postnatálního vývoje zubů. Tento proces kontroluje diferenciaci odontoblastů a cementoblastů, a reguluje mineralizaci dentinové a cementové matrix.  $\beta$ -katenin mimo jiné reguluje formování kořene. V periodontálním vazuu je exprimován *Axin2*, který se uplatňuje při vytváření cementové matrix (Kim et al., 2011; Bae et al., 2013; Bae et al., 2015; Han et al., 2015).

#### **4.7.4 *Wnt* signální dráha a zubní malformace u myši**

Expese inhibitoru *Dkk1* může u myši zastavit vývoj zubu ve stádiu zubní lišty (Wang et al., 2014). Ve stádiu zubního pupene dochází k expresi  $\beta$ -kateninu v zubním mezenchymu, který ovlivňuje vznik primárního sklovinného uzlu v epitelu. Inhibice  $\beta$ -kateninu v orálním

mezenchymu proto vede k zastavení zubního vývoje ve stádiu zubního pupene. Jelikož se  $\beta$ -katenin podílí na vzniku primárního sklovinného uzlu, jeho mutace může způsobit vývoj nadpočetného zubu u myši. Příčinou je tvorba nového sklovinného uzlu mimo již existující zubní základ (Liu et Millar, 2010).

Kanonická signální dráha ovlivňuje zubní morfogenezi a inhibice této dráhy je příčinou abnormálně tvarovaných zubů (Tamura et Nemoto, 2016 - review).  $\beta$ -katenin se podílí na stimulaci cementoblastů (obr. 6) a ukládání cementové matrix. Inaktivace  $\beta$ -kateninu v této fázi vyvolává poruchy ve vývoji kořenů stoliček a způsobuje hypo- nebo hypergenezi zubů (Duan et Bonewald, 2016 - review).



Obrázek 6

**Negativní regulace Wnt/ $\beta$ -kateninu během diferenciaci cementoblastů** – (adaptováno podle Wang et al., 2016)

- A)  $\beta$ -katenin stimuluje proliferaci PDL a DF, a inhibuje diferenciaci cementoblastů.
  - B) OSX negativně reguluje Wnt/ $\beta$ -katenin za pomoci aktivace Wnt inhibitoru DKK1.
- PDL – periodontální vaz, DF – zubní folikul, OSX – osterix

Gen *Wnt10a* reguluje tvar kořene a zubní korunky. Mutace v tomto genu způsobuje u myši nadpočetnou čtvrtou stoličku v dolní čelisti, menší stoličky s tvarově odlišnými korunkami a taurodontismus (Yang et al., 2015). Na Wnt signalizaci se podílí i Wnt antagonisty Wise a Shh regulátory zpětné vazby, jejichž mutace mohou vést ke vzniku abnormálního počtu či velikosti zubů (Ahn et al., 2010). Mutace receptoru LRP6 vede u myši k rozštěpu patra a rtu (Ockeloen et al., 2016).

TNF dráha Eda/Edar může regulovat expresi genů *Wnt10a* a *Wnt10b*, jejichž mutace je příčinou vzniku zubních agenezí. Snížení aktivity komplexu Eda1/Edar/NF- $\kappa$ B má za následek snížení exprese genu *Wnt10a* či *Wnt10b*, a vznik nesyndromatické zubní ageneze (Shen et al., 2016).

## 5. Vývojové vady zubů u člověka

### 5.1 Numerické vady zubů

Numerické vady zubů patří mezi nejčastější poruchy spojené s denticí. Postihují jak mléčné, tak trvalé zuby a mohou mít syndromatický i nesyndromatický původ. Poruchy ve vývoji dentice, které se vyznačují chybějícími zuby, se souhrnně označují jako ageneze (obr. 7). Selektivní zubní agenezi (STHAG) můžeme dále rozdělit na hypodoncii, oligodoncii a anodoncii. Nesyndromická forma této poruchy většinou postihuje jeden až dva zuby a častěji se vyskytuje u bělošského obyvatelstva. Nejčastěji se můžeme setkat s nevyvinutými třetími stoličkami, které chybí u 20 % populace. Ageneze druhých třenových zubů se vyskytuje ve 3,4 % případů a horní laterální řezáky chybí u 2,2 % populace. (Vastardis, 2000 - review; Cobourne et Sharpe, 2013 - review).

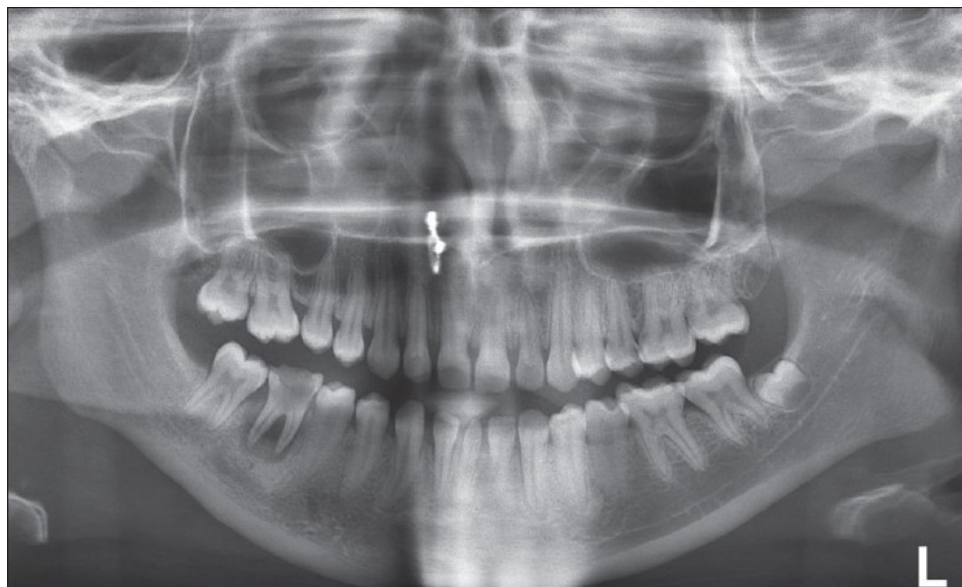
#### 5.1.1 Hypodoncie

Hypodoncie je termín, který označuje chybění méně než šesti zubů, s výjimkou třetích stoliček (Cobourne et Sharpe, 2013 - review). Ve většině případů se jedná o dědičnou chorobu, která je podmíněna autosomálně dominantními geny. Bylo zjištěno, že v různých rodových liniích je hypodoncie způsobena odlišnými skupinami genů, v některých případech se jedná o recesivní geny či geny vázané na pohlaví. Příčinnou mohou být i vnější faktory, např. endokrinní poruchy či syfilis (Book, 1950).

Hypodoncie může být jedním z projevů ektodermálního syndromu, který je podmíněn účinkem specifického genu. Hypohidrotická ektodermální dysplazie (HED) může být způsobena geny vázanými na pohlavní chromozomy (Book, 1950). Příčinou je mutace v genu pro ektodysplasin-A, který je součástí TNF signální dráhy (Klein et al., 2013). Choroba se vyznačuje chyběním potních žláz, hypodoncií nebo úplnou anodoncií. Postižení mají tenkou, suchou kůži a řídké vlasy. Book rovněž popsal chorobu, která se vyznačuje agenezí třenových zubů. Nazval ji PHC syndrom, který se mimo jiné projevuje předčasným šedivěním vlasů. Choroba je ovlivněna autosomálně dominantními geny (Book, 1950).

Vzácně se objevuje i porucha zvaná konkomitantní (souběžná) hypo-hyperdoncie (CHH). U pacientů můžeme pozorovat hypodoncii doprovázenou nadpočetnými zuby v jiných pozicích než pozice chybějícího zubu, která nejčastěji postihuje trvalou dentici. Ageneze se obvykle týká jedné až čtyř třetích stoliček, horních laterálních řezáků a horních a dolních druhých třenových zubů. Nejčastějším nadpočetným zubem je tzv. mesiodens v horní čelisti. Porucha úzce souvisí s rozštěpy patra a rtů a některými syndromy, např. Downův a Ellis van Creveld (EVC) syndrom. Příčiny vzniku CHH nejsou zcela objasněny. Předpokládá se, že na vině je chybná interakce epitelových a mezenchymálních buněk v rané odontogenezi, nebo nesprávná funkce buněk neurální lišty (Varela et al., 2009). EVC syndrom patří do skupiny vzácných autosomálně recesivních onemocnění,

kteře ovlivňují vývoj kostí a zubů. Syndrom je způsoben mutací v genu *EVC* nebo *EVC2*, jenž kódují stejnojmenné proteiny. Proteiny jsou exprimovány v primárních cílích a zapojují se do signální dráhy Shh. Mutace v genech *EVC/EVC2* mají na svědomí chybnou interakci signálních Shh ligandů (Chen et al., 2010).



Obrázek 7

**Ageneze zubů 18, 28, 31, 41 a 48** – (adaptováno podle Varela et al., 2009)

Snímek ukazuje agenezi zubů 18, 28, 31, 41 a 48, přičemž první číslo z dvojice určuje kvadrant a druhé číslo udává pozici v kvadrantu. Nadpočetný zub se nachází uprostřed dolní čelisti.

Autosomálně dominantní hypodontie je spojována s posunovou mutací genu *PAX9* na chromozomu 14. Nejčastěji postihuje trvalé stoličky, výjimkou však nejsou ani druhé třenové zuby či centrální řezáky (Klein et al., 2013).

### 5.1.2 Oligodontie

Oligodontie je vada, při které chybí více než šest zubů, kromě třetích stoliček (Cobourne et Sharpe, 2013 - review). Stockton a kol. zkoumali vrozenou oligodontii, vázanou na autosomálně dominantní geny. Zjistili, že mutace *PAX* genů způsobuje posun čtecího rámce a změnu párových oblastí genu *PAX9*. Mutace *PAX* genů je tedy zodpovědná za agenezi dentice u člověka (Stockton et al., 2000). Oligodontie je dále způsobená mutací v genu *MSX1*. Tato posunová mutace vyvolá změnu v sekvenci aminokyselin a má za následek absenci několika permanentních zubů. Obvykle nejsou vyvinuty třenové zuby v obou čelistech a dolní centrální řezáky z trvalé dentice. Absence téměř všech stoliček je typická pro mutaci *PAX9* genu. Tímto způsobem můžeme jasně rozlišit, který z těchto genů je v mutované formě odpovědný za oligodontii.

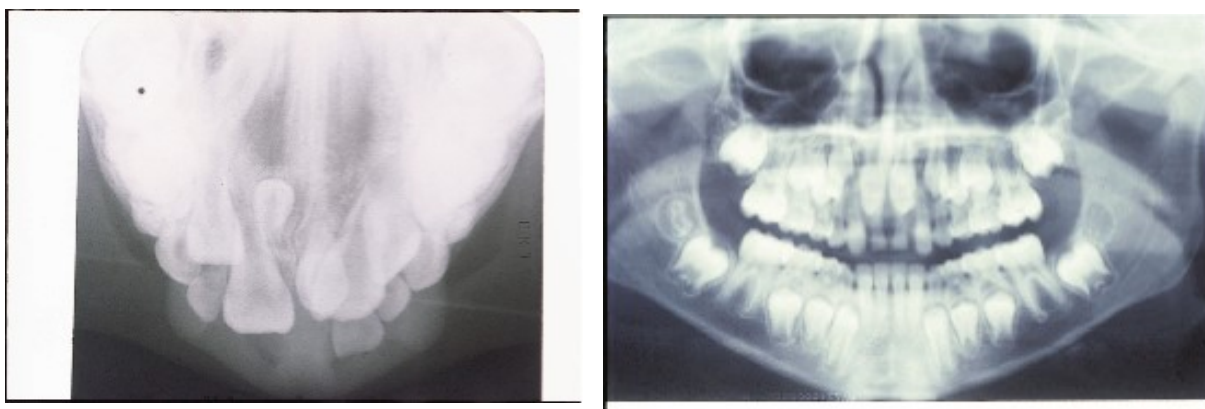
### 5.1.3 Anodoncie

Anodoncie je chápána jako stav, při kterém nedochází k vývoji zubů v jedné nebo obou čelistech (Cobourne et Sharpe, 2013 - review). Úplná anodoncie se v populaci vyskytuje velmi vzácně. Předpokládá se, že jde o dědičnou chorobu, která se přenáší pouze po otcovské linii. Vyskytují se případy bezzubých mužů, kteří jsou rovněž bez vlasů a jsou citliví na teplo. U žen takové případy nebyly pozorovány (Rutherford, 1931).

### 5.1.4 Hyperdoncie

Zvýšený počet zubů se nazývá termínem hyperdoncie (obr. 8). V trvalé dentici se častěji objevuje u mužů než u žen v poměru 2:1. Může postihovat oba typy dentice, v jedné nebo obou čelistech. Nadpočetné zuby buďto vykazují normální vzhled, nebo se mírně liší ve tvaru korunky. Část nadpočetných zubů v dočasné i trvalé dentici se nemusí prořezat ven a mohou způsobovat další problémy (Varela et al., 2009). Příčina vzniku hyperdoncie není zcela objasněna. Odborníci se nejvíce přiklání k teorii, že nadpočetné zuby vznikají hyperaktivitou zubní lišty. Jiná teorie vysvětluje poruchu rozdělením zubu na 2 části ve stádiu zubního pupene. Nemalou roli zde hraje i dědičnost. U příbuzných jedinců se tato anomálie vyskytuje častěji, ačkoliv se neřídí základními Mendelovy zákony (Garvey et al., 1999 - review). Přestože se vrozená hyperdoncie objevuje vzácně, je ovlivněna autosomálně dominantními i recesivními geny a geny vázanými na pohlaví (Klein et al., 2013).

Nejčastějším typem nadpočetného zubu je tzv. mesiodens. Tento jev se vyskytuje u 0,15 až 1,9 % populace. Mesiodens je situován v horní čelisti, v oblasti centrálního řezáku. (Russell et Folwarczna, 2003 - review). Nadpočetné zuby dále rozčleňujeme podle morfologických znaků na 4 typy. Nejčastějším typem je kónický tvar zubu, který se s převahou vyskytuje v dočasné i trvalé dentici. Obvykle je lokalizován v oblasti horních řezáků, kde může způsobit jejich posunutí či



Obrázek 8

**Hyperdoncie** – (adaptováno podle Garvey et al., 1999 - review)

Snímek vlevo ukazuje mesiodens kónického tvaru. Na snímku vpravo jsou nadpočetné tuberkulární horní centrální řezáky, které nejsou prořezané.



otočení. Druhým typem je tuberkulární zub, který se vyznačuje větším počtem hrbolků. Tyto zuby mají opožděný vývoj kořene a obvykle nedochází k jejich prořezávání. Bývají příčinou pozdního prořezání horních centrálních řezáků, neboť se vyskytují v této oblasti. Třetí typ se popisuje jako suplementární (nadpočetný) zub. Ten se tvarově shoduje s některým ze zubů, nejčastěji s horním laterálním řezákem, a nachází se na konci zubní řady. Posledním typem je odontom. Ve skutečnosti se jedná o odontogenní nádor, a proto není všemi vědci přijímán jako typ nadpočetného zubu (Garvey et al., 1999 - review).

## 5.2 Anomálie tvaru a velikosti zubů

Během vývoje zubního zárodku dochází k interakci epitelu s mezenchymem a poruchy v těchto drahách mohou způsobit anomálie ve tvaru a velikosti zubů. Pro tvorbu korunky je zásadní stádium zubních pupenů a pohárků, ve kterých se tvoří primární sklovinné uzly. Vytvořený sklovinný orgán je poté zodpovědný za správný tvar a počet zubních hrbolků (Cobourne et Sharpe, 2013 - review).

### 5.2.1 Tvarové anomálie

Tvarové anomálie jsou velmi rozmanité a mohou postihovat zubní korunku či kořen. Porucha se nejčastěji týká stoliček, kde můžeme pozorovat nadpočetný zubní hrbolek. Až 60 % populace vlastní přídavný, tzv. Carabelliho hrbolek (obr. 9) (Cobourne et Sharpe, 2013 - review). Ten se nachází na meziolingvální straně horních trvalých stoliček. Může vypadat jako mírné vyvýšení či celý hrot, jenž se nazývá pozitivní hrbolek. Negativní hrbolky vypadají jako brázdy a jamky na zubu. Carabelliho hrbolky se nejčastěji nachází bilaterálně u prvních stoliček. Prevalence této anomálie je mírně vyšší u mužů než u žen a předpokládá se, že je geneticky podmíněna (Alvesalo et al., 1975).



Obrázek 9

**Carabelliho hrbolek** – (adaptováno podle Kirthiga et al., 2015)

Nadpočetný hrbolek můžeme pozorovat i u horních řezáků. U asijského a původního amerického obyvatelstva je typické vyhloubení horních řezáků do tvaru lopaty. Rubinstein Taybiho syndrom neboli syndrom širokých palců je způsoben mutací genu *CREBBP*. Mimo jiné se vyznačuje hypoplázií skloviny a zubními defekty. Řezáky mají zakroucený nebo drápovitý tvar. Tvarově postiženy mohou být i kořeny. Okulo-facio-kardio-dentální syndrom je dominantní porucha vázaná na X



chromozom. Příčinou je mutace v genu *BCOR*, který kóduje korepresor BCL6. Porucha se projevuje abnormálně velkými kořeny, tzv. radikulomegaly, které jsou nejčastěji vidět u trvalých špičáků (Cobourne et Sharpe, 2013 - review).

S anomáliemi ve tvaru zubů souvisí i choroba taurodontismus. Obvykle postihuje vícečetné kořeny, které se zcela nevyvinou a jsou velmi krátké. Naopak celé tělo zubu je protáhlé a můžeme pozorovat rozšířenou dřevnou komoru (Komatz et al., 1978). Porucha často doprovází syndromy zahrnující ektodermální vady. Termín taurodontismus vymyslel v roce 1913 Keith, neboť zasažené zuby mu připomínaly zuby býka. V roce 1928 definoval Shaw tři formy této poruchy – hypotaurodontismus, mezotaurodontismus a hypertaurodontismus (Jaspers et Witkop, 1980 - review).

### **5.2.2 Velikostní anomálie**

Rozdílné velikosti zubů můžeme pozorovat napříč celou populací. Rozlišujeme tzv. mikrodonty (malé zuby) a megadonty (velké zuby). V čelisti může být tvarově postižen celý chrup, nebo jen několik samostatných zubů. Mikrodontní zuby nejčastěji postihují horní laterální řezáky, naopak horní centrální řezáky a dolní druhé třenové zuby můžeme častěji pozorovat jako megadonty. U bělošského obyvatelstva nejsou obě anomálie příliš obvyklé. Megadonty se vyskytují pouze u 1 % populace, mikrodonty u 2,5 %. Předpokládá se, že za velikost zubů je zodpovědný zubní mezenchym, neboť tam dochází k regulaci signální dráhy Wnt5a. Ta je jedním z faktorů, který určuje konečnou velikost zubu. Nejzávažnější případ mikrodoncie je znám u mikrocefalického osteodysplastického primordiálního nanismu typu II., což je autosomálně recesivní forma nanismu. Poruchu vyvolává gen zvaný *pericentrin* (*PCNT*), který kóduje centrozomální protein v epitelu a mezenchymu budoucího zubu. Postižení jedinci se mimo jiné vyznačují mikrocefálií a kostní dyzplázií. Mají neobvykle tvarované zuby a stoličky bez kořenů (Cobourne et Sharpe, 2013 - review).

### **5.2.3 Heterotopie**

Heterotopie označuje stav, kdy se zub prořezává na jiném místě, než je obvyklé, nebo je vychýlen jiným směrem (Peck et al., 1993). Příčinou bývá špatná interakce mezi epitelem a mezenchymem v raných fázích vývoje, nebo působení odontogenních cyst. Cysty vznikají ve sklovinném orgánu po dokončení amelogeneze a nachází se na cementosklovinné hranici ve formě epitelových dutin. Heterotopie může doprovázet jiné vývojové vady, nebo vznikat po úrazu. Obvykle se ektopické zuby prořezávají v horní čelisti, lícní oblasti a vedlejších nosních dutinách. Projevují se chronickými nebo opakovanými záněty vedlejších dutin dýchacích cest, sepsí, poruchami slzných kanálků, bolestí hlavy či necitlivostí obličeje (Saleem et al., 2010). Nejčastější transpozice zubu se týká horních trvalých špičáků. Během dlouhého stádia prořezávání snadno dochází k poškození, které vede k heterotopii. Dalším vysvětlením je neúplná resorpce kořenů dočasných špičáků, jež tlačí zubní pupen

odchýleným směrem. Z výzkumů vyplývá, že transpozice horních trvalých špičáků více postihuje ženy v poměru 1:3,8 (muži:ženy) a častěji se objevuje na levé straně (Peck et al., 1993).

#### **5.2.4 Srostlice**

Srostlice patří mezi anomálie vzniklé poruchami ektodermu a mezodermu. Předpokládá se, že porucha je ovlivněna poruchami metabolismu i dědičností. Srostlice mohou vznikat několika způsoby. Buďto dojde k rozdělení zubního zárodku během jeho diferenciaci, přičemž oba zárodky se vyvíjí společně, nebo dojde k fúzi dvou samostatných zárodků, které pokračují ve společném vývoji (Grover et Lorton, 1985).

### **5.3 Anomálie tvrdých tkání**

Anomálie tvrdých tkání se projevují poškozením struktury a barvy zubu. Mohou být zapříčiněny faktory vnějšího prostředí, nebo genetickými vlivy. Nejčastěji se setkáváme s poruchami skloviny a dentinu. Poruchy cementu se objevují spíše vzácně (Cobourne et Sharpe, 2013 - review).

#### **5.3.1 Hypoplázie skloviny**

Při diferenciaci ameloblastů může docházet k narušení jejich vývoje či úplné ztrátě. To má za následek poruchu zvanou hypoplázie skloviny (Spitzer, 1942). Porucha se nejčastěji projevuje horizontálními proužky na přední straně dočasných řezáků. U prořezaných zubů jsou proužky odlišně zabarveny a zuby jsou náchylnější k zubnímu kazu. Později zuby zcela zčernají a dojde k rozpadu korunky (Infante et Gillespie, 1974).

#### **5.3.2 Amelogenesis imperfecta**

Amelogenesis imperfecta je označení pro poruchu stavby skloviny, která má dědičný původ. V rodových liniích se může přenášet autosomálně dominantně, autosomálně recesivně, nebo vázaná na X chromozom. Postihuje všechny zuby v dočasné i trvalé dentici. Projevuje se buďto hypoplázií skloviny (obr. 10 a-d), nebo hypomineralizací (obr. 10 e-f), kdy je sklovina velmi měkká (Darling, 1956; Lagerstrom et al., 1991). Sklovina je tvořena dvěma proteiny – enamelinem a amelogeninem. Předpokládá se, že právě mutace v genu pro amelogenin je příčinou vzniku X vázané poruchy. Jedná se o deleci 5 kb minimálně ve dvou exonech genu pro amelogenin (Lagerstrom et al., 1991). Amelogenesis imperfecta vázaná na X chromozom postihuje ženy, které jsou heterozygotní v daném genu. Jejich hemizygotní synové, kteří mají pouze jednu alelu tohoto genu, vykazují měkkčí sklovinu obvyklé tloušťky se skvrnami. V primární dentici mohou mít zuby bílou barvu, která se u trvalých zubů mění na žlutohnědou. Na zubech se objevují vertikální proužky poškozené tkáně, které se střídají s proužky normální skloviny, a závažněji se projevují u mužů. Je to dáno tím, že u žen se proužky poškozené skloviny míchají s nepoškozenými ameloblasty a vznikají zóny částečně opravené skloviny. Jev můžeme vysvětlit inaktivací jednoho X chromozomu v každé buňce a vznik Barrova tělíska u žen.

Proto u žen, které jsou heterozygotní v daném genu, můžeme pozorovat dva různé typy skloviny (Sauk et al., 1972). Mutace v genu pro protein enamelin způsobuje autosomálně dominantní i recesivní formu amelogenesis imperfecta. Projevuje se především hypoplázií a tenkou vrstvou skloviny (Cobourne et Sharpe, 2013 - review).



Obrázek 10

**Amelogenesis imperfecta** – (adaptováno podle Cobourne et Sharpe, 2013 - review)

Jednotlivé obrázky znázorňují různé podoby poruchy Amelogenesis imperfecta. Na obrázcích a) až d) jsou postiženy obě dentice projevující se hypoplázií skloviny. Případ na obr. d) je způsoben AI vázanou na X chromozom. Obrázky e) a f) představují hypomineralizaci skloviny.

### 5.3.3 Dentinogenesis imperfecta

Dentinogenesis imperfecta je porucha tvorby dentinu, která postihuje dočasný i trvalý chrup. Následkem toho zuby mění zbarvení na žlutou až hnědou barvu a jsou velmi náchylné k zubním kazům. Porucha je dědičného rázu, přenáší se autosomálně dominantně, nebo se může vyskytnout jako vedlejší znak syndromu osteogenesis imperfecta. Mezi další projevy patří křehké zubní kořeny a sklovina, která se lehce láme. Korunky mají zakulacený tvar a dřevná komora je vytlačena nadměrnou produkcí dentinové matrix. Extracelulární dentinová matrix obsahuje velký podíl vody a malé množství hydroxyapatitových krystalů, což vede k malé produkci minerálních látek. Rozlišujeme tři typy dentinogenesis imperfecta (MacDougall et al., 1992). První typ (DGI-I) souvisí se syndromem osteogenesis imperfecta. Ten je způsoben mutací v genu pro syntézu kolagenu typu I,  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$ . Mutace způsobuje nedostatečnou tvorbu kostní tkáně a kosti jsou velmi křehké a náchylné ke zlomeninám. Zuby jsou jantarové až průhledné, dřevná komůrka je potlačena a kořeny jsou krátké. Druhý typ (DGI-II) vykazuje již zmíněné projevy a vždy postihuje všechny zuby, vzácně se objevuje i ztráta sluchu. Třetí typ (DGI-III), který se vyskytuje především u Brandywine populace, se vyznačuje otevřenými dřevnými kanálky a „skořápkovými“ zuby. Prevalence onemocnění je 1:8000 (MacDougall et al., 1992; Barron et al., 2008 - review; Cobourne et Sharpe, 2013 - review; Lee et al., 2013). Příčinou onemocnění typu II. a III. je mutace v genu pro sialofosfoprotein (DSPP), který je umístěn na chromozomu 4q21. Mutace se týká exonu 2 na pozici druhého nukleotidu od konce.

Jedná se o výměnu aminokyseliny Pro17 za Leu17. Přestože je exon 2 v těsné blízkosti hranice exon-intron, neovlivňuje správný sestřih pre-mRNA (Lee et al., 2013).

#### **5.3.4 *Dysplázie dentinu***

Dysplázie dentinu se vyskytuje ve dvou odlišných formách. První typ postihuje především kořeny, které jsou zkráceny a způsobují předčasné vypadávání zubů. Dřeňové komůrky jsou uzavřeny, avšak vnější tvar a struktura zubu nejsou ovlivněny. Objevuje se v dočasné i trvalé dentici. Druhý typ se vyznačuje opaleskujícími dočasnými zuby a zašpičatělou dřeňovou komůrkou u trvalé dentice (Chamberlain et Hayward, 1983; Cobourne et Sharpe, 2013 - review; Lee et al., 2013). Dysplázie dentinu patří mezi autosomálně dominantní poruchy a vyskytuje se u 1 člověka ze 100 000. Dysplázie dentinu typu II. je stejně jako u dentinogenesis imperfecta vyvolána mutací v genu pro sialofosfoprotein. Proto panuje názor, že se jedná o alelickou formu DG (Barron et al., 2008 - review; Cobourne et Sharpe, 2013 - review).

#### **5.3.5 *Hypofosfatázie***

Hypofosfatázie patří mezi geneticky podmíněné choroby a vyznačuje se nízkou hladinou alkalické fosfatázy v séru. Alkalická fosfatáza má obrovský význam při mineralizaci zubů, neboť se podílí na vzniku organické matrix a působí především ve sklovinném orgánu. Pacienti dále vykazují zvýšenou hladinu vápníku a močoviny v krvi (Luder, 1954; Ritchie, 1964). S poruchou se můžeme obvykle setkat u kojenců a dětí, kde často vyvolává předčasnou ztrátu mléčných zubů (Ritchie, 1964). U novorozenců dochází k rozsáhlému poškození ledvin a nemoc je ve většině případů fatální (Dickson et Horrocks, 1958). Mezi další projevy patří hypoplázie skloviny, aplázie nebo hypoplázie acelulárního cementu a dochází ke zvětšení dřeňových komůrek. Kořeny trvalých zubů vykazují nadměrné množství acelulárního cementu, avšak žádný celulární cement (Cobourne et Sharpe, 2013 - review).

#### **5.3.6 *Hypercementóza***

Hypercementóza je charakterizována nadměrnou produkcí cementu, který způsobuje ztlustění zubního vrcholu nebo kořene (Pinheiro et al., 2008). Může postihovat samostatný zub, skupinu zubů nebo celý chrup. Obvykle postihuje třenové zuby souměrně na obou stranách dentice. Hypercementóza se vyskytuje jako vedlejší projev řady syndromů, jako je artritida, akromegalie, Pagetova choroba nebo nedostatek vitamínu A. Ve většině případů však není známa příčina poruchy (Zhou et al., 2012).

## 5.4 Wnt a vývojové vady zubů u člověka

Škála znalostí působení Wnt dráhy v patogenezi dentálních vad u člověka není široká, jelikož ani přesná funkce této dráhy v odontogenezi není zcela objasněná, avšak v posledních letech poznatků přibývá.

### 5.4.1 Porucha Wnt dráhy jako součást syndromu

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) patří mezi autosomálně dominantní onemocnění, které postihuje tlusté střevo a konečník. Jednou z forem této poruchy je Gardnerův syndrom, který se mimo jiné projevuje desmoidními tumory, odontogenními nádory a nadpočetnými zuby. Příčinou této poruchy je ztráta funkce v genu *APC*, který působí jako antagonist Wnt signální dráhy (Cobourne et Sharpe, 2013 - review).

Jednou z forem ektodermální dysplázie je autosomálně dominantní porucha zvaná Odontonycho-dermální dysplázie (OODD). Choroba se mimo jiné vyznačuje oligodoncií, onychodysplázií, suchou kůží a sníženým růstem ochlupení, a je způsobena mutací v genu *WNT10A* (He et al., 2013; Vink et al., 2014; Kroigard et al., 2016).

Schöpf-Schulz-Passarge syndrom (SSPS) patří mezi autosomálně recesivní onemocnění a je rovněž způsoben mutací v genu *WNT10A*. Mezi hlavní projevy onemocnění řadíme hypodoncii, apokrinní hidrocystomy očních víček, hypotrichózu a dystrofii nehtů. SSPS i OODD jsou způsobeny variabilní expresí téhož spektra mutací genu *WNT10A*, tudíž bychom na ně neměli pohlížet jako na dvě klinicky odlišné choroby (He et al., 2013; Vink et al., 2014; Vilas-Sueiro et al., 2015).

### 5.4.2 Wnt v nesyndromatické patogenezi dentice

V lidské odontogenezi se uplatňuje gen *Wnt3a*, který je exprimován ve sklovinném epitelu ve stádiu zubního zvonku v 15. týdnu vývoje. Ve stádiu zubního pohárku a zvonku se slabě projevuje ligand *Wnt5a*, o němž se dosud předpokládalo, že se účastní pouze nekanonické signální dráhy (Wang et al., 2014). Mutace v genu *Wnt10a* má na svědomí nesyndromatickou formu hypodoncie. Mutace spočívá v záměně nukleotidů v sekvenci DNA, která se označuje jako jednonukleotidový polymorfismus (SNP) (Liu et Millar, 2010; Tamura et Nemoto, 2016 - review; Zhang et Wu, 2016). Plakophilin 1 (*Pkp1*), který se účastní Wnt signalizace, hraje roli v rozvoji zubních agenezí a ektodermální dysplázie, která se mimo jiné projevuje hypoplázií skloviny (Miyazaki et al., 2016).

Jednou z příčin vzniku oligodoncie je mutace v genu *Wnt10a* nebo *Wnt10b*, které sdílí 72 % podobnosti. Liší se pouze typ chybějících zubů v trvalé dentici. V případě *Wnt10a* jsou nejčastěji postiženy třenové zuby v prevalenci 62,5 % – 68,8 %. Mutace *Wnt10b* nejčastěji vyvolává agenzi laterálních řezáků v 83,3 % (Salvi et al., 2016; Yu et al., 2016).

Ukázalo se, že mutace v genu *AXIN2* je rovněž zodpovědná za oligodoncii. Mutace vede ke vzniku stop kodonu a předčasnému ukončení translace (Kim et al., 2006). Gen *AXIN2* negativně reguluje kanonickou Wnt signální dráhu. V postnatálním období je exprimován během vývoje odontoblastů v zubní dřeni a účastní se pozdních fází zubního vývoje, kde vymezuje oblast tvorby skloviny. Mutace v koreceptoru kanonické dráhy LRP6 vyvolává nesyndromatickou autosomálně dominantní formu oligodoncie, neboť může zcela zastavit průběh kanonické dráhy (Tamura et Nemoto, 2016 - review).

Ztráta funkce Wnt receptoru LRP6 je spojována s rozvojem zubních agenezí u lidí. V několika případech můžeme pozorovat nesyndromickou autosomálně dominantní formu oligodoncie, která může být doprovázena defekty skloviny, ankylózou nebo anomáliemi ve tvaru zubů (Liu et Millar, 2010; Ockeloen et al., 2016; Tamura et Nemoto, 2016 - review).

## 6. Závěr

V práci jsou popsány jednotlivé signální dráhy, které se podílejí na odontogenezi. Přičemž největší pozornost je věnována Wnt signální dráze. Wnt signály jsou exprimovány již v raných fázích odontogeneze. Ať samostatně nebo ve vztahu s jinými signálními drahami ovlivňuje Wnt signalizace vývoj dentice a mutace v této dráze mohou vyvolat vznik dentálních patologií.

Zubní vývoj je iniciován vrůstáním ektodermu do mezenchymu již v období raného embryonálního vývoje. Epitelové ztlustění je první viditelná známka odontogeneze. Jednotlivé vrstvy epitelu se skládají na sebe a dávají vznik zubní liště. Ze zubní lišty vybíhají epitelová zduření, která se označují jako zubní pupeny. Již ve stádiu zubního pupene je exprimován gen *Wnt-7b*, který společně s Shh dráhou reguluje formování pupenů. Narušení této dráhy má za následek zastavení vývoje ve fázi zubního pupene. Zubní základy procházejí vývojovými stádii pohárku a zvonku, pro něž je typická tvorba sklovinných uzlů. Wnt signály se podílejí na tvorbě primárního sklovinného uzlu ve stádiu zubního pohárku. Ve stádiu zvonku probíhá vznik odontoblastů a ameloblastů. Následuje proces mineralizace, ve kterém dochází k ukládání tří typů tvrdých tkání – skloviny, dentinu a cementu. Gen *Wnt10A* reguluje tvar kořene a zubní korunky.

I v patogenezi zubů lze najít Wnt signalizaci jako faktor determinující vznik zubní vady. Wnt/ $\beta$ -katenin se uplatňuje v ukládání cementové matrix a jeho mutace způsobuje hypo– nebo hypergenezi zubů. Mimo jiné se Wnt mutace podílí na vzniku zubních agenezí a ektodermální dysplázie. Jako jeden z nejčastějších genů Wnt dráhy se v souvislosti s patogenezi objevuje *Wnt10*, který je odpovědný za formaci korunky a kořene a je exprimován již ve stádiu pupene.

Z rešerše provedené v rámci předložené práce je zřejmé, že Wnt signální dráha je nezbytnou součástí normálního zubního vývoje. Její narušení souvisí s množstvím dentálních vad, ať již nesyndromického charakteru anebo jako součástí syndromů. Zejména v posledních letech se výzkum v oblasti Wnt dráhy a jejích komponent dostává do centra zájmu. Do budoucna nabízí modulace Wnt dráhy zcela jistě další možný přístup pro výzkum v regenerativní zubní medicíně a v získávání dalších terapeutických strategií.

## 7. Seznam použité literatury

- Ahn, Y., Sanderson, B. W., Klein, O. D., & Krumlauf, R. (2010). Inhibition of Wnt signaling by Wise (Sostdc1) and negative feedback from Shh controls tooth number and patterning. *Development*, 137(19), 3221-3231.
- Almonaitiene, R., Balciuniene, I., & Tutkuvienė, J. (2010). Factors influencing permanent teeth eruption. Part one-general factors. *Stomatologija*, 12(3), 67-72.
- Alvesalo, L., Nuutila, M., & Portin, P. (1975). The cusp of Carabelli. Occurrence in first upper molars and evaluation of its heritability. *Acta Odontol Scand*, 33(4), 191-197.
- Andersson, L., Blomlof, L., Lindskog, S., Feiglin, B., & Hammarstrom, L. (1984). Tooth ankylosis. Clinical, radiographic and histological assessments. *Int J Oral Surg*, 13(5), 423-431.
- Astekar, M., Kaur, P., Dhakar, N., & Singh, J. (2014). Comparison of hard tissue interrelationships at the cervical region of teeth based on tooth type and gender difference. *J Forensic Dent Sci*, 6(2), 86-91.
- Aurrekoetxea, M., Irastorza, I., Garcia-Gallastegui, P., Jimenez-Rojo, L., Nakamura, T., Yamada, Y., et al. (2016). Wnt/beta-Catenin Regulates the Activity of Epiprofin/Sp6, SHH, FGF, and BMP to Coordinate the Stages of Odontogenesis. *Front Cell Dev Biol*, 4, 25.
- Bae, C. H., Kim, T. H., Ko, S. O., Lee, J. C., Yang, X., & Cho, E. S. (2015). Wntless regulates dentin apposition and root elongation in the mandibular molar. *J Dent Res*, 94(3), 439-445.
- Bae, C. H., Lee, J. Y., Kim, T. H., Baek, J. A., Lee, J. C., Yang, X., et al. (2013). Excessive Wnt/beta-catenin signaling disturbs tooth-root formation. *J Periodontol Res*, 48(4), 405-410.
- Barron, M. J., McDonnell, S. T., Mackie, I., & Dixon, M. J. (2008). Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*, 3, 31.
- Bolk, L. (1922). Odontological Essays. *J Anat*, 56(Pt 2), 107-136.
- Book, J. A. (1950). Clinical and genetical studies of hypodontia. I. Premolar aplasia, hyperhidrosis, and canities prematura; a new hereditary syndrome in man. *Am J Hum Genet*, 2(3), 240-263.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., et al. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*, 5(2), 207-216.
- Chamberlain, B. B., & Hayward, J. R. (1983). Management of dentin dysplasia and facial disharmony. *Spec Care Dentist*, 3(3), 113-116.
- Chen, C. P., Su, Y. N., Hsu, C. Y., Chern, S. R., Tsai, F. J., Wu, P. C., et al. (2010). Ellis-van Creveld syndrome: prenatal diagnosis, molecular analysis and genetic counseling. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 49(4), 481-486.
- Chitnis, A. (2006). Why is delta endocytosis required for effective activation of notch? *Dev Dyn*, 235(4), 886-894.
- Choi, H., Ahn, Y. H., Kim, T. H., Bae, C. H., Lee, J. C., You, H. K., et al. (2016). TGF-beta Signaling Regulates Cementum Formation through Osterix Expression. *Sci Rep*, 6, 26046.
- Cleghorn, B. M., Boorberg, N. B., & Christie, W. H. (2010). Primary human teeth and their root canal systems. *Endodontic Topics*, Volume 23, Number 1, 1 September 2010, pp. 6-33(28): Wiley-Blackwell.
- Cobourne, M. T., & Sharpe, P. T. (2013). Diseases of the tooth: the genetic and molecular basis of inherited anomalies affecting the dentition. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2(2), 183-212.
- Consolaro, A. (2015). Orthodontic movement in deciduous teeth. *Dental Press J Orthod*, 20(2), 16-19.
- Darling, A. I. (1956). Some observations on amelogenesis imperfecta and calcification of the dental enamel. *Proc R Soc Med*, 49(10), 759-765.
- Dassule, H. R., Lewis, P., Bei, M., Maas, R., & McMahon, A. P. (2000). Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development*, 127(22), 4775-4785.
- Diamanti, J., & Townsend, G. C. (2003). New standards for permanent tooth emergence in Australian children. *Aust Dent J*, 48(1), 39-42; quiz 69.
- Dickson, W., & Horrocks, R. H. (1958). Hypophosphatasia. *J Bone Joint Surg Br*, 40-b(1), 64-74.
- Duan, P., & Bonewald, L. F. (2016). The role of the wnt/beta-catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *Int J Biochem Cell Biol*, 77(Pt A), 23-29.
- Eswarakumar, V. P., Lax, I., & Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16(2), 139-149.
- Garn, S. M., Lewis, A. B., & Kerewsky, R. S. (1965). Genetic, nutritional, and maturational correlates of dental development. *J Dent Res*, 44, Suppl:228-242.
- Garvey, M. T., Barry, H. J., & Blake, M. (1999). Supernumerary teeth--an overview of classification, diagnosis and management. *J Can Dent Assoc*, 65(11), 612-616.
- Grover, P. S., & Lorton, L. (1985). Gemination and twinning in the permanent dentition. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 59(3), 313-318.
- Hagg, U., & Taranger, J. (1985). Dental development, dental age and tooth counts. *Angle Orthod*, 55(2), 93-107.



- Han, P., Ivanovski, S., Crawford, R., & Xiao, Y. (2015). Activation of the Canonical Wnt Signaling Pathway Induces Cementum Regeneration. *J Bone Miner Res*, *30*(7), 1160-1174.
- Hardcastle, Z., Mo, R., Hui, C. C., & Sharpe, P. T. (1998). The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development*, *125*(15), 2803-2811.
- He, H., Han, D., Feng, H., Qu, H., Song, S., Bai, B., et al. (2013). Involvement of and interaction between WNT10A and EDA mutations in tooth agenesis cases in the Chinese population. *PLoS One*, *8*(11), e80393.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., & ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, *390*(6659), 465-471.
- Hogan, B. L. (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*, *6*(4), 432-438.
- Hovorakova, M., Lesot, H., Peterka, M., & Peterkova, R. (2005). The developmental relationship between the deciduous dentition and the oral vestibule in human embryos. *Anat Embryol (Berl)*, *209*(4), 303-313.
- Hovorakova, M., Lesot, H., Vonesch, J. L., Peterka, M., & Peterkova, R. (2007). Early development of the lower deciduous dentition and oral vestibule in human embryos. *Eur J Oral Sci*, *115*(4), 280-287.
- Infante, P. F., & Gillespie, G. M. (1974). An epidemiologic study of linear enamel hypoplasia of deciduous anterior teeth in Guatemalan children. *Arch Oral Biol*, *19*(11), 1055-1061.
- Jaspers, M. T., & Witkop, C. J., Jr. (1980). Taurodontism, an isolated trait associated with syndromes and X-chromosomal aneuploidy. *Am J Hum Genet*, *32*(3), 396-413.
- Jernvall, J., Kettunen, P., Karavanova, I., Martin, L. B., & Thesleff, I. (1994). Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol*, *38*(3), 463-469.
- Jernvall, J., & Thesleff, I. (2000). Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*, *92*(1), 19-29.
- Keranen, S. V., Aberg, T., Kettunen, P., Thesleff, I., & Jernvall, J. (1998). Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Dev Genes Evol*, *208*(9), 477-486.
- Kim, J. W., Simmer, J. P., Lin, B. P., & Hu, J. C. (2006). Novel MSX1 frameshift causes autosomal-dominant oligodontia. *J Dent Res*, *85*(3), 267-271.
- Kim, T. H., Lee, J. Y., Baek, J. A., Lee, J. C., Yang, X., Taketo, M. M., et al. (2011). Constitutive stabilization of ss-catenin in the dental mesenchyme leads to excessive dentin and cementum formation. *Biochem Biophys Res Commun*, *412*(4), 549-555.
- Kirthiga, M., Manju, M., Praveen, R., & Umesh, W. (2015). Prevalence of aberrant dental morphological details in 6-10 year old school children in an Indian population. *Contemp Clin Dent*, *6*(Suppl 1), S175-180.
- Kjaer, I. (2014). Mechanism of human tooth eruption: review article including a new theory for future studies on the eruption process. *Scientifica (Cairo)*, *2014*, 341905.
- Klein, O. D., Oberoi, S., Huysseune, A., Hovorakova, M., Peterka, M., & Peterkova, R. (2013). Developmental disorders of the dentition: an update. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, *163c*(4), 318-332.
- Komatz, Y., Tomoyoshi, T., Yoshida, O., Fujimoto, A., & Yoshitake, K. (1978). Taurodontism and Klinefelter's syndrome. *J Med Genet*, *15*(6), 452-454.
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, *4*(2), 68-75.
- Kratochwil, K., Galceran, J., Tontsch, S., Roth, W., & Grosschedl, R. (2002). FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in Lef1(-/-) mice. *Genes Dev*, *16*(24), 3173-3185.
- Kroigard, A. B., Clemmensen, O., Gjørup, H., Hertz, J. M., & Bygum, A. (2016). Odonto-onycho-dermal dysplasia in a patient homozygous for a WNT10A nonsense mutation and mild manifestations of ectodermal dysplasia in carriers of the mutation. *BMC Dermatol*, *16*, 3.
- Lagerstrom, M., Dahl, N., Nakahori, Y., Nakagome, Y., Backman, B., Landegren, U., et al. (1991). A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics*, *10*(4), 971-975.
- Lan, Y., Jia, S., & Jiang, R. (2014). Molecular patterning of the mammalian dentition. *Semin Cell Dev Biol*, *25-26*, 61-70.
- Lee, S. K., Lee, K. E., Song, S. J., Hyun, H. K., Lee, S. H., & Kim, J. W. (2013). A DSPP mutation causing dentinogenesis imperfecta and characterization of the mutational effect. *Biomed Res Int*, *2013*, 948181.
- Li, J., Chatzeli, L., Panousopoulou, E., Tucker, A. S., & Green, J. B. (2016). Epithelial stratification and placode invagination are separable functions in early morphogenesis of the molar tooth. *Development*, *143*(4), 670-681.
- Liu, F., & Millar, S. E. (2010). Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease. *J Dent Res*, *89*(4), 318-330.
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, *104*(4), 487-501.

- Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 781-810.
- Luder, J. (1954). Osteodystrophy due to congenital deficiency of phosphatase. *Proc R Soc Med*, 47(7), 541-543.
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17(1), 9-26.
- MacDougall, M., Zeichner-David, M., Murray, J., Crall, M., Davis, A., & Slavkin, H. (1992). Dentin phosphoprotein gene locus is not associated with dentinogenesis imperfecta types II and III. *Am J Hum Genet*, 50(1), 190-194.
- Manjunatha, B. S., & Soni, N. K. (2014). Estimation of age from development and eruption of teeth. *J Forensic Dent Sci*, 6(2), 73-76.
- Marino, M. W., Dunn, A., Grail, D., Inglese, M., Noguchi, Y., Richards, E., et al. (1997). Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(15), 8093-8098.
- Mikkola, M. L. (2008). TNF superfamily in skin appendage development. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19(3-4), 219-230.
- Mitsiadis, T. A., Graf, D., Luder, H., Gridley, T., & Bluteau, G. (2010). BMPs and FGFs target Notch signalling via jagged 2 to regulate tooth morphogenesis and cytodifferentiation. *Development*, 137(18), 3025-3035.
- Mitsiadis, T. A., Hirsinger, E., Lendahl, U., & Goridis, C. (1998). Delta-notch signaling in odontogenesis: correlation with cytodifferentiation and evidence for feedback regulation. *Dev Biol*, 204(2), 420-431.
- Miyazaki, K., Yoshizaki, K., Arai, C., Yamada, A., Saito, K., Ishikawa, M., et al. (2016). Plakophilin-1, a Novel Wnt Signaling Regulator, Is Critical for Tooth Development and Ameloblast Differentiation. *PLoS One*, 11(3), e0152206.
- Ntani, G., Day, P. F., Baird, J., Godfrey, K. M., Robinson, S. M., Cooper, C., et al. (2015). Maternal and early life factors of tooth emergence patterns and number of teeth at 1 and 2 years of age. *J Dev Orig Health Dis*, 6(4), 299-307.
- Nunn, R., Murray, A., & Sandler, J. (2011). Loss of deciduous teeth--is timing important to the GDP? *Dent Update*, 38(1), 55-58, 61-54.
- Nusse, R., & Varmus, H. E. (1992). Wnt genes. *Cell*, 69(7), 1073-1087.
- Ockeloen, C. W., Khandelwal, K. D., Dreesen, K., Ludwig, K. U., Sullivan, R., van Rooij, I. A., et al. (2016). Novel mutations in LRP6 highlight the role of WNT signaling in tooth agenesis. *Genet Med*, 18(11), 1158-1162.
- Ohazama, A., Courtney, J. M., & Sharpe, P. T. (2004). Opg, Rank, and Rankl in tooth development: co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res*, 83(3), 241-244.
- Ooe, T. (1957). On the early development of human dental lamina. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 30(2-3), 198-210.
- Ooe, T. (1962). On the development of position of the human deciduous molar germs in the latter half of the fetal life. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 38, 51-71.
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., et al. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*, 271(25), 15292-15297.
- Panousopoulou, E., & Green, J. B. (2016). Invagination of Ectodermal Placodes Is Driven by Cell Intercalation-Mediated Contraction of the Suprabasal Tissue Canopy. *PLoS Biol*, 14(3), e1002405.
- Peck, L., Peck, S., & Attia, Y. (1993). Maxillary canine-first premolar transposition, associated dental anomalies and genetic basis. *Angle Orthod*, 63(2), 99-109; discussion 110.
- 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(1), 89-104.
- Peterkova, R., Hovorakova, M., Peterka, M., & Lesot, H. (2014). Three-dimensional analysis of the early development of the dentition. *Aust Dent J*, 59 Suppl 1, 55-80.
- Peterkova, R., Lesot, H., Vonesch, J. L., Peterka, M., & Ruch, J. V. (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. I. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *Int J Dev Biol*, 40(5), 1009-1016.
- Peterkova, R., Peterka, M., Viriot, L., & Lesot, H. (2002). Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connect Tissue Res*, 43(2-3), 120-128.
- Pinheiro, B. C., Pinheiro, T. N., Capelozza, A. L., & Consolaro, A. (2008). A scanning electron microscopic study of hypercementosis. *J Appl Oral Sci*, 16(6), 380-384.
- Pispa, J., & Thesleff, I. (2003). Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Developmental Biology*, 262(2), 195-205.
- Plikus, M. V., Zeichner-David, M., Mayer, J. A., Reyna, J., Bringas, P., Thewissen, J. G., et al. (2005). Morphoregulation of teeth: modulating the number, size, shape and differentiation by tuning Bmp activity. *Evol Dev*, 7(5), 440-457.

- Putnova, I., Dosedelova, H., Bryja, V., Landova, M., Buchtova, M., & Stembirek, J. (2017). Angled Growth of the Dental Lamina Is Accompanied by Asymmetrical Expression of the WNT Pathway Receptor Frizzled 6. *Front Physiol*, 8, 29.
- Richard, A. C., Peters, J. E., Lee, J. C., Vahedi, G., Schaffer, A. A., Siegel, R. M., et al. (2016). Targeted genomic analysis reveals widespread autoimmune disease association with regulatory variants in the TNF superfamily cytokine signalling network. *Genome Med*, 8(1), 76.
- Ritchie, G. M. L. (1964). Hypophosphatasia: A Metabolic Disease with Important Dental Manifestations. *Arch Dis Child*, 39(208), 584-590.
- Ruch, J. V. (1998). Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol*, 76(6), 923-938.
- Russell, K. A., & Folwarczna, M. A. (2003). Mesiodens--diagnosis and management of a common supernumerary tooth. *J Can Dent Assoc*, 69(6), 362-366.
- Rutherford, M. E. (1931). Three generations of inherited dental defect. *Br Med J*, 2(3678), 9-11.
- Saleem, T., Khalid, U., Hameed, A., & Ghaffar, S. (2010). Supernumerary, ectopic tooth in the maxillary antrum presenting with recurrent haemoptysis. *Head Face Med*, 6, 26.
- Salvi, A., Giacomuzzi, E., Bardellini, E., Amadori, F., Ferrari, L., De Petro, G., et al. (2016). Mutation analysis by direct and whole exome sequencing in familial and sporadic tooth agenesis. *Int J Mol Med*, 38(5), 1338-1348.
- Sarkar, L., Cobourne, M., Naylor, S., Smalley, M., Dale, T., & Sharpe, P. T. (2000). Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), 4520-4524.
- Sarkar, L., & Sharpe, P. T. (1999). Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech Dev*, 85(1-2), 197-200.
- Sauk, J. J., Jr., Lyon, H. W., & Witkop, C. J., Jr. (1972). Electron optic microanalysis of two gene products in enamel of females heterozygous for X-linked hypomaturation amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, 24(3), 267-276.
- Schour, I. (1929). Early Human Tooth Development, with Special Reference to the Relationship Between the Dental Lamina and the Lip-Furrow Band. *Journal of Dental Research*, 9(5), 699-717.
- Shen, W., Wang, Y., Liu, Y., Liu, H., Zhao, H., Zhang, G., et al. (2016). Functional Study of Ectodysplasin-A Mutations Causing Non-Syndromic Tooth Agenesis. *PLoS One*, 11(5), e0154884.
- Smith, C. E., & Nanci, A. (1995). Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol*, 39(1), 153-161.
- Spitzer, R. (1942). Enamel Hypoplasia in Idiopathic Epilepsy. *Br Med J*, 1(4229), 110.
- Stockton, D. W., Das, P., Goldenberg, M., D'Souza, R. N., & Patel, P. I. (2000). Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet*, 24(1), 18-19.
- Tamura, M., & Nemoto, E. (2016). Role of the Wnt signaling molecules in the tooth. *Japanese Dental Science Review*, 52(4), 75-83.
- Thesleff, I., & Sharpe, P. (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev*, 67(2), 111-123.
- Tompkins, K. (2006). Molecular mechanisms of cytodifferentiation in mammalian tooth development. *Connect Tissue Res*, 47(3), 111-118.
- Tonge, C. H. (1969). The time-structure relationship to tooth development in human embryogenesis. *J Dent Res*, 48(5), 745-752.
- Vahtokari, A., Aberg, T., & Thesleff, I. (1996). Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development*, 122(1), 121-129.
- Varela, M., Arrieta, P., & Ventureira, C. (2009). Non-syndromic concomitant hypodontia and supernumerary teeth in an orthodontic population. *Eur J Orthod*, 31(6), 632-637.
- Vastardis, H. (2000). The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 117(6), 650-656.
- Vilas-Sueiro, A., Monteagudo, B., Gonzalez-Vilas, D., Varela-Veiga, A., & De las Heras, C. (2015). Genetic study in a suspected case of Schopf-Schulz-Passarge syndrome *Indian J Dermatol Venereol Leprol* (Vol. 81, pp. 408-410). India.
- Vink, C. P., Ockeloen, C. W., ten Kate, S., Koolen, D. A., Ploos van Amstel, J. K., Kuijpers-Jagtman, A. M., et al. (2014). Variability in dentofacial phenotypes in four families with WNT10A mutations. *Eur J Hum Genet*, 22(9), 1063-1070.
- Wainwright, B. J., Scambler, P. J., Stanier, P., Watson, E. K., Bell, G., Wicking, C., 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. *Embo j*, 7(6), 1743-1748.

- Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10(1), 45-65.
- Wang, B., Li, H., Liu, Y., Lin, X., Lin, Y., Wang, Y., et al. (2014). Expression patterns of WNT/beta-CATENIN signaling molecules during human tooth development. *J Mol Histol*, 45(5), 487-496.
- Wang, C., Liao, H., & Cao, Z. (2016). Role of Osterix and MicroRNAs in Bone Formation and Tooth Development. *Med Sci Monit*, 22, 2934-2942.
- Wang, Y., Li, L., Zheng, Y., Yuan, G., Yang, G., He, F., et al. (2012). BMP activity is required for tooth development from the lamina to bud stage. *J Dent Res*, 91(7), 690-695.
- Wise, G. E. (2009). Cellular and molecular basis of tooth eruption. *Orthod Craniofac Res*, 12(2), 67-73.
- Yang, J., Wang, S. K., Choi, M., Reid, B. M., Hu, Y., Lee, Y. L., et al. (2015). Taurodontism, variations in tooth number, and misshapened crowns in Wnt10a null mice and human kindreds. *Mol Genet Genomic Med*, 3(1), 40-58.
- Yu, P., Yang, W., Han, D., Wang, X., Guo, S., Li, J., et al. (2016). Mutations in WNT10B Are Identified in Individuals with Oligodontia. *The American Journal of Human Genetics*, 99(1), 195-201.
- Zhang, L., Chen, X. M., Sun, Z. J., Bian, Z., Fan, M. W., & Chen, Z. (2006). Epithelial expression of SHH signaling pathway in odontogenic tumors. *Oral Oncol*, 42(4), 398-408.
- Zhang, L., Hua, F., Yuan, G. H., Zhang, Y. D., & Chen, Z. (2008). Sonic hedgehog signaling is critical for cytodifferentiation and cusp formation in developing mouse molars. *J Mol Histol*, 39(1), 87-94.
- Zhang, S. J., & Wu, Z. Z. (2016). WNT10A polymorphism may be a risk factor for non-syndromic hypodontia. *Genet Mol Res*, 15(1).
- Zhou, J., Zhao, Y., Xia, C., & Jiang, L. (2012). Periodontitis with hypercementosis: report of a case and discussion of possible aetiologic factors. *Aust Dent J*, 57(4), 511-514.
- Zweifler, L. E., Patel, M. K., Nociti, F. H., Jr., Wimer, H. F., Millan, J. L., Somerman, M. J., et al. (2015). Counter-regulatory phosphatases TNAP and NPP1 temporally regulate tooth root cementogenesis. *Int J Oral Sci*, 7(1), 27-41.