

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Študijný program: Biologie  
Študijný odbor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Jaroslav Fábik

Prejavy odontogenézy externe od budúcej funkčnej dentície u experimentálneho modelu

*The signs of odontogenesis externally to the prospective functional dentition in the experimental model*

Diplomová práca

Školiteľ: Mgr. Mária Hovořáková, Ph.D.  
Konzultant: Mgr. Oldřich Zahradníček, Ph.D.

Praha, 2017

Táto práca vznikla na základe finančnej podpory Grantové agentury České republiky (granty č. GAP305/12/1766, P304/14/37368G).

### **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som záverečnú prácu vypracoval samostatne a že som uviedol všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe dňa 14.08.2017

Podpis

## **Pod'akovanie**

*V prvom rade patrí veľká vd'aka mojej školiteľke, Dr. Márii Hovořákovej, ktorá mi umožnila nazrieť do sveta vedy. Ďakujem jej za čas, energiu, ochotu a trpezlivosť, ktorú do mňa vložila. Naše debaty ma vždy dokázali motivovať a umožnili mi rásť nielen ako vedcovi, ale i ako človeku.*

*Vd'aka patrí i môjmu konzultantovi, Dr. Oldřichovi Zahradníčkovi, za jeho cenné rady a pripomienky, ako aj za vedenie behom technickej práce v laboratóriu.*

*V neposlednom rade d'akujem rodičom, ako aj ostatným blízkym, ktorí ma počas štúdia podporovali. Obzvlášť d'akujem mojej sestre, Michale, za jazykovú korektúru práce.*

*Na záver by som chcel pod'akovať všetkým kolegom z Oddělení vývojové biologie. Ďakujem im za pomoc a podporu pri tvorbe tejto diplomovej práce.*

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>10</b>
1.1	Orofaciálna anatómia človeka.....	10
1.1.1	Vestibulum oris (predsieň dutiny ústnej).....	11
1.1.2	Zuby.....	12
1.2	Myš ako experimentálny model pre štúdium odontogenézy .....	15
1.3	Vybrané signálne molekuly riadiace embryonálny vývoj.....	17
1.3.1	Fibroblastový rastový faktor (FGF) .....	17
1.3.2	Transformujúce rastové faktory beta (TGF- $\beta$ ) .....	22
1.3.3	WNT.....	25
1.3.4	Hedgehog (HH) .....	28
1.3.5	Ectodysplazín (EDA).....	32
1.4	Embryonálny vývoj orofaciálnej oblasti .....	37
1.4.1	Vývoj primitívnej ústnej dutiny človeka .....	37
1.4.2	Vývoj tváre a čel'ustí človeka .....	37
1.4.3	Vývoj vestibulum oris človeka .....	41
1.4.4	Vývoj zubov človeka.....	49
1.4.5	Molekulárna kontrola zubného vývoja.....	50
1.4.6	Vývoj dolného rezáku myši .....	56
1.5	Sieť esenciálnych génov odontogenézy .....	58
1.6	Úloha Eda génu vo vývoji orgánov .....	59
<b>2</b>	<b>Ciele práce.....</b>	<b>63</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a metódy.....</b>	<b>64</b>
3.1	Laboratórne myši .....	64
3.2	Pripúšť'anie myší a odber embryonálneho materiálu .....	64
3.3	Príprava parafínových rezov.....	64
3.4	Imunohistochémia a imunofluorescencia .....	66
3.5	Farbenie tkanivových rezov .....	69
<b>4</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>70</b>
4.1	Sledovanie expresie SHH proteínu.....	70
4.2	Sledovanie expresie EDA proteínu.....	78
4.3	Porovnanie expresie SHH a EDA proteínov.....	88
<b>5</b>	<b>Diskusia.....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Záverý .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Zoznam použitej literatúry .....</b>	<b>101</b>

# Abstrakt

Vývoj zubného zárodka myši predstavuje dôležitý model nielen pre štúdium odontogenézy, ale i všeobecnej organogenézy. Pozoruhodným vývojom prechádza dolný rezák myši. Základ dolného rezáku myšieho embrya je totiž prepojený so základom predsiene dutiny ústnej (*vestibulum oris*) epitelovými mostíkmi. V oblasti epitelových mostíkov sa podľa niektorých autorov prechodne objavuje rudimentárny zubný zárodok. Prvým prejavom epitelovo-mezechymálnych interakcií prebiehajúcej odontogenézy je z morfológického hľadiska zhrubnutie orálneho epitelu. Z hľadiska molekulárneho je to expresia génov *Shh*, *Eda*, *Edar*, *Pitx2*, *Bmp2*, *Bmp4* a *Dlx2*.

Bolo zistené, že okrem transkripčnej domény, predstavujúcej vlastné signalizačné centrum vyvíjajúceho sa funkčného rezáku, sa počas včasného vývoja objavuje ešte jedna dočasná transkripčná doména, lokalizovaná anteriórne a superficiálne v odontogénnej zóne epitelu. Anteriórna transkripčná doména vzniká práve v oblasti epitelových mostíkov a podľa niektorých autorov z fylogenetického hľadiska zodpovedá signálnemu centru rudimentárneho zuba. Bunky z anteriórnej transkripčnej domény sa počas vývoja dostávajú do základu *vestibulum oris* doposiaľ neobjasneným mechanizmom.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo porovnať časopriestorovú dynamiku expresie proteínov SHH a EDA v anteriórnej oblasti mandibuly myši v priebehu embryonálneho vývoja v kontexte s vývojom zárodokov rezákov a epitelových štruktúr externe od nich. Použitím imunohistochemického značenia sa podarilo dokázať, že proteín SHH sa exprimuje v rovnakom vzore ako gén *Shh*. EDA proteín sa podobne ako SHH exprimuje v oblasti epitelových mostíkov. V oblasti funkčného rezáku sa EDA proteín neexprimuje. Expresia EDA však bola detegovaná v základe *vestibulum oris*. Prítomnosť odontogénnych markerov ako EDA a SHH v oblasti epitelových štruktúr externe od vyvíjajúcich sa rezákov by mohla vysvetliť potenciál týchto nedentálnych štruktúr tvoriť zubné tkanivo za patologických podmienok a tým pomôcť k objasneniu etiológie vývojových dentálnych patológií, akými sú napríklad periférne odontómy, vyskytujúce sa labiálne a bukálne od zubného oblúka človeka.

**Kľúčové slová:** zub, myš, SHH, EDA, rudimentárny zub, vývoj zubov

# Abstract

The development of the mouse tooth primordium is an important model for studying odontogenesis, as well as general organogenesis. The development of the mouse lower incisor is of remarkable interest. The epithelial anlage of the mouse lower incisor is interconnected with the vestibular anlage via the epithelial bridges. According to some authors, the epithelial bridges represent an area, where the transient rudimentary incisor germ appears. From a morphological point of view, the first sign of ongoing epithelial-mesenchymal interactions during early odontogenesis is the thickening of oral epithelium. From a molecular point of view, it is the expression of the *Shh*, *Eda*, *Edar*, *Pitx2*, *Bmp2*, *Bmp4* and *Dlx2* genes.

Except for the transcription domain, representing the proper signalling centre of a developing prospective incisor, a transient transcription domain, localized anteriorly and superficially, appears in the odontogenic zone of the epithelium during early development. The anterior transcription domain originates in the area of epithelial bridges, and according to some authors, from an evolutionary point of view, it corresponds with the signalling centre of the rudimentary incisor germ.

The aim of this diploma thesis was to compare the temporospatial dynamics of SHH and EDA protein expression in the anterior part of the mouse mandible during embryonic development in the context of the development of prospective incisors and externally located epithelial structures. By utilizing immunohistochemical staining, it was confirmed that SHH protein is expressed in the same pattern as *Shh* gene. The EDA protein is expressed in the area of epithelial bridges, similarly to SHH. In the area of a prospective functional incisor, the EDA protein is not expressed. However, EDA expression was detected in the anlage of the oral vestibule. The presence of odontogenic markers, like SHH and EDA, in the area of epithelial structures externally to developing incisors could explain the potential of these non-dental epithelial structures to give rise to dental tissues and elucidate the etiology of developmental dental pathologies, such as peripheral odontomas, which appear labially and buccally to the dental arch in humans

**Keywords:** tooth, mouse , SHH, EDA, rudimentary tooth, tooth development

# Zoznam skratiek

3D	Three-dimensional
Aa	Aminoacid
Act	Activin
Ai.	A iné
AKT	Proteín kináza B (PKB)
AMH	Anti-müllerian hormone
Ang.	Anglicky
APC	Adenomatosis polyposis coli
Barx1	Barx homeobox 1
BMP	Bone morphogenetic protein
C	Caninus
c	Mliečny očný zub
Ci	Cubitus interruptus
CK1	Kazeín kináza 1
CO-SMAD	Common-mediator SMAD
Cre	Rekombináza <u>C</u> auses <u>R</u> ecombination
Cys	Cysteín
D	Diastéma
DAB	3, 3'-Diaminobenzidine
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DE	Dental epithelium
DISP	Dispatched
Dlx	Distal-less homeobox
DNA	Deoxyribonucleic acid
DVL	Dishevelled
E	Embryonálny deň
EDA	Ectodysplasin
EDAR	Ectodysplasin receptor
EDARADD	EDAR associated death domain
EDN-1	Endothelin 1
EDNRA	Endothelin receptor typu A
EDTA	Kyselina etyléndiamín tetraoctová
Egr1	Early growth response 1
EK	Enamel knot
Et al.	A kolektív
FEZ	Frontonazálna ektodermálna zóna
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FHF	Fibroblast growth factor homologous factor
FI	Functional incisor
FRS2 $\alpha$	Fibroblast growth factor receptor substrate 2 alpha
FZ	Frizzled
GDF	Growth differentiation factor
GDNF	Glial cell-line derived neurotrophic factor
GDP	Guanozín difosfát
GLI	Glioma associated oncogene
GRB2	Guanine nucleotide exchange factor 2
GSK3	Glykogén syntáza kináza 3
GTP	Guanozín trifosfát
HED	Hypohidrotická ektodermálna dysplázia

HH	Hedgehog
HSPG	Heparan sulfát proteoglykan
IHH	Indian Hedgehog
I	Incisivus
i	Mliečny rezák
iFGF	Intracellular fibroblast growth factor
Ig	Imunoglobulín
IHC	Imunohistochémia
Inb	Inhibin
I-SMAD	Inhibitory SMAD
IκK	IkappaB kináza
JNK	c-Jun N-terminálna kináza
LEF	Lymphoid enhancer binding factor
Lhx	LIM/homeobox
LRP5/6	Low density lipoprotein related protein 5/6
M	Molaris
m	Mliečna stolička
MAPK	Mitogen activated protein kináza
MAPKK	MAPK kináza
Mil.	Miliónov
Msx	Msh homeobox
Napr.	Napríklad
NEMO	NF-κ-B essential modulator
NF-κB	Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
Obr.	Obrázok
Osr2	Odd skipped related transcription factor 2
P/PM	Premolaris
P38	P38 mitogen-activated protein kináza
Pax9	Paired box 9
PBS	Phosphate buffered saline
PCP	Planar cell polarity
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kináza
Pitx	Paired-like homeodomain
PLCγ	Phospholipase C gamma
Príp.	Prípadne
PTCH	Patched
Resp.	Respektíve
RI	Rudimentary incisor
RTK	Receptor tyrosine kinase
Runx2	Runt-related transcription factor 2
R-SMAD	Receptor-regulated SMAD
SEF	Similar expression to FGF
SHH	Sonic hedgehog
SHP2	Src2 homology region 2 domain-containing-phosphatase-2
SKN	Skinny hedgehog
SMAD	Sma (small body size)/mad (mothers against decapaplegic)
SMO	Smoothened
SOS	Son of sevenless
SPRY	Sprouty
SSD	Sterol sensing domain
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T.j.	To jest
Ta	Tabby



Tab.	Tabuľka
TCF	T-cell factor
TRAF	TNF receptor-associated factor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor necrosis factor
T $\beta$ R	TGF- $\beta$ receptor
Tzv.	Takzvaný
ÚEM	Ústav experimentálnej medicíny
VE	Vestibular epithelium
VO	Vestibulum oris
WNT	Wingless/int-1
XEDAR	X-linked ectodysplasin-A2 receptor
XLHED	X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia
ZPA	Zóna polarizujúcej aktivity

# 1 Úvod

---

Zubný vývoj patrí medzi najlepšie preskúmané epitelovo-mezenchymálne interakcie v priebehu organogenézy. Podobnými interakciami prechádza počas vývoja väčšina orgánov. Jedným z týchto „orgánov“ je aj vestibulárny epitel, ktorý v oblasti dolných rezákov človeka i myši vzniká spolu so zubami z jedného spoločného epitelového základu. To, aké mechanizmy sú v hre pri diferenciácii na dve funkčne a morfológicky odlišné štruktúry, zostáva záhadou.

Laboratórna myš je najpoužívanejším modelovým organizmom pre výskum odontogenézy. Drvivá väčšina toho, čo o vývoji zubov vieme, bola zistená u myšieho modelu odontogenézy. Zaujímavosťou je, že v priebehu odontogenézy vznikajú u myši dva typy zubných zárodokov, funkčné a rudimentárne. V oblasti rezákov sa z prvého typu vyvinie funkčný zub a druhý typ, rudimentárny, po určitom čase zastaví svoj vývoj a štádia funkčného zuba nedosiahne. Akú funkciu plní tento druhý typ zubného zárodka je doposiaľ neznáme. Vzhľadom na to, že sa zakladá medzi funkčným rezákom a vestibulárnym epitelom, je možné, že nejako s týmito štruktúrami súvisí. Príležitostný výskyt patologických dentálnych štruktúr u myši aj človeka vo vestibulárnom epiteli túto hypotézu podporuje.

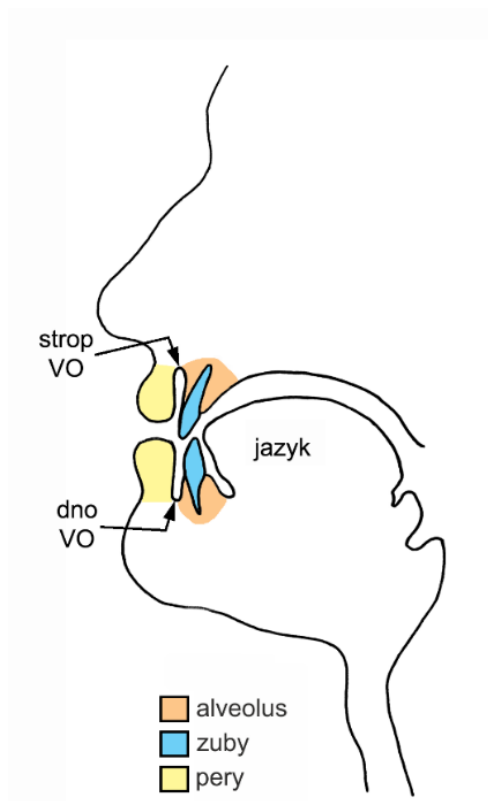
## 1.1 Orofaciálna anatómia človeka

Dutina ústna, *cavitas oris*, je počiatok tráviaceho systému človeka. Ventrálne ju ohraničujú pery, *labia oris*, a laterálne líca, *buccae*. Vstupom do ústnej dutiny je ústna štrbina, *rima oris*. Strop ústnej dutiny predstavuje podnebie, *palatum*, oddelujúce ústnu dutinu od dutiny nosovej a nosohltanu. Spodinu ústnej dutiny tvorí *diaphragma oris*. Dorzálne siaha ústna dutina až do hltanovej úžiny, *isthmus faucium*, kde tráviaci systém voľne prechádza do hltanu. Súčasťou ústnej dutiny sú taktiež špecializované orgány – jazyk, zuby, slinné žľazy, ai. Jazyk, *lingua*, leží na spodine ústnej dutiny. Zuby, *dentes*, sú vkladené do zubných lôžok, *alveoli dentales*, na hornej a dolnej čelusti a sú zoradené do dvoch zubných oblúkov, *arcus dentales superior et inferior*. Sliznica pokrývajúca celé alveolárne výbežky čelustí sa nazýva ďasno, *gingiva*. Zubnými oblúkmi je ústna dutina rozdelená na predsieň, *vestibulum oris* (labiálne či bukálne od

zubných oblúkov) a vlastnú dutinu ústnu, *cavitas oris propria* (lingválne od zubných oblúkov).

### 1.1.1 Vestibulum oris (predsieň dutiny ústnej)

Predsieň dutiny ústnej, *vestibulum oris*, je štrbinovitý priestor nachádzajúci sa labiálne a bukálne od zubných oblúkov (obr. 1.1). Pri zovretí zubov vytvára vestibulum uzatvorený priestor, ktorý komunikuje s vlastnou dutinou ústnou iba štrbinami medzi zubami a vzadu i väčšou štrbinou za poslednými stoličkami, tzv. retromolárnym priestorom. Na mieste, kde alveolárna sliznica prechádza do sliznice pier a líc, sa nachádza predsieňová klenba, *fornix vestibuli*. Po celej dĺžke *fornix vestibuli* je prítomný variabilný počet kosákovitých rias z riedkeho väziva. Tie sú obzvlášť výrazné v mediánnej rovine, kde vytvárajú uzdičky, *frenula labii superioris et inferioris*, fixujúce zvnútra peru k d'asnu. Výstelku *vestibulum oris* tvorí vestibulárny epitel.



**Obrázok 1.1: Schematické zobrazenie vestibulum oris (VO).** *Vestibulum oris* je ohraničené perami a zubami vkladnými do alveolov. (Z archívu Dr. Hovořákovej).

## 1.1.2 Zuby

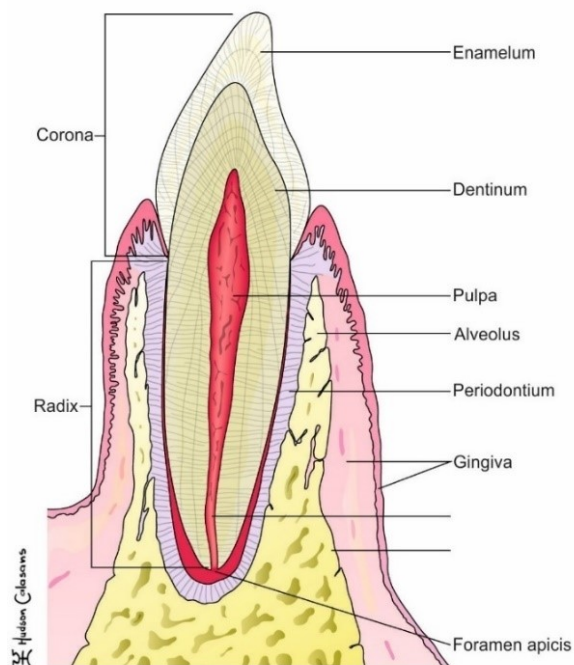
Zuby, *dentes*, sú tvrdé, kalcifikované štruktúry, nachádzajúce sa v ústnej dutine väčšiny stavovcov, vrátane človeka. Súhrn všetkých zubov jedinca sa nazýva chrup, alebo dentícia. Zuby sú fylogeneticky starobylé štruktúry. Najstarší známy stavovec so zubami, *Romundina stellina*, pochádza z obdobia skorého devónu (približne pred 410 mil. rokov) (Rücklin and Donoghue, 2015). Nápadná podobnosť v molekulárnej regulácii vývoja zubov a iných epitelových orgánov (šupiny, perie, chlpy, nechty, exokrinné žľazy) prirodzene vyúsťuje do otázok o ich evolučnom pôvode.

Zuby človeka sa od seba navzájom zreteľne odlišujú svojím tvarom a funkciou (heterodontný chrup). Človek má štyri typy zubov: rezáky (*dentes incisivi*), očné zuby (*dentes canini*), črenové zuby (*dentes premolares*) a stoličky (*dentes molares*). Ľudský chrup tvoria dve generácie zubov (difyodontný chrup). Vývoj dočasných (mliečnych) zubov, *dentes decidui*, začína v období 2. mesiaca embryonálneho vývoja a trvá približne 2 až 4 roky. V embryonálnom období taktiež dochádza k vývoju základov stálych zubov, *dentes permanentes*, ale ich tvorba zaberie ďalších 12 rokov. Prvé dočasné zuby sa prerezávajú približne 6 mesiacov po narodení a do 3. roku života by mal byť prerezaný celý dočasný chrup. V období okolo 6. roku života dochádza k erupcii prvého zuba trvalej dentície a postupne dochádza k exfoliácii dočasných zubov. Úplný trvalý chrup je prítomný po prerezaní tretej stoličky, obyčajne okolo 18 až 21 roku života jedinca. Zuby sú uložené v štyroch kvadrantoch. Dočasné zuby sú rozdelené v kvadrantoch po piatich zuboch, trvalé zuby sú rozdelené po ôsmich zuboch. Každý kvadrant dočasných zubov je zložený z dvoch rezákov, jedného očného zuba a dvoch stoličiek (zubný vzorec 2i 1c 2m). V kvadrante trvalých zubov sú navyše dva črenové zuby a tretia stolička (zubný vzorec 2I 1C 2PM 3M).

Na každom zube človeka rozoznávame korunku, krčok, koreň a dreňovú dutinu (obr. 1.2):

- I. **Korunka**, *corona dentis*, je vlastná, funkčne tvarovaná časť zuba, vyčnievajúca z ďasna do ústnej dutiny.
- II. **Krčok**, *collum dentis*, je malý úsek zuba medzi korunkou a koreňom.

- III. **Koreň**, *radix dentis*, je časť zuba vkladná do alveolárneho výbežku čelustí. Korene a ich vetvy sú vždy zakončené hrotom, *apex radice dentis*. Maxilárne stoličky majú korene až tri.
- IV. **Dreňová dutina**, *cavitas dentis*, je priestor uprostred zuba vyplnený zubnou dreňou, *pulpa dentis*. V korunke sa dreňová dutina rozširuje ako dutina korunky, *cavitas corone*. Naopak, v oblasti koreňa je dreňová dutina zúžená ako koreňový kanálik, *canalis radice dentis*, ktorý na hrote koreňa ústi ako jeden alebo viac otvorov, *foramen apicis dentis*.



**Obrázok 1.2: Stavba zuba.** (Zdroj obrázka: 2.bp.blogspot.com).

**Sklovina**, *enamelum*, je obzvlášť tvrdé, polopriehľadné tkanivo, kryjúce zubnú korunku. Najväčšiu hrúbku 2,5  $\mu\text{m}$  dosahuje sklovina na zubných hrbolčekoch a smerom k okraju zubného krčka sa stenčuje. Ide vlastne o vysoko mineralizovaný sekrét epitelových buniek, zložený takmer výhradne z hydroxyapatitu (tvorí až 95 % skloviny, zvyšok je proteínová matrix 1 % a voda 4 %). Organickú hmotu skloviny tvoria najmä jedinečné sklovinové proteíny, ako amelogeníny, ameloblastíny, enamelíny a tuftelíny. Na rozdiel od kosti a zuboviny sklovina neobsahuje kolagén. Sklovinotvorné bunky, ameloblasty, po erupcii zuba zanikajú. Sklovina preto

neobsahuje bunky a nemôže sa obnovovať. Oprava sklovinových defektov je potom obmedzená iba na remineralizáciu miniatúrnych kariéznych lézií.

Stavebnou zložkou skloviny sú sklovinové prizmy (hranoly). Sklovinové prizmy sú stĺpce široké 5  $\mu\text{m}$ , z nich je každý zložený z približne 1000 veľmi dlhých, vzájomne rovnobežných kryštálov hydroxyapatitu. Prizmy sú zaliate do interprizmatickej hmoty, v ktorej sú taktiež kryštály, ale líšia sa priestorovým usporiadaním. Siahajú bez prerušenia od hranice dentín-sklovina až do hĺbky 20  $\mu\text{m}$  pod povrch skloviny, kde ich zvyčajne nahrádza aprizmatická sklovina.

**Zubovina**, *dentinum*, je žltkasté, bezcievne tkanivo, tvoriace vlastnú hmotu zuba. Je tvrdšia ako kosť, hydroxyapatit tvorí 70 % jej hmotnosti. Organická hmota predstavuje 20 % hmoty zuboviny a je zložená z kolagénu typu I a proteoglykanov. Schopnosť vytvárať dentín si bunky zuboviny, odontoblasty, udržia počas celého života, čím postupne dochádza k zmenšovaniu dutiny korunky a koreňových kanálikov. K stimulácii odontoblastov a tvorbe nového dentínu dochádza aj pri poranení zuba.

**Cement**, *cementum*, je žltkasté tkanivo, podobné vláknitej kosti, kryjúce korene zubov. Má podobný pomer minerálnej zložky ako kostné tkanivo, a teda 50 % hmotnosti. Organickú zložku cementu predstavuje hlavne kolagén typu I a proteoglykany. Od kosti sa cement odlišuje tým, že neobsahuje ani cievy, ani nervy. Tak ako kosť, aj cement je perforovaný Sharpeyovými vláknami, ktoré pokračujú do vlákien periodontu a fixujú zub v alveole. Počas života sa na povrchu koreňa ukladajú nové vrstvy cementu a inkorporujú do seba nové Sharpeyove vlákna, aby kompenzovali pohyby zuba v alveole. Cement nepodstupuje remodeláciu, ale malé oblasti nesú známky resorpcie a opravy tkaniva. Vrstva cementu je výrazne tenšia ako vrstva skloviny. Na hranici krčku a korunky cement zvyčajne mierne prekrýva sklovinu, alebo sa ich okraje vzájomne stýkajú.

**Zubná dreň**, *pulpa dentis*, poskytuje výživu pre odontoblasty. Jedná sa o vysoko vaskularizované, rôsolovité väzivo podobné mezenchýmu, ktoré je obklopené dentínom a vyplňuje dreňovú dutinu zuba. V oblasti koreňa zubná dreň plynule nadväzuje na periodontálne väzy prostredníctvom jedného alebo viacerých apikálnych otvorov. Približne 60 % pulpárneho kolagénu je typu I, zastúpený je i kolagén typu III. Dreňovú dutinu lemuje vrstvička odontoblastov, produkujúca dentín. S narastajúcim vekom a depozitmi dentínu sa objem drene znižuje, a to

dokonca tak, že je možné odstrániť korunku bez obnaženia drene. Zubná dreň je bohato inervovaná, sympatická inervácia prichádza cestou periarteriálnych pletencov z *ganglion cervicale superius*, zatiaľ čo somatosenzitívnu inerváciu zabezpečujú vlákna z *ganglion trigeminale*, ktoré pod odontoblastami vytvárajú nervový pletenec – Raschkow plexus. Medzi inerváciou a zubnou agenézou sa javí istá korelácia (Kjaer et al., 1994; Chavez-Lomeli et al., 1996). Zaujímavý je prípad jednostrannej absencie *canalis mandibularis* a *nervus alveolaris inferior* v dolnej čelusti pochádzajúcej zo stredovekého Dánska. Autori predpokladajú, že tento defekt bol zodpovedný za agenézu zubov na postihnutej strane a *nervus mylohyoideus* dokázal čiastočne vykompenzovať vývoj alveolárnych výbežkov (Jakobsen et al., 1991).

S alveolárnou kosťou je zubný cement spojený osobitým systémom spojivového tkaniva – **ozubicou**, *periodontium*. Hlavnou funkciou ozubice je fixovať a stabilizovať zub v alveole. Taktiež poskytuje senzorické informácie o polohe zubov a sile skusu, čím reflexne chráni zuby pred neprímeraným tlakom pri žuvaní. Ozubica vyplňuje asi 200 µm širokú medzeru medzi povrchom koreňa a alveolárnou kosťou. Viac ako 70 % kolagénu v ozubici je typu I, prevažná časť zvyšku je typu III. Kolagénové vlákna ozubice sú orientované rôznymi smermi, čo im umožňuje pasívne pôsobiť proti pohybu zuba. Ozubica má bohaté krvné zásobenie a je inervovaná sympatickými a somatosenzitívnymi vláknami, ktoré prenášajú vazomotorické, resp. nociceptčné a proprioreceptívne informácie. Na hranici krčku a koreňa je zub, ozubica a priláhlá kosť krytá d'asnom.

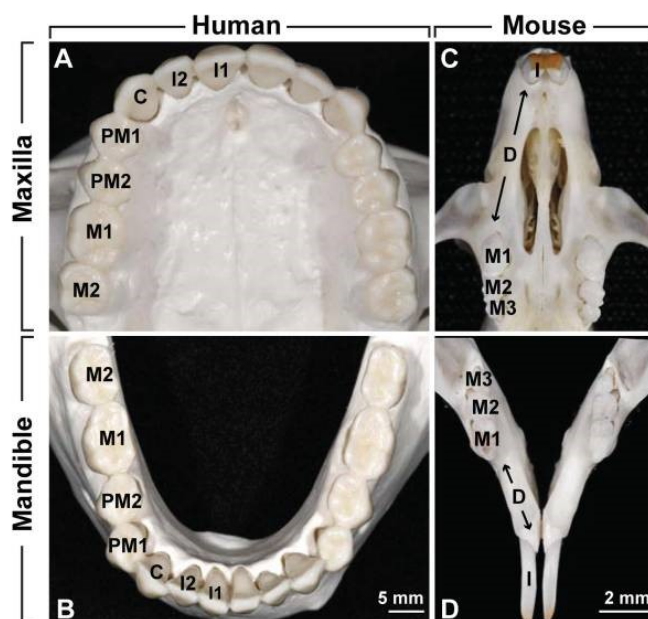
## 1.2 Myš ako experimentálny model pre štúdium odontogenézy

Laboratórna myš (*Mus musculus*) je najbežnejší modelový organizmus pre štúdium odontogenézy. Myš má vysokú reprodukčnú kapacitu, čím je zaistená i vysoká schopnosť reprodukcie experimentálnych výsledkov. Navyše patrí do kladu *Euarchontoglires*, ktorý zahŕňa i človeka, takže takmer všetky myšie gény majú svoje ľudské homológy. Známa je i kompletná sekvencia myšieho genómu a dostupná je široká škála metód genetickej manipulácie a s tým súvisiace množstvo dostupných kmeňov.

Myš disponuje sadou 16 zubov. V porovnaní so zubným vzorcom ancestrálnych placentovcov (*Placentalia*) je myš chrup vysoko redukovaný a vysoko funkčne a morfológicky špecializovaný. Každý kvadrant myších čelústí obsahuje iba jediný rezák oddelený od troch stoličiek úsekom bez zubov, zvaným diastéma. Práve koexistencia troch typov morfológicky a funkčne diferencovaných jednotiek (rezáky, diastéma, stoličky) v každom kvadrante čelústí umožňuje paralelné štúdie na o ich pôvode a kontrole vývoja (Peterkova et al., 2000). Na rozdiel od človeka nemá myš náhradný chrup a disponuje iba jednou generáciou zubov (monofyodontná dentícia). Myšie rezáky sú premenené na hlodáky a rastú kontinuálne v priebehu celého života jedinca. Na distálnom, funkčnom konci sa hlodáky nepretržite obrusujú, no zároveň na opačnom konci neustále dorastajú. Za schopnosť neobmedzeného rastu vďaka prítomnosti adultných kmeňových buniek na svojom proximálnom konci. Znalosť vlastností tejto populácie kmeňových buniek je v záujme základného i aplikovaného výskumu (regeneratívna terapia). K ukladaniu skloviny dochádza u myších rezákov iba na labiálnej strane, na lingválnej/palatálnej strane sa potom ukladá výlučne dentín. Hlodaním je zabezpečené, že na strane väčšieho dentínu dochádza k asymetrickému obrusovaniu, čím zostane odolnejšia rezná hrana rezáku tvorená iba sklovinou.

Aj keď sa myš a ľudský chrup od seba na prvý pohľad zreteľne odlišujú (obr. 1.3), všetky cicavčie zuby využívajú pri vývoji podobné, prípadne rovnaké, molekulárne kaskády. Navyše včasné štádiá zubného vývoja sú z histologického hľadiska v zásade totožné.





**Obrázok 1.3: Porovnanie maxilárneho (A, C) a mandibulárneho (B, D) zubného oblúka človeka (A-B) a myši (C-D).** Zatiaľ čo človek vymení v priebehu života zuby jedenkrát, myš disponuje po celý život iba jednou generáciou zubov. Trvalú ľudskú dentíciu tvorí 32 zubov (vyobrazovaný jedinec nemá tretie stoličky), myš má zubov 16. Človek má v jednom kvadrante čelustí dva rezáky, jeden očný zub, dva črenové zuby a tri stoličky (2I C 3PM 3M). V každom kvadrante myších čelustí je jeden rezák a tri stoličky, ktoré sú od rezáku oddelené bezzubou oblasťou, zvanou diastéma (I D 3M). (Podľa Jheon et al., 2013).

## 1.3 Vybrané signálne molekuly riadiace embryonálny vývoj

Na vytvorenie komplexného mnohobunkového organizmu je nevyhnutná koordinovaná súhra buniek, tkanív a orgánov. Interakcie medzi bunkami a tkanivami sa počas embryonálneho vývoja zúčastňujú predovšetkým signálne molekuly z rodín fibroblastových rastových faktorov (FGF), kostných morfogenetických proteínov (BMP), WNT a hedgehog (HH).

### 1.3.1 Fibroblastový rastový faktor (FGF)

Fibroblastový rastový faktor (FGF, angl. fibroblast growth factor) bol prvýkrát objavený vo výťažku z hovädzej hypofýzy v roku 1973 (Armelin, 1973). Už v roku 1938 však bolo známe, že výťažky z kuracích embryí podporujú rast fibroblastov izolovaných z kuracieho periostu (Trowell and Willmer, 1938).

Fibroblastové rastové faktory boli identifikované nielen u stavovcov, ale aj u bezstavovcov. Žiadne sekvencie podobné *Fgf* génu, neboli nájdené u jednobunkových organizmov ako *Escherichia coli* a *Saccharomyces cerevisiae*. Zaujímavé pritom je, že genóm vírusu jadrovej polyedrie obsahuje gén podobný *Fgf* (Ayres et al., 1994). Zo sekvencie genómu *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans* je známe, že iba jeden člen rodiny *Fgf* génov (gén *branchless*) sa nachádza u drozofily, a dvaja členovia (*egl-17* a *let-756*) sú známi u *C. elegans* (Sutherland et al., 1996; Burdine et al., 1997; Roubin et al., 1999). Naopak, u cicavcov je prítomných až 22 *Fgf* génov. Tento stav je výsledkom najmenej dvoch celogenómových duplikácií u včasných predkov stavovcov (Popovici et al., 2005). Podľa súčasného konsenzu sa rodina fibroblastových rastových faktorov delí na 5 podrodín parakrinných FGFs, jednu podrodinu endokrinných a jednu podrodinu intracelulárnych FGFs (Ornitz and Itoh, 2015).

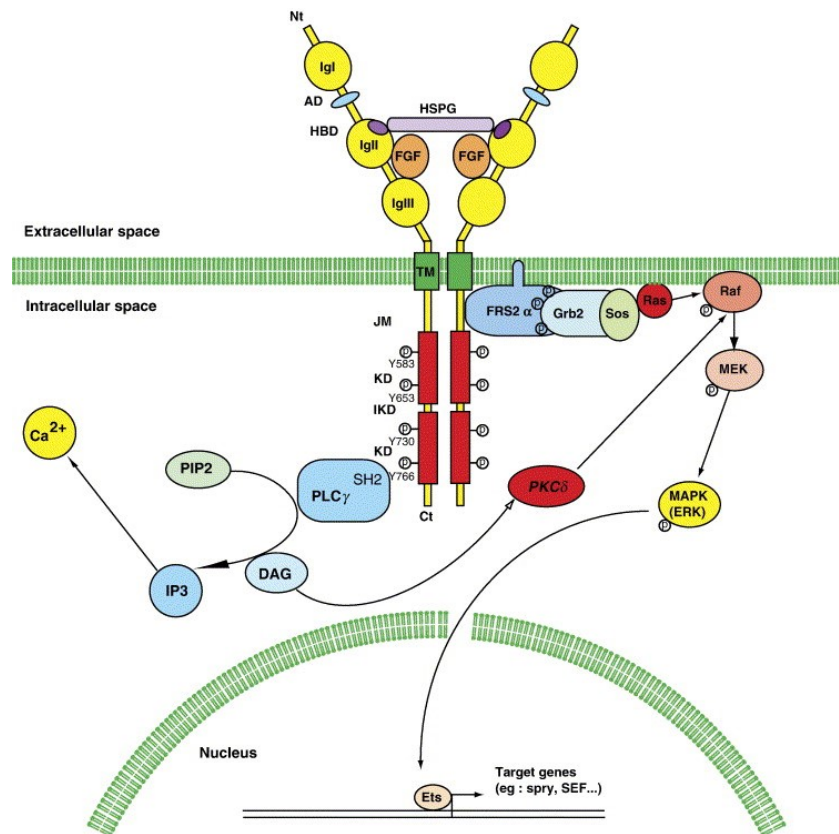
Signálne molekuly FGFs sú predovšetkým autokrinné/parakrinné faktory (nazývané tiež parakrinné FGFs, popr. kanonické FGFs), zatiaľ čo traja členovia FGF rodiny pôsobia endokrinne a plnia úlohu v regulácii metabolizmu fosfátu, žlčových kyselín, sacharidov a lipidov (nazývané tiež endokrinné FGFs). Štyri molekuly štruktúrne príbuzné FGF proteínom nie sú bunkou secernované a pôsobia na intracelulárnej úrovni (nazývané tiež iFGFs, príp. FGF homologické faktory - FHF). iFGFs interagujú v cytoplazme s C-terminálnou doménou napäťovo riadených sodíkových kanálov. iFGFs sú dôležitými regulátormi excitability neurónov a iných excitabilných buniek, napr. kardiomyocytov (Wang et al., 2012; Ornitz and Itoh, 2015).

Receptory fibroblastových rastových faktorov (FGFR) sú vysokoafinitné tyrozín kinázové receptory (RTK, angl. receptor tyrosine kinase), obsahujúce heparín viažucu sekvenciu, N-terminálne extracelulárne domény, pozostávajúce z troch „immunoglobuline-like“ subdomén (IgI-IgIII), transmembránovú doménu a C-terminálnu cytoplazmatickú tyrozín kinázovú doménu (Lee et al., 1989). Parakrinné FGFs vyžadujú pre signálnu funkciu väzbu k heparan sulfát proteoglykanom (HSPG), ktoré slúžia ako kofaktory umožňujúce homodimerizáciu FGF receptorov (Ornitz et al., 1992; Spivak-Kroizman et al., 1994). Homodimerizácia je nevyhnutná pre prenos signálu. Heparan sulfát je potentný kofaktor nielen pre FGF

signalizáciu, ale aj pre širokú škálu iných signálnych dráh, vrátane BMP, WNT a HH (Ornitz and Itoh, 2015).

Receptory FGF sa na membráne bunky vyskytujú ako neaktívne monoméry. Signálna dráha FGF začína naviazaním FGF ligandov na FGF receptory. Ligandy FGF sú spojené pomocou HSPG a viažu sa na IgII a IgIII domény FGF receptora. Väzba ligand-receptor spôsobí homodimerizáciu susedných receptorov a vzniká ternárny komplex FGFR-FGF-HSPG. Toto spojenie sprostredkuje transautofosforyláciu každého monoméru receptora pomocou cytoplazmatickej tyrozín kinázovej domény. Aktivovaný (=fosforylovaný) receptor ďalej fosforyluje tyrozínové zvyšky na adaptorovom proteíne jednej z intracelulárnych signálnych dráh, z ktorých za zmienku stoja Ras-MAPK, PI3K-AKT, PLC $\gamma$ , alebo STAT (viď „Zoznam skratiek“) (Teven et al., 2014; Ornitz and Itoh, 2015).

Stimulácia FGF receptora najčastejšie vyústi do aktivácie Ras-MAP (mitogen-activated protein) kinázovej dráhy. Stimulovaný receptor fosforyluje tyrozínové zvyšky na dokovacom proteíne FRS2 $\alpha$  (fibroblast growth factor receptor substrate 2 alpha) (obr. 1.4). Tým vzniká väzbové miesto pre adaptorový proteín GRB2 (guanine nucleotide exchange factor 2), ktorý sa pomocou tyrozín fosfatázovej domény SHP2 (src homology region 2 domain-containing phosphatase-2) viaže na FRS2 $\alpha$ . Adaptorový proteín GRB2 následne sprostredkuje aktiváciu GTPázy Ras regrutovaním výmenného faktora SOS (son of sevenless). Výmennou GDP za GTP sa Ras aktivuje. V GTP-viazanej konformácii sa Ras združuje s Raf kinázou, čím aktivuje jej serín/threonín kinázovú funkciu a signál sa odovzdá duálnej kináze MAPK (MAPKK). MAPKK fosforyluje MAP kinázu (MAPK) a kaskáda končí prenosom do jadra a fosforyláciou transkripčných faktorov, čo umožňuje interakciu s DNA a reguláciu cieľovej génovej expresie (Thisse and Thisse, 2005; Santarpia et al., 2012).



**Obrázok 1.4: Schéma väzby FGF ligandu na receptor a aktivácie signálnej dráhy.** Väzba ligandu spôsobí homodimerizáciu susedných receptorov a vzniká ternárny komplex, tvorený ligandom, receptorom a heparan sulfát proteoglykanom. Toto spojenie sprostredkuje transautofosforyláciu každého monoméru receptora pomocou cytoplazmatickej tyrozín kinázovej domény. Aktivovaný receptor ďalej fosforyluje tyrozínové zvyšky na dokovacom proteíne FRS2 $\alpha$ . Na FRS2 $\alpha$  sa následne viaže prostredníctvom tyrozín fosfatázovej domény SHP2 dokovací proteín GRB2. GRB2 má schopnosť aktivovať GTPázu Ras, ktorá je súčasťou MAP kinázovej dráhy FGF ligandy najčastejšie aktivujú MAP kinázovú dráhu. Medzi ďalšie signálne dráhy aktivované FGF ligandom patrí napríklad PLC $\gamma$  signálna dráha. (Podľa Thisse and Thisse, 2005).

Fibroblastové rastové faktory a ich receptory plnia široké funkcie v prenatálnom i postnatálnom vývoji. Keďže sú parakrinné FGFs rastovými faktormi, pôsobia najčastejšie ako mitogény, no zúčastňujú sa i prežívania, migrácie, diferenciácie buniek a metabolizmu. Počas včasného embryonálneho vývoja regulujú FGFs diferenciáciu vnútornej bunkovej masy do epiblastu a primitívneho endodermu (Yamanaka et al., 2010). V pokročilejších fázach vývoja majú FGFs kľúčovú úlohu v organogenéze, napr. pri vývoji srdca (Zaffran and Kelly, 2012), mozgu (Trokovic et al., 2005) alebo pri indukcii končatinového pupeňa (Ohuchi et al., 1997). Niektoré FGFs stimulujú proliferáciu aj v epiteli aj v mezenchýme, iné iba v epiteli alebo iba v mezenchýme (Jernvall et al., 1994; Kettunen and Thesleff, 1998; Kettunen et al., 2000). Postnatálne sa FGFs uplatňujú pri odpovedi na poškodenie tkaniva a pri jeho oprave. Sú dôležité pri regenerácii pľúcneho epitelu a kožných

poranení (Meyer et al., 2012; Guzy et al., 2015). V adultných tkanivách často reaktivujú vývojové signálne dráhy (Ornitz a Itoh 2015).

Mutácie vo *FGF* a *FGFR* génoch spôsobujú u ľudí rôzne patologické stavy. Najčastejšia príčina trpasličieho vzrastu, achondroplázia, je spôsobená gain-of-function mutáciou vo *FGFR3* géne. Táto mutácia znižuje inhibíciu enchondrálnej osifikácie, čím dochádza u postihnutých k vytvoreniu typického fenotypu (krátka postava, krátke proximálne segmenty končatín, veľká hlava s prominujúcim čelom) (Cohen, 1998). Receptory FGF boli implikované aj pri rozvoji rakovinových ochorení. Napríklad gain-of-function mutácie *FGFR3* sú najčastejšie pozorovanými mutáciami u rakoviny močového mechúra (Cappellen et al., 1999). Rekombinantné FGFs by mohli nájsť uplatnenie v biologickej liečbe. Na ich terapeutický potenciál pokazuje fakt, že FGF1 bol v klinických experimentálnych štúdiách schopný indukovať v srdci neoangiogézu (Schumacher et al., 1998).

### **Negatívna regulácia MAP kinázovej dráhy**

Podobne, ako je to v prípade aktivácie signálu, aj mechanizmy ktoré utlmujú FGF signalizáciu sú v živočíšnej ríši konzervované. Vo všeobecnosti je utlmenie FGF signalizácie vyvolané indukciou MAPK fosfatáz. Proteíny rodiny Sprouty (SPRY) sú MAPK fosfatázy, ktoré inhibujú RTK signalizáciu. Proteín SPRY bol prvýkrát identifikovaný ako antagonista FGF signalizácie, riadiaci apikálne vetvenie v dýchacích cestách drozofily. U cicavcov poznáme štyri homológy, SPRY1-SPRY4, obsahujúce konzervovanú, na cysteín bohatú C-terminálnu doménu. Na N-terminálnej doméne sa nachádza tyrozínový zvyšok nevyhnutý pre inhibičnú aktivitu SPRY proteínov (Rubin et al., 2005). Sprouty majú niekoľko mechanizmov účinku. Bud' sa viažu priamo na Raf kinázu, čím blokujú MAPK signalizáciu (Casici et al., 1999), alebo sa kompetitívne viažu na GRB2, čo zabraňuje tvorbe SOS/Ras komplexu (Hanafusa et al., 2002). Zaujímavé je, že samotná FGF signalizácia aktivuje SPRY proteíny, čo by mohlo predstavovať autoinhibíciu.

Medzi ďalšie negatívne modulátory FGF signalizácie patria fosfatázy SEF (similar expression to FGF) a MAPK fosfatáza 3. Regulácia FGF signalizácie prebieha aj na úrovni receptorov. Po aktivácii môžu byť FGFR internalizované a následne degradované alebo recyklované (Teven et al., 2014).

### 1.3.2 Transformujúce rastové faktory beta (TGF- $\beta$ )

Členovia nadrodiny transformujúcich rastových faktorov beta (TGF- $\beta$ , angl. transforming growth factor beta) sú všadeprítomné cytokíny, ktoré sa zúčastňujú vývojových mechanizmov počas zárodočného vývoja, udržiavania homeostázy a hojenia rán v adultných tkanivách. Exprimujú sa takmer v každej bunke ľudského tela a takmer každá bunka reaguje aspoň na jedného člena tejto nadrodiny. Poruchy proteínov z TGF- $\beta$  nadrodiny sú prítomné u mnohých malígnych a autoimunitných ochorení. Názov nadrodiny je odvodený od jej člena, signálneho proteínu TGF- $\beta$ , ktorý bol schopný malígne transformovať fibroblasty potkana v *in vitro* kultúre (de Larco and Todaro, 1978). Podľa Huminiecki et al. (2009) sa objavenie sa TGF- $\beta$  signalizácie zhoduje so vznikom prvých známych živočíchov. U cicavcov patrí do nadrodiny TGF- $\beta$  najmenej 30 proteínov, vrátane molekúl ako samotný TGF- $\beta$ , BMP, GDF (growth differentiation factor), GDNF (glial derived neurotrophic factor), Act (activin), Inh (inhibin), Nodal, Lefty a AMH (anti-müllerian hormone).

TGF- $\beta$  ligandy iniciujú signálnu dráhu naviazaním sa na vysokoafinitné Typ I a Typ II receptory (tiež nazývané T $\beta$ RI a T $\beta$ RII), ktoré sú zároveň jediné známe serín/treonín kinázové receptory. Väzba ligandu na dimér Typ II receptora indukuje tvorbu komplexu s príslušným dimeróm Typ I receptora, čím vzniká heterotetramérny komplex s naviazaným ligandom. Vznik komplexu je nasledovaný rotáciou receptorov, čím sa cytoplazmatická kinázová doména dostane do katalyticky výhodnej orientácie. To umožní Typ II receptoru fosforyláciu Typ I receptora na jeho glycín-serín bohatej doméne, čím sa aktivuje jeho serín/treonín kinázová funkcia. Aktivácia Typ I receptora umožní fosforyláciu SMAD proteínov (Gordon and Blobel, 2008).

SMAD proteíny je možné podľa funkcie rozdeliť do troch skupín:

- I. Receptorom regulované SMADy (R-SMADy), kam patria SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8.
- II. Common-mediator SMAD (CO-SMAD), kam patrí iba SMAD4.
- III. Inhibičné SMADy (I-SMADy), kam patria SMAD6 a SMAD7 (Kubiczkova et al., 2012).

Po fosforylácii dochádza k spojeniu dvoch aktivovaných R-SMADov s pomocným proteínom SMAD4 (Shi et al., 1997). Novovzniknutý heterodimérny komplex je schopný akumulácie v jadre, kde môže interagovať s rozličnými transkripčnými faktormi, čím dochádza k modulácii génovej expresie (Gordon and Blobel, 2008). Tretou skupinou SMADov sú antagonisti TGF- $\beta$  signalizácie s názvom I-SMADy. K inhibícii signálu dochádza zablokovaním aktivácie R-SMADov vytvorením komplexu s Typ I receptorom, alebo priamou kompetíciou o väzbu so SMAD4 (Itoh et al., 2001). Samotný názov „SMAD“ súvisí s identifikáciou ľudského SMAD1 a vznikol spojením názvov homologických génov „*sma*“ (small body size) z háďatka a „*mad*“ (mothers against decapaplegic) z drozofily (Sekelsky et al., 1995; Liu et al., 1996; Savage et al., 1996).

Diverzita typická pre TGF- $\beta$  signalizáciu nie je závislá iba na SMADoch, ale aj na schopnosti TGF- $\beta$  aktivovať iné signálne dráhy. TGF- $\beta$  sa môže zúčastňovať apoptózy, epitelovo-mezenchymálnej tranzície, migrácie, proliferácie, diferenciácie buniek a remodelácie extracelulárnej matrix. Medzi TGF- $\beta$  ligandom aktivované signálne dráhy patria napríklad Ras-MAPK, JNK, p38 a PI3K-AKT kinázové dráhy (viď „Zoznam skratiek“) (Moustakas, 2005). V prípade JNK dráhy boli pozorované oba typy aktivácie, t. j. SMAD-dependentná i nezávislá aktivácia (Engel et al., 1999).

### **Kostný morfogenetický proteín (BMP)**

Kostné morfogenetické proteíny (BMPs, angl. bone morphogenetic proteins) sú skupinou signálnych glykoproteínov patriacich do nadrodiny TGF- $\beta$ . Aktivita kostného morfogenetického proteínu bola prvýkrát pozorovaná v roku 1965 (Urist, 1965). Urist (1965) objavil, že demineralizovaná, lyofilizovaná kosť, implantovaná do svalu kráľika, dokázala indukovať ektopickú tvorbu kostného tkaniva. Samotné molekuly proteínu však mohli byť študované až o 23 rokov neskôr, kedy sa ich podarilo naklonovať (Wozney et al., 1988).

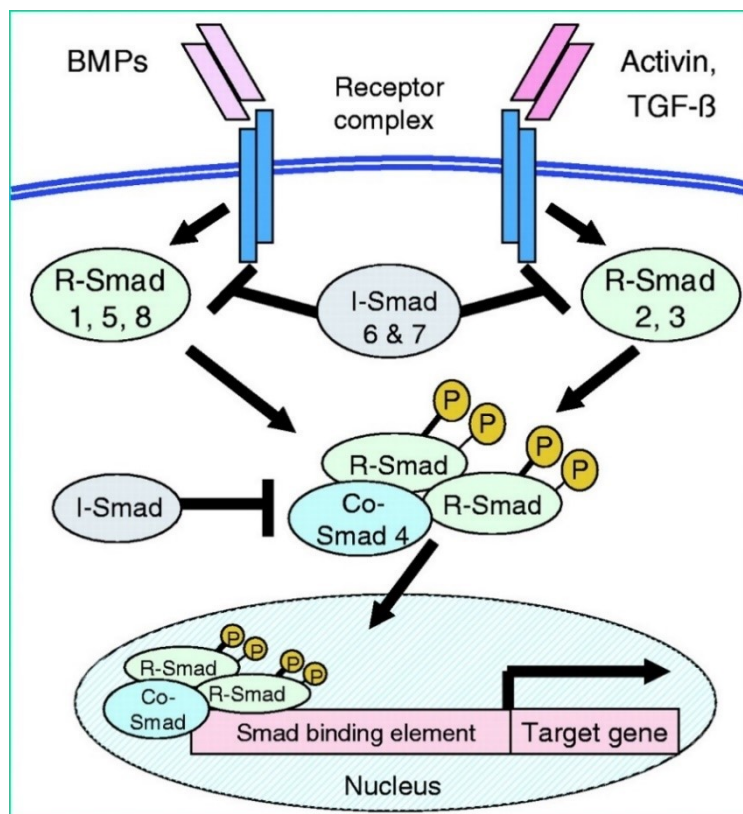
Zdá sa, že rodina BMP/GDF patrí medzi evolučne najstarších členov TGF- $\beta$  nadrodiny. Naznačuje to fakt, že BMP/GDF proteíny sa exprimujú u nematód a drozofil (Franchini and Ottaviani, 2006), kým aktívny/inhibičný len u drozofil a nie u nematód (Jensen et al., 2009). TGF- $\beta$  proteín je zatiaľ známy iba u stavovcov, nie však u bezstavovcov. S postupom času úloha BMP v evolúcii narastala. Pôvodné

funkcie zostali konzervované a nové sa vynorili spolu s novými členmi rodiny BMP proteínov (Hinck, 2012).

Aj keď má BMP signalizácia nepopierateľnú úlohu v ontogenéze kostného tkaniva, organizmus ju využíva v oveľa širšom rozsahu. Veľa dejov vo včasnom embryonálnom vývoji je závislých na BMP signalizácii, či už ide o rast, apoptózu, alebo diferenciáciu buniek (Zou and Niswander, 1996; Kobayashi et al., 2005; Stewart et al., 2010). Napríklad vo vyvíjajúcom sa embryu slúži BMP ako morfogén poháňajúci dorzoventrálny patterning mezodermu (Dosch et al., 1997). BMP takisto hrá hlavnú úlohu vo vývoji neurálnej platničky (Liem et al., 1995). V dospelých tkanivách hrá BMP dôležitú úlohu pri udržiavaní homeostázy, napríklad pri udržiavaní integrity kĺbov, iniciácii hojenia zlomenín a pri remodelácii ciev (Bobacz et al., 2003; Tsuji et al., 2006; Huang et al., 2009). Vzhľadom na širokú škálu funkcií, ktorú BMP vykazuje vo všetkých orgánových systémoch, je pre BMP možno príznačnejší názov „body morphogenetic protein“ (Obradovic Wagner et al., 2010).

Ako už bolo spomenuté u TGF- $\beta$  signálnej dráhy, intracelulárne dochádza k modulácii BMP signalizácie prostredníctvom SMAD proteínov. BMP špecifické receptorom regulované SMADy sú SMAD1, SMAD5 a SMAD8 (obr. 1.5). Vo vývojových procesoch hrajú veľmi dôležitú úlohu aj extracelulárni antagonisti BMP signalizácie. Tí sa pravdepodobne vyvinuli nezávisle od seba, pretože nezdedia žiadne konzervované úseky v primárnej sekvencii aminokyselín. U stavovcov sem patrí napríklad Noggin a Chordin (Balemans and Van Hul, 2002).





**Obrázok 1.5: Zjednodušená schéma TGF- $\beta$  a BMP signálnych dráh.** Vázba ligandu na dimér Typ II receptora (nazývaný tiež T $\beta$ RII/BMPRII) indukuje vznik heterotetramérneho komplexu s dimeróm Typ I receptora (nazývaný tiež T $\beta$ RI/BMPRI). Aktivovaný Typ I receptor umožní fosforyláciu R-SMAD proteínov. Po fosforylácii dochádza k spojeniu R-SMAD proteínov (u TGF- $\beta$  sa spájajú SMAD2 a 3; u BMP sa spájajú SMAD1, 3 a 5) s pomocným proteínom SMAD4. Novovzniknutý komplex akumuluje v cytoplazme a následne translokuje do jadra, kde je schopný ovplyvňovať expresiu génov. Inhibičné SMADy, SMAD6 a SMAD8, dokážu zablokovať transdukciu signálu vytvorením komplexu s Typ I receptorom. (Podľa Itman et al., 2006).

Zmeny v expresii BMP sú u ľudí zodpovedné za radu patologických stavov. Strata BMP signalizácie je dôležitý faktor pri progresii kolorektálneho karcinómu (Kodach et al., 2008). Znížená aktivita BMP súvisí so vznikom orgánovej fibrózy, ako je to v prípade chronického zlyhania obličiek. Pacientom s fibrotickými ochoreniami by mohla pomôcť biologická liečba. Rekombinantný BMP proteín znižuje renálnu fibrogenézu, apoptózu a transdiferenciáciu epitelových buniek (Mitu and Hirschberg, 2008).

### 1.3.3 WNT

Objav signálnych molekúl WNT je úzko prepojený s výskumom onkogénnych retrovírusov. Prvý *Wnt* gén, *Int-1*, bol identifikovaný v roku 1992 ako proto-onkogén, zapojený do virálnej tumorigény v mliečnej žľaze laboratórnej myši (Nusse and

Varmus, 1982). Neskôr sa zistilo, že vývojovo dôležitý gén u drozofily, „wingless“ (*wg*), je homológom „*Int-1*“ (Rijsewijk et al., 2016). V ďalších rokoch vzrástli dôkazy o zapojení *Int-1* do normálneho vývoja stavovcov a vzhľadom na nové objavy došlo k zlúčeniu do jedného názvu „*wg/Int-1*“ (= *Wnt*) (Wilkinson et al., 1987).

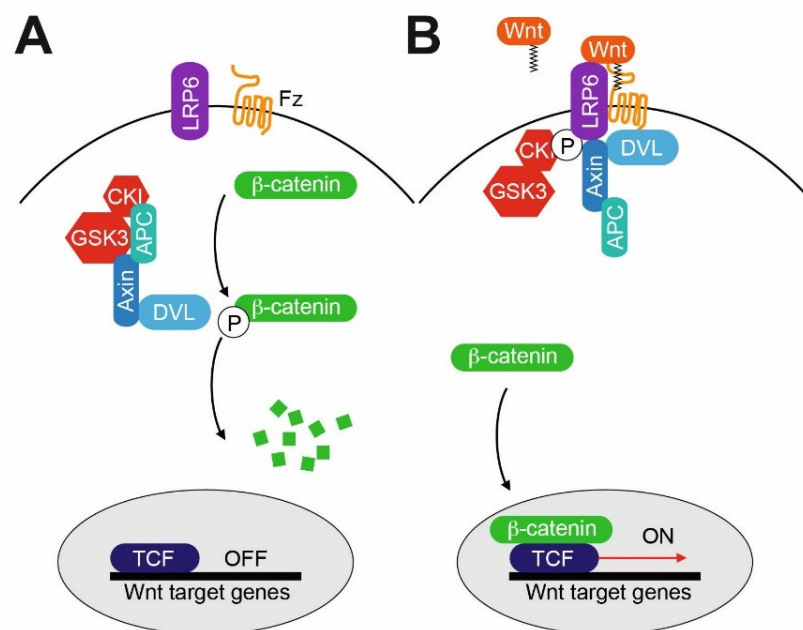
Gény *Wnt* sú evolučne konzervované a nájdeme ich takmer u všetkých mnohobunkových organizmov, od morskej sasanky rodu *Nematostella*, až po človeka (Kusserow et al., 2005). Rodina *Wnt* génov podstúpila v priebehu evolúcie mnohobunkovcov rozsiahle génové duplikácie. V súčasnosti je u nezmara známy iba jeden *Wnt* gén, zatiaľ čo u drozofily sedem (Hobmayer et al., 2000; Llimargas and Lawrence, 2001). U cicavcov je komplexnosť a špecificita WNT signalizácie sčasti dosiahnutá pomocou 19 WNT ligandov. WNT ligandy sú zložené z približne 350-400 aminokyselín a zdieľajú takmer totožný vzor 23 cysteínových zvyškov. Na finálnom WNT proteíne sú prítomné dve miesta lipidovej modifikácie, ktoré sú pravdepodobne zodpovedné za hydrofóbnosť a slabú rozpustnosť WNT proteínov (Willert et al., 2003; Takada et al., 2006). N-terminálna doména WNT proteínu je secernovaná ako signálny peptid a viaže sa na receptor rodiny Frizzled (FZ), 7-krát prechádzajúci cytoplazmatickou membránou. U človeka je známych 10 členov rodiny receptorových proteínov Frizzled (Schulte and Bryja, 2007).

Existujú dve hlavné vetvy, akými sa uskutočňuje WNTsignalizácia:

- I. Kanonická, alebo aj WNT/ $\beta$ -katenín dependentná signálna dráha (obr. 1.6).
- II. Nekanonická, alebo aj  $\beta$ -katenín nezávislá signálna dráha, ktorá sa ďalej delí na dráhu planárnej polarizácie bunky (WNT/JNK) a kalcium dependentnú dráhu (WNT/ $\text{Ca}^{2+}$ ).

Väzba medzi ligandom WNT a receptorom FZ vyžaduje na prenos signálu ko-receptory. Jedným z nich je LRP5-6 (low-density-lipoprotein-related protein 5/6), nevyhnutný pre kanonickú WNT signalizáciu (Pinson et al., 2000). Charakteristickou súčasťou kanonickej WNT signálnej dráhy je akumulácia a translokácia  $\beta$ -katenínu z cytoplazmy do jadra. V neprítomnosti WNT ligandu je cytoplazmatický  $\beta$ -katenín degradovaný deštruktívnym komplexom, ktorý obsahuje axin, APC (adenomatosis polyposis coli), GSK3 (glykogén syntáza kináza 3) a CK1 $\alpha$  (kazeín kináza 1 $\alpha$ ). Fosforylácia  $\beta$ -katenínu pomocou kazeín kinázy a GSK3 ho značí na ubikvitináciu a následnú degradáciu v proteozóme (obr. 1.6A). V prítomnosti WNT sa ligand viaže

na receptorový komplex FZ/LRP5/6, ktorý priamo interaguje s cytoplazmatickým fosfoproteínom Dishevelled (DVL) (Wong et al., 2003). Potom nasleduje fosforylácia LRP5/6, spojená s naviazaním axinu na receptorový komplex. To zabraňuje fosforylácii molekulami deštručného komplexu a vedie k stabilizácii  $\beta$ -katenínu, ktorý sa akumuluje v cytoplazme a následne translokuje do jadra. V jadre tvorí  $\beta$ -katenín komplex s TCF/LEF (T-cell factor / lymphoid enhancer factor) a dochádza k spusteniu transkripčnej odpovedi (obr. 1.6B).



**Obrázok 1.6: Zjednodušená schéma WNT signálnej dráhy.** (A) V absencii ligandu je  $\beta$ -katenín označený deštručným komplexom, ktorý obsahuje axin, APC, GSK3 a CK1 $\alpha$ . Takto označený  $\beta$ -katenín podstupuje degradáciu v proteozóme. (B) V prítomnosti WNT sa ligand viaže na receptorový komplex FZ/LRP5/6, ktorý priamo interaguje s cytoplazmatickým fosfoproteínom DVL. Väzba axinu na receptorový komplex znemožní fosforyláciu  $\beta$ -katenínu molekulami deštručného komplexu, čím dochádza k jeho stabilizácii v cytoplazme a k jeho translokácii do jadra. V jadre vytvára  $\beta$ -katenín komplex s proteínom TCF a môže regulovať expresiu rezponzívnych génov. (Zdroj obrázka: wormbook.org).

Dráha planárnej polarity bunky (planar cell polarity / PCP) je nekanonickou WNT signálnou dráhou, ktorá nie je závislá od  $\beta$ -katenínu. Epitelové bunky majú nielen apiko-bazolaterálnu polaritu, ale sú polarizované aj na úrovni epitelovej vrstvy (teda vzhľadom na bazálnu membránu). Princíp PCP spočíva v regulácii aktínového cytoskeletu, ktorý pomáha vytvárať tento typ „dvojitej“ polarizácie. Planárna polarita tak vplýva nielen na bunkové štruktúry, ako cílie vo vnútornom uchu, ale i na tkanivové štruktúry, ako vlasové folikuly (Wang and Nathans, 2007). Kalcium

dependentná dráha je ďalšou WNT dráhou nevyžadujúcou  $\beta$ -katenín. Úloha tejto dráhy spočíva v regulácii uvoľňovania vápnika z endoplazmatického retikula, čím pomáha riadiť jeho intracelulárnu koncentráciu.

Signalizácia pomocou WNT glykolipoproteínov je jedným zo základných mechanizmov, akými je riadená bunková proliferácia, polarita a determinácia bunkového osudu počas zárodočného vývoja a údržby adultných tkanív. WNT sa taktiež zúčastňuje bunkovej migrácie – je induktorom epitelovo-mezenchymálnej tranzície, napríklad vo vývoji mliečnej žľazy (Micalizzi et al., 2010). V zárodočnom vývoji uplatní organizmus WNT signalizáciu napríklad v spinálnej mieche, kde navádza komisurálne axóny v antero-posteriornej osi (Lyuksytova et al., 2003). V dospelom organizme je WNT esenciálnym regulátorom homeostázy črevného epitelu (Krausova and Korinek, 2014).

U človeka vedú poruchy regulácie WNT dráhy k rôznym patologickým stavom. Do priameho spojenia s ľudskými ochoreniami sa WNT signalizácia začala dávať po objavení *APC* génu, pri výskume dedičnej, postupne malignizujúcej choroby, familiárnej adenomatóznej polypózy (Kinzler et al., 1991). Gén *APC* bol však sprvu objavený nezávisle od WNT dráhy a až neskôr bolo zistené, že cytoplazmatický APC proteín interaguje s  $\beta$ -katenínom (Su et al., 1993). V hepatocelulárnych karcinómoch boli zasa objavené loss-of-function mutácie axinu (Clevers, 2000). Mimo rakoviny sú poruchy WNT signalizácie dávané do spojitosti napr. so zmenami kostnej denzity (Gong et al., 2001; Boyden et al., 2002).

### 1.3.4 Hedgehog (HH)

Hedgehog (*Hh*) bol pôvodne identifikovaný ako gén riadiaci polarizáciu segmentov u drozofily (Mohler, 1988). Svoje meno (hedgehog, v preklade „ježko“) si zaslúžil vďaka mutantnému fenotypu lariev, ktoré pripomínajú ježka. Drozofila disponuje iba jedným hedgehog génom. U cicavcov pozostáva rodina génov *Hh* z minimálne troch homológnych génov s rozličnými menami, Sonic hedgehog (*Shh*), Desert hedgehog (*Dhh*) a Indian hedgehog (*Ihh*) (Ramsbottom and Pownall, 2016). Niektorí klinici kritizujú mená ako „nadvukový ježko“, ktoré možno znejú v laboratóriu zábavne, menej humorná je ale situácia, pri ktorej musia vysvetľovať

pacientom alebo rodičom, že ich dieťa má vážnu vrodenú poruchu, pretože má zmutovaného „nadvukového ježka“ (Maclean, 2006).

Najväčšej pozornosti výskumníkov sa teší gén Sonic hedgehog (*Shh*), a to vďaka jeho kľúčovej úlohe v embryonálnom vývoji stavovcov. U stavovcov bol gén *Shh* prvýkrát popísaný ako morfogén, ktorý na základe koncentračného gradientu ventralizuje neurálnu trubicu a podmieňuje diferenciáciu motoneurónov a príslušných interneurónov (Roelink et al., 1994).

SHH ligand je spočiatku syntetizovaný ako 45 kDa prekurzor. Behom posttranslačnej modifikácie podstupuje peptid autoprotelýzu, čím vznikajú samostatné C- a N- terminálne fragmenty. C-terminálny fragment, SHH-C, funguje ako cholesterol transferáza a na karboxylový koniec N-terminálnemu fragmentu, SHH-N, kovalentne naviaže cholesterol. Palmitoylacetyltransferáza kódovaná génom Skinny hedgehog (*Skn*) pripojí palmitovú skupinu na pozíciu Cys-29, čím vzniká extrémne hydrofóbná molekula, ktorá je pripravená na transport z endoplazmatického retikula k cytoplazmatickej membráne (Chamoun, 2001). Skinny hedgehog deficientné myši vykazujú podobné vývojové poruchy ako *Shh* mutanty – chýba im diferencovaná bazálna platnička a sú postihnuté defektami neurálnej trubice (Chen et al., 2004). Väzba cholesterolu a palmitátu zvyšuje účinok signálneho proteínu SHH, zatiaľ čo naviazanie hydrofilných molekúl k N-terminálnej doméne aktivitu SHH naopak znižuje (Taylor et al., 2001). Celkovo je možné povedať, že lipidácia signálneho proteínu SHH je nevyhnutným krokom k vytvoreniu funkčnej signálnej molekuly.

Cholesterolom modifikovaný proteín SHH je viazaný na membránu bunky. Transport proteínu SHH je komplexný dej s viacúrovňovou reguláciou. Úspešný prenos SHH zo sekrečnej bunky sa skladá zo série krokov:

- I. SHH ligand je multimerizovaný a dvakrát lipidom modifikovaný (M-SHH-N), vďaka čomu je rozpustný a schopný difundovať do väčších vzdialeností (obr. 1.8 „Bod 1“) (Zeng et al., 2001).
- II. Transmembránový proteín Dispatched<sup>1</sup> (DISP) so sterol citlivou doménou, interaguje s cholesterolom modifikovaným M-SHH-N a uvoľní ho z bunkovej membrány sekretorických buniek (obr. 1.8 „Bod 2“) (Burke et al., 1999).

---

<sup>1</sup>DISP prechádza cytoplazmatickou membránou 12-krát.

- III. Za extracelulárny prenos M-SHH-N sú pravdepodobne zodpovedné heparan sulfát proteoglykany (Desbordes and Sanson, 2003).
- IV. Enzým s názvom „tout-velu“ reguluje prenos M-SHH-N nepriamo prostredníctvom regulácie syntézy heparan sulfát proteoglykanov (The et al., 1999).

HH signalizácia sa skladá zo série troch hlavných krokov:

- I. Väzba HH ligandu na receptor Patched<sup>2</sup> (PTCH) (obr. 1.8 „Bod 3“).
- II. Aktivácia Smoothened<sup>3</sup> (SMO).
- III. Aktivácia transkripčných faktorov. SMO iniciuje downstream signálnu kaskádu končiacu aktivovaním cytoplazmatického transkripčného komplexu cubitus interruptus (ci) u drozofily, resp. Glioma-associated-oncogene (GLI) u stavovcov (obr. 1.8 „Bod 5“). Komplex preniká do jadra (obr. 1.8 „Bod 6“), kde reguluje transkripciu HH responzívnych génov (obr. 1.8 „Bod 7“).

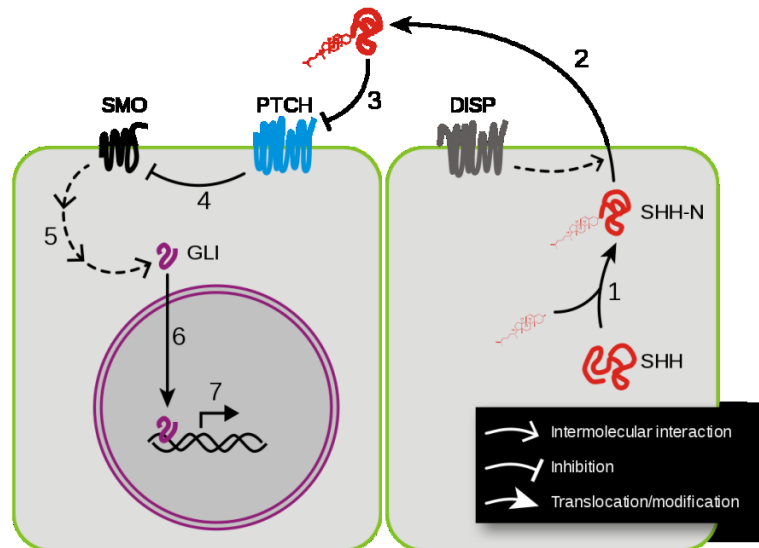
Proteíny GLI sú transkripčné faktory motívu zinkových prstov. U stavovcov boli doteraz objavení traja členovia rodiny GLI regulačných proteínov – GLI1, GLI2 a GLI3. GLI2 a GLI3 sú primárnymi respondérmí na HH signál. V nadväznosti na signál indukujú expresiu génu *Gli1*. Ten plní funkciu amplifikátora a zvyšuje účinok signalizácie. GLI1 slúži výhradne ako transkripčný aktivátor, zatiaľ čo GLI2 a GLI3 majú duálnu funkciu, teda sú schopné transkripčnej aktivácie i represie. Stavovčie proteíny GLI sa v niektorých funkciách prekrývajú a vykazujú čiastočnú redundanciu. Platí, že GLI2 je prítomný predovšetkým v neštiepenej forme ako transkripčný aktivátor, kým GLI3 sa vyskytuje v bunke prevažne ako C-terminálne štiepený transkripčný represor (Pan and Wang, 2007). V absencii HH ligandu je GLI3 proteolýzou konvertovaný do represorovej formy, ktorá suprimuje transkripciu génov. V prítomnosti ligandu sa tvorba represorovej formy GLI3 zablokuje. Rovnáha

---

<sup>2</sup>PTCH je transmembránový receptor, 12-krát prechádzajúci cytoplazmatickou membránou, so sterol citlivou doménou, ktorá interaguje s modifikovaným SHH ligandom.

<sup>3</sup>SMO je členom Frizzled rodiny transmembránových receptorov, a zdieľa homológiu s receptormi spojenými s G-proteínmi (G-protein couple receptors / GPCR) (Alcedo et al. 1996). SMO tvorí spolu s PTCH receptorový komplex na SHH responzívnych bunkách. V neprítomnosti SHH ligandu slúži receptor PTC ako negatívny regulátor, resp. inhibítor aktivity SMO (obr. 1.8 „Bod 4“). V prítomnosti SHH ligandu dochádza k represii PTCH, uvoľneniu väzby medzi PTCH a SMO a aktivácii SMO.

medzi represorovou a aktivátorovou formou určuje v jadre mieru odpovede na signál (Niewiadowski et al., 2014).



**Obrázok 1.7: Zjednodušená schéma SHH signálnej dráhy.** (1) Naviazanie cholesterolu na N-terminálny koniec SHH proteínu je esenciálnym krokom pre vznik funkčnej signálnej molekuly. (2) Transmembránový proteín DISP rozpoznáva cholesterol viazaný na molekulu SHH a uvoľní signálnu molekulu z bunky. (3) Na cieľovej bunke sa SHH molekula viaže na receptor PTCH. (4) V absencii SHH ligandu PTCH inhibuje SMO. (5) V prítomnosti SHH ligandu je SMO uvoľnený spod inhibície PTCH, čo vedie k aktivácii transkripčného komplexu GLI. (6) Aktivovaný GLI sa kumuluje v jadre, (7) kde je schopný regulovať transkripciu príslušných génov. (Zdroj obrázka: en.wikipedia.org).

Odkedy bol signálny proteín SHH prvýkrát pozorovaný ako ventralizačná molekula neurálnej trubice, sa jeho úloha vo vyvíjajúcom ale i dospelom organizme rozšírila do zdanlivo nekončiaceho zoznamu. SHH exprimovaný vo ventrálnom endoderme predného čreva je kritický pre vývoj prvého faryngeálneho oblúku, pretože zaisťuje prežívanie buniek neurálnej lišty (Brito et al., 2006). V myotóme riadi SHH výstavbu bazálnej laminy cez SHH-dependentnú syntézu laminínu  $\alpha 1$ . (Anderson et al., 2009). Vo vyvíjajúcom sa prozencefale sa SHH exprimuje na rozhraní ventrálneho a dorzálneho thalamu, v tzv. *zona limitans intrathalamica* (Scholpp et al., 2006). Neuroektoderm prozencefala a ektoderm tváre secernujú SHH a tým riadia vývoj horného segmentu tváre a frontonazálneho výbežku. (Marcucio et al., 2005). Azda najviac preskúmanou oblasťou pôsobenia SHH je vývoj končatiny. SHH je secernovaný v zóne polarizujúcej aktivity (ZPA), kde špecifikuje antero-posteriórnu osu končatiny. Špecifikácia posteriórne uložených prstov vyžaduje, aby daná oblasť bola dlhšiu dobu exponovaná účinku SHH (Scherz et al.,

2007). HH signalizácia ma nenahraditeľnú úlohu nielen v čase zárodočného vývoja organizmu, ale uplatňuje sa i postnatálne. V adultnom mozgu hrá SHH úlohu pri vzniku a obnove niky neurogénnych kmeňových buniek a pri regulácii proliferácie neuronálnych a gliových prekursorov (Traiffort et al., 2010). Počas anagénovej fázy vlasového cyklu je SHH detegovateľný v epitelových bunkách proximálneho konca vlasového folikulu (Oro and Higgins, 2003). U dospelých myší ošetrovaných anti-SHH protilátkou sa chlповý cyklus zastavuje v anagénovej fáze a dochádza k zastaveniu rastu chlpov. Signálny proteín SHH je teda pravdepodobne nevyhnutný pre regeneratívnu funkciu kmeňových buniek vlasovej cibulky (Wang et al., 2000). Iný proteín HH rodiny, Indian Hedgehog, patrí medzi významných regulátorov proliferácie chondrocytov a diferenciácie osteoblastov v priebehu enchondrálnej osifikácie (St-Jacques et al., 1999; Long et al., 2004).

Hedgehog signalizácia sa uplatňuje u viacerých ľudských ochorení. SHH signalizácia je aktívna u niektorých ochorení dýchacích ciest, napr. u pulmonárnej fibrózy, astmy, chronickej obštrukčnej choroby pľúc, ako aj rakoviny pľúc (Kugler et al., 2015). Mutácie v géne *SHH* spôsobujú vrodenú vývojovú poruchu, holoproencefáliu, ako následok straty ventrálnej stredovej čiary (Roessler et al., 1996). Blízka asociácia nádorového bujnenia s aberantnou SHH signalizáciou bola nájdená u najčastejšieho ľudského zhubného nádoru, bazaliómu (Otsuka et al., 2015) a taktiež i u meduloblastómu (Gibson et al., 2010).

### **1.3.5 Ectodysplazín (EDA)**

V roku 1875 publikoval Charles Darwin knihu Variácie zvierat a rastlín vplyvom domestikácie (Darwin, 1875). Popísal v nej prípad rodiny z Indie, v ktorej počas štyroch generácii trpelo desať mužov zubnými anomáliami. Postihnutí muži mali v ústach štyri malé a slabé rezáky a dohromady osem stoličiek. Mali riedke ochlpenie a plešateli už v mladom veku. Kvôli nadmerne vysychajúcej pokožke ťažko znášali horúčavy. Zaujímavé pritom bolo, že v rodine sa nikdy nevyskytla postihnutá dcéra. Zopár vetami popísal to, čo sa neskôr stalo známe ako anhidrotická/hypohidrotická ektodermálna dysplázia (HED). Keďže jeden zo zodpovedných génov sa nachádza na X chromozóme, postihnutí sú predovšetkým muži. V skutočnosti je však HED iba jednou z viac ako 150 pomerne vzácnych chorôb,



spoločne nazývaných ektodermálne dysplázie, ktoré postihujú pokožku a iné ektodermálne orgány. O viac ako 120 rokov bol zodpovedný gén, ektodysplazín (*EDA*), prvýkrát zmapovaný na X-chromozóme mužských pacientov a neskôr identifikovaný u pacientiek, ktoré boli nositeľkami X:autozómnej translokácie (Kere et al., 1996).

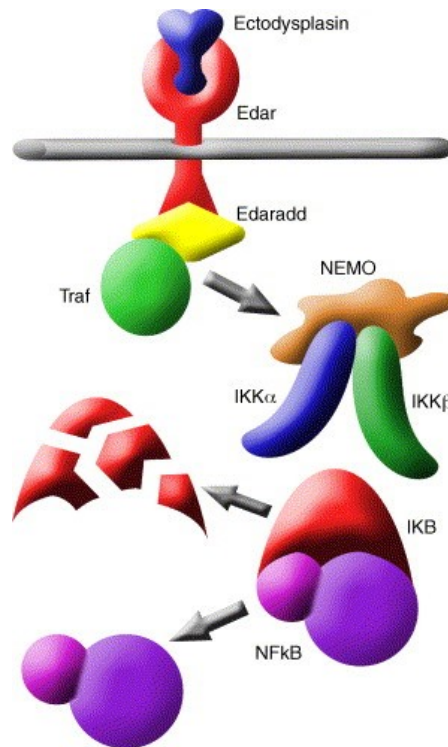
Fenotyp ektodermálnych dysplázií bol popísaný aj u spontánnych myších mutantov Tabby (*Ta*), izolovaných ešte na začiatku minulého storočia (Cui and Schlessinger, 2006). Tabby myši vykazujú charakteristické chlповé defekty, abnormality chrupu a potných žliaz, ktoré majú svoj ekvivalent u X-viazej hypohidrotickej ektodermálnej dysplázie (XLHED). Spojitosť *Ta* a *EDA* definitívne potvrdili Srivastava et al., (1997), ktorým sa podarilo naklonovať *Ta* gén a dokázať, že ide o homológ *EDA* génu.

Regulácia morfogénzy prostredníctvom *EDA* signálnej molekuly je evolučne vysoko konzervovaná. Dokazuje to zapojenie dráhy do morfogénzy ektodermálnych derivátov väčšiny, ak nie dokonca všetkých, stavovcov. S pokrokom v komparatívnej genomike a genetike došlo k zisteniu, že genetické komponenty *EDA* signálnej dráhy, ktoré sú mutované u pacientov a myší, sú vysoko konzervované aj u iných stavovcov, vrátane bežných modelových organizmov ako medaky japonské (nazývanej tiež halančík japonský), pazúrnatky a kury (Cui and Schlessinger, 2006).

Ektodysplazín je transmembránový proteín patriaci do nadrodiny tumor nekrotizujúcich faktorov (TNF, angl. tumor necrosis factor). Napriek tomu, že je *EDA* proteín viazaný na membránu, ukázalo sa, že je štiepený a vytvára rozpustný ligand, ktorý dokáže interagovať s *EDA* receptorom (*EDAR*) (Elomaa et al., 2001). Vo všeobecnosti platí, že TNF receptory, ktoré neobsahujú sekvenciu „death“ domény, iniciujú signalizáciu priamym regrutovaním TRAF (TNF receptor associated factor). Pokiaľ je sekvencia „death“ domény prítomná, nábor TRAF prebieha až po väzbe adaptorového proteínu na TNF receptor. Keďže *EDAR* obsahuje „death“ doménu, pri signalizácii dochádza k náboru adaptorového proteínu *EDARADD* (edar associated death domain) (obr. 1.8) (Headon et al., 2001).

Následne dochádza k väzbe TRAF. Je známych 6 TRAF proteínov, ale iba TRAF6 sa zdá byť schopný sprostredkovať účinok *EDARADD* proteínu. Jedným z kľúčových účinkov *EDARADD*/TRAF6 komplexu je aktivácia NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells) signálnej dráhy pomocou I $\kappa$ K kinázy. I $\kappa$ K

kináza je multimerný komplex zložený z dvoch katalytických podjednotiek,  $\text{I}\kappa\text{K}\alpha$  a  $\text{I}\kappa\text{K}\beta$ , spolu s regulačnou podjednotkou NEMO ( $\text{I}\kappa\text{K}\gamma$ ) (Israël, 2000). Za normálnych okolností je NF- $\kappa$ B neaktívny a uložený v cytoplazme bunky. V neaktívnom stave ho udržuje inhibítor  $\text{I}\kappa\text{B}$ . V okamihu, keď komplex EDARADD/TRAF6 aktivuje  $\text{I}\kappa\text{K}$  komplex, dochádza k fosforylácii, ubikvitinácii a následnej degradácii  $\text{I}\kappa\text{B}$ . Vďaka uvoľneniu  $\text{I}\kappa\text{B}$  inhibítora môže NF- $\kappa$ B translokovať do jadra a regulovať transkripciu génov (Lindfors et al., 2013).



**Obrázok 1.8: Zjednodušená schéma EDA/NF- $\kappa$ B signálnej dráhy.** EDA ligand sa viaže na transmembránový receptor EDAR, ktorý regrutuje intracelulárny adaptorový proteín EDARADD. Na ERADD sa prostredníctvom „death“ domény viaže TRAF, čo vedie k aktivácii  $\text{I}\kappa\text{K}$  komplexu.  $\text{I}\kappa\text{K}$  komplex fosforyluje  $\text{I}\kappa\text{B}$ , čím ho označí na degradáciu v proteozóme. V absencii  $\text{I}\kappa\text{B}$  inhibítora môže NF- $\kappa$ B translokovať do jadra a regulovať transkripciu génov. (Podľa Courtney et al., 2005).

Alternatívnym zstrihom 12 exónov *Eda* génu je možné vytvoriť najmenej 8 izoforiem (Bayés et al., 1998; Mikkola and Thesleff, 2003; Cui and Schlessinger, 2006). Iba dva transkripty však kódujú funkčné proteíny: EDA-A1 (391 aa) a EDA-A2 (389 aa). Rozdiel medzi týmito dvoma izoformami leží v ich receptor viažucej doméne. EDA-A1 a EDA-A2 sa viažu na dva odlišné TNF receptory, EDAR, respektíve XEDAR (Yan et al., 2000). V súčasnej literatúre a v predloženej práci odkazuje „EDA“ na EDA-A1 variantu.

Ektodysplazín je nevyhnutný pre normálny vývoj (nielen) ektodermálnych orgánov. Známky expresie *Eda* génu boli nájdené i v endoderme (Mikkola et al., 1999). Rovnaký morfogenetický signál je zapojený do vývoja odlišných ektodermálnych derivátov, akými sú u cicavcov vlasové folikuly, nechty, zuby a exokrinné žľazy, u vtákov perie a u plazov šupiny. Úloha EDA signalizácie pravdepodobne spočíva v kontrole množstva, veľkosti a hustoty epitelových štruktúr (Sadier et al., 2014). EDA signalizácia nezahŕňa vývoj ektodermálnych derivátov, ale iba reguluje a je regulovaná priebehom ich morfogénzy. Funkcia EDA-A2 a XEDAR vo vývoji zostáva enigmatická. Transkripty XEDAR boli lokalizované vo vyvíjajúcich sa vlasových folikuloch. Zaujímavá je expresia EDA-A2 v dentálnom, orálnom, ale i vestibulárnom epiteli (Mustonen et al., 2003). Namiesto vývoja je receptor XEDAR dávaný do súvislosti v tkanivovou homeostázou. Northern blot odhalil expresiu génu *Xedar* vo viacerých adultných tkanivách, vrátane semenníkov, mliečnej žľazy a čriev. U transgénnych EDA-A2 myší dochádza k multifokálnej myodegenerácii priečne pruhovaných svalov, ktorá je však závislá na prítomnosti XEDAR. Na základe výsledkov je teda možné predpokladať úlohu XEDAR pri homeostáze priečne pruhovanej svaloviny (Newton et al., 2004).

Ako už bolo spomenuté, mutácie genetických komponentov EDA signálnej dráhy zapríčiňujú ektodermálne dysplázie. Pacienti s anhidrotickou/hypohidrotickou ektodermálnou dyspláziou vykazujú redukciiu ochlpenia, chrupu a nechtov. Deficit vo funkcii potných žliaz (anhidróza, hypohidróza) vysvetľuje neschopnosť odolávať vysokým teplotám, ktorú spomínal Darwin. Postihnutých je viacero ďalších exokrinných žliaz, vrátane slinných, slzných, mazových, Meibomových a mliečnych (mliečne žľazy sú vlastne modifikované potné žľazy). Mnoho postihnutých jedincov navyše vykazuje charakteristické tvárové znaky (prominujúce čelo, plné pery výsledkom maxilárnej a dentálnej hypoplázie) (Clauss et al., 2008). Pacientov môžu trápiť respiračné problémy, podľa všetkého kvôli redukcii exokrinných žliazok v sliznici trachey a bronchov (Fete, 2014). *Eda* gén sa teda pravdepodobne zúčastňuje i morfogénzy endodermálnych derivátov, akými sú žľazky v dýchacom systéme.

Na zmeny v dávke ektodysplazínu je vysoko citlivý počet a tvar zubov. U ľudí, ale aj u myší, rozlišujeme široký rozsah fenotypových modifikácií. Závažné loss-of-function mutácie majú za následok významnú redukciiu dentície (niekedy až celého chrupu) a závažnú modifikáciu tvaru zubov (napríklad súdkovité zuby,

mikrodoncia a zmena v počte zubných hrbolčekov) (Clauss et al., 2008). V menej závažných prípadoch nemusia byť, snád' až na chýbajúce rezáky, zjavné žiadne klinické symptómy HED (Tao et al., 2006; Tarpey et al., 2007). Na opačnej strane stoja gain-of-function mutácie, ktoré boli nájdené u východoázijských populácii a zodpovedajú za lopatovité rezáky (Kimura et al., 2009).

Ektodermálne dysplázie boli zaznamenané aj u iných druhov. U zebričky (nazývanej tiež dánio pruhované) vedú mutácie *eda* a *edar* k poruchám vývoja plutiev, šupín a faryngeálnych zubov (Harris et al., 2008). Postihnuté môžu byť aj domáce zvieratá, respektíve psy (Lewis et al., 2010) a dobytok (Drogemuller et al., 2001). Pozoruhodné pritom je, že podávaním rekombinantného EDA proteínu gravidným Tabby myšiam je možné napraviť väčšinu defektov spôsobených X-viazanou ektodermálnou dyspláziou (Gaide and Schneider, 2003). Rovnaký účinok má administrácia rekombinantného EDA proteínu psom s XLHED v priebehu prvých dvoch týždňov po narodení. Trvalý chrup sa normalizuje, obnoví sa slzenie, zlepší sa schopnosť potiť sa a obnovia sa i tracheálne a bronchiálne žliazky (Casal et al., 2007; Mauldin et al., 2009). Experimentálne štúdie na myšiach a psoch vydláždili cestu pre vývoj humanizovaných EDA rekombinantných proteínov. V decembri 2015 bola ukončená druhá fáza klinických štúdií na novorodencoch s XHLED (<https://clinicaltrials.gov/NCT01775462>).

## 1.4 Embryonálny vývoj orofaciálnej oblasti

### 1.4.1 Vývoj primitívnej ústnej dutiny človeka

Vývoj hlavy začína vo včasnom embryonálnom vývoji a pokračuje postnatálne až do konca adolescentného obdobia. Prvou vznikajúcou štruktúrou budúcej tváre je ústna dutina. Morfogenéza ústnej dutiny začína v čase pokročilej neurulácie. Ústna dutina vzniká na najrostrálnejšom konci zárodka, na mieste, kde ektoderm priamo nalieha na endoderm bez medzivrstvy mezodermu alebo mezenchýmu, zvanom **orofaryngeálna membrána**, *membrana oropharyngealis seu buccopharyngea*. Ektoderm orofaryngeálnej membrány sa od okolitého tkaniva vymedzuje expresiou *Pitx* génov. Vplyvom rapidnej expanzie rostrálneho konca neurálnej trubice sa orofaryngeálna membrána posúva ventrálne a vzniká zreteľná vkleslina. Táto novozniknutá vkleslina sa nazýva primitívna ústna jamka, **stomodeum**. Stomodeum vystieľa vrstva stomodeálneho epitelu, ktorý je od endodermu hltanu oddelený orofaryngeálnou membránou a je prekursorom pre orálny a dentálny epitel. Postupom času dochádza k redukcii buniek tvoriacich orofaryngeálnu membránu na jednu až dve vrstvy epitelových buniek, čo vo štvrtom týždni vývoja vyvrcholí prasknutím membrány a vytvorením komunikácie medzi ústnou dutinou a hltanom (Soukup et al. 2013). Po prasknutí orofaryngeálnej membrány sa strácajú presne vymedzené hranice medzi ektodermom a endodermom. Bolo zistené, že u nižších stavovcov sa epitely z rôznych zárodočných vrsiev môžu miešať (Soukup et al., 2008). Do okolia stomodea migrujú bunky neurálnej lišty a dávajú vznik ektomezenchýmu orofaciálnej oblasti. Proliferáciou ektomezenchýmu sa okolo stomodea zakladajú výbežky, ktoré predstavujú stavebné jednotky budúcej tváre.

### 1.4.2 Vývoj tváre a čelústí človeka

Štruktúry tváre a čelústí pochádzajú z primordií, ktoré obkolesujú stomodeum u 4 až 5 týždňov starého ľudského embrya. Jedná sa o:

- I. Nepárový **frontonazálny výbežok**
- II. Párové **mediálne a laterálne nazálne výbežky**
- III. Párové **maxilárne a mandibulárne výbežky**

**Frontonazálny výbežok**, *prominentia frontonasalis*, vzniká proliferáciou mezenchýmu ventrálne od proencefala. Mezenchým frontonazálneho výbežku je pôvodu neurálnej lišty z oblasti proencefala a mezencefala. Po bokoch frontonazálneho výbežku sa pod indukčným vplyvom proencefala zakladajú lokálne zhrubnutia ektodermu, zvané čuchové plakódy, *placodae nasales seu olfactoriae*. V priebehu 6. týždňa embryonálneho vývoja dochádza k invaginácii čuchových plakód a vznikajú čuchové jamky, *foveae nasales* (obr. 1.9A-B). Spolu so vznikom čuchových jamiek sa vytvorí brázda, ktorá po stranách ohraničuje každú jamku a definuje nazálne výbežky. Výbežky na vonkajšom okraji jamiek sa nazývajú **laterálne nazálne výbežky**, *prominentiae nasales laterales*, na vnútornej strane jamiek sa nazývajú **mediálne nazálne výbežky**, *prominentiae nasales mediales*.

Prvým molekulárnym prejavom vznikajúceho frontonazálneho výbežku je syntéza kyseliny retinovej v oblasti ektodermu naliehajúceho na ventrálnu stenu proencefala. Kyselina retinová spúšťa syntézu signálnych molekúl FGF-8 a SHH v tvárovom ektoderme a neuroepiteli proencefala, ktoré majú stimulačný účinok na proliferáciu mezenchýmu neurálnej lišty. Experimentálne podanie antagonistov receptorov kyseliny retinovej vedie k zvýšenej apoptóze a zníženej proliferácii v proencefale a frontonazálnom výbežku. Morfologické defekty je možné zvrátiť reintrodukciami kyseliny retinovej, popr. FGF-8 a SHH (Schneider et al., 2001).

Difúzia morfogénu SHH z proencefala indukuje vznik frontonazálnej ektodermálnej zóny (FEZ) v tvárovom ektoderme. Frontonazálnu ektodermálnu zónu tvoria dve domény, dorzálna ektodermálna doména, exprimujúca gén *Fgf-8*, a ventrálna ektodermálna doména, exprimujúca gén *Shh*. Sútok týchto dvoch signálov má stimulačný vplyv na priliehajúci mezenchým neurálnej lišty. Zdá sa, že FEZ riadi dorzo-ventrálnu polaritu a proximo-distálny rast frontonazálneho výbežku. U človeka sa FEZ zakladá na špičkách mediálnych nazálnych výbežkov. U vtákov sa FEZ zakladá bilaterálne, avšak neskôr splýva do jedného signálneho centra. Transplantačné štúdie na vtáčích embryách ukázali, že ektopická transplantácia FEZ má za následok vytvorenie druhého zobáka. Je možné, že druhovo špecifické charakteristiky tvárovej oblasti generuje práve ektoderm frontonazálnej ektodermálnej zóny (Hu et al., 2003; Marcucio et al., 2005; Hu and Marcucio, 2009).

Čuchová jamka má taktiež významný vplyv na morfogénu orofaciálnej oblasti. Pri extirpácii čuchového epitelu jamky je ovplyvnený laterálny nazálny, ale

nie frontonazálny výbežok. Implantácia gulôčiek potiahnutých proteínom FGF-8 zvráti negatívny vplyv straty čuchového epitelu a laterálny nazálny výbežok sa vyvíja normálne. To naznačuje indukčný vplyv čuchovej jamky a FGF signalizácie na morfogénu laterálneho nazálneho výbežku (Szabo-Rogers et al., 2009).

Ďalším faktorom, ktorý výrazne ovplyvňuje finálnu podobu tváre, je rezpozivita tvárových výbežkov na WNT proteín. Vo všeobecnosti sa dá povedať, že WNT signalizácia stimuluje bunkovú proliferáciu a tým zväčšuje hmotu danej štruktúry. V kontexte vývoja tváre majú živočíchy s prominujúcim rostrom (vtáky) WNT rezpozívnu oblasť na frontonazálnom výbežku. Živočíchy s plochou tvárou (človek) majú WNT rezpozívne oblasti umiestnené na maxilárnych výbežkoch, čo stimuluje rast tváre do šírky (Brugmann et al., 2007).

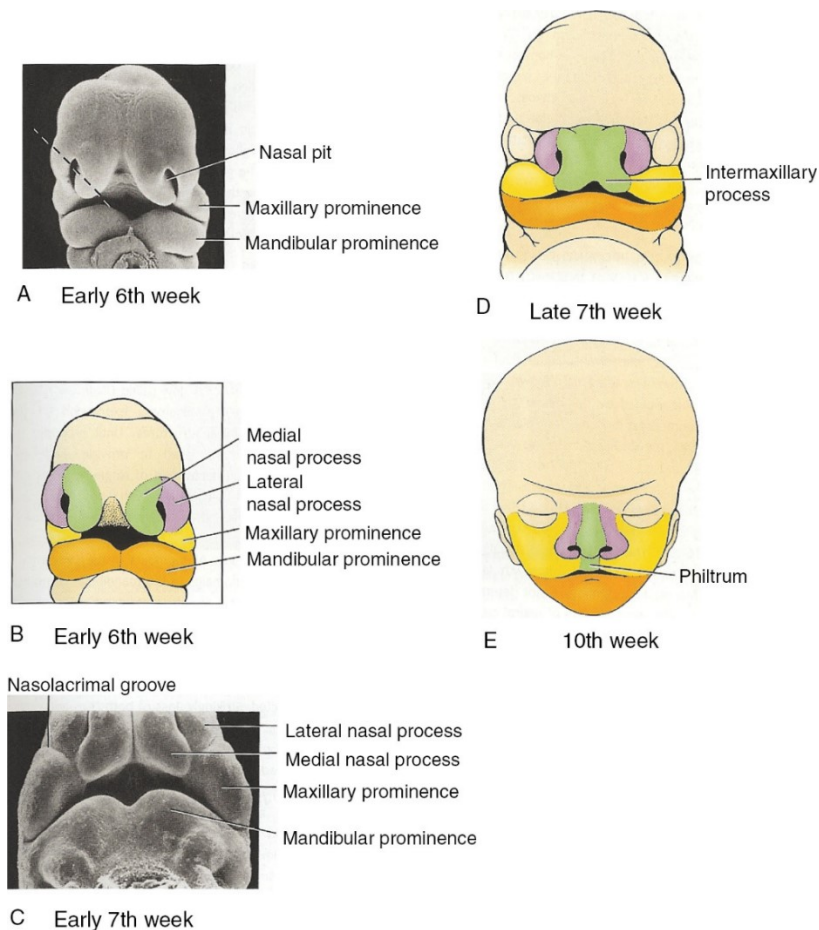
**Maxilárny výbežok**, *prominentia maxillaris*, ohraničuje stomodeum po stranách laterálne, zatiaľ čo **mandibulárny výbežok**, *prominentia mandibularis*, môžeme odlíšiť kaudálne od stomodea. Mezenchým maxilárnych výbežkov je pôvodu neurálnej lišty z oblasti proencefala a mezencefala, zatiaľ čo ektomezenchým mandibuly pochádza z oblasti mezencephala a rhombencephala (rhomboméry 1 a 2) (Köntges and Lumsden, 1996). Oba výbežky patria medzi deriváty prvého faryngeálneho oblúka. Faryngeálne oblúky, *arcus pharyngeales* (v staršej literatúre i žiabrové oblúky, *arcus branchiales*, pretože pripomínajú žiabre rýb), sú charakteristickými štruktúrami včasného vývoja hlavy a krku. Tieto oblúky sa objavujú v 4. a 5. týždni vývoja a ich jadro tvorí kondenzovaný mezenchým. Mezenchým faryngeálnych oblúkov je pôvodu neurálnej lišty, okrem svalového mezodermu, ktorý imigruje zo somitomér. Z vonkajšej strany zárodka sú faryngeálne oblúky oddelené hlbokými brázdami, zvanými faryngeálne brázdy, *sulci pharyngei*. Zároveň sa z vnútornej strany, resp. z laterálnej steny hltanu, vychlipujú tzv. faryngeálne vaky, *sacci pharyngei*. Tie penetrujú okolitý mezenchým, nevytvárajú však komunikáciu s vonkajšími brázdami. Napriek tomu, že vývoj faryngeálnych oblúkov, brázd a vakov pripomína vývoj žiabier u rýb a obojživelníkov, u ľudského embrya sa skutočné žiabre nevytvárajú. Z tohto dôvodu sa v kontexte embryonálneho vývoja človeka, resp. blanovcov (*Amniota*), začal používať termín „faryngeálny“.

Rozštiepenie prvého faryngeálneho oblúka na maxilárne a mandibulárne výbežky je do veľkej miery pod kontrolou signálneho proteínu Endothelin-1 (END-1)

(Clouthier et al., 2010). Endothelin-1 je secernovaný bunkami ektodermu, endodermu a paraxiálneho mezodermu oblúkov a viaže sa na svoj endothelin receptor typu A (EDNRA) na migrujúcich bunkách neurálnej lišty. Síce je EDN-1 exprimovaný vo všetkých faryngeálnych oblúkoch, najvýraznejší vplyv má EDN-1 na prvý faryngeálny oblúk. EDN-1 deficientné myši vykazujú transformáciu mandibuly na štruktúru podobnú maxile (Ozeki et al., 2004). Opačný prípad, konštitučná aktivácia EDNRA, zmení osud maxilárneho výbežku na mandibulárny (Sato et al., 2008).

Od 4. do 5. týždňa vývoja je frontonazálny výbežok dominantnou štruktúrou vyvíjajúcej sa tváre. S následným rastom maxilárnych a nazálnych výbežkov ustupuje frontonazálny výbežok z oblasti úst. V priebehu 6. a 7. týždňa pokračujú maxilárne výbežky vo zväčšovaní. Zároveň sa mediálne nazálne výbežky približujú k mediánnej rovine, až spolu zrastú (obr. 1.9C-D). Zrastá i brázda medzi mediálnym nazálnym a maxilárnym výbežkom. Vo výsledku je horná pera tvorená dvoma mediálnymi nazálnymi a dvoma maxilárnymi výbežkami. Zo spojenia mediálnych nazálnych výbežkov v mediánnej rovine vzniká intermaxiálny výbežok tváre, predstavujúci prekurzor pre **filtrum** (obr. 1.9E).





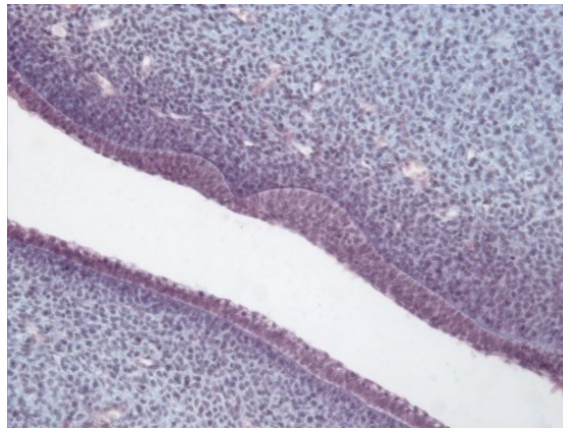
**Obrázok 1.9: Vývoj tvárovej oblasti človeka.** (A-B) V 6. týždni vývoja čuchové plakódy invaginujú, čím vznikajú čuchové jamky, mediálne a laterálne nazálne výbežky. (C-D) V 7. týždni vývoja mediálne nazálne výbežky zrastajú v mediálnej rovine a vzniká intermaxilárny výbežok. (E) Okolo 10 týždňa vývoja intermaxilárny výbežok vytvára filtrum. (Podľa Schoenwolf et al., 2009).

### 1.4.3 Vývoj vestibulum oris človeka

Podľa klasického modelu sa dočasný chrup vyvíja z kontinuálnej, podkovovitej dentálnej lišty. V literatúre sa ojedinele spomína ďalšia kontinuálna, podkovovitá epitelová štruktúra, ležiaca paralelne a externe (labiálne či bukálne) od dentálnej lišty, nazývaná **vestibulárna lišta**, *lamina vestibularis seu sulcus labiogingivalis*. Napriek tomu, že je vestibulárna lišta považovaná za vývojový základ *vestibulum oris*, mnohé z populárnych učebníc embryológie človeka (v súčasnosti už aj vývojovej biológie človeka) vôbec vývoj vestibula nespomínajú (Schoenwolf et al., 2009; Sadler, 2012; Carlson, 2014).

Vestibulárna lišta sa vyvíja medzi dentálnou lištou a budúcimi perami a lícami. Obidve lišty vznikajú na pôvodne samostatných mediálnych nazálnych a maxilárnych výbežkoch, ešte pred ich spojením. Spolu so splynutím tvárových výbežkov sa spája aj

ich dentálny a vestibulárny epitel (Hovorakova et al., 2005) (obr. 1.10). 3D rekonštrukcie vyvíjajúceho sa vestibula u zárodkov človeka ukázali, že oproti pôvodne predpokladanému modelu dvoch kontinuálnych líšt je skutočný stav omnoho komplexnejší (Hovorakova et al. 2005). Klasický model kontinuálnej podkovovitej vestibulárnej lišty je teda nesprávny.



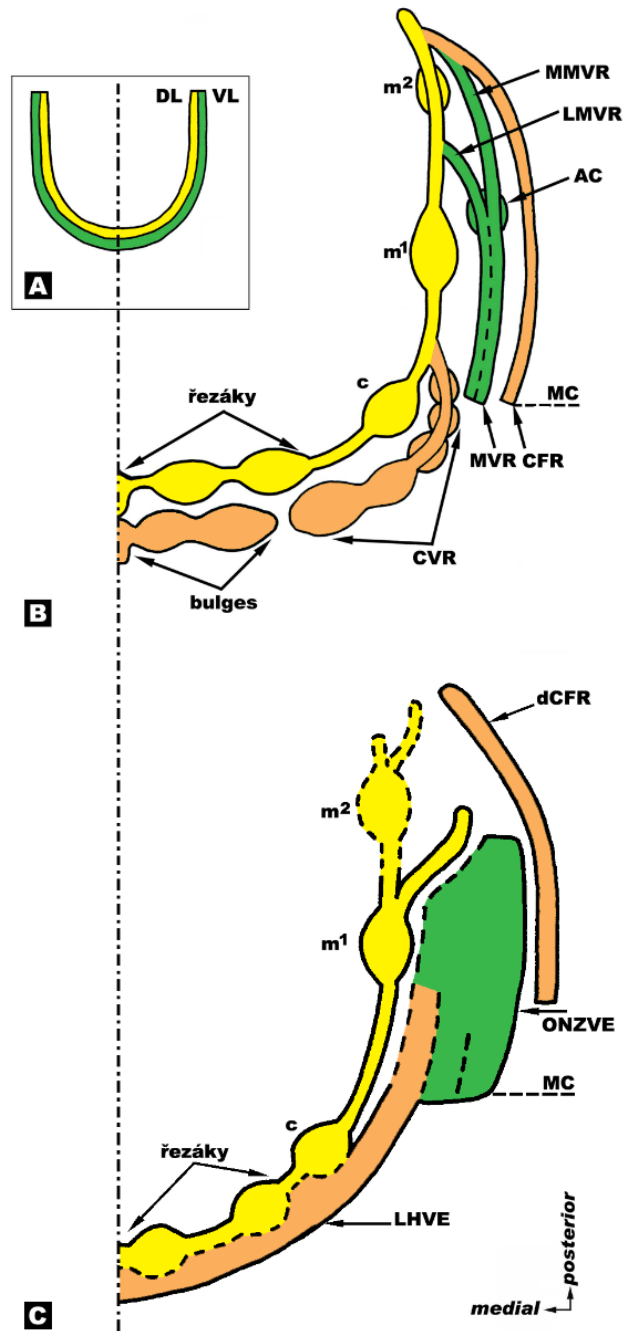
**Obrázok 1.10: Miesto kontaktu epitelov z maxilárneho a mediálneho nazálne výbežku.** Pri splývání tvárových výbežkov splýva aj ich dentálny a vestibulárny epitel. (Z archívu Dr. Hovořákovéj).

Dodnes existujú štyri modely ontogenetického vzťahu dentálnej a vestibulárnej lišty:

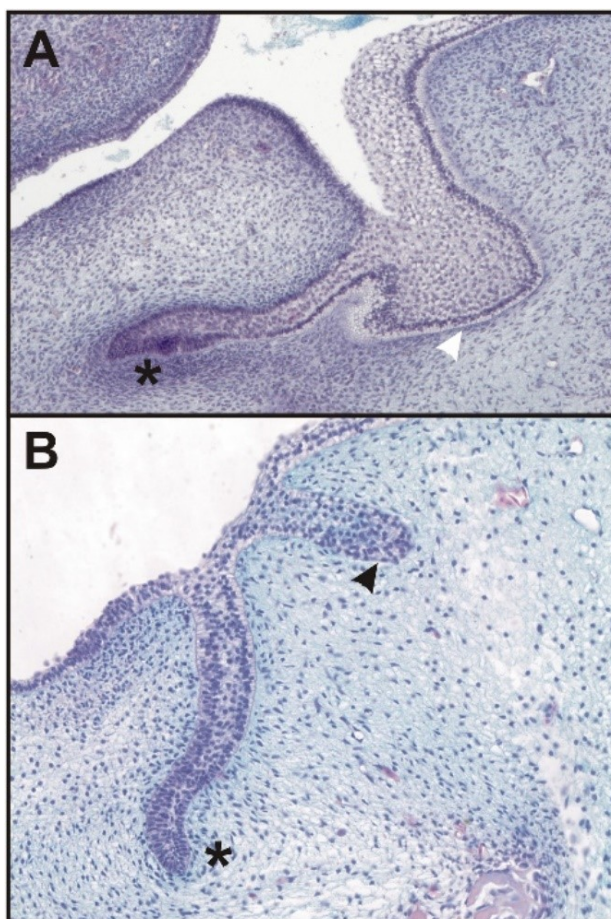
- I. Vestibulárna a dentálna lišta majú oddelený pôvod. Vestibulárna lišta sa zakladá neskôr a nezávisle od dentálnej lišty (Schour, 1929; Tonge, 1969).
- II. Vestibulárna a dentálna lišta majú spoločný pôvod. Pôvodný zhrubnutý epitel sa diferencuje na vonkajšiu vestibulárnu lištu a vnútornú dentálnu lištu (Röse, 1891; Bolk, 1924; Mjör and Fejerskov, 1986).
- III. V prednej časti zubného oblúka vznikajú vestibulárna a dentálna lišta z jedného spoločného epitelového zhrubnutia. V zadnej časti zubného oblúka vznikajú samostatne (Meyer, 1932; Radlanski, 1993).
- IV. Neexistuje súvislá vestibulárna lišta dávajúca vznik *vestibulum oris*. Vestibulárny epitel tvorí zhrubnutia a hrebene lokalizované externe od dentálneho valu. Vestibulárny a dentálny epitel sú regionalizované paralelne v mesio-distálnej osi (Hovorakova et al., 2005). Tento model je v súčasnosti najmodernejší.

V hornej čelusti vestibulárny a dentálny epitel opakovane splývajú v priebehu zubného vývoja, vyvíjajú sa však samostatne (obr. 1.11) (Hovorakova et al., 2005). V kontraste s hornou čelusťou, v dolnej čelusti sa na najranejších štádiách vývoja v oblasti rezáku diferencujú dve epitelové zhrubnutia (obr. 1.11). Z lingválnej strany každého epitelového zhrubnutia vznikajú budúce rezáky, zatiaľ čo labiálna strana sa diferencuje do vestibulárneho epitelu. V distálnej oblasti líc, za ústnym kútikom, sa dentálny a vestibulárny epitel zakladajú samostatne, tak ako v hornej čelusti. V pokročilejších fázach vývoja, časti vestibulárneho epitelu splývajú do tzv. labiálneho hrebeňa vestibulárneho epitelu, ktorý sa predlžuje distálne a dáva vznik vestibulu v oblasti dolnej pery (Hovorakova et al., 2007). V oboch čelustiach sa *vestibulum oris* vyvíja z rôznych základov v oblasti pier a v oblasti líc. Žiadny všeobecný plán, podľa ktorého sa vyvíja i dentálny i vestibulárny epitel, aj v hornej aj v dolnej čelusti, aj v oblasti pier, aj v oblasti líc, neexistuje.

Regionalizácia dentálneho a vestibulárneho epitelu pozdĺž mesio-distálnej osi a ich vzájomné interakcie sú nápadne podobné situácii u niektorých plazov (napr. varan mangrovový / *Varanus indicus*). Plazy nemajú pohyblivé pery, ani líca a ani predsieň dutiny ústnej. Namiesto toho sa v ústnej dutine objavujú externe od jednotlivých zubov malé žliazky, úlohou ktorých je zvlhčovať svojím sekrétom ústnu dutinu. Ku každému kónickému zubu zodpovedá jedna zubná žliazka, ktorá má vývojový pôvod v tzv. „tooth-gland lamina“ (Bolk, 1924). Porovnanie histologických rezov vestibulárneho epitelu človeka a tooth-gland lamina varana mangrovového odhaľuje prekvapivú podobnosť týchto štruktúr (obr. 1.12) (Hovorakova et al., 2016).



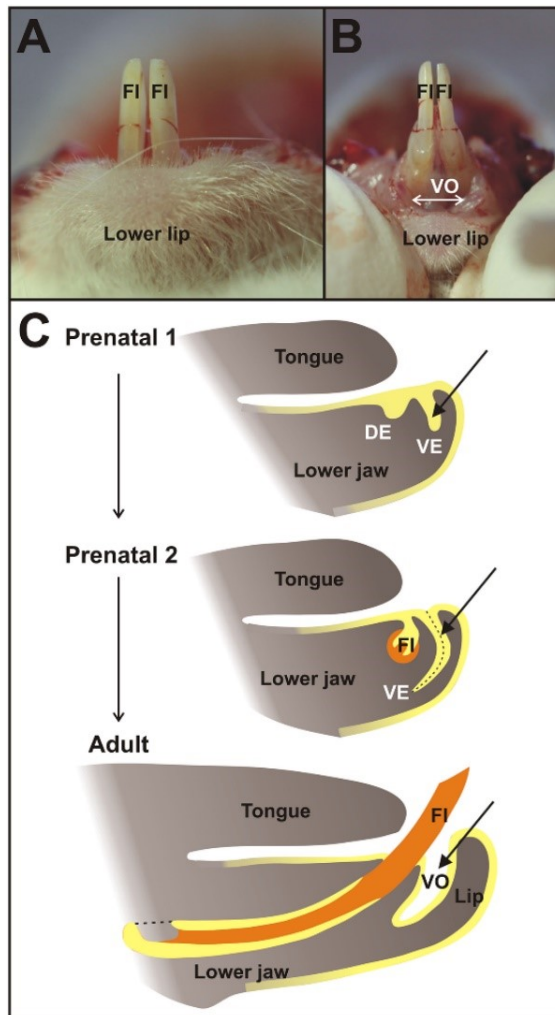
**Obrázok 1.11: Vývoj horného a dolného vestibulum oris človeka.** (A) Klasická predstava o vývoji dentície a *vestibulum oris* u človeka. *Vestibulum oris* pochádza z podkovovitej, kontinuálnej lišty (zelená), lokalizovanej paralelne a externe od dentálnej lišty (žltá), dávajúcej vznik zubným zárodkom. (B) V oblasti pier hornej čeľuste sa *vestibulum oris* vyvíja zo zhrubnutí epitelu („bulges“) v oblasti rezákov a vestibulárnej lišty očného zuba (CVR) (oranžová). V oblasti za ústnym kútikom hornej čeľuste sa *vestibulum oris* vyvíja z epitelu lícného žliabku (CFR) (oranžová). (C) V oblasti pier dolnej čeľuste sa *vestibulum oris* vyvíja z labiálneho hrebeňa vestibulárneho epitelu (LHVE) (oranžová), ktorý sa predlžuje distálne. V distálnej oblasti líc sa *vestibulum oris* vyvíja z epitelu lícného žliabku (dCFR) (oranžová). Žltou farbou je vyznačený dentálny epitel. AC – akcesórny pohárik, DL – dentálna lišta, LMVR – laterálny hrebeň vestibulárnej lišty stoličky, MC – ústny kútik, MMVR – mediálny hrebeň vestibulárnej lišty stoličky, MVR – vestibulárna lišta stoličky, ONZVE – oblasť nepravidelne zhrubnutého epitelu. VL – vestibulárna lišta. (Z archívu Dr. Hovořákovéj).



**Obrázok 1.12: Morfológická podobnosť vestibulárneho epitelu človeka a tooth-gland lamina u plaza.** (A) U ľudí pochádza *vestibulum oris* z epitelových štruktúr (biely hrot šípky), nachádzajúcich sa externe od dentálneho epitelu (hviezdička). Tieto epitelové štruktúry, dávajúce vznik *vestibulum oris*, sú regionalizované paralelne a externe od zubných zárodkov. (B) U niektorých plazov (znázornené na varanovi indickom), malé žliazky lokalizované externe od jednotlivých zubov pochádzajú z epitelovej tooth-gland lamina (čierny hrot šípky). (Podľa Hovorakova et al., 2016).

### Vývoj *vestibulum oris* myši

U myši má *vestibulum oris*, podobne ako v dolnej čelusti človeka, odlišný pôvod v proximálnej a distálnej oblasti. V proximálnej oblasti zubného oblúka vzniká *vestibulum oris* z tzv „lip-furrow band“ (nazývaný tiež vestibulárna lišta) (obr. 1.13). V distálnej oblasti zubného oblúka (oblasť líc) sa *vestibulum oris* diferencuje z tzv. „cheek-furrow ridge“ (v preklade „lícny žliabok“) (Peterkova, 1985).



**Obrázok 1.13: Vestibulum oris u myši.** (A) V dolnej čeľusti myši sa vestibulum oris (VO) v proximálnej časti zubného oblúka javí ako voľný priestor v ústnej dutine, labiálne ohraničený sliznicou pier a lingválne ohraničený sliznicou alveolov, ďasnami a zubami. (B, C) Vestibulum oris pochádza z vestibulárnej lišty (VE) priľahlej k dentálnemu epitelu (DE), predstavujúcej vývojový základ pre funkčné rezáky (FI). Funkčné rezáky sú tvorené epitelovým (žltá), ale i mezenchymálnym materiálom (oranžová). Samotná vestibulárna lišta dáva vznik epitelovej výstelke vestibulum oris v dolnej čeľusti dospeljej myši. (Podľa Hovorakova et al., 2016).

Gén *Shh* je považovaný za raný marker odontogenézy. *Shh* je vo vyvíjajúcej sa ústnej dutine obmedzený na odontogénne oblasti. V nedávnej štúdií poskytli Hovorakova et al. (2016) prvý experimentálny dôkaz o tom, že odontogénny epitel prispieva svojimi bunkami i do nedentálneho epitelu. Bol využitý Cre-loxP transgénny systém umožňujúci identifikovať všetky bunky exprimujúce gén *Shh*, a taktiež všetky bunky vznikajúce ich delením a delením ich potomkov (= *Shh* descendné bunky), pomocou modrého zafarbenia X-galovým farbením. V epitelovom základe vestibula sa gén *Shh* v priebehu vývoja neexprimuje, no nachádzajú sa v ňom modro sfarbené *Shh* descendné bunky (Hovorakova et al., 2016).

Varianta Cre-loxP transgénneho systému umožňuje sledovať descendентné bunky od určitého času, ktorý je daný intraperitoneálnou injekciou tamoxifénu. Tamoxifén indukuje v bunkách obsahujúcich Cre lokus rekombináciu. Bunky exprimujúce v danú chvíľu sledovaný gén a všetky bunky z nich pochádzajúce, je možné rovnako ako v predchádzajúcom systéme vizualizovať X-galovým farbením, pričom vzniká modro sfarbený komplex.

Použitím tamoxifénom indukovateľného Cre-loxP systému bolo dokázané, že *Shh* descendентné bunky v epitelovom základe *vestibulum oris* pochádzajú z včasnej odontogénnej domény externe od budúcich funkčných rezákov. Takýto výsledok naznačuje spoločný ontogenetický pôvod dentálneho epitelu a vnútornej vrstvy vestibulárnych buniek. Vonkajšia vrstva vestibulárnych buniek by mohla pochádzať z labiálnej sliznice (Hovorakova et al., 2016).

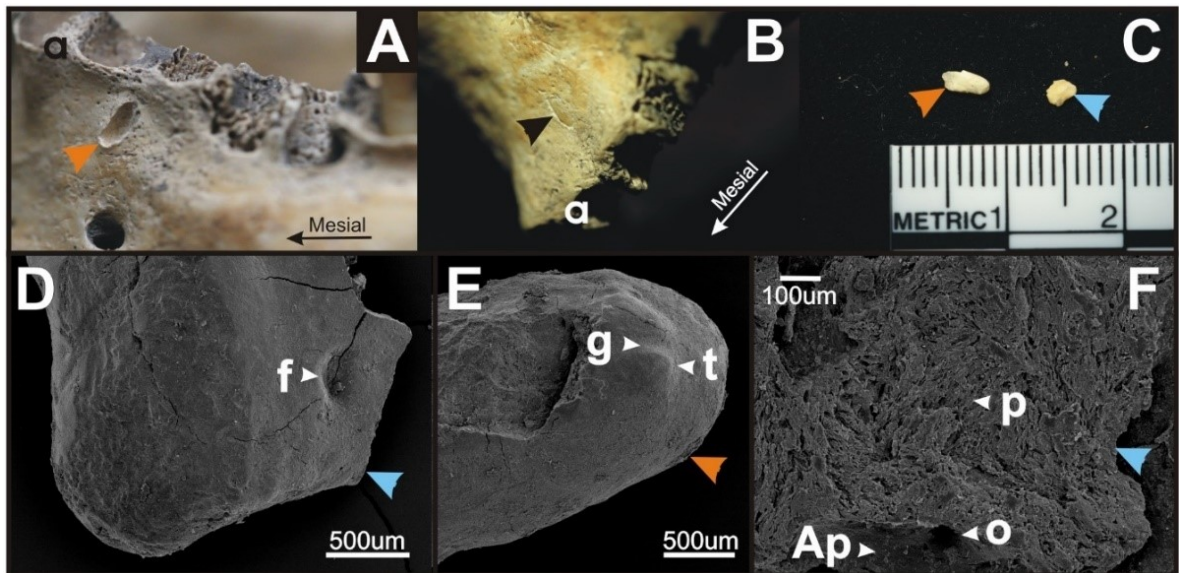
### **Vývojové dentálne patológie vo vestibulum oris človeka**

Vo *vestibulum oris* príležitostne dochádza k výskytu rôznych dentálnych patológií, akými sú napríklad periférne odontómy. Periférne odontómy, nezhubné nádory odontogénneho pôvodu, sú lokalizované v mäkkom tkanive externe od dentície, mimo kosti. Niektoré periférne odontómy si môžu zachovať stavbu podobnú zubom (Ide et al., 2000, 2008; Hanemann et al., 2013; Kwon et al., 2013). Vzácný prípad periférneho odontómu so zubovitými štruktúrami, ktoré sa prerezali cez ďasno do ústnej dutiny, publikovali Hanemann et al. (2013). Zúbky boli zložené zo skloviny, zuboviny, dreňovej dutiny a cementu v rovnakom usporiadaní, aké majú normálne zuby. Na rozdiel od normálnych zubov mali slabý úpon do tkaniva ďasien, čo sa klinicky prejavilo ich zvýšenou mobilitou. Boli ohraničené tenkou vrstvou epitelu a uložené v hustom kolagénovom väzive, čo ukazuje smerom k periférnemu pôvodu (Hanemann et al., 2013).

Vynára sa otázka, ako vznikajú dentálne anomálie v oblasti, kde dentálna lišta nie je prítomná. Vývojový pôvod odontómov zostáva stále záhadou. Ako možný zdroj boli popísané pretrvávajúce zvyšky odontogénneho epitelu (napr. Serresove zvyšky), ktoré si ponechávajú schopnosť epitelovo-mezenchymálnych interakcií (Silva et al., 2009; Kwon et al., 2013).

*Evc*<sup>4</sup>deficientné myši majú narušenú Sonic a Indian Hedgehog signalizáciu vo vývoji zubov a kostí. Za morfológické defekty u Ellis-van Creveldovho syndrómu by teda mohli byť zodpovedné poruchy Hedgehog signalizácie. Pacienti s Ellis-van Creveldovým syndrómom vykazujú tiež zmnôženie slizničných rias vo *vestibulum oris* (Hattab et al., 1998). Z tohto uhla pohľadu by mohol Ellis-van Creveldov syndróm potvrdzovať účasť *Shh* descendentných buniek na vývoji základu vestibula (Hovorakova et al., 2016).

Dentálne anomálie vo vestibulárnej oblasti boli objavené aj na historickom materiáli. Na pozostatkoch dolnej čeľusti, patriacej staršej žene z archeologického náleziska v obci Gáň na Slovensku, boli nájdené dve rudimentárne zubovité štruktúry (obr. 1.14 A-B). Rudimentárne zubovité štruktúry boli prítomné externe od zubného oblúka, ich poloha teda súhlasila s vymedzením vestibulárnej oblasti. Analýza na základe skenovacej elektrónovej mikroskopie následne potvrdila, že tieto štruktúry vykazujú znaky podobné zubom (obr. 1.14D-F). Povrch týchto rudimentárnych zúbkov pokrývala sklovina, aprizmatická ako aj prizmatická, s členitým povrchom (obr. 1.14D-F). Zúbky tiež obsahovali otvory, pravdepodobne pre nervy a cievy (obr. 1.14F).



**Obrázok 1.14: Zubovité štruktúry na historických lebkách potvrdzujú odontogénny potenciál vestibulárneho epitelu.** Počas záchranného archeologického výskumu v rokoch 2007 a 2008 na lokalite Gáň (okres Galanta, Slovensko, sťahovanie národov, 5.-6. storočie n. l.), boli nájdené tri rudimentárne zubovité štruktúry na lebke ženy, získanej z hrobu AH19. (A-F) Dve rudimentárne zubovité štruktúry sa nachádzali na dolnej čeľusti (A-B) externe od alveolov (a), jedna na povrchu kosti (oranžový hrot šípky, A, C, E) a druhá vnútri kosti (čierny hrot šípky, B). Tretí zúbok bol nájdený

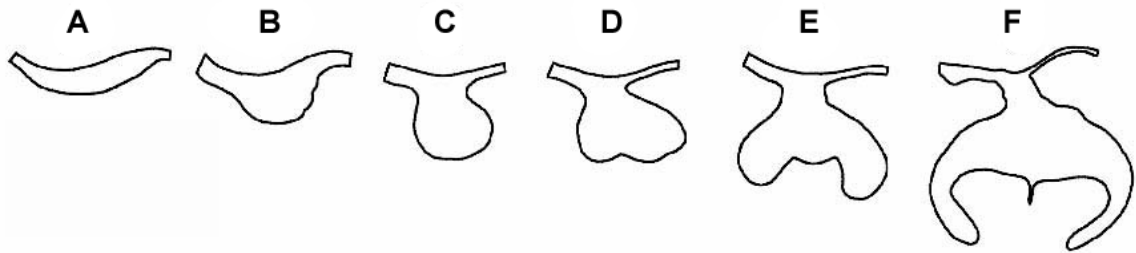
<sup>4</sup>Mutácie v géne *Evc* sú zodpovedné za vznik Ellis-van Creveldovho syndrómu.



voľne medzi fragmentami kostí (modrý hrot šípky, C, D, F). Analýza na základe skenovacej elektrónovej mikroskopie (D-F) ukázala aprizmatickú (Ap) a prizmatickú (p) sklovinu s členitým povrchom, ktorý tvorili hrbolčeky (t), jamky (f), žliabky (g). Taktiež boli detegované otvory (o), pravdepodobne pre nervy a cievy. (Podľa Hovorakova et al., 2016).

### 1.4.4 Vývoj zubov človeka

Vývoj zuba začína migráciou buniek neurálnej lišty do oblasti hornej a dolnej čeluste. V 6. týždni zárodočného vývoja bazálne bunky na niektorých miestach orálneho epitelu rapídne proliferujú. Mitotickou aktivitou bazálnych buniek orálneho epitelu vzniká epitelové **zhrubnutie (thickening)** (obr. 1.15A) , ktoré je prvým prejavom epitelovo-mezenchymálnych interakcií prebiehajúcej odontogenézy. Zhrubnutý orálny epitel následne invaginuje do mezenchýmu a vytvorí **lištu (lamina)** (obr. 1.15B). Každý zub má vlastný, jedinečný a časovo špecifický priebeh a morfológiu vývoja. Napriek tomu sú determinované všeobecné štádiá zubného vývoja spoločné pre celú dentíciu. V 8. týždni sa dentálny epitel u človeka zanára do mezenchýmu neurálnej lišty a začína z neho pučať 10 výbežkov, zvaných **pupene (buds)** (obr. 1.15C). Pupene predstavujú epitelovú zložku budúceho zuba. Pod proliferujúcim epitelom dochádza ku kondenzácii mezenchýmu a vytvoreniu kapilárnej siete. Induktívnym vplyvom dentálneho epitelu dochádza v 10. týždni vývoja k invaginácii kondenzovaného mezenchýmu do epitelu pupeňa a vzniká **pohárik (cap)** (obr. 1.15D-E). Pokročilý pohárik je tvorený vonkajšou vrstvou, vonkajší sklovinný epitel, vnútornou vrstvou, vnútorný sklovinný epitel a medzi nimi sa nachádza stredná, riedka, sieťovito usporiadaná vrstva - hviezdicové retikulum. Celá štruktúra nesie názov sklovinný orgán a vytvára budúcu sklovinu. Sklovinný orgán je ešte stále spojený s orálnym epitelom prostredníctvom nepravidelnej stopky, ktorá však onedlho zaniká. Na konkávnej ploche sklovinného orgánu je nakopný mezenchým, zvaný dentálna papila, ktorý predstavuje budúcu zubovinu a dreň. Obe štruktúry, sklovinný orgán a dentálnu papilu, obklopuje dentálny folikul, ktorý je základom fixačného aparátu zuba. Medzitým pučia z dentálneho epitelu pri bazálnej časti zubného zárodka malé divertikuly, tvoriace pupene trvalých zubov. V 14. týždni vývoja je dentálna papila hlboko zanorená do dentálnej lišty a tvorí jadro vyvíjajúceho sa zuba. Toto štádium sa nazýva **zvonček (bell)** (obr. 1.15F).



**Obrázok 1.15: Štádiá zubného vývoja.** (A) Štádium zhrubnutia/thickening, (B) štádium lišty/lamina, (C), štádium pupeňa/bud, (D-E), štádium pohárika/cap, (F) štádium zvončeka/bell. (Z archívu Dr. Hovořákovéj).

### 1.4.5 Molekulárna kontrola zubného vývoja

Zubný vývoj je závislý na sekvenčných a recipročných epitelovo-mezenchymálnych interakciách. Odontogénny potenciál predstavuje schopnosť jedného tkaniva indukovať expresiu génov v druhom príslušnom tkanive a iniciovať zubný vývoj. Odontogénna kompetencia predstavuje schopnosť tkaniva odpovedať na odontogénne signály a podporiť tvorbu zubov. Experimenty zamerané na rekombináciu medzi izolovaným dentálnym epitelom a mezenchymálnymi tkanivami ukázali, že počas včasného vývoja myšej stoličky zotrváva odontogénny potenciál v dentálnom epiteli a až neskôr sa presúva do mezenchýmu (Mina and Kollar, 1987; Lumsden, 1988). V štádiu pred vznikom pupeňa, pred a na embryonálnom dni (E) 11,5<sup>5</sup>, má dentálny epitel potenciál iniciovať vznik zubov pri kontakte s nedentálnym mezenchýmom. Odontogénne kompetentný je však výlučne mezenchým derivovaný z neurálnej lišty. Pri rekombinácii dentálneho epitelu s neneurálnym mezenchýmom, napríklad z končatiny, sa zuby nevytvoria (Lumsden, 1988). V štádiu včasného pupeňa (E12,5) sa odontogénny potenciál presúva do mezenchýmu, ktorý je schopný dať pokyn nedentálnemu epitelu k tvorbe zubovo-špecifických štruktúr (Kollar and Baird, 1970; Mina and Kollar, 1987; Lumsden, 1988). Odontogénny potenciál potom zostáva v mezenchymálnej papile a až do narodenia reguluje tvar zubu (Kollar and Baird, 1969, 1970; Yoshikawa and Kollar, 1981).

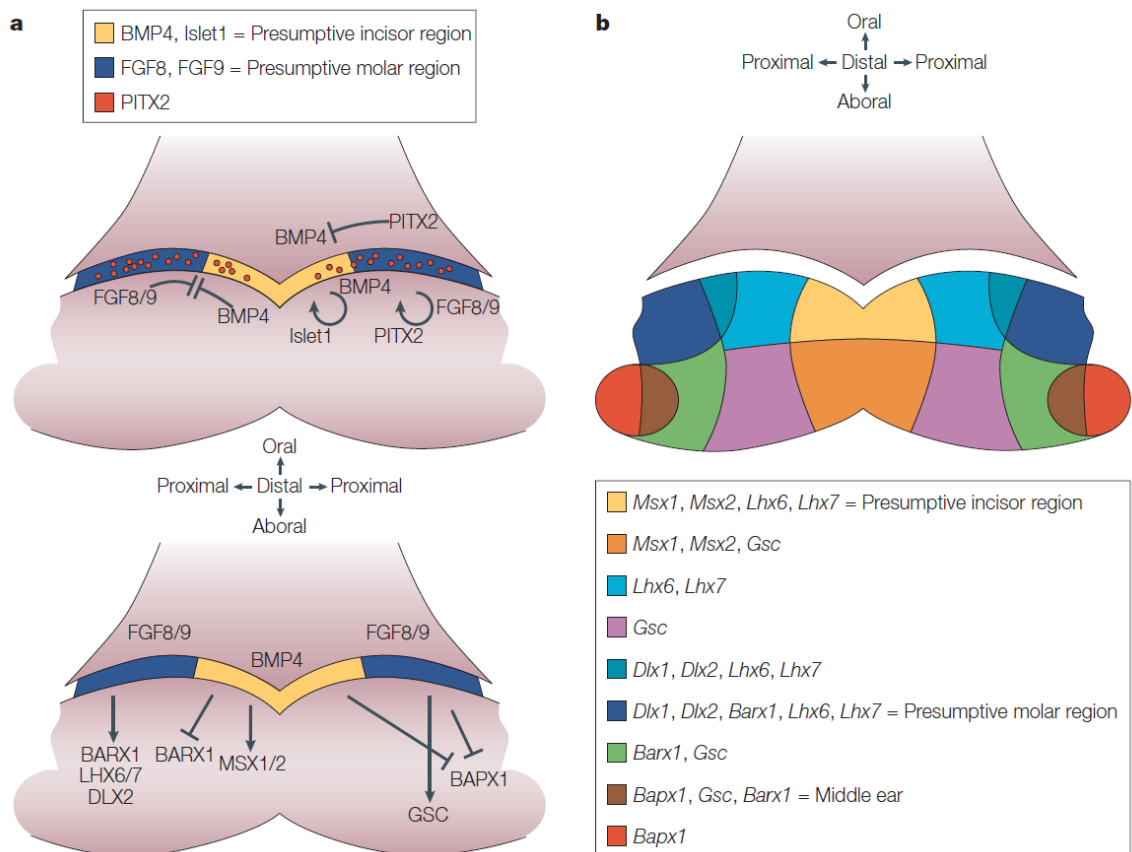
U myši migrujú bunky neurálnej lišty z oblasti mezencefala a rhombencefala do prvého faryngeálneho oblúka a dávajú vznik dentálnemu mezenchýmu približne okolo E8,5 (Zhang et al., 2003). Neskôr, okolo E10, dochádza k determinácii polohy a typov budúcich jednotlivých zubov. V priebehu výstavby faryngeálnych oblúkov

<sup>5</sup> Gravidita myši domácej trvá priemerne 21 dní.

produkuje endoderm hltnu morfogén SHH, čo má induktívny vplyv na expresiu génov *Fgf8* a *Bmp4* v epiteli prvého faryngeálneho oblúka (Haworth et al., 2007; Brito et al., 2008). Epitelom secerované signálne molekuly FGF8 a BMP4 indukujú expresiu génu *Pax9* v prezumpatívnom dentálnom mezenchýme a *Pitx2* v prezumpatívnom dentálnom epiteli. Za najvčasnejší transkripčný faktor exprimovaný v stomodeálnom epiteli sa považuje gén *Pitx2*. Spočiatku je expresia *Pitx2* detegovateľná v celom stomodeálnom epiteli a až neskôr sa obmedzuje na individuálne zárodky zubov (Mitsiadis et al., 1998; St.Amand et al., 2000). Tak ako expresia génu *Pitx2* špecifikuje epitelovú polohu budúcich zubov, tak expresia génu *Pax9* na E10 špecifikuje oblasti mezenchýmu, kde sa budú vyvíjať budúce zuby. Gény *Pitx2* a *Pax9* sa exprimujú pred akýmikoľvek morfológickými prejavmi odontogézy (Neubüser et al., 1997).

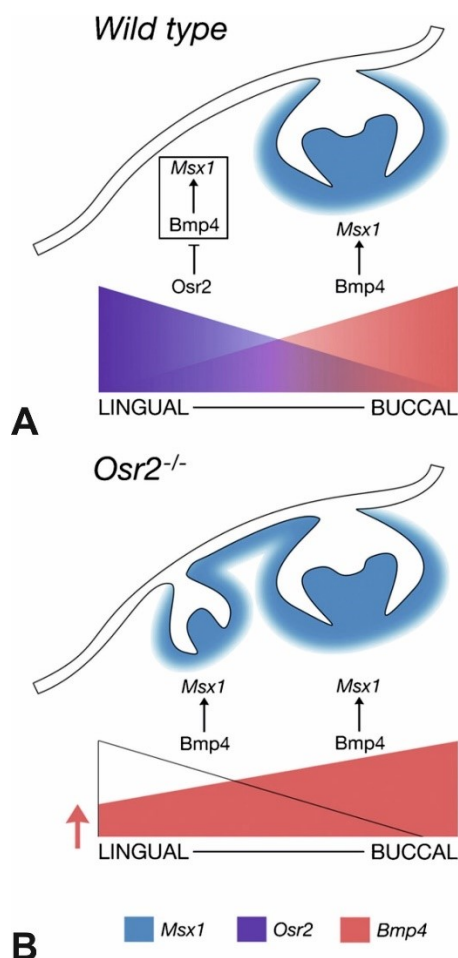
Po iniciácii odontogenézy, epitelom secerované FGF8 a BMP4 indukujú expresiu transkripčných faktorov, vrátane *Barx1*, *Dlx1*, *Dlx2*, *Msx1*, *Msx2*, *Pax9*, *Pitx1* a *Pitx2* (Neubüser et al., 1997; Bei and Maas, 1998; St.Amand et al., 2000) (obr. 1.16a). Expresia homeotických génov, napr. *Barx1*, *Dlx1*, *Dlx2*, *Lhx6*, *Lhx7*, *Msx1* a *Msx2* v mezenchýme viedla k navrhnutiu hypotézy „homeotického kódu odontogézy“ (Tissier-Seta et al., 1995; Qiu et al., 1997; Grigoriou et al., 1998). Homeotický kód odontogenézy je navrhovaný model odontogenézy, pri ktorom špecifické kombinácie expresie homeotických génov riadia tvorbu špecifických typov zubov (obr. 1.16b) (Sharpe, 1995).

Vzor expresie homeotických génov je definovaný pozitívnymi a negatívnymi signálmi z orálneho epitelu. Napríklad *Dlx1* a *Dlx2* deficientné myši majú zastavený vývoj maxilárnych stoličiek, ale vývoj ostatných zubov je normálny (Thomas et al., 1997). *Lhx6* a *Lhx7* deficientné myši vykazujú normálne rezáky a nadpočetné maxilárne zuby podobné rezákom, ktoré sú výsledkom zlyhania špecifikácie molárneho mezenchýmu (Denaxa et al., 2009).



**Obrázok 1.16: Vzor expresie génov vo vyvíjajúcich sa zubných zárodkoch.** (a) Signalizácia v rámci epitelu a medzi epitelom a mezenchýmom u embrya myši na E10,5. Schéma znázorňuje izolovanú dolnú čeľusť. Pozitívne autoregulačné slučky a vzájomná repesia v epitelu vedie k vzniku striktných hraníc génovej expresie, definujúcich prezumpatívne oblasti rezákov a stoličiek. Členovia BMP a FGF rodín proteínov v epitelu indukujú ale i inhibujú expresiu rôznych homeotických génov. To vyúsťuje do komplexného vzoru génovej expresie v mezenchýme, v proximo-distálnej, oro-aborálnej/ rostro-kaudálnej osi. (b) Homeotický kód odontogenézy. Expressia homeotických génov v dolnej čeľusti vytvára homeotický kód, definujúci typ zuba. (Podľa Tucker and Sharpe, 2004).

Epitelový *Bmp4* je pôvodne exprimovaný anteriórne, ešte pred akýmikol'vek známkami odontogenézy a indukuje expresiu *Msx1* v mezenchýme rezáku. Zároveň negatívne reguluje expresiu transkripčného faktora *Barx1* a obmedzuje ju na zárodoky stoličiek (Tissier-Seta et al., 1995; Tucker et al., 1998). *Barx1* teda špecifikuje stoličky, zatiaľ čo *Msx1* špecifikuje rezáky. Pri usporiadaní cicavčieho chrupu do jedného radu v buko-lingválnej osi je dôležitý transkripčný faktor typu zinkových prstov *Osr2* (odd skipped related transcription factor 2) (obr 1.17). *Osr2* je exprimovaný v lingvo-bukálnom gradiente a obmedzuje aktivitu proteínu MSX1 v oblasti jazyka. V absencii *Osr2* nie je MSX1 ničím obmedzovaný a indukuje v mezenchýme tvorbu nadpočetných zubov. V oblasti jazyka začnú nadpočetné zuby pučať priamo z orálneho epitelu (Zhang et al., 2009b).



**Obrázok 1.17: Regulácia počtu zubov v buko-lingválnej osi.** (A) U wild type myši je *Osr2* exprimovaný v lingvo-bukálnom gradiente naprieč osou čeluste a obmedzuje dráhu BMP4-MSX1 v lingválnej oblasti. (B) V absencii *Osr2* dráha BMP4-MSX1 aktivuje v mezenchýme lingválnej oblasti sekvenčnú indukciu zubov, pričom nadpočetné zuby pučia priamo z orálneho epitelu. Z toho vyplýva, že *Osr2* je dôležitý pri patterningu cicavcej dentície do jedného zubaradia. (Podľa Cobourne and Sharpe, 2010).

Okolo E11-11,5 sa v epitelových zhrubnutiach začínajú exprimovať gény *Fgf8*, *Fgf9*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*, *Shh*, *Wnt10a* a *Wnt10b* (Vainio et al., 1993; Heikinheimo et al., 1994; Bitgood and McMahon, 1995; Dassule and McMahon, 1998; Hardcastle et al., 1998; Kettunen and Thesleff, 1998; Zhang et al., 1999). Tieto epitelové signály predstavujú včasné markery odontogenézy a sú zodpovedné za indukciu génovej expresie v príslušnom mezenchýme, vrátane transkripčných faktorov *Msx1*, *Msx2*, *Runx2*, *Lef1*, *Dlx1*, *Dlx2*, *Egr1*, *Ptch*, *Gli1* a molekúl extracelulárnej matrix, ako syndecan-1 a tenascin (Vainio et al., 1993; Chen et al., 1996; Kratochwil et al., 1996; Bei and Maas, 1998; Dassule and McMahon, 1998; Zhang et al., 1999). V štádiu pupeňa dochádza v mezenchýme vplyvom epitelových signálov k indukcii expresie

génov kódujúcich niekoľko ďalších signálnych molekúl, vrátane *Fgf3*, *Fgf10*, *Activin*  $\beta$ -A, *Wnt5a*, ako aj samotného *Bmp4* (Vainio et al., 1993; Ferguson et al., 1998; Kettunen and Thesleff, 1998; Sarkar and Sharpe, 1999). S presunom expresie génu *Bmp4* z epitelu do mezenchýmu sa zároveň presúva i odontogénny potenciál.

Aktivita mezenchymálneho BMP4 udržiava expresiu génu *Shh*, ktorá je kritická pri prechode zuba z pupeňa do štádia pohárika (Zhang et al., 2000). Gén *Shh* sa exprimuje v epitelových zhrubnutiach už od prvých morfológických prejavov odontogenézy (Bitgood and McMahon, 1995). Vo včasných štádiách odontogenézy interaguje proteín WNT7b s SHH signálom a vymedzuje hranice medzi nedentálnym a dentálnym epitelom, čím určuje polohu vzniku budúcich zubov (Sarkar et al., 2000). *Wnt7b* je exprimovaný v orálnom epiteli, avšak mimo prezumpatívneho dentálneho epitelu. Ektopická expresia *Wnt7b* v oblasti prezumpatívneho dentálneho epitelu potláča expresiu *Shh* a následne inhibuje tvorbu zubného zárodka (Sarkar et al., 2000).

V dentálnom epiteli pôsobí proteín SHH ako silný mitogén, čím umožňuje invagináciu do priliehajúceho mezenchýmu a vznik pupeňa (Cobourne et al., 2001). V pokročilejších štádiách zubného vývoja sa gén *Shh* exprimuje v sklovinnom uzle, kde stimuluje proliferáciu v prilahlých tkanivách. V štádiu cytodiferenciácie zubných tkanív sa *Shh* génová expresia lokalizuje do vnútorného sklovinného epitelu a uchováva sa v diferencujúcej sa vrstve ameloblastov, pričom môže ovplyvňovať i prilahlé odontoblasty (Dassule et al., 2000).

Významný účinok na organogézu zubov majú transkripčné faktory. Napríklad mutácie v génoch *Lef1*, *Msx1* a *Runx2* vedú k zastaveniu zubného vývoja v štádiu pupeňa (Satokata and Maas, 1994; van Genderen et al., 1994; Kratochwil et al., 1996, 2002; D'Souza et al., 1999). V kontraste s *Msx1* sa strata *Msx2* prejaví až v pokročilejších štádiách vývoja (Maas et al., 2000). Gén *Msx1* je intenzívne exprimovaný v dentálnom mezenchýme, vrátane dentálnej papily a dentálneho folikulu v štádiách lišty, pupeňa, pohárika a zvončka. *Msx2* je koexprimovaný s *Msx1* v dentálnom mezenchýme, ale časť *Msx2* expresie sa presúva do dentálneho epitelu a je obmedzená na sklovinný uzol (Mackenzie et al., 1991; MacKenzie et al., 1992). Expresia *Msx1* je nevyhnutná pre indukciu expresie transkripčného faktora *Runx2*. *Runx2* je jeden z kľúčových faktorov podieľajúcich sa na indukcii expresie *Fgf3* v dentálnom mezenchýme, no zároveň je i regulovaný FGF signálmi z dentálneho

epitelu (D'Souza et al., 1999). *Runx2* je tiež kľúčový pre diferenciáciu osteoblastov a odontoblastov. Expresia génu *Runx2* sa prvýkrát objavuje v kondenzovanom mezenchýme v štádiu včasného pupeňa (E12) a pokračuje naprieč štádiom pohárika až do štádia včasného zvončeka (E16). V štádiu pohárika a pupeňa sa oblasti expresie génov *Msx1* a *Run2x* prekrývajú. Po štádiu zvončeka sa expresia *Runx2* presúva do dentálneho folikulu, oddeľujúceho zub od kosti, ktorá tiež exprimuje *Runx2* sa teda nezúčastňuje včasnej odontogenézy a iniciácie zubného vývoja, ale riadi pokročilú morfogénzu a histodiferenciáciu sklovinného orgánu (Åberg et al., 2004).

V štádiu pohárika (E14,5) sa vytvorí dočasný zhluk nedeliaciach sa epitelových buniek, ktoré podobne ako uzol počas gastrulácie, slúžia ako organizačné centrum. Tento zhluk epitelových buniek sa nazýva sklovinný uzol (EK, angl. enamel knot) a reguluje vznik zubných hrbolčekov. Počet sklovinných uzlov sa považuje za faktor určujúci počet hrbolčekov budúceho zuba (Vaahtokari et al., 1996). Zárodky rezákov majú iba jediný primárny EK (pEK), zatiaľ čo zárodky stoličiek vytvárajú ešte sekundárne sklovinné uzly (sEKs) (Kettunen and Thesleff, 1998). pEK stoličky zaniká apoptózou na konci štádia pohárika. Apoptózu v pEK indukuje BMP4, ktorý aktivuje proteín p21 (BMP4 pôsobí apoptoticky vo viacerých vyvíjajúcich sa systémoch) (Jernvall et al., 1998). V štádiu zvončeka (E16,5) sEKs prehýbajú vnútorný sklovinný epitel, čím vznikajú zubné hrbolčky. Sklovina a zubovina sa potom ukladajú na kontúry epitelu, čím definujú tvar zuba. Vnútri pEK sa exprimuje viacero signálnych molekúl, vrátane *Shh*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*, *Fgf3*, *Fgf4*, *Fgf9*, *Fgf20*, *Wnt3*, *Wnt6*, *Wnt10a*, *Wnt10b* a *Edar* (Vainio et al., 1993; Turecková et al., 1995; Neubüser et al., 1997; Dassule and McMahon, 1998; Sarkar and Sharpe, 1999; Jernvall and Thesleff, 2000; Laurikkala et al., 2001; Bei, 2009; Tummers and Thesleff, 2009; Jussila and Thesleff, 2012).

Na morfogénzu sklovinných uzlov má obzvlášť špecifický vplyv EDA signalizácia. Receptorový gén *Edar* je exprimovaný v pEK, no transkripty sú stále zjavné i potom, ako sa pEK vypne apoptózou. Za zmienku stojí, že v sEKs sa už expresia *Edar* neobjavuje. Odlišný vzor expresie vykazuje *Eda*, ktorá sa v oblasti pEK, resp. vnútorného sklovinného epitelu, neobjavuje vôbec. Bez ohľadu na to majú všetky myšie mutanty v genetických komponentoch EDA dráhy (*Eda*, *Edar*, *Edaradd*; resp. Tabby, Downless a Crinkled) abnormálny pEK a stoličky týchto mutantov nesú redukovaný počet hrbolčekov, navyše plytkých (Pispa et al., 1999; Tucker et al., 2000;

Headon et al., 2001; Laurikkala et al., 2001). Naopak, nadexpresia génov *Eda* a *Edar* vedie k vzniku nadpočetných hrbolčekov na stoličkách (Mustonen et al., 2003; Kangas et al., 2004; Tucker et al., 2004).

### 1.4.6 Vývoj dolného rezáku myši

Podobne ako je tomu u človeka, aj u myši má na niektorých miestach ústnej dutiny vestibulárna a dentálna lišta úzky vzťah. Vestibulárny epitel a základy funkčných rezákov sú v anteriórnej oblasti dolnej čeluste myši spojené epitelovými mostíkmi. Poloha epitelových mostíkov na labiálnej strane pupeňa funkčného rezáku korešponduje s oblasťou, kde sa v pokročilejších štádiách vývoja objavuje tzv. „rudimentárny rezák“ (zvaný aj prelakteálny, lakteálny, mliečny, dočasný) (Hovorakova et al., 2011).

Na rudimentárny rezák sa dá hľadiť ako na predstaviteľ'a dočasnej dentície, ktorá sa však u myši nevyvinie do funkčných zubov. U vývojovo pokročilejších embryí (E13,5) sa vývoj rudimentárneho rezáku zastaví a zaniká apoptózou (Hovorakova et al., 2011). Aj keď rudimentárny rezák neobsahuje žiadnu sklovinu a ani diferencovaný sklovinný orgán, bola popísaná schránka nepravidelného dentínu, obkolesená zopár diferencovanými odontoblastami (Fitzgerald, 1973). Podľa názoru Fitzgerald (1973) predstavuje táto rudimentárna štruktúra pozostatok ancestrálnej dentície, stále pretrvávajúcej u súčasných cicavcov. Fitzgerald (1973) prirovnal drobné rudimentárne rezáky myši k najranejšej (taktiež rudimentárnej) generácii zubov u plazov (Fitzgerald, 1973). Na podklade podobnej morfológie a polohy rudimentárnych rezákov myší a rudimentárnej dentície plazov navrhli Peterkova et al. (2002, 2006) klasifikovať vestigiálny rezák myši nie ako lakteálny, ale ako element prelakteálnej dentície, zatiaľ čo funkčný rezák zodpovedá mliečnej generácii zubov. Prelakteálne zuby boli popísané aj u iných druhov cicavcov, vrátane človeka, ako drobné rudimentárne zúbky, lokalizované labiálne či bukálne od funkčných lakteálnych zubov (Röse, 1891; Leche, 1893; Adloff, 1909; Moss-Salentijn, 1978).

Epitelové mostíky by mohli odrážať kompozitný pôvod dolného funkčného rezáku. Dolný funkčný rezák sa vyvíja lingválne od vestibulárneho epitelu a troch epitelových mostíkov. Epitelové mostíky predstavujú pučiace podjednotky



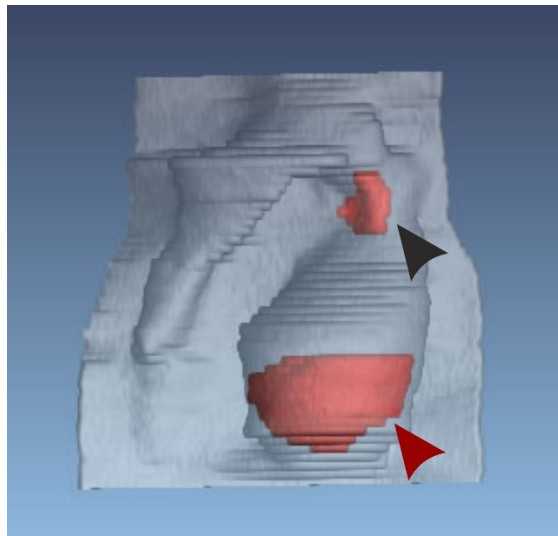
dentálneho epitelu, majúce potenciál vytvoriť niekoľko malých, rudimentárnych zúbkov. Počas vývoja by mohli epitelové mostíky splývať a dávať vznik jednému kompozitnému rudimentárnemu rezáku (Hovorakova et al., 2011). Výsledky experimentálnych štúdií tejto hypotéze neodporujú. Bolo dokumentované, že pri *in vitro* inhibícii BMP signalizácie dochádza k dezintegrácii transkripčnej domény funkčného rezáku na tri malé domény a funkčný hľadák nahradia tri menšie zúbky (Munne et al., 2010). Je však otázne, či naozaj došlo k dezintegrácii domény, alebo iba k revitalizácii rudimentov (Hovorakova et al., 2011). K podobnému výsledku dospeli Li et al. (2016) na zárodku rezáku pieskomila. Po explantácii zárodku rezáku a minimalizácii okolitého mezenchýmu sa vyvinie trojitý alebo dvojitý rezák, poprípade rezák podobný rezáku dvojitozubcov (*Lagomorpha*) (Li et al., 2016).

Až donedávna sa myslelo, že vo včasnom vývoji mandibuly sa objavuje v oblasti rezáku iba jedna oblasť expresie génu *Shh*, zodpovedajúca miestu vzniku funkčného rezáku. Kombináciou tradičných morfológických a molekulárnych metód sa však ukázalo, že v oblasti rezáku sa objavujú dve pozične i časovo odlišné zóny expresie *Shh*, usporiadané za sebou pozdĺž antero-posteriórnej osi (obr. 1.18) (Hovorakova et al., 2011).

V anteriórnej oblasti mandibuly myši sa veľmi včasne (E11) objavuje krátky lineárny pásik expresie *Shh*, ktorý sa postupne rozpína laterodistálne (Dassule and McMahon, 1998). Od E12 sa expresia *Shh* sústreďuje v zhrubnutých oblastiach orálneho epitelu, zvaných i plakódy. V texte vyššie bola zmienená dezintegrácia transkripčnej domény, v zmysle signálneho centra rezáku, pri inhibícii BMP signalizácie, kedy výsledkom bol vznik troch zubných štruktúr namiesto základu rezáku. K rozpadu pôvodnej zóny expresie *Shh* (domény) vo vývoji myšieho rezáku však dochádza i za fyziologických podmienok, teda nielen pri vzniku nadpočetných zúbkov. U embryí na E13 sa pôvodná doména expresie *Shh* rozpadne na dve vedľa seba ležiace zóny *Shh* expresie. Novovzniknuté domény *Shh* expresie zodpovedajú umiestneniu epitelových mostíkov medzi vestibulárnym epitelom a budúcimi funkčnými rezákmi. U starších embryí toho istého vývojového štádia (E13) zóny expresie *Shh* opäť splývajú do jedného signálneho centra. Na vývojovo pokročilejších embryách (E13,5) sa intenzita tejto anteriórnej expresie *Shh* postupne znižuje, až nakoniec vymizne úplne. Zároveň sa posteriórne objavuje nová doména *Shh*-pozitívnych buniek. Táto posteriórna doména *Shh* expresie zodpovedá zárodku

dolného funkčného rezáku a predchádza sklovinnému uzlu (Hovorakova et al., 2011), ktorý sa prechodne objavuje na E14 a predstavuje vlastné signálne riadiace centrum rezáku (Kieffer et al., 1999).

Pôvodná doména expresie *Shh* v epitelových mostíkoch zodpovedá rudimentárnemu rezáku. Už Nakatomi et al. (2010) ukázali, že *Shh* pozitívne bunky je možné nájsť i v epiteli oddeľujúcom základ funkčného rezáku od vestibulárneho epitelu. Funkcia tejto anteriórnej domény expresie *Shh* zatiaľ zostáva nejasná. Expresia génu *Shh* v epitelových mostíkoch môže mať funkciu pri determinácii polohy funkčného dolného rezáku myši (Hovorakova et al., 2011). Príkladom môžu byť najranejšie generácie rudimentárnych plazích a žraločích zubov, ktoré by mohli byť zapojené do determinácie polohy radovo usporiadaných zubov (Smith, 2003).



**Obrázok 1.18: 3D rekonštrukcia zárodka dolného rezáku myši, zobrazujúca dve domény expresie *Shh* génu.** Na E13,5 je prechodne možné detegovať ko-expressiu dvoch *Shh* exprimujúcich domén. Anteriórna doména expresie *Shh* génu (čierny hrot šípky) je lokalizovaná v oblasti epitelových mostíkov, ktoré prepojujú vestibulárny epitel so zubným zárodokom. Posteriórna doména expresie *Shh* génu (červený hrot šípky) je lokalizovaná na vrchole pupeňa rezáku. Táto posteriórna doména *Shh* expresie zodpovedá centru zárodku dolného funkčného rezáku a predchádza sklovinnému uzlu, ktorý sa prechodne zjavuje na E14 a predstavuje vlastné signálne riadiace centrum rezáku. (Z archívu Dr. Hovořákovéj).

## 1.5 Sieť esenciálnych génov odontogenézy

Pri bližšom pohľade na gény zapojené do odontogenézy odhalíme sadu génov spoločnú pre väčšinu stavovcov, od kostnatých (*Teleostei*) až po štvornožce (*Tetrapoda*). Gény, ktorých vzor expresie je zdieľaný medzi stavovcami, spolu vymedzujú sieť esenciálnych génov odontogenézy – „core dental network“ (sieť

v zmysle koordinovanej expresie). Sieť esenciálnych génov bola exprimovaná v úplne prvom zube, ktorý kedy vytvorila príroda, a následne vo všetkých jeho evolučných potomkoch, nezávisle od ich polohy v tráviacom systéme. Sieť esenciálnych génov reprezentuje konzervovanú skupinu molekúl, ktoré v priebehu zubného vývoja poskytujú molekulárnu mašinériu nepostrádateľnú pre správny vývoj zubov. Príroda pravdepodobne nikdy nevytvorila zub bez účasti týchto génov (Fraser et al., 2009). Génovú reguláciu zdieľajú medzi sebou orálne i faryngeálne zuby, teda sieť je nezávislá na polohe zubu v tráviacom systéme, resp. na príslušnosti buniek k zárodočnému listu (ektoderm/endoderm). Za zmienku stojí, že členovia sady esenciálnych génov sú starší ako samotné zuby, resp. stavovce, a sú koexprimovaní aj pri vývoji iných ektodermálnych orgánov, akými sú šupiny, perie a chlpy (Thesleff et al., 1995; Harris et al., 2002; Laurikkala et al., 2002; Pispá and Thesleff, 2003; Mustonen et al., 2004; Sire and Akimenko, 2004; Houghton et al., 2005; Lin et al., 2006; Pummila et al., 2007). Medzi nepostrádateľné odontogenetické gény patria rané markery epitelovej odontogenézy *Shh*, *Pitx2*, *Bmp2*, *Edar*, a čiastočne aj *Bmp4*, *Dlx2* a *Eda*. V mezenchýme sú nepostrádateľnými génmi *Bmp2*, *Bmp4*, *Dlx2*, *Runx2* a *Eda*. Zapojenie *Eda* do odontogenézy sa však naprieč stavovcami líši – u kostnatých sa exprimuje v mezenchýme, u cicavcov sa jedná o epitelový signál. Napriek tomu je úloha génu *Eda* v odontogenéze potenciálne zhodná (Fraser et al., 2008).

## 1.6 Úloha *Eda* génu vo vývoji orgánov

Predložená práca sa zameriava na dvoch členov siete esenciálnych génov odontogenézy („core dental network“), a to *Shh* a *Eda*. Tieto dva gény boli vybrané, pretože sa zdajú byť nepostrádateľnými pre správny vývoj zubného zárodka. V absencii SHH signalizácie sa zubný vývoj zastaví v štádiu lišty (Cobourne et al., 2001). Signál EDA môže byť nevyhnutný pre udržanie aktivity alebo expanziu signálnych centier. Nadexpresia *Eda* v orálnom epiteli v priebehu včasného vývoja zuba zachráni tretie stoličky, ktoré často u Tabby myší chýbajú (Srivastava et al., 2001). Nadexpresia *Eda* v orálnom epiteli môže vyústiť i do opaku, teda do tvorby nadpočetných zúbkov v oblasti anteriórne od prvej stoličky (Mustonen et al., 2003). Podobný účinok má i nadexpresia konštitučného TNF receptora v orálnom epiteli, pri ktorej príležitostne chýba tretí molár a objavuje sa nadpočetný zúbok anteriórne od

prvej stoličky (Tucker et al., 2004). Zároveň so vznikom nadpočetných zúbkov sa v oblasti diastémy zjavuje aj *Shh*-pozitívna doména. Je možné, že nadexprimovaná *Eda* vlastne udržiava aktivitu tejto odontogénnej domény, čo následne vedie k vzniku rudimentárneho zúbku (Mustonen et al., 2004). Niečo podobné je možné zhladať u malawských cichlíd, kde sa *Eda* gén exprimuje v mezenchýme medzizubných priestorov, zatiaľ čo v interdentálnom epiteli sa nachádza expresia génu *Wnt7b*. Tento vzor expresie pravdepodobne reguluje polohu *Shh*-pozitívnych odonténnych domén, predstavujúcich miesta vzniku budúcich funkčných zubov (Fraser et al., 2009).

Širší pohľad na úlohu *Eda* génu počas odontogenézy poskytuje zárodočný vývoj zebričiek. Zebrička disponuje zubami iba na horných faryngeálnych čelustiach, na dolných faryngeálnych čelustiach a v ústnej dutine zuby v priebehu evolúcie vymizli. Za stratu zubov v ústnej dutine by mohla byť zodpovedná regionálna absencia *Eda* génu. Nadexpresia *Eda* génu je schopná obnoviť zuby na hornej faryngeálnej čelusti, avšak nie v ústnej dutine. Strata chrupu v ústnej dutine je teda pravdepodobne výsledkom mutácii vo viacerých signálnych dráhach. Z toho vyplýva, že u zebričky je *Eda* gén vo vývoji dentície nepostrádateľný a komplementárny k iným signálnym dráham zapojených do odontogenézy (Aigler et al., 2014).

EDA signalizácia reguluje expresiu génov vnútri viacerých signálnych centier, vrátane *Wnt10a/b*, *Fgf20*, *Shh* (Pummila et al., 2007; Zhang et al., 2009a; Voutilainen et al., 2012; Huh et al., 2013). Indukcia génu *Eda* je pod reguláciou WNT signalizácie. Mezenchymálny signál Activin  $\beta$ -A indukuje expresiu receptorového génu *Edar*, čím sa bunky stávajú rezpozívne na WNT indukovaný EDA signál (Laurikkala et al., 2001, 2002b). Signalizácia EDA vytvára slučku a spätne reguluje aktivitu *Wnt* génov. V pupeňoch vlasových folikulov a mliečnej žlazy signál EDA upreguluje gény *Wnt10a* a *Wnt10b* (Zhang et al., 2009a; Voutilainen et al., 2012). Mutácie v géne *Wnt10a* môžu byť zodpovedné za izolovanú zubnú agenézu, podobne ako je tomu u génu *Eda*. Z uvedeného vyplýva, že EDA signalizácia je hypoteticky nepostrádateľná pre udržanie signálnej aktivity WNT (van den Boogaard et al., 2012; Arte et al., 2013).

Signalizácia EDA je spájaná nielen s WNT signálnou dráhou, ale aj s SHH a BMP signálnymi dráhami. Signál EDA suprimuje BMP signál v plakódach prostredníctvom upregulácie inhibítorov BMP signálnej dráhy. Strata primárnych vlasových plakód u *Eda* mutantných myší je aspoň čiastočne spôsobená neefektívnou inhibíciou aktivity BMP proteínov (Pummila et al., 2007). NF- $\kappa$ B signalizácia je nevyhnutná pri indukcii

SHH vo vlasových plakódach a teda pre ich následnú invagináciu (Schmidt-Ullrich et al., 2006). Signálna aktivita WNT z mezenchýmu je nevyhnutná pri špecifikácii taktilných vlasových diskov („touch domes“) v blízkosti primárnych vlasových plakód. Signálna aktivita WNT indukuje EDA signalizáciu v primárnej vlasovej plakóde. Signál EDA v primárnej vlasovej plakóde dodatočne aktivuje expresiu *Shh*. SHH cieľi na extrafolikulárne progenitory Merkelových buniek v taktilných vlasových diskoch. V adultnej pokožke reguluje sebaobnovu, ale nie diferenciáciu, kmeňových buniek taktilných vlasových diskov (Xiao et al., 2016). Molekulárne mechanizmy zúčastňujúce sa včasného vývoja sú do veľkej miery rovnaké u odlišných orgánov (Pispa and Thesleff, 2003; Mikkola and Millar, 2006). V zubnom vývoji indukuje signálna aktivita EDA expresiu génu *Shh*, ktorého produkt má stimulačný účinok na proliferáciu epitelu v pupeni (Pummila et al., 2007). Preto sa zdá byť možné, že v odlišných orgánoch indukuje EDA signalizácia rovnaké gény. Vo vyvíjajúcich sa zuboch a mliečnej žľaze môžu byť gény s podobnými funkciami indukované odlišnými signálnymi dráhami, zatiaľ čo primárne vlasové plakódy takouto redundanciou neovplyvujú, čo by vysvetľovalo špecifický fenotyp *Eda* mutantných myší. Vyradenie funkcie SHH a folistatínu (inhibítora BMP dráhy) vedie k zmenšeniu zubov a počtu zubných hrbolčekov, avšak nie k úplnej strate zubných zárodokov (Dassule et al., 2000; Wang et al., 2004).

Typicky sa neuvažuje o tom, že by sa úloha NF- $\kappa$ B dráhy vo vývoji a zápale nejako prekrývala. Upregulácia chemokínov v koži vystavenej účinku EDA proteínu odhaľuje potenciálny súvis týchto dvoch zdanlivo nesúvisiacich dejov. Dva chemokíny, CXCL10 a CXCL11 sú špecificky exprimované vo vlasových plakódach a sú potvrdené ako transkripčné ciele EDA/NF- $\kappa$ B (Lefebvre et al., 2012). Myši, ktorým chýba CXCR3 receptor, taktiež exprimovaný v epitelových plakódach, majú mierne znížený počet vlasových plakód (Lefebvre et al., 2012). Mechanizmy, ktorými CXC-chemokíny regulujú vývoj vlasov nie je objasnený, ale môže zahŕňať motilitu buniek. Viacero štúdií zdôraznilo trio CXCL10-CXCL11-CXCR3 ako regulátora migrácie keratinocytov a hojenia rán (Yates et al., 2009; Kroeze et al., 2012). Deficiencia v receptore CXCR3 narúša reepitelizáciu hlbokých rán a CXCR3 dráha predstavuje hlavný faktor zodpovedný za epitelovú migráciu a mezenchymálnu inváziu u karcinómu prsníka (Yates et al., 2009; Shin et al., 2010). Úlohu EDA/NF- $\kappa$ B dráhy v migrácii buniek implikujú i ďalšie štúdie. U *alf* mutantov japonskej medaky

chýba funkčný EDA proteín. Vo vyvíjajúcich sa plutvách nedochádza k migrácii epitelových a osteoprogenitorových buniek, takže bunky zostávajú na proximálnych koncoch končatín. Tým je zastavená elongácia plutiev, čoho dôsledkom je rudimentárny vzhľad všetkých plutiev *afl* mutantov (Iida et al., 2014). Vo vyvíjajúcich sa vlasových folikuloch myši dáva EDA proteín pokyny priláhlému mezenchýmu k upregulácii parakrinných faktorov, ako napr. FGF20. Rastový faktor FGF20 je nepostrádateľný pri zhlukovaní buniek a vytvorení mezenchymálneho kondenzátu (Huh et al., 2013).

## 2 Ciele práce

---

V predloženej práci bola sledovaná expresia SHH a EDA proteínov, ako produktov expresie odontogénnych markerov *Shh* a *Eda* génov, vo vyvíjajúcich sa epitelových štruktúrach v oblasti rostrálnej oblasti mandibuly myši. V rostrálnej oblasti mandibuly myšieho embrya sa nachádza predovšetkým zárodok budúceho dolného rezáku a základ *vestibulum oris*. Zubný zárodok je anteriórne prepojený s vestibulárnym epitelom oblasťou vyplnenou epitelovými mostíkmi. V oblasti epitelových mostíkov, anteriórne od budúceho funkčného rezáku, sa nachádza bunková populácia exprimujúca gén *Shh* ešte predtým, než sa *Shh* transkripčná doména objavuje na vrchole zárodku funkčného rezáku v jeho signálnom centre (Hovorakova et al., 2011). Bunková populácia anteriórne od budúceho funkčného rezáku by teda mohla exprimovať i ďalšie molekulárne markery zubného vývoja, ktoré majú úlohu pri determinácii odontogénnych zón. Proteíny SHH a EDA boli zvolené z toho dôvodu, že ich expresia je včasným markerom odontogenézy a je pravdepodobné, že pre vznik zuba sú absolútne nepodstrádateľnými.

Boli stanovené nasledujúce ciele:

- I. Určiť rozdiely, prípadne podobnosti, v časopriestorovej distribúcii proteínov SHH a EDA vo vyvíjajúcich sa epitelových štruktúrach (základy funkčných rezákov a štruktúry externe od nich) rostrálnej oblasti mandibuly myši.
- II. Vo vzťahu k zistenému vzoru expresie sledovaných produktov odontogénnych markerov sa pokúsiť determinovať úlohu bunkovej populácie anteriórne od budúceho funkčného rezáku.

## 3 Materiál a metódy

---

### 3.1 Laboratórne myši

Na získanie výsledkov v predloženej práci bol použitý kmeň myší CD1, čo je outbredný kmeň vyvinutý v inštitúte pre výskum rakoviny (Institute of Cancer Research) v roku 1948. Tento kmeň produkuje obzvlášť vysoké množstvo potomkov, a preto je dobrým univerzálnym modelom. Chovné páry boli zakúpené z Charles River (Germany), použité samice pochádzali z vlastného chovu ÚEM.

### 3.2 Pripúšťanie myší a odber embryonálneho materiálu

Samice CD1 boli pripúšťané cez noc a ráno im boli odčítané vaginálne zátky. Ak bola ráno prítomná vaginálna zátka, bola myš považovaná za gravidnú a poľudnie toho istého dňa bolo považované za E0,5.

Samice v požadovanom štádiu gravidity boli usmrtené cervikálnou dislokáciou. Embryá boli odoberané na E12,5; 12,7; 13,5; 14,5; 15,5 a 16,5. Z peritoneálnej dutiny bola vypreparovaná maternica. Jednotlivé embryá boli postupne zbavované plodových obalov. Po vyňatí z plodového vaku boli embryá osušené od amniovej tekutiny poklepaním o petriho misku. Embryá boli zvážené na digitálnych váhach s presnosťou na jeden mikrogram (obr. 3.1). Ďalej boli embryá roztriedené do vývojových štádií vzhľadom k chronologickému veku (odpovedajúcemu embryonálnemu dňu vývoja) v kombinácii s telesnou hmotnosťou s cieľom vytvoriť longitudinálnu vývojovú radu. Následne bolo každé embryo spracované samostatne.

### 3.3 Príprava parafínových rezov

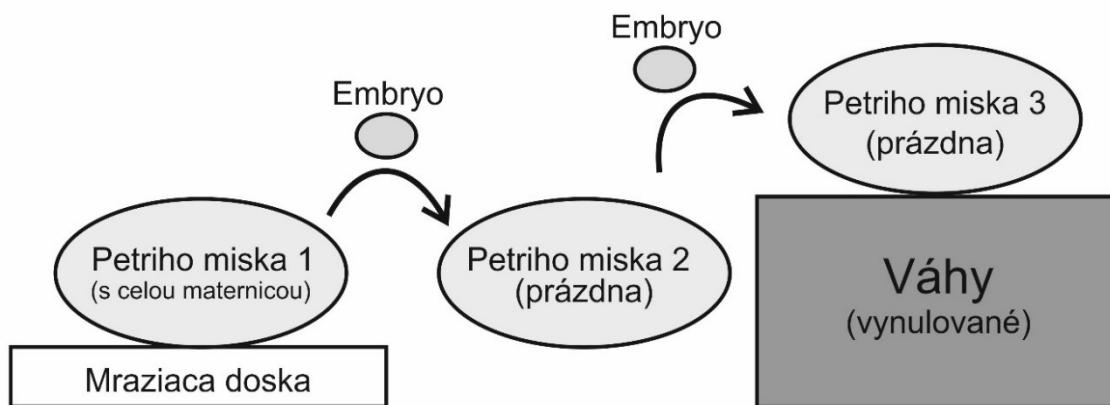
Pre imunohistochemickú analýzu tkanivových rezov boli vzorky zaliate do parafínu. Oddelené hlavičky embryí boli cez noc fixované v 4 % roztoku paraformaldehydu v PBS a uchované pri 4 °C. Po fixácii boli odvodnené vo vzostupnej rade metanolu (25 %, 50 %, 75 % a 100 %). Takto odvodnené vzorky je možné skladovať dlhobo pri -20 °C. Následne sa pokračovalo v odvodňovaní cez



izopropylalkohol. Cez medzistupeň v xyléne boli nakoniec odvodnené vzorky vložené na presýtenie do parafínu (protokol vid' nižšie). Teplota topenia prvého parafínu bola 54 °C. Ďalšie parafíny už mali teplotu topenia 58 °C a v poslednom parafíne s touto teplotou topenia zostávali vzorky uložené cez noc. Na druhý deň boli vzorky naorientované a ponechané pri izbovej teplote, aby ztuhli. Správna predozadná orientácia predstavuje jeden z najdôležitejších krokov pri histologickom spracovaní tkanív. Hlavičky boli orientované tak, aby báza lebky zvierala s dnom formičky mierne ostrý uhol, resp. tak, aby sa rostrálny koniec hlavy nedotýkal dna formičky. Vzorky boli frontálne nakrájané na rotačnom mikrotóme (Leitz, Nemecko) na tkanivové rezy s hrúbkou 8 µm. Rezy boli prenesené na vodný kúpeľ s teplotou 50 °C, kde sa mohli napínať. Keď bolo tkanivo dostatočne napnuté, rezy boli nabrané na superfrostové podložné sklá. Po tomto kroku sa jednotlivé sklá mohli premiestniť do termostatu, kde pri teplote 37 °C zaschli.

### **Zalievanie – protokol**

1. PBS.....5 min
2. Metanol 25 %.....5 min
3. Metanol 50 %.....5 min
4. Metanol 75 %.....5 min
5. Metanol 100 %.....5 min – alebo možnosť skladovať vzorku pri -20 °C
6. Metanol 100 %.....30 min
7. Izopropylalkohol.....3x 45 min
8. Xylén.....3x 30 min
9. Parafín 1A.....1 h
10. Parafín 1B.....1 h
11. Parafín 2.....1 h
12. Parafín 3.....1 h
13. Parafín 4.....cez noc



**Obrázok 3.1: Schéma postupu pri odbere embryonálneho materiálu.** Embryá boli spolu s celou maternicou uložené na petriho misku 1. Vypreparované embryo bolo prenesené na petriho misku 2, na ktorej bolo zbavené nadbytočných tekutín. Z petriho misky 2 bolo prenesené na petriho misku 3, ktorá bola uložená na vynulovaných váhach. Hmotnosť embrya bola zaznamenaná a ďalej bolo každé embryo spracované zvlášť. (Podľa Hovorakova et al., 2013).

### 3.4 Imunohistochemia a imunofluorescencia

Nakrájané rezy boli spracované imunohistochemicky podľa uvedeného protokolu (viď nižšie) s použitím protilátok proti SHH a EDA (Santa Cruz Biotechnology, tab. 3.1). Pre lepšiu vizualizáciu expresie EDA proteínu bola taktiež použitá metóda imunofluorescencie. Celkovo bolo použitých 44 embryí (tab. 3.2).

#### Imunohistochemia (IHC) – protokol

##### Deň 1

1. Deparafinizácia
  - 1.1. Xylén 1.....10 min
  - 1.2. Xylén 2.....10min
  - 1.3. Etanol 100 % .....10min
  - 1.4. Etanol 100 %.....10min
  - 1.5. Etanol 96 %.....10 min
  - 1.6. Etanol 96 %.....10min
2. PBS.....2x 5 min
3. 3 % peroxid vodíka v metanole.....45 min
4. PBS.....5 min
5. Inkubácia vo vodnom kúpeli pri teplote 90 °C a v roztoku TrisEDTA pH 9 1x.

6. Chladnutie 15 minút pri izbovej teplote.
7. PBS.....2x 10 min
8. Blokovací roztok.....2 h
9. Aplikácia primárnej protilátky (zriedená v blokovacom roztoku) a prikrytie podložných skiel parafilmom.
10. Inkubácia vo vlhkej komôrke cez noc pri 4 °C.

Poznámka: Pre potreby imunofluorescencie boli vynechané kroky 3-4.

## **Deň 2**

1. PBS.....3x 15 min
2. Blokovací roztok.....2 h
3. Aplikácia sekundárnej protilátky (zriedená v blokovacom roztoku), prikrytie podložných skiel parafilmom a inkubácia vo vlhkej komôrke jednu hodinu pri izbovej teplote.
4. PBS.....3x 15 min
5. Obkrúženie rezov PAP perom a aplikácia avidín-biotínového komplexu (ABC kit Vecstain, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Inkubácia vo vlhkej komôrke 30 minút pri izbovej teplote.
6. PBS.....3x 15 min
7. Aplikácia diaminobenzidínu (DAB). Inkubácia pri izbovej teplote až do objavenia sa signálu, alebo podľa potreby.
8. Zastavenie reakcie v destilovanej vode.

Poznámka: Pre potreby imunofluorescencie boli vynechané kroky 5-8. Posledným krokom bol krok 4, v ktorom sa do posledného PBS pridal DAPI v riedení 1:1000.

**Tabuľka 3.1: Použité protilátky.**

Primárne protilátky	Sekundárne protilátky	Riedenie	Riedenie
Rabbit polyclonal SHH [H160] (sc-9024, Santa Cruz Biotechnology)	Biotinylated Goat Anti-rabbit (BA-1000, Vector)	1:150	1:150
Goat polyclonal EDA [C17] (sc-18927, Santa Cruz Biotechnology)	Biotinylated Rabbit Anti-goat (BA-5000, Vector)	1:100	1:100
	Donkey Anti-goat Alexa-488 (A-11055, Life Technologies)		1:500

**TrisEDTA pH 9 1x**

Tris.....1,21 g  
 EDTA.....0,37 g  
 Destilovaná voda.....1000 ml

Poznámka: Nutná adjustácia pH na 9.

**Blokovací roztok**

Cold-Fish Gelatine 20%.....0,5 ml  
 BSA.....1 g  
 Triton X-100 10 %.....5 ml  
 Destilovaná voda.....100 ml

**Tabuľka 3.2: Tabuľka použitého materiálu - imunohistochemia a imunofluorescencia.** Počty odobraných embryí, ktoré boli imunohistochemicky alebo imunofluorescenčne značené protilátkami proti SHH a EDA proteínom.

E	Anti-SHH protilátka	Anti-EDA protilátka
E12,5	2	3
E12,7	2	0
E13,5	8	4
E14,5	4	7
E15,5	8	5
E16,5	0	1

## 3.5 Farbenie tkanivových rezov

Na kontrastné dofarbenie pozadia u imunohistochemicky značených rezov bolo použité dofarbenie eozínom. Výsledkom je ohnivo naružovelé sfarbenie cytoplazmy, ktoré kontrastuje s hnedou/čiernou farbou pozitívneho IHC signálu. Po objavení sa pozitívneho IHC signálu bola peroxidázová reakcia zastavená v destilovanej vode. Následne boli podložné sklá s rezmi dvakrát prepláchnuté v destilovanej vode. Rezy na podložných sklách boli opláchnuté v eozíne a opäť prepláchnuté destilovanou vodou, tentokrát trikrát. Nasledovala dehydratácia vo vzostupnej etanolovej rade (96 %, 100 %; dvakrát 5 minút v každej koncentrácii), prenesenie do xylénu a prichytenie krycieho sklíčka umelou živicom Neomount.

### Eozín

1. Eozín žltavý.....0,25 g
2. Destilovaná voda.....1000 ml

Na kontrastné dofarbenie pozadia u imunohistochemicky značených rezov bolo použité dofarbenie jadrovou červeňou (nuclear fast red, kernecht-rot). Výsledkom je jasno červené sfarbenie jadier, ktoré kontrastuje s hnedou/čiernou farbou pozitívneho IHC signálu.

### Jadrová červeň

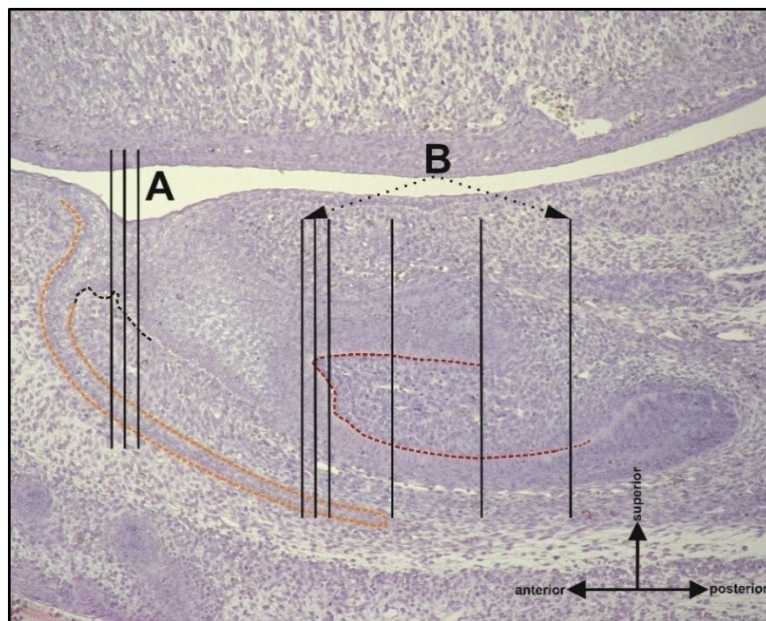
1. Síran hlinitý.....5 g
2. Jadrová červeň (Gurr's) .....0,1 g
3. Destilovaná voda .....100 ml

### Príprava farbiaceho roztoku

1. Rozpustiť 0,1 g jadrovej červene za horúca a stáleho miešania v 100 ml 5 % roztoku síranu hlinitého.
2. Po vychladnutí prefiltrovať.

## 4 Výsledky

Expresia proteínov EDA a SHH bola sledovaná v anteriórnej a posteriórnej rostrálnej oblasti dolnej čeľuste myších embryí prostredníctvom imunohistochemie. V tejto oblasti sa nachádza zárodok rezáku (obr. 4.1).



**Obrázok 4.1: Sagitálny rez zárodokom dolného rezáku myšieho embrya (E14,5).** Oranžový obrys vyznačuje bazálnu membránu vestibulárneho epitelu. Čierny obrys vyznačuje bazálnu membránu epitelových mostíkov, ktoré prepájajú zubný základ s vestibulárnym epitelom. Oblasť epitelových mostíkov (A) predstavuje anteriórnu oblasť expresie *Shh* génu. Červený obrys vyznačuje bazálnu membránu vnútorného sklovinného epitelu sklovinného orgánu. Táto zóna (B) predstavuje posteriórnu oblasť expresie *Shh* génu. Plné čiary predstavujú orientáciu pomyselných frontálnych rezov anteriórnu, resp. posteriórnu sledovanou oblasťou.

### 4.1 Sledovanie expresie SHH proteínu

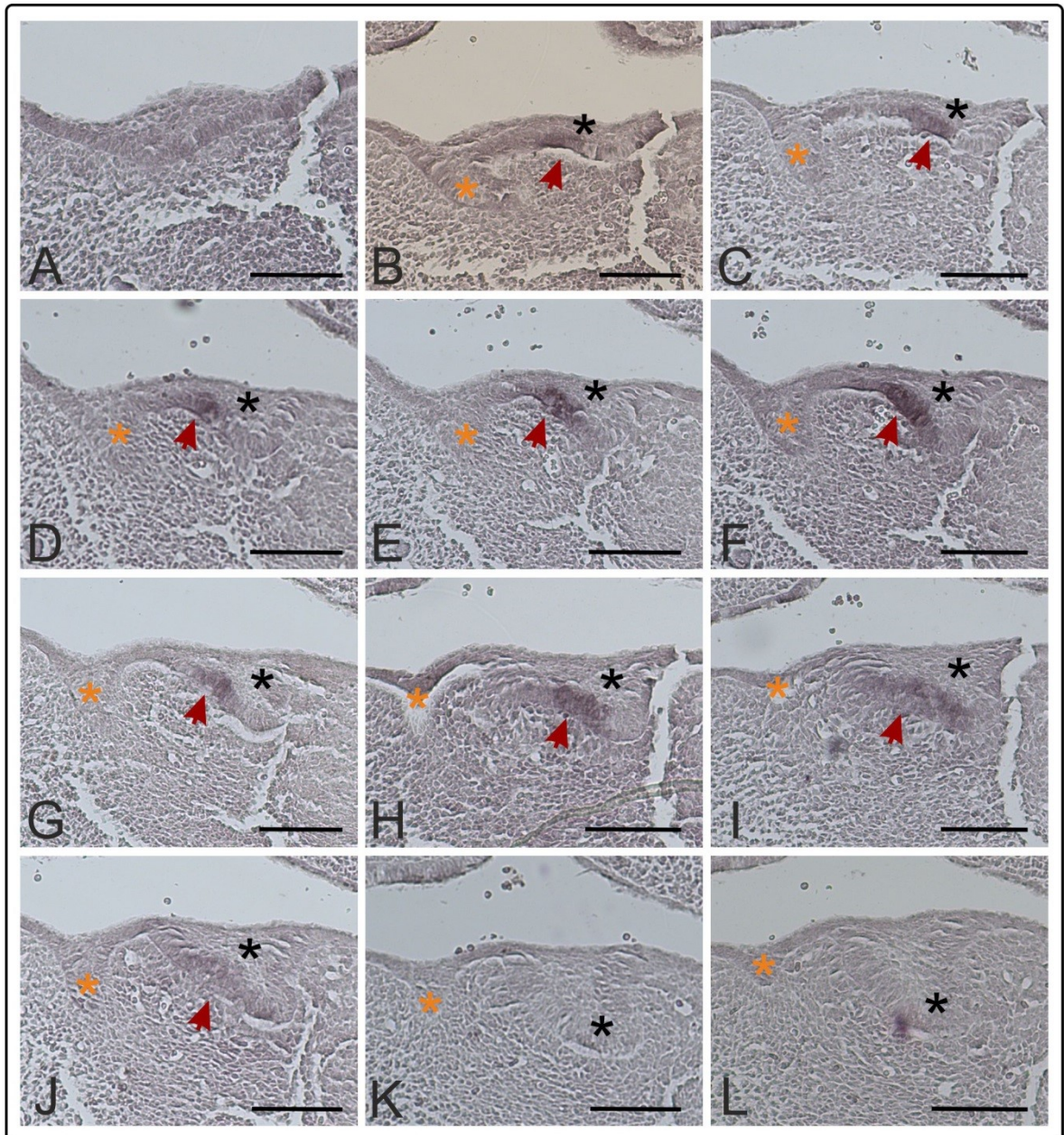
Najvčasnšie štádium, na ktorom bola sledovaná expresia SHH proteínu, bol E12,5 (104 mg, obr. 4.2). V anteriórnej sledovanej oblasti sa SHH proteín exprimuje v dentálnom epitelu v oblasti epitelových mostíkov (obr. 4.2B-J), ktoré sa nachádzajú na labiálnej strane zubného zárodka a prepájajú bázu pupeňa s vestibulárnym epitelom. Smerom posteriórne sa expresia SHH postupne vytráca. V posteriórnej oblasti zárodka rezáku nie je expresia SHH proteínu v dentálnom epitelu na vrchole epitelovej časti pupeňa detegovateľná (obr. 4.2K-L). Vo vestibulárnom epitelu nie je na tomto vývojovom štádiu expresia proteínu SHH prítomná (obr. 4.2B-L).

Na E12,7 (135 mg, obr. 4.3) je vzor expresie SHH proteínu v podstate identický s E12,5 (porovnaj obr. 4.2 a 4.3). V anteriórnej sledovanej oblasti sa SHH exprimuje v dentálnom epiteli v oblasti epitelových mostíkov (obr. 4.3B-H). V posteriórnej oblasti zárodka rezáku nie je na tomto štádiu expresia SHH proteínu zaznamenateľná (obr. 4.3J-O).

Na vývojovo menej pokročilých embryách na E13,5 (149mg) nie je detegovateľná expresia SHH proteínu vôbec, ani v anteriórnej, ani v posteriórnej sledovanej oblasti. Na vývojovo pokročilejších embryách na E13,5 (193 mg, obr. 4.4) nie je v anteriórnej sledovanej oblasti možné nájsť v dentálnom epiteli žiadne SHH pozitívne bunky. V anteriórnej sledovanej oblasti sú morfológicky detegovateľné epitelové mostíky, v ktorých je na predchádzajúcich vývojových štádiách prítomná expresia SHH proteínu, avšak na tomto vývojovom štádiu sú SHH negatívne (obr. 4.4C-E). V posteriórnej oblasti zárodka rezáku sa u vývojovo pokročilejších embryí na E13,5 (193 mg obr. 4.4) objavuje nová oblasť expresie SHH proteínu (obr. 4.4G-J). V porovnaní s expresiou v anteriórnej sledovanej oblasti je uložená hlbšie pod povrchom orálneho epitelu. SHH pozitívne bunky sa nachádzajú v dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti pupeňa a priliehajú k mezenchýmu v danej oblasti (obr. 4.4G-J).

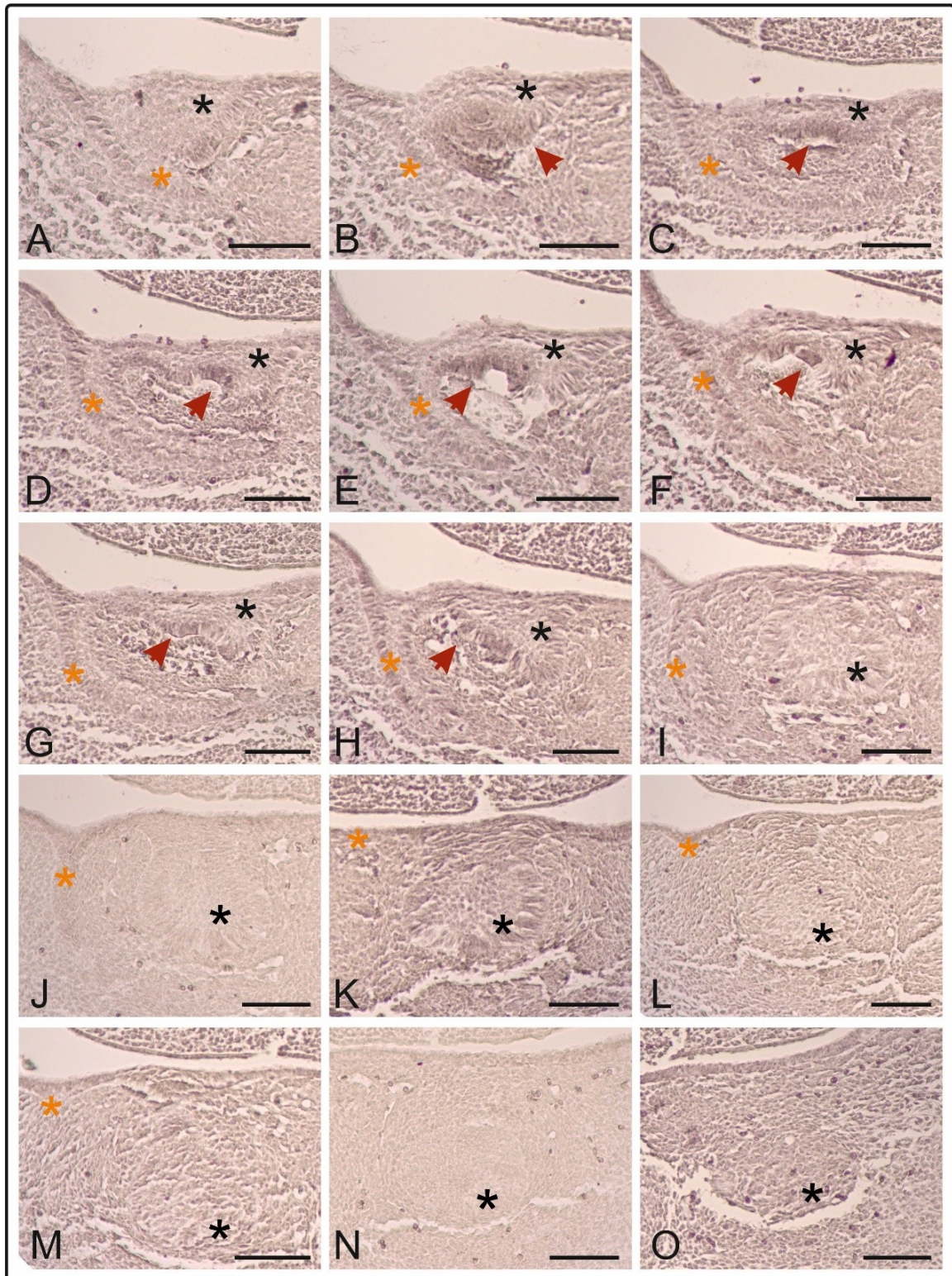
Na E14,5 (308 mg, obr 4.5) nie je v anteriórnej sledovanej oblasti možné nájsť v dentálnom epiteli SHH pozitívne bunky. To znamená, že podobne ako u predchádzajúceho štádia sú epitelové mostíky SHH negatívne (obr. 4.5C-G). Na E14,5 je už pozorovateľný diferencovaný sklovinný orgán. Expresia SHH proteínu je lokalizovaná do vnútorného sklovinného epitelu (obr. 4.5K-L).

Na E15,5 (484 mg, obr. 4.6) nie je v anteriórnej sledovanej oblasti v dentálnom epiteli zjavná expresia SHH proteínu (obr. 4.6C-G). V posteriórnej oblasti zárodka rezáku je expresia SHH proteínu detegovateľná vo vnútornom sklovinnom epiteli, teda na rovnakom mieste, ako na predchádzajúcom sledovanom štádiu (obr. 4.6J-P).

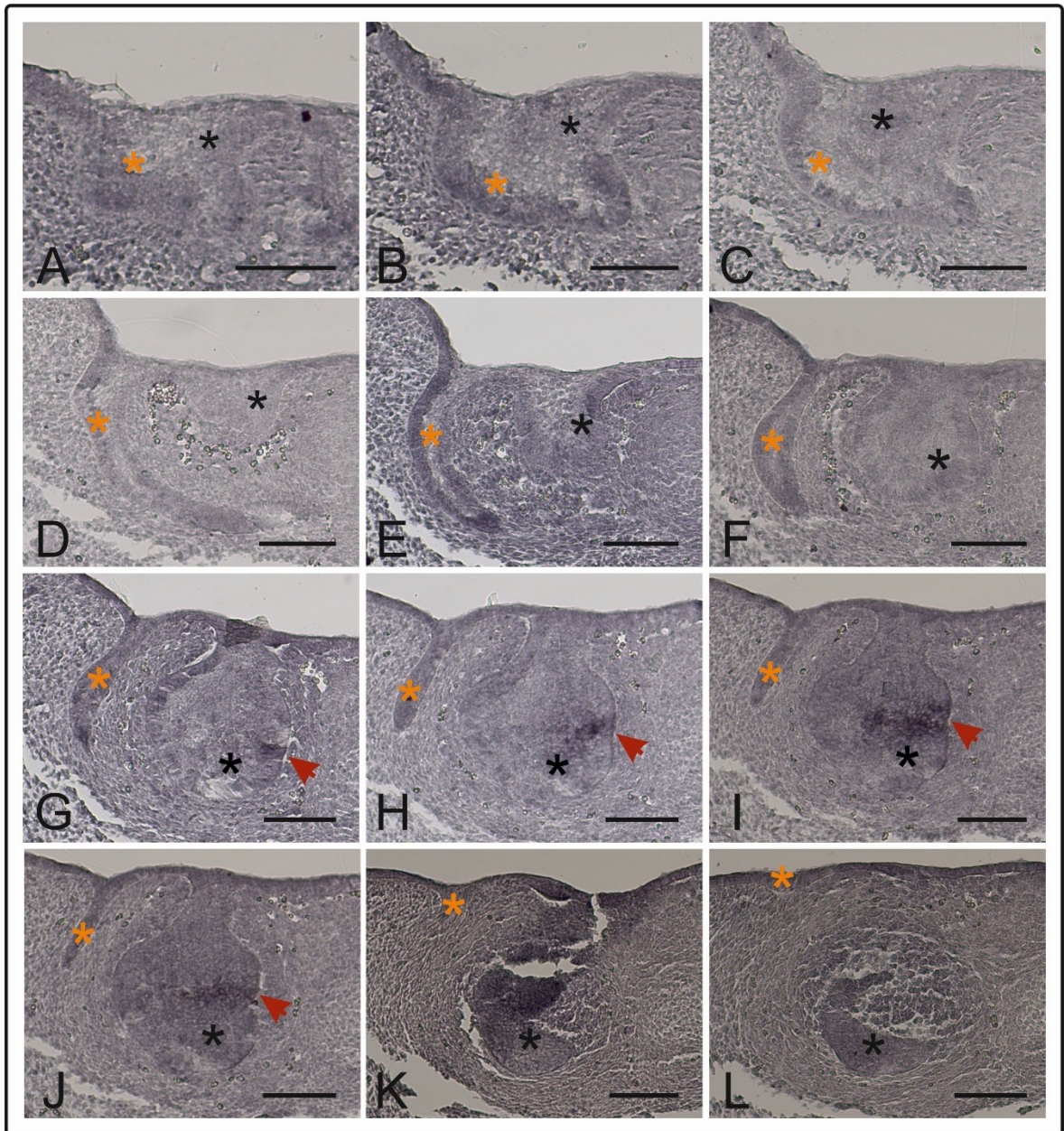


**Obrázok 4.2: Expresia SHH proteínu na semisérii frontálnych histologických rezov rezákovou oblasťou mandibuly myšieho embrya na E12,5 (104 mg).** Celkom anteriórne nie je možné presne stanoviť hranice medzi dentálnym a vestibulárnym epitelom (A). V anteriórnej sledovanej oblasti sa SHH proteín (červená šípka) exprimuje v dentálnom epitelí (čierna hviezdička) v oblasti epitelových mostíkov (B-J). Epitelové mostíky sa nachádzajú na labiálnej strane zárodka a prepájajú vestibulárny epitel s dentálnym epitelom. Smerom posteriórne sa expresia SHH proteínu vytráca. V posteriórnej oblasti zárodka rezáku nie je expresia SHH proteínu v dentálnom epitelí detegovateľná (K-L). Vo vestibulárnom epitelí (oranžová hviezdička) nie je expresia proteínu SHH prítomná (B-L). Škála znázorňuje 100  $\mu\text{m}$ .

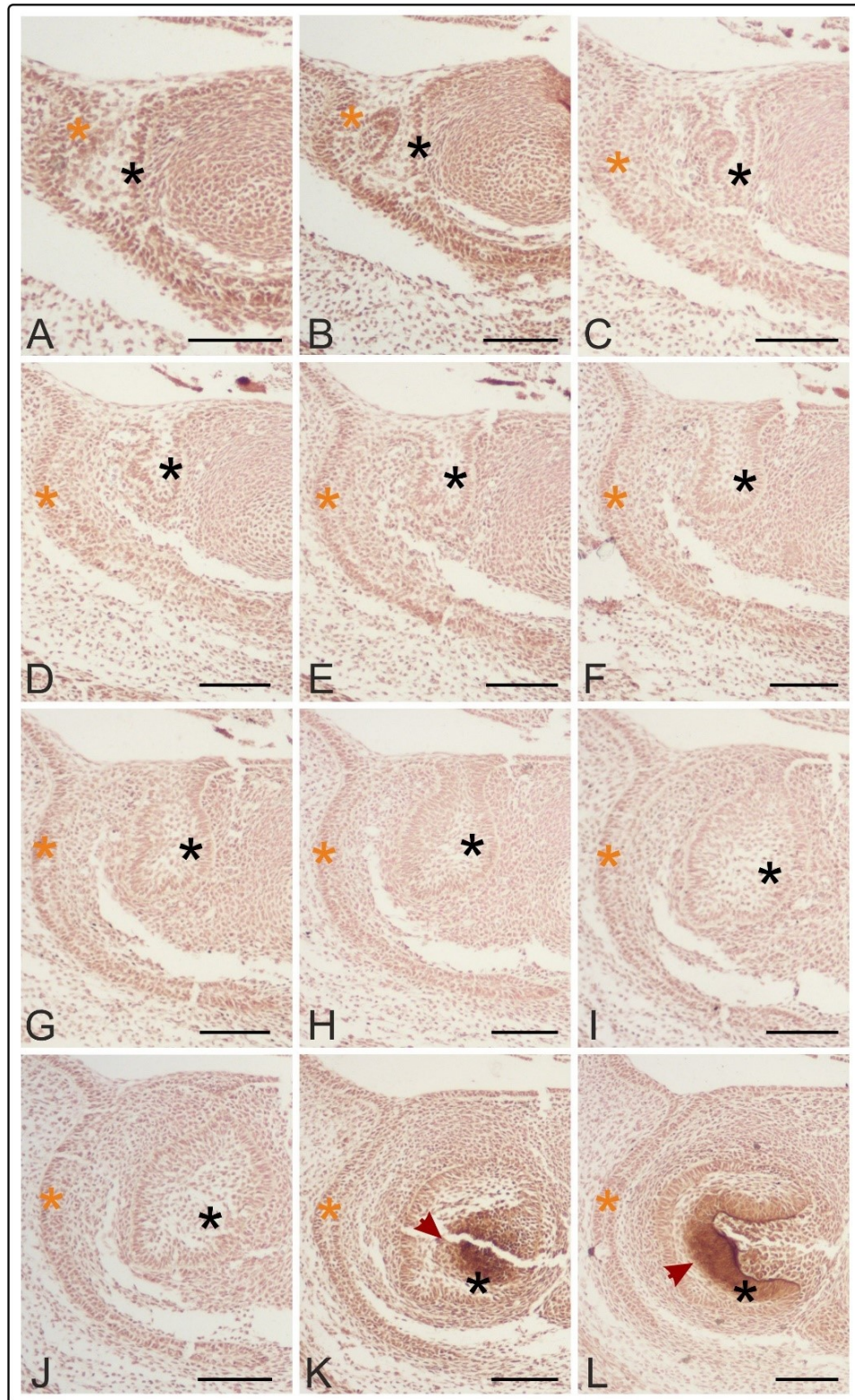




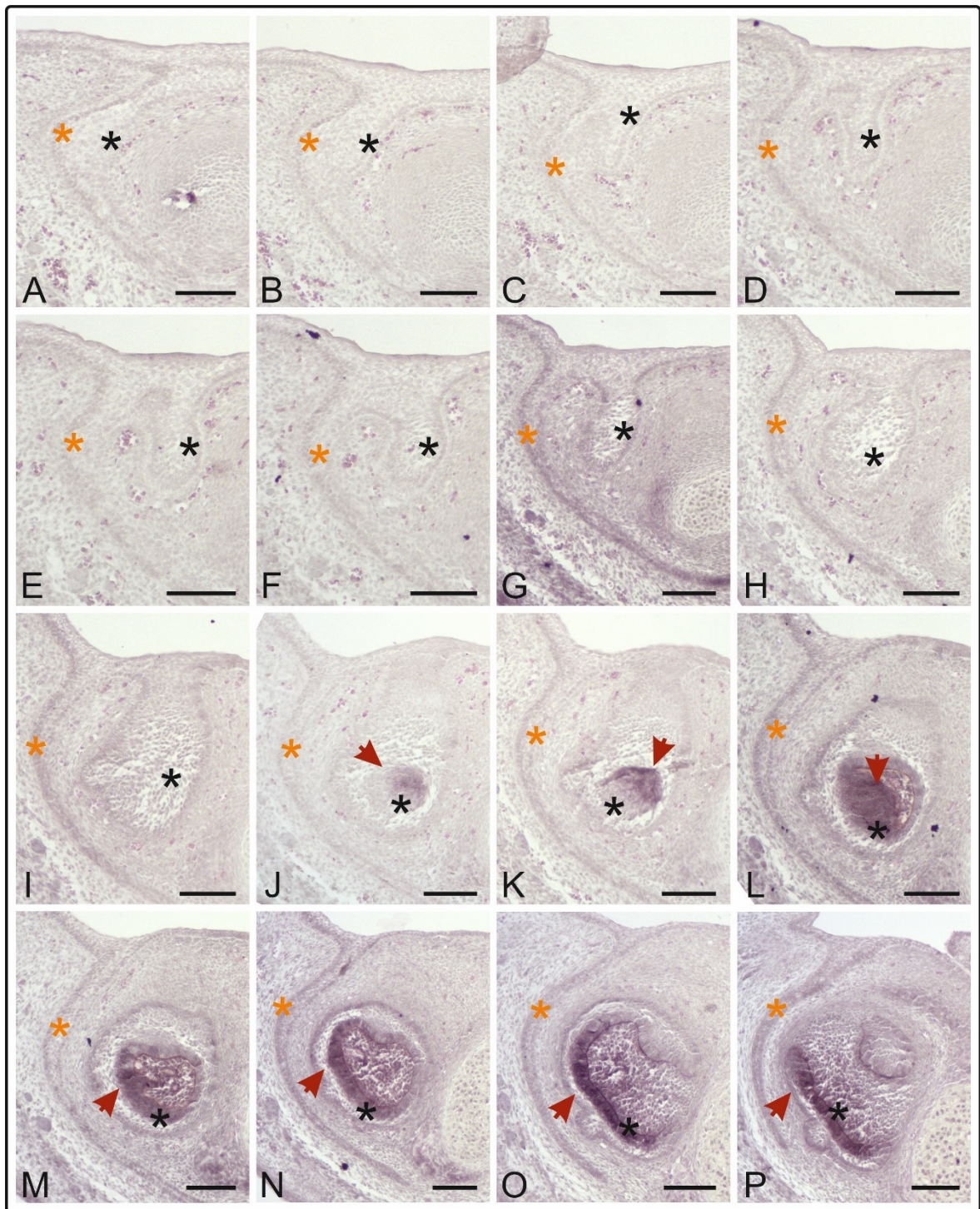
**Obrázok 4.3: Expresia SHH proteínu na semisérii frontálnych histologických rezov rezákovou oblasťou mandibuly myšieho embrya na E12,7 (135 mg).** Celkom anteriórne nie je možné presne stanoviť hranice medzi dentálnym (čierna hviezdička) a vestibulárnym epitelom (oranžová hviezdička) (A). V anteriórnej sledovanej oblasti sa na E12,7 exprimuje SHH proteín (červená šípka) v dentálnom epiteli (čierna hviezdička) v oblasti epitelových mostíkov (B-H). V posteriórnej oblasti zárodka nie je na E12,7 expresia SHH proteínu v dentálnom epiteli zaznamateľná (J-O). Vo vestibulárnom epiteli nie je expresia proteínu SHH prítomná (A-M). Škála znázorňuje 100  $\mu$ m.



**Obrázok 4.4: Expresia SHH proteínu na semisérii frontálnych histologických rezov rezákovou oblasťou mandibuly myšieho embrya na E13,5 (193 mg).** Celkom anteriórne nie je možné presne stanoviť hranice medzi dentálnym (čierna hviezdička) a vestibulárnym epitelom (oranžová hviezdička) (A-B). V anteriórnej sledovanej oblasti, v dentálnom epiteli (čierna hviezdička) v oblasti epitelových mostíkov, nie je expresia SHH proteínu prítomná (C-E). V posteriórnej oblasti zárodka rezáku je expresia SHH proteínu (červená šípka) zaznamenateľná v dentálnom epiteli na vrchole pupeňa v bunkách prilahlých k mezenchýmu (G-J). Vo vestibulárnom epiteli nie je expresia proteínu prítomná (A-L). Škála znázorňuje 100  $\mu$ m.

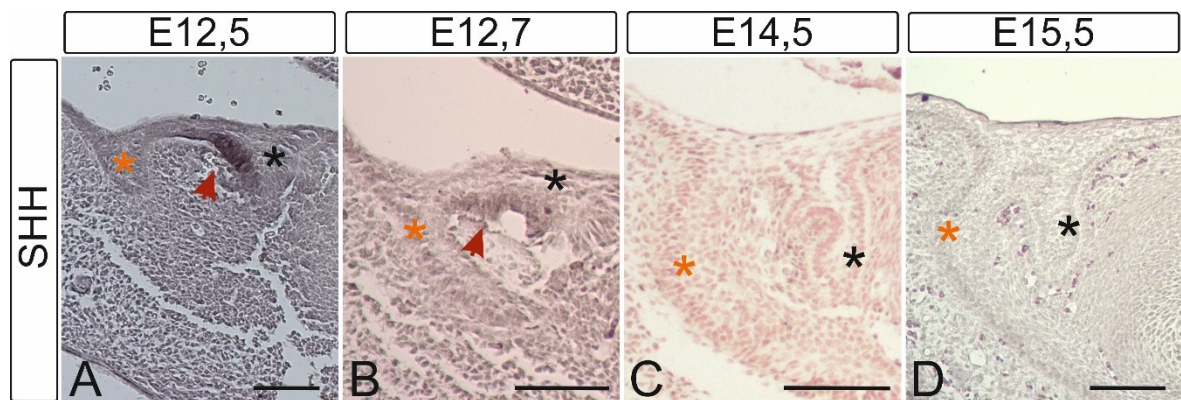


**Obrázok 4.5: Expresia SHH proteínu na semisérii frontálnych histologických rezov rezákovou oblasťou mandibuly myšieho embrya na E14,5 (308 mg).** Celkom anteriórne nie je možné presne stanoviť hranice medzi dentálnym (čierna hviezdička) a vestibulárnym epitelom (oranžová hviezdička) (A-B). V anteriórnej sledovanej oblasti nie je v dentálnom epitelu v oblasti epitelových mostíkov detegovateľná expresia SHH proteínu (C-G). V posteriórnej oblasti zárodka rezáku je detegovateľná expresia SHH proteínu (červená šípka) vo vnútornom sklovinnom epitelu (K-L). Vo vestibulárnom epitelu nie je expresia proteínu SHH prítomná (A-L). Škála znázorňuje 100  $\mu$ m.



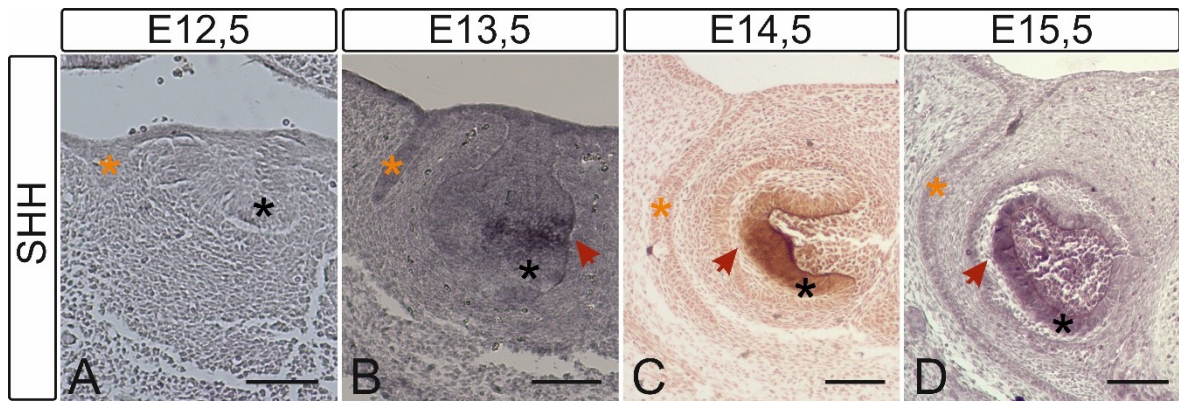
**Obrázok 4.6: Expresia SHH proteínu na semisérii frontálnych histologických rezov rezákovou oblasťou mandibuly myšieho embrya na E15,5 (484 mg). Celkom anteriórne nie je možné presne stanoviť hranice medzi dentálnym (čierna hviezdička) a vestibulárnym epitelom (oranžová hviezdička) (A-B). V anteriórnej sledovanej oblasti sa SHH proteín (červená šípka) v dentálnom epitelí v oblasti epitelových mostíkov neexprimuje (C-G). V posteriórnej oblasti zárodka rezáku na vrchole jeho epitelovej časti sa SHH proteín exprimuje vo vnútornom sklovinnom epitelí (J-P). Vo vestibulárnom epitelí nie je expresia proteínu SHH prítomná (A-P). Škála znázorňuje 100  $\mu$ m.**

Z uvedených výsledkov vyplýva, že proteín SHH sa v anteriórnej sledovanej oblasti exprimuje v dentálnom epiteli výhradne na včasných štádiách vývoja (E12,5-12,7) (obr. 4.7 a 4.21). V anteriórnej sledovanej oblasti sa SHH proteín exprimuje v dentálnom epiteli na labiálnej strane (obr. 4.2B-J, 4.3B-H a 4.7A-B), kde sa nachádzajú epitelové mostíky, ktoré prepojujú zubný zárodok s vestibulárnym epitelom. Na štádiu pokročilého pupeňa (E13,5) a na pokročilejších štádiách vývoja (E14,5-15,5) sú epitelové mostíky stále morfológicky detegovateľné, no expresia SHH proteínu v nich chýba (obr. 4.4C-E, 4.5C-G, 4.6C-G a 4.7C-D). Vo vestibulárnom epiteli nie je SHH proteín exprimovaný na žiadnom sledovanom štádiu (obr. 4.7A-D).



**Obrázok 4.7: Expresia SHH proteínu v anteriórnej sledovanej oblasti.** V anteriórnej sledovanej oblasti sa SHH proteín exprimuje výhradne na raných štádiách vývoja (A-B). Expresia SHH proteínu (červená šípka) je detegovateľná v dentálnom epiteli (čierna hviezdička) na labiálnej strane v oblasti epitelových mostíkov (A-B). Na pokročilejších štádiách vývoja nie je expresia SHH proteínu v anteriórnej sledovanej oblasti detegovateľná (C-D). Vestibulárny epitel (oranžová hviezdička) je SHH negatívny v priebehu celej sledovanej periódy vývoja (A-D). Škála predstavuje 100  $\mu\text{m}$ .

V posteriórnej oblasti zárodka rezáku je v dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti zubného zárodka expresia SHH proteínu prítomná od štádia pokročilého pupeňa (od E13,5) (obr. 4.8 a 4.21). Na včasných štádiách vývoja (E12,5-12,7) expresia SHH proteínu v tejto oblasti absentuje (obr. 4.2K-L, 4.3J-O a 4.8A-B) V štádiu pokročilého pupeňa (E13,5) sa SHH pozitívne bunky nachádzajú v dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti zubného zárodku, kde priliehajú k mezenchýmu (obr. 4.4G-J a 4.8C). Na štádiu pohárika (E14,5-15,5) je výrazná expresia SHH proteínu lokalizovaná vo vnútornom sklovinnom epiteli (obr. 4.5K-L, 4.6J-P a 4.8C-D).



**Obrázok 4.8: Expresia SHH proteínu v posteriornej oblasti zárodka rezáku.** Na E12,5 na štádiu včasného pupeňa sa v dentálnom epiteli (čierna hviezdička) na vrchole epitelovej časti zubného zárodka SHH neexprimuje (A). V posteriornej oblasti zárodka rezáku je expresia SHH proteínu detegovateľná od štádia pokročilého pupeňa (E13,5-15,5) (B-D). Na E13,5 sa SHH proteín (červená šípka) exprimuje v dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti pupeňa (B). Od E14,5 sa SHH proteín exprimuje vo vnútornom sklovinnom epiteli (C-D), ktorý je súčasťou sklovinného orgánu. Vo vestibulárnom epiteli (oranžová hviezdička) nie je expresia SHH proteínu prítomná v priebehu celej sledovanej periódy vývoja. Škála predstavuje 100  $\mu\text{m}$ .

## 4.2 Sledovanie expresie EDA proteínu

U vývojovo najmladších sledovaných štádií E12,5 (107 mg, obr. 4.9; 120 mg, obr. 4.10) je v anteriornej sledovanej oblasti expresia EDA proteínu detegovateľná na povrchu orálneho epitelu (obr. 4.9A-C a 4.10A-C). Smerom posteriorne je EDA proteín prítomný v oblasti, kde nie je možné stanoviť presné hranice medzi dentálnym a vestibulárnym epitelom (obr. 4.9D-G a 4.10D-H). V oblasti epitelových mostíkov, kde už je možné morfológicky odlišť dentálny a vestibulárny epitel, sa EDA proteín exprimuje aj v dentálnom, aj vo vestibulárnom epiteli (obr. 4.9H-L a 4.10E-N). Expresia EDA proteínu má v antero-posteriórnom smere celej rezákovej oblasti včasného pupeňa výrazne disperzný charakter. Celkom posteriorne, v dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti zubného zárodka, nie je expresia EDA proteínu detegovateľná (obr. 4.9M-O, obr. 4.100).

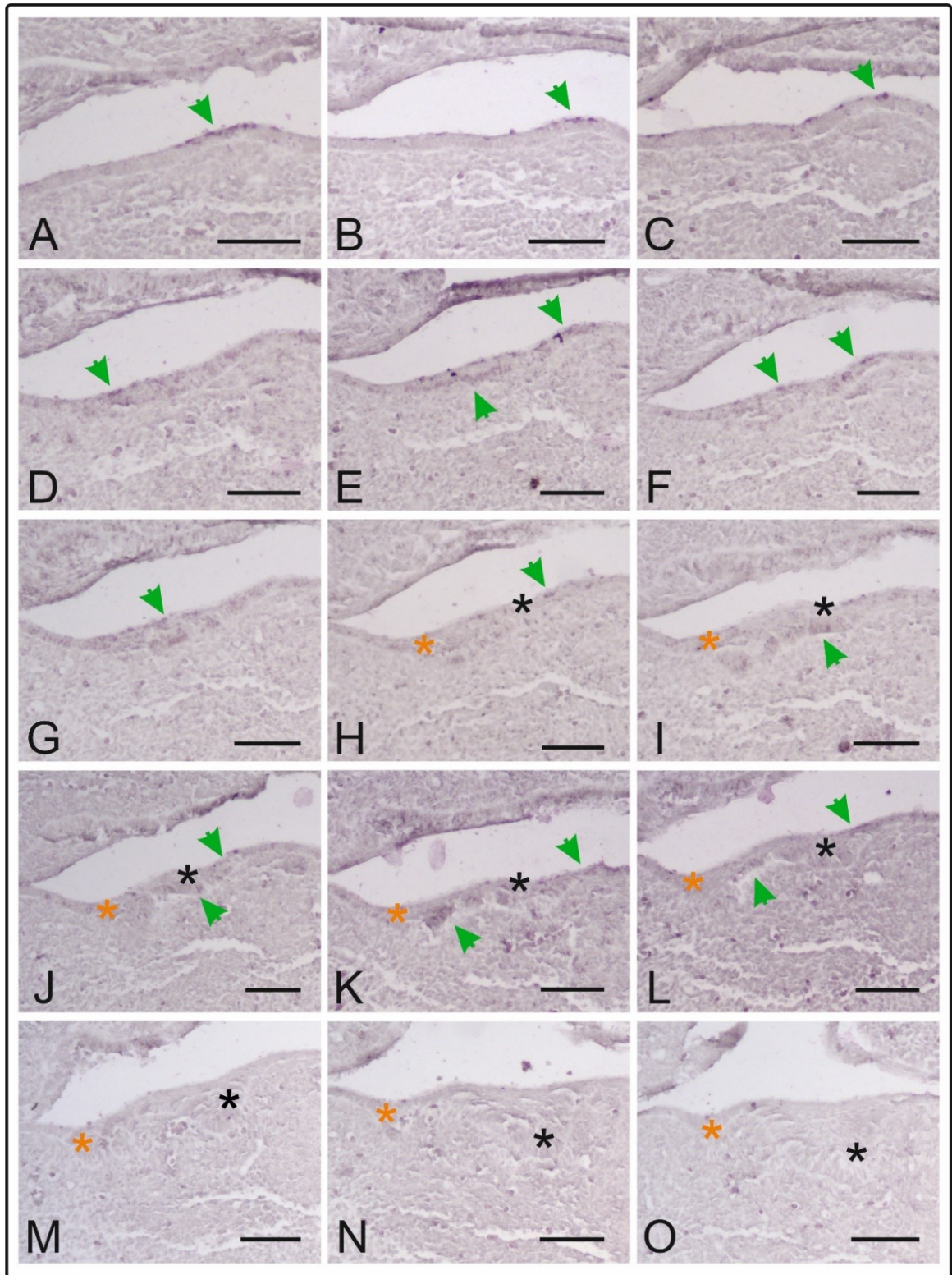
Na E13,5 (168 mg, obr. 4.11) je v anteriornej sledovanej oblasti EDA proteín prítomný v dentálnom epiteli v oblasti epitelových mostíkov prieliehajúcich k vestibulárnemu epiteli (obr. 4.11C-E). Smerom posteriorne je expresia detegovateľná v superficiálnych vrstvách dentálneho epitelu na bázi rezákového pupeňa (obr. 4.11F-H). EDA pozitívne bunky je možné detegovať aj vo vestibulárnom epiteli (obr. 4.11F) a v orálnom epiteli medzi zubným zárodkom a vestibulárnym

epitelom (obr. 4.11G). V posteriórnej sledovanej oblasti zárodka rezáku sa na štádiu E13,5 EDA proteín v dentálnom epiteli neexprimuje (obr. 4.11J-L).

Na E14,5 (300 mg, obr. 4.12) expresia EDA proteínu v anteriórnej sledovanej oblasti difúzne vyplňuje dentálny epitel v oblasti epitelových mostíkov (obr. 4.12B-F), priliehajúcich anteriórne k základu *vestibulum oris*. Postupne sa EDA pozitívne bunky v dentálnom epiteli sústreďujú labiálne (obr. 4.12G-K), v oblasti pril'ahlej k vestibulárnemu epitelu. EDA pozitívne bunky je možné detegovať aj v orálnom epiteli medzi zubným zárodokom a vestibulárnym epitelom (obr. 4.12G). V anteriórnej sledovanej oblasti je expresia EDA proteínu vo vestibulárnom epiteli koncentrovaná vo vnútornej vrstve buniek (obr.4.12B-K). V dentálnom epiteli v posteriórnej sledovanej oblasti základu rezáku nie je na E14,5 expresia EDA proteínu prítomná (obr. 4.12N-P). V posteriórnej sledovanej oblasti sa výrazná expresia EDA proteínu objavuje výlučne v strednej vrstve epitelových buniek základu *vestibulum oris* (obr 4.12L-P).

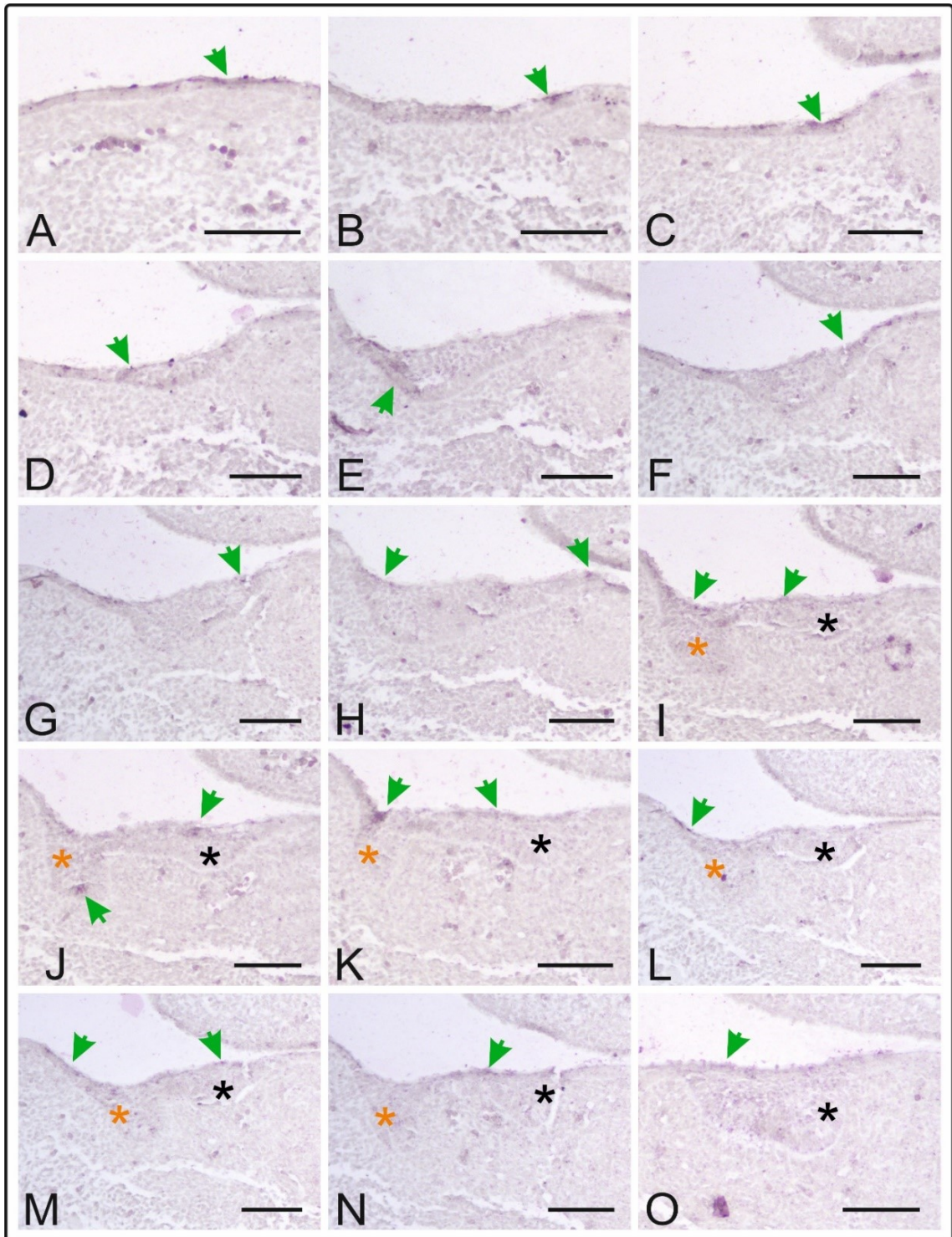
Na E15,5 (504 mg, obr. 4.13) je v anteriórnej sledovanej oblasti expresia EDA proteínu pozorovateľná v dentálnom epiteli v oblasti epitelových mostíkov (obr. 4.13A-J). Výrazná expresia je detegovateľná v zhľuku buniek v oblasti stopky na báze zubného zárodka (obr. 4.13E-J). V anteriórnej sledovanej oblasti je možné nájsť zhľuky EDA exprimujúcich buniek vo vestibulárnom epiteli (obr. 4.13E-K). V posteriórnej sledovanej oblasti zárodka rezáku nie je detegovateľná expresia EDA proteínu v dentálnom epiteli (obr. 4.13L-P). Tak ako na predchádzajúcom skúmanom štádiu, EDA proteín sa v posteriórnej sledovanej oblasti intenzívne exprimuje v strednej bunkovej vrstve epitelového základu *vestibulum oris* (obr. 4.13K-P).

Na E16,5 (504 mg, obr. 4.14) je v anteriórnej sledovanej oblasti zaznamenateľná expresia EDA proteínu vo vestibulárnom epiteli (obr. 4.14A-C). Smerom dozadu sa expresia EDA proteínu vo vestibulárnom epiteli obmedzuje iba na zhľuky buniek (obr. 4.14D-P), V oblasti stopky na báze rezákového základu je zjavný zhľuk EDA pozitívnych buniek (obr.4.14D-I), podobne ako u predchádzajúceho vývojového štádia. V posteriórnej sledovanej oblasti je na E16,5 expresia EDA proteínu lokalizovaná do oblasti tvoriacej posteriórnu časť stopky zubného zárodka a pril'ahlej k vestibulárnemu epitelu (obr. 4.14J-P). V dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti zubného zárodka nie je na tomto štádiu prítomná expresia EDA proteínu.

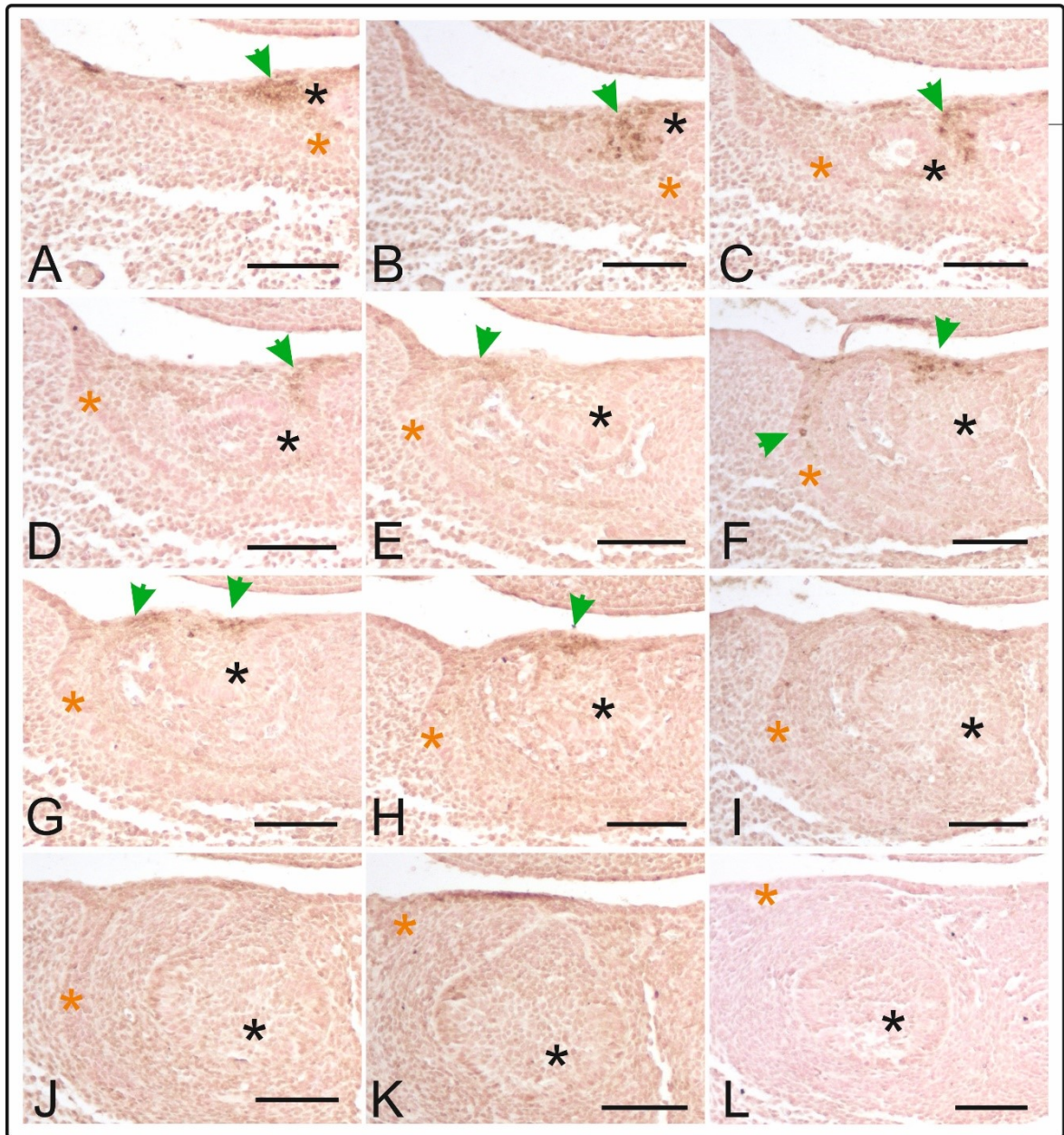


**Obrázok 4.9: Expresia EDA proteínu na semisérii frontálnych histologických rezov rezákovou oblasťou mandibuly myšieho embrya na E12,5 (107 mg).** Celkom anteriórne sa EDA proteín (zelená šípka) exprimuje v orálnom epiteli (A-C). Smerom posteriórne sa EDA proteín exprimuje v oblasti, kde nie je možné stanoviť presné hranice medzi dentálnym a vestibulárnym epiteliom (D-G). V oblasti epitelových mostíkov je expresia EDA proteínu zjavná aj v dentálnom (čierna hviezdica) aj vo vestibulárnom epiteli (oranžová hviezdička) (H-L). Celkom posteriórne, v dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti zubného zárodku nie je expresia EDA proteínu detegovateľná (M-O). Škála znázorňuje 100  $\mu\text{m}$ .

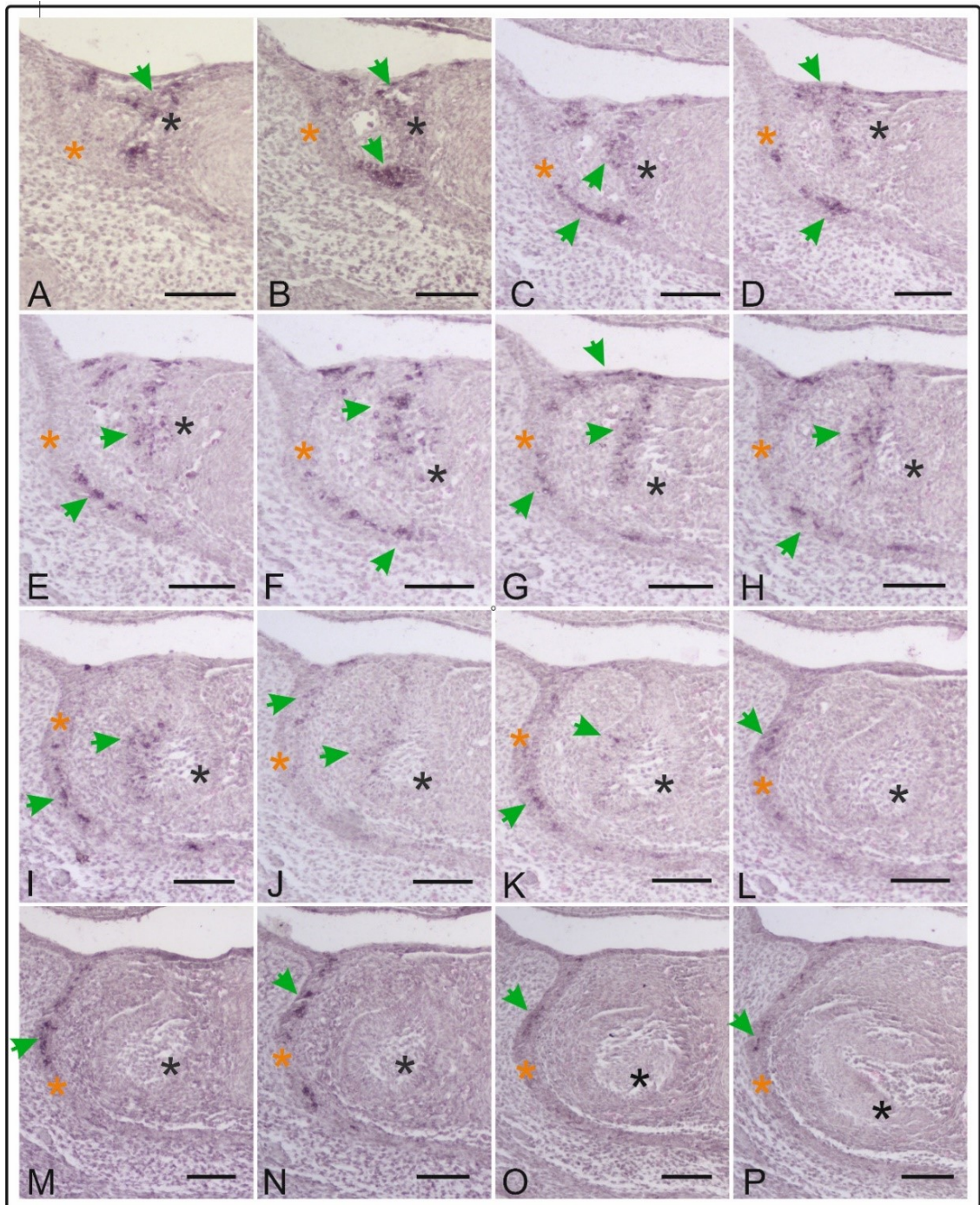




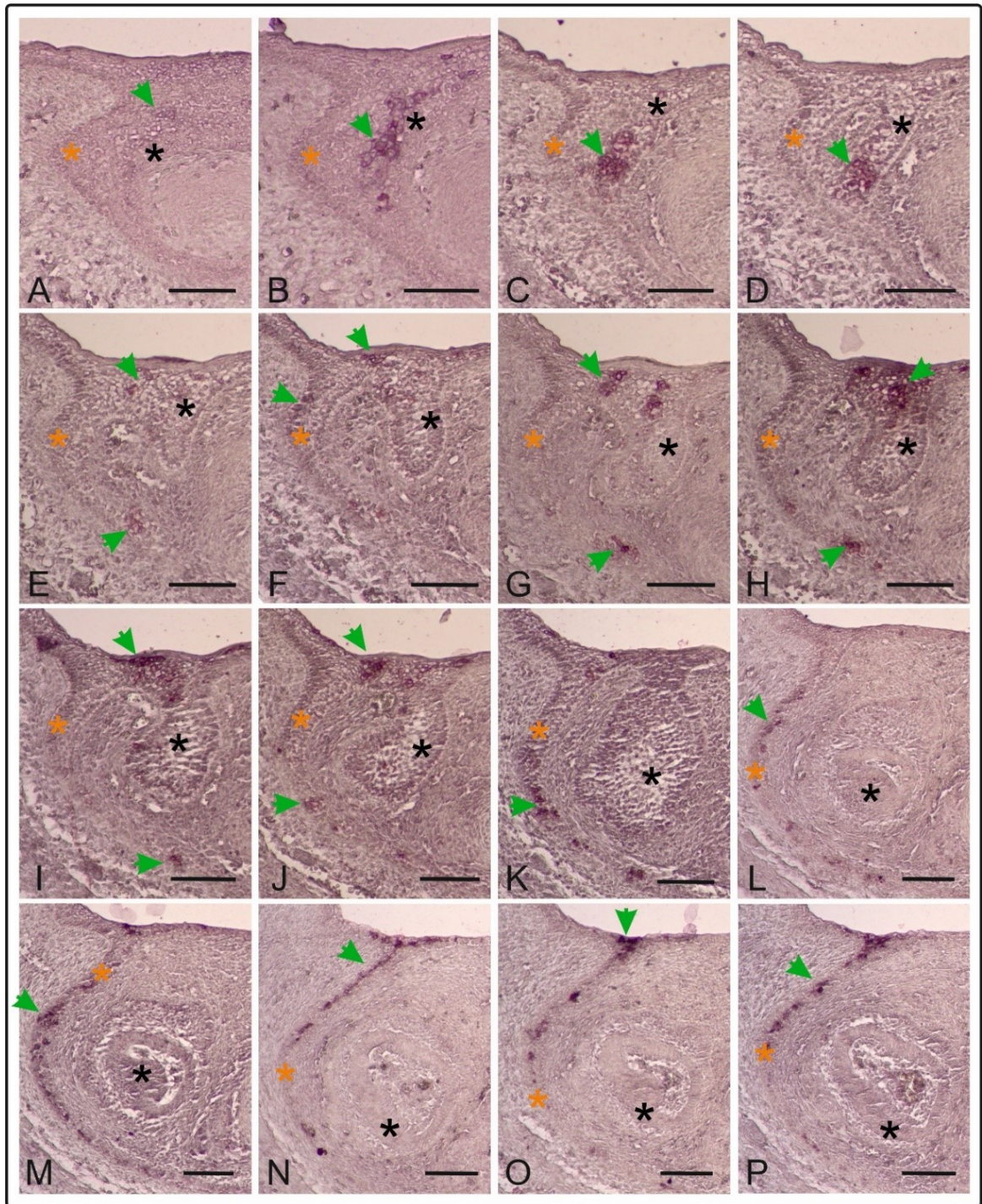
**Obrázok 4.10: Expresia EDA proteínu na semisérii frontálnych histologických rezov rezákovou oblasťou mandibuly myšieho embrya na pokročilejšom štádiu E12,5 (120 mg). Celkom anteriórne sa EDA proteín (zelená šípka) exprimuje v orálnom epiteli (A-C). Smerom posteriórne sa EDA proteín exprimuje v oblasti, kde nie je možné stanoviť presné hranice medzi dentálnym a vestibulárnym epiteliom (D-H). V oblasti epitelových mostíkov je expresia EDA proteínu zjavná v dentálnom (čierna hviezdička) a vestibulárnom epiteli (oranžová hviezdička) (E-N). Na vrchole epitelovej časti zubného pupeňa expresia EDA proteínu nie je detegovateľná (O). Expresia EDA proteínu má v antero-posteriórnom smere celej rezákovkej oblasti výrazne disperzný charakter (A-O). Škála znázorňuje 100  $\mu$ m.**



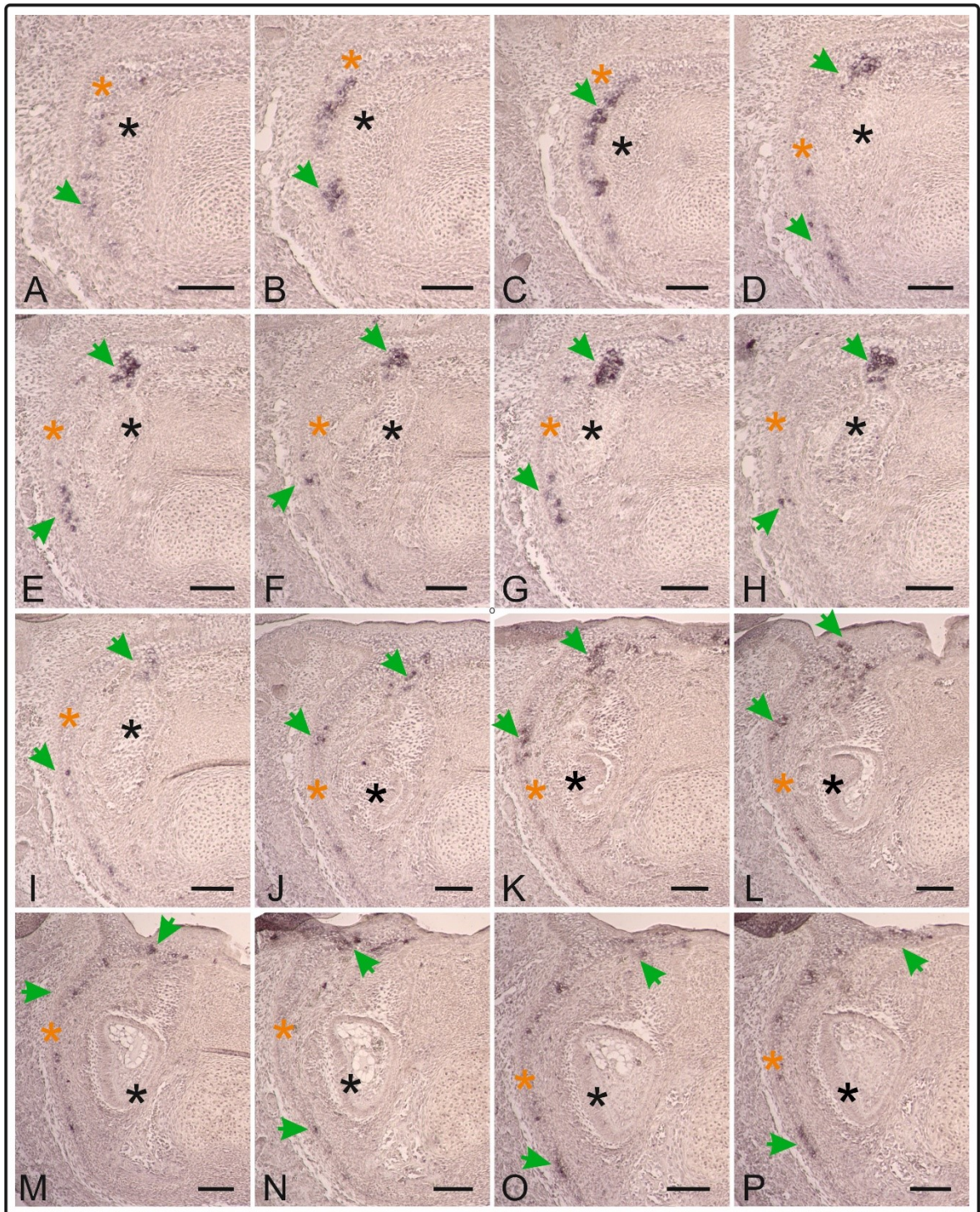
**Obrázok 4.11: Expressia EDA proteínu na semisérii frontálnych histologických rezov rezákovou oblasťou mandibuly myšieho embrya na E13,5 (168 mg).** Celkom anteriórne, v oblasti, kde nie je možné stanoviť presné hranice medzi dentálnym a vestibulárnym epitelom (A-B), je expresia EDA proteínu (zelená šípka) detegovateľná v epiteli mesiálne. V anteriórnej sledovanej oblasti je na E13,5 EDA proteín prítomný v dentálnom epiteli (čierna hviezdička) v oblasti epitelových mostíkov anteriórne prilahlých k základu *vestibulum oris* (oranžová hviezdička) (C-E). Smerom posteriórne je expresia detegovateľná v superficiálnych vrstvách dentálneho epitelu na bázi rezákového pupeňa (F-H). EDA pozitívne bunky sú ojedinele prítomné v strednej vrstve buniek vestibulárneho epitelu (F), je možné ich zaznamenať aj v orálnom epiteli medzi zubným zárodkom a vestibulárnym epitelom (G). V posteriórnej sledovanej oblasti nie je EDA proteín detegovateľný ani v dentálnom, ani vo vestibulárnom epiteli (J-L). Škála predstavuje 100  $\mu\text{m}$ .



**Obrázok 4.12: Expresia EDA proteínu na semisérii frontálnych histologických rezov rezákovou oblasťou mandibuly myšieho embrya na E14,5 (300 mg).** Celkom anteriórne, v oblasti, kde nie je možné stanoviť presné hranice medzi dentálnym a vestibulárnym epitelom (A), sa v epiteli v podstate plošne exprimuje EDA proteín (zelená šípka). V anteriórnej sledovanej oblasti expresia EDA proteínu difúzne vyplňuje dentálny epitel (čierna hviezdička) v oblasti epitelových mostíkov, priliehajúcich anteriórne k základu *vestibulum oris* (B-F). Smerom posteriórne je expresia EDA proteínu koncentrovaná na labiálnej strane dentálneho epitelu (G-K). V anteriórnej sledovanej oblasti sa EDA proteín tiež exprimuje vo vnútornej vrstve buniek vestibulárneho epitelu (oranžová hviezdička) (B-K). EDA pozitívne bunky je možné detegovať aj v orálnom epiteli medzi zubným zárodokom a vestibulárnym epitelom (G). V posteriórnej sledovanej oblasti nie je v dentálnom epiteli detegovateľná expresia EDA proteínu (N-P) EDA proteín sa v posteriórnej sledovanej oblasti exprimuje výlučne v strednej vrstve epitelových buniek základu *vestibulum oris* (L-P). Škála predstavuje 100  $\mu$ m.

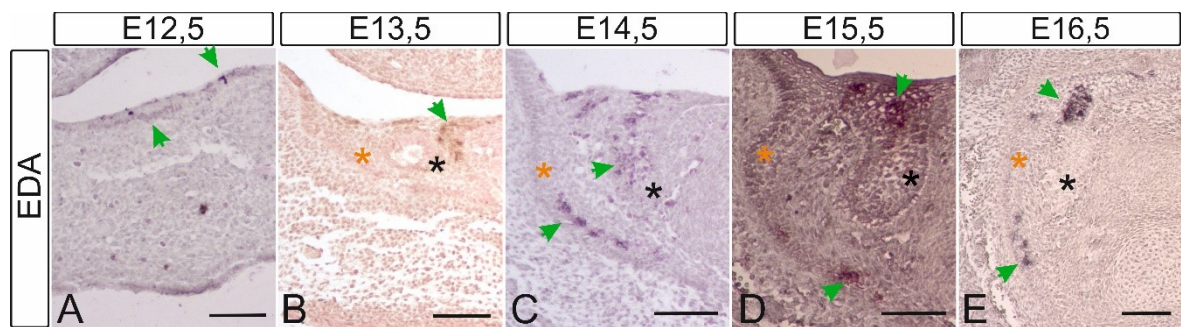


**Obrázok 4.13: Expresia EDA proteínu na semisérii frontálnych histologických rezov rezákovou oblasťou mandibuly myšieho embrya E15,5 (504 mg).** V anteriórnej sledovanej oblasti je na E15,5 pozorovateľná expresia v dentálnom epiteli (čierna hviezdička) v oblasti epitelových mostíkov (A-J). Intenzívna expresia EDA proteínu je prítomná v zhluku buniek na báze zubného zárodku v oblasti epitelovej stopky zubného zárodku (E-J). V anteriórnej sledovanej oblasti je možné nájsť zhluky EDA pozitívnych buniek v základe *vestibulum oris* (oranžová hviezdička) (E-K). V posteriórnej sledovanej oblasti nie je expresia EDA proteínu zaznamenateľná v dentálnom epiteli (L-P), ale výhradne v strednej vrstve buniek vestibulárneho epiteli (K-P). Škála predstavuje 100  $\mu\text{m}$ .



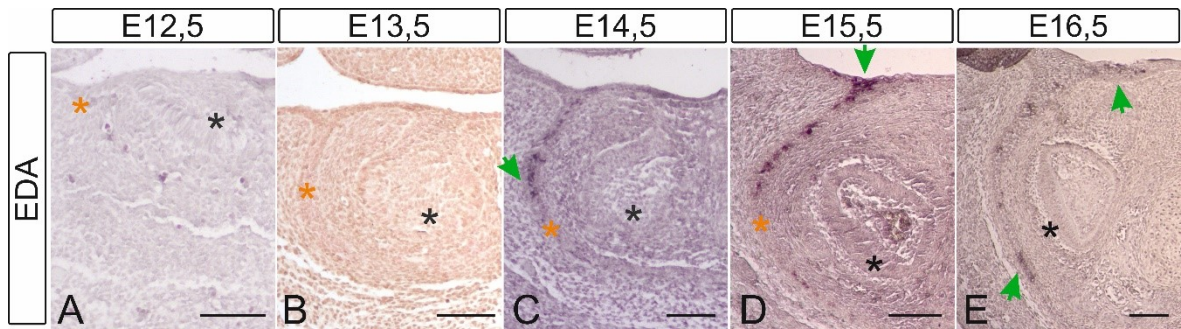
**Obrázok 4.14: Expresia EDA proteínu na semisérii frontálnych histologických rezov rezákovou oblasťou mandibuly myšieho embrya na E16,5 (750 mg).** V anteriórnej sledovanej oblasti je expresia EDA proteínu (zelená šípka) výrazná vo vestibulárnom epiteli (oranžová hviezdička) (A-C). Smerom posteriórne sa expresia EDA proteínu vo vestibulárnom epiteli obmedzuje iba na zhluky pozitívnych buniek (D-P). Na bázi zubného zárodku sa EDA proteín exprimuje v zhluku buniek v oblasti epitelovej stopky (D-I). V posteriornej oblasti zárodka rezáku sa EDA proteín exprimuje v posteriornej časti stopky zubného zárodku priľahlej k vestibulárnemu epiteli (J-P). V posteriornej sledovanej oblasti v dentálnom epiteli (čierna hviezdička) sa EDA proteín neexprimuje vôbec (J-P). Škála predstavuje 100  $\mu$ m.

V anteriórnej sledovanej oblasti sa EDA proteín exprimuje v dentálnom epiteli na všetkých sledovaných vývojových štádiách (E12,5-16,5) (obr. 4.15 a 4.21). Na najvčasnejších štádiách vývoja (E12,5) je expresia EDA proteínu v anteriórnej sledovanej oblasti prítomná v oblasti, kde nie je možné presne stanoviť hranice medzi dentálnym a vestibulárnym epitelom (obr. 4.9D-G, 4.10D-H a 4.15A). Na E13,5-14,5 je expresia EDA proteínu prítomná v dentálnom epiteli v oblasti epitelových mostíkov ktoré prepojujú zubný zárodok s epitelovým základom *vestibulum oris* (obr. 4.11A-E, 4.12A-C a 4.15B-C). Na E15,5-16,5 sa EDA proteín exprimuje v zhluku buniek v oblasti epitelovej stopky na báze epitelu rezákového zárodku (obr. 4.13E-J, 4.14D-I a 4.15D-E). V anteriórnej sledovanej oblasti sa v základe *vestibulum oris* EDA proteín exprimuje na lingválne uloženej bunkovej vrstve, príľahlej k zárodku zubu (obr. 4.12B-K, 4.13E-K, 4.14A-I, 4.15C-E).



**Obrázok 4.15: Expresia EDA proteínu v anteriórnej sledovanej oblasti.** V anteriórnej sledovanej oblasti sa EDA proteín (zelená šípka) exprimuje na všetkých sledovaných vývojových štádiách (A-E). Na E12,5 sa EDA proteín anteriórne exprimuje v oblasti, kde nie je možné presne stanoviť hranicu medzi dentálnym a vestibulárnym epitelom (A). Na E13,5-14,5 sa EDA proteín exprimuje v dentálnom epiteli (čierna hviezdička) v oblasti epitelových mostíkov anteriórne príľahlých k základu *vestibulum oris* (oranžová hviezdička) (B-C). Na E15,5-16,5 sa EDA proteín exprimuje v zhluku buniek v oblasti stopky na báze zubného zárodku (D-E). Vo vestibulárnom epiteli je expresia EDA proteínu na E14,5-16,5 koncentrovaná v lingválne uloženej bunkovej vrstve (D-E). Škála predstavuje 100  $\mu$ m.

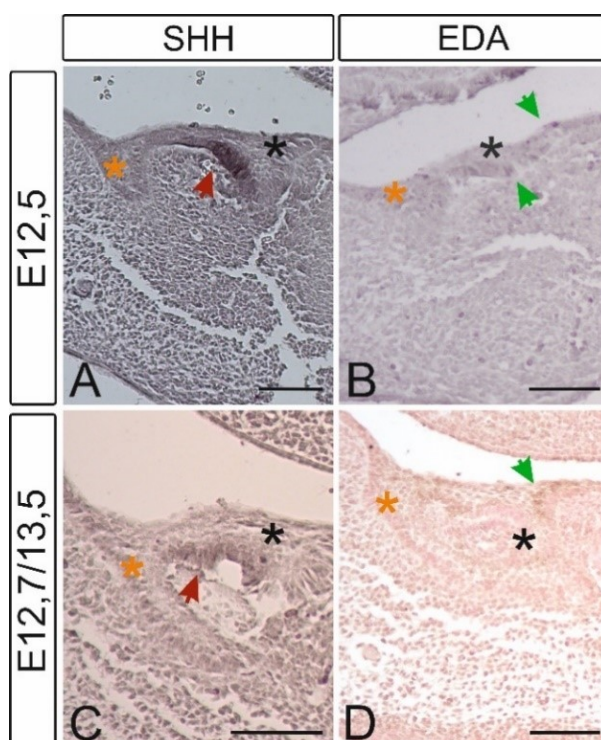
V posteriórnej sledovanej oblasti zárodka rezáku sa v dentálnom epiteli EDA proteín neexprimuje na žiadnom sledovanom vývojovom štádiu (E12,5-16,5) (obr. 4.16 a 4.21). EDA proteín sa exprimuje v strednej vrstve buniek vestibulárneho epitelu (obr. 4.16C-D).



**Obrázok 4.16: Expresia EDA proteínu v posteriórnej sledovanej oblasti zárodka rezáku.** V posteriórnej sledovanej oblasti sa EDA proteín (zelená šípka) v dentálnom epiteli (čierna hviezdička) neexprimuje na žiadnom sledovanom štádiu (A-E). V zodpovedajúcej oblasti sa na E14,5-16,5 EDA proteín exprimuje vo vestibulárnom epiteli (oranžová hviezdička) v strednej vrstve buniek (C-E). Na E16.5 sa EDA proteín exprimuje v orálnom epiteli priehajúcom k epitelovej stopke zubného zárodku (E). Škála predstavuje 100  $\mu$ m.

## 4.3 Porovnanie expresie SHH a EDA proteínov

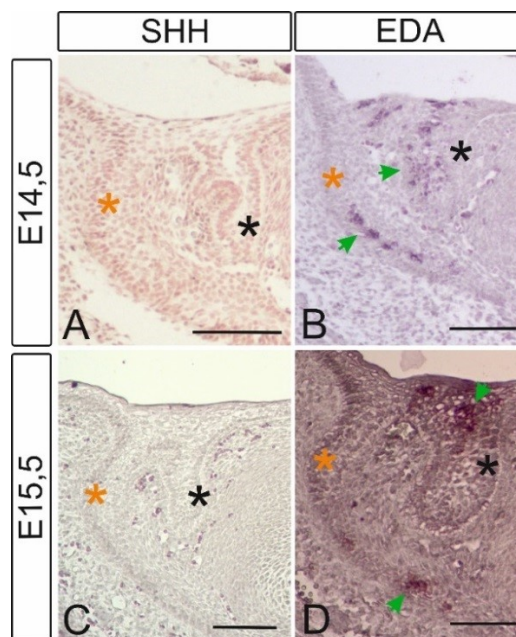
V anteriórnej sledovanej oblasti sa na včasných štádiách vývoja (E12,5-12,7) exprimujú oba proteíny, SHH i EDA (obr. 4.17 a 4.21). EDA proteín sa exprimuje v dentálnom epiteli v oblasti epitelových mostíkov, ktoré prepojujú dentálny epitel s epitelovým základom *vestibulum oris* (obr. 4.17C,D). V labiálnej bazálnej oblasti dentálneho epitelu vybiehajúcej do oblasti epitelových mostíkov sa exprimuje aj proteín SHH (4-17A,C). Na E13,5 nie je v tejto oblasti SHH proteín detegovateľný, ale vizualizácia expresie EDA proteínu zostáva prítomná (obr. 4.17D).



**Obrázok 4.17: Porovnanie expresie proteínov SHH a EDA v anteriórnej sledovanej oblasti na včasných vývojových štádiách E12,5-13,5.** Na E12,5-12,7 sa oba sledované proteíny, SHH (červená šípka) a EDA (zelená šípka) exprimujú v oblasti epitelových mostíkov (A-C). Na E13,5 nie je v tejto oblasti SHH proteín detegovateľný, ale expresia EDA proteínu zostáva prítomná (D). Čierna hviezdička – dentálny epitel, oranžová hviezdička – vestibulárny epitel.

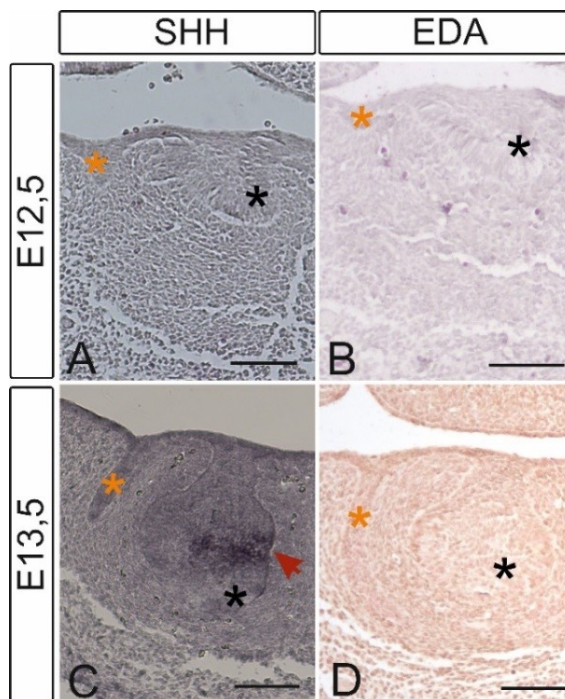


Na E14,5-15,5 sa v dentálnom epiteli v anteriórnej sledovanej oblasti exprimuje iba EDA proteín, SHH proteín sa v tejto oblasti neexprimuje (obr. 4.18 a 4.21). Na E14,5 expresia EDA proteínu difúzne vyplňuje dentálny epitel v oblasti epitelových mostíkov (obr. 4.18B) Na E15,5 je expresia EDA proteínu lokalizovaná v oblasti stopky na báze rezákového zárodka (obr. 4.18D). V anteriórnej sledovanej oblasti sa EDA proteín exprimuje vo vnútornej vrstve buniek vestibulárneho epitelu (obr. 4.18C,D).

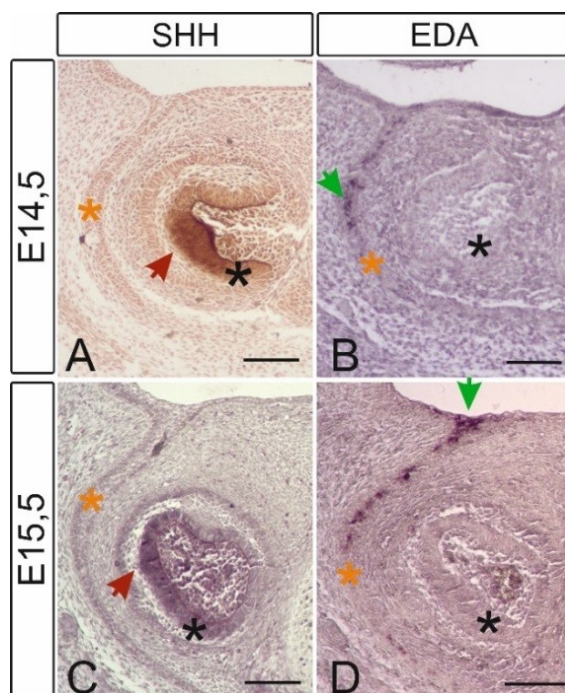


**Obrázok 4.18: Porovnanie expresie proteínov SHH a EDA v anteriórnej sledovanej oblasti na pokročilejších vývojových štádiách E14,5-15,5.** Na E14,5 a E15,5 sa SHH proteín v anteriórnej sledovanej oblasti neexprimuje (A,C). Na E14,5 sa EDA proteín exprimuje v dentálnom epiteli v oblasti epitelových mostíkov. Na E15,5 je expresia EDA proteínu (zelená šípka) koncentrovaná do zhľuku buniek v oblasti stopky na báze zubného zárodka (B, D). Čierna hviezdička – dentálny epitel, oranžová hviezdička – vestibulárny epitel.

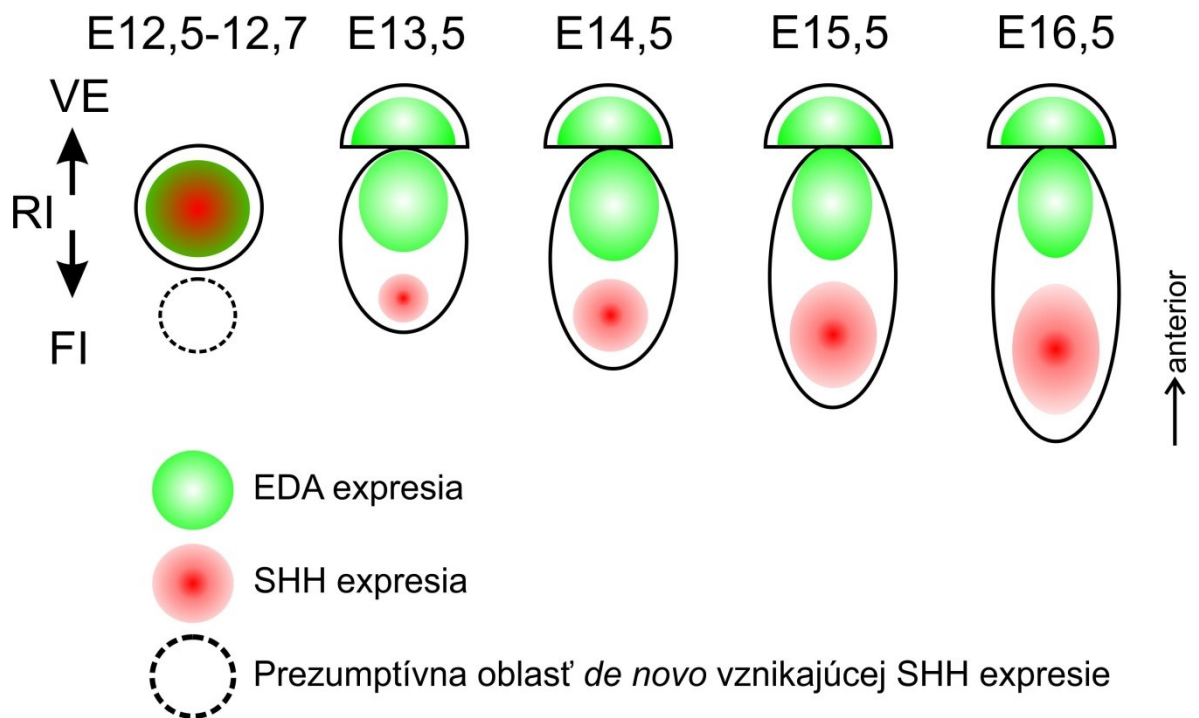
V posteriórnej sledovanej oblasti zárodka rezáku sa v dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti zubného zárodka exprimuje iba SHH proteín, EDA proteín sa v tejto oblasti neexprimuje na žiadnom sledovanom štádiu (obr. 4.19, 4.20 a 4.21). Na E13,5, je v dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti zárodka rezáku expresia SHH proteínu detegovateľná v bunkách prilahlých k mezenchýmu (obr. 4.19C). Na E14,5-15,5 sa proteín SHH exprimuje vo vnútornom sklovinnom epiteli (obr. 4.20A,C). V posteriórnej sledovanej oblasti sa na pokročilých štádiách vývoja EDA proteín exprimuje vo vestibulárnom epiteli v strednej vrstve buniek (obr. 4.20B-D).



**Obrázok 4.19: Porovnanie expresie proteínov SHH a EDA v posteriórnej sledovanej oblasti na včasných vývojových štádiách E12,5-13,5.** V posteriórnej sledovanej oblasti sa na E12,5 v dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti zubného zárodku neexprimuje ani jeden zo sledovaných proteínov (A-B). Na E13,5 sa SHH proteín (červená šípka) exprimuje v dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti zubného zárodku (C). Na E13,5 sa EDA proteín v dentálnom epiteli na vrchole epitelovej časti zubného zárodku neexprimuje (D). Čierna hviezdička - dentálny epitel, oranžová hviezdička - vestibulárny epitel.



**Obrázok 4.20: Porovnanie expresie proteínov SHH a EDA v posteriórnej sledovanej oblasti na pokročilejších štádiách vývoja E14,5-15,5.** Na E14,5-15,5 sa SHH proteín (červená šípka) exprimuje vo vnútornom sklovinnom epiteli na vrchole epitelovej časti zubného zárodku (A,C). Na E14,5-15,5 sa EDA proteín (zelená šípka) v dentálnom epiteli sklovinného orgánu neexprimuje vôbec (B,D), expresia EDA proteínu je detegovateľná v strednej vrstve buniek vestibulárneho epitelu (B,D). Čierna hviezdička - dentálny epitel, oranžová hviezdička - vestibulárny epitel.



**Obrázok 4.21: Schéma sledovanej časopriestorovej dynamiky expresie proteínov SHH a EDA naprieč vývojovými štádiami E12,5-16,5.** Na E12,5 sa SHH proteín exprimuje v anteriornej superficiálnej oblasti základu rezáku. E12,5 je vývojovo príliš málo pokročilé štádium, dentálny epitel vykazuje morfológiu včasného pupeňa a v oblasti dentálneho epitelu teda ešte nie je prítomná oblasť funkčného rezáku. Preto na tomto štádiu nie je možné determinovať v zubnom zárodku oblasť zodpovedajúcu posteriórnej sledovanej oblasti zárodku rezáku na nasledujúcich vývojových štádiách (od E13,5). Na E12,7 dochádza k útlmu anteriornej SHH expresie a na E13,5 sa v posteriórnej sledovanej oblasti *de novo* objavuje nová oblasť expresie SHH proteínu lokalizovaná na vrchole epitelového pupeňa, zodpovedajúca vlastnému signálnemu centru rezáku. EDA proteín sa exprimuje konzistentne naprieč všetkými sledovanými štádiami v anteriornej sledovanej oblasti, ako aj vo vestibulárnom epiteli. FI – functional incisor, RI – rudimentary incisor, VE – vestibular epithelium.

## 5 Diskusia

---

Predložená práca sa zameriava na vývoj dolného rezáku myši v kontexte expresie proteínov SHH a EDA. Bola sledovaná expresia proteínov SHH a EDA v prednej časti mandibuly od E12,5 do E16,5.

Najčastejšie sa vo vývojovej biológii pre posúdenie pokročilosti vývoja využíva metóda chronologického určenia štádia embryí. Odobrané embryá však môžu vykazovať značnú variabilitu nielen medzi jednotlivými vrhmi, ale i v rámci jedného embryonálneho dňa medzi sebou. To znamená, že embryá toho istého chronologického veku majú odlišný biologický vek. Nesúlad biologického veku embryí z toho istého vrhu spôsobuje mnoho faktorov. Nejde len o epigenetické faktory, ale aj o množstvo iných faktorov, ako napríklad miesto, kde dôjde k nidácii zygoty a počet embryí, ktoré sú viazané na danú oblasť maternice. Vývojové zmeny často prebiehajú veľmi rýchlo a hrubé členenie v rozmedzí embryonálnych dní sa preto javí ako nedostatočné. Preto je možné na začlenenie embryí do štádií využiť okrem chronologického veku v embryonálnych dňoch aj telesnú hmotnosť, ktorá dobre koreluje so štádiom zubného vývoja (Peterka et al., 2002). Vďaka telesnej hmotnosti je možné homogenizovať experimentálnu skupinu a usporiadať embryá v rámci jednotlivých chronologických štádií do radu podľa pokročilosti vývoja. Na základe týchto kritérií bola v tejto práci vytvorená longitudinálna vývojová rada myších embryí od E12,5 do E16,5 (tab. 3.2) s cieľom zachytiť reprezentatívne štádiá zubného vývoja od zubného pupeňa po pokročilý pohárik.

Anteriórna oblasť zárodka rezáku v dolnej i hornej čeľusti predstavuje miesto, kde sa podľa niektorých autorov zakladá rudimentárna generácia zubov (Woodward, 1894; Fitzgerald, 1973; Hovorakova et al., 2011). Za marker zubného vývoja v epiteli je považovaný gén *Shh*. Do súvislosti s vývojom zubov sa gén *Shh* dostal po objavení jeho expresie v zubných zárodkoch (Bitgood and McMahon, 1995). V literatúre je väčšinou možné dočítať sa o odontogénnej *Shh* doméne, ktorá zodpovedá budúcemu funkčnému rezáku. Uvádza sa, že dochádza k down-regulácii intenzívnej *Shh* expresie v štádiu včasného pupeňa (E12,5). Následne *Shh* gén reiniciuje svoju expresiu na vrchole pokročilého pupeňa (E13,5) (Seppala et al., 2017). Recentné štúdie však ukázali, že včasná superficiálna expresia génu *Shh*, objavujúca sa v anteriórnej oblasti

mandibuly v štádiu epitelového zhrubnutia až včasného pupeňa na E12,5, nie je len časovo, ale i priestorovo diskontinuitná v porovnaní s neskoršou expresiou v štádiu pokročilého pupeňa, a že teda nezodpovedá *de novo* sa objavujúcemu signálnemu centru funkčného rezáku na E13,5, ktoré je lokalizované posteriórne a zanorené hlbšie v mezenchýme (Hovorakova et al., 2011; Ahtiainen et al., 2016).

Anteriórnu doménu expresie *Shh* detegovali Hovorakova et al. (2011) od E12,5 do E13,5 (t.j. u embryí od 98 mg do 164 mg). V predloženej práci bola v zodpovedajúcom priestore identifikovaná intenzívna expresia SHH proteínu – teda produktu *Shh* génu, v oblasti epitelových mostíkov na E12,5 (104mg obr. 4.2), čo je štádium približne medzi E12,5 (98mg) a E13 (118mg) (Hovorakova et al., 2011). Na E13 (118 mg) boli popísané dve prilahlé vedľa seba ležiace domény expresie *Shh* génu v anteriórnej oblasti zárodku rezáku, ktoré zodpovedali dvom distinktným epitelovým mostíkom (Hovorakova et al., 2011). Prezentované výsledky jasne dokumentujú morfológicky odlišiteľné distinktné epitelové mostíky na imunohistochemicky značených vzorkách (E12,5 104 mg, obr. 4.2). Expresia SHH proteínu je lokalizovaná v tejto oblasti.

Na E12,7 (135 mg) bola expresia SHH proteínu lokalizovaná obdobným spôsobom, avšak vizualizovaný signál SHH expresie bol výrazne menej intenzívny ako na E12,5, čo môže značiť postupné miznutie SHH proteínu z oblasti epitelových mostíkov. Toto zodpovedá faktu, že expresia *Shh* génu v oblasti anteriórnej domény sa v tomto období vypína (Hovorakova et al., 2011), čo má za následok aj útlm expresie SHH proteínu.

Na základe *in situ* hybridizácie bolo zistené, že na E13,5 je prechodne možné zachytiť súčasne ko-existenciu miznúcej expresie *Shh* génu v anteriórnej superficiálnej oblasti a nastupujúcej expresie v oblasti signálneho centra základu funkčného rezáku, lokalizovanej viac posteriórne (Hovorakova et al., 2011). Takáto situácia v rámci výsledkov predloženej práce nebola zachytená. Na vývojovo menej pokročilých embryách na E13,5 (149 mg) nebola detegovaná expresia SHH proteínu vôbec, ani v anteriórnej, ani v posteriórnej sledovanej oblasti. Posteriórna expresia SHH proteínu bola identifikovaná na vrchole pokročilého pupeňa až na štádiu E13,5 (193 mg). Oneskorenie zachytenia expresie proteínu voči expresii génu je pravdepodobne spôsobené časovým posunom v translácii produktu expresie génu, čiže v čase začiatku expresie génu ešte množstvo translatovaného proteínu nie je

detegovateľné použitou metodikou. Bolo ukázané, že na E13,5 (174 mg) sa *Shh* gén exprimuje iba na vrchole rezákového pupeňa, pričom anteriórna oblasť už je *Shh* negatívna, teda anteriórna transkripčná doména už nie je aktívna. (Hovorakova et al., 2011). Toto zistenie korešponduje s prezentovanými výsledkami na E13,5 (193mg), kedy bola zachytená expresia SHH proteínu v posteriórnej oblasti na vrchole zubného pupeňa vyvíjajúceho sa rezáku (obr. 4.4).

Na základe predložených výsledkov je možné konštatovať, že SHH proteín sa teda podobne ako *Shh* gén exprimuje v štádiu včasného pupeňa v odlišnej oblasti, ako sa exprimuje v štádiu pokročilého pupeňa, pohárika a zvončeka, a že teda tieto dve expresie sú časovo aj priestorovo oddelené a reflektujú dva rôzne vývojové fenomény vo vývoji myšieho rezáku. Na raných štádiách vývoja sa SHH proteín exprimuje v oblasti anteriórnej iniciačnej odontogénnej domény, zatiaľ čo na pokročilých štádiách vývoja sa exprimuje v oblasti posteriórnej odontogénnej domény, reprezentujúcej signálne centrum vyvíjajúceho sa funkčného rezáku.

Anteriórna *Shh* pozitívna doména sa v oblasti rezáku objavuje pomerne včasne, už na E11 (Dassule and McMahon, 1998). Na E11 predstavuje expresia *Shh* raný marker odontogenézy. SHH pôsobí ako mitogén, ktorý svojou proliferáčnou aktivitou podmieňuje invagináciu dentálneho epitelu do dentálneho mezenchýmu a tým vznik pupeňa (E12) (Cobourne et al., 2001). Táto oblasť expresie je uložená povrchovo, na báze zubného zárodka a slúži ako iniciátor odontogenézy (Hovorakova et al., 2011; Ahtiainen et al., 2016).

Podľa Hovorakova et al. (2011) predstavuje anteriórna doména expresie *Shh* génu v oblasti epitelových mostíkov miesto, kde sa zakladá rudimentárna generácia zubov. Túto hypotézu nedávno podporili Li et al. (2016), ktorí ukázali, že aj počas včasného embryonálneho vývoja pieskomila vzniká v oblasti horného rezáku miniatúrny zúbok. V dentálnom epiteli sa u pieskomila objavuje viacero epitelových návalkov a distinkčných *Shh* transkripčných domén, čo naznačuje existenciu vestigiálnych zubných zárodokov. Pozoruhodné je, že pri explantácii zárodka rezáku pieskomila na štádiu pupeňa a minimalizovaní okolitého mezenchýmu sa zárodok vyvinie do trojitého, dvojitého rezáku, alebo do rezáku, ktorý je podobný rezáku dvojitozubcov (*Lagomorpha*). Pri explantácii zárodka rezáku pieskomila na štádiu pohárika a minimalizovaní okolitého mezenchýmu sa zárodok vyvinie do normálneho rezáku, avšak bez žliabku, typického pre rezák pieskomila. To naznačuje, že funkčný

rezák pieskomila vzniká integráciou viacerých rudimentárnych zárodkov, niektorých na štádiu pupeňa, iných na štádiu pohárika (Li et al., 2016).

Posteriórna doména expresie *Shh* génu sa objavuje na štádiu pokročilého pupeňa (Hovorakova et al., 2011). Podľa prezentovaných výsledkov sa na štádiu pokročilého pupeňa SHH proteín exprimuje na vrchole epitelovej časti zubného zárodku v bunkách dentálneho epitelu, ktoré sú prilahlé k mezenchýmu. Táto oblasť korešponduje s hlboko uloženou, posteriornou doménou expresie *Shh* génu, ktorá nie je v kontakte s orálnym epitelom (Hovorakova et al., 2011). Spolu so vznikom sklovinného orgánu sa expresia SHH proteínu rozširuje do oblasti vnútorného sklovinného epitelu (obr 4.5 a 4.6). Úloha SHH proteínu v tejto oblasti je pomerne dobre zdokumentovaná v súvislosti s cytodiferenciáciou zubných tkanív (Dassule et al., 2000). Aktivita SHH proteínu v sklovinnom orgáne je nevyhnutná pre vznik polarizovaných ameloblastov (Gritli-Linde et al., 2002). SHH má na bunky polarizujúci efekt v mnohých ďalších orgánoch, napr. v končatinovom pupeni (Scherz et al., 2007) a v neurálnej trubici (Roelink et al., 1994). Okrem toho má SHH úlohu pri prežívaní buniek na vrchole zárodku rezáku, pretože pri jeho absencii dochádza k ich apoptóze (Gritli-Linde et al., 2002), a má účinok i na proliferáciu, a to nielen na štádiu včasného pupeňa, ale aj na štádiu zvončeka (Wu et al., 2003).

EDA signalizácia reguluje expresiu viacerých génov v signálnych centrách, vrátane *Shh* génu, a je zodpovedná za expanziu a vznik sukcesívnych (náhradných) plakód (Mustonen et al., 2004). U EDA deficientných myší, ktoré vykazujú patológie ektodermálnych derivátov, vrátane zubov, dochádza k oneskorenej expresii *Shh* génu v posteriornej oblasti zárodku dolného rezáku. Navyše, u EDA deficientných myší bola pozorovaná redukcia posteriornej domény expresie *Shh* génu v porovnaní s výsledkami u wild type myší (nepublikované dáta Mgr. L. Horákovéj). Toto evokuje otázku, či by expresia *Eda* génu v anteriornej superficiálnej oblasti mohla prispievať k iniciácii posteriornej domény expresie *Shh* v zmysle regulácie sukcesívneho signálneho centra. To by mohlo vysvetlovať tiež zmenšenie signálnych centier u EDA deficientných myší, keďže expresia EDA proteínu reguluje veľkosť signálnych centier (Pispa et al., 1999; Mustonen et al., 2004).

Publikácie popisujúce expresiu *Eda* génu skúmajú najčastejšie stoličky (Pispa et al., 1999; Tucker et al., 2000; Laurikkala et al., 2001). Na myších zuboch sa *Eda* gén doteraz skúmal predovšetkým v súvislosti so sklovinnými uzlami a morfogenezou

zubných hrbolčekov. Je však nutné brať do úvahy, že v oblasti stoličiek môže mať *Eda* gén iné funkcie ako v oblasti rezáku.

Bolo popísané, že gén *Eda* sa na štádiu včasného pupeňa (E12-12,5) exprimuje v superficiálnych vrstvách orálneho epitelu, mimo invaginujúceho pupeňa (Tucker et al., 2000; Laurikkala et al., 2001). Prezentované výsledky ukazujú, že EDA proteín sa na raných štádiách exprimuje v anteriórnom orálnom epiteli a v celej rezákovej oblasti v antero-posteriórnom smere mimo vrchol invaginujúceho pupeňa

V štádiu pokročilého pupeňa sa *Eda* gén exprimuje v bazálnych bunkách epitelu pupeňa, mimo jeho vrcholu (Tucker et al., 2000; Laurikkala et al., 2001), ktorý predstavuje prekursor sklovinného uzlu. Po diferenciácii sklovinného orgánu sa expresia *Eda* génu presúva z bazálnych buniek epitelu pupeňa do vonkajšieho sklovinného epitelu (Pispa et al., 1999; Tucker et al., 2000; Laurikkala et al., 2001). V rámci prezentovaných výsledkov však expresia EDA proteínu v sklovinnom orgáne nebola zaznamenaná. Expresia EDA proteínu bola v posteriornejších oblastiach lokalizovaná mimo zubného zárodku, vo vestibulárnom epiteli a v orálnom epiteli priľahlom k základu *vestibulum oris*.

Keďže je EDA proteín sprvu viazaný na membránu a až potom dochádza k jeho štiepeniu, existuje možnosť, že rozpustný EDA proteín difunduje do okolia z buniek, v ktorých boli exprimované transkripty. Naskytuje sa tu i možnosť, že v skutočnosti nebola v predloženej práci detegovaná expresia proteínu EDA (EDA-1), ale zostrihová varianta EDA-2. Tejto skutočnosti by mohlo nasvedčovať to, že EDA-2 transkripty boli nájdené vo vestibulárnom epiteli (Mustonen et al., 2003). Odporuje tomu však popísaná intenzívna expresia EDA-2 transkriptu v epiteli sklovinného orgánu (Mustonen et al., 2003), ktorá v rámci predloženej práce zachytená nebola. Je teda pravdepodobné, že podobne ako u expresie SHH proteínu, ktorého expresia je oneskorená voči expresii *Shh* génu v danej oblasti (viď vyššie), aj u EDA proteínu mohlo dôjsť k oneskoreniu expresie v oblasti sklovinného orgánu a v nami sledovanom poslednom štádiu E16,5 ešte nebolo množstvo prítomného produktu translácie *Eda* génu v sklovinnom orgáne zachytiteľné použitou metodikou.

V predloženej práci sa expresia EDA proteínu v zárodku rezáku konzistentne naprieč štádiami (E12,5-14,5) koncentruje do bazálnej časti zubného zárodku. V zárodku horného rezáku bol popísaný podobný vzor expresie *Eda* génu (Tucker et al., 2000). Autori popisujú expresiu *Eda* génu v rezákovej oblasti v orálnom epiteli

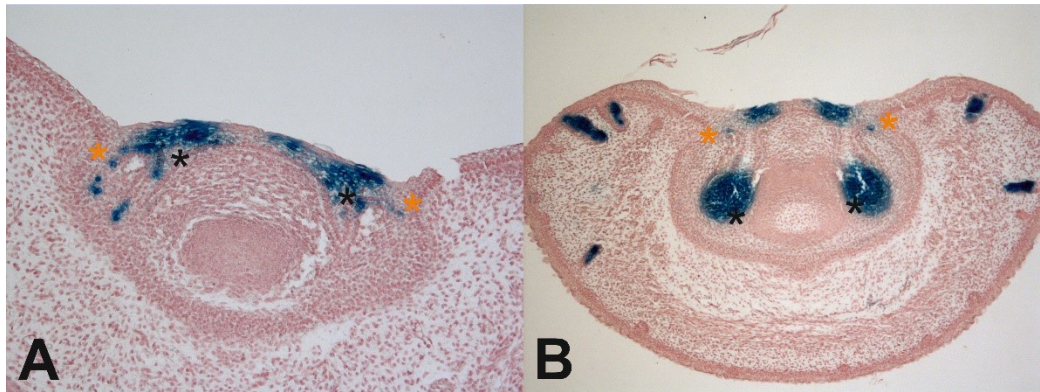


koncentrovanú do mediálnej oblasti zhrubnutého epitelu a orálneho epitelu bilaterálne spájajúceho zubné zárodky rezákov. Tento vzor expresie *Eda* génu je možné sledovať v bazálnej časti dentálneho epitelu do štádia zubného pohárika (Tucker et al., 2000).

V predloženej práci bol detegovaný veľmi slabý disperzne lokalizovaný vizualizovaný signál expresie EDA proteínu na E12,5. Tomuto odpovedajú publikované výsledky niektorých autorov, ktoré popisujú expresiu *Eda* génu na E12 ako slabú (Tucker et al., 2000), prípadne sa nepodarilo detegovať expresiu na štádiu epitelového zhrubnutia (E11) a pupeňa (E13) vôbec (Pispa et al., 1999). Existujú však i práce, kde autori našli expresiu *Eda* génu už na E10, teda ešte pred akoukoľvek morfológickou manifestáciou zubného vývoja (Laurikkala et al., 2001). Výsledky analýz pomocou northern blotu sa prikláňajú k tomu, že *Eda* sa naozaj exprimuje už veľmi včasne (Ferguson et al., 1997; Srivastava et al., 1997). Je ale pravdepodobné, že na detekciu *Eda* génu/proteínu v raných štádiách odontogenézy sú nutné citlivé sondy, popr. detekčné kity (Tucker et al., 2000).

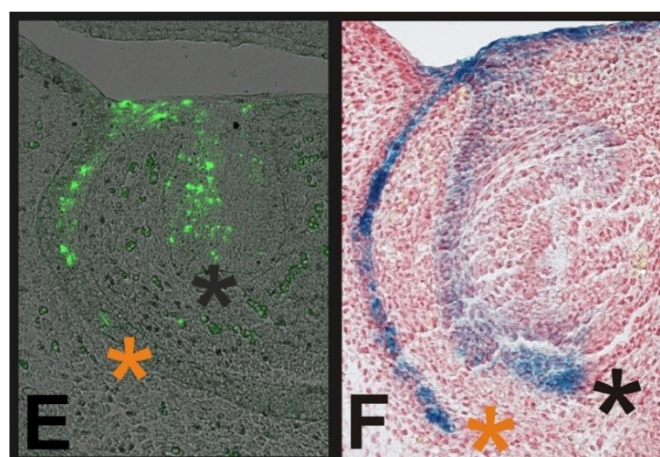
Vo všeobecnosti je zaujímavé, že vo vzťahu k dentícii býva často prehliadaný vestibulárny epitel, vyvíjajúci sa externe od zubných základov. Autori túto štruktúru v texte väčšinou vôbec nespomínajú a takéto informácie bývajú čitateľom objavené náhodou pri prezeraní obrazovej dokumentácie. Niektorí autori špecificky nerozlišujú vestibulárny epitel a priradia ho buď k orálnemu alebo dentálnemu epitelu (Mustonen et al., 2003). Napríklad Alappat et al. (2003) vo svojej práci popisujú ako dentálny epitel celý útvar invaginovaný do mezenchýmu – vrátane vestibulárneho epitelu.

Vo vestibulárnom epiteli sa samotný *Shh* gén neexprimuje. Recentné práce však ukázali, že bunky z anteriórnej domény expresie *Shh* génu sa počas vývoja doposiaľ neobjasneným mechanizmom dostávajú do vestibulárneho epitelu (obr. 5.1 a 5.2) (Hovorakova et al., 2011).



**Obrázok 5.1: Shh descendntné bunky na E16,5.** (A) V anteriórnej superficiálnej oblasti sú *Shh* descendntné bunky lokalizované v dentálnom epiteli (čierna hviezdička) v oblasti epitelových mostíkov na báze zubného zárodku. Epitelové mostíky na báze zubného zárodku predstavujú miesto, kde sa počas včasného vývoja objavuje anteriórna superficiálna *Shh* transkripčná doména (Hovorakova et al., 2011, 2016). Labiálne zasahujú *Shh* descendntné bunky do základu *vestibulum oris* (oranžová hviezdička). (B) V posteriórnej oblasti zárodku rezáku sú *Shh* descendntné bunky lokalizované v dentálnom epiteli (čierna hviezdička) na vrchole epitelovej časti zubného zárodku. V tejto oblasti zubného zárodku sa v pokročilých štádiách vývoja objavuje posteriórna *Shh* transkripčná doména, ktorá predstavuje vlastné signalizačné centrum budúceho funkčného rezáku. *Shh* descendntné bunky sú taktiež prítomné v posteriórnej časti stopky zubného zárodku a vo vestibulárnom epiteli (oranžová hviezdička). (Z archívu Dr. Hovořákovéj).

Výsledky prezentované v predloženej práci ukázali, že vestibulárny epitel je aj v prípade SHH proteínu negatívny. Detegovateľná je v ňom však expresia EDA proteínu, ktorá bola zachytená v podstate na všetkých vývojových štádiách v antero-posteriórnom priebehu vestibulárneho základu. Na viacerých sledovaných štádiách vzor expresie EDA proteínu nápadne kopíruje lokalizáciu *Shh* descendntných buniek (vid' obr. 5.2).



**Obrázok 5.2: Porovnanie lokalizácie fluorescenčne značených EDA pozitívnych buniek a *Shh* descendntných buniek zafarbených X-galom na E14,5.** EDA proteín sa exprimuje na labiálnej strane dentálneho epitelu a vo vnútornej vrstve buniek vestibulárneho epitelu. Expresiu v dentálnom a vestibulárnom epiteli prepája expresia v orálnom epiteli. *Shh* descendntné bunky sú lokalizované v rovnakej oblasti. (Podľa Hovorakova et al. 2016).

Bolo preukázané, že bunky vestibulárneho základu pochádzajú z oblasti, ktorá pôvodne mala odontogénny potenciál, a to z oblasti prvej *Shh* expresie, ktorá bola asociovaná s rudimentárnou generáciou rezákov (Hovorakova et al., 2016). Vo vestibulárnom epiteli sa podľa prezentovaných výsledkov exprimuje EDA proteín, ktorý zodpovedá za expanziu a vznik sukcesívnych plakód (Mustonen et al., 2004). Tento fakt podporuje hypotézu, podľa ktorej môže aberantná expresia odontogénnych proteínov byť zodpovedná za dentálne patológie vo *vestibulum oris* (Hovorakova et al., 2016). Jedným z kandidátov zo skupiny odontogénnych proteínov by mohol byť práve EDA proteín. Na objasnenie funkcie EDA proteínu v tejto oblasti však budú potrebné funkčné experimentálne štúdie.

## 6 Závery

---

I. Bola popísaná časopriestorová dynamika expresie SHH a EDA proteínov:

A. Proteín SHH sa exprimuje v rovnakých oblastiach ako gén *Shh* – v anteriórnej superficiálnej oblasti a v posteriórnej oblasti lokalizovanej v epitelovom základe vlastného funkčného rezáku.

B. V anteriórnej bazálnej časti vyvíjajúcej sa rezákovej oblasti je expresia EDA proteínu prítomná v oblasti epitelových mostíkov na všetkých skúmaných štádiách. Táto oblasť zodpovedá anteriórnej lokalizácii expresie SHH proteínu.

C. V posteriórnej oblasti zárodka vlastného funkčného rezáku sa EDA proteín v dentálnom epiteli sklovinného orgánu neexprimuje.

D. Na všetkých sledovaných štádiách vývoja bola expresia EDA proteínu zachytená vo vestibulárnom epiteli.

II. Bunková populácia anteriórne od zárodka funkčného rezáku, exprimujúca gén *Shh* v ranom embryonálnom vývoji, exprimuje proteíny SHH a EDA, ktoré sú považované za včasné markery epitelovej odontogenézy. Je teda pravdepodobné, že táto oblasť po určitú dobu vývoja vykonáva indukčnú funkciu v zmysle aktivácie odontogenézy a nesie potenciál k tvorbe zubných štruktúr. Aberantnou signalizáciou by mohlo dôjsť k revitalizácii odontogénneho potenciálu buniek anteriórne od zárodka funkčného rezáku a k tvorbe zubných tkanív aj po ukončení aktívnej odontogenetickej etapy zubného vývoja. To by vysvetľovalo etiológiu patológií s výskytom dentálnych tkanív, napr. periférnych odontómov, ktoré sa príležitostne objavujú v predsieni dutiny ústnej. Na detailnejšie pochopenie a vysvetlenie mechanizmu aktivácie tohto potenciálu však budú potrebné funkčné štúdie.

# 7 Zoznam použitej literatúry

---

- Åberg T, Wang X-P, Kim J-H, Yamashiro T, Bei M, Rice R, Ryoo H-M, Thesleff I. 2004. Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. *Dev Biol* 270:76–93.
- Adloff P. 1909. Überreste einer pralactealen Zahnreihe beim Menschen. *Deut Monatsschr Zahnheilk* 11:828–832.
- Ahtiainen L, Uski I, Thesleff I, Mikkola ML. 2016. Early epithelial signaling center governs tooth budding morphogenesis. *J Cell Biol* 214:753–767.
- Aigler SR, Jandzik D, Hatta K, Uesugi K, Stock DW. 2014. Selection and constraint underlie irreversibility of tooth loss in cypriniform fishes. *Proc Natl Acad Sci* 111:7707–7712.
- Alappat S, Zhang ZY, Chen YP. 2003. Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res* 13:429–442.
- Anderson C, Thorsteinsdóttir S, Borycki A-G. 2009. Sonic hedgehog-dependent synthesis of laminin  $\alpha 1$  controls basement membrane assembly in the myotome. *Development* 136:3495–3504.
- Armelin HA. 1973. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:2702–2706.
- Arte S, Parmanen S, Pirinen S, Alaluusua S, Nieminen P. 2013. Candidate Gene Analysis of Tooth Agenesis Identifies Novel Mutations in Six Genes and Suggests Significant Role for WNT and EDA Signaling and Allele Combinations. *PLoS One* 8:e73705.
- Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD. 1994. The Complete DNA Sequence of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology* 202:586–605.
- Balemans W, Van Hul W. 2002. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: A cocktail of modulators. *Dev Biol* 250:231–250.
- Bayés M, Hartung AJ, Ezer S, Pispá J, Thesleff I, Srivastava AK, Kere J. 1998. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Hum Mol Genet* 7:1661–1669.
- Bei M. 2009. Molecular genetics of tooth development. *Curr Opin Genet Dev* 19:504–510.
- Bei M, Maas R. 1998. FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* 125:4325–4333.
- Bitgood MJ, McMahon AP. 1995. Hedgehog and Bmp Genes Are Coexpressed at Many Diverse Sites of Cell–Cell Interaction in the Mouse Embryo. *Dev Biol* 172:126–138.
- Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, Erlacher L, Smolen JS, Graninger WB. 2003. Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. *Arthritis Rheum* 48:2501–2508.
- Bolk L. 1924. Die “Nebenleiste” der Säugetiere und die “Zahndrüsenleiste” der Reptilien. *Deut Monatsschr Zahnheilk* 7:129–137.

- van den Boogaard M-J, Créton M, Bronkhorst Y, van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D, Cune M, Ploos van Amstel HK. 2012. Mutations in *WNT10A* are present in more than half of isolated hypodontia cases. *J Med Genet* 49:327–331.
- Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. 2002. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346:1513–1521.
- Brito JM, Teillet M-A, Le Douarin NM. 2006. An early role for sonic hedgehog from foregut endoderm in jaw development: ensuring neural crest cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11607–11612.
- Brito JM, Teillet M-A, Le Douarin NM. 2008. Induction of mirror-image supernumerary jaws in chicken mandibular mesenchyme by Sonic Hedgehog-producing cells. *Development* 135:2311–2319.
- Brugmann S a, Goodnough LH, Gregorieff A, Leucht P, ten Berge D, Fuerer C, Clevers H, Nusse R, Helms J a. 2007. Wnt signaling mediates regional specification in the vertebrate face. *Development* 134:3283–3295.
- Burdine RD, Chen EB, Kwok SF, Stern MJ. 1997. *egl-17* encodes an invertebrate fibroblast growth factor family member required specifically for sex myoblast migration in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2433–2437.
- Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti K a, Dickson BJ, Basler K. 1999. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99:803–815.
- Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. 1999. Frequent activating mutations of *FGFR3* in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 23:18–20.
- Carlson BM. 2014. *Human Embryology & Developmental Biology*. 5th ed. Philadelphia: Saunders.
- Casal ML, Lewis JR, Mauldin EA, Tardivel A, Ingold K, Favre M, Paradies F, Demotz S, Gaide O, Schneider P. 2007. Significant correction of disease after postnatal administration of recombinant ectodysplasin A in canine X-linked ectodermal dysplasia. *Am J Hum Genet* 81:1050–1056.
- Casci T, Vinós J, Freeman M. 1999. Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* 96:655–665.
- Clauss F, Manière M-C, Obry F, Waltmann E, Hadj-Rabia S, Bodemer C, Alembik Y, Lesot H, Schmittbuhl M. 2008. Dento-craniofacial phenotypes and underlying molecular mechanisms in hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED): a review. *J Dent Res* 87:1089–1099.
- Clevers H. 2000. Axin and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 24:206–208.
- Clouthier DE, Garcia E, Schilling TF. 2010. Regulation of Facial Morphogenesis by Endothelin Signaling: Insights from Mice and Fish. *Am J Med Genet A* 152A:2962–2973.
- Cobourne MT, Hardcastle Z, Sharpe PT. 2001. Sonic hedgehog Regulates Epithelial Proliferation and Cell Survival in the Developing Tooth Germ. *J Dent Res* 80:1974–1979.
- Cobourne MT, Sharpe PT. 2010. Making up the numbers: The molecular control of mammalian dental formula. *Semin Cell Dev Biol* 21:314–324.
- Cohen MM. 1998. Achondroplasia, hypochondroplasia and thanatophoric dysplasia: clinically related skeletal dysplasias that are also related at the molecular level. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27:451–455.

- Courtney JM, Blackburn J, Sharpe PT. 2005. The Ectodysplasin and NF $\kappa$ B signalling pathways in odontogenesis. *Arch Oral Biol* 50:159–163.
- Cui C-Y, Schlessinger D. 2006. EDA Signaling and Skin Appendage Development. *Cell Cycle* 5:2477–2483.
- D'Souza RN, Aberg T, Gaikwad J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I. 1999. Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 126:2911–2920.
- Darwin C. 1875. *The variation of animals and plants under domestication*. 2d ed. London: John Murray.
- Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. 2000. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 127:4775–4785.
- Dassule HR, McMahon AP. 1998. Analysis of Epithelial–Mesenchymal Interactions in the Initial Morphogenesis of the Mammalian Tooth. *Dev Biol* 202:215–227.
- Denaxa M, Sharpe PT, Pachnis V. 2009. The LIM homeodomain transcription factors Lhx6 and Lhx7 are key regulators of mammalian dentition. *Dev Biol* 333:324–336.
- Desbordes SC, Sanson B. 2003. The glypican Dally-like is required for Hedgehog signalling in the embryonic epidermis of *Drosophila*. *Development* 130:6245–6255.
- Dosch R, Gawantka V, Delius H, Blumenstock C, Niehrs C. 1997. Bmp-4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*. *Development* 124:2325–2334.
- Drogemuller C, Distl O, Leeb T. 2001. Partial Deletion of the Bovine ED1 Gene Causes Anhidrotic Ectodermal Dysplasia in Cattle. *Genome Res* 11:1699–1705.
- Elomaa O, Pulkkinen K, Hannelius U, Mikkola M, Saarialho-Kere U, Kere J. 2001. Ectodysplasin is released by proteolytic shedding and binds to the EDAR protein. *Hum Mol Genet* 10:953–962.
- Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. 1999. Interdependent smad and jnk signaling in transforming growth factor- $\beta$ -mediated transcription. *J Biol Chem* 274:37413–37420.
- Ferguson BM, Brockdorff N, Formstone E, Ngyuen T, Kronmiller JE, Zonana J. 1997. Cloning of Tabby, the murine homolog of the human EDA gene: evidence for a membrane-associated protein with a short collagenous domain. *Hum Mol Genet* 6:1589–1594.
- Ferguson CA, Tucker AS, Christensen L, Lau AL, Matzuk MM, Sharpe PT. 1998. Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. *Genes Dev* 12:2636–2649.
- Fete TJ. 2014. Respiratory problems in patients with ectodermal dysplasia syndromes. *Am J Med Genet Part A* 164:2478–2481.
- Fitzgerald LR. 1973. Deciduous incisor teeth of the mouse (*Mus musculus*). *Arch Oral Biol* 18:381–389.
- Franchini A, Ottaviani DM and E. 2006. Cytokines and Invertebrates: TGF- $\beta$  and PDGF. *Curr Pharm Des* 12:3025–3031.
- Fraser GJ, Bloomquist RF, Streelman JT. 2008. A periodic pattern generator for dental diversity. *BMC Biol* 6:32.
- Fraser GJ, Hulsey CD, Bloomquist RF, Uyesugi K, Manley NR, Streelman JT. 2009. An ancient gene network is co-opted for teeth on old and new jaws. *PLoS Biol* 7:0233–0247.

- Gaide O, Schneider P. 2003. Permanent correction of an inherited ectodermal dysplasia with recombinant EDA. *Nat Med* 9:614–618.
- van Genderen C, Okamura RM, Fariñas I, Quo RG, Parslow TG, Bruhn L, Grosschedl R. 1994. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev* 8:2691–2703.
- Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currle DS, Eden C, Kranenburg TA, Hogg T, Poppleton H, Martin J, Finkelstein D, Pounds S, Weiss A, Patay Z, Scoggins M, Ogg R, Pei Y, Yang Z-J, Brun S, Lee Y, Zindy F, Lindsey JC, Taketo MM, Boop FA, Sanford RA, Gajjar A, Clifford SC, Roussel MF, McKinnon PJ, Gutmann DH, Ellison DW, Wechsler-Reya R, Gilbertson RJ. 2010. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature* 468:1095–1099.
- Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML. 2001. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107:513–523.
- Gordon KJ, Blobel GC. 2008. Role of transforming growth factor- $\beta$  superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1782:197–228.
- Grigoriou M, Tucker AS, Sharpe PT, Pachnis V. 1998. Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development* 125:2063–2074.
- Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP. 2002. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development* 129:5323–5337.
- Guzy RD, Stoilov I, Elton TJ, Mecham RP, Ornitz DM. 2015. Fibroblast growth factor 2 is required for epithelial recovery, but not for pulmonary fibrosis, in response to bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52:116–128.
- Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, Nishida E. 2002. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4:850–858.
- Hanemann JA, Oliveira DT, Garcia NG, Santos MR, Pereira AA. 2013. Peripheral compound odontoma erupting in the gingiva. *Head Face Med* 9:15.
- Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT. 1998. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development* 125:2803–2811.
- Harris MP, Fallon JF, Prum RO. 2002. Shh-Bmp2 signaling module and the evolutionary origin and diversification of feathers. *J Exp Zool* 294:160–176.



- Harris MP, Rohner N, Schwarz H, Perathoner S, Konstantinidis P, Nüsslein-Volhard C. 2008. Zebrafish *eda* and *edar* mutants reveal conserved and ancestral roles of ectodysplasin signaling in vertebrates. *PLoS Genet* 4:e1000206.
- Hattab FN, Yassin OM, Sasa IS. 1998. Oral manifestations of Ellis-van Creveld syndrome: report of two siblings with unusual dental anomalies. *J Clin Pediatr Dent* 22:159–165.
- Haworth KE, Wilson JM, Grevellec A, Cobourne MT, Healy C, Helms JA, Sharpe PT, Tucker AS. 2007. Sonic hedgehog in the pharyngeal endoderm controls arch pattern via regulation of *Fgf8* in head ectoderm. *Dev Biol* 303:244–258.
- Headon DJ, Emmal SA, Ferguson BM, Tucker AS, Justice MJ, Sharpe PT, Zonana J, Overbeek PA. 2001. Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature* 414:913–916.
- Heikinheimo M, Lawshé A, Shackelford GM, Wilson DB, MacArthur CA. 1994. *Fgf-8* expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system. *Mech Dev* 48:129–138.
- Hinck AP. 2012. Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors - Insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily. *FEBS Lett* 586:1860–1870.
- Hobmayer B, Rentzsch F, Kuhn K, Happel CM, von Laue CC, Snyder P, Rothbacher U, Holstein TW. 2000. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* 407:186–189.
- Houghton L, Lindon C, Morgan BA. 2005. The ectodysplasin pathway in feather tract development. *Development* 132:863-872.
- 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)* 209:303–313.
- 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* 115:280–287.
- Hovorakova M, Lochovska K, Zahradnicek O, Domonkosova Tibenska K, Dornhoferova M, Horakova-Smrckova L, Bodorikova S. 2016. One Odontogenic Cell-Population Contributes to the Development of the Mouse Incisors and of the Oral Vestibule. *PLoS One* 11:e0162523.
- Hovorakova M, Prochazka J, Lesot H, Smrckova L, Churava S, Boran T, Kozmik Z, Klein O, Peterkova R, Peterka M. 2011. *Shh* expression in a rudimentary tooth offers new insights into development of the mouse incisor. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol* 316B:347–358.
- Hovorakova M, Smrckova L, Lesot H, Lochovska K, Peterka M, Peterkova R. 2013. Sequential *Shh* expression in the development of the mouse upper functional incisor. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol* 320B:455-464.
- Hu D, Marcucio RS. 2009. Unique organization of the frontonasal ectodermal zone in birds and mammals. *Dev Biol* 325:200–210.
- Hu D, Marcucio RS, Helms J a. 2003. A zone of frontonasal ectoderm regulates patterning and growth in the face. *Development* 130:1749–1758.

- Huang Z, Wang D, Ihida-Stansbury K, Jones PL, Martin JF. 2009. Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum Mol Genet* 18:2791–2801.
- Huh S-H, Närhi K, Lindfors PH, Häärä O, Yang L, Ornitz DM, Mikkola ML. 2013. Fgf20 governs formation of primary and secondary dermal condensations in developing hair follicles. *Genes Dev* 27:450–458.
- Huminięcki L, Goldovsky L, Freilich S, Moustakas A, Ouzounis C, Heldin C-H. 2009. Emergence, development and diversification of the TGF- $\beta$  signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evol Biol* 9:28.
- Chamoun Z. 2001. Skinny Hedgehog, an Acyltransferase Required for Palmitoylation and Activity of the Hedgehog Signal. *Science* 293:2080–2084.
- Chavez-Lomeli ME, Mansilla Lory J, Pompa JA, Kjaer I. 1996. The Human Mandibular Canal Arises from Three Separate Canals Innervating Different Tooth Groups. *J Dent Res* 75:1540–1544.
- Chen MH, Li YJ, Kawakami T, Xu SM, Chuang PT. 2004. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* 18:641–659.
- Chen Y, Bei M, Woo I, Satokata I, Maas R. 1996. Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development* 122:3035–3044.
- Ide F, Mishima K, Saito I, Kusama K. 2008. Rare peripheral odontogenic tumors: report of 5 cases and comprehensive review of the literature. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 106:e22–e28.
- Ide F, Shimoyama T, Horie N. 2000. Gingival Peripheral Odontoma in an Adult: Case Report. *J Periodontol* 71:830–832.
- Iida Y, Hibiya K, Inohaya K, Kudo A. 2014. Eda/Edar signaling guides fin ray formation with preceding osteoblast differentiation, as revealed by analyses of the medaka all-fin less mutant *afl*. *Dev Dyn* 243:765–777.
- Israël A. 2000. The IKK complex: An integrator of all signals that activate NF- $\kappa$ B? *Trends Cell Biol* 10:129–133.
- Itman C, Mendis S, Barakat B, Loveland KL. 2006. All in the family: TGF-beta family action in testis development. *Reproduction* 132:233–246.
- Itoh F, Asao H, Sugamura K, Heldin CH, Ten Dijke P, Itoh S. 2001. Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *EMBO J* 20:4132–4142.
- Jakobsen J, Jørgensen JørB, Kjær I. 1991. Tooth and bone development in a Danish medieval mandible with unilateral absence of the mandibular canal. *Am J Phys Anthropol* 85:15–23.
- Jensen PA, Zheng X, Lee T, O'Connor MB. 2009. The Drosophila Activin-like ligand Dawdle signals preferentially through one isoform of the Type-I receptor Baboon. *Mech Dev* 126:950–957.
- Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keranen S, Thesleff I. 1998. The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 125:161–169.

- Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, 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* 38:463–469.
- Jernvall J, Thesleff I. 2000. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 92:19–29.
- Jheon AH, Seidel K, Biehs B, Klein OD. 2013. From molecules to mastication: the development and evolution of teeth. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2:165–182.
- Jussila M, Thesleff I. 2012. Signaling Networks Regulating Tooth Organogenesis and Regeneration, and the Specification of Dental Mesenchymal and Epithelial Cell Lineages. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a008425.
- Kangas AT, Evans AR, Thesleff I, Jernvall J. 2004. Nonindependence of mammalian dental characters. *Nature* 432:211–214.
- Kere J, Srivastava AK, Montonen O, Zonana J, Thomas N, Ferguson B, Munoz F, Morgan D, Clarke A, Baybayan P, Chen EY, Ezer S, Saarialho-Kere U, de la Chapelle A, Schlessinger D. 1996. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nat Genet* 13:409–416.
- Kettunen P, Laurikkala J, Itäranta P, Vainio S, Itoh N, Thesleff I. 2000. Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 219:322–332.
- Kettunen P, Thesleff I. 1998. Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 211:256–268.
- Kieffer S, Peterkova R, Vonesch JL, Ruch J V, Peterka M, Lesot H. 1999. Morphogenesis of the lower incisor in the mouse from the bud to early bell stage. *Int J Dev Biol* 43:531–539.
- Kimura R, Yamaguchi T, Takeda M, Kondo O, Toma T, Haneji K, Hanihara T, Matsukusa H, Kawamura S, Maki K, Osawa M, Ishida H, Oota H. 2009. A Common Variation in EDAR Is a Genetic Determinant of Shovel-Shaped Incisors. *Am J Hum Genet* 85:528–535.
- Kinzler KW, Nilbert MC, Su L-K, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, Finniear R, Markham A, Groffen J, Boguski MS, Altschul SF, Horii A, Ando H, Miyoshi Y, Miki Y, Nishisho I, Nakamura Y. 1991. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253:661–665.
- Kjaer I, Kocsis G, Nodal M, Christensen LR. 1994. Aetiological aspects of mandibular tooth agenesis--focusing on the role of nerve, oral mucosa, and supporting tissues. *Eur J Orthod* 16:371–375.
- Kobayashi T, Lyons KM, McMahon AP, Kronenberg HM, Martin GR. 2005. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proc Natl Acad Sci* 102:18023–18027.
- Kodach LL, Wiercinska E, de Miranda NFCC, Bleuming SA, Musler AR, Peppelenbosch MP, Dekker E, van den Brink GR, van Noesel CJM, Morreau H, Hommes DW, ten Dijke P, Offerhaus GJA, Hardwick JCH. 2008. The Bone Morphogenetic Protein Pathway Is Inactivated in the Majority of Sporadic Colorectal Cancers. *Gastroenterology* 134:1332–1341.e3.

- Kollar EJ, Baird GR. 1969. The influence of the dental papilla on the development of tooth shape in embryonic mouse tooth germs. *Development* 21:131-148.
- Kollar EJ, Baird GR. 1970. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morphol* 24:173-186.
- Köntges G, Lumsden A. 1996. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* 122:3229-3242.
- Kratochwil K, Dull M, Farinas I, Galceran J, Grosschedl R. 1996. Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev* 10:1382-1394.
- 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* 16:3173-3185.
- Krausova M, Korinek V. 2014. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal* 26:570-579.
- Kroeze KL, Boink MA, Sampat-Sardjoepersad SC, Waaijman T, Scheper RJ, Gibbs S. 2012. Autocrine Regulation of Re-Epithelialization After Wounding by Chemokine Receptors CCR1, CCR10, CXCR1, CXCR2, and CXCR3. *J Invest Dermatol* 132:216-225.
- Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. 2012. TGF-beta -- an excellent servant but a bad master. *J Transl Med* 10:183.
- Kugler MC, Joyner AL, Loomis CA, Munger JS. 2015. Sonic Hedgehog Signaling in the Lung. From Development to Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52:1-13.
- Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ, Holstein TW. 2005. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433:156-160.
- Kwon JH, Cho YA, Hyun HK, Shin TJ, Kim YJ. 2013. Gingival peripheral odontoma in a child: Case report of an uncommon lesion. *Open J Stomatol* 3:109-111.
- de Larco JE, Todaro GJ. 1978. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:4001-4005.
- Laurikkala J, Mikkola M, Mustonen T, Aberg T, Koppinen P, Pispá J, Nieminen P, Galceran J, Grosschedl R, Thesleff I. 2001. TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Dev Biol* 229:443-455.
- Laurikkala J, Pispá J, Jung H-S, Nieminen P, Mikkola M, Wang X, Saarialho-Kere U, Galceran J, Grosschedl R, Thesleff I. 2002. Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar. *Development* 129:2541-2553.
- Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT. 1989. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 245:57-60.
- Lefebvre S, Fliniaux I, Schneider P, Mikkola ML. 2012. Identification of Ectodysplasin Target Genes Reveals the Involvement of Chemokines in Hair Development. *J Invest Dermatol* 132:1094-1102.

- Leche W. 1893. Nachtrage zu Studien uber die Entwicklung der Zahnsystems bei Saugetieren. *Morph Jahrb* 20:113–142.
- Lewis JR, Reiter AM, Mauldin EA, Casal ML. 2010. Dental abnormalities associated with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia in dogs. *Orthod Craniofac Res* 13:40–47.
- Li L, Tang Q, Jung H-S. 2016. The Grooved Rodent Incisor Recapitulates Rudimentary Teeth Characteristics of Ancestral Mammals. *J Dent Res* 95:923–930.
- Liem KF, Tremml G, Roelink H, Jessell TM. 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82:969–979.
- Lin C-M, Jiang TX, Widelitz RB, Chuong C-M. 2006. Molecular signaling in feather morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 18:730–741.
- Lindfors PH, Voutilainen M, Mikkola ML. 2013. Ectodysplasin/NF- $\kappa$ B signaling in embryonic mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 18:165–169.
- Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, Harland RM, Massague J. 1996. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 381:620–623.
- Llimargas M, Lawrence PA. 2001. Seven Wnt homologues in *Drosophila*: A case study of the developing tracheae. *Proc Natl Acad Sci* 98:14487–14492.
- Long F, Chung U, Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, McMahon AP. 2004. *Ihh* signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 131:1309–1318.
- Lumsden AG. 1988. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* 103 Suppl:155–169.
- Lyuksyutova AI, Lu C-CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Marc T-L, Zou Y. 2003. Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 302:1984–1988.
- Maas R, Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R. 2000. *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24:391–395.
- MacKenzie A, Ferguson MW, Sharpe PT. 1992. Expression patterns of the homeobox gene, *Hox-8*, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape. *Development* 115:403–420.
- Mackenzie A, Leeming GL, Jowett AK, Ferguson MW, Sharpe PT. 1991. The homeobox gene *Hox 7.1* has specific regional and temporal expression patterns during early murine craniofacial embryogenesis, especially tooth development in vivo and in vitro. *Development* 111:269–285.
- Maclean K. 2006. Humour of gene names lost in translation to patients. *Nature* 439:266–266.
- Marcucio RS, Cordero DR, Hu D, Helms JA. 2005. Molecular interactions coordinating the development of the forebrain and face. *Dev Biol* 284:48–61.
- Mauldin EA, Gaide O, Schneider P, Casal ML. 2009. Neonatal treatment with recombinant ectodysplasin prevents respiratory disease in dogs with X-linked ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet Part A* 149A:2045–2049.

- Meyer M, Müller A-K, Yang J, Moik D, Ponzio G, Ornitz DM, Grose R, Werner S. 2012. FGF receptors 1 and 2 are key regulators of keratinocyte migration in vitro and in wounded skin. *J Cell Sci* 125:5690–5701.
- Meyer W. 1932. *Normale Histologie und Entwicklungsgeschichte der Zähne des Menschen*. München: Lehmann.
- Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15:117–134.
- Mikkola ML, Millar SE. 2006. The Mammary Bud as a Skin Appendage: Unique and Shared Aspects of Development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11:187–203.
- Mikkola ML, Pispá J, Pekkanen M, Paulin L, Nieminen P, Kere J, Thesleff I. 1999. Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mech Dev* 88:133–146.
- Mikkola ML, Thesleff I. 2003. Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:211–224.
- Mina M, Kollar EJ. 1987. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 32:123–127.
- Mitsiadis TA, Mucchielli M-L, Raffo S, Proust J-P, Koopman P, Goridis C. 1998. Expression of the transcription factors *Otlx2*, *Barx1* and *Sox9* during mouse odontogenesis. *Eur J Oral Sci* 106:112–116.
- Mitu G, Hirschberg R. 2008. Bone morphogenetic protein-7 (BMP7) in chronic kidney disease. *Front Biosci* 13:4726–4739.
- Mjør I, Fejerskov O. 1986. *Human oral embryology and histology*. 1th ed. Copenhagen: Muunksgaard.
- Mohler J. 1988. Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics* 120:1061–1072.
- Moss-Salentijn L. 1978. Vestigial teeth in the rabbit, rat and mouse; their relationship to the problem of lacteal dentitions. In: Butler P, Joysey K, editors. *Development, function and evolution of teeth*. London: Academic Press. p 13–29.
- Moustakas A. 2005. Non-Smad TGF- signals. *J Cell Sci* 118:3573–3584.
- Munne PM, Felszeghy S, Jussila M, Suomalainen M, Thesleff I, Jernvall J. 2010. Splitting placodes: effects of bone morphogenetic protein and Activin on the patterning and identity of mouse incisors. *Evol Dev* 12:383–392.
- Mustonen T, Ilmonen M, Pummila M, Kangas AT, Laurikkala J, Jaatinen R, Pispá J, Gaide O, Schneider P, Thesleff I, Mikkola ML. 2004. Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages. *Development* 131:4907–4919.
- Mustonen T, Pispá J, Mikkola ML, Pummila M, Kangas AT, Pakkasjärvi L, Jaatinen R, Thesleff I. 2003. Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1. *Dev Biol* 259:123–136.

- Nakatomi M, Wang X-P, Key D, Lund JJ, Turbe-Doan A, Kist R, Aw A, Chen Y, Maas RL, Peters H. 2010. Genetic interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol* 340:438–449.
- Neubüser A, Peters H, Balling R, Martin GR. 1997. Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* 90:247–255.
- Newton K, French DM, Yan M, Frantz GD, Dixit VM. 2004. Myodegeneration in EDA-A2 transgenic mice is prevented by XEDAR deficiency. *Mol Cell Biol* 24:1608–1613.
- Niewiadomski P, Kong JH, Ahrends R, Ma Y, Humke EW, Khan S, Teruel MN, Novitch BG, Rohatgi R. 2014. Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate hedgehog signaling. *Cell Rep* 6:168–181.
- Nusse R, Varmus HE. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31:99–109.
- Obradovic Wagner D, Sieber C, Bhushan R, Börgermann JH, Graf D, Knaus P. 2010. BMPs: From Bone to Body Morphogenetic Proteins. *Sci Signal* 3:mr1.
- Ohuchi H, Nakagawa T, Yamamoto A, Araga A, Ohata T, Ishimaru Y, Yoshioka H, Kuwana T, Nohno T, Yamasaki M, Itoh N, Noji S. 1997. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* 124:2235–2244.
- Ornitz DM, Itoh N. 2015. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4:215–266.
- Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P. 1992. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol* 12:240–247.
- Oro AE, Higgins K. 2003. Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Dev Biol* 255:238–248.
- Otsuka A, Levesque MP, Dummer R, Kabashima K. 2015. Hedgehog signaling in basal cell carcinoma. *J Dermatol Sci* 78:95–100.
- Ozeki H, Kurihara Y, Tonami K, Watatani S, Kurihara H. 2004. Endothelin-1 regulates the dorsoventral branchial arch patterning in mice. *Mech Dev* 121:387–395.
- Pan Y, Wang B. 2007. A novel protein-processing domain in Gli2 and Gli3 differentially blocks complete protein degradation by the proteasome. *J Biol Chem* 282:10846–10852.
- Peterka M, Lesot H, Peterkova R. 2002. Body Weight in Mouse Embryos Specifies Staging of Tooth Development. *Connect Tissue Res* 43:186–190.
- Peterkova R. 1985. The common developmental origin and phylogenetic aspects of teeth, rugae palatinae, and fornix vestibuli oris in the mouse. *J Craniofac Genet Dev Biol* 5:89–104.
- Peterkova R, Lesot H, Peterka M. 2006. Phylogenetic memory of developing mammalian dentition. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol* 306B:234–250.
- Peterkova R, Peterka M, Viriot L, Lesot H. 2002. Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connect Tissue Res* 43:120–128.

- Peterkova R, Peterka M, Viriot L, Lesot H. 2000. Dentition development and budding morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol* 20:158–172.
- Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. 2000. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407:535–538.
- Pispa J, Jung H-S, Jernvall J, Kettunen P, Mustonen T, Tabata MJ, Kere J, Thesleff I. 1999. Cusp Patterning Defect in Tabby Mouse Teeth and Its Partial Rescue by FGF. *Dev Biol* 216:521–534.
- Pispa J, Thesleff I. 2003. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol* 262:195–205.
- Popovici C, Roubin R, Coulier F, Birnbaum D. 2005. An evolutionary history of the FGF superfamily. *BioEssays* 27:849–857.
- Pummila M, Fliniaux I, Jaatinen R, James MJ, Laurikkala J, Schneider P, Thesleff I, Mikkola ML. 2007. Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression. *Development* 134:117–125.
- Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT, Presley R, Pedersen RA, Rubenstein JLR. 1997. Role of the Dlx Homeobox Genes in Proximodistal Patterning of the Branchial Arches: Mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and -2 Alter Morphogenesis of Proximal Skeletal and Soft Tissue Structures Derived from the First and Second Arches. *Dev Biol* 185:165–184.
- Radlanski R. 1993. Contributions to the development of human deciduous primordia. Carol Stream: Quintessence Publishing.
- Ramsbottom S, Pownall M. 2016. Regulation of Hedgehog Signalling Inside and Outside the Cell. *J Dev Biol* 4:23.
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. 2016. The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50:649–657.
- Roelink H, Augsburger A, Heemskerk J, Korzh V, Norlin S, Ruiz i Altaba A, Tanabe Y, Placzek M, Edlund T, Jessell TM, Dodd J. 1994. Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76:761–775.
- Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui L-C, Muenke M. 1996. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14:357–360.
- Röse C. 1891. Über die Entwicklung der Zähne des Menschen. *Arch Mikr Anat* 38:491.
- Roubin R, Naert K, Popovici C, Vatcher G, Coulier F, Thierry-Mieg J, Pontarotti P, Birnbaum D, Baillie D, Thierry-Mieg D. 1999. let-756, a *C. elegans* fgf essential for worm development. *Oncogene* 18:6741–6747.
- Rubin C, Zwang Y, Vaisman N, Ron D, Yarden Y. 2005. Phosphorylation of carboxyl-terminal tyrosines modulates the specificity of sprouty-2 inhibition of different signaling pathways. *J Biol Chem* 280:9735–9744.
- Rücklin M, Donoghue PCJ. 2015. Romundina and the evolutionary origin of teeth. *Biol Lett* 11:20150326.
- Sadier A, Viriot L, Pantalacci S, Laudet V. 2014. The ectodysplasin pathway: from diseases to adaptations. *Trends Genet* 30:24–31.



- Sadler T. 2012. *Langman's Medical Embryology*. 12th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Santarpia L, Lippman SL, El-Naggar AK. 2012. Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16:103–119.
- Sarkar L, Cobourne M, Naylor S, Smalley M, Dale T, Sharpe PT. 2000. Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4520–4524.
- Sarkar L, Sharpe PT. 1999. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech Dev* 85:197-200
- Sato T, Kurihara Y, Asai R, Kawamura Y, Tonami K, Uchijima Y, Heude E, Ekker M, Levi G, Kurihara H. 2008. An endothelin-1 switch specifies maxillomandibular identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18806–18811.
- Satokata I, Maas R. 1994. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 6:348–356.
- Savage C, Das P, Finelli L, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW. 1996. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Pnas* 93:790–794.
- Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. 1995. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139:1347–1358.
- Seppala M, Fraser G, Birjandi A, Xavier G, Cobourne M. 2017. Sonic Hedgehog Signaling and Development of the Dentition. *J Dev Biol* 5:6.
- Sharpe PT. 1995. Homeobox genes and orofacial development. *Connect Tissue Res* 32:17–25.
- Shi Y, Hata A, Lo RS, Massague J, Pavletich NP. 1997. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 388:87–93.
- Shin SY, Nam J-S, Lim Y, Lee YH. 2010. TNF -exposed Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Promote Locomotion of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through Transcriptional Activation of CXCR3 Ligand Chemokines. *J Biol Chem* 285:30731–30740.
- Scherz PJ, McGlinn E, Nissim S, Tabin CJ. 2007. Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. *Dev Biol* 308:343–354.
- Schmidt-Ullrich R, Tobin DJ, Lenhard D, Schneider P, Paus R, Scheidereit C. 2006. NF- $\kappa$ B transmits Eda A1/EdaR signalling to activate Shh and cyclin D1 expression, and controls post-initiation hair placode down growth. *Development* 133:1045-1057.
- Schneider RA, Hu D, Rubenstein JLR, Maden M, Helms JA. 2001. Local retinoid signaling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining FGF8 and SHH. *Development* 128:2755–2767.
- Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. 2009. *Larsen's Human Embryology*. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone.

- Scholpp S, Wolf O, Brand M, Lumsden A. 2006. Hedgehog signalling from the zona limitans intrathalamica orchestrates patterning of the zebrafish diencephalon. *Development* 133:855–864.
- Schour I. 1929. Early human tooth development, with special reference to the relationship between the dental lamina and the lip furrow band. *J Dent Res* 9:699–711.
- Schulte G, Bryja V. 2007. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28:518–525.
- Schumacher B, Pecher P, Specht BU Von, Stegmann T. 1998. Clinical Investigation and Reports Induction of Neoangiogenesis in Ischemic Myocardium by Human Growth Factors First Clinical Results of a New Treatment of Coronary Heart Disease. :645–650.
- Silva A-RS, Carlos-Bregni R, Vargas P-A, de Almeida O-P, Lopes M-A. 2009. Peripheral developing odontoma in newborn. Report of two cases and literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14:e612-5.
- Sire J-Y, Akimenko M-A. 2004. Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Dev Biol* 48:233–247.
- Smith MM. 2003. Vertebrate dentitions at the origin of jaws: when and how pattern evolved. *Evol Dev* 5:394–413.
- Soukup V, Epperlein H-H, Horacek I, Cerny R. 2008. Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature* 455:795–798.
- Soukup V, Horacek I, Cerny R. 2013. Development and evolution of the vertebrate primary mouth. *J Anat* 222:79–99.
- Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I. 1994. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* 79:1015–1024.
- Srivastava a K, Pispis J, Hartung a J, Du Y, Ezer S, Jenks T, Shimada T, Pekkanen M, Mikkola ML, Ko MS, Thesleff I, Kere J, Schlessinger D. 1997. The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13069–13074.
- Srivastava AK, Durmowicz MC, Hartung AJ, Hudson J, Ouzts L V, Donovan DM, Cui CY, Schlessinger D. 2001. Ectodysplasin-A1 is sufficient to rescue both hair growth and sweat glands in Tabby mice. *Hum Mol Genet* 10:2973–2981.
- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13:2072–2086.
- St.Amand TR, Zhang Y, Semina E V, Zhao X, Hu Y, Nguyen L, Murray JC, Chen Y. 2000. Antagonistic Signals between BMP4 and FGF8 Define the Expression of Pitx1 and Pitx2 in Mouse Tooth-Forming Anlage. *Dev Biol* 217:323–332.
- Stewart A, Guan H, Yang K. 2010. BMP-3 promotes mesenchymal stem cell proliferation through the TGF- $\beta$ /activin signaling pathway. *J Cell Physiol* 223:658–666.

- Su L-K, Vogelstein B, Kinzler KW. 1993. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262:1734–1737.
- Sutherland D, Samakovlis C, Krasnow MA. 1996. *branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87:1091–1101.
- Szabo-Rogers HL, Geetha-Loganathan P, Whiting CJ, Nimmagadda S, Fu K, Richman JM. 2009. Novel skeletogenic patterning roles for the olfactory pit. *Development* 136:219–229.
- Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, Takao T, Takada S. 2006. Monounsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion. *Dev Cell* 11:791–801.
- Tao R, Jin B, Guo SZ, Qing W, Feng GY, Brooks DG, Liu L, Xu J, Li T, Yan Y, He L. 2006. A novel missense mutation of the EDA gene in a Mongolian family with congenital hypodontia. *J Hum Genet* 51:498–502.
- Tarpey P, Pemberton TJ, Stockton DW, Das P, Ninis V, Edkins S, Andrew Futreal P, Wooster R, Kamath S, Nayak R, Stratton MR, Patel PI. 2007. A novel Gln358Glu mutation in ectodysplasin A associated with X-linked dominant incisor hypodontia. *Am J Med Genet Part A* 143A:390–394.
- Taylor FR, Wen D, Garber EA, Carmillo AN, Baker DP, Arduini RM, Williams KP, Weinreb PH, Rayhorn P, Hronowski X, Whitty A, Day ES, Boriack-Sjodin A, Shapiro RI, Galdes A, Pepinsky RB. 2001. Enhanced Potency of Human Sonic Hedgehog by Hydrophobic Modification. *Biochemistry* 40:4359–4371.
- Teven CM, Farina EM, Rivas J, Reid RR. 2014. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes Dis* 1:199–213.
- The I, Bellaiche Y, Perrimon N. 1999. Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol Cell* 4:633–639.
- Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. 1995. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol* 39:35–50.
- Thisse B, Thisse C. 2005. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 287:390–402.
- Thomas BL, Tucker AS, Qui M, Ferguson CA, Hardcastle Z, Rubenstein JL, Sharpe PT. 1997. Role of *Dlx-1* and *Dlx-2* genes in patterning of the murine dentition. *Development* 124:4811–4818.
- Tissier-Seta JP, Mucchielli ML, Mark M, Mattei MG, Golidis C, Brunet JF. 1995. *Barx1*, a new mouse homeodomain transcription factor expressed in cranio-facial ectomesenchyme and the stomach. *Mech Dev* 51:3–15.
- Tonge C. 1969. The Time-Structure Relationship of Tooth Development in. *J Dent Res* 48:745–752.
- Traiffort E, Angot E, Ruat M. 2010. Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J Neurochem* 113:576–590.
- Trokovic R, Jukkola T, Saarimäki J, Peltopuro P, Naserke T, Vogt Weisenhorn DM, Trokovic N, Wurst W, Partanen J. 2005. *Fgfr1*-dependent boundary cells between developing mid- and hindbrain. *Dev Biol* 278:428–439.

- Trowell OA, Willmer EN. 1938. The Effects of Some Tissue Extracts on the Growth of Periosteal Fibroblasts. *J Exp Biol*:60–70.
- Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V. 2006. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 38:1424–1429.
- Tucker A, Headon D, Courtney J-M, Overbeek P, Sharpe P. 2004. The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Dev Biol* 268:185–194.
- Tucker A, Sharpe P. 2004. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet* 5:499–508.
- Tucker AS, Headon DJ, Schneider P, Ferguson BM, Overbeek P, Tschopp J, Sharpe PT. 2000. Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development* 127:4691–4700.
- Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. 1998. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* 282:1136–1138.
- Tummers M, Thesleff I. 2009. The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol* 312B:309–319.
- Turecková J, Sahlberg C, Aberg T, Ruch J V, Thesleff I, Peterkova R. 1995. Comparison of expression of the *msx-1*, *msx-2*, *BMP-2* and *BMP-4* genes in the mouse upper diastemal and molar tooth primordia. *Int J Dev Biol* 39:459–468.
- Urist MR. 1965. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150:893–899.
- Vahtokari A, Aberg T, Jernvall J, Keränen S, Thesleff I. 1996. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech Dev* 54:39–43.
- Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. 1993. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75:45–58.
- Voutilainen M, Lindfors PH, Lefebvre S, Ahtiainen L, Fliniaux I, Rysti E, Murtoniemi M, Schneider P, Schmidt-Ullrich R, Mikkola ML. 2012. Ectodysplasin regulates hormone-independent mammary ductal morphogenesis via NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:5744–5749.
- Wang C, Hennessey JA, Kirkton RD, Wang C, Graham V, Puranam RS, Rosenberg PB, Bursac N, Pitt GS, Cardiology M. 2012. Fibroblast growth factor homologous factor 13 regulates Na<sup>+</sup> channels and conduction velocity in murine heart. *109:775–782*.
- Wang LC, Liu ZY, Gambardella L, Delacour A, Shapiro R, Yang J, Sizing I, Rayhorn P, Garber EA, Benjamin CD, Williams KP, Taylor FR, Barrandon Y, Ling L, Burkly LC. 2000. Conditional disruption of hedgehog signaling pathway defines its critical role in hair development and regeneration. *J Invest Dermatol* 114:901–908.
- Wang X-P, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Wankell M, Werner S, Thesleff I. 2004. Modulation of activin/bone morphogenetic protein signaling by follistatin is required for the morphogenesis of mouse molar teeth. *Dev Dyn* 231:98–108.

- Wang Y, Nathans J. 2007. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* 134:647–658.
- Wilkinson DG, Bailes JA, McMahon AP. 1987. Expression of the proto-oncogene *int-1* is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo. *Cell* 50:79–88.
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, Nusse R. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423:448–452.
- Wong H-C, Bourdelas A, Krauss A, Lee H-J, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi D-L, Zheng J, Axelrod JD, Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N, Bezprozvanny I, Maximov A, Boutros M, Mlodzik M, Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M, Cadigan KM, Nusse R, Cheyette BN, Waxman JS, Miller JR, Takemaru K, Sheldahl LC, Khlebtsova N, Fox EP, Earnest T, Moon RT, Cowburn D, Daniels DL, Cohen AR, Anderson JM, Brunger AT, Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A, Djiane A, Riou JF, Umbhauer M, Shi DL, Gloy J, Hikasa H, Sokol SY, Guntert P, Braun W, Wuthrich K, Guntert P, Mumenthaler C, Wuthrich K, Hillier BJ, Christopherson KS, Prehoda KE, Brecht DS, Lim WA, Hung AY, Sheng M, Krasnow RE, Wong LL, Adler PN, Li L, Yuan H, Xie W, Mao J, Caruso AM, McMahon A, Sussman DJ, Wu D, Moon RT, Shah K, Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N, Noordermeer J, Klingensmith J, Perrimon N, Nusse R, Nooren IM, Thornton JM, Park M, Moon RT, Rothbacher U, Laurent MN, Dewardoff MA, Klein PS, Cho KW, Fraser SE, Rousset R, Mack JA, et al. 2003. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* 12:1251–1260.
- Woodward M. 1894. On the milk dentition of the rodentia, with a description of a vestigial milk incisor in the mouse (*Mus musculus*). *Anat Anz* 9:619–631.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. 1988. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242:1528–1534.
- Wu C, Shimo T, Liu M, Pacifici M, Koyama E. 2003. Sonic hedgehog functions as a mitogen during bell stage of odontogenesis. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:92–96.
- Xiao Y, Thoresen DT, Miao L, Williams JS, Wang C, Atit RP, Wong SY, Brownell I. 2016. A Cascade of Wnt, Eda, and Shh Signaling Is Essential for Touch Dome Merkel Cell Development. *PLOS Genet* 12:e1006150.
- Yamanaka Y, Lanner F, Rossant J. 2010. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* 137:715–724.
- Yan M, Wang LC, Hymowitz SG, Schilbach S, Lee J, Goddard A, de Vos AM, Gao WQ, Dixit VM. 2000. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science* 290:523–527.
- Yates CC, Whaley D, Hooda S, Hebda PA, Bodnar RJ, Wells A. 2009. Delayed reepithelialization and basement membrane regeneration after wounding in mice lacking CXCR3. *Wound Repair Regen* 17:34–41.
- Yoshikawa DK, Kollar EJ. 1981. Recombination experiments on the odontogenic roles of mouse dental papilla and dental sac tissues in ocular grafts. *Arch Oral Biol* 26:303–307.
- Zaffran S, Kelly RG. 2012. New developments in the second heart field. *Differentiation* 84:17–24.

- Zeng X, Goetz JA, Suber LM, Scott WJ, Schreiner CM, Robbins DJ. 2001. A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 411:716–720.
- Zhang Y, Tomann P, Andl T, Gallant NM, Huelsken J, Jerchow B, Birchmeier W, Paus R, Piccolo S, Mikkola ML, Morrisey EE, Overbeek PA, Scheidereit C, Millar SE, Schmidt-Ullrich R. 2009a. Reciprocal Requirements for EDA/EDAR/NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathways in Hair Follicle Induction. *Dev Cell* 17:49–61.
- Zhang Y, Wang S, Song Y, Han J, Chai Y, Chen Y. 2003. Timing of odontogenic neural crest cell migration and tooth-forming capability in mice. *Dev Dyn* 226:713–718.
- Zhang Y, Zhang Z, Zhao X, Yu X, Hu Y, Geronimo B, Fromm SH, Chen YP. 2000. A new function of BMP4: dual role for BMP4 in regulation of Sonic hedgehog expression in the mouse tooth germ. *Development* 127:1431–1443.
- Zhang Y, Zhao X, Hu Y, St. Amand T, Zhang M, Ramamurthy R, Qiu M, Chen Y. 1999. Msx1 is required for the induction of Patched by Sonic hedgehog in the mammalian tooth germ. *Dev Dyn* 215:45–53.
- Zhang Z, Lan Y, Chai Y, Jiang R. 2009b. Antagonistic actions of Msx1 and Osr2 pattern mammalian teeth into a single row. *Science* 323:1232–1234.
- Zou H, Niswander L. 1996. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* 272:738–741.

### **Internetové zdroje**

- <http://2.bp.blogspot.com/-OhCyLNRe3Cc/UfaSDCPhpI/AAAAAAAAADks/p5syBVESW6k/s1600/15-4.jpg>
- <https://clinicaltrials.gov/NCT01775462>
- [https://en.wikipedia.org/wiki/Hedgehog\\_signaling\\_pathway#/media/File:Sonic\\_hedgehog\\_pathway.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Hedgehog_signaling_pathway#/media/File:Sonic_hedgehog_pathway.svg)
- [http://wormbook.org/chapters/www\\_wntsignaling.2/wntsignal.html](http://wormbook.org/chapters/www_wntsignaling.2/wntsignal.html)