

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra zoologie

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Signální dráhy účastníci se ekto-mezenchymálních  
interakcí při proliferaci během odontogeneze.**

**Olomouc 2012**

**Petr Sládek**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Práci jsem vypracoval samostatně, všechny zdroje, které jsem při vypracování použil a čerpal z nich, jsou v práci řádně citovány s uvedením úplného odkazu na daný zdroj.

V Olomouci 31. 7. 2012.

Podpis:

Poděkování patří vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Vlastě Lungové. Bez jejího času, ochoty, trpělivosti, cenných rad a inspirace při vznikajícím textu této práce by bylo velmi obtížné práci dokončit. Také bych rád poděkoval Laboratoři embryologie živočichů Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR v. v. i. v Brně za grantovou podporu této práce GA ČR P302/12/J059.

## **Abstrakt:**

Zuby jsou orgány epitelo-mezenchymální stavby mající hned několik funkcí. Ve vývoji zubů neboli odontogenezi, se uplatňuje několik buněčných procesů – migrace, proliferace, diferenciacce a programovaná buněčná smrt.

Odontogeneze má geneticky kontrolovaný průběh. Tyto geny regulují průběh vývoje zubu prostřednictvím různých transkripčních faktorů nebo sekretovaných proteinů. Protože při odontogenezi dochází k interakci mezi epitelem a pod ním ležícím mezenchymem, signální molekuly působí parakrinně. Těchto molekul je v dnešní době známo více jak 350. Většina ze signálních molekul patří k rodině transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF $\beta$ ), fibroblasty růstový faktor (FGF), Hedgehog, Wnt a Notch. Nedávno identifikovanou signální molekulou byl ektodysplazin, člen rodiny tumor nekrotizující faktor (TNF).

V této práci byly zpracovány informace týkající se proliferace. Proliferační oblasti nalézáme jak v epitelu, tak i v okolním mezenchymu. V prenatalním období souvisí proliferací zóny s prorůstáním epitelu do mezenchymu a to ve stádiu iniciace, dentální plakody, pupene, pohárku a zvonku. Okolní mezenchymové buňky kolem zubního základu nejprve kondenzují, pak se teprve začínají intenzivně dělit za vzniku buněk dentální papily a okolního dentálního vaku. Intenzivní dělení epitelových i mezenchymových buněk je během prenatalního vývoje kontrolováno signálními centry – dentální plakody, primárním a sekundárním sklovinným uzlem.

V postnatalním období, kdy je už kompletní formace korunky, vznikají 2 struktury podílející se na proliferacích procesech – terciární sklovinný uzel na korunce a Hertwigova epitelální kořenová pochva, která kontroluje vývoj kořene zubu.

**Klíčová slova:** Odontogeneze, Epitelo–mezenchymové interakce, Proliferace, Msx, Pax, FGF, Hedgehog, BMP, Wnt, Eda.

## **Abstract:**

Teeth are epithelio-mesenchymal organs with many functions. Several cellular processes are applied during tooth development (odontogenesis) – migration, proliferation, differentiation and programmed cell-death.

Odontogenesis is a genetically controlled process. These genes regulate the progress of the tooth development by different transcription factors or secreted proteins. There is an interaction between epithelial and underlying mesenchymal tissues during the odontogenesis. It means, that signal molecules act paracrine and are mediated by more than 350 signalling molecules. Most of them belong to transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), fibroblast growth factor (FGF), Hedgehog, Wnt and Notch families. Recently identified signal molecule was Ectodysplasin, member of tumor necrosis factor family (TNF).

This study is compiled of proliferation-related information. Proliferation zones are located in the epithelium and in the surrounding mesenchyme. Proliferation in prenatal period is associated with invagination of epithelium into the mesenchyme, which includes initiation, dental placode, bud stage, cup stage and bell stage. First, the mesenchyme cells around the epithelium condense, and then they start to proliferate. These cells are forming mesenchymal papilla and dental follicle. During prenatal development is controlled by dental placode, primary and secondary enamel knots.

In the postnatal period, when the formation of crown is complete, are 2 structures involved in the proliferation processes - tertiary enamel knot in the crown and Hertwig's epithelial root sheath, which controls development of root of tooth.

**Keywords:** Odontogenesis, Epithelial–mesenchymal interaction, Proliferation, Msx, Pax, FGF, Hedgehog, BMP, Wnt, Eda.

# Obsah

<b>Použité zkratky</b>	7
<b>1. Úvod</b>	9
<b>2. Hlavní morfogenetické procesy</b>	11
2.1 Buněčná migrace, asociace, smrt, diferenciace	11
2.2 Proliferace	12
<b>3. Proliferace v odontogenezi</b>	14
3.1 Řízení proliferačních procesů během prenatalního období	15
3.1.1 Orální ektoderm	16
3.1.2 Odontogenní mezenchym	16
3.1.3 Dentální plakoda	17
3.1.4 Kondenzovaný dentální mezenchym	17
3.1.5 Primární sklovinný uzel	18
3.1.6 Mezenchym dentální papily	19
3.1.7 Sekundární sklovinný uzel	19
3.2 Proliferace v odontogenezi v postnatalním období	20
<b>4. Geny účastníci se proliferačních procesů v rámci odontogeneze</b>	21
4.1 <i>Pax9</i>	22
4.2 <i>Msx</i>	22
4.3 <i>Dlx</i>	23
4.4 <i>Lhx</i>	24
4.5 <i>Barx</i>	24
4.6 <i>Runx2</i>	24
4.7 <i>Axin2</i>	25
<b>5. Signální dráhy a molekuly</b>	26
5.1 FGF signální dráha	27
5.2 TGF signální dráha	28
5.3 SHH signální dráha	30
5.4 Wnt signální dráha	31
5.5 Notch signální dráha	32
5.6 TNF signální dráha	33
<b>6. Závěr</b>	35
<b>7. Literatura</b>	36

## POUŽITÉ ZKRATKY

Dd.	zuby (Dentes)
HTT	tvrdé zubní tkáň (Hard tooth tissue)
CNC	neurální lišta (Cranial Neural Crest)
M1	první molár (The first molar)
M3	třetí molár (The third molar)
PEK	primární sklovinný uzel (Primary enamel knot)
SEK	sekundární sklovinný uzel (Secondary enamel knot)
TEK	terciární sklovinný uzel (Tertiary enamel knot)
CL	cervikální smyčka (Cervical loop)
HERS	Hertwigova epiteliální kořenová pochva (Hertwig's epithelial root sheath)
PCD	programovaná buněčná smrt (Programmed cell-death)
HSC	hematopoetické kmenové buňky (Hematopoietic stem cell)
PCNA	proliferální jaderný antigenu (Proliferating cell nuclear antigen)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
RNA	ribonukleová kyselina (Ribonucleic acid)
CAM	celulární adhesivní molekuly (Cell Adhesion Molecules)
M	mitóza (mitosis)
G <sub>0</sub>	klidová fáze (resting phase)
G <sub>1</sub>	první růstová fáze, postmitotická (Gap 1 phase)
S	syntetická fáze (synthesis phase)
G <sub>2</sub>	druhá růstová fáze, premitotická
OEE	vnější sklovinný epitel (Outer enamel epithelium)
IEE	vnitřní sklovinný epitel (Inner enamel epithelium)
SI	stratum intermedium
SR	stratum reticulare
E	embryonální den (embryonic day)
P	postnatální den (postnatal day)
Pax	Paired box domain
Msx	msh-like homeobox gene
msh	muscle segment homeobox gene
Dlx	distal-less homeobox gene
Lhx	LIM homeobox gene
Runx2	runt related transcription factor 2

eda	ectodysplasin A
edar	EDA receptor
BMP	kostní morfogenetický protein (Bone morphogenetic protein)
FGF	fibroblasty růstový faktor (Fibroblast growth factor)
SHH	sonic hedgehog
DHH	desert hedgehog
IHH	indian hedgehog
Smo	Smoothened
Ptc	Patched
TNF	tumor necrosis factor
Wnt	wing-less-type MMTV integration site family
ROR	Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor
RANK	receptor activator of NFκB
RANKL	RANK ligand
OPG	osteoprotegerin
Gsc	Goosecoid gene
AD	autozomálně dominantní
AR	autozomálně recesivní
TNS	Witkopův syndrom (Tooth and nail syndrome)
WHS	Wolf-Hirschhornův syndrom
Cdk4	cyklin dependentní kináza 4 (Cyclin-dependent kinase 4)
Wg	Wingless
Int-1	integration-1
LRP	Lipoprotein receptor-related protein
APC	Adenomatous polyposis coli
GSK-3β	Glykogen syntáza kináza 3β
CK1	Casein Kinase 1
Fz	Frizzled
Dsh	Dishvelled
TCF/LEF1	T Cell-specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor 1



## 1. Úvod

Zuby (lat. dentes, Dd.) jsou životně důležitým orgánem živočišného organismu, mají složitou stavbu i vývoj. V živočišné říši se tyto struktury poprvé vyskytují až u čelistnatých obratlovců (Gnatostomata) (Malinský et al. 2005, Gaisler et Zima 2007). Kromě mastikačního významu, který je zdaleka nejdůležitější v celé živočišné říši, plní v lidském světě také funkci estetickou a artikulační (Stejskalová et al. 2008).

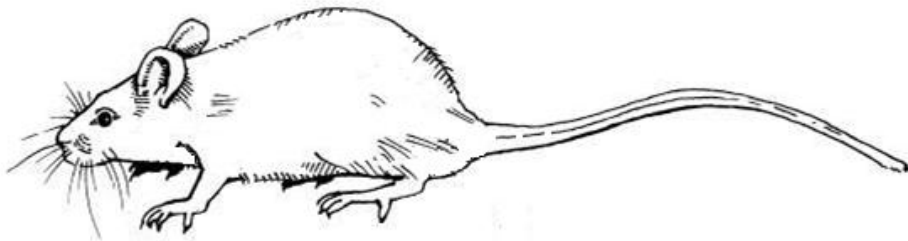
Vývoj zubů neboli odontogeneze je zahájena ve velmi časných stádiích embryonálního vývoje. Uplatňuje se při něm velké množství interakcí mezi základními buněčnými typy a dochází k aktivaci řady signálních drah. Pouze při správném fungování nastává plnohodnotný vývoj zubu bez vývojových abnormalit. Proto poznatky získané studiem embryonálního vývoje zubů a jejich integrace s okolními tkáněmi na buněčné a molekulární úrovni nám otvírají nové možnosti a cesty jak k náhradě ztracených tvrdých zubních tkání (HTT), tak i v diagnostice a léčbě určitých vývojových abnormalit, kdy můžou chybět pouze některé (hypodoncie, oligodoncie) nebo všechny zuby (anodoncie) (Krejčí et al 2007, Matalová et al. 2008).

Výzkum molekulární a buněčné podstaty odontogeneze se provádí na myši dentici, modelovým zubem je zpravidla první myší molár M1, a to buď mandibulární (Viriot et al. 1997) nebo maxilární (Peterková et al. 1996). Také již byly publikovány souhrnné studie zabývající se proliferací i apoptózou v prenatalním vývoji myších mandibulárních molárů (Lesot et al. 1996). V postnatálním vývoji byly již také publikovány studie na proliferativní pochody u M1 (Lungová et al. 2011) nebo u M3 (Chlastáková et al. 2011). Ne vždy jsou ale používány myší moláry, proto na výše zmíněné projekty navazuje srovnávací studie časoprostorového rozložení proliferace i apoptózy hrabošů polních (Šetková et al. 2006).

I přes tyto publikace stále ještě není k dispozici studie zahrnující stručné a přehledné shrnutí proliferačních změn jak v prenatalním, tak i v postnatálním vývoji zubu. Proto bylo cílem této bakalářské práce prozkoumání a souhrn nynějších poznatků o proliferačních procesech ve vývoji zubních zárodků myších molárů M1. Práce se zaměřila především na signální dráhy (TGF, FGF, SHH, Wnt, TNF nebo Notch) a molekuly řídící proliferační aktivity v jednotlivých stádiích vývoje. Zahrnuje tedy stadia iniciace, kdy dochází ke ztluštění epitelu a jeho prorůstání do okolního mezenchymu, přes stadia zubního pupene a pohárku, kdy pokračuje proliferace epitelu doprovázeného

vznikem signálního centra – tzv. primárního sklovinného uzlu (PEK). Další strukturou je zubní zvonek, kdy proliferují laterální epitelové buňky a vznikají sekundární sklovinné uzly (SEK). V postnatálním období práce zdůrazňuje pokračující proliferaci cervikální smyčky (CL), která jako Hertwigova epiteliální kořenová pochva (HERS) formuje tvar a vývoj kořene. Proliferací dentální papily vzniká zubní pulpa, naopak z dentálního vaku se diferencuje závěsný aparát zubu.

Z praktického hlediska má použití myši, jako modelového organismu, nespornou výhodu v tom, že její chov je snadný a je dostupná široká škála různých transgenních nebo knock-outových linií (Macholán 1997, Jebavý et al. 2011, URL1). Výsledky jsou dobře použitelné, jelikož raný vývoj zubů člověka a myši, je alespoň na histologické úrovni prakticky stejný (Krejčí et al. 2007).



**Obr. 1: Laboratorní myš.** Modelový organismus – schématické znázornění. Převzato a upraveno Jebavý et al. 2011.

## **2. Hlavní morfogenetické procesy**

Vývoj celého jedince (ontogeneze) je složitý a souvislý proces, který začíná oplozením vajíčka spermií, vrcholí dosažením zralosti a končí smrtí. V rámci tohoto vývoje se buňky množí, pohybují, vzájemně se dotýkají a navazují mezibuněčné kontakty i umírají. Tyto elementární děje označujeme jako základní morfogenetické procesy. Základních morfogenetických procesů je tedy několik: proliferace, migrace, asociace, diferenciaci a buněčná smrt.

### **2.1 Buněčná migrace, asociace, smrt, diferenciaci**

Buněčná migrace vede k přemístování jednotlivých buněk či skupin buněk. Může být buď zcela pasivní, nebo aktivní. V případě pasivní migrace jsou dříve vzniklé buňky vytlačovány do periferie nově tvořenými buňkami (typicky v okolí proliferačních center). V případě aktivní migrace dochází k zapojení vlastního lokomočního aparátu buňky. Buňky jsou při změně pozice vystaveny různým podmínkám okolního prostředí, kde reagují na signály a určují, jak se buňky budou dále diferencovat. Typickými migrujícími buňkami uplatňující se v odontogenezi jsou buňky neurální lišty (CNC) (Jelínek et al. URL1).

Buněčná asociace spojuje jednotlivé buňky ve vyšší funkční celky a umožňuje jim vzájemné ovlivňování. Spojování buněk se uskutečňuje pomocí celulárních adhezivních molekul (CAM), exprimovaných na cytoplazmatické membráně a posléze i morfologicky prokazatelnou formou bodových a plošných buněčných spojení, jak je známe z cytologie (Jelínek et al. URL1)

Programovaná buněčná smrt (PCD), označovaná též jako apoptóza, je výraz vyhrazený pro fyziologickou smrt buňky s typickou morfologií. Smyslem apoptózy je odstranění vadných (mutace), či nadbytečných buněčných elementů pro udržení homeostázy jak v prenatalním, tak i v postnatalním vývoji. Při apoptóze typicky probíhá kondenzace a fragmentace buněčného jádra, ztráta objemu buňky a svažování buněčné membrány zakončené tvorbou apoptotických tělísek. Tyto tělíska jsou pak fagocytována, popřípadě odstraněna sousedními buňkami (Wyllie et al. 1980, Cohen et Duke 1984, Ren et Savill 1998). V odontogenezi se uplatňuje při eliminaci sklovinných uzlů.

Diferenciací rozumíme proces, kdy z pluripotentních buněk (např. kmenových) vznikají buňky specializované k určité funkci. Na vývojové specializaci každé buňky se podílí velké množství genů (Jelínek et al. URL1). Diferenciace není následkem ztráty či přírůstku chromosomového materiálu a jen zřídka je spojena s nezvratnou změnou genomové DNA. Během odontogeneze podstupují diferenciaci nejprve odontoblasty zubní pulpy (ve stádiu zubního zvonku E18,5), které jsou následované diferenciací ameloblastů (perinatálně v období P0). Cementoblasty a fibroblasty periodontia se diferencují postnatálně před erupcí zubu (Lungová et al. 2011).

## **2.2 Proliferace**

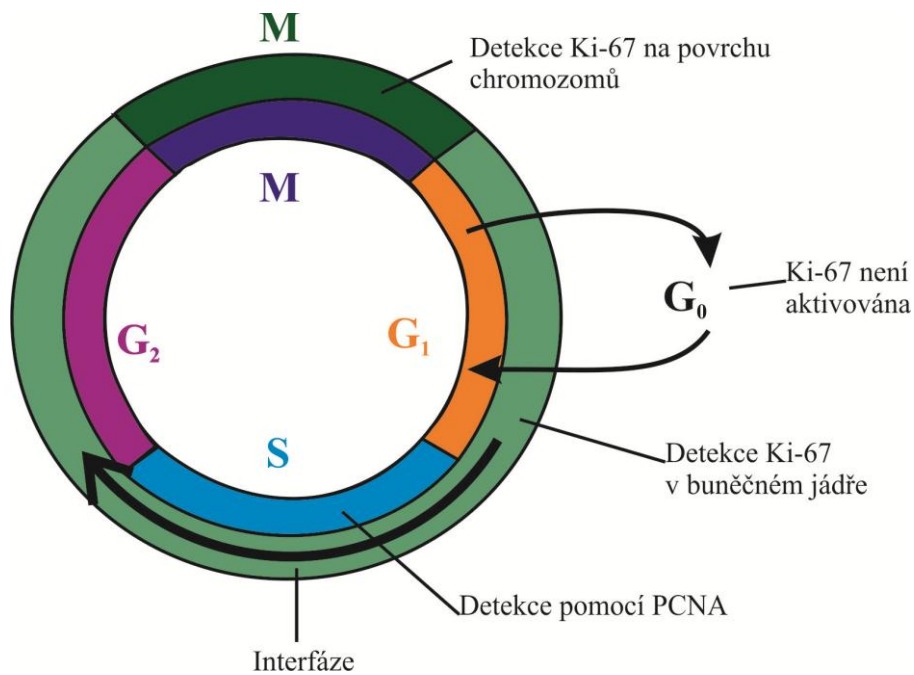
Proliferací rozumíme proces intenzivního množení buněk. Výsledkem dělení jsou zvětšující se populace buněk, které se dále diferencují do jednotlivých buněčných linií (Jelínek et al. URL1).

Proliferace se uplatňuje převážně v embryonálním období, kdy se zakládá většina orgánů. Místa intenzivního rozmnožování buněk jsou zpravidla soustředěna do tzv. proliferačních center. Proliferací pak tyto orgány rostou a zvětšují se.

V postnatálním období jednotlivé orgány dokončují svůj vývoj. Většina buněk následně ztrácí schopnost proliferace, a proto se v dospělosti proliferace omezuje výhradně na procesy obnovy mechanicky namáhaných či poškozených tkání (buňky epidermis, střevní sliznice, výstelka dýchacího traktu) a udržování tělních pochodů (vznik krevních elementů z hematopoetické kmenové buňky, HSC).

Pro detekci míst aktivních při buněčné proliferaci se používá v dnešní době především imunohistochemických metod. Nejčastějším způsobem je imunohistochemické značení PCNA, což je metoda průkazu proliferačního jaderného antigenu (PCNA, proliferating cell nuclear antigen) v S fázi buněčného cyklu (Obr. 2) (Šmarda et al. 2005). PCNA antigen je trimerní svírací protein, který se pomocí clamp loaderu (replikační faktor C) upevňuje obvykle k DNA řetězci s pomocí DNA polymerázy. Bez svíracího proteinu by byla tato polymeráza schopna vytvářet jen několik desítek nukleotidů dlouhé fragmenty DNA (Goedken et al. 2005). Během replikace DNA se rozlišuje tzv. vedoucí a zpoždující se vlákno. Vedoucí (leading) vlákno je asociováno se svíracím proteinem po poměrně dlouhou dobu, zatímco zpoždující se (lagging) vlákno se musí vždy po dokončení daného Okazakiho fragmentu ze svíracího proteinu uvolnit a celý komplex se znovu sestavuje na následujícím RNA primeru (Alberts et al. 2002).

Kromě PCNA můžeme k detekci buněčné proliferace použít i jako marker protein Ki-67 (také známý jako MKI67). Ten je striktně spojen s dělením buněk, kdy během interfáze (kam řadíme fáze  $G_1$ , S a  $G_2$ ) je nejvíce detekován v buněčném jádře, zato v mitóze je většina proteinu lokalizována na povrchu chromozomů. Ki-67 protein je přítomný během všech aktivních fází buněčného cyklu (fázích  $G_1$ , S,  $G_2$ , M mitózy), při přechodu do  $G_0$  fáze je však nepřítomný (Obr. 2) (Scholzen et al. 2000, Bullwinkel et al. 2006, Rahmanzadeh et al. 2007).



**Obr. 2: Buněčný cyklus.** Schéma znázorňuje průchod buněčným cyklem, PCNA je detekována pouze s S fází, Ki-67 ve všech fázích kromě  $G_0$ . M – mitotická fáze.

### **3. Proliferace v odontogenezi**

Na souhrnné studie zabývající se proliferací i apoptózou v prenatalním vývoji myších mandibulárních molárů (Lesot et al. 1996) navazují srovnávací studie časoprostorového rozložení proliferace i apoptózy hrabošů polních (Šetková et al. 2006). Postnatálně byla distribuce proliferačních zón u mandibulárních M1 (Lungová et al. 2011) a u M3 (Chlastáková et al. 2011).

Proliferační oblasti nalézáme jak v epitelu, tak i v okolním mezenchymu. V prenatalním období souvisí proliferační zóny s prorůstáním epitelu do mezenchymu a to ve stádiu iniciace, dentální plakody, pupene, pohárku a zvonku (Obr. 3). Okolní mezenchymové buňky kolem zubního základu nejprve kondenzují, od stádia zubního pupene se pak začínají intenzivně dělit. Dalším vývojem dávají vznik mezenchymovým buňkám dentální papily a okolního dentálního vaku.

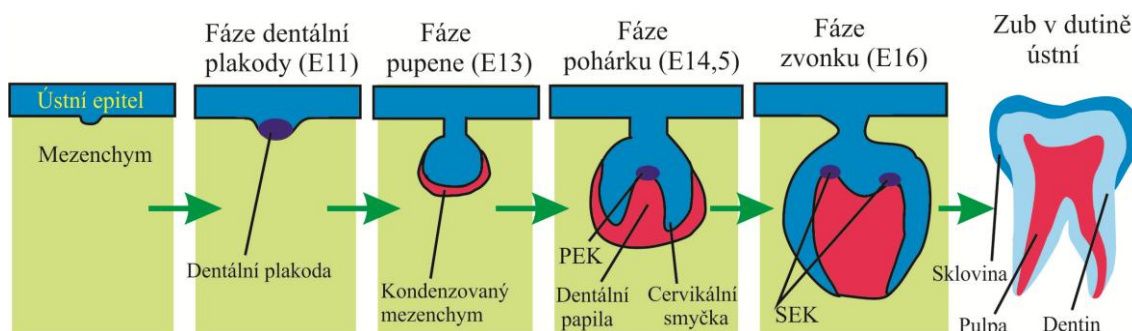
Intenzivní dělení epitelových i mezenchymových buněk zubního základu je během prenatalního vývoje kontrolováno signálními centry, označované též jako sklovinné uzly – dentální plakoda, PEK, SEK. Dentální plakoda vzniká na přesně definovaném místě (E11) a je považována za časné signální centrum s dočasnou existencí. Ze stadia plakody pokračující proliferací a vrůstáním do mezenchymu vzniká útvar podobný pupenu – stádium pupene (E13,5). V epitelu od fáze pupene vznikají signální centra, označované jako sklovinné uzly. PEK je lokalizován v oblasti největší konvexity pupene a pomocí signálních molekul řídí proliferační pochody epitelu (orgánu skloviny) i mezenchymu – tím řídí i přechod mezi stadiem pupene a pohárku (Jernvall et al. 1994). Ve stádiu zubního pohárku (E14,5) se epitel začíná členit na dvě vrstvy – vnitřní sklovinný epitel (IEE) a vnější sklovinný epitel (OEE). Místo stětávání IEE a OEE se označuje jako CL a vyznačuje se vysokou proliferační aktivitou. Jejím pokračujícím vrůstáním do mezenchymu vytváří stádium zubního zvonku (E16). CL má charakteristický vzhled, který předurčuje tvar budoucí korunky. K proliferaci dochází i v mezenchymu, kdy z kondenzovaného mezenchymu díky vedoucímu vlivu orgánu skloviny vzniká proliferací dentální papila. U vícehrbolkových zubů se z perzistujících buněk PEK v místech budoucích hrbolků vytváří SEK, přechodná struktura podílející se signálními molekulami převážně na formaci tvaru korunky (Coin et al. 1999).

Před zahájením mineralizace (E18-18,5), má orgán skloviny typické čtyřvrstevné uspořádání. Centrálně od OEE, který má ochrannou funkci, se nachází

stratum reticulare (SR) s ochrannou a vyživovací funkcí, stratum intermedium (SI) a IEE. SI aktivně připravuje živiny pro IEE/ameloblasty a zároveň se podílí na diferenciaci ameloblastů. Dentinogeneze začíná diferenciací odontoblastů v hrbolcích budoucích zubů (E18,5) a rovněž mírně předchází amelogenezi (Luckett 1993).

Z okrajových částí dentální papily vznikají v průběhu vývoje odontoblasty a z její vnitřní části zubní pulpa. Poslední vznikající strukturou prvotního základu zubu, rovněž mezenchymového původu, je dentální vak. Jedná se o mezenchym, který se kondenzuje na okrajích orgánu skloviny. Pro jeho vznik je také důležitý induktivní vliv orgánu skloviny (Luckett 1993, Ten Cate 1998, Sadler 2002).

Po vytvoření mineralizovaném základu korunky začíná probíhat vývoj zubního kořene a okolní kosti. Z buněk CL začíná prorůstat do hloubky HERS, která se skládá pouze ze IEE a OEE. Na tvorbě zubního alveolu se podílí vnější epitel dentálního vaku. Při vývoji kořene pokračuje proces dentinogeneze, na který navazuje cementogeneze a vývoj periodontia (z dentálního vaku). Vývoj zubní pulpy a zubního alveolu probíhá paralelně s vývojem korunky a kořene (Luckett 1993, Malinský 2005).



**Obr. 3:** Schéma přehledně znázorňující vývojové fáze vývoje vícehrbolkových zubů včetně lokalizace signálních center. Převzato a upraveno z (Koussoulakou et al. 2009).

### 3.1 Řízení proliferačních procesů během prenatálního období

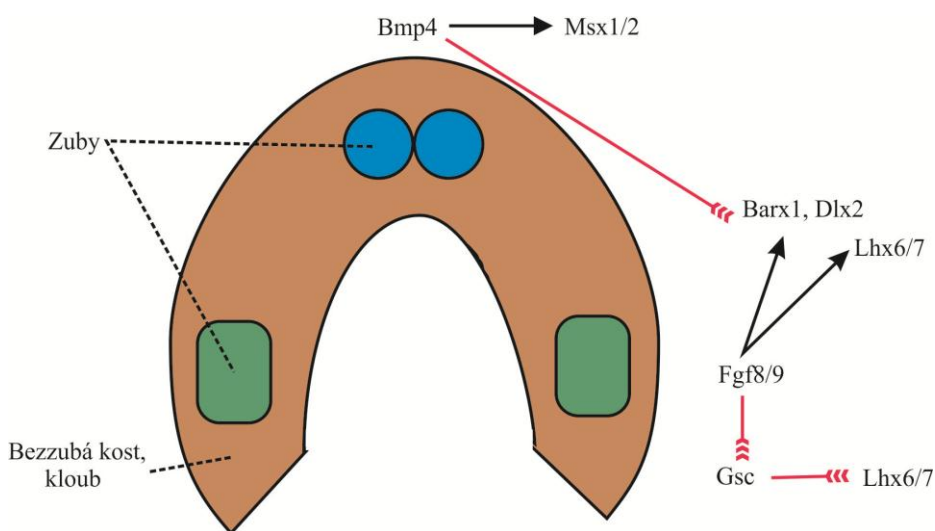
Proces	Místo
Vymezení zubního pole	Orální ektoderm
	Odontogenní mezenchym
Iniciace	Dentální planda
Fáze pupene	Kondenzovaný dentální mezenchym
Fáze pohárku	PEK
	Mezenchym dentální papily
Fáze zvonku	SEK

**Tab. 1.** Přiřazení jednotlivých fází k místu vývoje zubu.

### 3.1.1 Orální ektoderm

Před samotným vývojem zubů musí být definována jejich pozice vůči okolním strukturám. Základní antero-posteriorní a orální-aborální osa je dána exprimováním molekul BMP4 a FGF8/9 v anteriorní a posteriorní části orálního ektodermu, které vymezují oblast budoucích řezáků a molárů (Obr. 4) (Fleischmannová et al. 2010). Typ zubů můžeme ovlivnit i experimentálně, např. po přidání molekuly Noggin (váže se a inaktivuje členy TGF- $\beta$  signálních molekul včetně BMP) v časném vývoji (ED 9-10) vyústí k transformaci vývoje řezáků k molárům (McMahon et al. 1998).

První morfologické změny v epitelu jsou patrné kolem E11 (Koussoulakou et al. 2009). V orálním ektodermu probíhá exprese genu *Pitx2*. Do signalizace jsou zapojeny signální dráhy BMP, FGF, SHH i WNT (Obr. 7) (Thesleff 2000).



**Obr. 4:** Schematické znázornění základní vymezení ploch vývoje zubů. V místech budoucích řezáků (modře) se exprimuje BMP4, v místech budoucích molárů (zeleně) Fgf8/9. Hnědě je znázorněna bezzubá kost. Převzato a upraveno Fleischmannová et al. 2010.

### 3.1.2 Odontogenní mezenchym

Díky stimulaci orálního ektodermu dochází k expresi mnoha genů v přilehlém odontogenním mezenchymu. Geny zapojené do vývoje jsou *Lhx6/7*, *Barx1*, *Msx1/2*, *Dlx1/2* a *Gli1/2/3*. FGF8/9 indukují expresi *Lhx6/7*, *Dlx 1/2*, *Barx1* a posteriorní mezenchymální markery vylučující expresi *Gsc* (Gooseoid gen). V anteriorní části orálního ektodermu dochází díky BMP4 k expresi *Msx1/2* a zároveň zabraňuje expresi *Barx1*. Jestliže je inhibován BMP4, dochází k expresi *Barx1* a zároveň dochází k vývoji molárů místo řezáků (Obr. 4) (Fleischmannová et al. 2010).

Epiteliální BMP4 prostřednictvím *Msx1* specificky indukuje produkci mezenchymální BMP4, zatímco epiteliální FGF8 indukuje tvorbu mezenchymálního



aktivinu  $\beta$ A. Díky mezenchymální BMP4 a aktivinu  $\beta$ A následně zahajují buňky epitelu proliferaci na přesně definovaných místech a začínají se vnořovat do mezenchymu (Koussoulakou et al. 2009).

### 3.1.3 Dentální plakoda

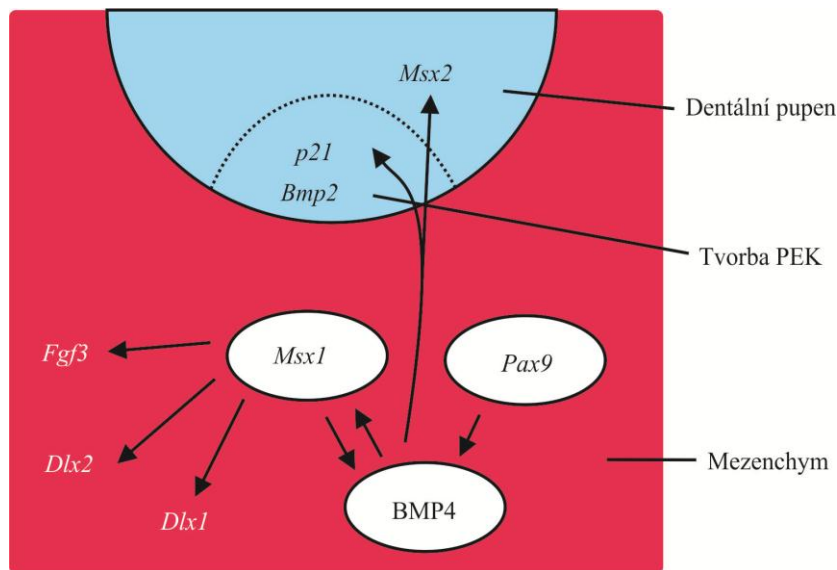
Dentální plakoda, označovaná též jako časné signální centrum, je tvořena souborem buněk s regulační aktivitou. Buňky tvořící dentální plakody sekretují molekuly všech čtyř signálních rodin (BMP, FGF, SHH a WNT). Navíc zde dochází k expresi genů *p21*, *Msx2*, *Lef1* a *Edar* (Obr. 7), kdy pouze *Lef1* a *Edar* působí proliferčně na okolní tkáň, zatímco *p21* a *Msx2* působí apoptoticky (Kratochwil et al. 1996, Peters et Balling 1999).

### 3.1.4 Kondenzovaný dentální mezenchym

V dentálním mezenchymu nejprve dochází k zahušťování, neboli kondenzaci, buněk. Kondenzovaný epitel se vyvíjí kolem invaginace epitelu, připomínající pupen. V této fázi vývoje dochází k úplné ztrátě odontogenního potenciálu v epitelu a přebírá jej mezenchym (ED11.5-12), rovněž dochází k intenzivní expresi *Pax9*, která je nutná pro mezenchymální ztlušťování (Mina et Kollar 1987). Dalšími exprimovanými geny jsou *Lhx6/7*, *Barx1*, *Msx1/2*, *Dlx1/2*, *Gli1/2/3*, *Lef1* a *Runx2* (Obr. 7).

Mezenchymální buňky sekretují důležité extracelulární molekuly, tenascin a syndecan. Tyto molekuly se poté v mezibuněčném prostředí spojují a zvyšují koncentraci mnoha růstových faktorů. Různá koncentrace mezi těmito místy indukuje také rozdílné množení buněk v epiteliálních vrstvách a dochází k transformaci zubního pupenu do polopyramidální struktury (Koussoulakou et al. 2009). Myší moláry dosahují tohoto stádia přibližně v E13.5-14. Signální dráhy zapojeny do této etapy vývoje jsou BMP, FGF a WNT (Obr. 7).

Nejpravděpodobnější možností pro indukci přeměny ze stádia pupene do stádia pohárku, je molekula BMP4. Jestliže není tato signální molekula produkována, geny *Lef1*, *Msx1* a *Pax9* nejsou exprimovány a vývoj zubního zárodku se zastavuje ve fázi pupene (Obr. 5) (Maas et Bei 1997, Keränen et al. 1999, Kapadia et al. 2007).



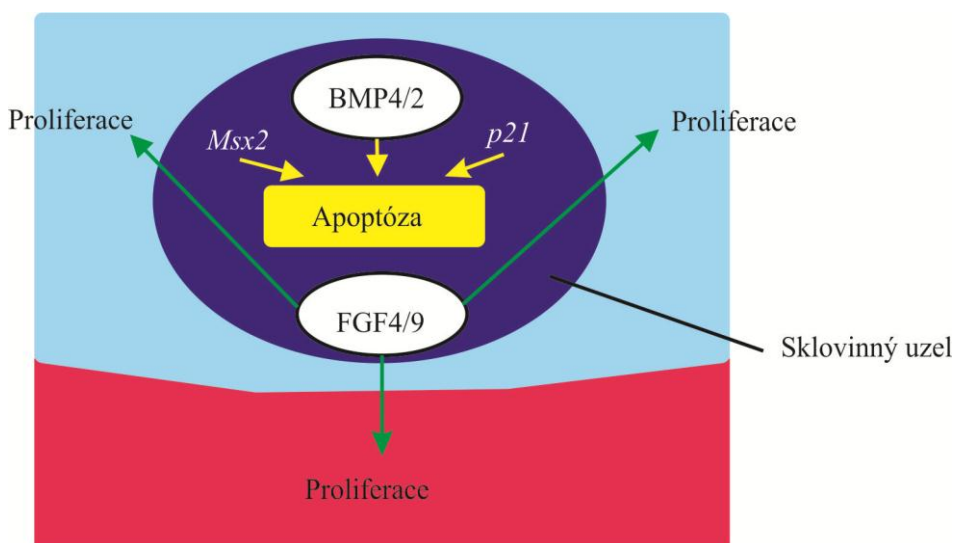
**Obr. 5:** Schéma znázorňuje mezenchymální působení BMP4 na stádium pupene. (Převzato a upraveno dle Peters et Balling 1999)

Mezi molekulami PAX9 s MSX1 dochází k fyzické proteinové interakci *in vitro* i *in vivo*. Typickým produktem je stabilní dimerní komplex. Mezenchym přiléhající k vrcholu pupenu v přítomnosti *Msx1* současně s *Pax9* produkuje BMP4 (Obr. 5). Tím spouští v epiteliálních buňkách tvorbu *p21* (Ogawa et al. 2005). Vzniklý protein, spolu s BMP2, je charakteristický pro buňky sklovinného uzlu (Jernvall et al. 1994, Koussoulakou et al. 2009). *Fgf3*, *Dlx1* a *Dlx2* se objevují v dentálním mezenchymu pod regulací *Msx1* (Bei et Maas, 1998).

### 3.1.5 Primární sklovinný uzel

PEK představuje přechodnou, nicméně velmi důležitou, strukturu orgánu skloviny (Jernvall et al. 1994). Má charakter ztlustění ve vnitřním sklovinném epitelu a slouží jako signální centrum v procesu řízení vývoje dalších dentálních struktur, včetně proliferačních procesů (Vaahtokari et al. 1996). Sklovinný uzel byl objeven Spermannem a Mangoldem již roku 1924. Jeho funkcí je podpora proliferace buněk ve svém okolí, tím způsobuje růst CL. Dále prostřednictvím růstových faktorů (FGF4/9 a SHH) stimuluje proliferaci orgánu skloviny a okolních mezenchymových buněk zubní pulpy (Thesleff et Sharpe 1997, Jernvall et al. 1998, Thesleff 2006). Proto dochází ke změně tvaru z pupene (E13) v pohárek (E14,5) a později až ve tvar zvonku (E16) (Jernvall et al 1994, Koussoulakou et al. 2009). Sklovinný uzel exprimuje geny *Lef1* a *Edar* (oba mají proliferační aktivitu), dále také exprimuje geny *Msx2*, *Bmp2* a *p21* (všechny mj. indukují apoptózu) (Obr. 6). *P21* se účastní řízení buněčného cyklu a to

tak, že se pod jeho vlivem přestávají epiteliální buňky dělit, protože neumožní vstup do S fáze buněčného cyklu (Jernvall et al. 1998).



**Obr. 6:** Schéma znázorňující proliferační signály sklovinného uzlu řízené FGF4/9 a buněčnou smrt zprostředkovanou BMP4/2, Msx2 a p21 (Peters *et* Balling, 1999).

### 3.1.6 Mezenchym dentální papily

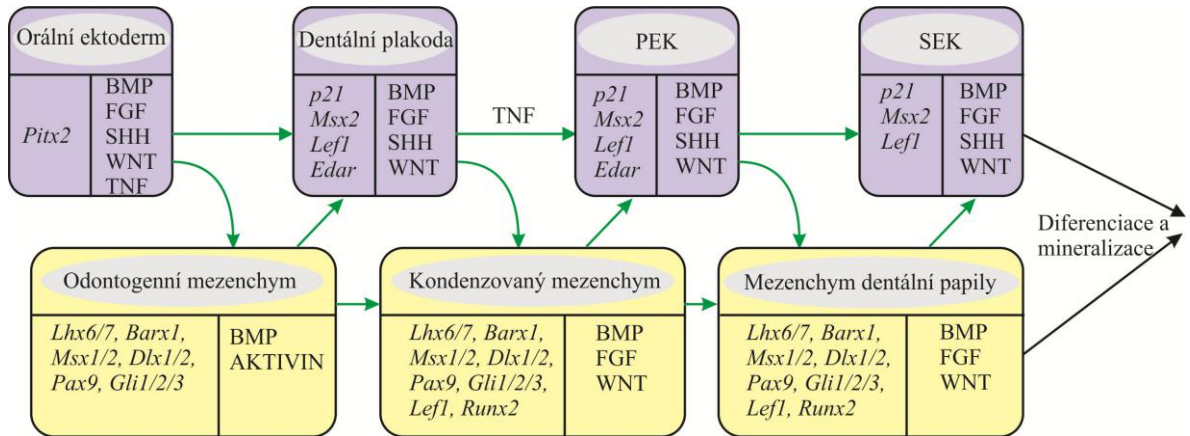
Dentální papila je mezenchymální struktura typická pro stádium zvonku, vyskytující se v centrální části vyvíjejícího se zubu. Z laterálních stran je ohraničována rostoucími strukturami orgánu skloviny, kdy CL roste směrem do hloubky a předurčuje tvar a obrys budoucí zubní korunky (Obr. 3). Moláry dosáhnou stádia zvonku do E17.5-18 (Rossant *et* Tam 2002) V mezenchymu dochází k expresi stejných genů jako v kondenzovaném mezenchymu, čili zahrnuje *Pax9*, *Lhx6/7*, *Barx1*, *Msx1/2*, *Dlx1/2*, *Gli1/2/3*, *Lef1* a *Runx2*. Ze signálních drah jsou zapojeny BMP, FGF a WNT (Obr. 7). Z vnější vrstvy dentální papily pak dochází k diferenciaci buněk zubní pulpy v odontoblasty (Thesleff 2003).

### 3.1.7 Sekundární sklovinný uzel

SEK jsou charakteristické pro vícehrbolkové zuby. Při objevení prvního SEK, což je časově velmi variabilní, přibližně v E15, již popisujeme zub jako začátek fáze zvonku. SEK vznikají pravděpodobně z buněk PEK, které nepodlehly apoptóze (Lesot *et* al. 1996, Coin *et* al. 1999). Později se formuje i druhý, třetí a čtvrtý SEK. Vnitřní sklovinný epitel se pod vedením signálních molekul z SEK nadále vchlipuje do mezenchymu. Tímto pohybem vytlačuje hvězdicové retikulum a získává formu zvonku

(E 16.5). Sklovinné uzly koordinují tedy nejen formování, ale také pozici a velikost příslušných hrbolků na korunce (Coin et al. 1999).

Buňky SEK exprimují stejné geny jako PEK, s výjimkou *Edar*. Signální dráhy zapojené do vývoje zahrnují BMP, FGF, SHH a WNT (Obr. 7) (Thesleff 2003).



**Obr. 7:** Schéma znázorňuje působení signálních molekul a genetických faktorů v epitelu a mezenchymu během jednotlivých fází zubního vývoje. Převzato a upraveno z Thesleff 2003.

### 3.2 Proliferace v odontogenezi v postnatálním období

V postnatálním období vznikají 2 struktury podílející se na proliferačních procesech – terciární sklovinný uzel (TEK), který je lokalizován na korunce, a HERS podílející se na vývoji kořene zubu.

U vícehrbolkových zubů ze zbytků buněk SEK struktura označovaná jako terciární sklovinný uzel (TEK). Řídí vytváření výsledného tvaru korunky včetně vzniku EFA (Enamel free areas), které se nachází na korunce myších mandibulárních molárů (Luukko et al. 2003).

Po dokončení tvorby zubní korunky také dochází k vývoji zubního kořene. Ten vzniká pokračujícím vývojem CL, která je základ pro další strukturu – HERS. HERS má důležitý formativní vliv na budoucí tvar a počet kořenů, reguluje načasování jejich vývoje a navíc indukuje diferenciaci odontoblastů. Proliferační procesy HERS jsou, stejně jako při prenatalním vývoji korunky, řízeny epitel-mezenchymovými interakcemi. HERS vykazuje vysokou mitotickou aktivitu v období P4-P12. Pak dochází k utlumování proliferační aktivity, až se úplně ukončuje vývoj kořene (P16) (Lungová et al. 2011). Na vývoji kořene se uplatňují proteiny SHH a MSX2. S postupujícím vývojem se HERS rozpadá, některé její části mohou ale perzistovat i v dospělosti (Malinský et al. 2002).

#### 4. Geny účastníci se proliferačních procesů v rámci odontogeneze

Z předchozích údajů vyplývá, že s vývojem zubů je spojeno více než 300 genů. Většina těchto genů je evolučně vysoce konzervovaná a je spojena se signálními drahami zajišťující mezibuněčnou komunikaci mezi epitelovou a mezenchymovou tkání (Thesleff 2006).

Velmi důležitými členy genů účastnících se odontogeneze jsou geny *Pax*, *Msx*, *Dlx*, *Lhx*, *Barx*, *Pitx* a *Runx2* (Kavitha et al. 2010). Pro výzkum molekulárních mechanismů je důležité, že regulační geny *Msx1*, *Pax9* nebo *Pitx* se exprimují jak u lidí, tak i u myši. Při pokusech byly nalezeny jen malé rozdíly v expresi, v zásadě je mechanismus regulace identický (Lin et al et al. 2007).

Časná exprese genů *Msx1* a *Msx2* je omezena na distální, ve střední čáře umístěnou oblast, kde se budou vyvíjet řezáky a nikoliv moláry. Zatímco *Dlx1* a *Dlx2* jsou exprimovány v mezenchymu, kde se budou vyvíjet moláry (MacKenzie et al. 1991, Qiu et al. 1997).

Geny zodpovědné za proliferaci		Geny zodpovědné za apoptózu	
<i>Pax9</i>	Almeida et al. 2010	<i>p21</i>	Peters et Ballinng 1999
<i>Msx1</i>	Maas et Bei 1997	<i>Msx2</i>	Peters et Ballinng 1999
<i>Dlx</i>	Bei et Maas 1998		
<i>Lef1</i>	Kratochwil et al. 1996		

**Tab. 2:** Přehled některých genů účastnících se vybraných morfogenetických pochodů včetně referencí.

Geny, při jejichž mutaci dochází k zastavení vývoje zubu	
<i>Pax9</i>	Neubóser et al. 1997, Kavitha et al. 2010
<i>Msx1</i>	Satokata et Maas 1994
<i>Msx1 s Msx2</i>	Hu et al. 1998, Satokata et al. 2000, Matalová et al. 2008
<i>Lef1</i>	Kratochwil et al. 1996
<i>Dlx1/2</i>	Thomas et al. 2000
<i>Axin2</i>	Matalová et al., 2008
<i>Eda/EdaR</i>	Headon et Overbeek 1999; Monreal et al 1999
<i>Pitx2</i>	Lin et al. 1999

**Tab. 3:** Přehled některých genů, při jejichž mutaci dochází k zastavení odontogeneze včetně referencí.

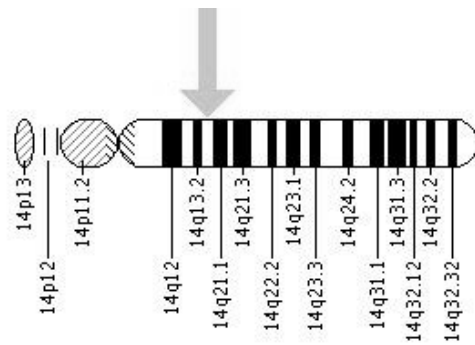
#### 4.1 Pax9

*Pax9* je členem genů rodiny *Pax* (Paired box domain gene family). Pro tuto rodinu je typická DNA-párovací doména. Gen pro *Pax9* se vyskytuje na chromozomu 14q13.3 (Obr. 8) a obsahuje 4 exony. Hraje významnou úlohu při regulaci buněčné diferenciace (Neubóser et al. 1997).

*Pax9* je exprimován v časných stádiích vývoje zubů v dentálním mezenchymu pod kontrolou antagonistického působení FGF8/BMP4, kdy FGF8 má aktivační potenciál a BMP4 má funkci inhibiční. Vysoká míra exprese je typická pro fáze iniciace, pupene a čepičky. Naopak ve fázi zvonku (E16) je exprese již potlačována (Almeida et al. 2010).

*Pax9* je potřebný pro kondenzaci zubního mezenchymu okolo zubního pupene, protože aktivuje gen *Msx1*, se kterým je pravděpodobně spojen zpětnou vazbou. *Pax9* je nezbytný k pokračování mezenchymálního vývoje BMP4, *Msx1* a *Lef1* (Kavitha et al. 2010). To je klíčové pro rozvoj zubního zárodku, jelikož BMP4 je zapojen do signalizační kaskády, která je nutná k tvorbě sklovinného uzlu (Obr. 5) (Kapadia et al. 2007).

Pokud dojde k mutaci *Pax9* nebo je jeho exprese chybná, nedochází k aktivaci *Msx1*. Jestliže je přítomná absence *Pax9* nebo *Msx1*, pak je vývoj zubu zastaven ve stadiu pupenu. Klinicky se projevuje jako izolované formy autozomálně dominantní (AD) oligodoncie, kdy je postižena většina stálých molárů, občas v kombinaci s dalšími typy zubů (Neubóser et al. 1997).



**Obr. 8:** Schéma znázorňující umístění genu *Pax9* na chromozomu. Zdroj: URL3.

#### 4.2 Msx

Je členem malé rodiny známé jako *Msx* homeobox gene family, související s genem u drosophily nazývajícím se muscle segment homeobox (*msh*) (Davidson

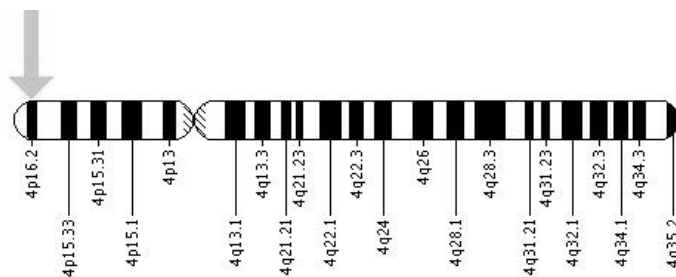
1995). U člověka jsou zatím známy 2 tyto geny, *Msx1* a *Msx2* (Ivens et al. 1990). Gen pro *Msx1* u člověka na chromozómu 4p16.1 (Obr. 9)

Gen *Msx1* obsahuje 2 exony, z nichž druhý zahrnuje homeodoménu, která se váže na DNA a umožňuje interakci s *Pax9* a dalšími proteiny. Gen pro *Msx1* se ve velké míře vyskytuje v zubním mezenchymu a má zásadní význam při vývoji zubů (Peters et Balling 1999).

*Msx1* inhibuje diferenciaci buněk tím, že udržuje vysokou hladinu exprese cyklinu D1 a Cdk4. Tím zabrání odchodu z buněčného cyklu a umožní buňce odpovědět na proliferační faktory. Navíc je schopen způsobit dediferenciaci již diferencovaných svalových vláken na jednojaderné buňky, které mohou exprimovat chondrogenní, adipogenní, pyogenní a osteogenní markery (Kavitha et al. 2010).

Mutace tohoto genu způsobí narušení vývoje zubů v raném stádiu. *Msx1* hraje významnou roli v epiteliálních a mezenchymálních interakcích řídících rozvoj všech epidermálních orgánů, kam patří kromě zubů i vlasové folikuly nebo mléčné žlázy (Hu et al. 1998).

Momentálně jsou známy tři mutace v 1. exonu a čtyři mutace v exonu 2, které jsou spojovány s hypodoncií. Klinicky se může jednat buď o AD nebo autozomálně recesivní (AR) hypodoncii. U lidí jsou AD hypodoncii spojovány s druhými premoláry a třetími moláry, navíc mutace v *Msx1* má také souvislost s rozštěpem rtu, patra, Witkopovým syndromem (Tooth and nail syndrome; TNS). AR hypodoncii se spojuje s Wolf-Hirschhornovým syndromem (WHS) (Matalová et al. 2008).



**Obr. 9:** Schéma znázorňující umístění genu *Msx1* na chromozomu. Zdroj URL4.

### 4.3 *Dlx*

*Dlx* (Distal less) rodina homeoboxových genů obsahuje 6 členů (*Dlx 1-6*). Geny *Dlx1* a *Dlx2* jsou typické pro oblasti molárů. Jsou exprimovány v epitelu a mezenchymu žaberních oblouků, mezenchymu zubních pupenů a dentální laminy (Thomas et al. 2000).

Mutace tohoto genu mají za následek abnormality týkající se derivátů prvních 4 žaberních oblouků, včetně mandibuly a kalvy. Mutace těchto genů má za následek selhání vývoje a ztrátu horních molárů (Thomas et al. 2000).

#### 4.4 Lhx

Lim homeodomény transkripční faktory (*Lhx-1* a *Lmx1-b*) jsou exprimovány v buňkách CNC prvního žaberního oblouku. Chybná exprese tohoto genu vyvolává abnormální vývoj prvního žaberního oblouku včetně ageneze zubů a rozštěpu patra (Zhao et al. 1999).

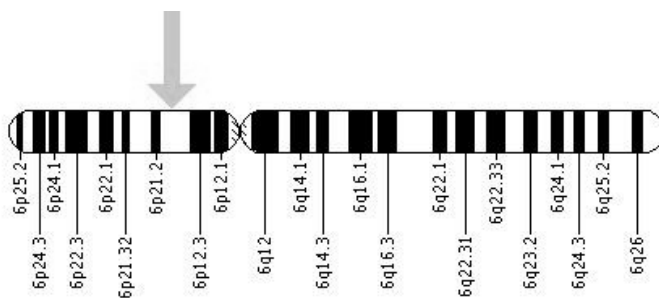
#### 4.5 Barx

*Barx1* je exprimován mezenchymem mandibulárního a maxilárního výběžku a v zubních primordiích. *Barx2* je exprimován orálním epitelem ještě před vývojem zubů (Jones et al. 1997).

#### 4.6 Runx2

*Runx2* (runt related transcription factor 2) je transkripčním faktorem a klíčovým regulátorem diferenciací osteoblastů a tvorby kostí. Analýza *Runx2* ukázala, že je jeho exprese omezena na zubní mezenchym mezi fází pohárku a časným stádiem zvonku (James et al. 2006).

Mutace v genu *Runx2* se u lidí projeví také tvorbou nadpočetných zubů ve stálé dentici. Ta samá mutace u myši ale tvorbu nadpočetných zubů nevyvolá (Otto et al. 1997). Předpokládá se, že rozdíl v projevu mutace je dán skutečností, že myší chrup se podobá spíše dočasnému chrupu lidí, ve kterém mutace *Runx2* tvorbu nadpočetných zubů nespouští.



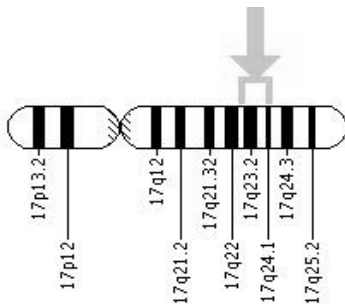
**Obr. 10:** Schéma znázorňující umístění genu *Runx2* na chromozomu Zdroj: URL5.



#### 4.7 *Axin2*

*Axin2* je gen, který reguluje embryonální vývoj většiny orgánů, včetně zubů. Na chromozomu je lokalizován v pozici 17q23-24. Funguje jako negativní regulátor signální dráhy Wnt, která podporuje fosforylaci a degradaci  $\beta$ -kateninu (Obr.17) (Jho et al. 2002).

Mutace genu *Axin2* jsou příčinou těžkých oligodoncií u lidí. Dochází k agenezi většiny stálých molárů, premolárů, dolních řezáků a horních postranních řezáků. Oproti tomu centrální řezáky jsou vždy přítomny (Matalová et al. 2008).

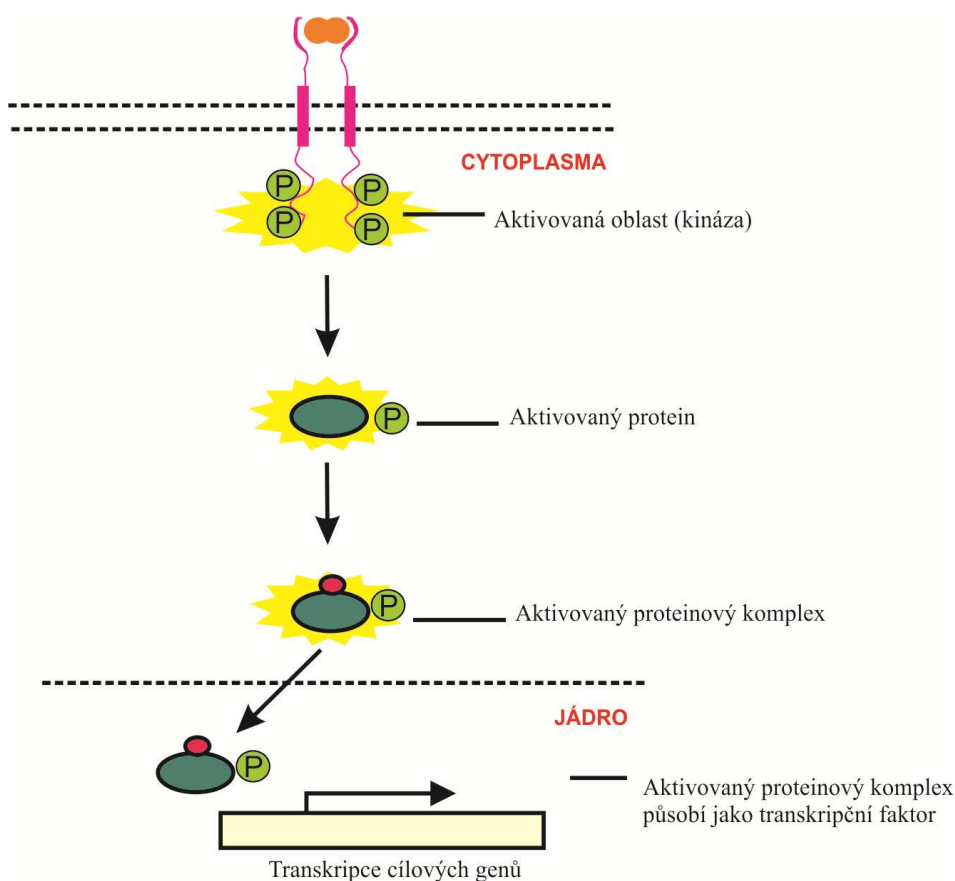


**Obr. 11:** Schéma znázorňující umístění genu *Axin2* na chromozomu Zdroj: URL6.

## 5. Signální dráhy a molekuly

Mezibuněčná signalizace je podstatná pro indukci a kompetenci k odpovědi mezi signalizujícími a cílovými buňkami (Sadler 2011, Rossant et Tam 2002)

Do procesu vývoje zubů je zapojeno několik signálních drah. Jedná se především o signální dráhy FGF, BMP, SHH, Wnt, TNF a některé další, jako EGF (Epidermální růstový faktor) nebo Notch. Každá z těchto signálních drah ve svém průběhu obsahuje signální molekuly (ligandy), vážící se na speciální transmembránové receptory a právě tyto receptory slouží jako přenašeč signálu do nitra buňky, kde spouští typickou kaskádovitou odpověď. Receptor má extracelulární, transmembránovou a cytoplasmatickou doménu, která je často enzymem kinázou a často aktivuje transkripční faktor (Thesleff et Sharpe 1997, Junqueira et al. 1997, Vacek 2006).



**Obr. 12: Schéma typické signální dráhy.** Zahrnuje ligand a jeho receptor, kdy je receptor aktivován ligandem a přes enzymovou aktivaci se spouští fosforylační kaskáda, aktivující ve výsledku transkripční faktor regulující genovou expresi.

Přehledné shrnutí signálních molekul zapojených v intercelulárních signalizačních drahách je zobrazeno v následující tabulce.

Rodina signálních molekul	Signální molekuly
Fibroblastové růstové faktory (FGFs)	FGF-1 až FGF-10 eFGF
Transformující růstový factor $\beta$ (TGF- $\beta$ ) superrodina	Aktivin Vg-1 Kostní morfogenetický protein (BMP) Decapentaplegic (Drosophila)
Hedgehog	Hedgehog (insecta) Sonic hedgehog (vertebrata) Indian hedgehog (vertebrata) Desert hedgehog (vertebrata) Tyggywinkle hedgehog (vertebrata)
Wingless	Wingless (insecta) Wnt protein rodina (vertebrata)
Delta a serrate	Delta a serrate

**Tab. 4. Přehled intercelulárních signálních molekul.** Převzato a upraveno z Wolpert et al. 1998.

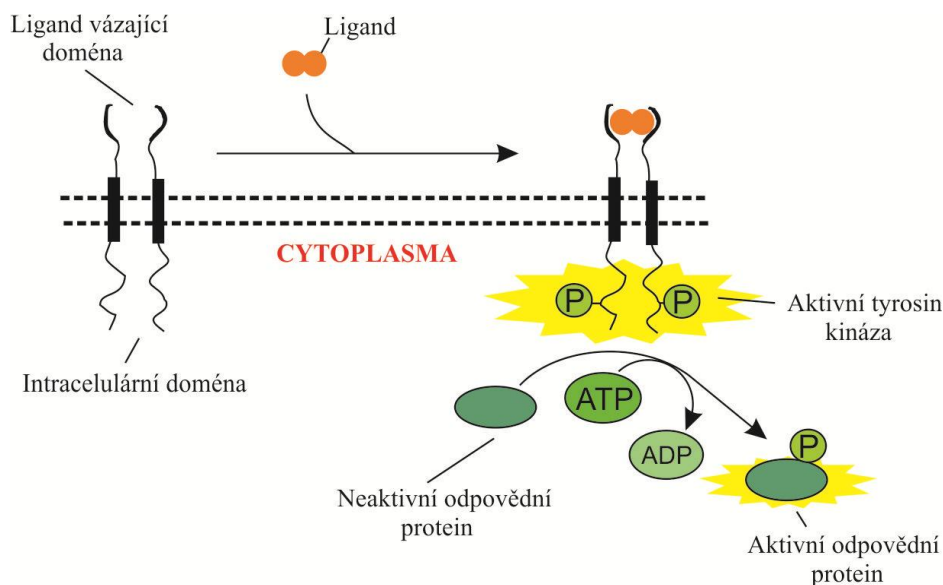
### **5.1 FGF signální dráha**

Proteiny FGF patří do velké rodiny heparin vazebných bílkovin, tzv. FGF rodiny, které jsou schopné zprostředkovat růst a diferenciaci buněk z nejrůznějších vývojových původů (Wilkie et al. 1995).

V současné době je známo již více než 20 genů, které mohou vytvářet stovky proteinových isoform (Sadler 2011). Se samotným vývojem zubů je spojováno 7 FGF signálních molekul. Prvním objeveným členem byl FGF3 (Wilkinson et al. 1989), jeho sekrece je spojena s mezenchymem dentální papily. Kromě *Fgf3* jsou v dentálním mezenchymu ještě exprimovány a sekretovány FGF7 a FGF10, zatímco FGF4, FGF8, FGF9 a FGF20 jsou lokalizovány v dentálním epitelu (Thesleff et Sharpe 1997). Se signálními centry jsou spojeny geny pro molekuly FGF3, FGF4, FGF9 a FGF20 (Wang et Thesleff, 2006).

Na povrchu cílové buňky, která odpovídá na signál FGF, se nachází receptor FGFR (fibroblast growth factor receptor). FGFR je transmembránový protein, který kódují čtyři geny a jejich alternativním sestřihem vzniká mnoho isoform tohoto receptoru s různou afinitou k různým ligandům FGF. Receptor obsahuje extracelulární

část, na kterou se váží ligandy FGF, a intracelulární doménu s tyrosin kinázovou aktivitou. Jestliže se naváže ligand FGF na FGFR, dochází k dimerizaci receptoru, což vede k aktivaci tyrosin kinázy. Jejím prostřednictvím je dále aktivovaná mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK – mitogen activated proteinkinase), fosfatidylinositol-3 kináza (PI3K) a fosfolipáza C (PLC), které pak vedou informaci do jádra (Böttcher et Niehrs 2005). Výsledkem je proliferace buněk.



**Obr. 13: Schéma FGF signální dráhy.** Po navázání ligandu dochází k aktivaci intracelulární domény, která fosforyluje odpovědní protein.

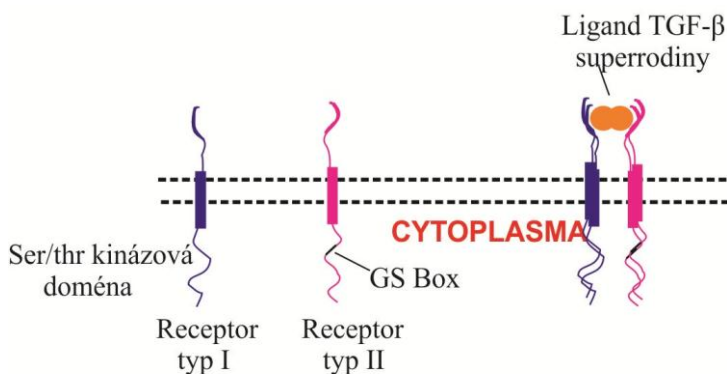
## 5.2 TGFβ signální dráha

Tato dráha je někdy také nazývána jako Smad signální dráha nebo Smad rodina transkripčních faktorů (Gilbert 2000). Rodina lidského transformního faktoru beta (TGFβ) se skládá z 33 členů, většina z nich kóduje dimery, sekretované polypeptidy, které se uplatňují při kontrole vývoje. Ligandy jsou transformační růstový faktor β (TGFβ – transforming growth factor β) nebo kostní morfogenetický protein (BMP – bone morphogenic protein), patřící do rodiny TGFβ. Členové TGF-β superrodiny ovlivňují parakrinně ostatní buňky pomocí transkripčních faktorů (Heldin et al. 1997).

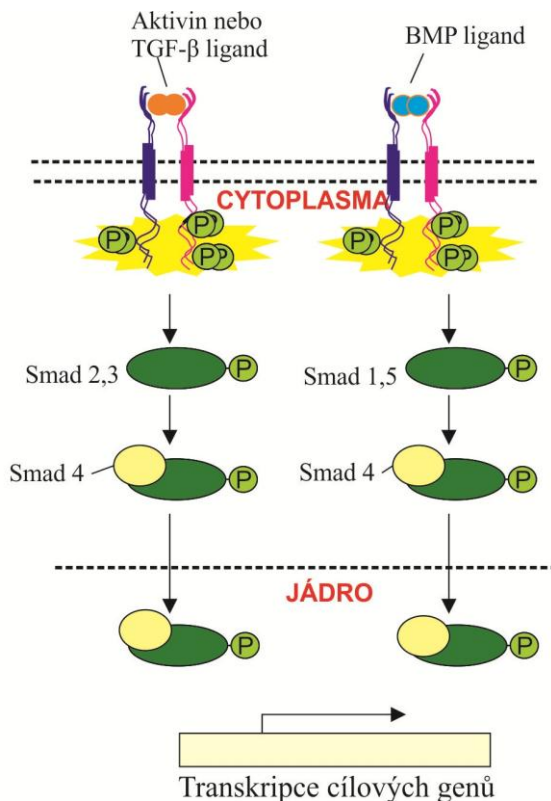
Ligandy TGF-β se váží na receptor TGF-β typu II, který pak dovoluje navázání na receptor TGF-β typu I. Jakmile se oba receptory dostávají do těsného kontaktu, je receptor typu II schopen fosforylace serinu nebo threoninu na receptoru typu I v oblasti GS domény, čímž jej aktivuje. Nyní je schopen aktivovaný receptor I. typu fosforylovat Smad protein.

Proteiny Smad 1 a 5 jsou spouštěny BMP rodinou TGF- $\beta$  superrodiny, zatímco receptory vázící aktivin a TGF- $\beta$  rodinu fosforylují Smad 2 and 3. Tyto fosforylované proteiny Smad pak intracelulárně na sebe váží Smad 4 a tím vzniká dimer, který vstupuje do jádra a tam reguluje transkripci cílových genů důležitých pro proliferaci (Gilbert 2000).

U obratlovců se vykytuje i ligand Nodal, jež je schopný aktivovat Smad cestu v buňkách, určených ke specifické formaci mesodermu v levo-pravé orientaci (Heldin et al 1997, Gilbert 2000).



**Obr. 14: Schéma TGF $\beta$  membránových receptorů.** K aktivaci je potřeba nejprve vazba ligandu na typu II, poté dojde k navázání na ligand typu I a fosforylaci v oblasti GS domény.



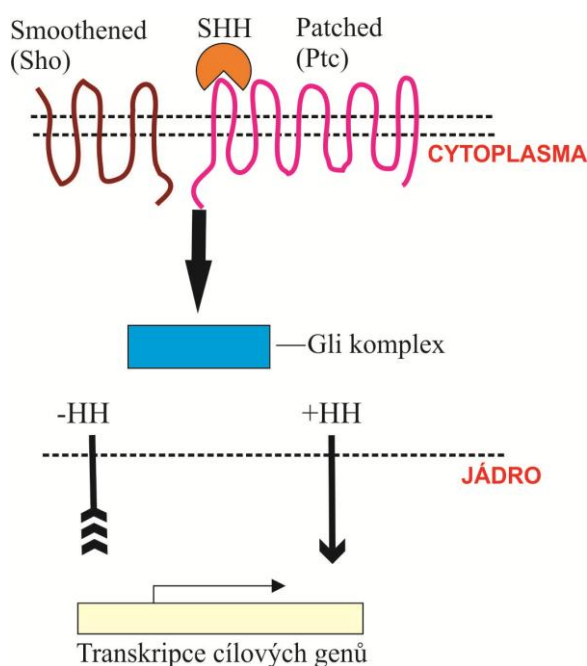
**Obr. 15: Schéma TGF- $\beta$  signální dráhy.** Pro BMP ligandy jsou typické transportní proteiny Smad 1 a 5, pro activin a TGF- $\beta$  ligandy proteiny Smad 2 a 3. Intracelulárně dochází k dimerizaci proteinem Smad 4, který umožňuje vstup do jádra a transkripci cílových genů.

### 5.3 Hedgehog signální dráha

Další signální drahou je Sonic hedgehog (SHH). SHH má v průběhu odontogeneze nepostradatelný význam (Cobourne 1999). V procesu odontogeneze je exprimována dentálním epitelem v několika fázích. Jednak ve fázi epiteliálního ztluštění (Bitgood et McMahon 1995), ve stádiu sklovinného uzlu a také ve stádiu diferenciaci ameloblastů (Vaahtokari et al 1996, Cobourne et al. 2001, Thesleff et Sharpe 1997).

Sonic hedgehog je signální molekula řazena do rodiny hedgehog proteinů, která zahrnuje minimálně 3 členy – kromě SHH, který byl ale nejvíce studován, se do této rodiny řadí DHH (Desert) a IHH (Indian). Všechny tyto molekuly jsou podmíněny geny (Rossant et Tam 2002).

Hedgehog signální dráhu kromě signální molekuly tvoří transmembránový receptor Patched (Ptc) mající typickou strukturu (Chen et Struhl 1996). Ptc v nepřítomnosti HH proteinu potlačuje signální funkci druhého transmembránového proteinu Smoothened (Smo). Navázání HH ligandu na Ptc aktivuje Smo, který aktivuje transkripci *Hh* cílových genů, potřebných pro proliferaci a diferenciaci, přes rodinu transkripčních faktorů Gli (Dassule et al. 2000), zahrnující transkripční faktory Gli-1, -2, -3. Analýza myši s vyřazenou expresí Gli-2 ukázala abnormální vývoj horních řezáků, pravděpodobně způsobený mírnou formou holoprosencephalie. Nicméně u Gli-3 mutantních myši nebyly prokázány žádné odchylky od jejich normálního vývoje (Cobourne et al. 2007).



**Obr. 16: Schéma SHH signální dráhy.** Navázání ligandu na Ptc aktivuje protein Smo a ten přes rodinu transkripčních faktorů Gli indukuje transkripci *Hh* cílových genů.

## **5.4 Wnt signální dráha**

Hlavní signální molekulou je protein Wnt, který má nejméně 16 isoform. Struktura těchto molekul je zakódována v genetické informaci buňky. Tyto signální molekuly se účastní procesů proliferace, diferenciace, migrace a apoptózy. Také se podílí na vývoji paraxiálního mezodermu, neurální trubice a kraniofaciálního primordia (Gilbert 2000).

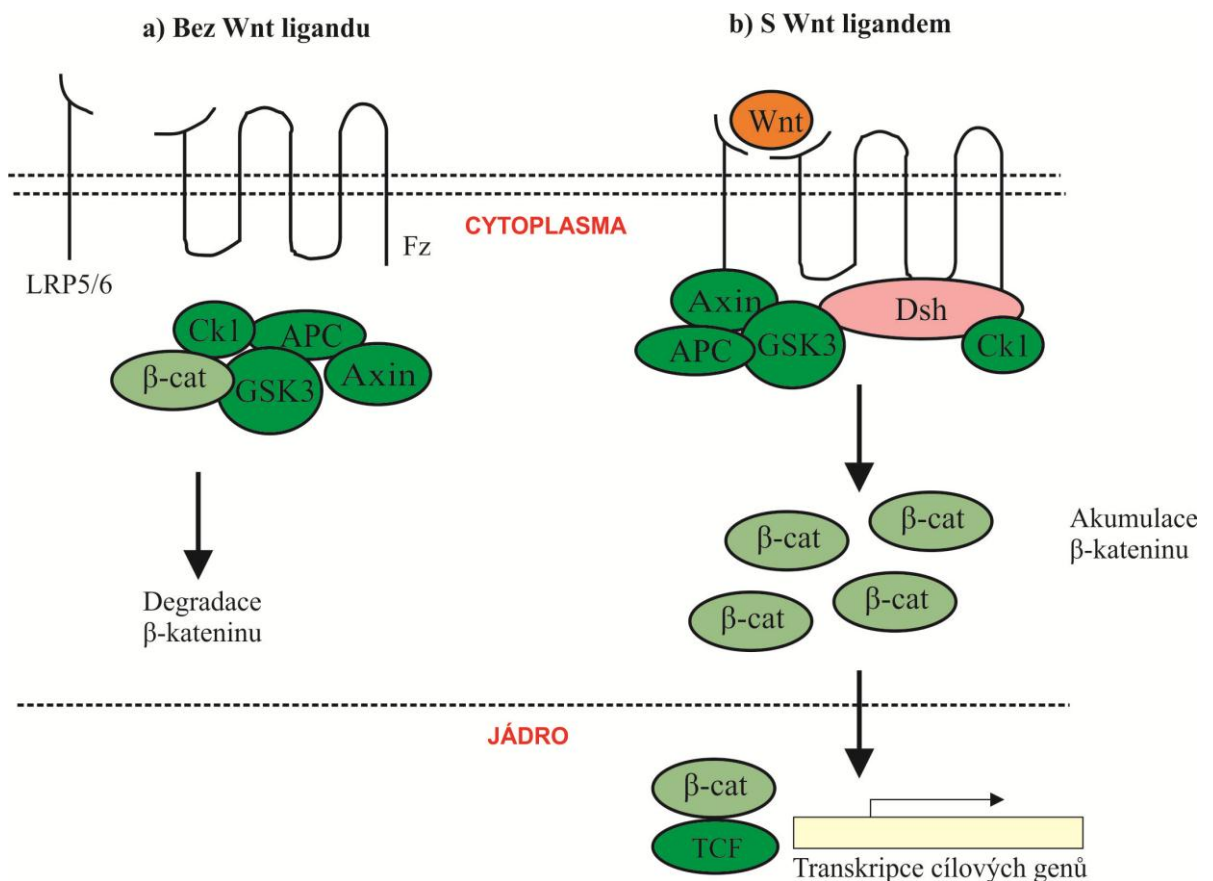
Pod označením Wnt se ukrývají spojené názvy dvou genů – *Wg* (Wingless) popsáno u *Drosophily* a *int-1* (Integration 1) u myši. Oba geny jsou homologní a mají evolučně společného předka (Rijsewijk et al. 1987).

Ligandy Wnt patří do rodiny sekretovaných glykoproteinů. Ligandy Wnt aktivují signální dráhy vázané na receptory Frizzled rodiny a protein související s lipoproteinovým receptorem LRP 5/6 (lipoprotein receptor-related protein). Některé z Wnt signálních drah využívají jako klíčový signální transduktor  $\beta$ -katenin. Tato dráha se označuje jako kanonická a je nejlépe prozkoumána. Cytoplazmatický  $\beta$ -katenin se za nepřítomnosti Wnt ligandu navazuje na destrukční komplex složený z APC (adenomatous polyposis coli) nádorového supresorového proteinu, podpůrného proteinu Axinu, glykogen syntázy kinázy-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) a CK1 (Casein Kinase 1). GSK-3 $\beta$  fosforyluje  $\beta$ -katenin, který je následně degradován (Zeng et al. 1997, Rossant et Tam 2002, Komiya et Habas 2008). Wnt ligand, který se naváže na Frizzled (Fz) receptor, indukuje fosforylaci LRP 5/6 pomocí membránově vázané GSK-3 $\beta$  a CK1. Fosforylace vede k interakci Axinu s LRP 5/6, tento komplex je potom stabilizován intracelulárním Dishvelled (Dsh) proteinem (Kishida et al. 1999). Vazba Axinu na LRP 5/6 vede k rozrušení komplexu nutného ke spuštění kaskády degradace  $\beta$ -kateninu a to způsobuje jeho akumulaci v cytoplazmě a po dosažení určité koncentrace pak translokaci do jádra.  $\beta$ -katenin v jádře aktivuje transkripční faktory z rodiny TCF/LEF1 (T Cell-specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor 1) tím, že se z faktoru TCF uvolní receptor Groucho, do této doby blokující transkripci. Pak už nic nebrání v indukci exprese mnoha cílových genů, které jsou zodpovědné i za proliferaci (Cavallo et al. 1998).

Vedle standardní, kanonické, aktivace může být Wnt dráha aktivovaná také nestandardně, nekanonicky, kdy je přenos signálu nezávislý na  $\beta$ -kateninu. Nekanonických drah je v dnešní době objeveno již několik typů. Zpravidla je ligandem Wnt5a vážící se na receptor Fz nebo jiný protein, např. ROR (Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor). Další přenos signálu je ale v porovnání s kanonickou

dráhou odlišný, účastní se jej jiné proteiny a dochází k transkripci jiných genů (Oishi et al. 2003, Fukuda et al. 2008).

Tato signální dráha má významný vliv také na vývoj zubního zárodku. Wnt dráhy aktivované při odontogenezi zahrnují šest Wnt genů, *Wnt-3*, *-4*, *-5a*, *-6*, *-7b* a *10b*. Místo jejich exprese se liší, některé se exprimují v mezenchymu, jiné v epitelu. Míra exprese se v průběhu odontogeneze mění, nicméně nejvyšší aktivity dosahuje ve sklovinném uzlu (Sarkar et Sharpe 1999, Järvinen et al. 2006).



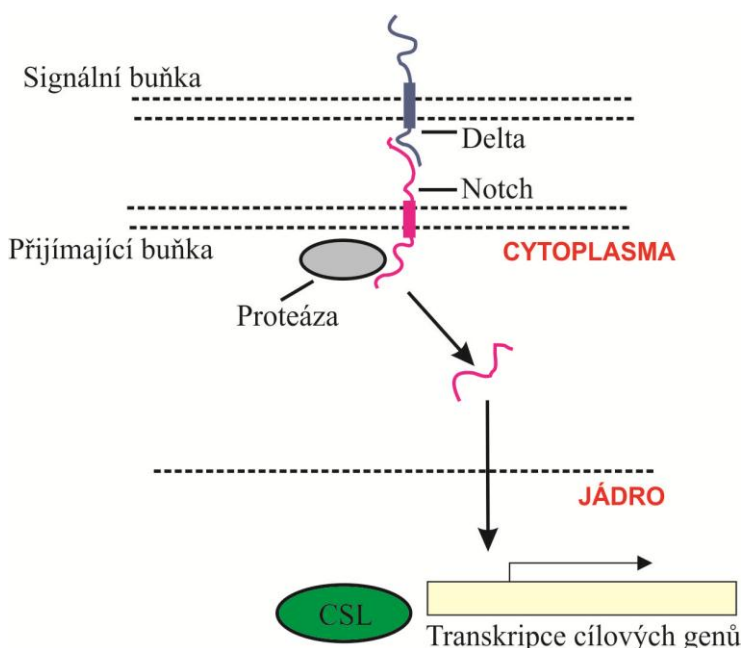
**Obr. 17: Schéma Wnt signální dráhy.** a) Kanonická Wnt signalizace bez přítomnosti Wnt ligandu b) Kanonická Wnt signalizace po navázání Wnt ligandu

### 5.5 Notch signální dráha

Tato signální dráha se vyskytuje u většiny mnohobuněčných živočichů. Receptor Notch je jednoduchý transmembránový protein a stejně tak, jako jeho ligandy Delta a Jagged (Serrate), je v průběhu odontogeneze exprimován jak v epitelu, tak i v mezenchymální tkáni. *Notch-1*, *Notch-2* a *Notch-3* geny jsou exprimovány v dentálním epitelu již v době formace laminy (Mitsiadis et al. 1997, Katsube et Sakamoto 2005).



Vazba ligandu na Notch receptor vyvolává na extracelulární doméně odštěpení intracelulární části, která se poté dostává do jádra, kde aktivuje transkripci cílových genů, které se podílejí i na proliferativních procesech (Mitsiadis et al. 1995).



**Obr. 18: Schéma Notch signální dráhy.** Navázání ligandu vyvolá odštěpení intracelulární části Notch domény, která v jádře aktivuje transkripci.

### **5.6 TNF signální dráha**

Mezi TNF superrodinu signálních molekul patří mnoho významných členů, kteří se podílejí na 2 rozdílných pochodech v mechanismu – proliferaci/diferenciaci a apoptóze. S proliferačními procesy v průběhu odontogeneze jsou spojeny Ektodysplasin-A (zahrnující 2 izoformy – EDA-A1 a EDA-A2) a RANKL ligandy.

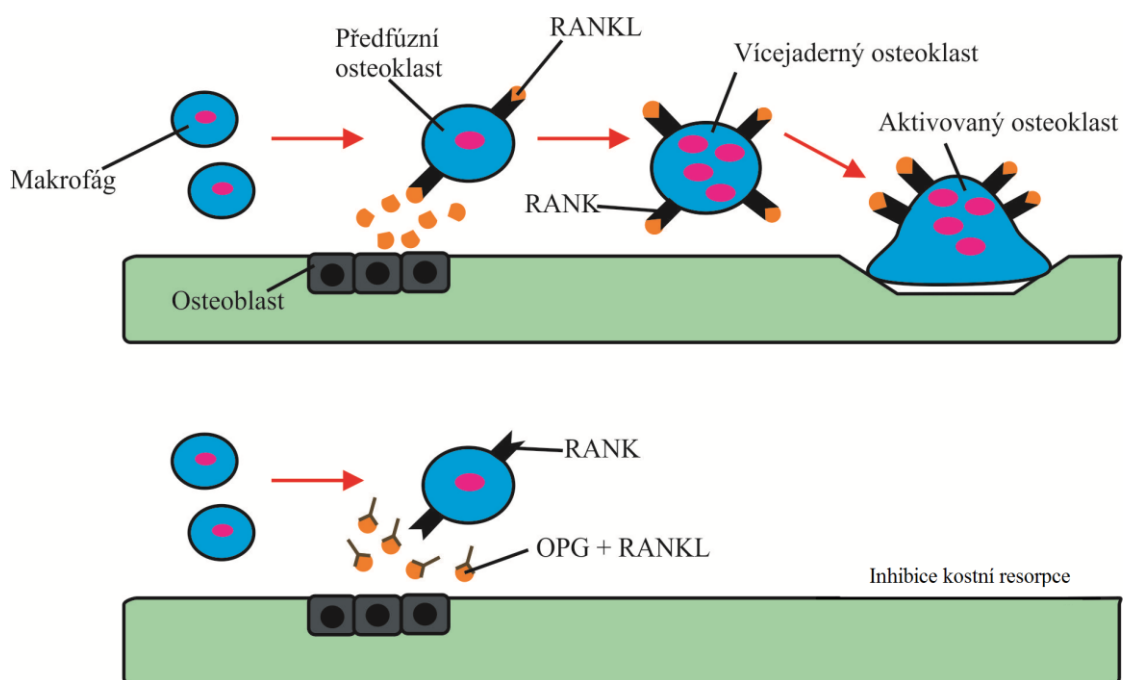
EDA-A1 se váže na receptor EDAR, který je spjat s adapter proteinem EDARADD a zahrnují aktivaci kanonické NFKB signální dráhy (Courtney et al. 2005). EDA-A2 se váže spíše na receptor EDA2R (známější jako XEDAR) a aktivuje podobnou dráhu, které nicméně nehraje tak významnou roli ve vývoji (Mikkola 2008). Myší jedinci s mutací genů pro *Eda*, *Edar* nebo *Edaradd* (spontánní mutace se označují jako *tabby*, *downless*, a *crinkled*) mají snížený počet zubů s anomální morfologií hrbolků (Courtney et al. 2005).

Během časného vývoje je EDA signální dráha důležitá pro definování odontogenních polí a počtu vytvořených zubních zárodků. Konkrétně mutace v *Eda* nebo *Edar* vyúsťují ve formaci menších zubů s častější absencí třetích molárů (Sofaer 1997). Naopak zvýšení exprese *Eda* nebo nadměrná aktivace *Edar* vede k formování

nadpočetných zubů v oblasti diastemy (Mustonen et al. 2003, Tucker et al. 2004). EDA signalizace také ovlivňuje tvar budoucího zubu. Mutace v některé ze tří složek signální dráhy má za následek snížení počtu zubních hrbolků a jejich zaoblení.

*Eda* je exprimována v orálním i dentálním epitelu během celé tvorby zubů, zatímco *Edar* a *Edaradd* jsou exprimovány ve sklovinném uzlu. Sklovinné uzly u *tabby* nebo *crinkled* mutantních myší jsou menší (Pispa et al. 1999, Ohazama et al. 2004). Ztráta exprese *Edar* u *downless* myší vede k formování sklovinného uzlu, který má prodloužený tvar (Tucker et al. 2000).

Další signální dráhou zapojenou do odontogeneze a především vývoje přilehlých kostních tkání je dráha RANK/RANKL/OPG (receptor activator of NF $\kappa$ B/RANK ligand/osteoprotegerin). Exprese *Rankl* v osifikačních centrech při časném vývoji alveolární kosti je kritickým místem zubního vývoje. Při zvýšení molekul OPG, které kompetitivní inhibicí inaktivují osteoklasty, dochází ke zpoždění zubního vývoje a hypomineralizaci zubů. (Ohazama et al., 2004). Molekuly RANKL a BMP prostřednictvím cesty transkripce *Msx2* aktivují interakci kosti se zubem, prodloužení kořene a erupce zubů (Aioub et al. 2007).

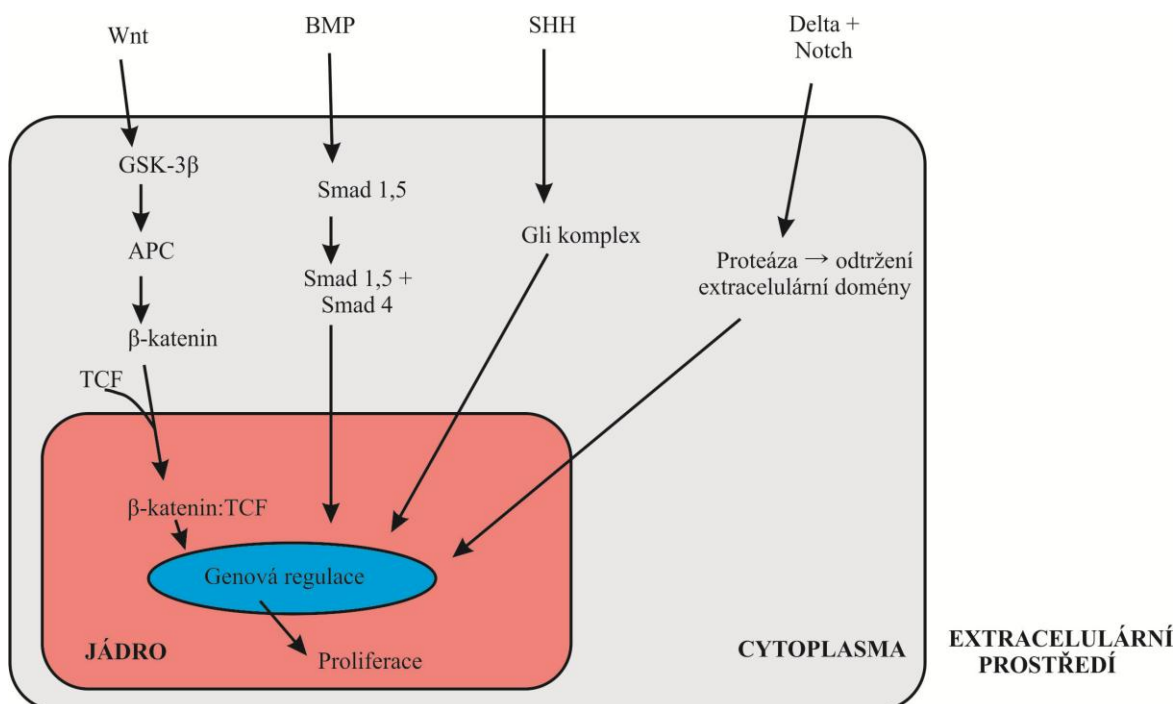


**Obr. 19: Schéma RANK/RANKL/OPG signální dráhy.** Když se OPG naváže na RANKL, dochází k inhibici RANK.

## 6. Závěr

Myši a stejně jako ostatní zuby savců se zakládají již v embryonálním období. Jedním z nepostradatelných pochodů ve vývoji jakéhokoliv orgánu, zuby nevyjímaje, je proliferace. V prenatalním období se proliferační aktivita vztahuje k epitelovým i mezenchymovým buňkám. Tyto proliferační buňky jsou kontrolovány přechodnými strukturami – sklovinnými uzly (primárním a sekundárním). Postnatálně kontrolují proliferaci 2 struktury – v korunce terciární sklovinný uzel a v oblasti kořene je to Hertwigova epitelální pochva.

Pro správný průběh odontogeneze je nutné přesné řízení vývoje na molekulární úrovni a to převážně transkripčními faktory a signálními molekulami z rodin FGF, TGF, SHH, Wnt a TNF (Obr 20). Proteiny patřící do těchto rodin se navíc uplatňují v mezibuněčných komunikacích nejenom při vývoji zubů, ale i při vývoji jiných tkání a orgánů. Jestliže dojde k porušení signalizace, dochází v méně závažných případech k tvarovým anomáliím, v závažnějším případě mohou chybět pouze některé (hypodoncie, oligodoncie) nebo všechny zuby (anodoncie). Studium vývoje zubů u myši můžeme zmapovat přesný průběh odontogeneze a získané výsledky použít v praxi pro diagnostikování i terapii vývojových anomálií.



Obr. 20: Zjednodušené znázornění signálních drah zapojených do proliferace v odontogenezi.

## **7. Použitá literatura**

1. Aioub, M., Lezot, F., Molla, M., Castaneda, B., Robert B., Goubin, G., Nefussi, J. R. et al. (2007). *Msx2*<sup>-/-</sup> transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis. *Bone*. 41: 851–859.
2. Alberts, B. et al. (2002) *The Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. 4th. ed. ISBN 0-8153-3218-1.
3. Almeida, C. V., Andrade, S. C., Saito, C. P., Ramenzoni, L. L., Line, S. R. (2010). Transcriptional analysis of the human PAX9 promoter. *J. Appl. Oral Sci.* 2010, 18(5): 482–486.
4. Bei, M., Maas, R. (1998). FGFs and BMP4 induce both *Msx1*-independent and *Msx1*-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development*. 125: 4325–4333.
5. Bitgood, M. J. and McMahon, A. P. (1995). Hedgehog and *Bmp* genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 172: 126–138.
6. Böttcher, R. T., Niehrs, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine reviews*. 26(Feb): 63–77.
7. Bullwinkel, J., Baron-Lühr, B., Lüdemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., Scholzen, T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol.* 206(3): 624–35.
8. Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., Peifer, M., Bejsovec, A. (1998). *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*. 395: 604–608.
9. Chen, Y., Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87: 553–563.
10. Cobourne, M. T. (1999). The Genetic Control of Early Odontogenesis. *Br. J. Orthod.* March. 26(1): 21–28.
11. Cobourne, M. T., Hardcastle, Z., Sharpe, P. T. (2001). Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *Journal of Dental Research* 80(11): 1974–9.

12. Cobourne, M. T., Miletich, I., Sharpe, P. T. (2007). Sonic Hedgehog Signalling during Tooth Morphogenesis, *Molecular Biology Intelligence Unit*: 69–78.
13. Coin, R., Lesot, H., Vonesch, J. L., Haikel, Y., Ruch, J. V. (1999). Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int. J. Dev. Biol.* 43(3): 261-267.
14. Cohen, J. J., Duke, R. C. (1984). Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* 132: 38-42.
15. Courtney, J. M., Blackburn, J., Sharpe, P. T. (2005). The ectodysplasin and NFκB signalling pathways in odontogenesis. *Arch. Oral. Biol.* 50: 159–163.
16. Dassule, H. R., Lewis, P., Bei, M., Maas, R., McMahon, A. P. O. D. (2000). Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 127: 4775–4785.
17. Davidson, D. (1995). The function and evolution of MsX genes: Pointers and paradoxes. *Trends Genet* 11: 405–11.
18. Fleischmannová, J., Matalová, E., Sharpe, P. T., Míšek, I., Radlanski, R. J. (2010). Formation of the Tooth-Bone Interface. *J. Dent. Res.* 89(2): 108–115.
19. Fukuda, T., Chen, L., Endo, T., Tang, L., Lu, D., Castro, J. E., Widhopf, G. F. 2nd, Rassenti, L. Z., Cantwell, M. J., Prussak, C. E., Carson, D. A., Kipps, T. J. (2008). Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 3047–3052.
20. Gaisler, J., Zima, J. (2007): *Zoologie obratlovců*. Academia. Pp. 696.
21. Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
22. Goedken, E. R., Kuriyan, J. (2005). Sliding Clamps in DNA Replication: E. coli  $\beta$ -Clamp and PCNA Structure. In Lennarz, W.J., Lane, M.D.. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Four-Volume Set, 1-4.
23. Headon, D. J., Overbeek, P. A. (1999). Involvement of a novel TNF receptor homologue in hair follicle induction. *Nat. Genet.* 22: 370–374.
24. Heldin, C. H., Miyazono, K., Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 390(6659): 465–71.
25. Hu, G., Vastardis, H., Bendall, A. J., Wang, Z., Logan, M., Zhang, H., Nelson, C., Stein, S., Greenfield, N., Seidman, Ch. E., Seidman, J. G., Abate-Shen, C. (1998).

- Haploinsufficiency of MSX1: a Mechanism for Selective Tooth Agenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 18(10): 6044–6051.
26. Chlastáková, I., Lungová, V., Wells, K., Tucker, A. S., Radlanski, R. J., Míšek, I., Matalová, E. (2011). Morphogenesis and bone integration of the mouse mandibular third molar. *Eur. J. Oral. Sci.* 119: 265–274.
  27. Ivens, A., Flavin, N., Williamson, R., Dixon, M., Bates, G., Buckingham, M., et al. (1990). The human homeobox gene HOX7 maps to chromosome 4p16.1 and may be implicated in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Hum. Genet.* 84: 473–6.
  28. James, M. J., Järvinen, E., Wang, X. P., Thesleff, I. (2006). Different roles of Runx2 during early neural crest-derived bone and tooth development. *J. Bone Miner. Res.* 21: 1034–44.
  29. Järvinen, E., Salazar-Ciudad, I., Birchmeier, W., Taketo, M. M., Jernvall, J., Thesleff, I. (2006). Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103(49): 18627–32.
  30. Jebavý, L. a kol. (2011). Chov laboratorních zvířat. Česká zemědělská univerzita v Praze. 1. vydání. 50-58. ISBN 978-80-213-2176-2.
  31. Jernvall, J., Kettunen, P., Karavanova, I., Martin, L. B. and Thesleff, I. (1994). Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 463-469.
  32. Jernvall, J., Åberg, T., Kettunen, P., Thesleff, I. (1998). The life history of an embryonic signaling center: BMP4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development.* 125(2): 161–169.
  33. Jho, E. H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C. K., Freund, J. N., Costantini, F. (2002). Wnt/ $\beta$ -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22(4): 1172–1183.
  34. Jones, F. S., Kioussi, C., Copertino, D. W., Kallunki, P., Holst, B. D., Edelman, G. M. (1997). Barx2, new homeobox gene of the Bar class, is expressed in neural and craniofacial structures during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 2632–7.
  35. Junqueira, C. L., Carneiro, J., O. Kelley, R. (1997). *Základy histologie*. 1. v ČR vydání. Jinočany, H & H, 1997. Pp. 502. ISBN 80-85787-37-7.

36. Kapadia, H. Mues, G., D'Souza, R. (2007). Genes affecting tooth morphogenesis. *Orthod. Craniofac Res.* 10(3): 105–113.
37. Katsube, K., Sakamoto, K. (2005). Notch in vertebrates--molecular aspects of the signal. *Int J. Dev. Biol.* 49(2-3): 369–374.
38. Kavitha, B., Priyadarshini, V., Sivapathasundharam, B., Saraswathi, T. R. (2010). Role of genes in oro-dental diseases, *Indian J. Dent. Res.* 21(2): 270-274.
39. Keränen, S. V., Kettunen, P., Lberg, T., Thesleff, I., Jernvall, J. (1999). Gene expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Dev. Genes. Evol.* 209(8): 495-506.
40. Kishida, S., Yamamoto, H., Hino, S., Ikeda, S., Kishida, M., Kikuchi, A. (1999). DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Mol Cell Biol.* 19: 4414–4422.
41. Komiya, Y., Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 4: 68-75.
42. Koussoulakou, S. D., Margaritis L. H., Koussoulakos S. L. (2009). A Curriculum Vitae of Teeth: Evolution, Generation, Regeneration, *Int. J. Biol. Sci.* 5: 226–243.
43. Kratochwil, K., Dull, M., Farinas, I., Galceran, J., Grosschedl, R. (1996). Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev.* 10(11): 1382–94.
44. Krejčí, P., Fleischmannová, J., Matalová, E. (2007). Molekulární podstata hypodontie. *Ortodoncie.* 1: 33–39
45. Lungová, V., Radlanski, R. J., Tucker, A. S., Renz, H., Míšek, I. and Matalová, E. (2011). Tooth-bone morphogenesis during postnatal stages of mouse first molar development. *J. Anat.* 218: 699–716.
46. Lesot, H., Vonesch, J. I., Peterka, M., Turecková, J., Peterková, R. and Ruch, J. V. (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. II. Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth. *Int. J. Dev. Biol.* 40: 1017–1031.
47. Lin, C. R., Kioussi, C., O'Connell, S., Briata, P., Szeto, D., Liu, F., Izpisua-Belmonte, J. C., Rosenfeld, M. G. (1999). Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature.* 401: 279–282.
48. Lin, D., Huang, Y., He, F., Gu, S., Zhang, G., Chen, Y. and Zhang, Y. (2007), Expression survey of genes critical for tooth development in the human embryonic tooth germ. *Dev. Dyn.*, 236: 1307–1312.

49. Lockett W. P. (1993). Ontogenetic staging of the mammalian dentition, and its value for assessment of homology and heterochrony. *J. Mammal. Evol.* 1: 269–282.
50. Luukko, K., Løes, S., Furmanek, T., Fjeld, K., Kvinnsland, I. H., Kettunen P. (2003). Identification of a novel putative signaling center, the tertiary enamel knot in the postnatal mouse molar tooth. *Mech. Develop.* 120: 270–276.
51. Maas, R., Bei, M. (1997). The genetic control of early tooth development. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 8(1): 4–39.
52. MacKenzie, A. L., Leeming, G. L., Jowett, A. K., Ferguson, M. W. J., and Sharpe, P. T. (1991). The homeobox gene Hox 7.1 has specific regional and temporal expression patterns during early murine craniofacial embryogenesis, especially tooth development in vivo and in vitro. *Development (Cambridge, UK)* 111: 269–285.
53. Macholán, M. (1997). Myš domácí. *Vesmír* 76(4): 208–21.
54. Malínský, J., Malínská, J., Michalíková, Z. (2005). *Morfologie orofaciálního systému pro studenty zubního lékařství*, 1. vydání, Pp. 119-126. ISBN 80-244-1062-1.
55. Matalová, E., Fleischmannová, J., Sharpe, P. T., Tucker, A. S. (2008). Tooth agenesis: from molecular genetics to molecular dentistry, *J. Dent. Res.* 87(7): 617–623.
56. McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B. et al. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev.* 12(10): 1438–52.
57. Mikkola, M. L. (2008). TNF superfamily in skin appendage development. *Cytokine Growth Factor. Rev.* 19: 219–230.
58. Mina, M., Kollar, E. J. (1987). The induction of odontogenesis in non-odontogenic mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch. Oral Biol.* 32: 123–127.
59. Mitsiadis, T., Lardelli, M., Lendahl, U. and Thesleff, I. (1995) Expression of Notch 1, 2 and 3 is regulated by epithelial–mesenchymal interactions and retinoic acid in the developing mouse tooth and associated with determination of ameloblast cell fate. *J. Cell Biol.* 130: 407–418.
60. Mitsiadis, T. A., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., Thesleff, I. and Lendahl, U. (1997) Mouse *Serrate1* (*Jagged-1*): expression in the developing tooth is regulated



- by epithelial–mesenchymal interactions and fibroblast growth factor-4. *Development* 124: 1473–1483.
61. Monreal, A. W., Ferguson, B. M., Headon, D. J., Street, S. L., Overbeek, P. A., Zonana, J. (1999). Mutations in the human homologue of mouse *dl* cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat. Genet.* 22: 366–369.
  62. Mustonen, T., Pispa, J., Mikkola, M. L., Pummila, M., Kangas, A.T., Pakkasjarvi, L., Jaatinen, R., Thesleff, I. (2003) Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1. *Dev. Biol.* 259: 123–136.
  63. Neubóser, A., Peters, H., Balling, R., Martin, G. R. (1997). Antagonistic interaction between FGF and BMP signaling pathways: A mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* 90: 247–55.
  64. Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G. C., Mundlos, S., Shibuya, H., Takada, S., Minami, Y. (2003). The receptor tyrosine kinase *Ror2* is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells.* 8: 645–654.
  65. Ogawa, T., Kapadia, H., Wang, B., D'Souza R. N. (2005). Studies on Pax9-Msx1 protein interactions. *Arch. Oral. Biol.* 50(2): 141–145.
  66. Ohazama, A., Courtney, J. M., Tucker, A. S., Naito, A., Tanaka, S., Inoue, J., Sharpe, P. T. (2004). *Traf6* is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Dev Dyn.* 229: 131–135.
  67. Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R., Selby, P. B., Owen, M. J. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 89: 765–771.
  68. Peterková, R., Lesot, H., Vonesch, J., Peterka, M., Ruch, J. V. (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. I. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *Int. J. Dev Biol.* 40: 1009–1016.
  69. Peters, H., Balling, R. (1999). Teeth. Where and how to make them. *Trends in Genetics.* 15(2): 59–65.
  70. Pispa, J., Jung, H. S., Jernvall, J., Kettunen, P., Mustonen, T., Tabata, M. J., Kere, J., Thesleff, I. (1999). Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Dev Biol.* 216: 521–534.

71. Qiu, M., Bulfone, A., Ghattas, I., Meneses, J. J., Christensen L., Sharpe, R. T., Presley, R., Pedersen, R. A. and Rubenstein J. L. (1997). Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: Mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev. Biol.* 185: 165–184.
72. Rahmanzadeh, R., Hüttmann, G., Gerdes, J., Scholzen, T. (2007). Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif.* 40(3): 422–30.
73. Ren, Y., Savill, J. (1998) Apoptosis: the importance of being eaten. *Cell Death Differ.* 5: 563-568.
74. Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., Nusse, R. (1987). The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell.* 50: 649–657.
75. Rossant, J., Tam, P. P. L. (2002). *Mouse development: Patterning, Morphogenesis and Organogenesis.* Academic Press. Pp. 422-481. ISBN: 978-0-12-597951-1.
76. Sadler, T. W. (2011). *Langmanova lékařská embryologie.* 10. vydání. Praha, Grada. Pp. 432. ISBN 978-80-247-2640-3.
77. Sarkar, L., Sharpe, P. T. (1999). Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech. Dev.* 85: 197–200.
78. Satokata, I., Maas, R. (1994). Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat. Genet.* 6: 348–356.
79. Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S., Peters, H., Tang, Z., Maxson, R., Maas, R. (2000). Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat. Genet.* 24: 391–395.
80. Scholzen, T., Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182(3): 311–22.
81. Sofaer, J. A. (1997) The teeth of the “sleek” mouse. *Arch. Oral. Biol.* 22: 299–301.
82. Šetková, J., Lesot, H., Matalová, E., Witter, K., Matulová, P., Míšek, I. (2006). Proliferation and apoptosis in early molar morphogenesis – voles as model in odontogenesis. *Int J. Dev. Biol.* 50: 481–489.
83. Šmarda, J., Dostál, J., Pantůček, R., Růžičková, V. and Koptíková, J. (2005). *Metody molekulární biologie.* 1. vydání, MU Brno. 194. ISBN 80-210-3841-1.

84. Ten Cate, A. R. (1998). Oral histology: development, structure, and function. St. Louis: Mosby. pp. 81–102. ISBN 0-8151-2952-1.
85. Thesleff, I., Sharpe, P. (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mech. Dev.* 67: 111-123.
86. Thesleff, I. (2003). Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J. Cell Sci.* 116: 1647–1648.
87. Thesleff, I. (2006). The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am. J. Med. Genet. Part. A.* 140A: 2530-2535.
88. Thomas, B. L., Liu, J. K., Rubenstein, J. L., Sharpe, P. T. (2000). Independent regulation of *Dlx2* expression in the epithelium and mesenchyme of the first branchial arch. *Development.* 127: 217-24.
89. Tucker, A.S., Headon, D. J., Courtney, J. M., Overbeek, P., Sharpe, P.T. (2004). The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Dev. Biol.* 2004. 268: 185–194.
90. Tucker, A. S., Headon, D. J., Schneider, P., Ferguson, B. M., Overbeek, P., Tschopp, J., Sharpe, P. T. (2000). Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development.* 127: 4691–4700.
91. Vaahtokari, A., Åberg, T., Jernvall, J., Keränen, S. and Thesleff, I. (1996). The enamel knot as a signaling centre in the developing mouse tooth. *Mech. Dev.* 54(1): 39–43.
92. Vacek Z (2006). Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka. Grada Publishing Praha. Pp. 255. ISBN 80-247-1267-9.
93. Viriot, L., Peterková, R., Vonesch, J., Peterka, M., Ruch, J. V., Lesot, H. (1997). Mouse molars morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. III. Spatial distribution of mitoses and apoptoses up to bell-staged first lower molar teeth. *Int. J. Dev. Biol.* 41: 679–690.
94. Wang, X. P., Thesleff, I. Tooth Development, In: Unsicker, K.; Kriegstein, K.: Cell signaling and growth factors in development: from molecules to organogenesis. Weinheim. 2006. Pp. 719-754. ISBN 978-3-527-31034-0.
95. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. and Currie, A. R. (1980). Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251–306.
96. Wilkie, A. O. M., Morriss-Kay, G. M., Jones, E. Y. and Heath, J. K. (1995). Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Curr. Biol.* 5: 500–507.

97. Wilkinson, D. G., Bhatt, S. and McMahon, A. P. (1989) Expression pattern of the FGF-related proto-oncogene int-2 suggests multiple roles in fetal development. *Development*. 105: 131–136.
98. Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P. and Meyerowitz, E. (1998). *Principles of Development*. Oxford: Curr. Biol. Ltd, Oxford University Press.
99. Zeng, L., Fagotto, F., Zhang, T., Hsu, W., Vasicek, T. J., Perry, W. L., Lee, J. J., Tilghman, S. M., Gumbiner, B. M., Costantini, F. (1997). The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell*. 90: 181–192.
100. Zhao, Y., Guo, Y. J., Tomac, A. C., Taylor, N. R., Grinberg, A., Lee, E. J. (1999). Isolated cleft palate in mice with a targeted mutation of the LIM homeobox gene Lhx8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96:15002-6.

**Internetové zdroje:**

- 101.URL1: Internetová encyklopedie savců. <http://www.savci.upol.cz/hlodavci.htm>  
[cit. 20.6.2012]
- 102.URL2: Jelínek, R., Dostál M., Likovský, Z., Halašková M., Maňáková, E., Peterka, M., Peterková, R., Titlbach, M., Velický, J., Zemanová, Z. Skripta histologie. Supertext v síti 3. LF UK. <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/26.htm> [cit. 16.7.2012]
- 103.URL3: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PAX9> [cit. 6.7.2012]
- 104.URL4: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSX1> [cit. 6.7.2012]
- 105.URL5: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/RUNX2> [cit. 6.7.2012]
- 106.URL6: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/AXIN2> [cit. 6.7.2012]