

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra zoologie**

**Bakalářská práce**



**SIGNÁLNÍ DRÁHY APOPTÓZY V ODONTOGENEZI**

**Olomouc 2012**

**Sláva Špiláková**

Prohlašuji , že jsem bakalářsku práci na téma „Signální dráhy apoptózy v odontogenezi,, vypracovala samostatně s použitím odborné literatury a pramenů uvedených v seznamu literatury .

V Olomouci dne.....

## Poděkování

Touto cestou bych rada poděkovala své vedoucí bakalářské práce RNDr. Vlastě Lungové za poskytnutí studijní literatury, trpělivost, odborné vedení, cenné rady a připomínky při tvorbě bakalářské práce. Také bych rada poděkovala Laboratoři embryologie živočichů Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR v.v.i. v Brně za grantovou podporu této práce GA ČR P502/12/1285.

## **ABSTRAKT**

Apoptóza je mechanismus programované buněčné smrti hrající významnou roli jak v embryonálním tak v postnatálním vývoji. Účastní se morfogeneze, histogeneze a udržování homeostázy mnohobuněčných organismů. Proces programované buněčné smrti spouští dvě hlavní signální dráhy – receptorová a mitochondriální. Receptorová signální dráha je zprostředkována přes receptor smrti lokalizovaný na zevní cytoplazmatické membráně. Na tento receptor se naváže ligand a poté se vytvoří proteinový komplex, který aktivuje iniciátorové a později efektorové kaspázy. Mitochondriální dráha se účastní především proteiny z rodiny Bcl-2 rodiny. Tyto proteiny se dělí na proapoptotické a antiapoptotické a jsou zodpovědné za permeabilitu mitochondriální membrány. Apoptózu vyvolávají proapoptotické proteiny této rodiny, které v důsledku snížení propustnosti membrány umožní uvolnění cytochromu c z mitochondrie do cytosolu. Po vytvoření komplexu v cytosolu se spouští iniciátorové a poté efektorové kaspázy. Obě tyto dráhy vedou k aktivaci efektorové kaspázy-3 a následně k destrukci buňky.

V posledních letech byl proces apoptózy intenzivně zkoumán ve vývoji zubu. Experimenty se prováděly na myších zubních zárodcích. Během vývoje myších M1 molárů apoptóza doprovází celý vývoj zubů a účastní se i přestavby okolní kostní tkáně. Proces apoptózy byl zaznamenán v regresi diastemálních primordiích, při odstranění buněk sklovinných uzlů, v odontogenezi a amelogenezi, při vývoji kořene a integraci zubů do alveolární kosti. Apoptóza ve vývoji zubů je zprostředkována přes mitochondriální signální dráhu a ze silnější receptorovou signální dráhou přes receptor smrti Fas.

Cílem této práce bylo přispět k pochopení role apoptózy v embryonálním a postnatálním vývoji myšího moláru M1 a vytvoření přehledu signálních dráh aktivujících apoptózu.

**Klíčová slova** : apoptóza, odontogeneze, vnější signální dráha, vnitřní signální dráha, kaspázy

## **ABSTRACT**

Apoptosis is programmed cell death mechanism, playing essential role in both embryonic and postnatal development. Participates in morphogenesis, histogenesis and homeostasis of multicellular organisms. The process of programmed cell death, triggers two major signaling pathway - receptor and mitochondrial. Receptor pathway is mediated through death receptor located on the outer cytoplasmic membrane. The receptor binds ligand and then creates a protein complex that activates the initiators and effector caspases later. Mitochondrial pathway involved mainly proteins Bcl-2 family. These proteins are subdivided into proapoptotic and antiapoptotic and answering the permeability of mitochondrial membranes. The apoptosis induces proapoptotic proteins of this family, which in the case of reduction of membrane permeability enables releasing to cytochrome c mitochondria into the cytosol. After creating the complex in the cytosol is triggered initiators and effector caspases then. Both pathways lead to the activation of effector caspases-3 and subsequently to the destruction of cells.

In recent years the process of apoptosis was studied intensively in the development of the tooth. Experiments were performed on nucleus of mice tooth . During the development of mouse molars M1 apoptosis is accompanied by the development of teeth and even participate in the reconstruction of the surrounding bone tissue. The process of apoptosis was observed in the regression diastemálních primordia, cells in the removal enamel knots and in odontogenesis amelogenezi, development and integration of roots of teeth to alveolar bone. Apoptosis in tooth development is mediated through the mitochondrial signaling pathway, and enhanced receptor signaling pathway via the death receptor Fas.

The aim of this work was to contribute understanding of apoptosis's role in embryonic and postnatal development of mouse molars M1 and creating summary of signaling pathways activating apoptosis.

**Key words:** apoptosis, odontogenesis, external signal pathway, the internal pathway, caspase

## **Seznam skratek:**

- Apaf-1 - Apoptotic Protease Activating Factor 1 – faktor aktivující apoptické proteázy
- Bcl-2 - B-cell lymphoma gene-2 – B- buněčná lymphoma gen
- BID – BH3 interacting domain death agonist – proapoptotický člen proteinové rodiny Bcl-2
- BH domain - Bcl-2 Homology domain – Bcl-2 homologní doména
- CAD – Caspase Activated DNase
- CARD - Caspase Recruitment Domain
- CRD - Cysteine Rich Domain – doména bohatá na cystein
- DD - Death Domain – doména smrti
- DcR1/2 – Decoy receptor 1/2 – matoucí receptor 1/2
- DED - Death Effector Domain – efektorová doména smrti
- DISC - Death Inducing Signalling Complex – smrt indukující signální komplex
- DR3/4/5 - Death Receptor3/4/5 – receptor smrti3/4/5
- FADD – Fas Associated Death Domain – Fas asociovaná doména smrti
- HERS -Hertwig's epithelial root sheath – Hertwigova epiteliální kořenová pochva
- IAP - Inhibitor of Apoptosis Protein – inhibitor apoptotického proteinu
- NF- $\kappa$ B - Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells
- NIAP – Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein – neuronální apoptotický inhibitor proteinu
- NK- Natural killers – přirozeně zabíjející buňky
- PCD – Programmed cell death – programovaná buněčná smrt
- PEK – Primary enamel knot - primární sklovinný uzel
- SMAC/DIABLO - Second Mitochondria Derived Activator of Caspases/Direct
- SEK- Secondary enamel knot – sekundární sklovinný uzel
- tBid – truncated Bid – zkrácený protein BID
- TEK – tertiary enamel knot – terciální sklovinný uzel
- TNF - Tumor Necrosis Factor – tumor nekrotizující faktor
- TNFRs - Tumor Necrosis Factor Receptor – receptor pro tumoru nekrotizující faktor

TRADD - TNF Receptor Associated Death Domain – TNF receptor asociovaná doména smrti

TRAF - TNF Receptor Associated Factor – TNF receptor asociovaný faktor

XIAP - X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein – X- inhibitor apoptického proteinu

# OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2. APOPTÓZA.....</b>	<b>10</b>
2.1 Apoptóza ve vývoji organismu.....	10
2.2 Charakteristické znaky apoptozy a nekrózy.....	11
2.3 Aktivace apoptózy.....	13
2.4 Kaspázy.....	13
<b>3. SIGNALNÍ DRÁHY APOPTÓZY.....</b>	<b>15</b>
3.1 Vnější signální dráha apoptózy.....	15
3.1.1 Receptor smrti.....	16
3.2 Nereceptorová signální dráha.....	18
3.2.1 Hlavní úloha mitochondrií.....	19
3.2.2 Rodina Bcl-2 proteinu.....	20
3.3 Shrnutí signálních dráh apoptózy v buňce.....	23
<b>4. APOPTÓZA V ODONTOGENEZI.....</b>	<b>24</b>
4.1 Apoptóza v odontogenezi a její význam.....	24
4.2 Apoptóza ve sklovinných uzlech.....	24
4.3 Apoptóza v diastemálních zubních primordiích.....	26
4.4 Apoptóza v ameloblastech a odontoblastech.....	27
4.5. Apoptóza při vývoji kořene.....	27
4.6. Apoptózaa při integraci zubů do alveolární kosti.....	28
4.7 Signální dráhy apoptózy v odontogenezi.....	29
4.8 Porucha apoptózy v odontogenezi.....	30
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>33</b>
<b>6. SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>34</b>



# 1. ÚVOD

Pro správný vývoj je důležitá rovnováha mezi vznikem nových buněk, jejich diferenciací a odstranění přebytečných a nepotřebných buněk. Na tomto procesu se účastní řada genů, jejichž aktivace v buňce je zodpovědná za všechny tyto procesy.

Smrt buňky je tedy důležitý proces pro udržení rovnováhy organismu. Buňka může zaniknout dvěma odlišnými způsoby- apoptózou a nekrotózou. Zatímco při nekrotóze buňky odumírají z důvodu poškození např. pro nedostatek živin, apoptózou buňky umírají do jisté míry dobrovolně. Označují se také za buněčnou sebevraždu, protože buňka se v tomto případě na své smrti aktivně účastní.

Během několika let byl proces apoptózy zkoumán na vývoji hlodavčích zubů. Tyto organismy vykazují značnou podobnost s lidskou denticí. Předpokládá se, že apoptóza ve vývoji zubů je zodpovědná za určení tvaru zubů, jejich velikosti a umístění v čelisti. Přesné časoprostorové rozložení apoptotických buněk v průběhu různých vývojových stádií zubů je známé. Ale molekulární mechanismy spouštějící proces apoptózy nejsou ještě podrobně prozkoumány.

Cílem této práce bylo zpracovat literární rešerši na téma signálních dráh aktivujících apoptózu buněk během prenatálního i postnatálního vývoje myších M1 molárů a navázat tak na přehledné studie publikované v literatuře (Matalová et al., 2004, Matalová et al., 2012).

## 2. APOPTÓZA

### 2.1 Apoptóza ve vývoji organismu

Termín „apoptóza“ již ve starověku používal Hippokratés či Galénos pro označení „opadávání listu ze stromů“ nebo ve smyslu „plešatění či řídnutí“ kostí nebo „odpadávání strupu“ (Nijhawan et al., 2000).

Proces apoptózy byl však poprvé popsán až v devatenáctém století. V roce 1842 byl německý přírodovědec Carl Vogt pravděpodobně prvním, kdo popsal základní mechanismus programované buněčné smrti při přeměně pulce v žábu, kdy buňky ocásku pulce odumřou předurčeným způsobem (Dvorská et al., 2008). O pár let později v roce 1885 se procesem apoptózy podrobněji zabýval i německý cytogenetik Waltherem Flemmingem, avšak v tomto období se stala centrem pozornosti fagocytóza a proces apoptózy zůstal neprozkoumaný (Paweletz et al., 2001). Vědci se opět začali zabývat programovanou buněčnou smrtí až v druhé polovině dvacátého století, kdy v roce 1972 Kerr, Wyllie a Currie popsali buněčnou smrt jako jev, který je důležitý pro regulaci počtu buněk v organismu a podílí se na udržování homeostázy (Kerr et al., 1972). Ve 21. století se apoptóza stala hlavním objektem intenzivního zkoumání a pochopení jejího mechanismu. V roce 2002 obdrželi Sydney Brenner, H. Robert Horvitz a John E. Sulston Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství za výzkum v oblasti genetické regulace vývoje orgánů a programované buněčné smrti (Dvorská et al., 2008).

Programovaná buněčná smrt hraje významnou úlohu v embryogenezi, morfogenezi, histogenezi a udržování homeostázy mnohobuněčných organismů (Matalova et al., 2004, Doseff, 2004). V embryonálním vývoji savců má apoptóza důležité uplatnění např. ve vývoji končetin, zejména v procesu separace prstů – digitalizace. Porucha programované buněčné smrti při formování prstů je spojená se syndaktyliemi, kdy dochází k potlačení apoptózy prostřednictvím inhibitoru blokujícího aktivitu kaspáz (Milligan et al., 1995). V pozdějších fázích embryonálního vývoje je programovaná buněčná smrt zapojena do formování

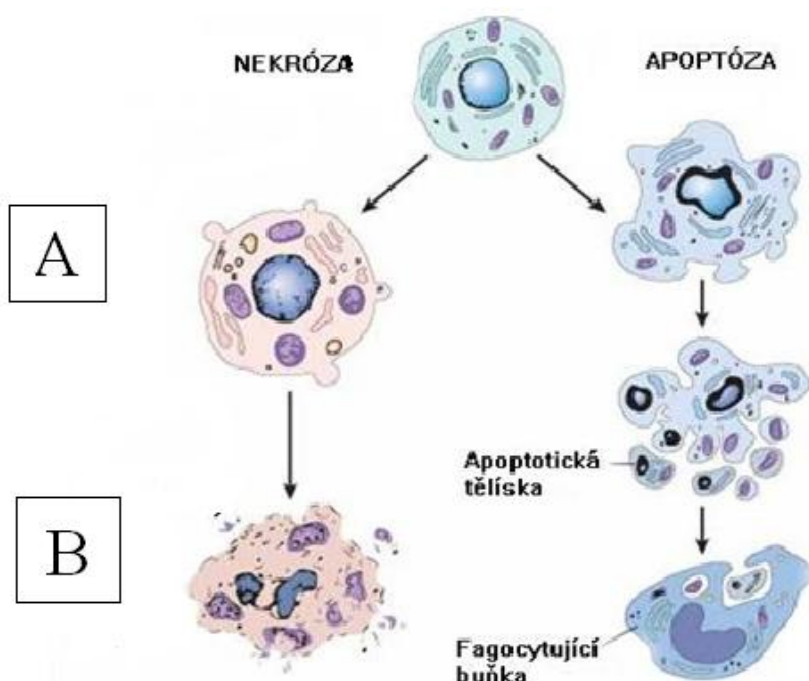
struktur a orgánových systémů (Jacobson et al., 1997). Například při vývoji srdce byla apoptóza pozorovaná v místech připojení koronárních artérií k aortě (Eralp et al., 2005). Při vývoji nervové soustavy podléhá předčasné smrti asi polovina neuronů. (Doseff 2004, Meier et al., 2002, Barres et al., 1992). Apoptóza má své uplatnění i při gonádogenezi a gametogenezi. U mužů je apoptózou odstraněn Müllerův kanálek a u žen stejným způsobem Wolfův kanálek (Lee et al. 1998). U obou pohlaví zanikají apoptózou protonefridiální trubice (Lee et al., 1998). Za fyziologických podmínek se apoptóza účastní při dozrávání vajíček a spermií.

## **2.2 Charakteristické znaky apoptózy a nekrózy**

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt (PCD), je přísně regulovaný proces smrti buňky (Doseff, 2004). Účastní se vytváření nových struktur, udržování žádoucího množství buněk a eliminace nepotřebných nebo zhoubných buněk (Jacobson et al., 1997). Stejně jako buněčná proliferace apoptóza zahrnuje sled biochemických procesů vedoucích k typickým změnám vzhledu buňky (Kerr et al., 1972, Doseff 2004). Charakteristickými morfologickými znaky apoptotických buněk je degradace cytoskeletu, následná změna tvaru cytoplazmatické membrány, smrštění buňky, fragmentace buněčného jádra štěpením DNA, kondenzace chromatinu, rozpad jádra, sevřknutí cytoplazmy a ztráta objemu buňky (Doseff, 2004). Proces je zakončen tvorbou apoptotických tělísek, což jsou membránou ohraničené buněčné fragmenty. Apoptotická tělíška na svém povrchu vytváří látky např. fosfatidylserin (Martin et al., 1995), které ji označí, aby mohla být pohlcena okolními buňkami nebo buňkami imunitního systému (profesionální fagocyty) (Savill J, et al 2003). Dochází tak k šetrnému odstranění zbytku buňky bez zánětlivého procesu (obr.1).

Nekróza je patologický děj, který postihuje víceméně náhodné buňky, jež byly vystavené mechanickým, chemickým nebo tepelným vlivům. Mohou ji také vyvolat virové infekce, bakteriální toxiny či náhlé vyčerpání buněčných energetických zásob. Při nekróze dochází k narušení integrity cytoplazmatické membrány, což způsobuje narušení rovnováhy vnitřního prostředí buňky. Narušení této rovnováhy vede

k objemovým změnám buňky nebo organel. Výsledkem tohoto procesu je enzymatické poškození buňky a její rozpad, čímž se celé vnitřní prostředí uvolní do okolí. Nekróza je obvykle doprovázena zánětem (Savill, 1997) (obr.1). Hlavním rozdílem mezi nekrotickou a apoptotickou smrtí je fakt, že při nekrotické smrti je buňka pasivní obětí, na rozdíl od apoptózy kde je buňka aktivním účastníkem. Vynakládá dokonce vlastní energii na to, aby dosáhla vlastního zániku (Zamzami a Kroemer, 2001). Zda buňka zemře nekrotickou nebo apoptotickou, závisí zčásti na faktorech zahrnujících signální specifika smrti buňky, fyziologické prostředí, stav tkáně a stadium vývoje buňky (Elmore, 2007).



**Obr. 1. Schéma nekrotické a apoptotické smrti buňky** Převzato : Cancer 1994; 73: 2013-26/, A :Při nekróze buňka bobtná (zvětšuje svůj objem), zatímco při apoptóza se scvrkává. B :Následkem nekrózy je vylití cytoplazmy z buňky do okolí, zatímco při apoptóze se vytváří tzv. apoptotická tělíska, které jsou fagocytovány.

## **2.3 Aktivace apoptózy**

Apoptózu spouští složitá soustava různých látek. Tyto látky mohou být mimobuněčného nebo vnitrobuněčného původu. Z mimobuněčných molekul mohou apoptózu aktivovat toxiny (Popov et al., 2002), hormony nebo růstové faktory (glukokortikoidy, thyroïdní hormony, TNF, TGF1), oxid dusnatý (Brüne et al., 2003, Chaloupka, 1996) nebo cytokininy. Tyto látky buď pronikají přímo do buňky nebo spouští biochemickou kaskádu z vnější části cytoplazmatické membrány. Vnitrobuněčná cesta je spouštěná ve chvíli, kdy je buňka v jakékoliv formě stresu, jako je tepelný stres, radiace, nedostatek živin, virová infekce, nedostatek kyslíku či zvýšený obsah vápníkových iontů uvnitř buňky. Oba typy látek aktivující apoptózu jsou zodpovědné za aktivaci proteáz zvaných kaspázy. Díky aktivaci kaspáz můžeme pozorovat charakteristické morfologické změny v umírajících buňkách.

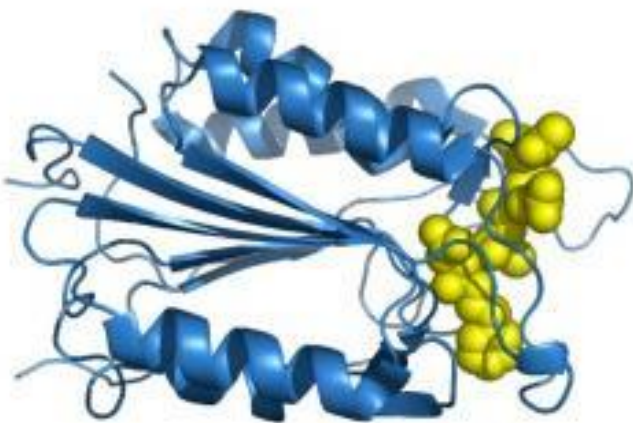
## **2.4 Kaspázy**

Kaspázy jsou klíčové komponenty zapojené do celého procesu apoptózy. Jedná se o proteiny rodiny cysteinových proteáz, které ve svých substrátech štěpí specificky kyselinu asparagovou (Riedl a Shi, 2004). U savců bylo dosud zjištěných 15 kaspáz (Kuranaga, 2011; Lamkanfi et al, 2007), ne všechny se však účastní procesu apoptózy (Riedl a Shi, 2004). Mezi neapoptotické kaspázy patří např. kaspázy-1, -4, a -5, které se účastní zánětlivých procesů, nebo kaspáza-8 spolu s FADD napomáhá při vývoji cév a diferenciaci makrofágů (Indran et al., 2011). Apoptotické kaspázy dělíme na dva typy: iniciátorové apoptotické kaspázy (-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) a efektorové (výkonné) apoptotické kaspázy (-3, -6, -7). Iniciátorové kaspázy se podílejí na přenosu signálu a aktivačním štěpení efektorových kaspáz zodpovídajících za zánik buňky. Obsahují buď efektorovou doménu smrti DED (Death Effector Domain) (kaspázy-8, -9) nebo tzv. doménu CARD (Caspase Recruitment Domai). Obě domény slouží ke zprostředkování interakce kaspáz s různými adaptarovými molekulami (kaspázy-2, -9). Efektorové kaspázy (-3, -6, 7) jsou aktivované iniciačními kaspázami a jsou odpovědné za vznik

typických morfologických znaků apoptózy a za samotný zánik buňky. Mají tedy velký vliv na strukturu a životní funkce buňky (Taylor et al., 2008).

Kaskáda kaspáz může být spuštěna dvěma odlišnými cestami. Vnější cestou apoptózy zprostředkovanou přes receptor smrti, nebo vnitřní (mitochondriální cestou apoptózy). Mitochondriální dráha zahrnuje aktivaci pro-apoptotických faktorů jako Bax, které patří mezi antagonisty apoptotických proteinů Bcl-2 rodiny (Zimmermann et al., 2001). Obě tyto dráhy vedou v konečném důsledku k aktivaci kaspázy-3, která štěpí další efektorové kaspázy. Dochází tak k typickým biochemickým a morfologickým změnám charakteristických pro apoptózu.

Buňky obsahují také přírodní inhibitory kaspáz, které blokují aktivitu apoptózy. Jedná se o proteiny z rodiny IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) (Shi, 2002). V současné době je známo osm savčích proteinů z této rodiny: (Shi, 2002) XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein), c-IAP1, c-IAP2, MI-IAP/Livin, Iip2, NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein), Bruce/Apollon a Survivin. Proteiny se vážou na kaspázy-3, -7, -9. Kaspáza-9 je inhibovaná proteinem XIAP (Salvesen a Duckett, 2002), a kaspázy -3 a -7 proteiny XIAP, c-IAP1, c-IAP2 a NAIP (Maier et al., 2002). Proteiny z rodiny IAP inhibují efektorové kaspázy odlišným způsobem jako iniciační (Huang et al., 2001). U efektorové kaspázy se do aktivního místa váže XIAP a zabrání tak navázání substrátu do aktivního místa. Tím je znemožněná enzymatická funkce kaspázy (Chai et al., 2001; Riedl et al., 2001).



**Obr. 2: kaspáza-3** Převzato z: <http://www.osel.cz/index.php?clanek=4888>

### 3. SIGNALNÍ DRÁHY APOPTÓZY

Jak již bylo výše zmíněno, na základě místa odkud signály buněčné smrti přicházejí, můžeme rozlišit dvě základní cesty aktivace buněčné smrti - vnější a vnitřní (Ashkenazi, 2002; Ow et al., 2008).

#### **3.1 Vnější signální dráha**

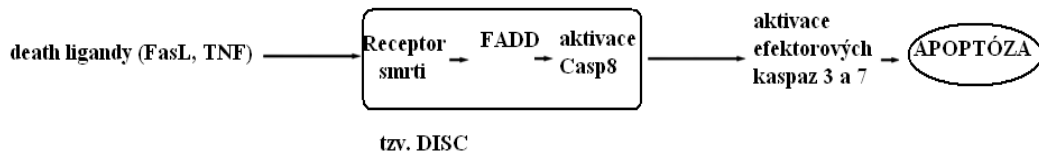
Vnější receptorová signální dráha začíná navázáním ligandu (signálních molekul) na receptor smrti lokalizovaný na zevní straně cytoplazmatické membrány (Ashkenazi, 2002, Tartaglia a Goeddel, 1992). Po navázání ligandu na receptor smrti se změni konformace na intracelulární doméně, která umožní navázání dalších proteinů. Vznikne proteinový komplex, který aktivuje iniciátorové a později i efektorové kaspázy a dochází tak k smrti buňky (Ashkenazi, 2002, Matalová, 2008).

Mezi nejčastější smrti indukující ligandy (death inducing ligands) patří Fas ligand, TNF $\alpha$  a TRAIL (jinak Apo2L). Po navázání ligandu na receptor smrti dochází k trimerizaci receptoru (tři molekuly receptoru spojené ligandem). Trimerizace je potřebná pro navázání adaptorové molekuly FADD (Fas Associated Death Domain) (Chinnaiyan et al., 1995) nebo TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain) (Hsu et al., 1995). Adaptorový protein FADD má efektorovou doménu smrti nazývanou DED, díky které je schopný vázat prokaspázy-8 a -10 (Chinnaiyan et al., 1995). Kromě extracelulární domény mají některé receptory smrti ve své intracelulární části doménu smrti („death domain“ DD) (Chinnaiyan et al., 1995, Hsu et al., 1995, Kischkel et al., 1995, Browning et al., 1993).

Trimerizované receptory smrti, adaptorové molekuly FADD (případně TRADD) a prokaspázy-8 nebo -10 vytvoří komplex. Tento komplex je označován jako DISC – smrt indukující signální komplex (Death Inducing Signalling Complex) (Ow et al., 2008). Komplex DISC umožní autokatalyticky aktivovat iniciační kaspázy, které následně aktivují efektorové kaspázy směřující k smrti buňky (Boldin et al., 1996, Muzio et al., 1996, Zhang et al., 1998) (obr.3).

Apoptóza vyvolána receptorovou signální dráhou může být zastavena prostřednictvím proteinu c-FLIP, který inaktivuje FADD a kaspázu-8 (Elmore,2007).

### ZEVNÍ CESTA AKTIVACE APOPTÓZY



**Obr.3: Schéma zevní cesty aktivace apoptózy**

#### **3.1.1 Receptor smrti**

Receptory smrti jsou cytokinové receptory patřící do velké rodiny receptorů TNFRs („tumor necrosis factor receptors,,- receptory pro tumor nekrotizující faktor). Mají funkci senzoru, které po obdržení extracelulárního signálu vedou k rychlé iniciaci apoptózy (Tartaglia a Goeddel, 1992, Aggarwal et al., 1985). Pro tyto receptory je charakteristická DD (death domain) doména smrti. Mezi receptory indukující apoptózu patří TNFR1 (tumor necrosis faktor), Fas, DR3, DR4, DR5 a jiné (obr.4 )

Receptor TNFR1 je receptor, který může aktivací transkripčních faktorů vyvolat jak apoptózu, tak proliferaci. Ligandem pro TNFR je TNF- $\alpha$  nazývaný též TNF (Carswell et al., 1975). Ligand TNF je exprimován aktivovanými makrofágy, lymfocyty, NK buňkami, neutrofily, keratinocyty, fibroblasty a buňkami hladké svaloviny (Schulze-Osthoff et al., 1998). Po navázání ligandu na receptor dochází k vazbě adaptorové molekuly na DD (Hsu et al., 1995). Cesta apoptózy začíná navázáním sekundárního adaptorového proteinu FADD k molekule TRADD (je navázána na DD) (Chinnaiyan et al., 1995). Systém TNFR1/TNF se účastní indukci a modulaci zánětlivé odpovědi.

Ligandem pro receptor Fas je FasL. Komplex Fas/FasL způsobuje apoptózu u leukemických buněk in vitro (Bernhard a Thomas, 1989). Gen receptoru Fas

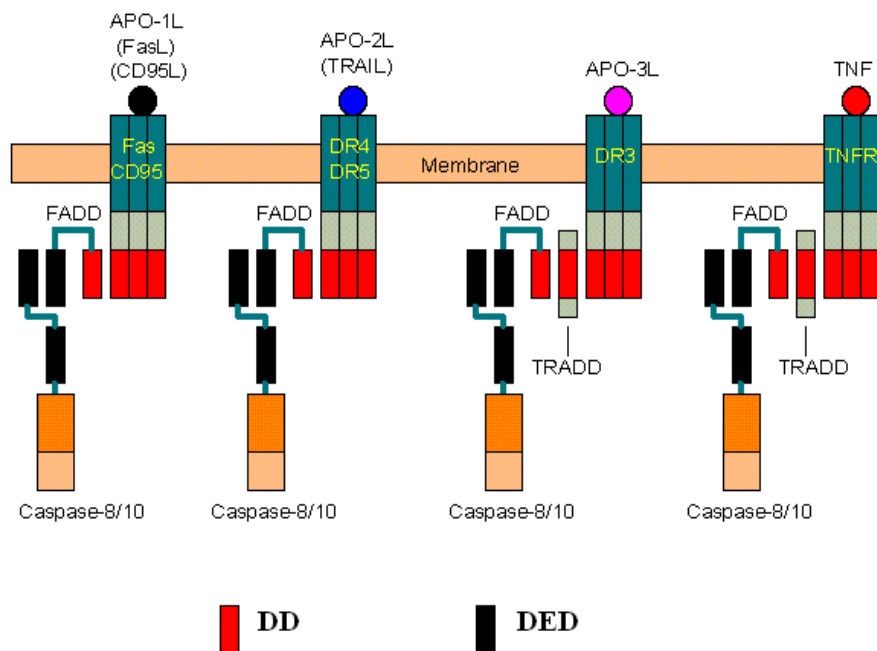


obsahuje p53RE („p53 responsible element“, část reagující s proteinem p53) (Munsch et al. 2000), který může při interakci s proteinem p53 zvyšovat expresi Fas. Po aktivaci exprese Fas pomocí p53 buňky vystavují na svém povrchu větší množství receptoru Fas a tím zvyšují citlivost buněk k iniciaci apoptózy pomocí FasL. Ligand FasL je exprimován u NK („natural killers“, přirozeně zabíjející buňky) buněk a aktivovaných T-lymfocytů (Krammer, 1997). Velké množství buněčných typů exprimuje Fas v menší míře, ve větším množství byl zjištěn výskyt tohoto receptoru v brzlíku, játrech, srdci, plicích, ledvinách, vaječnicích a u různých typů rakovinných buněk (Watanabe-Fukunaga et al., 1992).

DR3 receptor váže trimerizovaný protein APO3L (Migone et al., 2002). Receptor je schopný aktivovat apoptotický, ale také transkripční faktor NF- $\kappa$ B (Marsters et al., 1996). Přenos signálu cestou apoptózy je uskutečnený pomocí adaptorových molekul TRADD, TRAF-2, FADD a kaspázy-8 (Chinnaiyan et al., 1996). Exprese DR3 se vyskytuje u tkání se zvýšeným množstvím lymfocytů: slezina, brzlík, periferní lymfocyty a částečně tkáně tenkého a tlustého střeva (Chinnaiyan et al., 1996). Důležitou úlohu má při regulaci homeostázy lymfocytů (Migone et al., 2002).

DR4 („death receptor 4“, receptor smrti 4) může interagovat FADD i TRADD (Chaudhary et al., 1997). Ligandem pro tento receptor je TRAIL. TRAIL neslouží jako ligand pouze pro DR4, ale také pro podobný receptor DR5 a pro DcR receptory DcR1 („decoy receptor 1“, matoucí receptor 1) a DcR2 („decoy receptor 2“, matoucí receptor 2). Přítomnost DR4 byla zjištěna v mnoha tkáních (Pan et al., 1997). Vyšší exprese byla zjištěna ve slezině, tenkém střevě, brzlíku, periferní krvi, ale také v některých rakovinných tkáních a u aktivovaných T-lymfocytů (Pan et al., 1997).

Ligandem pro receptor DR5 je TRAIL, stejně jako u receptoru DR4 a další receptory DcR1, DcR2 a OPG (Wiley et al., 1995). Exprese recetoru DR5 roste při poškození DNA a je regulována proteinem p53 (Wu et al., 1997). Zvýšený počet DR5 na povrchu poškozených buněk tvoří ochranu organismu před rakovinnými buňkami. Exprese tohoto receptoru byla zjištěna v srdci, játrech, plicích, slezině, vaječnicích, tenkém střevě, periferní krvi a dalších tkáních (Walczak et al., 1997).



**Obr.4: Receptory smrti: Fas/CD95, DR4/DR5, DR3, TNFR a jejich ligandy. DD – domény smrti (Death Domain), DED – efektorová doména smrti (Death Effector Domain) Převzato z : <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch6G.htm>**

### **3.2 Nereceptorová signální dráha**

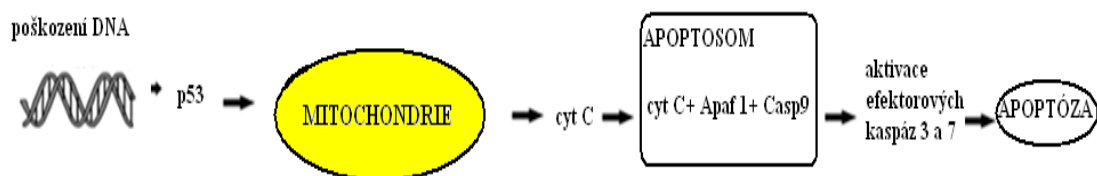
Nereceptorová signální dráha se také označuje jako vnitřní cesta aktivace apoptózy, která není závislá na membránových receptorech. U této dráhy se uplatňují především mitochondrie a endoplazmatické retikulum (Ow et al., 2008, Ficková a Nagy, 2007). Vnitřní dráha je iniciovaná vnějším, nebo vnitřním apoptotickým stimulem (Gross et al., 1999, Ficková a Nagy, 2007). Mezi klíčové prvky preceptorové signální dráhy patří proteiny z rodiny Bcl-2, proteiny uvolněné z mitochondrií, proteiny tvořící apoptozom, kaspáza-9 a její inhibitory (Saikumar et al., 1999).

Vnější podnět vyvolávající vnitřní dráhu apoptózy je např. ionizující záření, které způsobuje poškození DNA, na což reaguje protein p53. Tento protein aktivuje proapoptotické proteiny Bax a Bak (proapoptotické členy proteinové rodiny Bcl-2), které inaktivují protein Bcl-2 (Miyashita and Reed, 1995; Zong et al., 2001).

Proteiny Bax a Bak umožní permeabilizaci mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c a SMACs („second mitochondria-derived activators of caspases“, aktivátory kaspáz uvolněné z mitochondrií) (Li et al., 1997). Molekuly cytochromu c vytváří s proteiny Apaf-1 apoptozóm, což je komplex proteinů umožňující aktivace kaspázy-9 (Acehan, 2002). Kaspáza-9 aktivuje efektorovou kaspázu-3, -6, -7 a v konečném důsledku dochází k procesu apoptózy jako při receptorové apoptotické dráze (obr.5).

Vnitřní apoptotický stimul pochází ze samotné buňky (aktivace onkogenů, poškození DNA ) (Gross et al., 1999). Aktivní kaspázy-8 štěpí protein BID („BH3 interacting domain death agonist“, proapoptotický člen proteinové rodiny Bcl-2) na tBID („truncated BID“, zkrácený protein BID) schopný inaktivovat protein Bcl-2 a tím aktivovat proteiny Bak a Bax, což také umožní permeabilizaci mitochondriální membrány za uvolnění cytochromu c. Klíčovou roli nereceptorové signální dráhy apoptózy hrají proteiny z rodiny Bcl-2, proteiny vyplavované z mitochondrií, proteiny tvořící apoptozóm, kaspáza-9 a její inhibitory (Saikumar et al., 1999)

#### VNITŘNÍ CESTA AKTIVACE APOPTÓZY



**Obr.5:** Schéma vnitřní cesty aktivace apoptózy

### 3.2.1 Hlavní úloha mitochondrií

Kromě zprostředkování a zesílení apoptotické dráhy hrají mitochondrie hlavní roli v integraci a šíření signálů pocházejících z nitra buňky, jako je např. poškození DNA, oxidativní stres a hladovění (Kaufmann, 2000; Wang, 2001). Většina podmínek indukující apoptózu zahrnuje jak narušení vnitřního

mitochondriálního transmembránového potenciálu tak i propustnost membrány. Porušení této membrány vede k uvolňování proapoptotických bílkovin z mitochondriálního intermembránového prostoru do cytoplazmy (Bernardi, 1999; Loeffler, 2000 ). Mezi uvedené bílkoviny patří i cytochrom c. Z publikovaných experimentů vyplývá, že vpravení malého množství cytochromu c do cytosolu savčích buněk navodilo apoptózu v těchto buňkách (Li et al., 1997). Na druhou stranu buňky s umělým navozením nedostatečné produkce cytochromu c byly odolné vůči mnoha apoptotickým stimulům. Rovněž byla u těchto buněk pozorována nedostatečná schopnost aktivace kaspázy-3 (Li et al., 2001).

Cytochrom c je umístěn za běžných podmínek v intermembránovém prostoru mitochondrií (Gross et al., 1999). Během apoptózy se tento protein odpojí od vnitřní mitochondriální membrány a uvolní se do cytosolu (Gogvadze et al., 2006). Uvolnění mitochondriálních proteinů má význam při zprostředkování apoptotické dráhy. Tyto procesy musí být ale pod přísným dohledem regulačních mechanismů, které jsou v mnoha ohledech závislé na členech Bcl-2 rodiny.

### **3.2.2 Rodina Bcl-2 proteinu**

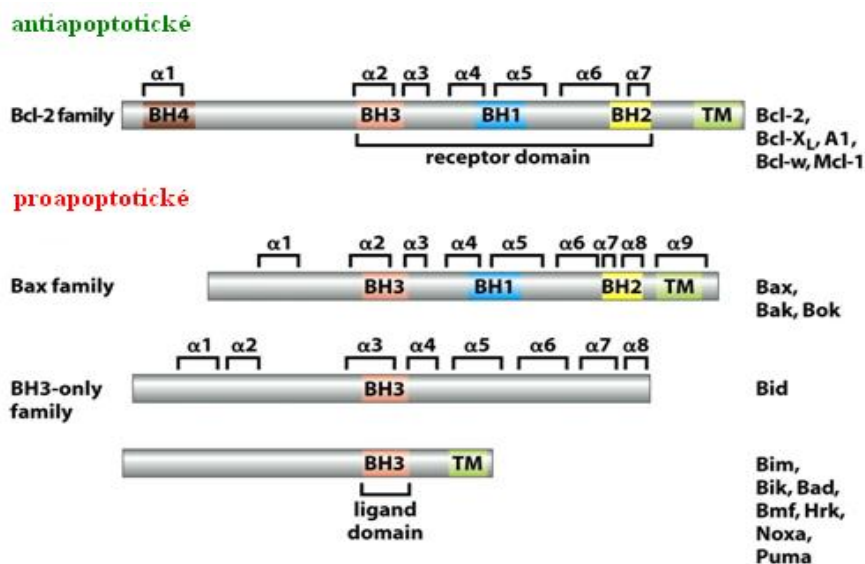
Velmi významná rodina proteinů regulujících vnitřní mitochondriální apoptózu je rodina Bcl-2 proteinů. Název této rodiny byl odvozen od „ B- cell lymphoma,„. Zjistilo se, že protein a zároveň onkogen Bcl-2-B-cell lymphoma gene-2 působí jako inhibitor buněčné smrti, bez vlivu na aktivaci buněčné proliferace (Vaux et al., 1988). Předpokládá se, že hlavní funkce Bcl-2 rodiny u savců je ochrana integrity mitochondrií a regulace uvolňování proapoptotických faktorů z mitochondrie do cytosolu (Gross et al., 1998). Ne všechny proteiny z této rodiny mají antiapoptotické účinky a v rámci této rodiny existují i proteiny, které apoptózu naopak podporují ( Gross et al., 1999, Youle a Strasser, 2008). Z toho hlediska je můžeme rozdělit do dvou skupin na proteiny, které umožňují propustnost mitochondriální membrány zvané proapoptotické proteiny a proteiny, které stabilizují mitochondriální membránu nazývané též jako antiapoptotické.(Tab.1, obr.6)

K proapoptickým proteinům Bcl-2 patří Bax, Bak, Bok, Bcl-G. Jsou umístěny na vnější mitochondriální membráně, kde zvyšují její propustnost, což vede k vylučování cytochromu c z mitochondrie do cytosolu a následně k aktivaci kaspáz vedoucích k destrukci buňky (Wei et al., 2001, Gao et al., 2005). Proteiny této skupiny Bcl-2 rodiny se vůči Bax/Bak chovají antagonisticky. K antiapoptickým proteinům rodiny Bcl-2 u savců patří Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, A1 (také známý jako Bcl2A1), Mcl1 a Bcl-b (Youle a Strasser, 2008). Antiapoptické proteiny brání apoptóze tak, že vytváří nefunkční heterodimery s proteiny Bax, Bak a Bok (Zha et al., 1996). Heteridomerizace antiapoptických proteinů brání proteinům Bax, Bak, Bok oligomerizovat ve vnější mitochondriální membráně (Antonsson et al., 2000; Mikhailov et al., 2003;) a následně spouštět buněčnou smrt. Nezáleží na proteinu, který aktivuje, nebo inhibuje buněčnou smrt, ale záleží na poměru mezi antiapoptickými a proapoptickými proteiny z této rodiny, které nakonec určí, zda buňka přežije nebo zahyne (Antonsonn, 2000, Korsmeyer et al., 1993, Kluck et al., 1997). Pokud jsou členové proapoptických proteinů v převaze, buňka je zneškodněná, naopak při převládání antiapoptických proteinů je buňka schopná života (Korsmeyer et al, 1993.;Kluck et al.1997).

Základní strukturou proteinů Bcl-2 rodiny je přítomnost alespoň jedné ze čtyř homologních domén (BH1, BH2 BH3, BH4 domain- Bcl-2 Homology domain). BH domény jsou důležité pro jejich funkci a proteinové interakce (homo- i heterodimerické) (Petro set al., 2001, Youle a Strasser,2008, Denisov et al., 2003; Muchmore et al., 1996).

Skupiny	Domény	Členové	funkce
Bcl-2 like	BH1 BH2 BH3 BH4	Bcl-2, Bcl-xL, A1, Boo, Bcl-w, Mcl- 1, BAG, Bcl-x, Bcl-B	Inhibitory apoptózy
Bax like	BH1 BH2 BH3	Bax, Bak, Bok, Bcl-10	Aktivátory apoptózy, efektory
BH3 only	BH3	Bim, Bik, Bad, Bid, Hrk, Noxa, Puma, Bmf	Nepřímé aktivátory apoptózy, iniciátory

Tab.1: Rozdělení proteinů Bcl-2 rodiny s jejich doménami, členy a funkcemi. Antiapoptotické proteiny (zeleně) a proapoptotické proteiny (červeně).



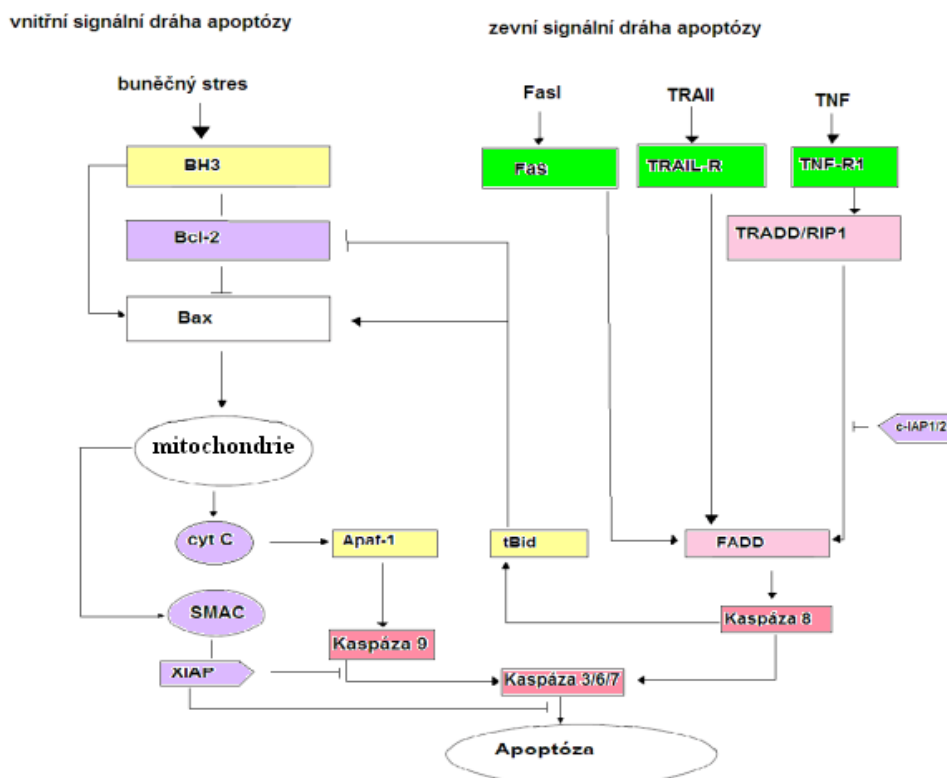
Obr.6: Rozdělení anti-apoptotických a proapoptotických proteinů rodiny Bcl-2 obsahující BH domény (podle Cory and Adams, 2002, The Biology of Cancer).

### 3.3 Shrnutí signálních dráh apoptózy v buňce

Apoptóza u savců může být spuštěna vnější (receptorovou) nebo vnitřní signální dráhou (obr.6).

**Vnější signální cesta apoptózy** – ligand se naváže na receptor smrti, poté se naváže adaptorová molekula FASS nebo TRADD a vytvoří se tak DISC komplex. Komplex aktivuje iniciační kaspázy-8, které aktivují efektorové kaspázy-3,-6,-7 vedoucí k smrti buňky.

**Vnitřní signální cesta apoptózy** - je řízená především Bcl-2 rodinou proteinů řídících propustnost mitochondriální membrány. Antiapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny inhibují mitochondriální propustnost membrány zatímco proapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny (Bak,Bax) umožňují uvolnění cytochromu c a dalších proteinů z intermembránového prostoru mitochondrie do cytosolu v důsledku zvýšené propustnosti mitochondriální membrány. Cytochrom c následně váže Apaf-1 a prokaspázy-9, čímž vznikne apoptosom, který štěpí prokaspázy-9 na aktivní formu kaspázy-9 a následně kaspázy vedoucí k destrukci buňky.



Obr. 6 : Schematické znázornění hlavních apoptotických signálních dráh v buňce. Upraveno a převzato ( Strasser, 2011)

## **4. APOPTÓZA V ODONTOGENEZI**

### **4.1 Apoptóza v odontogenezi a její význam**

Zub je orgán epitelo-mezenchymálního původu. Vzájemná interakce mezi epitelovými a mezenchymálními buňkami určuje zubní morfogenezi (Cobourne a Sharpe, 2003; Tucker a Sharpe, 1999). Apoptóza během odontogeneze plní několik důležitých rolí. Vyskytuje se ve všech stádiích- od počátku iniciace tvorby zubního zárodku až po stadium erupce zubů (Matalova et al., 2004).

Komplexní studie v časoprostorovém rozložení apoptózy u prenatalních myších molárů M1 byly publikované u Lesot et al. (1996) a Peterkova et al. (1996). Po nich následuje srovnávací studie u hraboše polního Setkova et al. (2006). Apoptózu v průběhu postnatálního vývoje myšího moláru M1 ve své práci nedávno popsala Lungová et al. (2011) a u myšího M3 Chlastakova et al. (2011).

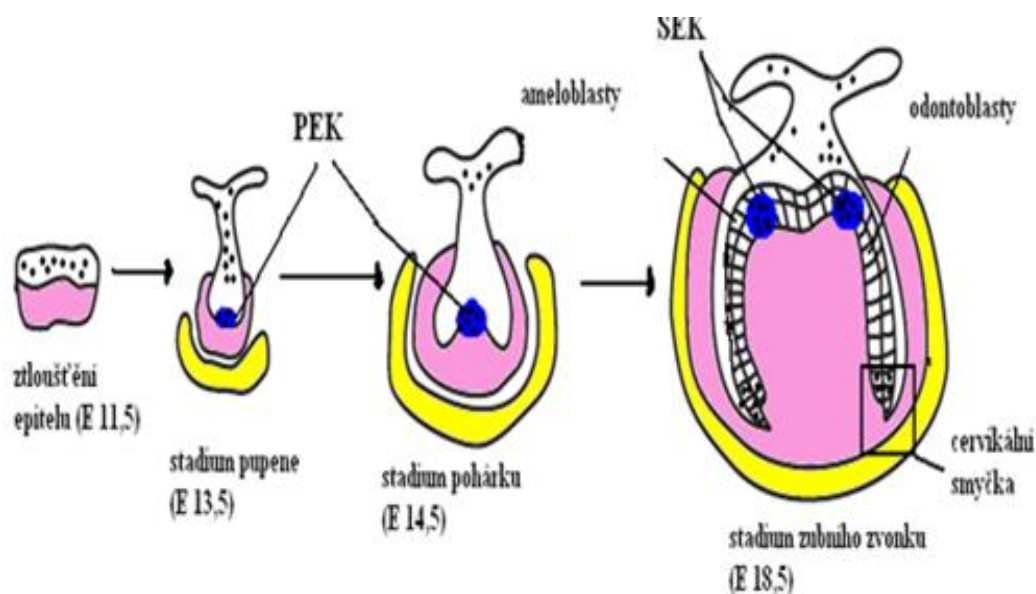
V prenatalní ontogenezi je apoptóza především spojena s eliminací signálních center, a s odstraněním zubních primordií. Postnatálně se podílí na organizační struktuře odontoblastů i ameloblastů, eliminaci Hertwigovy epiteliální kořenové pochvy (HERS) a remodelaci okolních tkání souvisejících s růstem kořene a prořezáváním zubů (Matalová, 2012). Zubní kořen se vytváří až po dokončení tvorby zubní korunky. Společně s růstem korunky se remodeluje okolní kost a vytváří se závěsný aparát zubu.

### **4.2 Apoptóza ve sklovinných uzlech**

První výskyt apoptotických buněk v zárodku zubů je spojen s invaginací epitelu vytvářejícího zubní pupen (Vaahtokari et al, 1996 ). Buňky vykazující apoptotickou aktivitu byly pozorované v ztluštěném epitelu počátečního stadia zubního pupene (E 12.5) (obr.8). V pozdní fázi zubního pupene (E 13) byly apoptotické buňky koncentrovány na špičce zubního pupene označoveném jako primární sklovinný uzel (PEK). V okolním mezenchymu nebyly nalezeny žádné



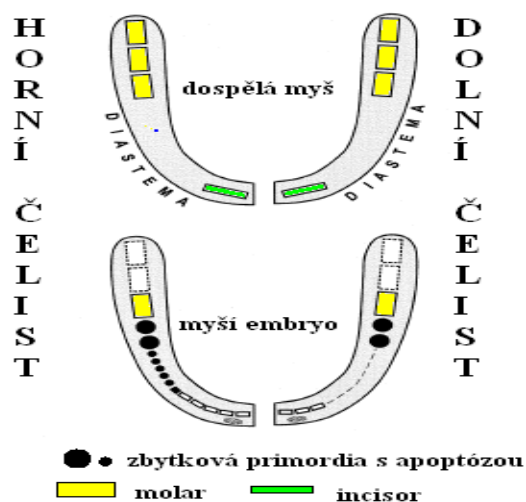
apoptické buňky. Primární sklovinný uzel řídí přechod mezi vývojovými stádii pupene a pohárku. Stimuluje proliferaci buněk ve svém okolí, což způsobuje růst cervikální smyčky, která se postupně zanořuje do okolního mezenchymu a ohraničuje oblast zubní pulpy (Jernvall 1998, Tucker a Sharper 2004, Theselff 2006). Během dalšího vývoje (E14.5-15), ve stadiu zubního pohárku, se počet apoptotických buněk primárního sklovinného uzlu (PEK) zvyšuje bez ztráty buněčné hmoty. Tím je PEK po skončení své funkce postupně eliminován (Vaahtokari et al., 1996). Během počátečního stádia zubního zvonku (E16- E18) je rozložení apoptotických buněk především patrné v místech vznikajících zubních hrbolů v tzv. sekundárních sklovinných uzlech (SEK), také v epiteliálních buňkách dentální laminy a vnějším sklovinném epitelu (Jernvall et al., 1994) (tab.2, obr.8).



**Obr. 8:** Schématický přehled časoprostorového rozložení apoptotických buněk (černé tečky) ve vývoji od stádia ztlustěného epitelu po stádium zubního zvonku. Růžová-mezenchym, Bílá- epitel, PEK- primární sklovinný uzel, SEK –sekundární sklovinný uzel Upraveno a převzato z Matalová 2004

### 4.3 Apoptóza v diastemálních zubních primordiích

Apoptóza plní také funkci „fylogenetické“, buněčné smrti, protože se podílí na redukci nadpočetných zubních pupenů (zbytkových primordií) lokalizovaných mezi řezákem a prvním molárem v prostoru zvaném diastema (Peterková, 2002, Matalova, 2004). Celý model apoptózy se v časných stádiích vývoje zubů liší u mandibul (dolní čelisti) a maxill (horní čelisti) (E13- 15). V horní čelisti byla u embryonálních myší v oblasti mezi řezáky a prvními moláry zjištěna zbytková primordia. Většina těchto diastemálních primordií jsou malá. Jejich životnost je asi 24 hodin, během kterých jejich epitel podstoupí apoptózu a zmizí (Peterková et al., 2003). Tato malá zbytková primordia se však nevyskytují v diastemě dolní čelisti (Peterková et al., 1996). Vedle malých zubních zárodků se v prostoru diastemy během embryonálního vývoje zakládají i velká zbytková primordia nacházející se na hranici mesiálního molárního segmentu a to jak u horní tak u dolní čelisti myších embryí. Zdánlivě odpovídají základům premolárů u primitivních hlodavců. Apoptóza ovlivňuje tato primordia pouze přechodně (Peterková et al., 2003). Primordia se pouze snižují, přetvářejí a začleňují do mesiální části první stoličky v čelisti. Apoptóza tak reguluje konečný počet zubů a vytváří funkční zubní vzorec (Peterková et al., 2002) (obr.9).



**Obr.9: Horní a dolní čelist u dospělé myši a myšičeho embrya, na kterých jsou vyznačeny velké a malé zbytkové primordia s apoptózou, moláry a incisori. Upraveno a převzato z Peterková, 2003**

#### **4.4 Apoptóza v ameloblastech a odontoblastech**

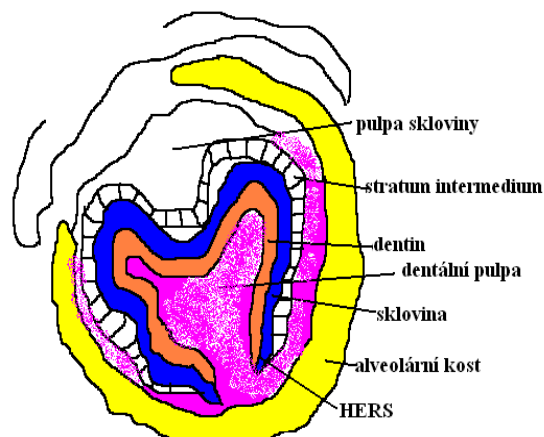
Dentinogeneze začíná ve stádiu pozdního zubního zvonku v oblasti růstových center na vrcholu vznikající korunky a sestupuje po laterální straně orgánu skloviny až po cervikální smyčku. V růstových centrech probíhá současně diferenciací odontoblastů a ameloblastů. U vícehrbolkových zubů se vytvoří více růstových center podle počtu hrbolků. V důsledku neustálé výroby dentinové matrix se odontoblasty posunují do středu zubní pulpy a postupně zaplňují místo pro zubní pulpu. To se děje procesem apoptózy vyskytujícím se zejména na počátku sekundární tvorby dentinu v postnatálním období (Matalová, 2012). Nervový růstový faktor (NGF) je důležitým faktorem buď pro přežití odontoblastů nebo pro apoptózu odontoblastů počas redukce pulpy (Mitsiadis et al., 1993).

Proces amelogeneze začíná prenatálně a pokračuje během celého postnatálního období a je ukončen před prořezáním zubu. V ameloblastech je apoptóza detekovaná v různých stádiích vývoje skloviny : v diferencovaných pre-ameloblastech, v přechodných ameloblastech a přilehlých buňkách stratum intermedium a zrajících ameloblastech (Bronckers et al., 2000). Ve stádiích tvorby skloviny od ukončení sekreční fáze a pozdní fáze zrání asi polovina ameloblastů lokalizovaných v erupční dráze zubu podléhá apoptóze (Smith, 1998).

#### **4.5 Apoptóza při vývoji kořene**

Zubní kořen se u myšího M1 moláru začíná vyvíjet ve stádiu (P4) až po ukončení růstu korunky. Hlavní úlohu při vývoji kořene mají buňky sklovinného orgánu. Z cervikální smyčky, která představuje hranici mezi korunkou a kořenem se vytvoří Hertwigova epitelová kořenová pochva (HERS) ( Diekwisch, 2001). Epitelové buňky HERS řídí diferenciaci buněk zubní papily v odontoblasty a diferenciaci cementoblastů. Po ukončení své funkce jsou buňky HERS buď odstraněny apoptózou, začleňují se do vznikajícího cementu, podstupují epitelomezenchymální transformaci, nebo migrují z dentinu do okolního periodontia a tam vytváří Malassezovy ostrůvky (Kaneko et al., 1999, Cerri a Katchburian 2005, Luan

et al., 2006). Z publikovaných výsledků vyplývá (Lungová et al., 2011), že počátek eliminace HERS spadá do stadia P8, kdy je zahájena depozice kořenového dentinu. Apoptóza se ve stádiu P8 objevuje mezi buňkami zubní pulpy a ve stadiu P16 i mezi odontoblasty a diferencovaných fibroblastů periodontia (Lungová et al., 2011) (obr.10).

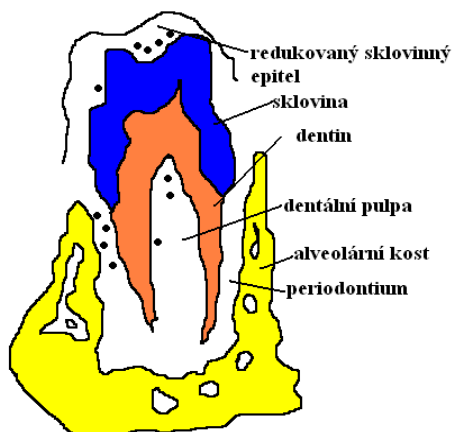


**Obr.10 : Stadium P4. Zahájení tvorby kořene, vytvoření HERS** Upraveno z Lungová, 2011

#### **4.6 Apoptóza při integraci zubů do alveolární kosti**

Alveolární kost se vytváří už v prenatálním období ve stádiu zubního pupene E13. Základ budoucího alveolu nasedá na bázi zubního pupene, pohárku i zvonku. Ve stádiu zubního zvonku P0 zasahují hřebeny alveolární kosti až nad hrboly zubní korunky (Lungová et al., 2011). Při integraci zubu a alveolární kosti v postnatálním vývoji se apoptóza společně s aktivními osteoklasty účastní remodelace okolní kostní tkáně. Oblast resorpce kosti je lokalizovaná podél vnitřního okraje alveolu a to jak v oblasti alveolárních hřebenů i na bázi zubního lůžka. Nejdynamičtější přestavba kosti probíhá společně s prodlužováním zubního kořene v období mezi stadiem P4 a P6 (Lungová et al., 2011). Pomocí apoptózy a činností osteoklastů jsou alveolární hřebeny postupně odstraněny z erupční dráhy zubu, který se ve stadiu P10 posouvá blíže do dutiny ústní. Odstranění hřebenů probíhá nejdřív na linguální straně (P6) a později na bukální (P8) straně zubu. Ve stadiu P10 a 12 alveolární hřebeny dále ustupují činností apoptózy a osteoklastů až na úroveň krčku. Ve stádiu P16 dochází

k vytvoření široké alveolární jamky v kosti na vytvoření pevné opory kořene zubu (Lungova et al., 2011) (obr.11).



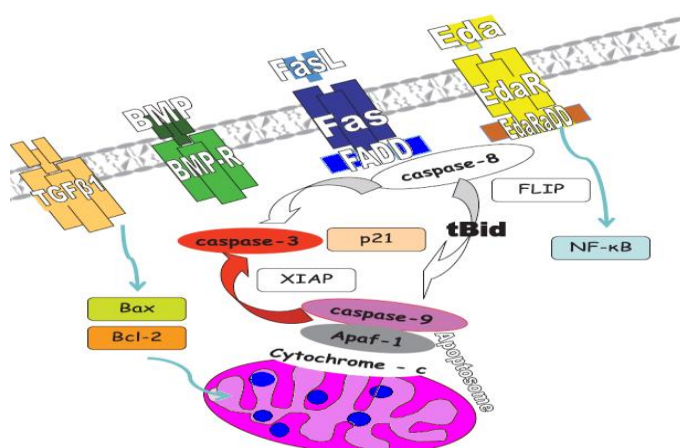
**Obr. 11: Stadium P16. Ukončení aktivního růstu kořene. Apoptotické buňky (černé tečky) Upravené z Lungová 2011**

#### **4.7 Signální dráhy apoptózy v odontogenezi**

V odontogenezi byla zjištěná mitochondriální signální dráha jako hlavní signální dráha apoptózy v sklovinném uzlu. Receptorová signální dráha v odontogenezi může pracovat synergicky s mitochondriální dráhou, avšak její hlavní úlohou je zesílení signálních mechanismů apoptózy (tab.2) ( Matalova et al., 2005).

Významnou rodinou proteinů pro regulaci mitochondriální dráhy v odontogenezi je Bcl-2 rodina. Byla nalezená v orgánu skloviny (Slootweg a Weger, 1994), v ameloblastech (Kondo et al., 2001), subodontoblastické vrstvě (Piattelli et al., 2000) a odontoblastech.. Antagonista Bcl-2 je Bax a poměr mezi těmito dvěma proteiny určuje osud buňky (Kitamura et al., 2001, Govorko et al. 2010). Bax převažuje v buňkách vnějšího sklovinného epitelu a naproti tomu Bcl-2 dominuje v oblasti vnitřního sklovinného uzlu. V pulpě skloviny byly některé buňky vyjádřeny Bcl-2 nebo Bax, zatímco jiné byly vyjádřeny oběma (Matalová 2012). Kondenzované ektomezenchymální buňky zubu byly většinou vyjádřeny jen proteiny Bax. Neapoptotické funkce kaspáz byly v odontogenezi také zjištěny. Hlavní funkce těchto kaspáz souvisí s tvorbou zubního kostního komplexu (Szymczyk et al. 2006).



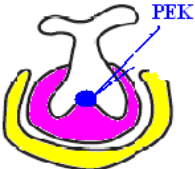
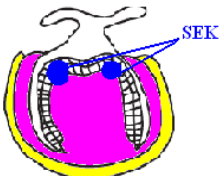
Apoptóza ve sklovinných uzlech u myších molárů je spojena s cyklin-dependentní kinázou p21 (Jernvall et al., 1998). P21 je indukovaný izolovaným zubním epitelem vyjádřeným základním zubním mezenchymem na začátku tvorby sklovinného uzlu (Jernvall et al., 1998). P21 působí prostřednictvím kaspázových dráh. Při absenci p21 nebyly zjištěny u myši žádné vývojové vady chrupu (Deng et al., 1995). Naopak p53 je velmi důležitý v roli apoptózy. Jeho absence může vést k spontánnímu vývoji nádoru (Donehower et al., 1992).



**Obr.12 :** Schématické zobrazení molekulárních interakcí souvisejících s apoptózou ve vývoji zubů. Uplatňuje se tu jak mitochondriální tak receptorová signální dráha, zprostředkována přes receptor smrti. Spojením ligandu s receptorem smrti má za následek spuštění iniciátorů kaspáz jako kaspáza-8 a následně efektorových kaspáz-kaspáza-3. Efektorové kaspázy mohou být také aktivovány mitochondriální dráhou iniciovanou vylitím cytochromu c z mitochondrie a následnou tvorbou apoptozomu (cytochrom c + Afpa-1 + kaspáza- 9). Obě cesty jsou propojeny tBid a mohou být modulovány proteiny Bcl-2 rodiny. Zvýšená hladina cyklinu-dependentní kinázy p21 a snížená úroveň NF- kappa B podporuje proces apoptózy. Převzato z : Matalova et al., 2012

#### **4.8 Porucha apoptózy v odontogenezi**

V důsledku tkáňových interakcí může apoptóza hrát roli v zubních onemocněních a dismorfologiích. Může být zapojená v oligodoncii, hypodoncii, agenezi a periodontálních nemocech (revize Fleischmannova et al., 2008). Poruchy apoptózy mohou také hrát roli při určování počtu zubů nebo ovlivňovat konečnou velikost zubu. Apoptóza je také hlavní příčina makrodoncie (Kim et al., 2006).

TKÁŇ	ZTLUŠTĚNÝ EPITEL (E 11,5)	PUPEN (E 13,5)	POHÁREK (E 14,5)	ZVONEK (E 18,5)
				
E P I T E L	<i>Bmp2/4/7</i> <i>EdaR</i> <i>P63</i> <i>Wnt4,6,10a,</i> <i>10b</i>	<i>Bmp7</i> <i>Msx2</i> <i>Eda/EdaR</i> <i>Wnt4,6,7b</i> <b><u>Fas/FasL/FADD</u></b> <b>Bmp2</b> <b>Fgf4</b> <b>Shh</b> <b>(PEK)</b>	<i>Eda</i> <i>Msx2</i> <i>Wnt6</i> <b><u>Fas/Fad/FADD</u></b> <b>Shh</b> <b>Bmp2/4/7</b> <b>EdaR Fgf4</b> <b>p21</b> <b>Wnt3, 10a, 10b</b> <b>Kaspaza-3,9</b> <b>Aapf-1</b> <b>(PEK)</b>	<i>Bmp7</i> <i>Fgf4</i> <i>Msx-2</i> <i>Eda/EdaR</i> <i>Wnt4,7b</i> <b><u>Fas/FasL/FADD</u></b> <b>Fgf4</b> <b>(SEK)</b>
M E Z E N C H Y M	<i>Bmp4</i> <i>Msx-1/2</i> <i>Wnt5a</i>	<i>Bmp4</i> <i>Msx-1</i> <i>Wnt5a</i> <b>Fas</b>	<i>Bmp4</i> <i>Msx-1</i> <i>Wnt5a</i>	<i>Bmp2/4</i> <i>Msx -1/2</i> <i>N-myc</i> <i>Wnt5a</i>

Tab.2: Přehled exprese mRNA genu (kurzíva) v epiteliální a mezenchymální tkáni a časoprostorového rozložení apoptózy od stádia ztluštěného epitelu, přes stádium zubního pupene, pohárku a zvonku. Upraveno a převzato z: Matalová et al., 2012

## **5. ZÁVĚR**

Apoptóza v odontogenezi byla pozorována v různých stádiích. Vhodným modelem pro studie programované buněčné smrti je myší zubní zárodek. Během vývoje zárodku myší M1 byla apoptóza pozorována v regresi diastemálních primordiích, při odstránení buněk sklovinných uzlů, v odontogenezi, amelogenezi, při vývoji kořene a integraci zubů do alveolární kosti. Proces apoptózy se v odontogenezi děje přes mitochondriální signální dráhu. Receptorová signální dráha probíhající přes Fas receptor zabezpečuje zesílení signálů. Porucha apoptózy je zodpovědná za vznik makrodoncie.



## 6. SEZNAM LITERATURY

1. Acehan, D. Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X. and Akey, C.W., (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9(2): 423-32.
2. Aggarwal, B.B., Eessalu, T.E., Hass, P.E. (1985). Characterization of receptors for tumor necrosis factor and their regulation by  $\gamma$ -interferon. *Nature*. 318: 665–667.
3. Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., Martinou, J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* 345. 271–278.
4. Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer*. 2: 420-430.
5. Barres, B.A., Hart, I.K., Coles, H.C., Burne, J.F., Voyvodic, J.T., Richardson, W.D., and Raff, M.C. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*. 70: 31–46.
6. Bernard, V. L., a Thomas, J. K. (1989). Post-Earnings-Announcement Drift: Delayed Price Response or Risk Premium? *Journal of Accounting Research*, 27, 1-36.
7. Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V. and Di Lisa, F. (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 264(3): 687-701.
8. Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. and Wallach, D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**, 803-815.
9. Bronckers, A.L., Goei, S.W., Dumont, E., Lyaruu, D.M., Wo" Itgens, J.H., Van Heerde, W.L., et al. (2000). In situ detection of apoptosis in dental and periodontal tissues of the adult mouse using annexin-V-biotin. *Histochem. Cell Biol.* 113, 293–301.

10. Brüne B. (2003), Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON?. *Cell Death Differ.*, roč. 10, čís. 8, s. 864–9.
11. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. And Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Immunology*. 9: 3666–3670.
12. Cerri P.S., Katchburian E. (2005) Apoptosis in the epithelial cells of the rest of Malassez in the periodontium of rat molars. *J Periodontal Res* 40, 365-372.
13. Cobourne, M.T., and Sharpe, P.T. (2003). Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Arch. Oral Biol.* 48, 1–14.
14. Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21 cIP1/WAF undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675–684.
15. Denisov, A.Y., Madiraju, M.S.R., Chen, G., Khadir, A., Beauparlant, P., Attardo, G., Shore, G.S., Gehring, K. (2003). Solution structure of human BCL-w: modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *J. Biol. Chem.* 278: 21124–21128.
16. Diekwisch T.G.H. (2001). The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol* 45, 695-706
17. Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215–221.
18. Doseff A.I. (2004) Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells Dev*, 13: 473-483
19. Dvorská, M., Driák, D., Švadnová, I. (2008). Apoptóza v gynekologii a porodnictví (část I, patofyziologie apoptózy). *Gynekolog*. 17: 132-140.
20. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4): p. 495-516.
21. Eralp, I., Lie-Venema, H., DeRuiter, M.C., Van Den Akker, N.M., Bogers, A.J., Mentink, M.M., Poelmann, R.E., Gittenberger-de Groot, A.C. (2005).

Coronary artery and orifice development is associated with proper timing of epicardial outgrowth and correlated fas ligand associated apoptosis patterns. *Circ. Res.* 96: 526--534.

22. Ficková, M. a Nagy, M. (2007). Apoptóza – programovaná bunková smrť a rastlinné metabolity. *Chem. Listy.* 101: 131-137.
23. Gao, S., Fu, W., Durrenberger, M., De Geyter, C., Zhang, H. 2005. Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 1015–1024.
24. Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2006). Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757: 639–647.
25. Govorko, D.K., Becic, T., Vukojevic, K., Mardesic-Brakus, S., Biocina-Lukenda, D., and Saraga-Babic, M. (2010). Spatial and temporal distribution of Ki-67 proliferation marker, Bcl-2 and Bax proteins in the developing human tooth. *Arch. Oral Biol.* 55, 1007–1016.
26. Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 17: 3878-3885.
27. Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13: 1899–1911.
28. Hatakeyama, S., Tomichi, N., Ohara-Nemoto, Y., and Satoh, M. (2000). The immunohistochemical localization of Fas and Fas ligand in jaw bone and tooth germ of human fetuses. *Calcif. Tissue Int.* 66, 330–337.
29. Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D. (1995). The TNF receptor associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation. *Cell.* 81: 495–504.
30. Huang, Y., Park, Y.C., Rich, R.L., Segal, D., Myszka, D.G., Wu, H. (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell.* 104: 781–790.
31. Indran, I.R., et al. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta- ioenergetics.* **1807**(6): p. 735-745.

32. Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Wu, Q., Dataa, P., Alnemri, E.S., Shi, Y. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*. 104: 769–780.
33. Chaloupka J. (1996) Programovaná smrt buňky. - Biologické listy, 61(3-4): 2479-271
34. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 81: 505–512.
35. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Yu, G. L., Lyons, R. H., Garg, M., Duan, D. R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J. and Dixit V. M. (1996). Signal transduction by DR3 a Death Domain-containing Receptor Related to TNFR-1 and CD95. *Science*. 274: 990–992.
36. Chlastakova, I., Lungova, V., Wells, K., Tucker, A.S., Radlanski, R.J., Misek, I., et al. (2011). Morphogenesis and bone integration of the mouse mandibular third molar. *Eur. J. Oral Sci.* 119,265–273.
37. Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347—354
38. Jernvall J., Kettunen P., Karavanova I., Martin L.B., Thesleff I. (1994) Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol* 38.463-469.
39. Jernvall, J., Aberg, T., Kettunen, P., Keranen, S., and Thesleff, I. (1998). The life history of an embryonic signalling center: BMP-4 induces p-21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 125, 161–169.
40. Kaneko H., Hashimoto S., Enokiya Y., Oguchi H., Shimono M. (1999) Cell proliferation and death of Hertvig's epithelial root sheath in the rat. *Cell Tissue Res* 298,95-103.
41. Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C (2000). "Induction of apoptosis by cancer chemotherapy." *Exp Cell Res* 256(1): 42-9.

42. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26: 239-257.
43. Kim J.Y., Cho S.W., Hwang H.J., Lee M.J., Lee J.M., Cai J. (2007) Evidence for expansit based tempoval BMP4/NOGGIN interactions in specifying periodontium morphogenesis. *Cell Tissue Res* 330, 123-132.
44. Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal.* 14 (22): 5579–5588.
45. Kitamura, C., Kimura, K., Nakayama, T., Toyoshima, K., and Terashita, M. (2001). Primary and secondary induction of apoptosis in odontoblasts after cavity preparation of rat molars. *J. Dent. Res.* 80, 1530–1534.
46. Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R., Newmeyer D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275: 1132-1136.
47. Korsmeyer S.J., Shutter J.R., Veis D.J., Merry D.E. (1993). Oltvai Z.N. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol*, 4: 327-332.
48. Kondo, S., Tamura, Y., Bawden, J.W., and Tanase, S. (2001). The immunohistochemical localization of Bax and Bcl-2 and their relation to apoptosis during amelogenesis in developing rat molars. *Arch. Oral Biol.* 46, 557–568.
49. Kuranaga, E. (2011). Caspase signaling in animal development. *Dev. Growth Diff.* 53, 137–148.
50. Lamkanfi, M., Kanneganti, T.D., Franchi, L., and Núñez, G. (2007). Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 82, 1–6.
51. Lee, D.M., Osathanondh, R., Yeh, J. (1998). Localization of Bcl-2 in the human fetal müllerian tract. *Fertility and Sterility.* 70: 135-140.
52. Lesot H., Vonesch J.L., Peterka M., Turečková J., Peterková R., Ruch J.V. (1996). Mouse molar morphogenesis revised by three-dimensional

- reconstruction. II. Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell stages first and second upper molar teeth. *Int J Dev Biol*, 40:1017–1031.
53. Li, L., Yuan, G., Liu, C., Zhang, L., Zhang, Y., Chen, Y., et al. (2011). Exogenous fibroblast growth factor 8 rescues development of mouse diastemal vestigial tooth *ex vivo*. *Dev. Dyn.* online March 15.
  54. Loeffler, M. and Kroemer, G. (2000). "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita." *Exp Cell Res* 256(1): 19-26.
  55. Luan X., Yoshihiro I., Diekwisch T.G.H. (2006). Evolution and development of Herwig's epithelial root sheath. *Dev Dyn* 235,1167-1180.
  56. Lungova', V., Radlanski, R.J., Tucker, A.S., Renz, H., Míšek, I., and Matalova', E. (2011). Tooth-bone morphogenesis during postnatal stages of mouse first molar development. *J. Anat.* 218, 699–715.
  57. Luukko K., Loes 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.
  58. Maier, J.K.X., Lahoua, Z., Gendron, N.H., Fetni, R., Johnston, A., Davoodi, J., Rasper, D., Roy, S., Slack, R.S., Nicholson, D.W., MacKenzie, A.E. (2002). The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J. Neurosci.* 22: 2035–2043.
  59. Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A J., Rader, J.A., Van Schie, R.C., Laface, D.M., et al. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182, 1545–1556.
  60. Matalova, E., Tucker, and Sharpe, P.T. (2004). Death in the life of a tooth. *J. Dent. Res.* 83, 11–16.
  61. Matalova, E., Tucker, A.S., and Míšek, I. (2005). Apoptosis-related factors (Fas receptor, Fas ligand, FADD) in early tooth development of the field vole (*Microtus agrestis*). *Arch. Oral Biol.* 50, 165–169.

62. Matalova, E., Fleischmannova, J., Sharpe, P.T., Tucker, A.S.J. (2008) Tooth agenesis: from molecular genetics to molecular dentistry, *Dent Res.*87(7):617-23.
63. Matalova, E., Dubska, L., Fleischmannova, J., Chlastakova I., Janeckova, E., and Tucker, A.S. (2010). Cell proliferation and apoptosis in the primary enamel knot measured by flow cytometry of laser microdissected symplex. *Arch. Oral Biol.* 55,570–575.
64. Matalova, E., Svandova E., Abigail S. Tucker A.S. (2012). Apoptotic signaling in mouse odontogenesis.
65. Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796–801.
66. Mikhailo, V., Mikhailova, M., Degenhardt, K., Venkatachalam, M.A., White, E., Saikumar, P. (2003). Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 278: 5367–5376.
67. Migone, T. S., Zhang, J., Luo, X., Zhuang, L., Chen, C., Hu, B., Hong, J. S., Perry, J. W., Chen, S. F., Zhou, J. X. H., Cho, Y. H., Ullrich, S., Kanakaraj, P., Carrell, J., Boyd, E., Olsen, H. S., Hu, G., Pukac, L., Liu, D., Ni, J., Kim, S., Gentz, R., Feng, P., Moore, P. A., Ruben, M. and Wei, P. (2002). TL1A Is a TNF-like Ligand for DR3 and TR6/DcR3 and Functions as a T Cell Costimulator. *Immunity.* 16: 479–492.
68. Mitsiadis, T.A., Couble, P., Dicou, E., Rudkin, B.B., and Magloire, H. (1993). Patterns of nerve growth factor (NGF) proNGF, and p75, NGF receptor expression in the rat incisor: comparison with expression in the molar. *Differentiation* 54,161–175.
69. Miyashita, T. and Reed, J. C. (1995). Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax Gene. *Cell.* 80: 293–299.
70. Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettlesheim, D., Chang, B., Thompson, C.B., Wongparallel, S.-L., Ngparallel, S.-C., Fesik, S.W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature.* 381: 335-341.

71. Munsch, D., Watanabe-Fukunaga, R., Bourdon, J. C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E. and Reisdorf, P. (2000.) Human and Mouse Fas (APO-1/CD95) Death Receptor Genes Each Contain a p53-responsive Element That Is Activated by p53 Mutants Unable to Induce Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (6): 3867–3872.
72. Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Dixit, V. M. (1996) .FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-827.
73. Nijhawan, D., Monarpour, N., Wang, X. (2000). Apoptosis in neuronal development and disease. *Ann. Rev. Neurosc.* 24: 73-88.
74. Ow, Y.L.P., Green, D.R., Hao, Z., Mak, T.W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 532-542.
75. Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J. and Dixit, V. M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*. 276: 111–113.
76. Peterková, R., Lesot, H., Vonesch, J.L., Peterka, M., Ruch, J.V.(1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. I. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *Int J Dev Biol*, **40**: 1009-1016.
77. Peterkova, R., M. Peterka, L. Viriot and H. Leesot. (2002). Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connect. Tissue Res.* 43: 120-128
78. Peterková R., Peterka M., Lesot, H. (2003). The developing mouse dentition: a new tool for apoptosis study. *Ann N Y Acad Sci*, **1010**: 453-466.
79. Petros, A.M., Medek, A., Nettesheim, D.G., Kim, D.H., Yoon, H.S., Swift, K., Matayoshi, E.D., Oltersdorf, T, Fesik, S.W. (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc. Natl Acad. Sci.* 98: 3012–3017.
80. Piattelli, A., Rubini, C., Fioroni, M., Ciavarelli, L., and De Fazio, P. (2000). Bcl-2, p53, and MIB-1 in human adult dental pulp. *J.Endod.* 26, 225–227.



81. Popov, S.G., Villasmil, R., Bernardi, J., *et al.* (2002). Lethal toxin of *Bacillus anthracis* causes apoptosis of macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, April 2002, roč. 293, čís. 1, s. 349–55.
82. Riedl, S.J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C., Salvesen, G.S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*. 104: 791–800.
83. Riedl, S.J a Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 897-907.
84. Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M., Venkatachalam, M. A. (1999). Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American Journal of Medicine.* 107:489-506.
85. Savill, J. (1997). Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leuk Biol* 61:375-380.
86. Savill J, Gregory C, Haslett C.(2003). Eat me or die. *Science*, roč. 302, čís. 5650.
87. Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* 9, 459–470.
88. Slootweg, P.J, and de Weger, R.A. (1994). Immunohistochemical demonstration of bcl-2 protein in human tooth germs. *Arch. Oral Biol.* 39, 545–550.
89. Smith, C.E. (1998). Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9, 128–161.
90. Setkova, J., Lesot, H., Matalova, E., Witter, K., Matulova, P., and Misek, I. (2006). Proliferation and apoptosis in early molar morphogenesis—voles as models in odontogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 50, 481–489.
91. Szymczyk, K.H., Freeman, T.A., Adams, C.S., Srinivas, V., and Steinbeck, M.J. (2006). Active caspase-3 is required for osteoclast differentiation. *J. Cell. Physiol.* 209, 836–844.
92. Tartaglia, L. a Goeddel, D. (1992). Two TNF receptors. *Immunology today.* 13: 151–153.

93. Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 231-241
94. Thesleff, I. (2006). The genetic basis of tooth development and dental defekt. *Am J Med Genet A* 140,2530-2535.
95. Tucker, A.S., and Sharpe, P.T. (1999). Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning, the right shape in the right place. *J. Dent. Res.* 78, 826–834.
97. Tucker, A., and Sharpe, P. (2004). The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat. Rev.Genet.* 5, 499–508.
98. Vaahtokari, A., A°berg, T., and Thesleff, I. (1996). Apoptosis in developing tooth: association with an embryonic signallingcenter and suppression of EGF and FGF-4. *Development* 122,121–129.
99. Vaux, D. L., Cory, S., Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival andcooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 335: 440–442.
100. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG and Rauch CT. (1997). *EMBO J.*, 16, 5386 ± 5397.
101. Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* 15(22): 2922-33.
102. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nagata, S. (1992). The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J. Immunol.* 148(4): 1274–1279.
103. Weil, M., Jacobson, M.D., Coles, H.S., Davies, T.J., Gardner, R.L., Raff, K.D. and Raff, M.C. (1996). "Constitutive expression of the machinery for programmed cell death." *J Cell Biol* 133(5): 1053-9.
104. Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J. K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A. and Goodwin, R.G. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 3(6): 673–682.

105. Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G. and el-Deiry, WS. (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature Genetics*. 17(2): 141–143.
106. Youle, R.J. and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 47-59.
107. Zamzami, N. and Kroemer G (2001) Mitochondria in apoptosis. How Pandora's box opens. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2, 67–71.
108. Zha, H., Aime-Sempe, C., Sato, T., Reed, J.C. (1996). Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* 271: 7440–7444.
109. Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N.H. and Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* **392**, 296-300.
110. Zimmermann, K.C., Bonzon, C. and Green, D.R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 92, 57–70.
111. Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R. and Thompson, C. B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes dev.* 15(12): 1481–1486.