

Středoškolská Odborná Činnost



**AKTIVITA
KMENOVÝCH BUNĚK
V MYŠÍCH ŘEZÁCÍCH
PO JEJICH POŠKOZENÍ**

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 4

Aktivita kmenových buněk v myších řezácích po jejich poškození

Stem cells activity in mouse incisors after damage

Autor: Štěpánka Keprtová

Škola: Gymnázium Blansko, p. o., Seifertova 13, Blansko

Kraj: Jihomoravský kraj

Vedoucí práce: Mgr. Jan Křivánek, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Josef Lavický

Marcos González López, M.Sc.

Nikola Eva Mádlová

Brno 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval(a) samostatně a použil(a) jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v seznamu vloženém v práci SOČ.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V ...Adamově... dne ...28.2. ... podpis: Štěpánka Kopecká



jihomoravský kraj

MUNI
MED



Poděkování

Na tomto místě bych moc ráda poděkovala především vedoucímu této práce, Mgr. Janu Křivánkovi, Ph.D., který mě svým nadšením do vědy motivoval a inspiroval během celého procesu mé odborné činnosti, jejíž výsledky jsou shrnuty na následujících stránkách. Velké díky patří rovněž lidem, bez kterých bych praktickou část experimentu nebyla schopná zrealizovat. Nesmírnou pomocí mi byli Marcos González López, M.Sc. a Mgr. Josef Lavický. V oblasti přípravy vzorků pro experiment musím zvláště poděkovat laborantce Kataríně Marečkové, která k tomu účelu nakrájela nádherné histologické řezy myších řezáků.

Obrovské díky náleží JCMM, od kterého jsem obdržela finanční podporu na úhradu materiálů v hodnotě 17 000 Kč.

Za důkladné korektury jsem velmi vděčná bývalé sočkařce Nikole Evě Mádlové. Nikol, díky za cenné rady ohledně formy a obhajoby práce!

V neposlední řadě poděkování patří i mojí škole Gymnázium Blansko, p.o. Děkuji jejímu řediteli za veškerou trpělivost a ochotu, kterou vynaložil během výkonu mé odborné činnosti.

Anotace

Kmenové buňky jsou neodmyslitelnou součástí veškeré regenerace živých tkání. Diferencují se do nejrůznějších specializovaných buněk, stojí tak na počátku života, ale také zajišťují jeho udržitelnost.

Unikátním modelem, na kterém lze aktivitu kmenových buněk pozorovat ve velmi krátkém časovém intervalu, jsou kontinuálně rostoucí myší řezáky. Díky jejich jedinečným vlastnostem a snadné dostupnosti není divu, že se pro řadu experimentů zabývajících se evolucí a vývojem stal stěžejním subjektem. Jak ukazuje tato práce, myší řezák nejen, že na první pohled vypadá jako dynamický orgán, tak jeho proměnlivou dynamiku reflektují i vlastnosti na molekulární úrovni. Po poškození distální části řezáku totiž dochází k rapidní akceleraci jeho růstu, tedy ke zvýšení proliferace kmenových buněk. Což je velice zajímavý a neprozkoumaný jev.

Práce poskytuje nový náhled na kmenové buňky a ukazuje je ve světle, ve kterém je ještě nikdo předtím nepozoroval. Objasňuje funkce sledovaných exprimovaných genů a poskytuje dosud nepopsané informace o jejich vlastnostech v kontextu myšího řezáku. Sleduje taktéž jejich proměnlivou expresi a zasazuje je do celistvého kontextu komplexních interakcí, popřípadě celých signalizačních drah – Wnt, Shh nebo Fgf, které se podílí na regeneraci zubní tkáně. Výsledky, kterými tato práce přispěla v dlouhodobém výzkumu této oblasti, mají potenciál se do budoucna uplatnit na poli regenerativní medicíny.

Hlavní cíle této práce jsou:

1. Objasnění mechanismů změn v myším řezáku na buněčné i molekulární úrovni po jeho poškození.

2. Shromáždění dosud neznámých poznatků o měnící se expresi detekovaných genů *Dkk1*, *Wisp1*, *Ecell*, *Lypd1*, *Nell1*, *Bhlhe41* v čase i prostoru jako odpověď na poškození.
3. Sběr dat k podpoření nervové hypotézy ohledně akcelerace růstu myšího řezáku v odpovědi na poškození.
4. Molekulární porovnání dvou oddělených epiteliálních mikroprostředí kmenových buněk, které navzdory umístění v rámci jednoho uzavřeného orgánu mají zcela odlišné proporce a parametry.
5. Podíl na vývoji nové metodologie kvantifikace růstu.

Vizí tohoto výzkumu myšího řezáku je uplatnění kmenových buněk ve stomatologii a regenerativní medicíně. Mohly by zásadně ovlivnit inovaci metodiky v oblasti náhrad poškozeného zubu a nabídnout tak elegantní řešení ve smyslu aplikace přímo do místa poškození, kde by se proliferací a následnou diferenciací dokázaly postarat o regeneraci poškozené tkáně.

Šířeji řečeno, kmenové buňky mohou představovat stále hledanou odpověď nejen v oblasti zubu, ale i v oblasti dárcovství orgánů. Použití vlastních kmenových buněk pacienta zamezí potenciálně fatální imunitní reakci organismu. Výzkum kmenových buněk za účelem uplatnění v regenerativní medicíně je v poslední době předmětem intenzivního bádání. S tím ale vyvstávají i etické otázky zejména, jsou-li zdrojem experimentů lidské embryonální buňky. Tyto kontroverze ale rozptyluje právě sám pokračující výzkum, který se v dnešní době zaměřuje nejen na uplatnění kmenových buněk, ale i na hledání jejich vhodného zdroje, a slibuje do budoucna vývoj terapií na dnes neléčitelné choroby.

Klíčová slova:

Diferenciace, genová exprese, kmenové buňky, mRNA, proliferace, transkripce, translace

Annotation:

Stem cells are an integral part of all regeneration of living tissues. They differentiate into various specialized cells, thus standing at the beginning of life, but also ensuring its sustainability.

A unique model on which the activity of stem cells can be observed in a very short time interval is the continuously growing mouse incisor. Thanks to its unrivalled aspects and easy availability, it is not surprising that it has become cardinal subject for a whole range of experiments engaged in evolution and development.

As it is shown in this thesis, mouse incisor does not only look like a dynamic organ at first sight, but its dynamics is even reflected on a molecular level. After damaging the distal part, growth of the incisor is rapidly accelerated which is caused by increased stem cells' proliferation. This represents a very interesting and unresearched phenomenon.

Our thesis provides new view on stem cells showing them in the light, in which no one has ever seen them before. This project clarifies function of the observed expressed genes and gives yet undescribed information about their characteristics in the context of mouse incisor.

The changing expression is described as well and situated into whole context of complex interactions, alternatively into whole signaling pathways – Wnt, Shh or Fgf, which take part in the regeneration of dental tissue. The results, by which this thesis contributed in the long-term ongoing research of this area, have potential to put into effect on the field of regenerative medicine in the future.

The main goals of this thesis are:

1. Clarifying mechanisms of the changes on cellular and molecular level in the mouse incisor after its damage.
2. Collection of previously unknown knowledge about the changing expression of the detected genes *Dkk1*, *Wisp1*, *Ecell*, *Lypd1*, *Nell1*, *Bhlhe41* in time and space in response to damage.
3. Collection of data to support the neural hypothesis regarding the acceleration of mouse incisor growth in response to injury.
4. Molecular comparison of two separated epithelial stem cell niches, which in spite of localization within the same closed organ have completely different proportions and parameters.
5. Contributing to the development of new methodology of growth quantification.

The vision of this research is to implement stem cells into stomatology and regenerative medicine. They could fundamentally influence the innovation of methodology in the field of damaged tooth replacements and thus offer an elegant solution in the sense of application directly to the site of damage, where they would be able to take care of the regeneration of damaged tissue through proliferation and subsequent differentiation.

More broadly, stem cells may represent the ever-searching answer not only in the dental field, but also in the field of organ donation. The use of the patient's own stem cells prevents the body's potentially fatal immune response. The use of stem cells for applications in regenerative medicine has recently been the subject of intensive research. Nevertheless, there are also many ethical questions raised, especially if the source of the experiments are human embryonic cells. These controversies, however, are dispelled by ongoing research, which nowadays focuses not only on the application of

stem cells, but also on the search for their appropriate source, and promises the future development of therapies for currently incurable diseases.

Key words:

Differentiation, gene expression, mRNA, proliferation, stem cells, transcription, translation

Obsah

1	Úvod.....	13
2	Teoretická část.....	14
	2.1 Kmenové buňky	14
	2.1.1 Kmenovost.....	15
	2.1.2 Totipotentní buňky.....	15
	2.1.3 Pluripotentní buňky	16
	2.1.4 Multipotentní buňky	16
	2.1.5 Unipotentní buňky	17
	2.1.6 Mikroprostředí kmenových buněk	18
	2.2 Buněčná proliferace.....	19
	2.3 Anatomická a morfologická stavba myšího řezáku	20
	2.4 Mikroprostředí kmenových buněk v myším řezáku.....	25
	2.5 Genová exprese	27
	2.5.1 Transkripce a translace.....	27
	2.5.2 DKK1	29
	2.5.3 WISP1	30
	2.5.4 ECEL1	30
	2.5.5 LYPD1.....	31
	2.5.6 NELL1	31
	2.5.7 BHLHE41	32
3	Materiály a metody	33
	3.1 Disekce mandibuly.....	33
	3.2 Příprava vzorku	34

	3.2.1 Fixace	34
	3.2.2 Dekalcifikace.....	35
	3.2.3 Zalití do parafínu	35
	3.3 <i>In situ</i> hybridizace	36
	3.4 Hematoxylinové barvení.....	38
	3.5 Mikroskopie.....	39
4	Výsledky.....	40
	4.1 Růst myšího řezáku na makroskopické úrovni.....	40
	4.2 Genová exprese	42
	4.2.1 DKK1	42
	4.2.2 WISP1	45
	4.2.3 ECEL1	47
	4.2.4 LYPD1.....	49
	4.2.5 NELL1	51
	4.2.6 BHLHE41	53
	4.3 Interakce a signální dráhy.....	55
5	Diskuse	58
6	Závěr	60
7	Seznam obrázků	62
8	Seznam zkratk.....	64
9	Použitá literatura.....	66

1 ÚVOD

Tkáň kontinuálně rostoucího chrupu, nebo-li hypselodontní dentice, je tvořena poměrně rozsáhlým spektrem buněk s různým diferenciacním stupněm (23). U hypselodontní dentice nedochází za fyziologických podmínek k trvalému zastavení růstu, a naopak si zub v apikální části uchovává aktivní populaci kmenových buněk (19). Tento jev lze typicky pozorovat na výrazných řezácích hlodavců. Z toho důvodu se právě myš domácí (*Mus musculus*) stala tak atraktivním modelem pro výzkum kmenových buněk a jejich interakcí s okolním prostředím.

Přinejmenším malá subpopulace kmenových buněk se nachází v základu každého orgánu napříč rozmanitými druhy živočichů. Takové buňky díky svým jedinečným vlastnostem slouží organismu jako rezerva, ze které se postupně obnovují okolní tkáně (4). Za život člověka se tedy například buňky střevního epitelu kompletně vymění dokonce více než tisíckrát bez jakéhokoli narušení integrity tkáně. Dojde-li však k poškození, neomezeně se dělicí populace kmenových buněk tuto informaci obdrží a začne produkovat specializované potomstvo, aby se organismus byl schopen s vychýlením z homeostázy vyrovnat.

V myším řezáku je epiteliální i mezenchymální tkáň obnovována na základě proliferační aktivity kmenových buněk, které přetrvávají ve svém mikroprostředí v zubním apexu. Obdrží-li tyto buňky informaci o způsobeném poškození distální části zubu, zákonitě zvyšují svou proliferaci (38).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky (*stem cells*; SCs) jsou primární buňky s vysokým proliferačním a diferenciacním potenciálem, které se vyznačují schopností sebeobnovy.

Charakteristickým morfologickým atributem SCs je absence jakýchkoli buněčných funkčních specifických struktur, jak v jádře, tak v cytoplazmě, jež jsou typické pro diferenciované buňky (1). Buňka kmenová se lze také v některých případech od buňky diferenciované rozlišit pomocí fenotypických znaků na povrchu cytoplasmatické membrány nebo přítomností specifických proteinů uvnitř buňky.

SCs se rozlišují na embryonální (*embryonic stem cells*; ESCs) a adultní (*adult stem cells*; ASCs) (3).

Embryonální kmenové buňky jsou buňky s velkými jádry a vysokým počtem ribozomů. Tyto buňky se odlišují od diferencovaných či od ASCs řadou specifických markerů jako je exprese SSEA1, či syntézou transkripčních faktorů SOX2, OCT3/4 a růstových faktorů FGF (2). Vznikají z jediné buňky totipotentní – zygoty, která dává vzniknout symetrickým dělením menším blastomerám toho samého stupně kmenovosti (3). V průběhu embryonálního dělení však ESCs schopnost totipotence ztrácí a buňky vznikající na počátku embryonálního vývoje v embryoblastu již nabývají pluripotentní stupeň kmenovosti (2).

Dospělé (somatické) neboli adultní kmenové buňky mají schopnost multipotence a unipotence. Je přijímán všeobecný názor, že se v různých orgánech a tkáních dospělého organismu nachází subpopulace ASCs, které slouží k jejich regeneraci a udržování homeostázy (4).

Dalším diferenciacním stupněm SCs je buňka unipotentní, která dokáže proliferovat pouze do jednoho buněčného typu, ale neztrácí schopnost sebeobnovy (5). Konečným výsledkem celé buněčné linie je buňka terminálně diferencovaná, která ztrácí schopnost proliferace a nachází se většinou v G0 fázi, již v buněčném cyklu nepokračuje.

2.1.1 Kmenovost

Termín kmenovost označuje diferenciační stupeň, ve kterém se buňka nachází. Stupeň kmenovosti vypovídá pouze informaci o proliferačním potenciálu buňky, neurčuje však, zda je buňka skutečně kmenovou, jelikož nevypovídá o schopnosti sebeobnovy (6). V minulosti byl pohled na kmenovost značně zjednodušený, to však mění recentní objevy, které na rozdíl od předešlých hypotéz prokazují, že stupeň kmenovosti může být v některých případech reversibilní. Možnost vratného procesu diferenciace kmenových buněk tak spustila vlnu otázek, jejichž předmětem je vize budoucí cílené reprogramace diferencovaných somatických buněk. Jejich potenciální transplantací by bylo umožněno předejít problémům s negativní imunitní reakcí příjemce, který by se tímto stal zároveň vlastním dárce (8).

Na základě stupně kmenovosti se SCs zařazují v hierarchické uspořádání kmenových buněk (viz obrázek 1).

2.1.2 Totipotentní buňky

Kmenové buňky totipotentní jsou v hierarchii SCs nejvyšším kmenovým stupněm. Mají schopnost dát vznik dceřiné totipotentní buňce a jakémukoli typu tkáně všech třech zárodečných listů včetně tkáně extraembryonální (tj. placenta) (7). První buňka totipotentní vzniká splynutím vajíčka a spermie, stojí na počátku ontogeneze a označuje se jako zygota. Zygota však nelze klasifikovat jako kmenovou buňku z toho důvodu, protože postrádá schopnost sebeobnovy (4).

Nicméně díky vysoké aktivitě enzymu telomerázy, která zabraňuje zkracování telomer, se zygota může teoreticky dělit až neomezeně dlouhou dobu (9). Mitotickým dělením totipotentní zygoty vznikají buňky dceřiné – blastomery, které neztrácí schopnost totipotence. Počátkem embryogeneze se tvoří již kmenové buňky pluripotentní, což je další diferenciační stupeň SCs. Totipotence je proto typická jen pro zygota a úzkou skupinu buněk z ní přímo vznikajících (7).

2.1.3 Pluripotentní buňky

Pluripotentní SCs se dokáží diferencovat v jakoukoli buňku budoucího embrya ektodermálního, endodermálního či mezodermálního původu. Vznikají na začátku embryonálního vývoje v rámci embryoblastu. Svým dělením produkují množství rozmanitých buněk, které poskytují základy orgánů (4). Pluripotentní SCs tedy mají velký vliv na průběh organogeneze. U myši je pro udržení pluripotence předpokladem exprese faktoru LIF (*leukemia inhibitory factor*; inhibiční faktor leukémie). Naopak u lidských ESCs tuto funkci zastává zejména FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) (2).

Bylo dokázáno, že pluripotentní buňky je možné i uměle vytvořit, a to téměř ze všech somatických buněk. Princip tohoto procesu spočívá v reprogramování již diferencované buňky v buňku s jiným buněčným osudem, což je označováno jako transdiferenciace (2). První úspěšnou reprogramaci myši adultní somatické buňky provedli v roce 2006 Takahashi a Yamanaka. Za využití retrovirové transdukce 4 genů pro transkripční faktory – *Klf4*, *c-Myc*, *Oct4*, *Sox2* – v myších fibroblastech při podmínkách totožných kultivaci ESCs došlo k indukci buněčné reprogramace a ke konverzi na buňku pluripotentní (39). Další možnost reprogramace představuje buněčná fúze, která spočívá ve sloučení somatické buňky s embryonální kmenovou buňkou (2). Avšak tato metoda, jejímž cílem bylo použití pluripotentních buněk v buněčné terapii, se ukázala být kontradiktorní, jelikož při ní vznikají tetraploidní buňky (2). Genomická nestabilita nově vzniklé buňky může vést ke vzniku maligních nádorů, a navíc se může vyskytnout po transplantaci imunitní reakce (10). Pluripotentní uměle dediferencované buňky se označují jako indukované pluripotentní kmenové buňky (*induced pluripotent stem cells*; iPSCs) (39). Výzkum iPSCs (Takahashi et Yamanaka, 2006) se stal jedním z nejstěžejnějších objevů, které vedly v roce 2012 k udělení Nobelovy ceny za fyziologii nebo lékařství vědcům John B. Gurdon a Shinya Yamanaka.

2.1.4 Multipotentní buňky

Multipotentní kmenové buňky se kategorizují jako ASCs. Jejich schopnost diferenciaci je omezena pouze v rámci jednoho zárodečného listu na určité typy somatických buněk, které se podílejí na stavbě tkání a orgánů. SCs multipotentní můžeme tedy označit za tkáňově specifické buňky, které nesou odpovědnost za udržování

diferencovaných populací ve tkáních, které se více či méně po celý život kontinuálně obnovují (7). Udržují tkáňovou homeostázu, nahrazují poškozené či odumřelé buňky a zajišťují tak i orgánovou regeneraci, příp. reparaci (41). V základě orgánů se nachází konstantní subpopulace SCs, která se formuje z buněk pluripotentních už při organogenezi a která zajišťuje celoživotní fungování organismu (4). Multipotentní SCs jsou například mezenchymální kmenové buňky nebo hematopoetické kmenové buňky (12).

V různém mikroprostředí se vyskytují různé signální molekuly, které v multipotentních SCs iniciují aktivaci určitých genů. Tím dochází k expresi nových proteinů, které buď determinují určitý fenotypický znak, nebo se podílí v navazujících signálních drahách. Jev, kdy je aktivací genu změněn buněčný osud, se označuje jako buněčná plasticita (41). Díky této adaptibilitě se z multipotentních SCs mohou vyvíjet různé druhy unipotentních SCs (40). Příkladem plasticity jsou SCs kostní dřeně, které obsahují dva typy kmenových buněk: hematopoetické (*hematopoietic stem cells*; HSCs) a mezenchymální (*mesenchymal stem cells*; MSCs). Z HSCs vznikají všechny krevní linie a za určitých podmínek dokáží diferencovat např. i do hepatocytů (11,12). MSCs mohou diferencovat např. do neuronů (13), do myocytů kosterního svalu nebo do adipocytů (2).

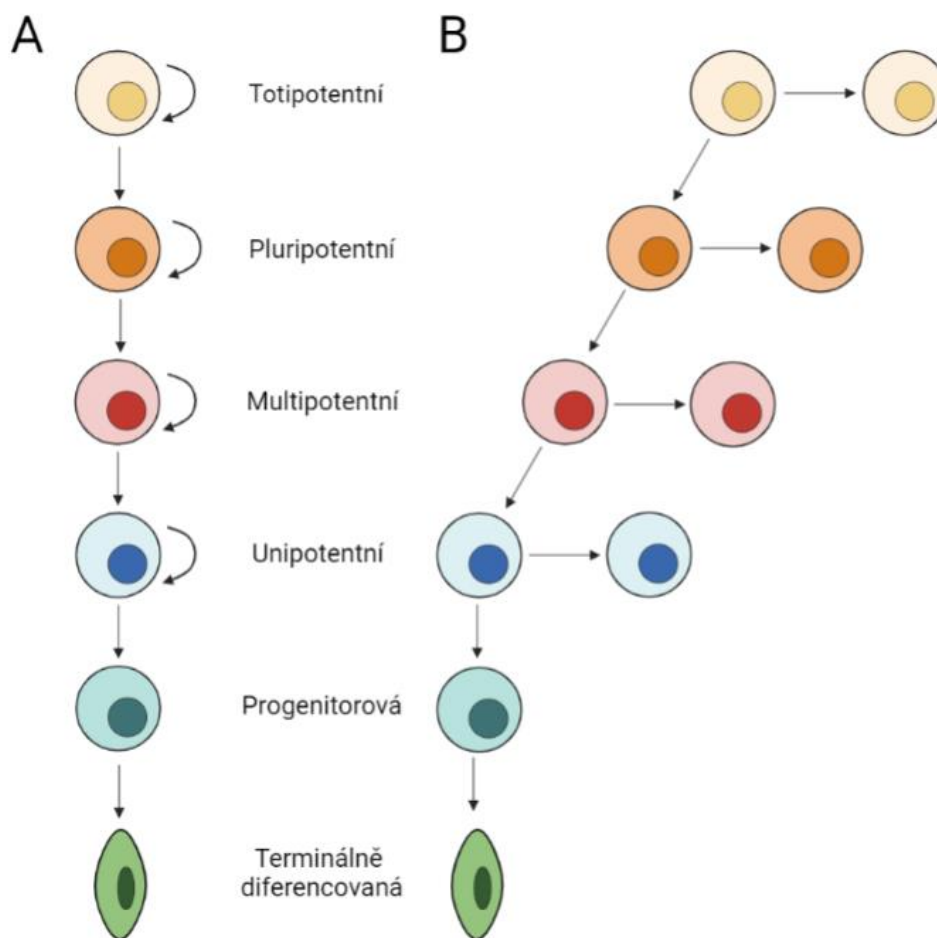
Výše popsané multipotentní SCs se schopností plasticity se mohou také kategorizovat jako oligopotentní buňky, jejichž typickou vlastností je abilita diferenciaci do dvou a více buněčných linií závisle na mikroprostředí (41).

2.1.5 Unipotentní buňky

Unipotentní SCs zahrnují buňky s nízkým diferenciačním potenciálem, které mají schopnost diferencovat pouze do jednoho buněčného typu, ale stále mají neomezenou schopnost sebeobnovy (6). Jelikož jsou dalším diferenciačním stupněm po multipotentní buňce, stejně jako SCs multipotentní se SCs unipotentní nachází v základě každého orgánu, kde udržují jeho životaschopnost.

Například v plicích alveoli pneumocyty typu II dávají vznik pneumocytům typu I (13).

Buňky, které ztratily schopnost sebeobnovy, se označují jako progenitorové. Konečným výsledkem celé buněčné linie je buňka terminálně diferencovaná.



Obr. 1: Hierarchie kmenových buněk (upraveno podle: Kuo et Tuan, 2003)

Schéma znázorňuje klesající proliferaci potenciál kmenových buněk, který ustupuje ve prospěch vyššího diferenciačního stupně (A). Buňka, která ztrácí schopnost sebeobnovy, kterou lze pozorovat při asymetrickém dělení (B), již nespadá pod definici kmenové buňky (7). Na vrcholku buněčné linie stojí buňka totipotentní, která formuje celý organismus. Proliferací dále diferencuje do buněk pluripotentních, které jsou již schopné tvořit zredukované spektrum dceřiných buněk. Buňky multipotentní mohou dát vznik už jen tkáňově specifickým buňkám. Diferencovanou buňku tvoří buňky unipotentní, které mají schopnost sebeobnovy a proliferují pouze do jednoho buněčného typu.

2.1.6 Mikroprostředí kmenových buněk

Mikroprostředí kmenových buněk je označení pro prostor, kde jsou v klidovém stádiu za zanedbatelné proliferaci aktivity udržovány SCs. Každé takové mikroprostředí obsahuje signální molekuly extracelulární matrix, hydrofilní a hydrofobní mediátory, které kontrolují proliferaci a případně iniciují další diferenciaci (42). Jsou tímto

zodpovědné za celkovou integritu organismu a udržení proporciálního počtu buněk. Mikroprostředí SCs tak má přímý dopad na konkrétní vlastnosti SCs a hraje zásadní roli v přežití organismu (6). Například pokud SC získají toleranci vůči určitým signálním molekulám, nebo v mikroprostředí dojde k deficitu či nadměrné exprese signální molekuly, může to vést k nekontrolovatelné buněčné proliferaci. Tento stav abnormálního zmnožení buněk se označuje jako hyperplazie, což může předznamenávat i vznik tumoru (14).

K diferenciaci SCs v mikroprostředí dochází pouze změnil-li se parametry molekul, které se účastní signalizačních drah.

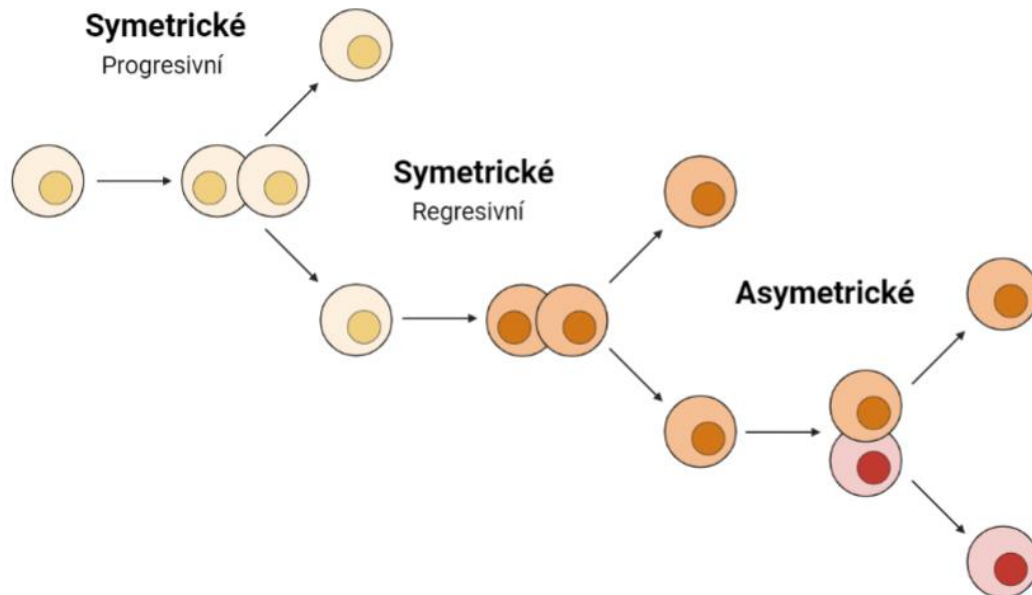
2.2 Buněčná proliferace

Proliferace je buněčné dělení kmenových buněk. Označuje takřka neomezené dělení, kdy SCs mohou produkovat stejně tak neomezené množství generací (4). SC proliferují mitózou buď symetricky, nebo asymetricky (obrázek 2) (14).

Symetrické dělení je nejrozšířenější typ dělení, při kterém se veškeré buněčné komponenty rovnoměrně dělí mezi nově vzniklé dceřiné buňky. Symetrické dělení lze z hlediska poklesů a nárůstů populací SCs rozlišit na **regresivní**, kdy dochází k hromadné diferenciaci buněk dceřiných, a **progresivní**, kdy se naopak zvyšuje populace SCs (viz obrázek 2) (4). Z tohoto pohledu je symetrické dělení pro organismus nevýhodné, jelikož dochází k velkým momentálním populačním výkyvům. V případě, že se jedna generace sestává výhradně z diferencovaných buněk, k obnově populace SCs musí vzniknout další generace progresivním symetrickým dělením, kterou budou tvořit pouze buňky kmenové. Pro normální tkáňovou homeostázu a vývoj organismu je zásadní rovnováha mezi regresivním a progresivním dělením. Symetrické dělení znamená pro organismus značnou energetickou náročnost z toho důvodu, že při něm diferencované buněčné populace narůstají rychleji než při dělení asymetrickém.

Výhoda asymetrického dělení spočívá v současném průběhu regresivního a progresivního dělení (4). Ačkoli se buňka mateřská rozdělí na dvě buňky dceřiné, tak jedna z buněk postupuje do dalšího diferenciačního stupně, zatímco ta druhá si zachovává svůj předešlý stupeň kmenovosti (14). Tento cyklus pomáhá zachovávat dlouhodobě neměnný se objem populací SCs. Právě to, a jakákoli jiná situace, kdy z buňky kmenové

opět vzniká buňka kmenová se stejným diferenciačním stupněm, se označuje jako schopnost sebeobnovy (14).



Obr. 2: Proliferace kmenových buněk (Z archivu autorky, 2022)

Symetrické a asymetrické dělení lze morfologicky rozlišit podle orientace dělicího vřeténka během cytokineze. Vertikální pozice vřeténka je typická pro symetrické dělení, naopak horizontální pro dělení asymetrické (14).

2.3 Anatomická a morfologická stavba myšího řezáku

Myší dentice je plně vyvinuta až v pozdních fázích embryogeneze, což z ní činí vhodný, dostupný a relativně izolovaný model pro různé typy studií evoluční a vývojové biologie. Skládá se z molárů a řezáků, mezi nimiž se nachází diastema. Jak humánní, tak myší dentice je tvořena různě funkčně specializovanými zuby, a proto je označována jako heterodontní (17). Dentice byla v minulosti pod evolučním tlakem modifikována až do nynějších typů: brachyodontní, hypsodontní a hypselodontní (19). Brachyodontní dentice má zuby s nízkou korunkou kryté vrstvou skloviny nad úrovní gingivy. Můžeme je nalézt jak u člověka, tak u myši. Naopak hypsodontní zuby mají korunku vysoko nad gingivální linií. Hypsodontní dentice je z evolučního pohledu modifikace, která chrání zub před ztrátou a abrazí (19). Mechanismy stojící za tvorbou hypsodontního zubu způsobují při odontogenezi opoždění vývoje kořene. Pokud se kořen zcela nevyvine, vede to ke vzniku hypselodontního zubu (17). U myši se vyvíjí hypselodontní řezák s analogem kořene

(linguální strana krytá cementem) a korunky (labiální strana krytá enamelem) (19). Proliferační aktivita buněk u tohoto typu zubu není nikdy zcela utlumena, proto je schopen dorůstat po celý život (20). Myší dentici lze tedy rozdělit na brachyodontní moláry a hypselodontní řezáky.

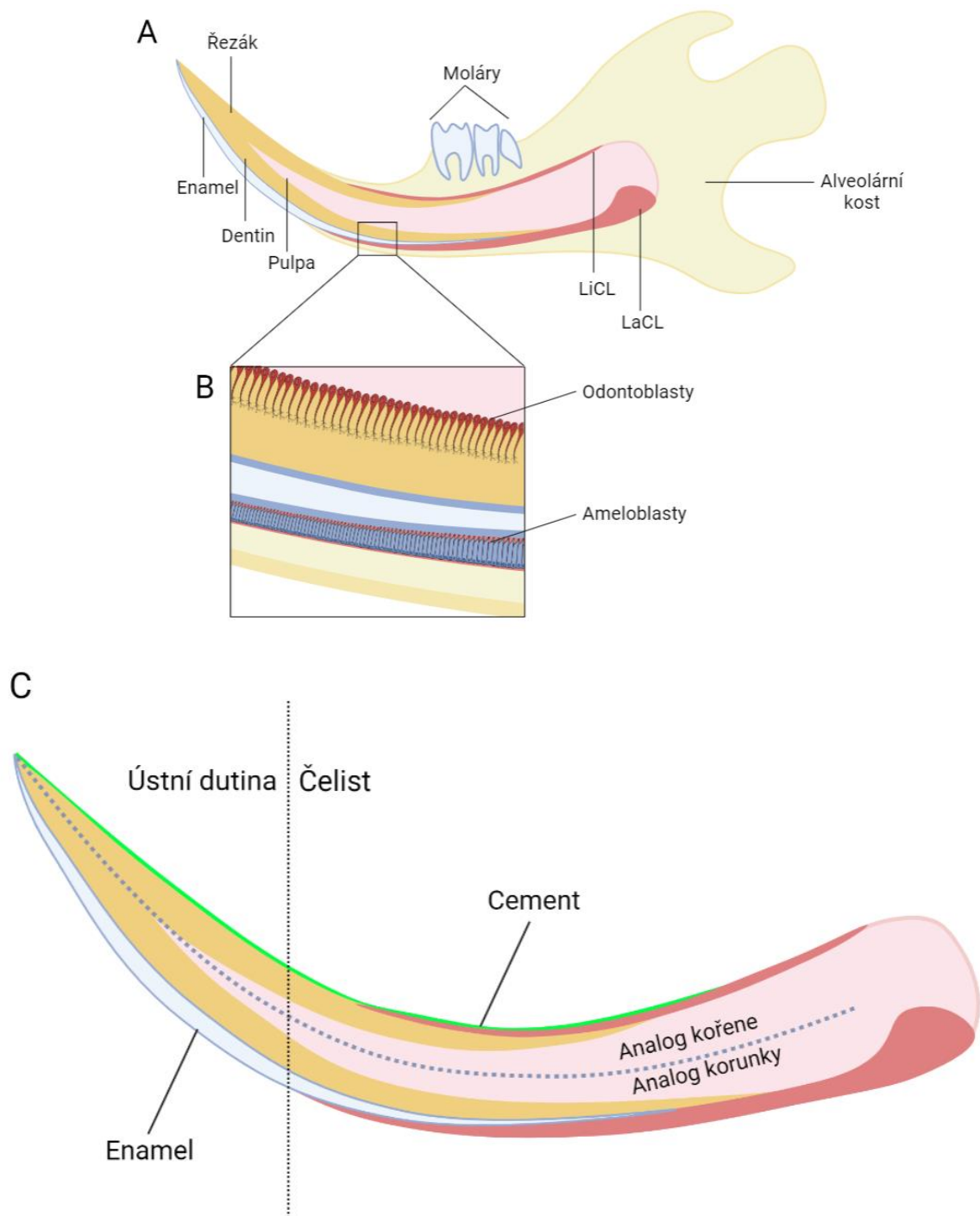
Na rozdíl od jiných tvrdých tkáních v těle, ať už je řeč o myši nebo o člověku, se morfologická stavba zubu během života organismu mění pouze mechanickým poškozením, a tedy po odontogenezi nedochází k žádné přestavbě mineralizované tkáně jako to je u skeletu. Tento fakt rovněž podporuje tezi, že během evoluce se jakékoli selekční tlaky nebo genetický drift musely uplatňovat pouze při odontogenezi (17).

Odontogeneze je zahájena interakcí dentálního epitelu a ektomezenchymu, která vede k tvorbě dentální laminy, ve které vzniká první signalizační centrum – dentální plakoda (20). Během odontogeneze zub prochází několika stádii: pupen, čepička, zvonek, apozice (pozdní zvonek), na což navazuje vývoj kořene (17,20). Ve stádiích pupene až čepičky se v nedělících se buňkách iniciuje exprese několika signálních molekul, patřících například mezi rodiny FGF (*fibroblast growth factor*; fibroblastový růstový faktor), BMP (*bone morphogenetic protein*; kostní morfogenetický protein), WNT a SHH (*sonic hedgehog*), a probíhá tak tvorba primárního sklovinného uzlu (18,20). Vznik sekundárních sklovinných uzlů je determinován aktivitou primárního uzlu a nastává u morfologicky složitější dentice, kupříkladu v lidském moláru, kde jsou sekundární uzly nezbytné pro vznik korunky se čtyřmi vrcholy (20). Každý sklovinný uzel vytváří jeden vrchol zubu. Změnou parametrů, které mají vliv na vznik, umístění a aktivitu sekundárních uzlů, lze vytvořit téměř jakýkoli morfologický typ zubu, což bylo teoreticky ověřeno pomocí matematického modelu (Salazar-Ciudad et Jernvall, 2004). Z toho plyne hlavní role sklovinných uzlů, a to zajištění morfologické komplexity zubu, což je považováno za jeden z klíčů evolučního úspěchu savců (43).

U myšího řezáku dochází po dokončení stádia čepičky k rotaci ze směru sagitální roviny do směru transverzální roviny. V tomto bodě se také pokládají základy budoucího mikroprostředí kmenových buněk v narůstajících cervikálních smyčkách a předurčuje se tak hypselodontní povaha zubu (20). Kmenové buňky, které svou proliferací vedou k invaginaci zubu v oblasti cervikálních smyček do okolního mezenchymu, již v tomto místě přetrvávají po celý život myši. V porovnání se zubem člověka se kmenové buňky v cervikálních smyčkách objevují v ranějších fázích odontogeneze, již ve stádiu zvonku, zatímco u lidského zubu je tomu tak až v následující apozici (44). Nejzásadnějším rozdílem je však skutečnost, že zub člověka si v cervikálních smyčkách po úplném

zformování kořenů dále neudrží vhodné mikroprostředí, kde by si SCs dokázaly udržet kmenové vlastnosti (20).

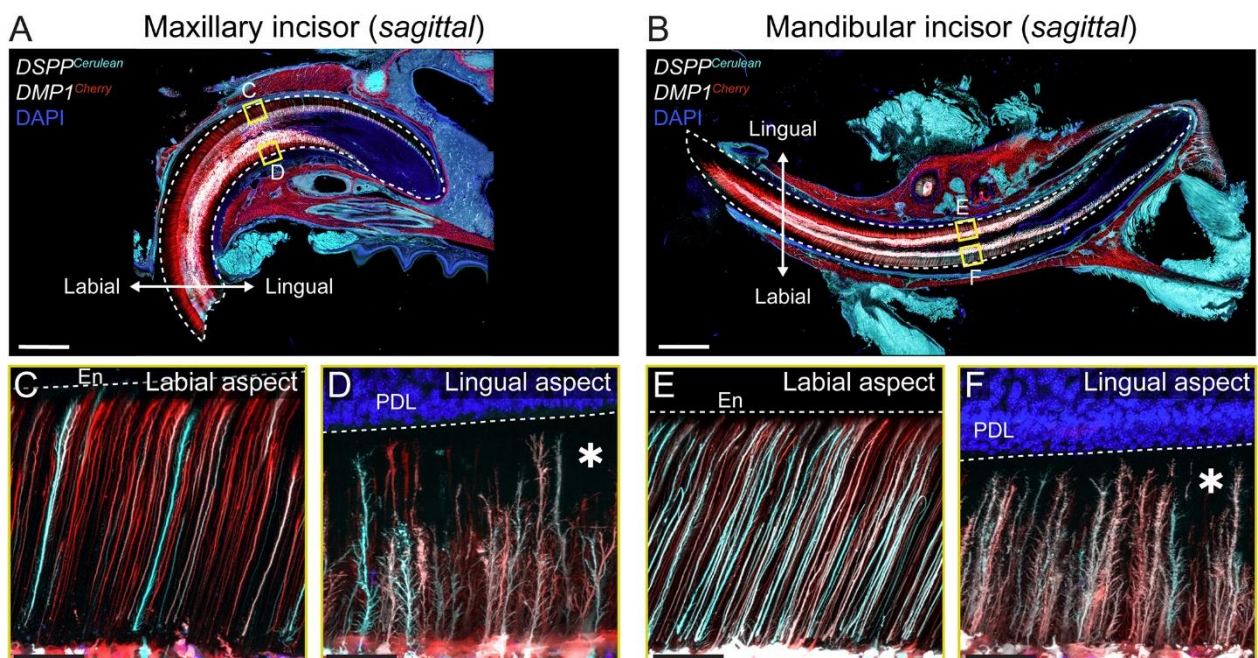
Myší řezák nemá pravou anatomickou korunku nebo kořen, namísto toho zub můžeme rozdělit na analog korunky a analog kořene dle epiteliálních tkání distribuovaných na povrchu zubu (viz obrázek 3). Další z typických vlastností myšího řezáku je asymetrická produkce enamelu, který pokrývá pouze labiální stranu zubu, tedy analogickou část korunky. Linguální strana je kryta pouze dentinem a vrstvou cementu a určuje tedy analogickou část kořene (19). Díky této rozdílné tvrdosti tkání dochází na linguální straně k rychlejšímu opotřebení, které udává apikální části zubu tvar břitvy. Nerovnoměrná produkce enamelu souvisí s asymetrií cervikálních smyček, které jsou ve velkém velikostním nepoměru. Labiální smyčka je větší z toho důvodu, že jsou u ní také vyžadovány náročnější funkce, než které plní linguální smyčka, zejména pak se z labiální smyčky produkují ameloblasty zajišťující regeneraci skloviny (20).



Obr. 3: Anatomická a histologická stavba myšního řezáku (Z archivu autorky, 2022)

Schématický náčrt sagitálního řezu mandibulou. Vyobrazen řezák s neukončeným růstem ve vztahu k molárům (A) s detailem na produkci dentinu a enamelu (B). C, anatomické členění řezáku dle tkání na straně linguální (cement; analog kořene) a labiální (enamel; analog korunky). Zkratky: LiCL – linguální cervikální smyčka (*lingual cervical loop*); LaCL – labiální cervikální smyčka (*labial cervical loop*).

Buňky tvořící dentální epitel vznikají proliferací epitelálních kmenových buněk uložených v cervikálních smyčkách. Podrobnější výzkum (Lavický et al., 2021) morfologické stavby dentinu prokázal, že je jeho mikrostruktura z velké části ovlivňována typem přiléhajícího epitelu, což poukazuje na rozdílné funkce cervikálních smyček. Mikrostrukturální distinkce je nejlépe pozorovatelná na odontoblastech, polarizovaných buňkách s dlouhými sekrečními výběžky zvanými Tomesova vlákna, které jsou formovány závisle na produkovaném druhu dentinu (21) (viz obrázek 4). Odontoblasty produkují dva druhy dentinu na základě toho, jakému typu epitelu jsou vystavovány: sklovinnému epitelu (*enamel-facing dentin*; enamelem obklopen dentin; labiální strana) nebo epitelu podílejícím se na tvorbě kořene (*cement-facing dentin*; cementem obklopený dentin; lingvální strana) (21). V enamelem obklopeném dentinu jsou Tomesova vlákna formována v dlouhé a úzké, uspořádané výběžky, naopak v cementem obklopeném dentinu mají Tomesova vlákna podobu velmi rozvětvených a složitých výběžků (21). Jelikož se potvrdilo identické chování dentinové mikrostruktury, zejména pak vzorec struktury odontoblastů, při stejných podmínkách v moláru i v řezáku, tento objev podporuje teorii analogie korunky a kořene.



Obr. 4: Diverzní struktura Tomesových vláken odontoblastů (převzato z: Lavický et al., 2021)

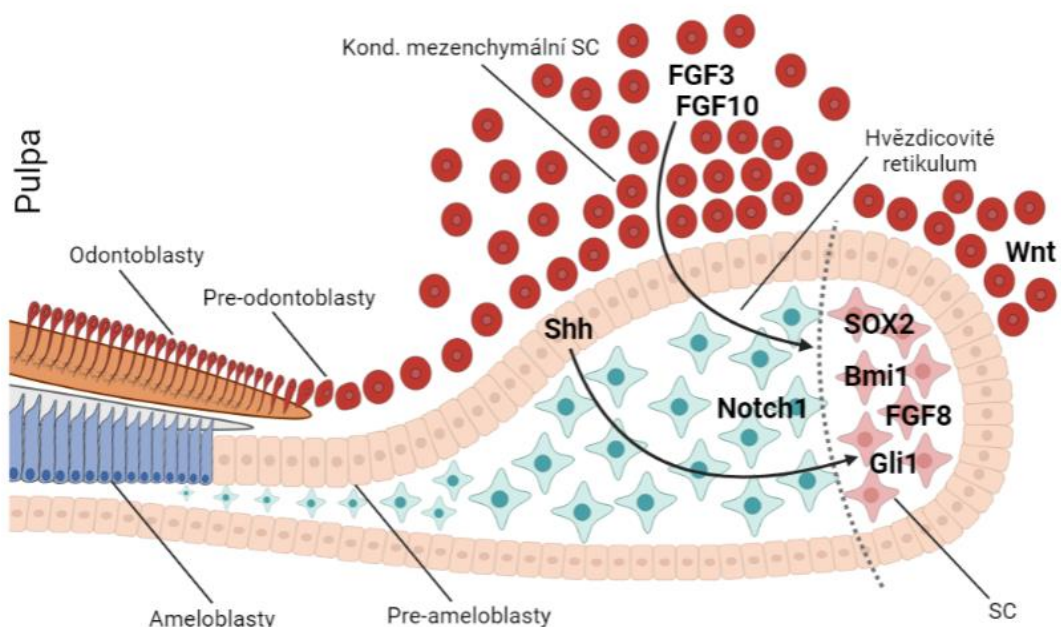
Porovnání mikrostruktury dentinu v maxilárním a mandibulárním řezáku (A,B) z DSSPCerulean/DMP1Cherry geneticky modifikovaných myší. Na vzorcích aplikována metoda immunostaining (imunofluorescence), DNA buněk obarveno pomocí DAPI. C,D,E,F;

detail na labiální (C,E) a linguální (D,F) odontoblasty. Jak labiální odontoblasty, tak i linguální odontoblasty mandibuly i maxilly vykazují velmi podobnou morfologii. Bílé hvězdičky označují odlišnosti v mikrostruktuře linguálních odontoblastů. Měřítko: 1000 μm (A,B) a 50 μm (C-F). Zkratky: En – enamel; PDL – parodontální (periodontální) vazy (*periodontal ligament*) (21).

2.4 Mikroprostředí kmenových buněk v myším řezáku

Jak popisuje předešlá kapitola, epiteliální mikroprostředí kmenových buněk myšího řezáku jsou asymetrické ve velikosti, což má dopad na asymetrickou strukturu celého zubu. Tato kapitola se zaměřuje na stavbu epiteliálního a mezenchymálního mikroprostředí SCs a jejich molekulárních interakcí.

Schopnost neustálého růstu myšího řezáku zajišťují epiteliální a mezenchymální kmenové buňky. Mikroprostředí epiteliálních SCs se nachází v cervikálních smyčkách v apikální části zubu, tato oblast je celkem přesně popsána a definovaná. Oproti tomu je mikroprostředí mezenchymálních SCs méně charakterizované. Nachází se v pulpě, v oblasti okolo cervikálních smyček bez specifické morfologické hranice.



Obr. 5: Labiální mikroprostředí kmenových buněk (upraveno podle: Reinoisé et Michon, 2014)

V labiální cervikální smyčce se mikroprostředí epiteliálních kmenových buněk nachází v těsné blízkosti hvězdčitého retikula. Dojde-li k proliferaci SCs, diferencovaná buňka

opouští mikroprostředí a začleňuje se do bazální epitelové vrstvy okolo hvězdčovitého retikula. Postupnou integrací buněk dochází k jejich migraci směrem k oklusální části zubu, během čehož se dále diferencují do preameloblastů a následně maturují v ameloblasty. Mezenchymální kmenové buňky (kond. mezenchymální SCs) se kondenzují v těsné blízkosti bazální epitelové vrstvy, toto místo je součástí jejich mikroprostředí (19,20).

Epiteliální i mezenchymální SCs mají svou specifickou funkci, která závisí na vlastnostech linguálního či labiálního mikroprostředí SCs: na přítomnosti příslušných signálních molekul. Asymetrie epiteliálního mikroprostředí SCs je spjata s velkým rozdílem proliferačních aktivit, kdy linguální cervikální smyčka kromě redukované populace buněk hvězdčovitého retikula obsahuje rovněž méně proliferující buňky než labiální cervikální smyčka. To je zapříčiněno integrovanou sítí regulačních proteinů složenou z BMP, FGF a folistatinu (22) (viz obrázek 5). Aktivita těchto hlavních proteinů a jejich signalizační dráhy pak objasňují vznik analogové části korunky a kořene.

Za přítomnost diferencovaných ameloblastů na labiální straně řezáku je zodpovědný konkrétně protein BMP4 exprimovaný z mezenchymálních odontoblastů. Na linguální straně řezáku dochází naopak k inhibici BMP4, což je způsobeno přítomností folistatinu (22). Díky regulaci BMP proteinů je v analogu kořene znemožněna tvorba ameloblastů.

K udržení proliferace schopných buněk v mikroprostředí SCs, jsou nezbytně nutné růstové faktory FGF, které jsou syntetizovány v mezenchymálních buňkách v blízkosti cervikální smyčky (23). Bez FGF10 není možné dokončit vývoj labiální cervikální smyčky během odontogeneze, a proto myši s nízkou produkcí FGF10 umírají ve dni P1 kvůli hypoplastické cervikální smyčce (22). Pro linguální smyčku však není exprese FGF10 tak zásadní, jelikož i při jeho abnormální distribuci má linguální cervikální smyčka standardní velikost (22). Zároveň však také bylo prokázáno, že regulační signalizace vůči FGF funguje i ze strany proteinů BMP (22). BMP4 má inhibiční vliv na FGF3.

Zatímco Fgf signalizace hraje zásadní vliv pro udržení populace kmenových buněk, Wnt signalizace je v postnatálním období spíše inhibována na rozdíl od období odontogeneze, kdy je tato signalizační dráha aktivní a umožňuje morfogenezi (19). V okolí labiální cervikální smyčky byly detekovány WNT inhibitory, jejichž ztráta zapříčiňuje expresi WNT3, který vede k zastavení diferenciaci ameloblastů (19).

NOTCH signály napomáhají proliferaci a řídí buněčnou apoptózu. V jeho nepřítomnosti je proliferace regulována a apoptóza zvýšena, což vede ke zmenšení cervikálních smyček (22).

K zachování tkáňové homeostázy je důležité, aby množství buněk vzniklých proliferací odpovídalo počtu ztracených buněk, čehož se dosahuje také pomocí Shh (*Sonic hedgehog*) signalizační dráhy (19). SHH exprimované diferencovanými buňkami, potomstvem progenitorových buněk, je součástí pozitivních zpětných vazeb, které podporují produkci dalšího potomstva v kmenových buňkách i v buňkách bazálního epitelu cervikální smyčky (23).

2.5 Genová exprese

Genová exprese je proces přenosu genetické informace do podoby polypeptidového řetězce, nejčastěji proteinu, což podléhá mechanismům transkripce a translace. Iniciací tohoto procesu závisí také na vnějším mikroprostředí buňky, odkud jsou přijímány z povrchu buňky signální molekuly. Tyto signály buď zachycují příslušné membránové receptory, anebo mohou procházet skrz cytoplazmu i jadernou membránu až k chromozomům, kde se váží na promotorové sekvence DNA (25). Navázáním na membránový receptor molekula iniciuje signál, a tak ve výsledku nepřímo ovlivňuje proteosyntézu. Naopak při navázání transkripčního faktoru na promotor DNA signální molekula genovou expresi ovlivňuje přímo. Transkripční faktory dokáží snadno regulovat expresi genů, ať už pozitivně nebo negativně (25).

Na fenotypu buňky se podílí všechny exprimované geny. Geny, které neprocházejí transkripcí, jednoduše nejsou v danou chvíli buňkou exprimovány (25).

2.5.1 Transkripce a translace

Centrální dogma molekulární biologie ustanovuje dva obvyklé přenosy genetické informace: z DNA do DNA při replikaci v rámci cytokineze; a z DNA do mediátorové RNA (mRNA) (25). Přepis z DNA do mRNA se nazývá transkripce, následující překlad mRNA do dlouhého peptidového řetězce aminokyselin se označuje jako translace. Transkripce a translace jsou klíčové procesy, které umožňují přenos genetické informace a její následnou expresi v podobě peptidového řetězce, popřípadě proteinu. Přenos

genetické informace funguje na principu přepisu sekvence DNA do genového transkriptu, mediátorové RNA, která kóduje určitý polypeptid. Pojem polypeptid někdy bývá zaměňován s proteinem, avšak polypeptid je řetězec mnoha molekul aminokyselin, zatímco protein je složen nejméně z jednoho polypeptidového řetězce, kde se počet aminokyselin pohybuje okolo 50 a více (25). Translace probíhá v ribozomech a při vzniku proteinů tento děj lze označit za proteosyntézu. Kromě proteinů mohou však ještě vznikat oligopeptidy, které obsahují méně než 11 aminokyselin (25).

Jelikož je eukaryotní buňka velmi komplexní jednotka se složitým systémem membrán, které jí rozčleňují do jednotlivých kompartmentů, má i komplikovanou genovou expresi. Genová exprese se odehrává v krocích, které probíhají odděleně ve specializovaných organelách.

Transkripce zahrnuje tři stádia: iniciace, elongace a terminace vlákna s uvolněním molekuly RNA (25). Prvním krokem je navázání RNA-polymerázy na promotor genu. Promotor je DNA sekvence nukleotidů, která označuje začátek genu. Od tohoto místa RNA-polymeráza čte řetězec dusíkatých bází a přiřazuje k nim komplementární RNA molekuly do té doby, než nenarazí na terminátor, což je naopak poslední nukleotid genu (25).

Syntéza RNA však nemůže být iniciována pouze RNA-polymerázami, je k tomu zapotřebí ještě vazba proteinových transkripčních faktorů (tj. SOX2, OCT4, HOX-A13) na promotorovou oblast, čímž se vytvoří celý iniciační komplex (23,24,25).

Proces iniciace RNA a proces elongace se navzájem překrývají. V rámci elongace, nebo-li prodlužování jsou modifikovány koncové části vznikajícího vlákna RNA, aby nedošlo po dokončení transkripce při transferu do ribozomů k degradaci přenášené genetické informace (25). V této fázi dochází ke strukturálnímu rozlišení konců RNA vláken na 5'-konec a 3'-konec. 3'-konec bude syntetizován až při finálním uvolnění vlákna mRNA. 5'-konec váže 7-metylguazinovou čepičku, zatímco 3'-konec je později polyadenylován (25).

Jakmile RNA-polymeráza narazí na terminátor, přepis DNA se ukončuje s výslednou primární mRNA (pre-mRNA). RNA-polymeráza, pre-mRNA a DNA řetězec se od sebe oddělují. Pre-mRNA, je tedy souborem všech komplementárních nukleotidů, v případě eukaryot zpravidla jednoho transkribovaného genu (25). Pro vznik mRNA je třeba posttranskripčních úprav, jelikož vlákno pre-mRNA zahrnuje mezi sekvencemi nukleotidů s funkční genetickou informací – tyto sekvence jsou nazývány exony – i nekódující sekvence zvané introny. Odstraněním intronů vzniká plně vyvinutá mRNA,

která podstupuje transfer z jádra do ribozomů v cytoplazmě, kde bude podrobena translaci (25).

Translace probíhá na složitých organelách ribozomů a účastní se jí hned tři typy RNA: ribosomální (rRNA), transferová (tRNA) a mediátorová (mRNA) (45). Ribozom se skládá z velké a malé podjednotky, které jsou tvořeny ribozomovými proteiny a rRNA (25). Stejně tak jako transkripce, translace probíhá ve třech fázích: iniciace, elongace a terminace.

Iniciace syntézy polypeptidového řetězce je zahájena přečtením mRNA iniciačního kodonu, kterým je triplet nukleotidů AUG (25). Iniciační kodon, ani terminační kodony UAA, UAG, UGA neurčují začlenění žádné aminokyseliny, signalizují pouze začátek a konec translace, proto se na ně nenavazuje tRNA (25). Molekuly tRNA do ribozomu přivádějí aminokyseliny, které se integrují do polypeptidového řetězce. Při translaci se na triplety nukleotidů mRNA, tzv. kodony, navazují dle zákonitostí genetického kódu komplementární triplety nukleotidů tRNA, tzv. antikodony. Při spárování kodonu a antikodonu se řetězec prodlouží o molekulu aminokyseliny. Kodony tak obvykle kódují několik z 20 běžných aminokyselin. Například umístění alaninu v polypeptidovém řetězci determinují mRNA sekvence GCU, GCC, GCA a GCG (25).

Terminace polypeptidového řetězce proběhne kdykoli, kdy při jeho elongaci vstoupí do translace jeden z terminačních kodonů. Proces translace je ukončen uvolněním mRNA vlákna z ribozomu, který se opět rozpadá na podjednotky.

Protein prochází dále skládáním do sekundární a terciální struktury, případně se ještě váže na jiné řetězce polypeptidů do kvartérní struktury, je-li multimerní (25).

2.5.2 DKK1

Do rodiny Dickkopf patří geny kódující proteiny DKK1, DKK2, DKK3 a DKK4, které v signálních drahách zprostředkovávají vzájemné interakce mezi proteiny (46). Sekvence nukleotidů determinující tvorbu DKK1 je obsažena v genu *Dkk1*, který se nachází v myším genomu na chromozomu 19 (50).

DKK1 je označován jako antagonist Wnt signální dráhy Wnt/ β -katenin, inhibuje totiž *Lrp5/6*, které jsou klíčovými koreceptory v této Wnt dráze (46). Regulace

tvorby proteinů *Lrp5/6* je endocytoticky umožněna transmembránovým proteinem KREMEN1, který je receptorem pro DKK1 (46).

Protein DKK1 se také účastní mechanismů vedoucích k nabytí pluripotence, a to aktivací *Sox2*, *Oct4* a *Nanog*. Syntetizované proteiny tvoří SOX2-OCT4 komplex, který se váže na NANOG, který je lokalizován přímo na promotoru DNA (15,16). *Dkk1* v tomto procesu opět inhibuje *Lrp5* (27).

DKK1 má velký rozsah v expresi v myších tkáních. Podílí se na tvorbě jak mezenchymálních, tak epiteliálních tkání (46).

2.5.2 WISP1

WISP1 (*WNT1 inducible signaling pathway protein*; WNT1 indukovatelný signalizační protein) je protein, který je kódován stejnojmenným genem *Wisp1* (30). Bývá označován také jako CCN4, který náleží k rodině CCN (*cellular communication network factor*; faktor buněčné komunikační sítě) (29). WISP1 je indukován expresí genu *Wnt1*, který syntetizuje protein Wnt signalizační dráhy – WNT1 (30). Gen WISP1 se u myši nachází na chromozomu 15 (51).

Wnt signalizační dráha dohlíží nad průběhem buněčné proliferace i nad buněčnou smrtí (autofagie, apoptóza) (28,30). Tyto procesy zajišťuje mTOR kináza, na jejíž syntéze se podílí WISP1 (30). WISP1 je spojován s aktivací Wnt signalizační dráhy (30).

U *Wisp1* opět platí, že má obsáhlou škálu exprese. Často tvoří signál v kondenzujícím se mezenchymu v blízkosti oblastí, kde dochází k formování kostí, podporuje osteoblastickou diferenciaci a proliferaci mezenchymálních buněk (30). Může také ovlivňovat expresi BMP2, a tím přispět k osteogenezi (30).

2.5.2 ECEL1

Ecell obsahuje informaci k proteosyntéze enzymatického proteinu konvertujícího endotelin, tento protein se nazývá ECEL1 (31). Endoteliny jsou peptidy, které mohou být degradovány ECEL1 nebo jím být pouze negativně regulovány (31). *Ecell* je u myši zakódován na chromozomu 1 (52).

ECEL1 byl detekován v endoplazmatickém retikulu a v menší míře v buněčné plasmatické membráně (32). Jeho hlavním úkolem je štěpit endoteliny, proto se jinak také

nazývá endopeptidáza. Jeho aktivita je stěžejní z hlediska hormonálních procesů při regulaci neuropeptidů a peptidů (31). Exprese je zvyšována při endogenní buněčné degradaci (32). Dokáže se chovat jako receptor i signalizační molekula. Je hojně exprimován v endoteli, neboli jednovrstevném plochém epitelu (31).

2.5.2 LYPD1

Gen *Lypd1* (*LY6/PLAUR domain-containing protein 1*), zkráceně LYPD1 (33). Tento gen je u myši lokalizován na chromozomu 1 (53).

LYPD1 se nachází v plazmatické membráně, což mu umožňuje negativně regulovat výskyt proteinů v okolním intracelulárním matrixu (33). LYPD1 je anticholinergikum, jež se chová jako modulátor aktivity nikotinových acetylcholinových receptorů (34). Tyto receptory jsou součástí neurálních signalizací, které se podílejí na formování odpovědi na podnět vyvolávající strach (34). Je faktorem, který determinuje buněčný osud ve vývoji neuronů. (33).

2.5.2 NELL1

Gen *Nell1*, který svou transkripcí iniciuje syntézu proteinu NELL1 (*Neural EGF like 1*), obsahuje ve své genetické informaci repetice obdobné EGF (*epidermal growth factor*; epidermální růstový faktor) (48). Ve struktuře proteinu NELL1 proto jsou lokalizovány domény příbuzné EGF, což umožňuje podíl na rozhodujících biologických procesech v buněčném cyklu (35). Genová sekvence je u myši umístěna na chromozomu 7 (54).

Expresi NELL1 determinuje BMP9 signál, který působí jako jeho pozitivní regulátor (35,36,47). Funkce proteinu NELL1 zásadně ovlivňuje buněčný růst a diferenciaci, kupříkladu indukuje diferenciaci osteoblastů, naopak redukuje jejich proliferaci a také rozhoduje o terminální mineralizaci (36).

2.5.2 BHLHE41

Protein BHLHE41 (*basic helix-loop-helix family member e41*; člen základní helix-loop-helix rodiny e41) je syntetizován genem *Bhlhe41*, který se u myši nachází na chromozomu 6 (37, 55).

Je předpokládáno, že se BHLHE41 vyskytuje v karyoplazmě, kde funguje jako transkripční faktor díky své schopnosti se navázat do represivních komplexů na promotory DNA (49). Tím znemožňuje nebo naopak zpřístupňuje RNA polymeráze vazbu na iniciační místo transkripce, tudíž gen, na jehož promotoru se vyskytuje BHLHE41, nepodstupuje genovou expresi a není tedy geneticky aktivní. Touto vlastností může BHLHE41 ovlivňovat i buněčné dělení. Jeho negativní regulační vlastnosti z BHLHE41 dělají represor na cirkadiánní úrovni (37). BHLHE41 inhibuje genovou expresi tzv. hodinových genů, jejichž aktivace a inaktivace v konkrétní denní době je nezbytná k tomu, aby biorytmus organismu zůstal nenarušen (37). Dojde-li k nedostatku BHLHE41, může se u organismu projevit fenotyp zkráceného spánkového cyklu (37).

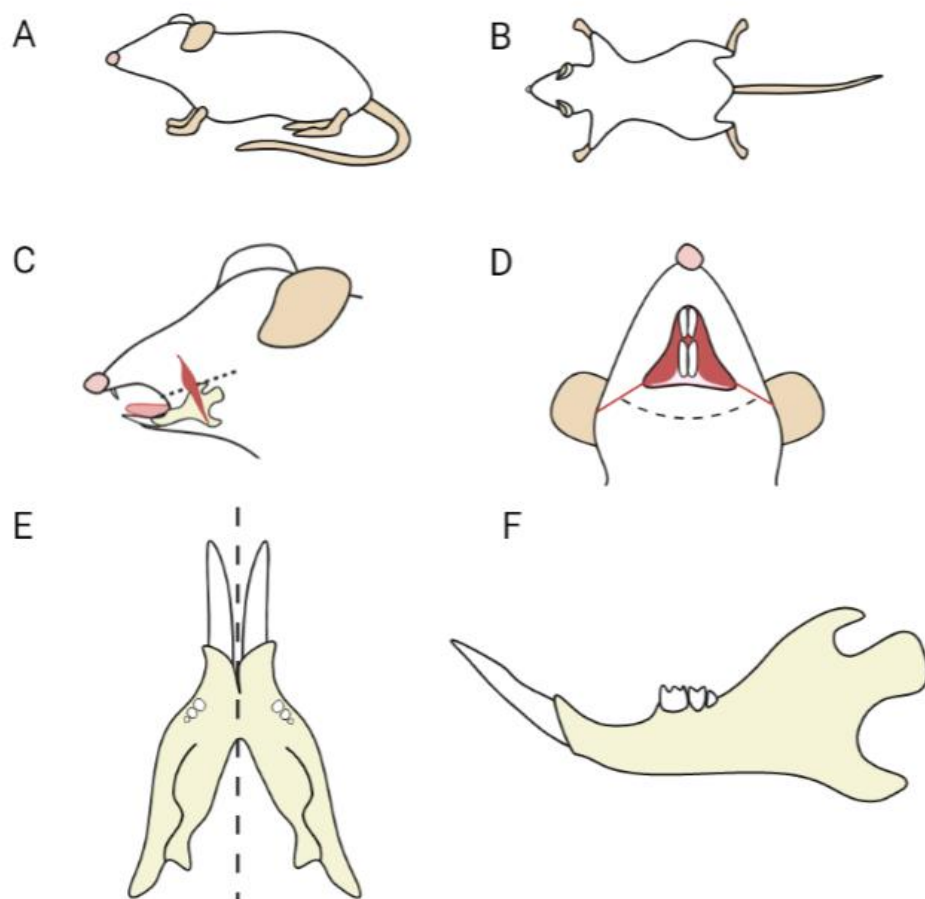
3 MATERIÁLY A METODY

Vlastní experiment sestával ze tří částí:

1. Odběr vzorků: disekce mandibuly.
2. Zpracování vzorků a detekce signálu genové exprese: fixace, dekalifikace, zalití do parafínu, *in situ* hybridizace, hematoxylinové barvení.
3. Mikroskopie.

3.1 Disekce mandibuly

Za účelem získání vzorků byly použity samečci C56BL/6 ve věku 6-8 týdnů, kterým byla nejprve odříznuta proximální část mandibulárního řezáku. Na základě délky časového úseku, který byl řezáku ponechán pro regeneraci, byly myši rozděleny do tří skupin: 12h, 24h a kontrolní vzorky bez poškozených řezáků. Usmrcení myši proběhlo inhalací anestetika izofluranu (KDG9623) a následnou cervikální dislokací, po čemž se přistoupilo k disekci mandibul.



Obr. 6: Disekce mandibulárního řezáku (Z archivu autorky, 2023)

Myš byla předávkována inhalací výparů kapalného izofluoranu (A) s následným provedením cervikální dislokace (B). Pomocí chirurgických nůžek byly na obou stranách stomatu přestřiženy žvýkací svaly i vazy spojující maxillu a mandibulu. Zároveň byla také odebrána lingua z cavum oris (C), po čemž následovalo vykloubení celé mandibuly z temporomandibulárního kloubu a její vyříznutí (D). V tomto bodě je vyseparována mandibula. Disekce řezáku je zakončena bisekcí mandibuly a odstraněním přebytečné tkáně (E,F).

3.2 Příprava vzorku

3.2.1 Fixace

Vzorky byly fixovány 24 hodin v 4% roztoku paraformaldehydu (PFA) (pH 7,4). Fixace zabraňuje posmrtnému rozkladu a uchovává buňky a tkáňové struktury co nejbližší životnímu stavu.

3.2.2 Dekalcifikace

Dále byly vzorky dekalifikovány po 10 dní v 10% roztoku EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) (pH7,4), který byl vyměňován každé 2-3 dny. Po celou dobu byly vzorky uchovávány při teplotě +4 °C.

Proces dekalifikace se provádí z důvodu další úpravy vzorků. Kost jako taková je jedna z nejtvrdějších tkání v těle, a proto je komplikované ji zpracovat do tenkých řezů určených k mikroskopii. Dekalcifikací se odstraní minerální složka kalcifikovaných tkání (tj. enamel, alveolární kost) a zůstává pouze složka biologická, která může být snadno bez poškození nakrájena na řezy o tloušťce 2 μm .

3.2.3 Zalítí do parafínu

Vzorky před zalitím do parafínu prošly dehydratací v rámci vzestupné ethanolové řady, následně xylenovým čištěním, a nakonec byly ponořeny do parafínu (viz tabulka č. 1).

LÁTKA	ČAS
70% ethanol	45 min
80% ethanol	60 min
96% ethanol	60 min
96% ethanol	60 min
96% ethanol	90 min
Xylen	30 min
Xylen	30 min
Xylen	45 min
Xylen	75 min
Parafín	60 min
Parafín	90 min
Parafín	120 min

Tabulka 1: Zpracování vzorků pro zalítí do parafínu

Poté byly zality do tekutého parafínu o teplotě 60 °C a po dalších několik hodin zahřívány.

Po ztuhnutí tekutého parafínu byly parafínové bloky se vzorky uvnitř nakrájeny za pomoci mikrotomu (Leica SM2000R) na řezy o tloušťce 2 µm, které byly přeneseny na podložní sklíčka. Vzorky byly uchovány přes noc na 37 °C, po čemž následovalo přemístění do pokojové teploty, avšak bez přístupu světla.

Parafín se používá při úpravě tkání k nakrájení na velmi tenké histologické řezy. Zalévání do parafínu je jednou ze tří běžně používaných přípravných metod. Dalšími dvěma jsou zmrazení tkáně do OCT a pak metoda s polotenkým řezem (*semithin*), která je využívána pro rozměrově větší vzorky.

Zalévání do parafínu má velkou výhodu v možnosti nakrájet tkáň až na mikrometry, čehož se využívá především pro *in situ* hybridizaci. Důvodem je velmi tenká vrstva tkáně, která obsahuje v ose z ideálně pouze jednu vrstvu buněk. Při vizualizaci tak není překryta žádná buňka a lze sledovat pouze 2D profil tkáně.

3.3 *In situ* hybridizace

Pro *in situ* hybridizaci byl použit RNAscope 2.5 HD Assay – *RED* (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA; 322350).

In situ hybridizace funguje na principu spojování komplementárních sekvencí DNA-DNA, DNA-RNA nebo RNA-RNA. V případě tohoto experimentu bylo využito vazby RNA-RNA, kdy aplikovaná uměle vytvořená RNAscope sonda vytvořila vazby s příslušnými molekulami mRNA (56) (viz obr. 7).

K *in situ* hybridizaci je nutné, aby vzorek prošel sérií úprav, které umožní navázání detekčních sekvencí na volné molekuly mRNA v cytoplazmě. K těmto krokům se využívají speciální patentovaná činidla: 2.5 H₂O₂ a Proteáza Plus (322330), Target Retrieval Buffer (322000), Wash Buffer (310091), 2.5 HD Detection Reagents (322360) (57).

Vzorky byly vloženy do vařící vodní lázně po 30 minut, po čemž byly dehydratovány ethanolem. Následně na ně byl aplikován peroxid vodíku. Po tomto kroku byly vzorky umístěny do Target Retrieval Buffer o teplotě 100 °C.

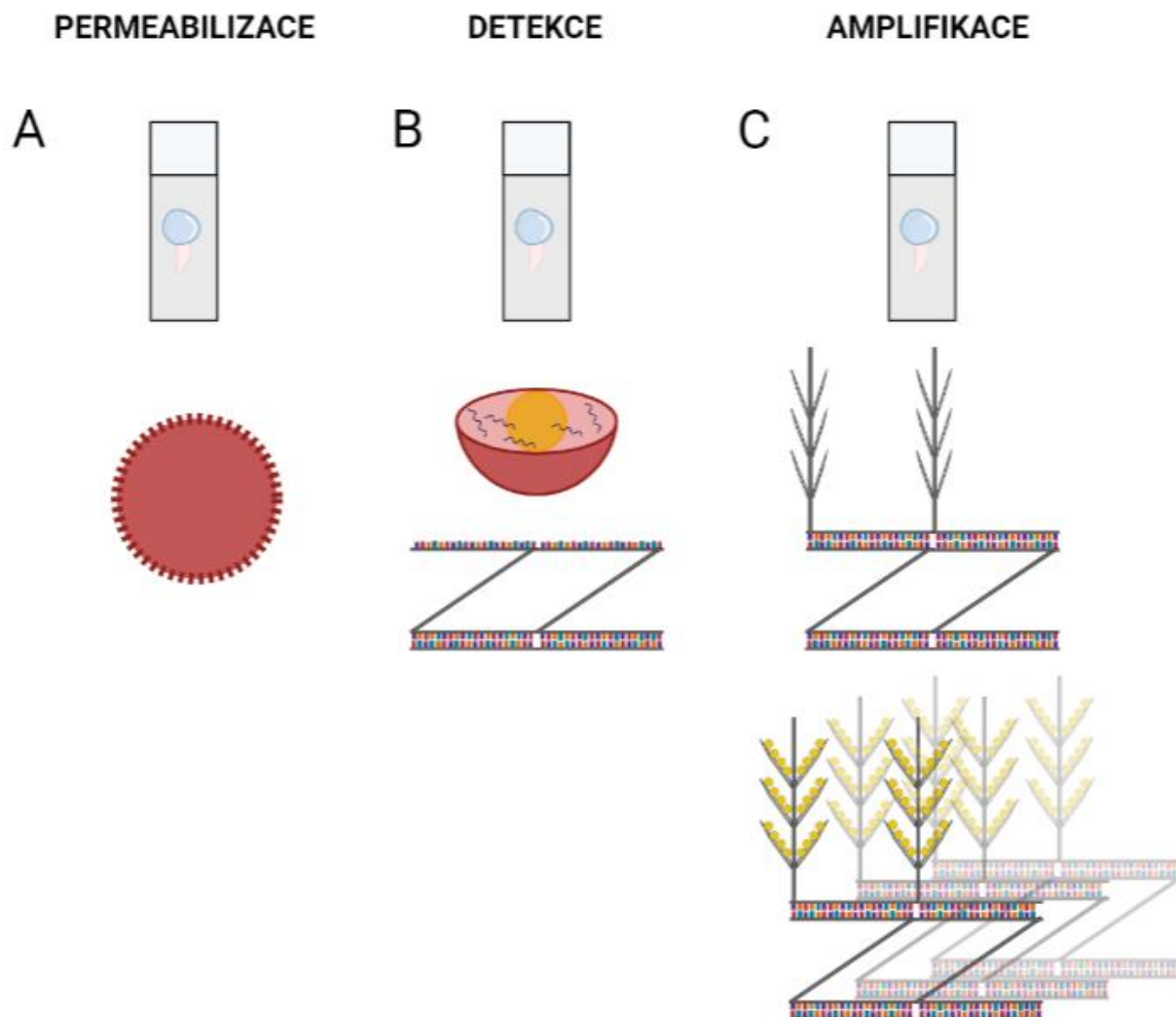
Přímý průchod sekvencí RNAscope průb je umožněn permeabilizací cytoplazmatické membrány, což je uskutečněno předešlou inkubací vzorku s cca 50 µl

Proteázy Plus při teplotě 40 °C. Po použití RNAscope prób se detekční sekvence zanedlouho ocitnou v cytoplazmě, kde lokalizují komplementární řetězce mRNA. V místech, kde se vyskytují dvě molekuly prób vedle sebe, se nachází specifický signál. Naváže-li se na mRNA pouze jedna molekula, signál je vyhodnocen jako nespecifický, a proto nepodléhá navazujícím amplifikačním procesům.

Signál je ještě více zesílen působením řady amplifikačních činidel (2.5 HD Detection Reagents). Tento signál informuje o přítomnosti mRNA určené k translaci do příslušného proteinu, který se projevuje na fenotypu nebo molekulárních interakcích buňky.

Wash Buffer byl použit k pročištění vzorků mezi aplikací jednotlivých amplifikátorů.

Vzorky jsou v jednotlivých fázích detekce i amplifikace bezprostředně po použití činidel inkubovány v hybridizační pícce (HybEZ Oven; 310010) za teploty 40 °C, která je optimální k hybridizačním procesům. Bylo použito celkem šest RNAscope prób: Dkk1 (402521), Wisp1 (501921), Ecel1 (475331), Lypd1 (318361), Nell1 (807961), Bhlhe41 (467431).



Obr. 7: RNAscope (Z archivu autorky, 2023)

Vzorky prošly protokolem RNAscope, který je založen na principu *in situ* hybridizace. Nejprve je třeba provést permeabilizaci buněčné membrány, čehož je dosaženo pomocí proteázových činidel (A). Tím je umožněn průchod molekul próby s navrženou sekvencí pro detekci hledaných signálů mRNA přímo v buňce (B). Na tyto próby se následně navazují amplifikátory, které slouží jako zesilovače signálu (C).

3.4 Hematoxylinové barvení

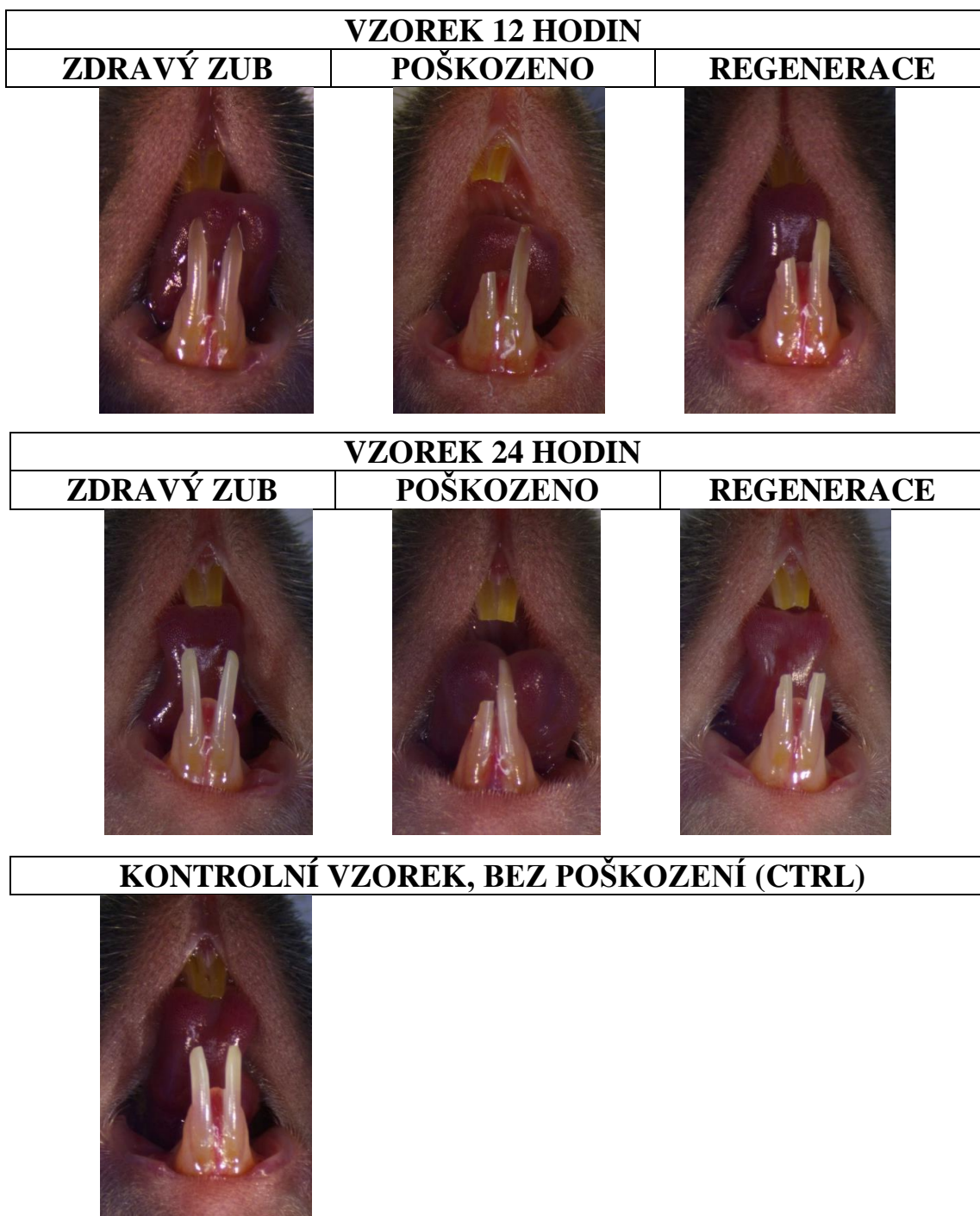
Histologické řezy určené k vizualizaci ve světelné rovině mikroskopu byly nabarveny hematoxylinem, nebo IMMPACT AP substrátem (Vector Laboratories; SK-5105). Jak substrát, tak hematoxylin obarvují na rozdíl od *in situ* hybridizace všechny buňky, což umožňuje vizualizaci celé tkáně.

3.5 Mikroskopie

Vzorky byly zpracovány metodou RNAscope pro analýzu ve světelné rovině. Každý signál v podobě tečky představuje jednu detekovanou molekulu mRNA, díky četnosti tak lze kvantifikovat počet buněk, které exprimují příslušný gen, a lze zanalyzovat také rozdíly intenzity signálů mezi různými geny.

4 VÝSLEDKY

4.1 Růst myšího řezáku na makroskopické úrovni



**Obr. 8: Regenerace myšího řezáku po mechanickém poškození
(Z archivu autorky, 2023)**

Myši byly rozděleny do tří skupin. Dvěma skupinám byla poškozena distální část řezáku. Třetí skupině nebyl poškozen řezák za účelem porovnání procesů před a po poškození řezáku. Jedné skupině s poškozeným řezákem bylo pro regenerační procesy ponecháno 12 hodin, zatímco druhá skupina měla pro ty samé regenerační procesy ponecháno 24

hodin. Na fotkách si lze povšimnout, že řezák dorůstá především v časovém intervalu 12 – 24 hodin. Tato skutečnost naznačuje, že v časovém úseku od poškození zubu zhruba do času 12 hodin dochází k útlumu signalizačních drah, které inhibují buněčnou proliferaci, a zároveň jsou tak aktivovány signalizační dráhy, které iniciují proliferaci.

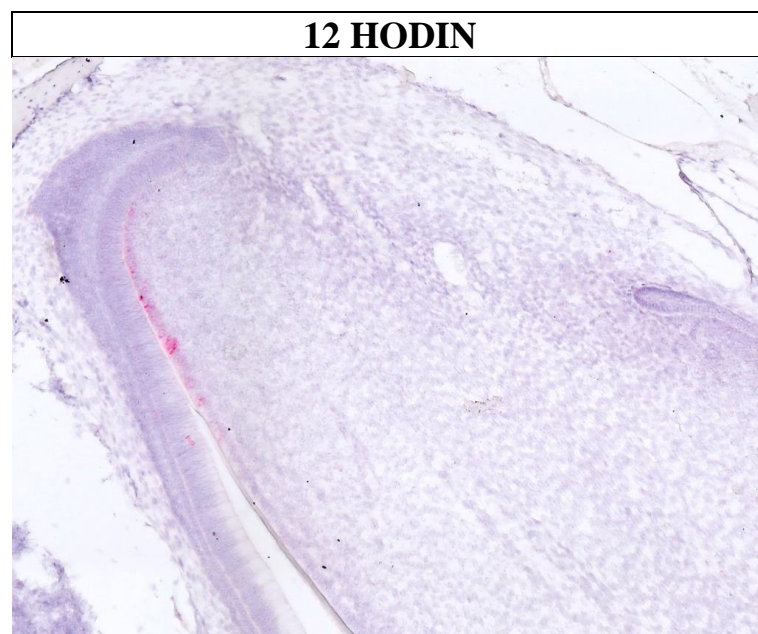
Nejen, že myší zub roste v průběhu celého života organismu, ale, jak lze pozorovat, je patrné, že několikanásobně svou rychlost růstu zvyšuje v odpovědi na poškození (viz obr. 8). Na vědecké scéně se objevují teze, dle kterých může být tato akcelerace zapříčiněna buď ztrátou kontaktu s protější denticí, což znemožňuje abrazi, nebo může být tato rapidní změna způsobena stimulací nervů v pulpě, což iniciuje vznik receptorů sloužících k tvorbě hormonů souvisejících s bolestí. Na jedné straně tedy stojí hypotéza mechanická, a na té druhé hypotéza nervová. Jednou z náplní této práce je na základě získaných dat podpořit nervovou hypotézu, která by ještě více mohla podtrhnout změny proliferační aktivity kmenových buněk.

4.2 Genová exprese

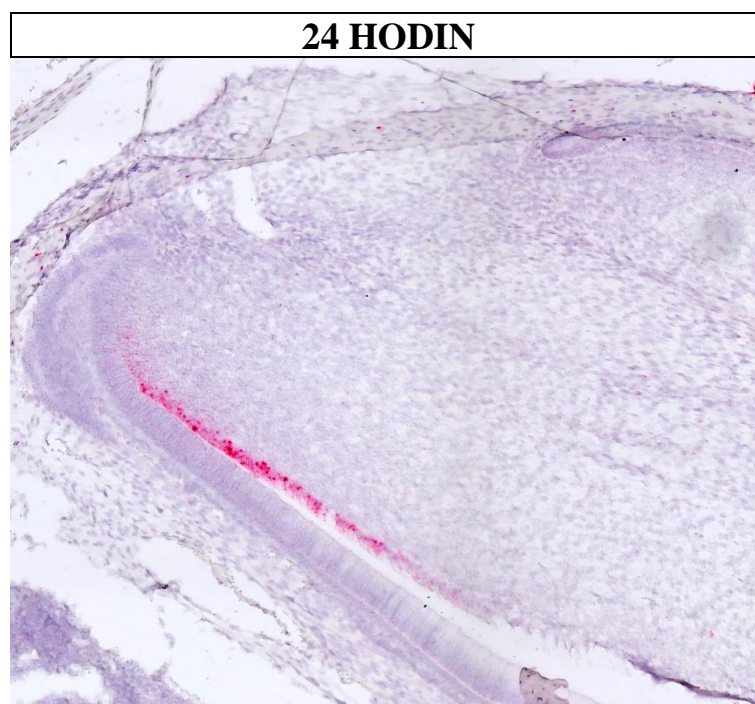
4.2.1 DKK1



Obr. 9: Exprese genu *Dkk1* v myším řezáku v kontrolním vzorku



Obr. 10: Exprese genu *Dkk1* v myším řezáku 12 hodin po poškození



Obr. 11: Expresa genu *Dkk1* v myším řezáku 24 hodin po poškození

V kontrolním vzorku začíná exprese DKK1 již v kondenzujících mezenchymálních SCs, které pod jeho působením diferencují v preodontoblasty. V postupně maturujících odontoblastech je exprese čím dál více utlumována, až se signál ztrácí úplně v oblasti, kde se již začínají vyskytovat odontoblasty v sekreční fázi. Role exprese DKK1 v preodontoblastech a kondenzovaném mezenchymu zřejmě spočívá v inhibici Wnt/ β -katenin dráhy, která v kombinaci s WISP1 způsobuje diferenciaci.

Pokles exprese DKK1 na timepointu 12h po poškození potvrzuje, že aktivita genu *Dkk1* úzce souvisí s aktivací Wnt/ β -katenin dráhy, která za normálních podmínek zůstává potlačena. Wnt dráhy se hojně podílí na embryonálním vývoji a jejich iniciace je spojena s buněčnou proliferací. Jelikož je DKK1 inhibitorem Wnt/ β -katenin dráhy, jeho deficit způsobuje zvýšení proliferace mezenchymálních SCs. Z toho vyplývá, že je v danou chvíli diferenciace preodontoblastů omezena – DKK1 nechává Wnt/ β -katenin dráze volný průběh. Podobně tomu je i v odontogenezi, kdy jsou Wnt dráhy nezbytné pro správný morfogenetický vývoj. Proto se významnější známky exprese DKK1 projevují až po utlumení Wnt dráhy, čemuž se tak děje v prvních dnech postnatálního období.

V čase 24 hodin po poškození je již exprese DKK1 obnovena, z čehož lze soudit, že v zájmu zachování normálních proporcí zubu bylo třeba zregulovat Wnt dráhu v oblasti labiální cervikální smyčky. Hlavním důvodem nezbytné inhibice Wnt/ β -katenin

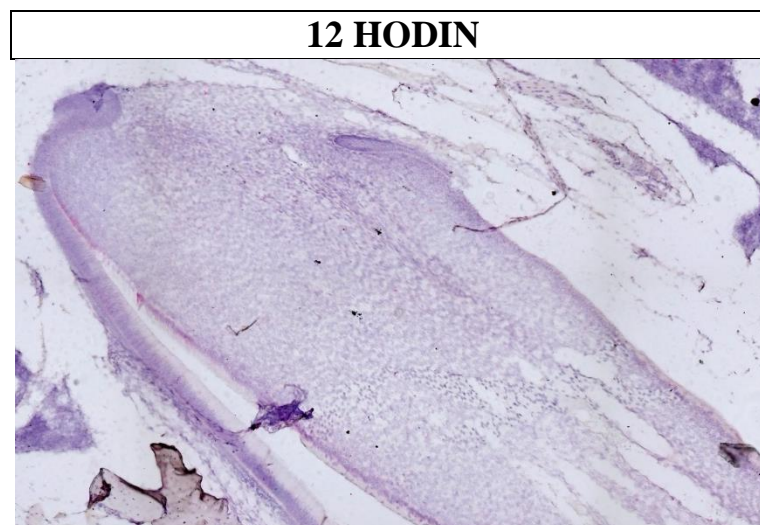
dráhy v této oblasti je, že zde rovněž probíhá exprese WISP1. Bez přítomnosti DKK1 by mohla probíhat diferenciace v bezprostřední blízkosti mezenchymálních SCs, což by vedlo k postupné ztrátě jejich populace.

Zajímavé jsou rozdíly mezi labiální a linguální cervikální smyčkou. Všechny výše popsané skutečnosti totiž platí pouze pro analog korunky. To by mohlo znamenat, že analog kořene navzdory tomu, že v něm odontoblasty hrají v produkci dentinu o něco zásadnější roli než v analogu korunky, místo DKK1 využívá jiných inhibitorů Wnt/ β -katenin dráhy. Druhou možností by mohla být úplná absence Wnt/ β -katenin dráhy v linguální smyčce, kterou ale vyvrací data z exprese WISP1.

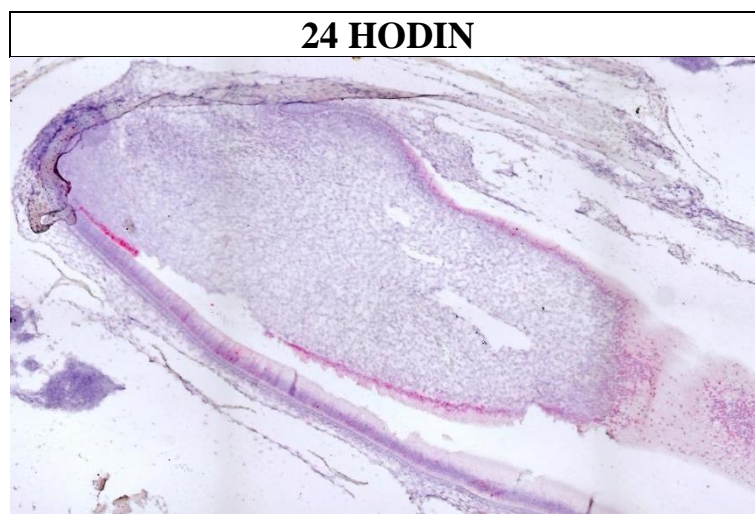
4.2.2 WISP1



Obr. 12: Expres genu *Wisp1* v myším řezáku v kontrolním vzorku



Obr. 13: Expres genu *Wisp1* v myším řezáku 12 hodin po poškození



Obr. 14: Expresí genu *Wisp1* v myším řezáku 24 hodin po poškození

Expresí genu *Wisp1* je v kontrolním vzorku velmi rozsáhlá. Byla detekována zejména v celé labiální a apikální části linguální linie odontoblastů, a dokonce slabě i v ameloblastech vstupujících do sekreční fáze. Tento podíl na četném výskytu zapříčiňuje nejzásadnější charakteristika WISP1 jakožto WNT1 indukčního proteinu. Protein WISP1 se skrze Wnt/ β -katenin dráhu podílí na diferenciaci a regulaci buněčných populací. Tento výrok potvrzují i data ze vzorků s expresí DKK1, jehož signál se nachází již v kondenzovaném mezenchymu, sílí v preodontoblastech a slábne s rostoucí expresí WISP1.

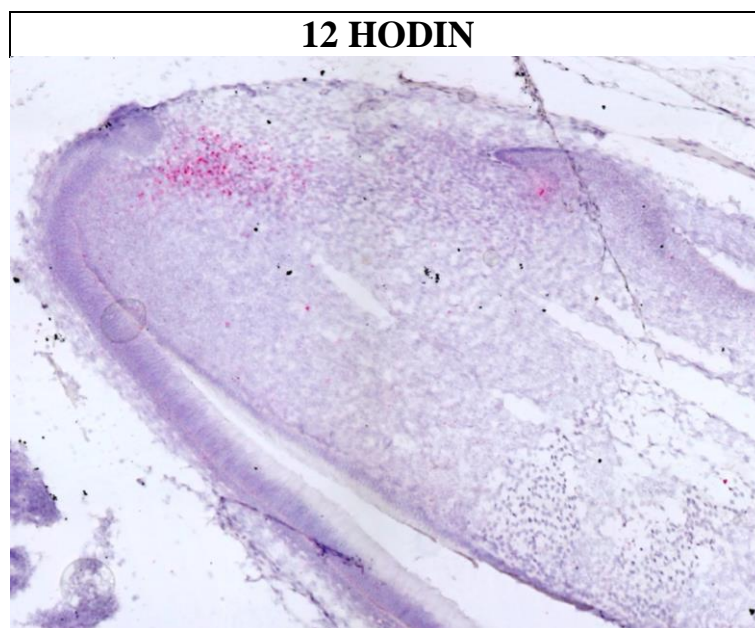
Expresí se poté utlumuje a po 12 hodinách regenerace řezáku je inhibována téměř úplně. Jak se jeví, negativní regulace WISP1 zapříčiňuje rozsáhlou proliferaci buněk, během které je dočasně pozastavena diferenciace. Wnt/ β -katenin dráha tedy mění svou povahu na základě přítomnosti WISP1.

Expresí WISP1 se opět obnovuje 24 hodin po poškození, což stejně jako obnova expresí DKK1 vypovídá o ukončení regenerace řezáku a postupném zpomalení jeho růstu za zvýšené diferenciací buněk, které dále migrují k distální části řezáku.

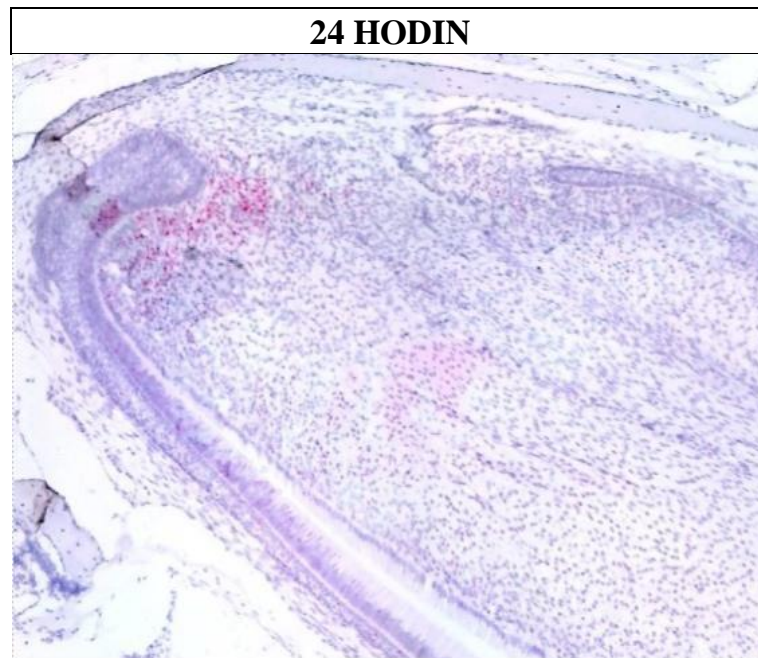
4.2.3 ECEL1



Obr. 15: Expresse genu *Ecell* v myším řezáku v kontrolním vzorku



Obr. 16: Expresse genu *Ecell* v myším řezáku 12 hodin po poškození



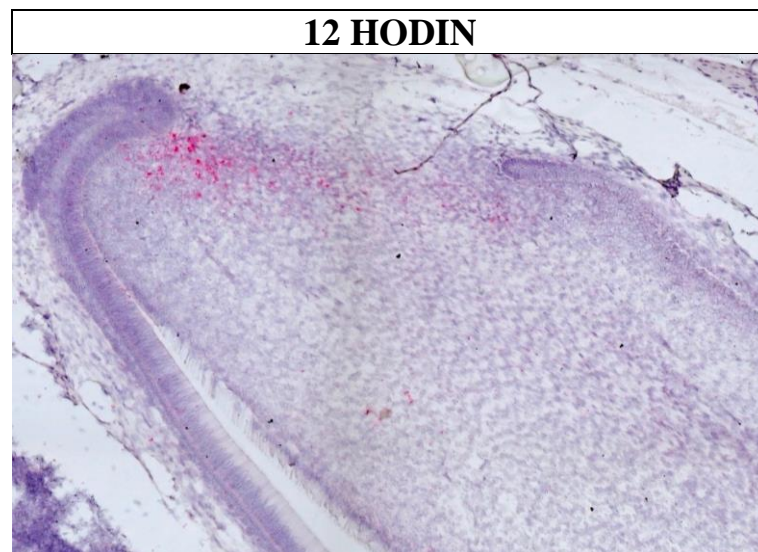
Obr. 17: Expres genu *Ecel1* v myším řezáku 24 hodin po poškození

Buňky exprimující ECEL1 jsou lokalizovány v apikální části v oblasti labiálních mezenchymálních SCs a škála exprese ECEL1 se v průběhu regenerace nijak zásadně nemění. ECEL1 lze tím pádem považovat za gen nereagující na exogenní mechanické poškození orgánu. Není zapojen do žádných souvisejících signálních drah a zřejmě se zde podílí pouze na rozkladu endotelinů.

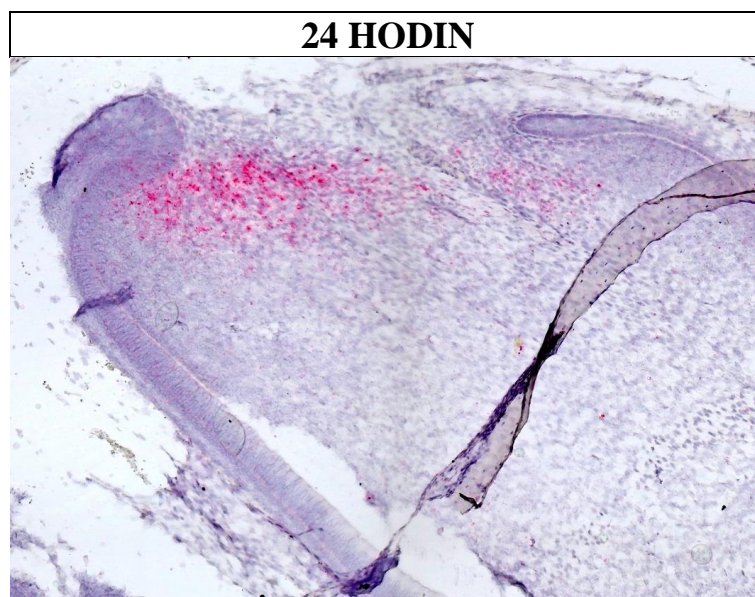
4.2.5 LYPD1



Obr. 18: Expresse genu *Lypd1* v myším řezáku v kontrolním vzorku



Obr. 19: Expresse genu *Lypd1* v myším řezáku 12 hodin po poškození



Obr. 20: Expresie genu *Lypd1* v myším řezáku 24 hodin po poškození

Nejsilnější exprese LYPD1 byla zaznamenána v kontrolním vzorku, konkrétně v apikální části řezáku v labiálních i linguálních mezenchymálních SCs. Signál v blízkosti labiální cervikální smyčky je však mnohem intenzivnější, nežli je tomu u linguální smyčky.

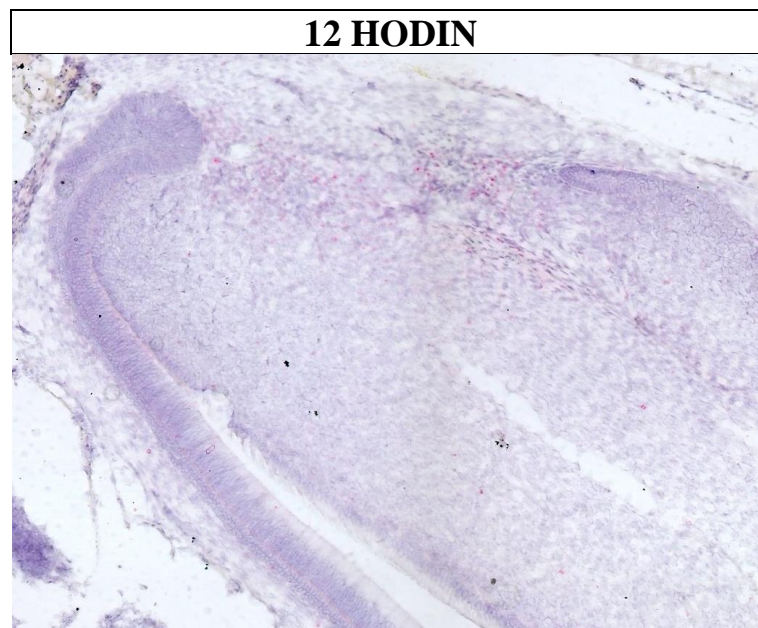
Po 12 hodinách je exprese výrazně utlumena. Dle již známých informací o LYPD1, týkajících se jeho role neurotransmiteru v reakcích na podněty vyvolávající strach, je možné, že pokles v expresi na timepointu 12h souvisí právě přímo s poškozením řezáku myši, která takto navíc byla vystavena stresovému prostředí. Absence LYPD1 na nikotin-acetylcholinových receptorech by v tom případě vedla k interakci buněčné membrány s jinými signalizačními molekulami, které poskytují informaci k indukci proliferace.

Expresie je v čase 24 hodin po poškození již téměř obnovena, což podporuje trend uvedení parametrů v mikroprostředí SCs přibližně do původního stavu již po 24 hodinách.

4.2.5 NELL1

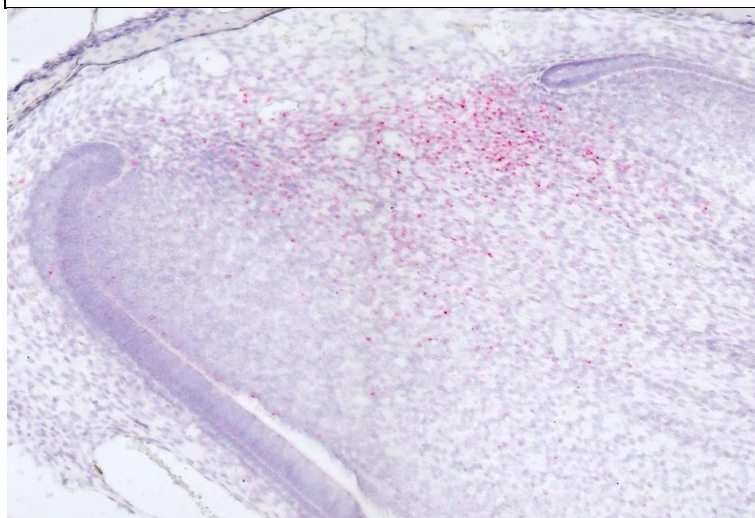


Obr. 21: Expresse genu *Nell1* v myším řezáku v kontrolním vzorku



Obr. 22: Expresse genu *Nell1* v myším řezáku 12 hodin po poškození

24 HODIN



Obr. 23: Expresse genu *Nell1* v myším řezáku 24 hodin po poškození

Nejintenzivnější exprimovaný signál lze pozorovat v kontrolním vzorku, kde *Nell1* podléhá transkripci v apikální části pulpy, zejména v oblasti mezi cervikálními smyčkami.

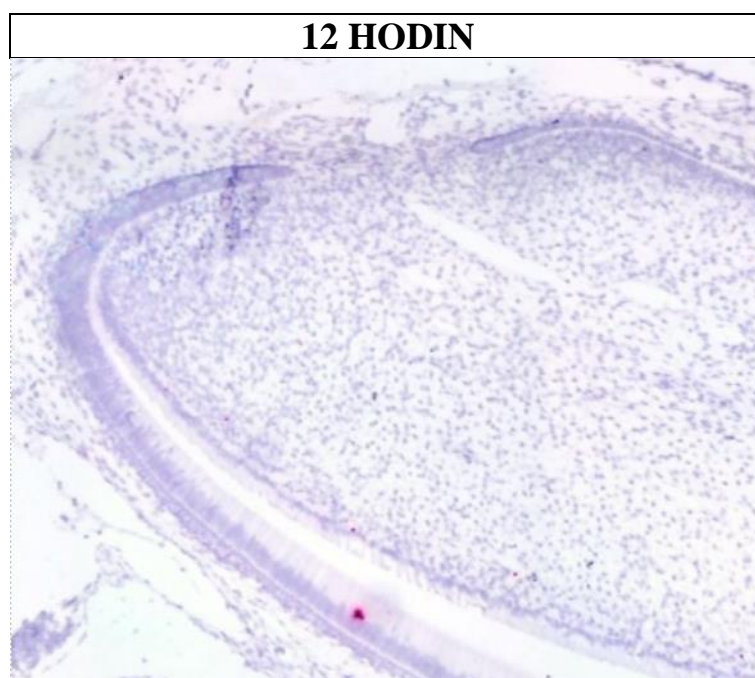
Na druhou stranu na timepointu 12 hodin je veškerá genová exprese *Nell1* potlačena. V porovnání data ze vzorků zdravého zubu a z 12 hodin po poškození odpovídají dříve zjištěným či předpokládaným efektům NELL1. Tento rapidní rozdíl potvrzuje roli NELL1 v buněčné diferenciaci, příp. v proliferaci. V kontrolním vzorku zdravého zubu dochází k velké míře exprese, jelikož je při stabilním rovnoměrném růstu zubu nutné podporovat buněčnou diferenciaci. Naopak 12 hodin po poškození je indukce diferenciaci nežádoucí, a to zejména z důvodu co nejrychlejšího nahrazení ztracených buněk.

V čase 24 hodin po poškození ovšem ještě nedošlo k plnému obnovení exprese, a tedy patrně je exprese NELL1 ve většině buněk, které jej za normálních podmínek exprimují, potlačována v zájmu kompletního obnovení řezáku.

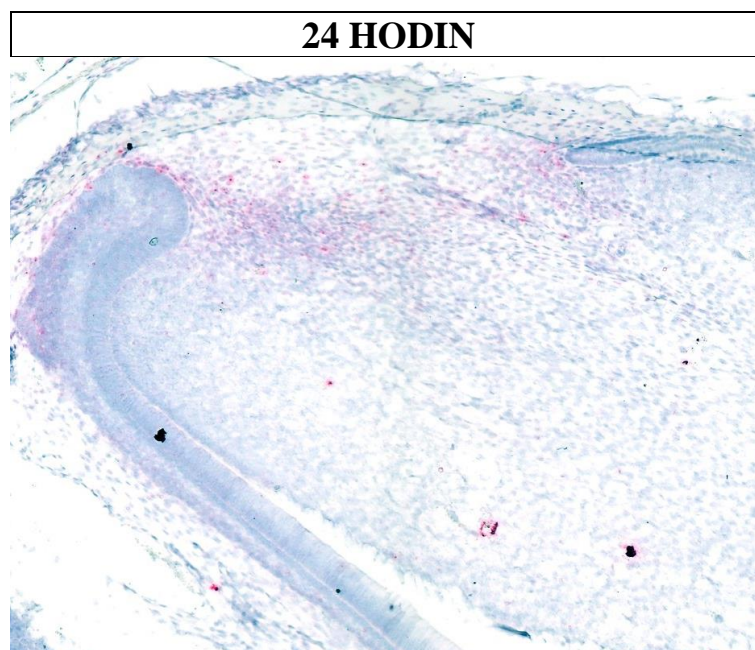
4.2.6 BHLHE41



Obr. 24: Expres genu *Bhlhe41* v myším řezáku v kontrolním vzorku



Obr. 25: Expres genu *Bhlhe41* v myším řezáku 12 hodin po poškození

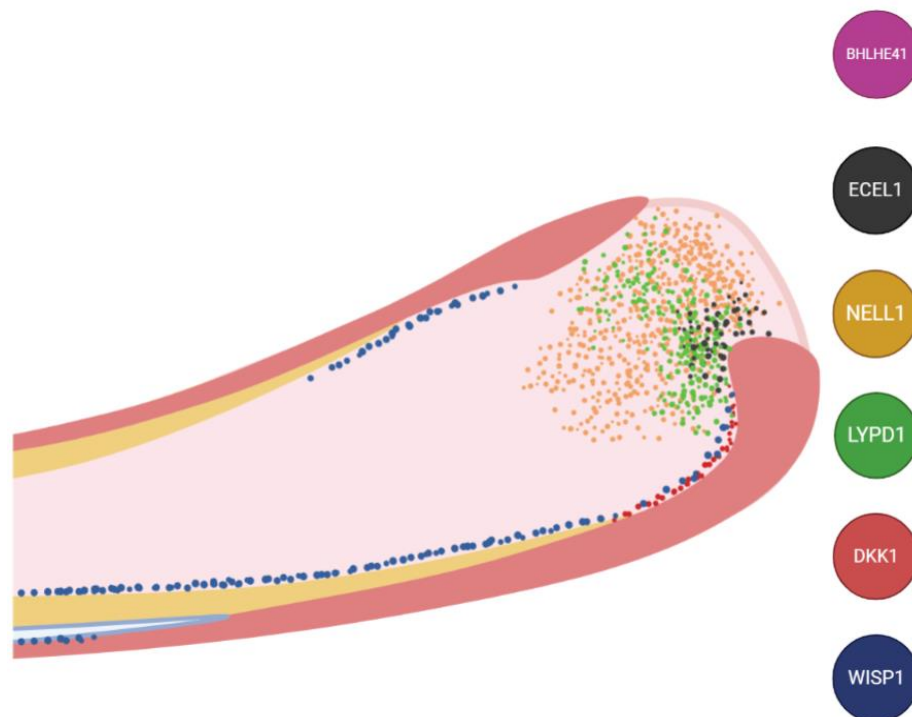


Obr. 26: Expresse genu *Bhlhe41* v myším řezáku 24 hodin po poškození

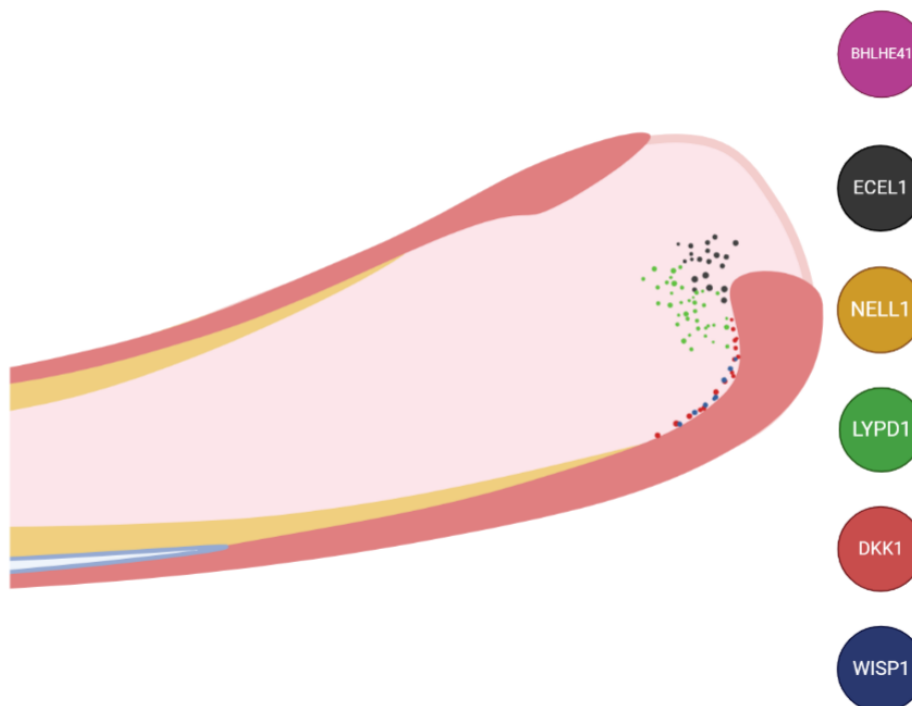
BHLHE41 je ve všech vzorcích exprimován velmi slabě. Signál se nachází především v pulpě v okolí cervikálních smyček. Jelikož je protein BHLHE41 inhibičním transkripčním faktorem, který je vázán přímo na DNA promotory, exprese BHLHE41 znamená redukovanou proliferaci.

Zajímavé jsou rozdíly mezi jednotlivými vzorky, zatímco v kontrolním vzorku je exprese BHLHE41 téměř zanedbatelná, 12 hodin nato je exprese zastavena úplně, aby byla přibližně 24 hodin po poškození nejintenzivnější, dokonce silnější než v kontrolním vzorku. Tato skutečnost vede k závěru, že právě exprese BHLHE41 je jedním z faktorů, které vytváří signál pro negativní regulaci proliferace v mikroprostředí SCs. Zachování tohoto mechanismu by pro zpomalení růstu řezáku při terminaci regeneračních procesů mohlo být naprosto klíčové.

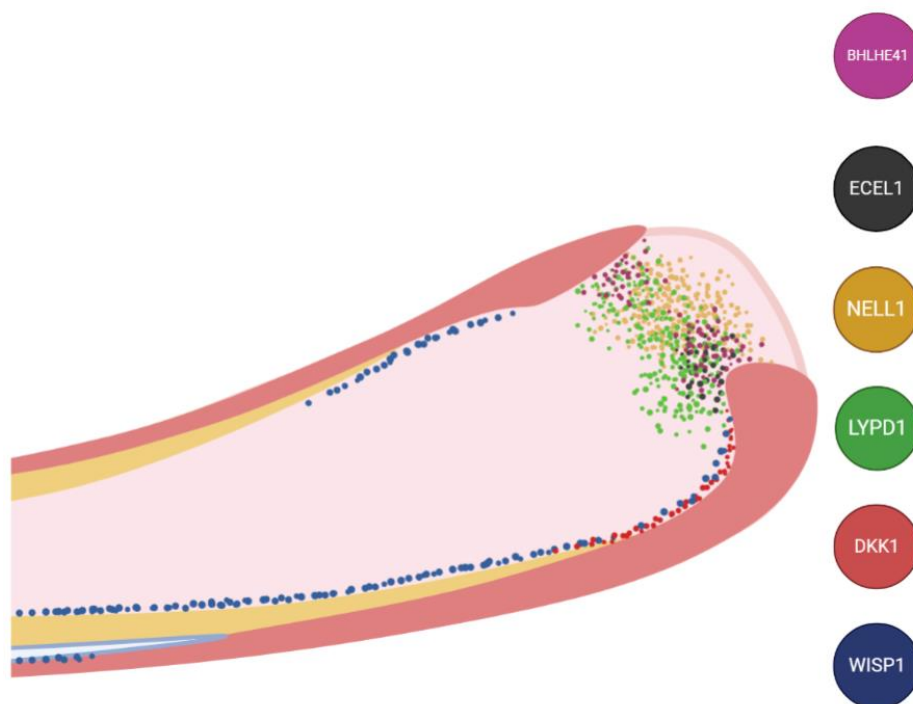
4.3 Interakce a signální dráhy



Obr. 27: Schéma exprese genů ve vzorku nepoškozeného řezáku
(Z archivu autorky, 2022)



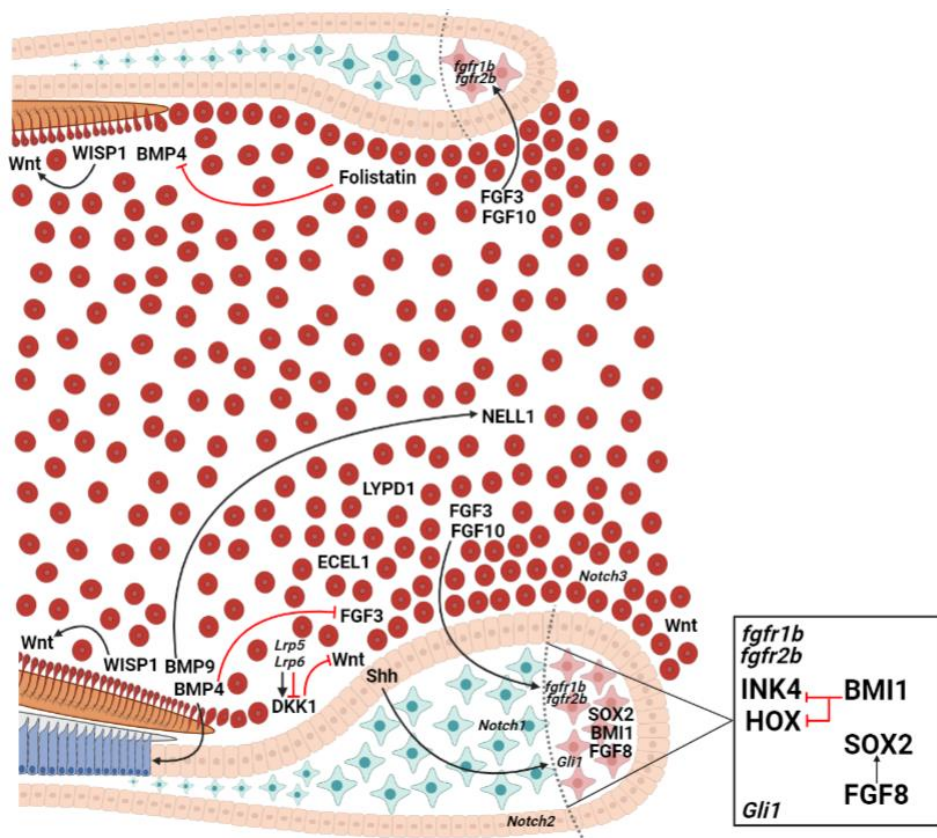
Obr. 28: Schéma exprese genů ve vzorku 12h po poškození
(Z archivu autorky, 2022)



Obr. 29: Schéma exprese genů ve vzorku 24h po poškození (Z archivu autorky, 2022)

Výsledky na buněčné úrovni poskytují v zásadě dva typy informací. Za prvé, představu o konkrétním vlivu sledovaných genů na fenotyp buňky. A za druhé, získaná data nastiňují změny proliferačních aktivit kmenových buněk, což je spjato s poklesem diferenciací.

Téměř všechny exprimované geny sledují trend poklesu na timepointu 12h (viz obr. 28). Tato skutečnost naznačuje, že sledované geny hrají roli při regulaci buněčného dělení a případně zajišťují projev určitého fenotypu, který je výsledkem diferenciací procesů. Jedinou výjimku tvoří *Ecell* a *Bhlhe41*. Exprese BHLHE41 probíhá až 24 hodin po poškození, existuje proto možnost, že je ve větší míře exprimován teprve, je-li třeba zpomalit buněčnou proliferaci (viz obr. 29).



Obr. 30: Schéma molekulárních interakcí ve vzorku nepoškozeného řezáku (Z archivu autorky, 2022)

Zakomponují-li se geny detekované na buněčné úrovni do signalizačních drah na molekulární úrovni, jejich role představuje nový pohled do rozsáhlé komplexní sítě vzájemně se ovlivňujících signálů. Exprese genů, jejich interakce a signální dráhy, podléjící se za normálních podmínek na aktivitě kmenových buněk v myším řezáku, zmiňované v této práci, jsou vyznačeny ve schématu výše (viz obr. 30).

5 DISKUSE

Téma kmenových buněk je v oblasti regenerativní medicíny v poslední době považováno za čím dál tím víc atraktivní. Samotné fungování kmenových buněk a jejich role v reparaci a regeneraci poškozené tkáně však je doposud ne zcela pochopena. Z toho důvodu je považováno za klíčové poznání faktorů, kterými je udržení progenitorové populace podmíněno, nebo naopak které determinují projev určitého fenotypu.

Tato práce se zabývá podrobnějšími účinky genů, které byly vyselektovány na základě předešlého výzkumu (Křivánek et al., 2020), a sleduje jejich zatím neprozkoumané reakce na poškození kontinuálně rostoucího zubu.

Detekovaná exprese DKK1 a WISP1 podporuje dříve získaná data (Lavický et al., 2021) a vsazuje je do přesněji definovaného vztahu v rámci Wnt signalizační dráhy.

V kontextu zubu pak vzorky exprese LYPD1, ECEL1 a NELL1 zobrazují zcela nová, dosud nepozorovaná, data. Zatímco v této práci je blíže popsána souvislost NELL1 s diferenciací mezenchymálních buněk pulpy, role LYPD1 v možné neurální signalizaci zůstává nevysvětlena. Protein LYPD1 by se však mohl podílet na inervaci zubní pulpy, což naznačuje jak oblast exprese v zubním apexu, tak předešlé studie LYPD1 v kontextu neurogeneze. Naopak, jak ukazují výsledky, *Ecell* se jeví jako kompletně nereagující gen na poškození, potažmo změnu proliferační aktivity, jelikož jeho exprese v průběhu regenerace zůstává nepozměněna v porovnání s expresí v kontrolním vzorku nepoškozeného řezáku.

Posledním genem, jehož exprese byla pozorována, je *Bhlhe41*. Výsledky naznačují, že BHLHE41 by mohl být negativním regulátorem abnormálně zvýšené proliferace, která je indukována mechanickým poškozením. Za normálních podmínek není v myším řezáku exprimován.

Není pochyb o tom, že vzhledem ke komplexitě dynamických signalizačních drah v kontinuálně rostoucím zubu poskytují nově získaná data pouze zlomek pohledu do procesů stojících za regulací kmenových buněk v apikální části řezáku. Proto nemohou být analyzována bez uvedení do kontextu s ostatními známými faktory, které ovlivňují mikroprostředí kmenových buněk (Jernvall et Thesleff, 2000). Takovou perspektivu tato práce také poskytuje, avšak interakce jsou zde vykonstruovány na základě obecných znalostí o jednotlivých genech. Proto by ten samý znovu opakovaný experiment zahrnoval i detekci exprese například proteinu BMP9, který úzce souvisí s expresí NELL1, nebo také SOX2, FGF10 a FGF3, které hrají zásadní roli v míře proliferace kmenových buněk. Rovněž aktivace kmenových buněk v analogu kořene vyžaduje další výzkum, dle výsledků jsou signály pro zvýšení soustředěny především do analogu korunky a otázky ohledně odlišných diferencovaných buněčných populací ještě nejsou zcela zodpovězeny.

6 ZÁVĚR

Tento projekt objasňuje problematiku procesů stojících za změnou proliferační aktivity kmenových buněk myšího řezáku v odpovědi na mechanické poškození. Tato práce poskytuje inovativní a zcela původní informace o genech *Dkk1*, *Wisp1*, *Ecell*, *Lypd1*, *Nell1* a *Bhlhe41*, jejichž podíl na proliferaci kmenových buněk v kontinuálně rostoucím myším řezáku byl doložen řadou studií.

V této práci byly definovány konkrétní účinky a lokace exprese genů majících vliv na aktivitu kmenových buněk. Dále byla popsána jejich regulace po mechanickém poškození myšího řezáku v čase i prostoru. Geny *Dkk1*, *Wisp1*, *Lypd1*, *Nell1* a *Bhlhe41* byly identifikovány jako klíčové, neboť vykazovaly po způsobení traumatu patrnou změnu exprese.

Role DKK1 a WISP1 ve Wnt signalizační dráze byla potvrzena a blíže definována. Rovněž byly objasněny účinky NELL1, jenž interaguje s BMP9 a způsobuje tak diferenciaci buněk zubní pulpy za inhibice buněčné proliferace v těchto místech.

Informace o genu LYPD1 v literatuře jsou velice stručné a jeho účinky jsou dodnes popsány nedostatečně. Tato práce naznačuje roli LYPD1 v diferenciaci nervových buněk v apikální části zubní pulpy.

ECEL1 byl na základě exprese nezávislé na poškození zubu vyloučen z genů ovlivňujících aktivitu kmenových buněk.

Role BHLHE41 dle získaných dat spočívá v terminaci buněčné proliferace ve chvíli, kdy je řezák téměř zcela zregenerován.

Nové poznatky, kterými tato práce přispěla k neustále probíhajícímu výzkumu kmenových buněk, mají potenciál najít do budoucna uplatnění na

poli regenerativní medicíny, ať už ve vytváření živých zubních výplní, či v léčbě leukémie.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Hierarchie kmenových buněk	18
Obrázek 2: Proliferace kmenových buněk	20
Obrázek 3: Anatomická a histologická stavba myšního řezáku	23
Obrázek 4: Diverzní struktura Tomesových vláken odontoblastů	24
Obrázek 5: Labiální mikroprostředí kmenových buněk	25
Obrázek 6: Disekce mandibulárního řezáku	34
Obrázek 7: RNAscope	38
Obrázek 8: Regenerace myšního řezáku po mechanickém poškození	40
Obrázek 9: Exprese genu <i>Dkk1</i> v myším řezáku v kontrolním vzorku	41
Obrázek 10: Exprese genu <i>Dkk1</i> v myším řezáku 12 hodin po poškození	42
Obrázek 11: Exprese genu <i>Dkk1</i> v myším řezáku 24 hodin po poškození	42
Obrázek 12: Exprese genu <i>Wisp1</i> v myším řezáku v kontrolním vzorku	44
Obrázek 13: Exprese genu <i>Wisp1</i> v myším řezáku 12 hodin po poškození	44
Obrázek 14: Exprese genu <i>Wisp1</i> v myším řezáku 24 hodin po poškození	45
Obrázek 15: Exprese genu <i>Ecell</i> v myším řezáku v kontrolním vzorku	46
Obrázek 16: Exprese genu <i>Ecell</i> v myším řezáku 12 hodin po poškození	46
Obrázek 17: Exprese genu <i>Ecell</i> v myším řezáku 24 hodin po poškození	47

Obrázek 18:	
Expresce genu <i>Lypd1</i> v myším řezáku v kontrolním vzorku	48
Obrázek 19:	
Expresce genu <i>Lypd1</i> v myším řezáku 12 hodin po poškození	48
Obrázek 20:	
Expresce genu <i>Lypd1</i> v myším řezáku 24 hodin po poškození	49
Obrázek 21:	
Expresce genu <i>Nell1</i> v myším řezáku v kontrolním vzorku	50
Obrázek 22:	
Expresce genu <i>Nell1</i> v myším řezáku 12 hodin po poškození.....	50
Obrázek 23:	
Expresce genu <i>Nell1</i> v myším řezáku 24 hodin po poškození.....	51
Obrázek 24:	
Expresce genu <i>Bhlhe41</i> v myším řezáku v kontrolním vzorku	52
Obrázek 25:	
Expresce genu <i>Bhlhe41</i> v myším řezáku 12 hodin po poškození.....	52
Obrázek 26:	
Expresce genu <i>Bhlhe41</i> v myším řezáku 24 hodin po poškození.....	53
Obrázek 27:	
Schéma exprese genů ve vzorku nepoškozeného řezáku.....	54
Obrázek 28:	
Schéma exprese genů ve vzorku 12h po poškození	54
Obrázek 29:	
Schéma exprese genů ve vzorku 24h po poškození	55
Obrázek 30:	
Schéma molekulárních interakcí ve vzorku nepoškozeného řezáku	56
Tabulka 1: Zpracování vzorků pro zalití do parafínu	35

8 SEZNAM ZKRATEK

ASCs	Adultní kmenové buňky (<i>Adult stem cells</i>)
<i>Bhlhe41</i>	<i>Basic helix-loop-helix family, member e41</i> ; gen
BHLHE41	<i>Basic helix-loop-helix family member e41</i> ; protein
<i>Bmi1</i>	<i>Bmi1</i> proto-oncogen, <i>polycomb RING finger</i> doména
BMP	Kostní morfogenetický protein (<i>Bone morphogenetic protein</i>)
<i>c-Myc</i>	Onkogen myelocytomatózy
CCN4	Faktor buněčné komunikační sítě 4 (<i>Cellular communication network factor 4</i>); <i>Wisp1</i>
<i>Dkk1</i>	<i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i> ; gen
DKK1	<i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i> ; protein
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
<i>Ecel1</i>	<i>Endothelin converting enzyme-like 1</i> ; gen
ECEL1	<i>Endothelin converting enzyme-like 1</i> ; protein
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ESCs	Embryonální kmenové buňky (<i>Embryonic stem cells</i>)
FGF	Fibroblastový růstový faktor (<i>Fibroblast growth factor</i>)
<i>Gli1</i>	<i>GLI-Kruppel family member GLI1</i>
HOX-A13	<i>Homeobox protein Hox-A13</i>
HSCs	Hematopoetické kmenové buňky
iPSCs	Indukované pluripotentní kmenové buňky
<i>Klf4</i>	<i>Kruppel-like factor 4</i>
KREMEN	<i>Kringle containing transmembrane protein</i>
LaCL	Labiální cervikální smyčka
LiCL	Linguální cervikální smyčka
LIF	Inhibiční faktor leukémie (<i>Leukemia inhibitory factor</i>)
<i>Lrp5/6</i>	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
<i>Lypd1</i>	<i>Ly6/Plaur domain containing 1</i> ; gen
LYPD1	<i>Ly6/Plaur domain containing 1</i> ; protein
mRNA	Mediátorová RNA

MSCs	Mezenchymální kmenové buňky (<i>Mesenchymal stem cells</i>)
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin kinase</i> ; protein
<i>Nanog</i>	<i>Nanog homeobox</i> ; gen
NANOG	<i>Nanog homeobox</i> ; protein
<i>Nell1</i>	<i>NEL-like 1</i> ; gen
NELL1	<i>NEL-like 1</i> ; protein
OCT	Optimální směs pro řeznou teplotu (<i>Optimal cutting temperature compound</i>)
<i>Oct4</i>	<i>POU domain, class 5, transcription factor 1 (Pou5f1)</i>
PFA	Paraformaldehyd
pre-mRNA	Primární transkript RNA
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribosomální RNA
SCs	Kmenové buňky
SHH	<i>Sonic hedgehog</i> ; protein
<i>Sox2</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i> ; gen
SOX2	Transkripční faktor z rodiny SOX; protein
SSEA1	<i>Fucosyltransferase 4 (FUT4)</i> ; protein
tRNA	Transferová RNA
<i>Wisp1</i>	WNT1 indukovatelný signalizační protein (<i>WNT1 inducible signaling pathway protein</i>); gen
WISP1	WNT1 indukovatelný signalizační protein (<i>WNT1 inducible signaling pathway protein</i>); protein
WNT	Skupina glykoproteinů; proteiny Wnt signalizační dráhy

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. Karel Smetana. „Kmenové buňky". *Kontakt* 2010, č. 12(3) (říjen 2010): 251–54.
2. Hana Barboříková. „Kmenové buňky a buněčná terapie". Masarykova Univerzita, 2009.
3. Zhang, Haojian, a Zack Z. Wang. „Mechanisms That Mediate Stem Cell Self-Renewal and Differentiation". *Journal of Cellular Biochemistry* 103, č. 3 (15. únor 2008): 709–18. <https://doi.org/10.1002/jcb.21460>.
4. Stanislav Filip, Jaroslav Mokřý, a Ivan Hruška. *Kmenové buňky: biologie, medicína, filozofie*. Makropulos. Praha: Galén, 2006.
5. Lucie Škodová. „Historie výzkumu kmenových buněk". Masarykova Univerzita, 2009.
6. Kolios, George, a Yuben Moodley. „Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine". *Respiration* 85, č. 1 (2013): 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>.
7. Kuo, C.K., a R.S. Tuan. „Tissue Engineering with Mesenchymal Stem Cells". *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 22, č. 5 (září 2003): 51–56. <https://doi.org/10.1109/MEMB.2003.1256272>.
8. Marcela Kadlecová. „Využití kmenových buněk". Karlova Univerzita, 2017.
9. Marie Doležalová. „Proteiny rodiny MYC v regulaci nádorových kmenových buněk se zaměřením na nádory dětského věku". Masarykova Univerzita, 2022.
10. Vavrušáková, Barbora. „Genetické a epigenetické abnormality u lidských pluripotentních kmenových buněk". Masarykova Univerzita, 2011.

11. Lagasse, Eric, Heather Connors, Muhsen Al-Dhalimy, Michael Reitsma, Monika Dohse, Linda Osborne, Xin Wang, Milton Finegold, Irving L. Weissman, a Markus Grompe. „Purified Hematopoietic Stem Cells Can Differentiate into Hepatocytes in Vivo". *Nature Medicine* 6, č. 11 (listopad 2000): 1229–34. <https://doi.org/10.1038/81326>.
12. Markéta Hanáčková. „Hematopoetické kmenové buňky". Masarykova Univerzita, 2008.
13. Mezey, Éva, Karen J. Chandross, Gyöngyi Harta, Richard A. Maki, a Scott R. McKercher. „Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow". *Science* 290, č. 5497 (prosinec 2000): 1779–82. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1779>.
14. Chhabra, Shaan N., a Brian W. Booth. „Asymmetric cell division of mammary stem cells". *Cell Division* 16 (29. září 2021): 5. <https://doi.org/10.1186/s13008-021-00073-w>.
15. Chambers, Ian, a Simon R. Tomlinson. „The transcriptional foundation of pluripotency". *Development (Cambridge, England)* 136, č. 14 (15. červenec 2009): 2311–22. <https://doi.org/10.1242/dev.024398>.
16. Rodda, David J., Joon-Lin Chew, Leng-Hiong Lim, Yui-Han Loh, Bei Wang, Huck-Hui Ng, a Paul Robson. „Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2 *". *Journal of Biological Chemistry* 280, č. 26 (1. červenec 2005): 24731–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502573200>.
17. Jernvall, Jukka, a Irma Thesleff. „Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals". *Development* 139, č. 19 (1. říjen 2012): 3487–97. <https://doi.org/10.1242/dev.085084>.
18. Jernvall, Jukka, a Irma Thesleff. „Reiterative Signaling and Patterning during Mammalian Tooth Morphogenesis". *Mechanisms of Development* 92, č. 1 (15. březen 2000): 19–29. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00322-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00322-6).

19. Renvoisé, Elodie, a Frederic Michon. „An Evo-Devo perspective on ever-growing teeth in mammals and dental stem cell maintenance". *Frontiers in Physiology* 5 (28. srpen 2014): 324.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00324>.

20. Irma Thesleff a Mark Tummers. „Tooth Organogenesis and Regeneration". In *StemBook*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute, 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27071/>.

21. Lavicky, Josef, Magdalena Kolouskova, David Prochazka, Vladislav Rakultsev, Marcos Gonzalez-Lopez, Klára Steklíková, Martin Bartos, et al. „The Development of Dentin Microstructure Is Controlled by the Type of Adjacent Epithelium". *Journal of Bone and Mineral Research* 37 (1. listopad 2021). <https://doi.org/10.1002/jbmr.4471>.

22. Wang, Xiu-Ping, Marika Suomalainen, Szabolcs Felszeghy, Laura C Zelarayan, Maria T Alonso, Maksim V Plikus, Richard L Maas, Cheng-Ming Chuong, Thomas Schimmang, a Irma Thesleff. „An Integrated Gene Regulatory Network Controls Stem Cell Proliferation in Teeth". *PLoS Biology* 5, č. 6 (červen 2007): e159.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050159>.

23. Kuang-Hsien Hu, Jimmy, Vagan Mushegyan, a Ophir D. Klein. „On the Cutting Edge of Organ Renewal: Identification, Regulation, and Evolution of Incisor Stem Cells". *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 52, č. 2 (únor 2014): 79–92. <https://doi.org/10.1002/dvg.22732>.

24. Biehs, Brian, Jimmy Kuang-Hsien Hu, Nicolas B. Strauli, Eugenio Sangiorgi, Heekyung Jung, Ralf-Peter Heber, Sunita Ho, et al. „BMI1 Represses Ink4a/Arf and Hox Genes to Regulate Stem Cells in the Rodent Incisor". *Nature Cell Biology* 15, č. 7 (červenec 2013): 846–52.
<https://doi.org/10.1038/ncb2766>.

25. Snustad, D. Peter, a Michael J. Simmons. *Genetika*. Editoval Jiřina Relichová. Přeložil Jiří Doškař, Jiří Fajkus, Petr Hořín, Aleš Knoll, Petr Kuglík, Jan Šmarda, a Jana Šmardová. Druhé, Aktualizované vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2017.

26. Han, X.L., M. Liu, A. Voisey, Y.S. Ren, P. Kurimoto, T. Gao, L. Tefera, P. Dechow, H.Z. Ke, a J.Q. Feng. „Post-Natal Effect of Overexpressed DKK1 on Mandibular Molar Formation". *Journal of Dental Research* 90, č. 11 (1. listopad 2011): 1312–17.
<https://doi.org/10.1177/0022034511421926>.
27. Li, Xuan, Xiao-Lin Liu, Xiao Li, Ya-Chao Zhao, Qian-Qian Wang, Hong-Yu Zhong, Dong-Dong Liu, Chong Yuan, Teng-Fei Zheng, a Mei Zhang. „Dickkopf1 (Dkk1) Alleviates Vascular Calcification by Regulating the Degradation of Phospholipase D1 (PLD1)". *Journal of Cardiovascular Translational Research* 15, č. 6 (prosinec 2022): 1327–39. <https://doi.org/10.1007/s12265-022-10251-y>.
28. Berschneider, Barbara, a Melanie Königshoff. „WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 1 (WISP1): A Novel Mediator Linking Development and Disease". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43, č. 3 (1. března 2011): 306–9.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.11.013>.
29. Wang, Yan, Shi-Hui Yang, Ping-Wen Hsu, Szu-Yu Chien, Chao-Qun Wang, Chen-Ming Su, Xiao-Fang Dong, Yong-Ming Zhao, a Chih-Hsin Tang. „Impact of WNT1-Inducible Signaling Pathway Protein-1 (WISP-1) Genetic Polymorphisms and Clinical Aspects of Breast Cancer". *Medicine* 98, č. 44 (listopad 2019): e17854.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017854>.
30. Maiese, Kenneth. „WISP1: Clinical Insights for a Proliferative and Restorative Member of the CCN Family". *Current neurovascular research* 11, č. 4 (2014): 378–89.
31. Valdenaire, O, E Rohrbacher, A Langeveld, A Schweizer, a C Meijers. „Organization and chromosomal localization of the human ECEL1 (XCE) gene encoding a zinc metallopeptidase involved in the nervous control of respiration." *Biochemical Journal* 346, č. Pt 3 (15. března 2000): 611–16.

32. Benoit, Alexandre, Miguel Angel Vargas, Luc DesGROSEILLERS, a Guy Boileau. „Endothelin-Converting Enzyme-like 1 (ECE1) Is Present Both in the Plasma Membrane and in the Endoplasmic Reticulum". *Biochemical Journal* 380, č. 3 (15. červen 2004): 881–88. <https://doi.org/10.1042/bj20040215>.
33. Lo, Amy A., Jennifer Johnston, Ji Li, Danielle Mandikian, Maria Hristopoulos, Robyn Clark, Dorothee Nickles, et al. „Anti-LYPD1/CD3 T-Cell-Dependent Bispecific Antibody for the Treatment of Ovarian Cancer". *Molecular Cancer Therapeutics* 20, č. 4 (duben 2021): 716–25. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0490>.
34. Parker, Clarissa C., Greta Sokoloff, Riyan Cheng, a Abraham A. Palmer. „Genome-Wide Association for Fear Conditioning in an Advanced Intercross Mouse Line". *Behavior Genetics* 42, č. 3 (květen 2012): 437–48. <https://doi.org/10.1007/s10519-011-9524-8>.
35. Wang, Jing, Junyi Liao, Fugui Zhang, Dongzhe Song, Minpeng Lu, Jianxiang Liu, Qiang Wei, et al. „NEL-Like Molecule-1 (Nell1) Is Regulated by Bone Morphogenetic Protein 9 (BMP9) and Potentiates BMP9-Induced Osteogenic Differentiation at the Expense of Adipogenesis in Mesenchymal Stem Cells". *Cellular Physiology and Biochemistry* 41, č. 2 (2017): 484–500. <https://doi.org/10.1159/000456885>.
36. Chen, Qiuman, Liwen Zheng, Yuxin Zhang, Xia Huang, Feilong Wang, Shuang Li, Zhuohui Yang, et al. „Special AT-rich sequence-binding protein 2 (Satb2) synergizes with Bmp9 and is essential for osteo/odontogenic differentiation of mouse incisor mesenchymal stem cells". *Cell Proliferation* 54, č. 4 (4. březen 2021): e13016. <https://doi.org/10.1111/cpr.13016>.
37. Wang, Chen, Na Zhao, Qin Zheng, Di Zhang, a Yang Liu. „BHLHE41 Promotes U87 and U251 Cell Proliferation via ERK/CyclinD1 Signaling Pathway". *Cancer Management and Research* 11 (2019): 7657–72. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S214697>.

38. Krivanek, Jan, Ruslan A. Soldatov, Maria Eleni Kastriti, Tatiana Chontorotzea, Anna Nele Herdina, Julian Petersen, Bara Szarowska, et al. „Dental cell type atlas reveals stem and differentiated cell types in mouse and human teeth". *Nature Communications* 11 (23. září 2020): 4816. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18512-7>.
39. Takahashi, Kazutoshi, a Shinya Yamanaka. „Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors". *Cell* 126, č. 4 (25. srpen 2006): 663–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
40. Dulak, Józef, Krzysztof Szade, Agata Szade, Witold Nowak, a Alicja Józkowicz. „Adult Stem Cells: Hopes and Hypes of Regenerative Medicine". *Acta Biochimica Polonica* 62, č. 3 (2015): 329–37. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1023.
41. Wang, Xusheng. „Stem cells in tissues, organoids, and cancers". *Cellular and Molecular Life Sciences* 76, č. 20 (2019): 4043–70. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03199-x>.
42. Goetz, Petr. *Vybrané kapitoly z lékařské biologie II*. Karolinum, 2002.
43. Salazar-Ciudad, Isaac, a Jukka Jernvall. „How Different Types of Pattern Formation Mechanisms Affect the Evolution of Form and Development". *Evolution & Development* 6, č. 1 (2004): 6–16. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142x.2004.04002.x>.
44. Adam Bogdanovič. „Dentální mezenchymální kmenové buňky v kontinuálně rostoucím myším řezáku". Masarykova Univerzita, 2022.
45. Ivan, Dylevský. *Obecná kineziologie*. Grada Publishing a.s., 2007.
46. Baetta, Roberta, a Cristina Banfi. „Dkk (Dickkopf) Proteins". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 39, č. 7 (červenec 2019): 1330–42. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312612>.

47. Wang, Liu, Xiangfen Li, Yao Song, Lan Zhang, Ling Ye, Xuedong Zhou, Dongzhe Song, a Dingming Huang. „NELL1 Augments Osteogenesis and Inhibits Inflammation of Human Periodontal Ligament Stem Cells Induced by BMP9". *Journal of Periodontology* 93, č. 7 (2022): 977–87. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0517>.
48. Qin, Qizhi, Mario Gomez-Salazar, Robert J. Tower, Leslie Chang, Carol D. Morris, Edward F. McCarthy, Kang Ting, Xinli Zhang, a Aaron W. James. „NELL1 Regulates the Matrisome to Promote Osteosarcoma Progression". *Cancer Research* 82, č. 15 (3. srpen 2022): 2734–47. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-0732>.
49. Rauschmeier, René, Charlotte Gustafsson, Annika Reinhardt, Noelia A-Gonzalez, Luigi Tortola, Dilay Cansever, Sethuraman Subramanian, et al. „Bhlhe40 and Bhlhe41 transcription factors regulate alveolar macrophage self-renewal and identity". *The EMBO Journal* 38, č. 19 (1. říjen 2019): e101233. <https://doi.org/10.15252/emj.2018101233>.
50. „Dkk1 dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI". Viděno 17. prosinec 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13380>.
51. „Ccn4 cellular communication network factor 4 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI". Viděno 17. prosinec 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22402>.
52. „Ecel1 endothelin converting enzyme-like 1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI". Viděno 17. prosinec 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13599>.
53. „Lypd1 Ly6/Plaur domain containing 1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI". Viděno 17. prosinec 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Mus+musculus+Lypd1>.
54. „Nell1 NEL-like 1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI". Viděno 17. únor 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338352>.
55. „Bhlhe41 basic helix-loop-helix family, member e41 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI". Viděno 17. prosinec 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79362>.

56. Wang, Fay, John Flanagan, Nan Su, Li-Chong Wang, Son Bui, Allissa Nielson, Xingyong Wu, Hong-Thuy Vo, Xiao-Jun Ma, a Yuling Luo. „RNAscope". *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD* 14, č. 1 (leden 2012): 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>.
57. Bio-Techne. „Learn How RNAscope Technology Works". Viděno 3. leden 2023. <https://www.bio-techne.com/>.