

치아 기관배양시 골형성단백의 역할에 관한 연구

정일혁^{1,2} · 정종훈³ · 정필훈¹

¹서울대학교치과대학 구강악안면외과학교실, 악안면기형 특수진료실,

BK21 악안면기형재건 조직공학팀, 지능형생체계면공학센터

²서울대학교 보라매병원 치과-구강악안면외과, ³전남대학교 농업생명과학대학 생물산업공학과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2004;30:438-443)

THE ROLE OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN IN THE TOOTH CULTURE

Il-Hyuk Chung^{1,2}, Jong-Hoon Chung³, Pill-Hoon Choung¹

¹ Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Craniofacial Tissue Engineering Laboratory of BK21 Human Life Science and the Intellectual Biointerface Engineering Center, College of Dentistry, Seoul National University

² Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Seoul National University Boramae Hospital

³ Dept. of Biosystems and Agricultural Engineering, Inst. of Ag. Sci. and Tech., Chonnam National University

Objectives : The proper development of the facial structures relies upon a sequence of tightly regulated signaling interactions between the ectoderm and mesoderm involving the participation of several families of signaling molecules. Among these, bone morphogenetic proteins (BMPs) have been suggested to be a key signal that regulates the development of the mandible and the initiation and morphogenesis of the teeth. The aim of this study was to examine the artificial development of the mandibular structures and to examine the role of BMPs on tooth morphogenesis and differentiation using an organ culture system.

Materials and Methods : The tooth germs from Ed 11.5, 13.5 mice were dissected, and transplanted into the diastema of the mandible primordia. The mandibles containing the transplanted tooth germs were cultured in vitro. During this period, beads soaked with BMP4 were implanted around the transplanted tooth germs. In addition, a diastema block containing the transplanted tooth germ was dissected, then transferred to an adult mouse kidney. After the organ culture, the developing mandibular explant was removed from the kidney and prepared for the tissue specimens. Odontogenesis of the transplanted tooth germs was examined after Hematoxylin-eosin, Masson-trichrome staining.

Results : Proliferation and differentiation of the tooth germs cultured in the diastema was observed. In the BMP4-treated tooth germs, the formation of the first and second molars was noted. The crown of the developing tooth showed the formation of a mature cusp with the deposition of enamel and dentin matrix.

In conclusion, it was confirmed that BMP4 is involved in the formation of a dental crown and the differentiation of ameloblasts and odontoblasts of the molar tooth during the development of the transplanted tooth germs.

Key words : BMP4, Organ culture, Tooth germ transplantation, Diastema, Mandible primordia

I. 서 론

정 필 훈

110-744, 서울 종로구 연건동 28

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Pill-Hoon Choung

Department of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University,

Yeon-gun dong 28, Jongno-Gu, Seoul, 110-744, Korea

Tel. 82-2-760-3477 Fax. 82-2-745-3477

E-mail : choungph@snu.ac.kr

최근 여러 연구에서 생체공학적 방법을 이용한 바이오 장기 제작법이 제시되고 있으며, 이러한 방법을 통한 치아 및 턱뼈 결손부의 수복은 그 유용성이 크지 않을 수 없다. 생물학적 또는 공학적 방법을 이용하여 질환의 진단 및 치료에 필요한 혁신적인 기법의 개발을 추구하는 생체공학적 방법의 원리에 기초하여 생체기관의 인위적인 배양 기법을 치아 발생에 적용하여 치아결손부

* This study was supported in part by a grant of the Korean Health 21 R & D project, Ministry of Health & Welfare : Musculoskeletal Bioorgans Center (0405-B001-0204-0006)

의 수복회복이 가능하리라 판단된다.

발생과정 중 상악골 및 하악골은 제1 세궁에서 유래하며, 이러한 구조물의 적절한 발육을 위해서는 외피 및 신경외배엽에서 유래한 신경능선 세포의 증식 및 제1 세궁으로의 이동이 필수적이다¹²⁾. 상악골 및 하악골 구조의 형성은 외배엽과 신경능선에서 유래한 중배엽 사이의 잘 조절된 신호의 상호작용에 의해 이루어진다³⁴⁾. 치아형성 부위에서는 이러한 상호작용의 결과로 구강 상피의 만곡과 형태 형성을 거쳐 치관을 만들게 된다. 또한 전사 조절인자와 성장인자가 이러한 상피와 간엽의 상호 작용에 관여하게 되며, 골형성단백질(bone morphogenetic proteins, BMPs), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factors, FGFs), hedgehog(HH) 군, Wnt 군의 성장인자가 주로 영향을 미치는 것으로 알려졌다³⁴⁾. 이러한 신호전달 체계는 치아의 형성과 안면골격의 발달을 조절하는 것으로 알려졌다⁵⁷⁾.

골형성단백은 치아 발생의 시작과 형태 형성에 중요한 영향을 미치며, 이 중 BMP2와 BMP4는 치아형성 과정 중 상피와 간엽의 상호 작용에 있어서 가장 중요한 것으로 알려졌다. 특히 발생 중인 상악골 및 하악골에서 BMP4 발현 부위와 시기는 초기 치아형성 과정 중의 중요한 역할을 시사 한다^{8,10)}. 설치류에 있어서, 치아형성 개시기에 *Bmp2*와 *Bmp4*는 치관(dental lamina)에 발현되는 반면 *Bmp4*는 단독으로 하방의 간엽층에 발현된다. 이후 치아형성이 진행되면서 *Bmp4*의 발현은 간엽으로 이동하게 되며, *Bmp2*, *Bmp7*은 치성상피에 계속 나타난다³⁴⁾. 이후 치아 형태를 결정하는 데 중요한 역할을 하는 법랑결절의 경우 *Bmp2*, *Bmp7*의 발현의 증가를 보인다. 이후 모상기(cap stage)에 도달하면 *Bmp4* 역시 법랑결절과 치성 간엽에 발현되고, 치유두 심부의 간엽세포는 *Bmp2*의 국소적 발현을 보인다. 종상기(bell stage)에 이르면, 법랑아세포 형성부위에 *Bmp4*, 조상아세포 형성부위에 *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*의 발현이 나타나게 된다^{5,8,10)}. 한편 *Bmp7* 유전자 결여 생쥐의 경우 치아형성에 있어서 결손이 초래되지 않는 것으로 보고되었고¹¹⁾, 분리된 치성간엽 조직에 BMP4 함유 bead의 첨가를 통하여 생체 내 간엽 및 재조합 치아조직과 유사한 유전자 발현이 나타남이 알려졌다^{12,13)}. 나아가 생쥐의 태중 11.5일경 치아발달의 잠재력은 상피에서 간엽으로 이동하게 되며, 이러한 이동은 *Bmp4*의 발현이 치배 상피에서 간엽으로 이동하는 시기와 일치 한다¹⁰⁾. 치아형성 초기 치성상피 층의 *Bmp4*의 발현은 뇌상기 *Msx1*, *Msx2*, *Egr1* 유전자의 간엽 발현에 필수적이다⁸⁾. 또한 BMP4는 *Msx1*이 결여된 생쥐에서 치아 형태 형성을 회복 시켰으며, 치아 형성이 뇌상기에서 모상기로 진행하는 역할을 하는 것으로 알려졌다^{5,10)}. 이러한 사실은 뇌상기 치유두에서의 BMP4 발현은 뇌상기 및 모상기의 형태 형성에 중요한 역할을 수행하는 것을 시사한다. 나아가 종상기 이후 과정에서 BMP4의 조상아세포 및 법랑아세포에서의 발현이 보고되었고¹⁰⁾, 이것은 BMP4가 이러한 세포의 분화와 상아질 및 법랑질 등의 치아의 경조직을 침착하는데 중요한 역할을 하는 것을 나타낸다.

본 연구에서는 생체공학적 방법을 이용하여 치아 형성 및 세포 분화 과정에서의 BMP4의 역할을 고찰하였다. 발생 중인 생쥐에서 구치 치배를 채취하여 하악 원기에서 치배가 형성되지 않는

치간극에 이식하였고, BMP4가 함유된 bead를 이식 치배 주위에 이식한 후 기관배양을 실시하였다. 기관배양 후 형성된 이식한 치배의 발육을 관찰하였다.

2. 실험재료 및 방법

1) 하악 원기 및 치배의 채취

본 연구는 CD-1 종의 생쥐 태아를 사용하였다. 임신이 확인된 날의 정오를 태중 0.5일(Embryonic day 0.5, Ed 0.5)로 정하여 태아의 연령을 결정하였다. 또한 태아 연령의 정확한 결정을 위하여 상악원기 및 하악원기의 상대적 크기, 사지 발달 정도 등의 형태학적 기준을 사용하였다. 태중 11.5일(Ed 11.5) 및 13.5일(Ed 13.5)의 생쥐 태아를 자궁에서 박리하여 Dulbeccos phosphate buffered saline (D-PBS, Gibco-BRL Laboratories, Detroit, MI, supplemented with 20 IU/ml penicillin-streptomycin)이 들어있는 Petri dish에 위치시킨 후 머리부분을 잘라내고 현미경하에서 발생 중인 제1 세궁에서 하악 원기를 박리 하였다. 이후 하악 원기 측면에 위치된 구치 치배를 분리해냈다.

2) 치간극에의 치배 이식 및 기관 배양

박리한 치배를 발생 중인 다른 하악 원기의 치간극에 이식 시켰으며(Fig. 1), BMP4 또는 BMP의 길항물질인 Noggin을 함유한 bead를 이식 치배 주위에 위치시켰다. BMP4 또는 Noggin을 함유한 bead는 Affigel-blue agarose beads를 37°C에서 30분간 50 µg/µl의 recombinant human BMP-4 (Genetics Institute, Cambridge, MA, USA)에 기관 배양하여 제작하였다. 이식 치배를 함유한 하악 원기를 Trowell 방법¹⁷⁾에 따라 배양기에서 37°C, 5% CO₂, 90% 습도의 조건에서 2일 간 배양하였다. 대조군으로 치간극에 치배 이식 후 bead 이식 없이 기관배양 한 군을 설정하였다.

3) 신장 내 이식 및 생체 배양

배양기에서 배양된 하악 원기에서 이식 치배를 함유한 치간극 부위를 현미경하에서 박리하였고, 수컷 생쥐의 신장막 하방에 이식하였다. 이후 2-3주간 생체 내 배양을 실시하였다.

4) 발육된 치배의 관찰

생체 배양이 끝난 후 생쥐를 희생시켜 발생 중인 치아를 채취하였다. 이후 4% paraformaldehyde에 고정된 후 탈수 과정을 거쳐 파라핀 포매를 실시하였으며, 5 µm 두께의 절편을 제작하여 Hematoxylin-eosin, Masson-trichrome으로 염색 후 현미경하에서 관찰하였다.

III. 연구결과

치간극에 이식 후 실험실 및 생체 배양을 실시 한 대조군 치배의 경우 치아 형성 및 발육을 관찰할 수 있었다. 발육 중인 치배는 종상기에 도달하였으며, 내치상피세포층의 증식 및 만곡으로 인한 치관의 형태 형성을 관찰할 수 있었다. 이러한 내치상피의

만곡은 치아기의 정상세망의 감소를 보였고, 정점에서는 법랑질 및 상아질 형성을 동반한 교두 형성을 관찰할 수 있었다. 또한 일부에서는 치경부에서 내, 외치상피의 증식을 통한 치근 형성의 시작을 관찰할 수 있었다. 또한 발육중인 치아 하방으로 치조골의 증식을 동반한 치아 지지조직의 형성을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

하악 치간극에 이식 후 배양 기간 중 골형성단백을 투여한 치배는 후기 종상기, 치관 형성기에 도달하였다. 발생 중인 치아는 교두 발달을 동반한 치관 형성을 보였으며, 치관부 전체에 걸친 상아질, 법랑질층 형성을 관찰 할 수 있었다. 이러한 교두 발달은 치간극 이식 후 골형성단백 투여 없이 실험실 배양을 실시한 군에 비하여 뚜렷하였다. 치간극에 치배 이식 후 BMP4 함유 bead를 이식한 치배는 치아형성 세포의 분화 및 석회화를 특징으로 후기 종상기까지의 발육을 보였다. 발생 11.5일에 채취한 이식한 치배는 상아질 및 법랑질 침착을 특징으로 하는 치관형성을 보였으며, 이식한 치배 대부분에서 제1 대구치 및 제2 대구치의 형

성이 관찰 되었다 (Fig. 3).

발생 13.5일 하악원기에서 채취, 이식 후 BMP4를 투여한 치배 역시 후기 종상기, 치관기까지의 발육을 보였고, 이식한 치배는 제1대구치 및 제2대구치 형성을 보였다. 총 56개의 BMP4 투여 Ed 13.5 치배 중 치간극 이식 및 기관배양을 통해 46개의 치배 (82%) 에서 제1 대구치와 함께 제2 대구치의 형성을 관찰 할 수 있었다. 형성된 제1대구치는 내치상피세포층의 발육에 따른 치관부 교두 발달을 보였다. 발육 중인 교두 부위는 뚜렷한 법랑아세포 및 조상아세포 분화를 보였고 이에 따른 법랑질 및 상아질 침착을 보였다. 총 56개의 BMP4 투여 치배 중 49개의 치배에서 (88%) 법랑질 및 상아질층 형성을 동반한 교두 발육을 보였다. 형성된 제2대구치는 제1대구치에 비하여 그 크기는 작지만 뚜렷한 교두 발육을 보였다. 발육 중인 치아의 치경부에서는 Hertwigs 상피 근초가 치아기를 따라 증식하는 양상을 보였고, 상아질 침착을 동반한 치근 형성이 관찰되었다 (Fig. 4).

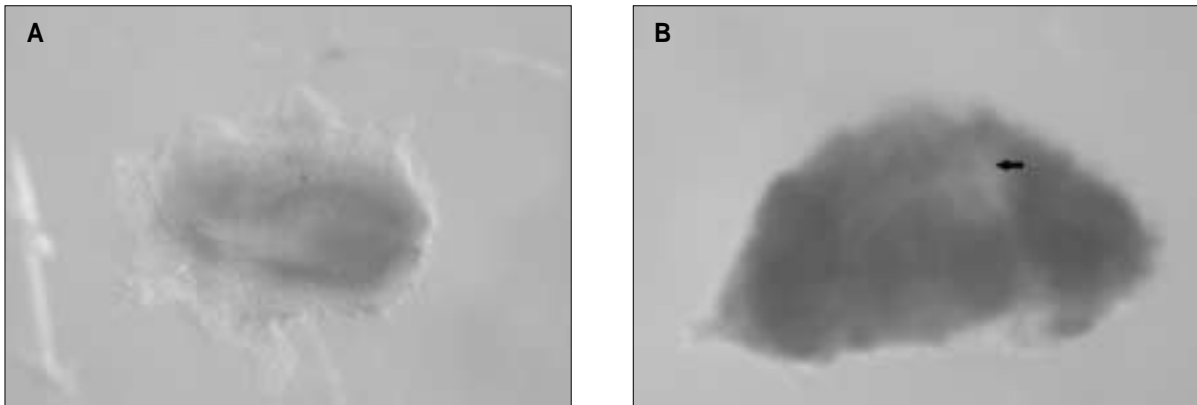


Fig. 1. (A) Ed 13.5 tooth germs, which was dissected from the mandibular prominence. (B) Embryonic mandible, which had the transplanted tooth germ in the diastema. An arrow indicates the transplanted tooth germ.

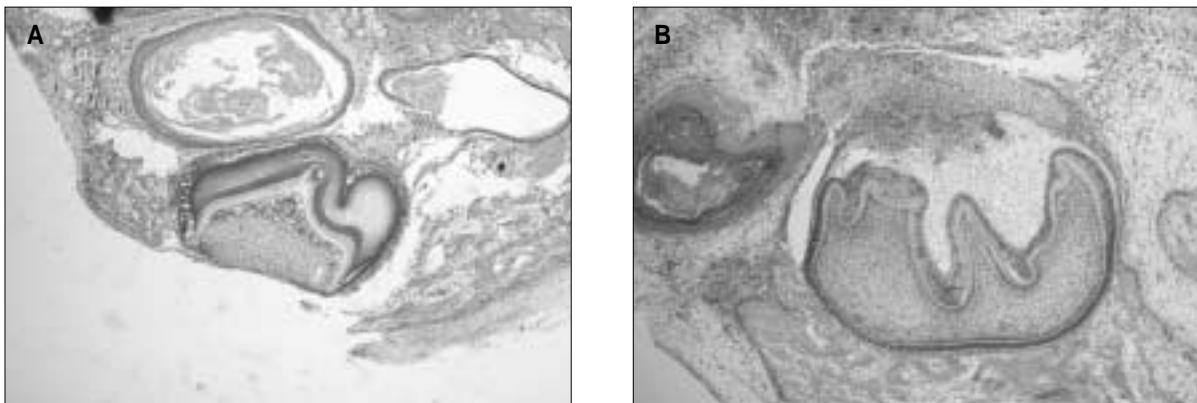


Fig. 2. Cultured diastema area, which had the transplanted tooth germ. The formation of the supporting structures and the development of the tooth was observed. (A): Ed11.5 tooth germ, Hematoxylin-eosin, ×40, B: E13.5 tooth germ, Hematoxylin-eosin stain, ×40).

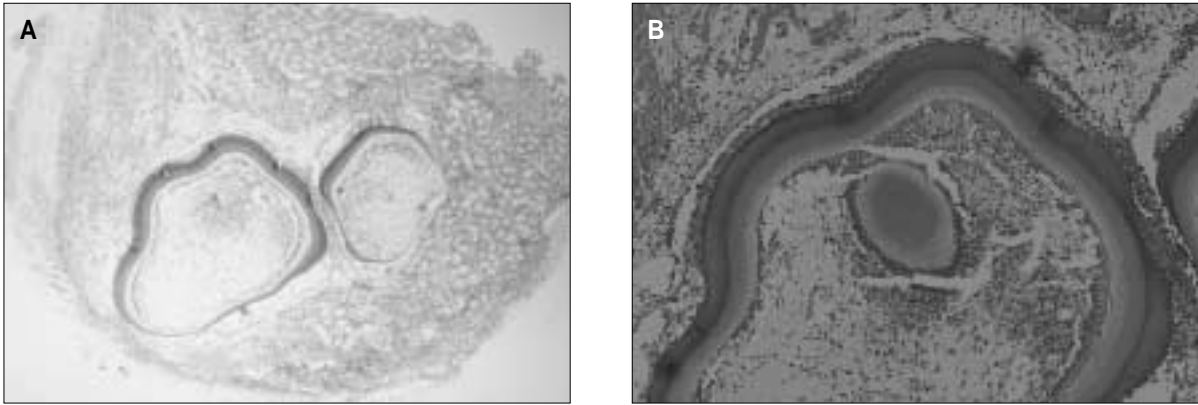


Fig. 3. The Ed 11.5 tooth germs cultured with the BMP4-soaked beads. The transplanted tooth germ showed development to the bell stage (A: Hematoxylin-eosin, $\times 40$, B: Masson-trichrome, $\times 100$).

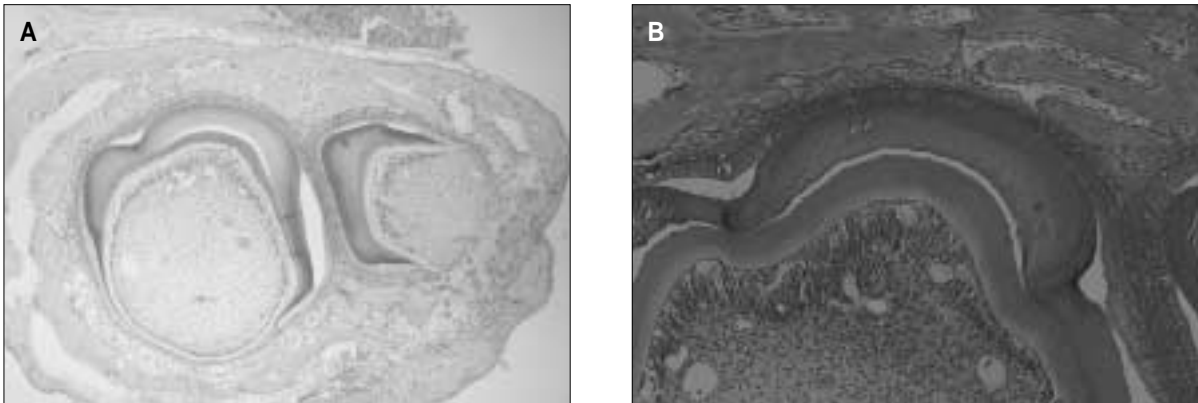


Fig. 4. The Ed 13.5 tooth germs cultured with BMP4-soaked beads. The first and second molars originated from the transplanted tooth germs And the developing tooth showed mature cusp development with the formation of the enamel and dentin matrix (A. Hematoxylin-eosin, $\times 40$, B. Masson-trichrome, $\times 100$).

IV. 고 찰

치아발육의 시작 및 형태 형성에서의 골형성단백의 역할에 대한 연구가 계속되어 왔으며, 신호전달 물질로 그 중요성이 제시되고 있다. 상악골 및 하악골 원기의 발육에 따른 골형성단백의 발현 부위 및 시기는 치아 발육에서 이의 역할을 시사한다고 할 수 있으며^{8,10}, 직접적으로 골형성단백 수용기인 ALK3 (BMPR 1A) 및 ALK6 (BMPR 1B) 가 치아발생 과정 중의 모상기에서 내치상피층 및 외치상피층에 발현되는 것으로 알려졌다^{18,19}.

본 연구에서는 치아 발육 중, 치관 형성에 미치는 골형성단백의 역할을 알아보고자 BMP4 함유 bead를 이식 치배 주위에 위치시켰다. BMP4를 투여 치배는 후기 중상기, 치관기까지의 발육을 보였고, 이식한 치배에서는 제1대구치 및 제 2대구치 형성이 관찰되었다. 발육된 치아는 내치상피세포층의 발육에 따른 뚜렷한 치관부 교두 발달을 보였다. 발육 중인 교두 부위는 법랑아세포 및 조상아세포 분화와 이에 따른 법랑질 및 상아질 침착을 보였다. 이러한 발육은 발생 13.5일 채취 이식한 치배에서 뚜렷하였

는데, 이 시기 즉, 뇌상기는 치관이 하방의 간엽으로 증식되어 들어가며, 이러한 상피증식의 바로 인접한 부위에서 간엽 세포의 밀도 증가를 특징적으로 나타낸다. 이러한 간엽세포의 군집부인 치유두는 향후 상아질과 치수를 형성하며, 간엽조직 상방에 위치한 상피 증식 부분은 최종적으로 법랑질을 형성하게 된다.

이 후 치아 발육은 뇌상기에서 모상기로 진행되며, 이러한 전환은 치아 형성에 가장 중요한 역할을 하며 치관 발육의 시작을 보인다. 이 과정은 발육 중인 치배의 치성상피 첨단 부위에서 일차 법랑결절의 형성에 의해 매개된다. 치성상피 첨단의 국소적 세포증식에 의해 법랑결절이 형성되며, 신호전달의 중심으로 작용한다^{20,23}. 이 부위는 특징적으로 *Bmp2*, *4*, *7* 등의 골형성단백과 *sonic hedgehog (Shh)*, *Fgf4*, *Fgf9*, *p21* 등의 신호전달 물질이 발현된다. *Bmp2*와 *Bmp7*는 발생 13일경 간엽으로 증식하는 상피에 발현되는 반면 *Bmp4*는 모상기 후반기에 법랑결절의 원심부에서 발현된다. 이러한 *Bmp4*의 발현 양상은 법랑결절의 세포사와 밀접한 관련을 가지며, 이러한 과정을 통하여 *Bmp4*가 치관 형성에 관여하는 것으로 알려졌다^{21,24}. 나아가 이차 법랑결절이 추가적

인 교두 발생부위에 형성되게 되는데, 이 부위는 일차 법랑결절과 동일한 유전자 발현 양상에 추가적인 *Fgf4*의 발현을 특징으로 한다. *Bmp2, 4*는 이차 법랑결절에 국한되어 발현되지 않으며, *Bmp4* 전사체는 일차 법랑결절의 소실과 함께 치성상피에서의 발현이 사라진다²⁴. 이러한 사실은 일차 법랑결절이 일정한 간격을 두고 이차 법랑결절이 형성되도록 하는 역할을 하는 것을 시사한다. 추가적인 법랑결절 형성에 역할을 하는 측방억제(lateral inhibition)기전을 통하여 이차 법랑결절이 형성되며, 이 과정에서 골형성단백은 치관형성 중 교두발달에 중요한 역할을 한다^{25,26}.

발육 중인 치아의 교두 형성은 특정 위치에서의 국소적인 내치상피 세포의 증식에 의해 이루어지며, 이에 뒤이어 상피와 간엽의 경계부에서 상아질을 형성하는 조상아세포 및 법랑질을 형성하는 법랑아세포의 분화를 통하여 이루어진다. 치관완성기, 즉 세포 분화기 중 골형성단백 수용기인 *ALK3*는 상피와 간엽층 모두에 발현되며 이는 내치상피 세포층 및 외치상피 세포층, 성상세망 및 치유두에 발현된다¹⁹. 한편 *Bmp4*는 이시기에 내, 외치상피세포층에 인접한 간엽세포층에 발현된다²⁷. *Bmp2*와 *Bmp7*은 초기 종상기에 내치상피세포에 발현되며, 이러한 발현부위는 하방의 간엽세포들이 조상아세포로 분화하도록 하는 상피유래 신호전달물질로 작용하는 것과 일치한다¹⁰. 또한 *Bmp4* 발생 16일경 전조상아세포층을 포함한 치유두의 교두 형성 부위에 강하게 발현되며, 이 보다 하루 늦게 *Bmp2*와 *Bmp7* 유전자 전사체가 전조상아세포층에 발현하는 특징을 보인다^{10,28,29}. 이러한 골형성단백의 발현 양상은 조상아세포 분화가 완료될수록 약해지는 특징을 보인다. 한편 *Bmp2, 4, 7* 등이 법랑아세포의 말기 분화과정에 발현되는 것으로 알려졌고, 이 중 *Bmp4*가 가장 강하게 발현된다^{27,28}. *Bmp4*의 발현은 정도는 상아질 형성이 진행될수록 조상아세포에서 감소하나, 법랑아세포에서는 지속되는 특징을 보인다²⁸. 따라서 *BMP4* 발현은 조상아세포와 법랑아세포 분화를 유도하는 간엽성 신호전달물질로 작용하며, 이의 발현 시점과 부위는 치아를 구성하는 세포의 분화에 중요한 역할을 한다. *BMP4* 함유 bead를 이식한 치배에서 법랑질 및 상아질 층의 뚜렷한 형성과 이로 인한 조상아세포층과 법랑아세포층의 분리를 관찰할 수 있었다.

생쥐 발생 14일경부터 제2대구치의 발육이 제1대구치 후방에서 나타나게 되며²⁹, 상, 하 제2대구치 치아기의 전방경계는 발생 16일경부터 뚜렷한 구분이 가능하다³⁰. 또한 발생 17일 경부터, 제 2 대구치의 치성상피는 제1대구치 치성상피와 분리되어 발생 중인 턱뼈의 후미 방향으로 성장 및 전-후방 크기 증가를 보인다³¹. 본 연구에서 *BMP4* 투여군의 경우 치관부 형성을 동반한 제2대구치의 발육을 관찰할 수 있었고, 이는 생 후 상아질 및 법랑질 침착 시기에 해당하는 양상을 보였다. 이러한 발육 양상은 *BMP4*가 제2대구치 발육 및 생성에 중요한 역할을 함을 보여 준다.

본 연구에서는 생체공학적 기관배양법을 이용하여 치아 형성 및 세포 분화 과정에서의 골형성단백의 역할을 고찰하였다. 생체 기관 내 여러 종류 세포사이의 구조적 관계 및 상호작용을 유지하고 또한 외부 자극에 의한 발달의 방향을 연구하기 위해 기관배양법이 고안되었다. 이러한 관계는 조직 전체를 적출하거나

또는 구성조직을 분리하여 재조하는 방식을 통하여 유지될 수 있다. 이러한 조직체는 생체내 이식을 통하여 발달을 관찰할 수 있고, 또한 실험실에서 배양되어 질수 있다³². 본 연구에서는 Trowell 방법¹⁷을 이용하여 일차적인 배양을 실시하였다. 이 방법은 배양하고자 하는 기관을 배양액과 기체의 계면에 위치하여 영양분에 대한 접근이 용이한 동시에 기체 교환이 가능하며, 기관의 구조적 특성을 유지하도록 하는 특징을 지닌다. 이러한 배양법은 치아 배양 및 장기 배양에 가능성을 제시하며 향후 연구의 필요성을 제시한다. 즉, 일반적인 세포배양과는 다른 3차원적 배양법을 통한 치아 배양이 필요하고, 이식된 치배 및 하악원기의 생리적 환경내에서의 성장과 분화를 위하여 신장에서의 배양을 실시하였다. 이는 시험관내의 배양 속도나 환경이 생체내에서의 배양속도나 환경에 미치지 못한 것에 의한 것으로 생리적 환경을 제공할 수 있는 배양법에 대한 연구가 필요하다.

V. 결 론

1. 하악 치간극에 이식 후 기관 배양법을 이용해 배양된 치배에서 치아 형성 및 성장이 관찰되었다.
2. 하악 치간극에 이식 후 *BMP4*를 투여한 치배에서는 제1, 2 대구치의 형성을 관찰할 수 있었다. 형성된 치아의 치관부는 법랑질 및 상아질 형성을 동반한 교두 발달을 관찰할 수 있었다.
3. 치아 발달에 있어서 *BMP4*는 교두의 발달과 법랑질 형성에 중요한 역할을 하며 치아 초기 형성에 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

본 연구의 결과는 생체기관 배양법을 이용한 하악원기의 배양을 통하여 하악골 발육 및 치아형성을 이룰 수 있음을 보여주며, 또한 골형성단백이 치아의 치관 형성과 법랑아 세포 및 조상아세포의 분화에 관여함을 보여준다. 이러한 생체 배양 방법을 통한 치아 발육과 그 주변 지지조직의 형성은 향후 치열 및 턱뼈 결손 부위의 재건에 이용될 수 있으리라 판단된다.

참고문헌

1. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Han J, Rowitch DH, Soriano P, MaMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 2000;127:1671-1679.
2. Stottman RW, Anderson RM, Klingensmith J. The BMP antagonists chordin and noggin have essential but redundant roles in mouse mandibular outgrowth. *Dev Biol* 2001;240:457-473.
3. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Science* 2003;116:1647-1648.
4. Peters H, Balling R. Teeth where and how to make them. *Trends Genet* 1999;15:59-65.
5. Thesleff I. Genetic basis of tooth development and dental defects. *Acta Odontol Scand* 2000;58:191-194.
6. Thesleff I, Nieminen P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:844-850.
7. Corbourn MT, Sharpe PT. Tooth and jaw: molecular mechanism of patterning in the first branchial arch. *Arch Oral Biol* 2003;48:1-14.
8. Vainio S, Karavanova J, Jowetta A, Thesleff I. Identification of *BMP-4* as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell*

- 1993;75:45-58.
9. Francis-West PH, Tatla T, Brickell PM. Expression patterns of the bone morphogenetic protein genes *Bmp-4* and *Bmp-2* in the developing chick face suggest a role in outgrowth of the primordia. *Dev Dyn* 1994;201:168-178.
 10. Åberg T, Wozney J, Thesleff I. Expression patterns of bone proteins (BMPs) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn* 1997;210:383-396.
 11. Helder MN, Karg H, Berovoets TJ, Vukicevic S, Burger EH, D' Souza RN, Woltgens JH, Karsenty G, Bronckers AL. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1, OP-1) and tooth development. *J Dent Res* 1998;77:5455-54.
 12. Karavana I, Vainio S, Thesleff I. Transient and recurrent expression of the *Egr-1* gene in epithelial and mesenchymal cells during tooth morphogenesis suggests involvement in tissue interactions and in determination of cell fate. *Mech Dev* 1992;39:41-50.
 13. Jowett AK, Vainio S, Ferguson MW, Sharpe PT, Thesleff I. Epithelial-mesenchymal interactions are required for *msx-1* and *msx-2* gene expression in the developing murine molar tooth. *Development* 1993;117:461-470.
 14. Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 1987;32:1231-27.
 15. Bei M, Maas RL. FGFs and BMP4 induce both *Msx1*-independent and *Msx1*-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* 1998; 125:4325-4333.
 16. Bei M, Kratochwil, K, Maas RL. BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of *Msx1* in tooth development. *Development* 2000; 127:4711-471.
 18. Trowell OA. The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp Cell Res* 1959;16:118-147.
 19. Ikeda T, Takahashi H, Suzuki A, Ueno N, Yokose S, Yamaguchi A, Yoshike S. Cloning of rat type I receptor c DNA for bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 and the localization compared with that of ligands. *Dev Dyn* 1996;206:318-329.
 20. Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* 1998;282:1136-1138.
 21. Tabata MJ, Fujii T, Liu JG, Ohmori T, Abe M, Wakisaka S, Iwamoto M, Kurisu K. Bone morphogenetic protein 4 is involved in cusp formation in molar tooth germ of mice. *Eur J Oral Sci* 2002;110:114-120.
 22. Jernvall J, Åberg T, Kearney S, Thesleff I. The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induced p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 1998;125:161-169.
 23. Vaahtokari A, Åberg T, Jernvall J, Keranen S, Thesleff I. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech Dev* 1996;54:39-43.
 24. Vaahtokari A, Åberg T, Thesleff I. Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development* 1996;122:121-129.
 25. Jernvall J, Keranen SV, Thesleff I. Evolutionary modification of development in mammalian teeth: quantifying gene expression patterns and topography. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:14444-14448.
 26. Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signalling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 2000;92:19-29.
 27. Takahashi H, Ikeda T. Transcripts for two members of the transforming growth factor-beta superfamily *Bmp-3* and *Bmp-7* are expressed in developing rat embryos. *Dev Dyn* 1996;207:439-449.
 28. Jernvall J, Kettunen P, Karavanova K, Martin LB, Thesleff I. 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* 1994;38:463-469.
 29. Begue-Kirn C, Smith AJ, Loriot M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF betas, BMPs, IGF1, *msxa*, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1994;38:405-420.
 30. Obara N. Expression of the neural cell adhesion molecule during mouse tooth development. *Connect Tissue Res* 2002;43:212-215.
 31. Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, Cam Y, Peterkova R, Lesot H. Position and growth of upper and lower tooth primordia in prenatal mouse-3D study. *J Craniofac Genet Dev Biol* 2000;20:35-43.
 32. Freshney RI. Culture of animal cells, a manual of basic technique (ed 4), Danveers, MA, Willey-Liss, 2000, pp 396-399.