

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

Proliferace a migrace buněk v zubním vývoji

Bakalářská práce

Michaela Rothová

Školitel: MUDr. Renata Peterková, Csc.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně s uvedením veškeré použité literatury.

V Praze, 26.4.2006

OBSAH

1. Úvod.....	2
2. Počátek embryonálního vývoje.....	3
3. Vývoj zubů.....	4
3.1 Epitel-mezenchymální interakce v zubním vývoji.....	6
3.2 Signalizační centrum zubního vývoje- sklovinný uzel (enamel knot).....	7
3.3 Apoptoza- významný faktor vývoje dentice.....	10
3.4 Determinace stádia zárodečného a zubního vývoje.....	11
4. Proliferace.....	12
4.1 Stručný přehled buněčného cyklu.....	14
4.1.1 Regulace buněčného cyklu.....	14
4.1.2 Průchod buněčným cyklem.....	15
5. Přehled hlavních růstových faktorů a signálních molekul důležitých v embryogenezi.....	16
5.1 Fibroblast Growth Factors (FGFs).....	17
5.1.1 Ovlivnění zubního vývoje.....	18
5.2 Hedgehog (HH).....	19
5.2.1 Sonic Hedgehog (SHH).....	20
5.2.1.1 Ovlivnění zubního vývoje.....	21
5.3 Transforming Growth Factor- β (TGF- β) nadrodina.....	22
5.3.1 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).....	23
5.3.1.1 Ovlivnění zubního vývoje.....	24
5.4 Wingless (Wnt).....	25
5.4.1 Ovlivnění zubního vývoje.....	26
5.5 Tumor Necrosis Factor (TNF).....	27
5.6 Notch signalizace.....	28
5.7 Homeobox.....	28
6. Obecné mechanismy migrace.....	30
7. Buňky neurální lišty (NCC).....	31
7.1 Indukce neurální lišty.....	32
7.2 Rozdělení buněk neurální lišty.....	33
7.3 Hlavové buňky neurální lišty.....	33
7.4 Migrace buněk neurální lišty.....	34
7.4.1. Počátek migrace NCC.....	34
7.4.2 Extracelulární matrix (ECM).....	34
7.4.3 Další komponenty důležité pro migraci NCC.....	35
7.5 Buňky neurální lišty a zubní vývoj.....	36
8. Závěr.....	37
9. Výhledy do budoucna.....	37
10. Poděkování.....	37
11. Seznam použité literatury.....	38

1. ÚVOD

Proliferace (buněčné dělení) a migrace jsou základními a nezbytnými morfogenetickými mechanizmy během embryonálního vývoje. Proliferací buněk oplozené zygoty vznikají populace buněk, které následným buněčným dělením dávají vznik třem zárodečným listům a extraembryonální tkáni. Zastavení buněčného cyklu (a tím buněčné proliferace) vede k regresi vývoje zárodku a jeho smrti. Migrace buněk je v zárodečném vývoji nejintenzivnější během gastrulace, kdy migrující buňky dávají vznik mezodermu a mezenchymu. Dále během neurulace, kdy dochází k migraci buněk neurální lišty, které dávají vznik širokému spektru buněčných typů. Porucha migrace buněk v časném zárodečném vývoji vyústí v defekty mezodermální tkáně a neurální soustavy.

Proliferace a migrace jsou významnými procesy také během zubního vývoje. Proliferace je nezbytná pro růst zubního epitelu i mezenchymu. Během časného zárodečného vývoje dochází k migraci buněk neurální lišty do oblastí maxilárních, mandibulárních a frontonazálních výběžků, kde se později jako ektomezenchym podílejí při vzniku zubů.

Zubní vývoj slouží jako velice vhodný model pro studium regulace orgánového vývoje. Výhodou experimentálního modelu vyvíjející se dentice je i skutečnost, že studium vývoje dentice umožňuje komplexní pohled na vývoj jednotlivých zubních orgánů, které se v jednom jedinci nevyvíjí současně. V jednom jedinci tak můžeme sledovat více vývojových zubních stádií najednou. Poznatky ze studia vývoje zubního orgánu je možné využít i pro výzkum vývoje dalších epitelových derivátů, například plic, slinných, potních a mléčných žláz nebo vlasů.

Zubní vývoj je řízen vzájemnými interakcemi mezi epitelem a mezenchymem odvozeným od buněk neurální lišty. Tyto interakce vedoucí k proliferaci, apoptoze nebo diferenciaci buněk jsou zprostředovány, mimo jiné, členy proteinových rodin FGF, HH, Wnt, TGF- β , BMP a TNF.

Cílem této práce bylo vytvořit literární přehled

- 1) úlohy proliferace a migrace buněk v zubním vývoji;
- 2) hlavních molekulárních faktorů ovlivňující proliferaci a migraci buněk v zubním vývoji.

2. POČÁTEK EMBRYONÁLNÍHO VÝVOJE

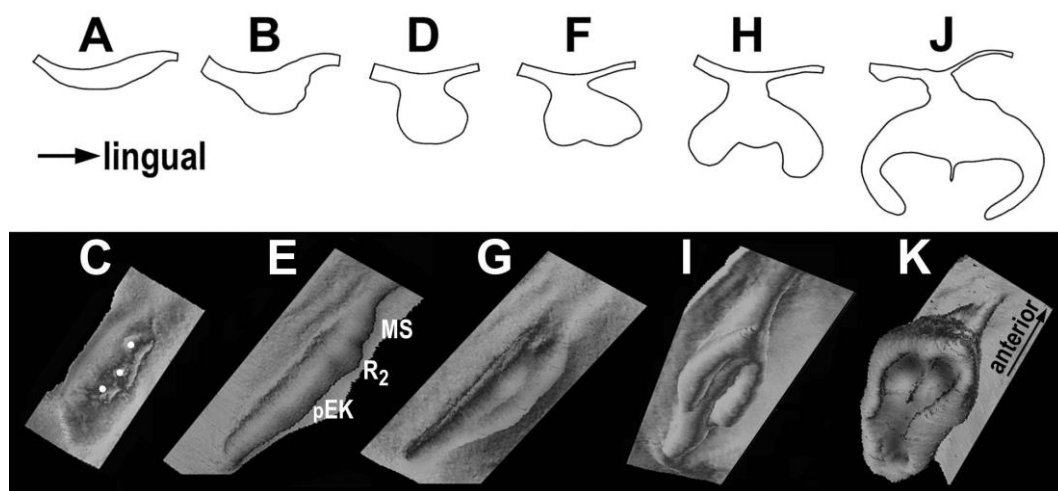
Počátek embryonálního vývoje začíná oplozením. K oplození savčího vajíčka dochází v ampule vejcovodů, kdy meiosa vajíčka je plně dokončena. Vzniká zygota a její 1. buněčné dělení začíná den poté. Zygota posléze dává vznik morule. Vnější buňky 16-ti buněčné moruly dávají vznik trofoblastu- trofoektodermu, ze kterého se vytváří embryonální část placenty- tkáň chorionu. Vnitřní buňky 16-ti buněčného stádia produkují vnitřní buněčnou masu (inner cell mass- ICM), která vytváří 2 vrstvy: epiblast a spodní vrstvu hypoblast. Epiblast dává vznik samotnému embryu, tedy všem třem zárodečným listům (embryonálnímu ektodermu, endodermu a mezodermu), hypoblast dává vznik extraembryonálnímu endodermu (žloutkovému vaku). Mezi ICM a trofoblastem vzniká dutina (blastocoel) vyplněná tekutinou. Toto stádium se nazývá blastocysta. Na stádiu blastocysty dochází k uhníždění embrya ve stěně endometria. Blastocysta je zachycena endometriem díky extracelulárním receptorům, např. pro kolagen, laminin, fibronektin nebo hyaluronovou kyselinu. Gastrulace začíná formováním primitivního proužku. Znamená počátek morfogeneze a je to proces, ve kterém vzniká mezoderm. Savčí mezodermální a endodermální buňky migrují skrz primitivní proužek a tyto migrující buňky ztrácejí E-kadherin. Brzy po vzniku primitivního proužku migrující buňky vytvářejí ve štěrbině mezi epiblastem a hypoblastem mezenchym, odpovídající za vznik pojivové tkáně. Buňky migrující skrz uzel (savčí organizační centrum) dávají vznik notochordu. Notochord vytyčuje základní osu zárodka a je základ pro vývoj axiálního skeletu. Notochord plní v časném zárodku funkci primárního induktoru- indukuje nad ním uložený ektoderm, který se ztlušťuje a vzniká podélná neurální ploténka. Neurulace je proces, při kterém dochází ke vzniku neurální ploténky a neurálních valů, které vznikají z okrajů neurální ploténky. Později vzniká spojením valů nervová trubice. Při tomto splývání se uvolňují neuroektodermové buňky neurální lišty, které migrují podél nervové trubice a rozšíří se po celém embryu (viz str. 31 a obr. 15). Migrující buňky neurální lišty dávají vznik např. buňkám spinálních ganglií, ganglií autonomního nervového systému, Schwannovým buňkám a mimo jiné i odontoblastům (Moore a Persaud, 2002; Gilbert, 2003). Neurulací začíná důležitá fáze vývoje, kdy se zakládají orgánové systémy a formují se základní zevní charakteristiky embrya.

Mezi základní morfogenetické procesy patří buněčná proliferace, migrace, apoptóza a adheze. Morfodiferenciace je proces, který je chápán jako výsledek morfogenetických mechanismů.

3. VÝVOJ ZUBŮ

Normálně se vyvíjí u savců dvě sady zubů: mléčná a permanentní dentice. V každém čelistním kvadrantu suchozemských savců nalezneme předozadně na čelisti řezáky a špičáky (zuby jednohrbolkové), zuby třenové a stoličky (zuby mnohohrbolkové). Zuby se vytvářejí na orálním povrchu horní a dolní čelisti, které jsou deriváty 1. žaberního oblouku. Zubní základy jsou odvozeny od 2 typů buněk, ektodermu a ektomezenchymu (odvozeného od buněk hlavové neurální lišty).

Vývojová stádia zubů jsou pojmenována podle tvaru zubního epitelu na frontálních řezech- epitelové ztlustění, zubní lišta, pupen, pohárek, zvonek. Avšak na 3D rekonstrukcích zubního epitelu se ukázalo, že tyto termíny nemusí vyjadřovat opravdové tvary zubního epitelu (Peterková et al., 2002) (obr. 1).



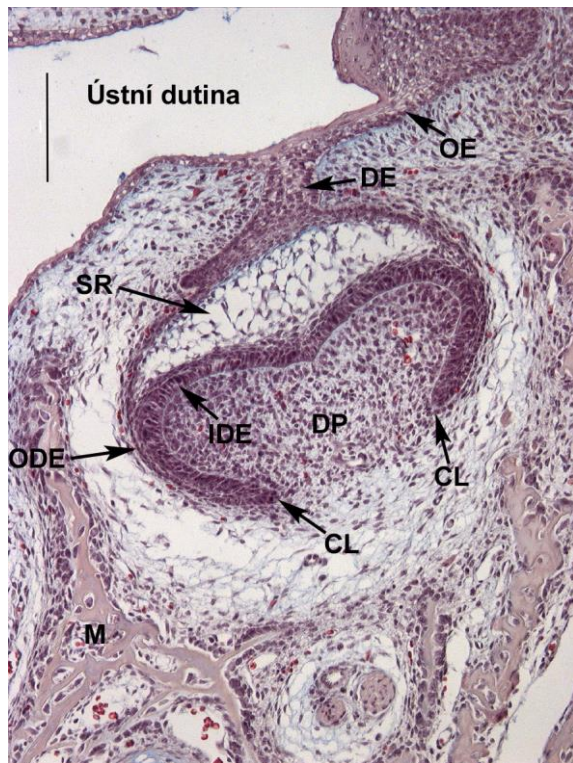
Obr. 1 Stádia vzniku prvního moláru myšního embrya na embryonálních dnech 12.5 (A-C), 13.5 (D, E), 14.0 (F, G), 14.5 (H, I) a 16.0 (J, K). V první řadě (A, B, D, F, H, J) jsou obrysy zubního epitelu na frontálních řezech, v druhé řadě (C, E, G, I, K) jsou 3D rekonstrukce zubního epitelu. (A) epitelové ztlustění, (B) zubní lišta, (D, E) zubní pupen, (F, G) časný pohárek, (H, I) pohárek a (J, K) zvonek. (Převzato z Peterková et al., 2002).

První morfologická známka vývoje zubu je charakterizována ztlustěním orálního epitelu a kondenzací přilehlého mezenchymu. Názory na proces vzniku zubní lišty se liší, mnozí autoři uvádějí, že počátek zubního vývoje je charakterizován specificky lokalizovaným epitelovým ztlustěním, které podstupuje zvýšenou proliferaci a tím vytváří zubní pupen. Jako důkaz uvádějí specifickou expresi SHH v orálním epitelu, který je považován za stimulantu buněčné proliferace v epitelu i mezenchymu (Hardcastle et al., 1998; Sarkar et al., 2000; Cobourne et al., 2001). Avšak Ruch ve své práci z roku 1984 uvádí, že vznik zubní lišty nebo pupenu nezahrnuje zvýšení proliferace epitelových buněk, ale spíše specifické orientace mitotických vřetének- podélnou osou kolmo k bazální membráně. Také zmiňuje, že mitotický index (poměr buněk proliferujících a neproliferujících) je signifikantně nižší v epitelových buňkách než v buňkách mezenchymálních (Ruch, 1984). Pourtois (1961) ve své práci

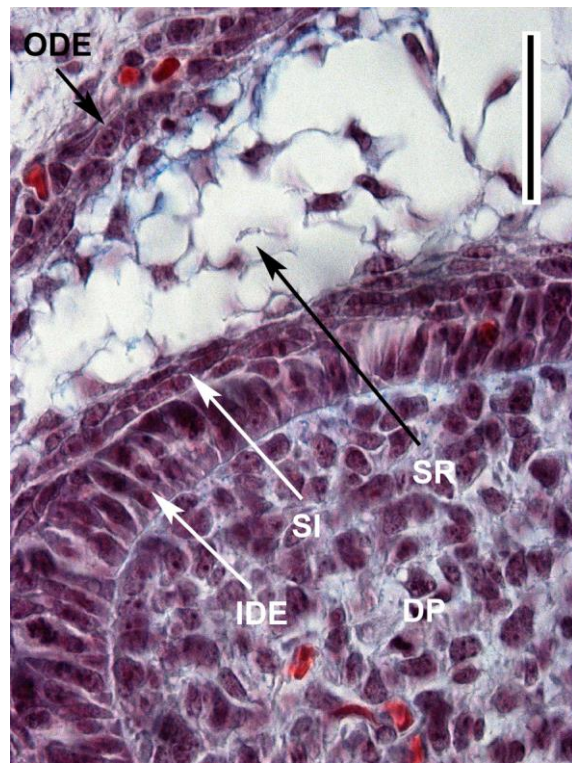
navrhuje jiné vysvětlení vzniku zubní lišty: během vchlípení zubního epitelu dochází ke sklouznutí povrchových epitelových buněk do vytvářejícího se žlábků (Peterková et al., 2002).

Jakmile zubní pupen dosáhne své plné velikosti nabývá tvaru pohárku. Stádium pohárku je spojeno se vznikem cervical loop, která obrůstá mezenchym zubní papily. Pro stádium pohárku je charakteristická histodiferenciace vnějšího a vnitřního zubního (sklovinného) epitelu a hvězdicovitého retikula (stellate reticulum) (obr. 2).

A.



B.



Obr. 2 Frontální histologické řezy prvního dolního moláru na stádium zvonku u myšičího embrya ve stáří ED 17.5. **(A)** DP- dentální papila, CL- cervical loop, IDE- inner dental epithelium (vnitřní zubní epitel), ODE- outer dental epithelium (vnější zubní epitel), SR- stellate reticulum, DE- dentální epitel stopky sklovinného orgánu, OE- orální epitel, M- mandibula. Zubní vak je prosvětlená tkáň kolem zubního zárodku. Měřítka ukazují vzdálenost 100 μm . **(B)** DP- dentální papila, IDE- vnitřní zubní epitel, SI- stratum intermedium, SR- stellate reticulum, ODE- vnější zubní epitel. Měřítka ukazují vzdálenost 30 μm .

Stádium zvonku je charakteristické diferenciací mezenchymálních buněk v odontoblasty. Diferenciace odontoblastů je ukončena jejich vystoupením z buněčného cyklu, prodloužením buňky, polarizací jádra a produkcí predentinové matrix (Slavkin a Bringas, 1976). Odontoblasty produkují predentin (kolagenní extracelulární matrix), který se později kalcifikací mění na dentin. Buňky vnitřního zubního (sklovinného) epitelu se diferencují v ameloblasty produkující enamelovou matrix, která se mineralizací mění ve sklovinu- v nejtvrďší tkáň v těle (Moore a Persaud, 2002). Diferenciace ameloblastů zahrnuje značný růst, prodloužení buňky, změny v polaritě jader a organel a výskytu cytoskeletu

(Slavkin, 1974). Během vývoje sklovinného orgánu a dentální papily kondenzuje okolní mezenchym do struktury zubního vaku, ze kterého později vzniká cement (tuhá pojivová tkáň pokrývající dentin kořene zuby) a periodontální tkáň, která upevňuje zuby v zubním lůžku (Moore a Persaud, 2002) (obr. 2).

V myších řezácích je obnova epitelu produkujícího sklovinnou matrix a/nebo indukce mezenchymálních buněk k tvorbě dentinu zajištěna epitelovými kmenovými buňkami, které sídlí v cervical loops na apikálním konci sklovinného orgánu. Zubní kmenové epitelové buňky zde dávají vznik čtyřem buněčným liniím- vnitřnímu zubnímu (sklovinnému) epitelu, stratum intermedium, stellate retikulum a vnějšímu zubnímu (sklovinnému) epitelu (Harada et al., 2002).

Mezenchymální kmenové buňky byly objeveny v lidské dospělé zubní pulpě, v lidské mléčné dentici a periodontálním ligamentu (Shi et al., 2005).

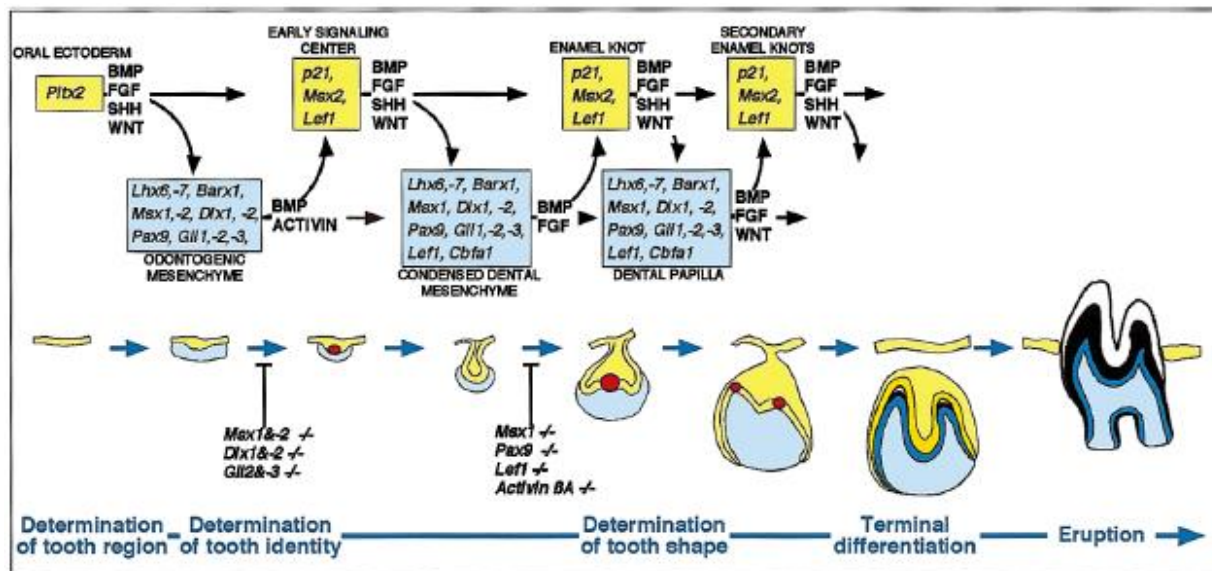
V dnešní době je nejvíce využívaným modelem pro studium zubního vývoje savčí dentice u laboratorní myši. Myší dentice obsahuje pouze jednu generaci zubů s redukováným počtem. V každém zubním kvadrantu je 1 řezák oddělený od 3 molárů bezzubou oblastí nazývanou diastema.

3.1 EPITEL-MEZENCHYMÁLNÍ INTERAKCE v zubním vývoji

Morfogeneze všech epitelových derivátů je regulována sledem vzájemných interakcí mezi prvky epitelové a mezenchymální tkáně. Mezi ektodermální deriváty patří chlupy, zuby, nehty, rohy a některé žlázy (jako je mléčná, slinná a potní) a jejich počáteční vývoj je podobný. Mezi hlavní signální molekuly zahrnuté v epitel-mezenchymálních interakcích patří molekuly proteinových rodin FGF, HH, TGF- β , Wnt a TNF (Pispa a Thesleff, 2003-review) (obr. 3).

Rekombinační experimenty ukazují, že za indukci zubního vývoje je odpovědný orální epitel a indukovat zubní růst je schopen, i když ektomezenchym neurální lišty nepochází z 1. žaberního oblouku (Lumsden, 1988; Mina a Kollar, 1987). Molekulární vysvětlení poskytly pokusy, při kterých byl odstraněn orální ektoderm, a tím docíleno ztráty exprese téměř všech ektomezenchymálních homeobox genů. Po přidání exogenního FGF-8 došlo k navrácení exprese mnoha těchto genů (Ferguson et al., 2000) Na ED (embryonálním dni) 10.5 jsou epitelové signály nutné pro správný zubní vývoj a mezenchymální expresi genů, avšak již na ED 11.5 je mezenchymální exprese nezávislá na epitelu, z čehož vyplývá, že počáteční signál tvorby zuby spočívá v epitelu a později, během vývoje, se přesune do NCC odvozeného ektomezenchymu (Ferguson et al., 2000).

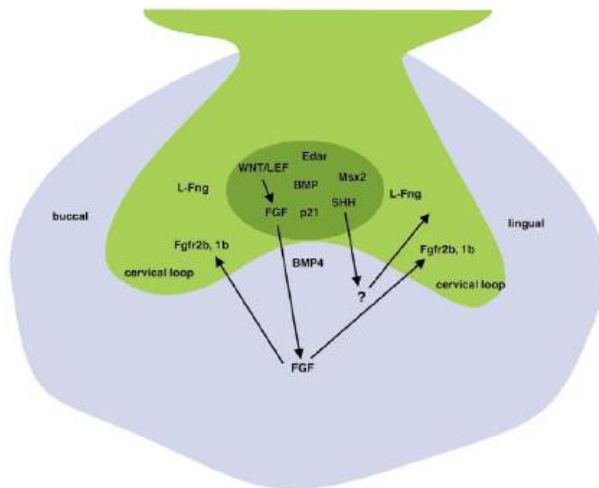
Orální (tj. lokalizovaný při ústním povrchu) ektomezenchym interakcemi s přilehlým orálním ektodermem hraje roli ve vzniku zubů, zatímco aborální (vzdálenější od orálního povrchu) ektomezenchym dává vznik Meckelově chrupavce.



Obr. 3 Schématický přehled signálů a transkripčních faktorů, které zprostředkovávají vzájemné epitel- mezenchymální interakce u vyvíjejícího se zubu. Nahoře jsou ukázány molekulární kaskády a dole odpovídající morfologická stádia zubního vývoje. U epitelového ztluštění a zubního pupene jsou vyznačeny experimenty s knockout myšmi, u kterých byl zubní vývoj zastaven v daném morfologickém stádiu. Žlutě je označen zubní epitel, červeně sklovinné uzly a modře zubní mezenchym. (Převzato z Jernvall a Thesleff, 2000).

3.2 SIGNALIZAČNÍ CENTRUM ZUBNÍHO VÝVOJE- Sklovinný uzel (enamel knot)

Od objevu Spemanna a Mangolda organizační aktivity rtu blastoporu, byly u obratlovců objeveny další organizační tkáně, které regulují vznik tkání a tvar orgánů. Např. vývoj končetiny je regulován souhrou signálů ze 3 různých signalizačních struktur: 1) z apikální ektodermální lišty (AER) exprimující Fgf-4, 2) zóny polarizační aktivity (ZPA) exprimující Shh (AER i ZPA exprimují stejné Bmp jako sklovinný uzel) a 3) dorzálního ektodermu. Bylo objasněno, že signály patřící k HH, Wnt, FGF a BMP rodině zprostředkovávají organizační efekty různých signálních tkání. Tyto signální molekuly se vyskytují také v zubním sklovinném uzlu, který byl označen jako signalizační centrum zubního vývoje (Jernvall et al., 1994; Vaahtokari et al., 1996) (obr. 4).



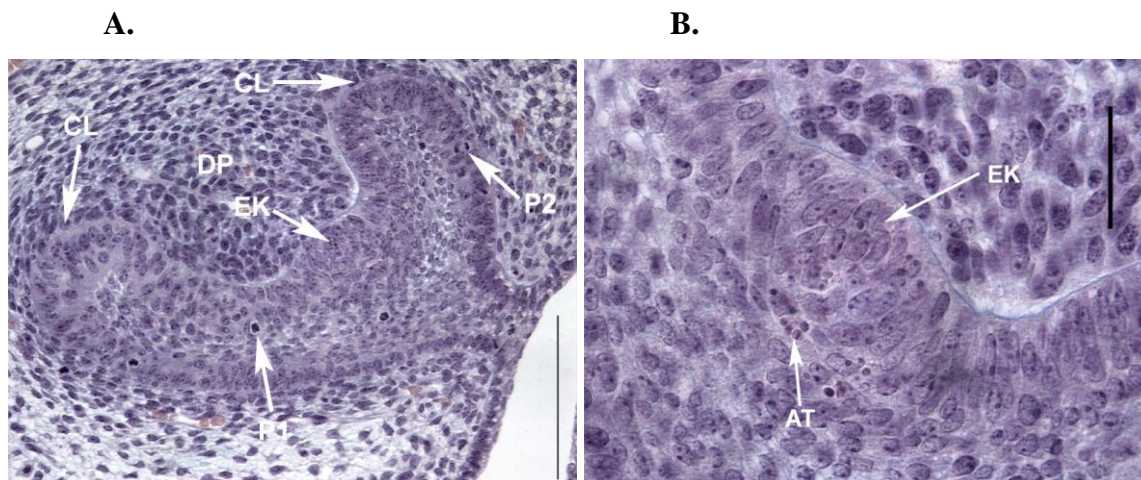
Obr. 4 Regulace morfogeneze zuby signalizačním centrem- sklovinným uzlem. Sklovinný uzel je označen tmavě zeleně, je v něm exprimováno více než 10 signálních molekul, které regulují růst a morfogenezi zubní korunky. Wnt signalizace, zprostředkovaná LEF1, ve sklovinném uzlu zvyšuje expresi FGFs v epitelu, které indukují mezenchymální FGFs. Mezenchymální FGFs pravděpodobně hrají významnou roli ve stimulaci proliferace v cervical loops. SHH ze sklovinného uzlu reguluje skrz mezenchym epitelový růst. (Převzato z Pispá a Thesleff , 2003).

Sklovinné uzly jsou v literatuře spojovány s proliferací a migrací buněk (viz níže).

Počátek vzniku zubního pupenu je spojován se vznikem přechodných epitelových signalizačních center exprimujících molekuly všech 4 základních proteinových rodin, ale také p21, Msx2 a Lef 1 (Dassule a McMahon, 1998).

Předpoklad, že sklovinný uzel reprezentuje specifickou buněčnou linii s jednoznačným osudem je podporován expresí cyklin dependentního kinázového inhibitoru p21, který je spojen s terminální diferenciací mnoha buněčných typů. P21 je spojován s únikem z G1 fáze buněčného cyklu, je také exprimován v AER. Sklovinný uzel je rozeznáván díky nulové inkorporaci BrdU (Bromo- deoxyuridine), a tak reprezentuje neproliferativní doménu (Vaahtokari et al., 1996). Transkripční faktory Msx-1, Lef-1 exprimované v zubním mezenchymu jsou důležitými faktory pro vznik sklovinného uzlu, což vyplývá ze zastavení zubního růstu v pozdním stádiu pupenu u Msx-1 nebo Lef-1 delečních myších mutantů. Sklovinný uzel exprimuje Fgf-4,9, Shh, Bmp-2, 4 a 7.

Primární sklovinný uzel je přechodná populace epitelových buněk ve středu zubního pohárku. Je v blízkém kontaktu s přilehlým mezenchymem zubní papily (Tucker a Sharpe, 1999- review). Na histologických řezech je pozorován na časném stádiu pohárku jako pevně sbalený shluk epitelových buněk (Thesleff a Sharpe, 1997- review) (obr. 5).



Obr. 5 Frontální histologické řezy horního moláru na stádiu pohárku u myších zárodků ve stáří ED 15.5. (A) EK- enamel knot (sklovinný uzel), DP- dentální papila, CL- cervical loop, P1- metafáze, P2- anafáze. Měřítka ukazují vzdálenost 100 μm . (B) EK- enamel knot (sklovinný uzel), AT- apoptotická tělíska. Měřítka ukazují vzdálenost 30 μm .

Je vcelku zajímavé, že sklovinný uzel exprimuje růstové faktory, ale sám zůstává bez proliferace, což je spojováno s nedostatkem FGF receptorů ve sklovinném uzlu (Kettunen et al., 1998). Buňky sklovinného uzlu podstupují apoptozu a uzel se začíná vytrácet během přechodu zubního pohárku ve zvonek. Apoptóza přítomná ve sklovinném uzlu je považována za mechanismus, který kontroluje dobu trvání signalizace (Vaahtokari et al., 1996). Nové sekundární sklovinné uzly se vytvářejí de novo na vrcholcích budoucích zubních hrbolků během pozdního stádia pohárku a časného stádia zvonku (ED 16). Exprimují *Fgf4* a jsou také odstraněny apoptozou, jejich funkce je opět kontrola proliferace (Vaahtokari et al., 1996; Coin et al., 1999).

Jedna z teorií uvádí, že buňky primárního sklovinného uzlu mohou mít buněčnou spojitost se sekundárními sklovinnými uzly, pravděpodobnou migrací nebo buněčným dělením přežívajících buněk primárního uzlu. Tímto by některé buňky utekly apoptotickému osudu (Coin et al., 1999). Tato teorie byla vyvrácena v práci Matalové et al. (2005), kde buňky primárního sklovinného uzlu byly označeny lipofilní barvou DiI, která se váže na buněčné membrány. Izolované mandibuly myších zárodků ED 14.5 byly nakrájeny na frontální plátky o tloušťce 250 μm , buňky sklovinného uzlu obarveny DiI a *in vitro* kultivovány. Tato studie ukázala, že nedělící se buňky primárního sklovinného uzlu nepřispívají ke vzniku sekundárního sklovinného uzlu svou migrací ani proliferací přežívajících buněk (Matalová et al., 2005).

3.3 APOPTOZA- významný faktor vývoje dentice

Buněčná smrt může být rozdělena na dva odlišné typy: 1) Buněčná nekróza, je způsobena akutním poškozením tkáně. Nekrotické změny v buňce vedou nakonec k buněčnému vylití do okolí. 2) Programovaná buněčná smrt (PCD)- apoptoza, se uplatňuje při regulaci buněčného počtu, odstraňování poškozených (defektních) buněk během vývoje, růstu a obnovy tkání.

Charakteristický morfologický znak apoptozy je kondenzace cytoplazmy, segregace a zhutnění chromatinu a nukleozomální fragmentace. Kondenzované jádro a cytoplazma se pak rozpadají na apoptotická tělíška různých velikostí.

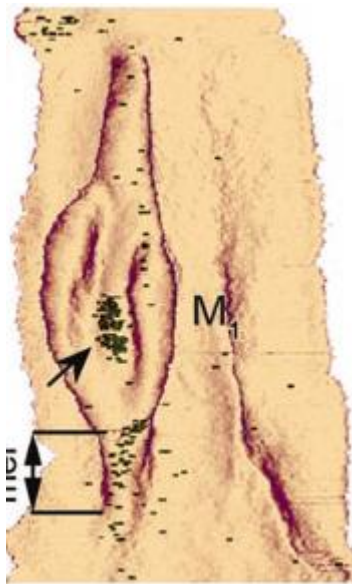
Dle Glücksmanna může být PCD rozdělena jako a) fylogenetická PCD, je zapojená při ztrátě vestigiálních struktur (rudimentárních struktur, které jsou pozůstatkem po vývojových předcích) b) morfogenetická PCD, uplatňuje se při vzniku specifických tvarů, c) histogenetická PCD, je spojená s buněčnou diferenciací. Apoptoza hraje všechny tři role během vývoje zubů u myši (Peterková et al., 2002).

Apoptoza se uplatňuje při determinaci počtu funkčních zubů eliminací zubních vestigiálních primordií v budoucí bezzubé oblasti čelisti (diastemě) (Peterková et al., 2003). Bylo dokumentováno, že exprese některých molekulárních markerů (Msx2, Pax9) chybí v oblasti rudimentálních zubních základů v myši diastemě a že ztráta exprese těchto genů může hrát roli v regresi diastemových zubních základů (Turečková et al., 1995; Keranen et al., 1999). Morfogenetická funkce apoptozy spočívá v potlačení buněk zubního epitelu ve specifických oblastech zubních základů (přední hranice řezáku a první stoličky, střed zubního pohárku) (Lesot et al., 1999).

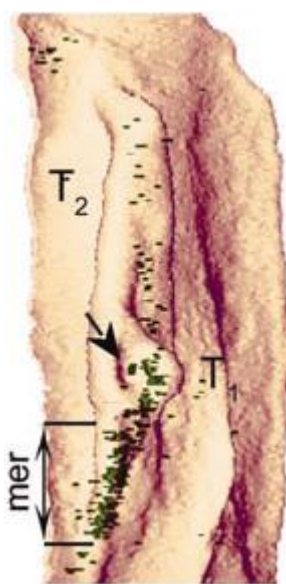
Apoptoza se objevuje také během diferenciaci ameloblastů. Přibližně 50 % ameloblastů mezi sekreční a pozdní zrací fází podstupuje apoptózu. Ta se nevyhne ani odontoblastům, apoptoza v odontoblastech byla prokázána v hlodavcích řezácích a lidských stoličkách různého věku. Apoptoza hraje důležitou roli v regulaci celkového počtu zubů dentice, morfogenezi zubů a korunky (Matalová et al., 2004-review).

Apoptoza sledovaná na 3D rekonstrukcích zubního epitelu dolní čelisti byla obecně zvýšena u Tabby myši (charakterizace těchto mutantů viz kapitola „TNF“). Avšak zdá se, že mutace v EDA genu není primární příčinou zvýšení apoptozy. Apoptoza je v tomto případě spíše důsledek poruchy vývoje dentice, pravděpodobně způsobené defektem v segmentaci zubního epitelu Tabby myši (Boráň et al., 2005) (obr. 6).

A. WT



B. Tabby mutant

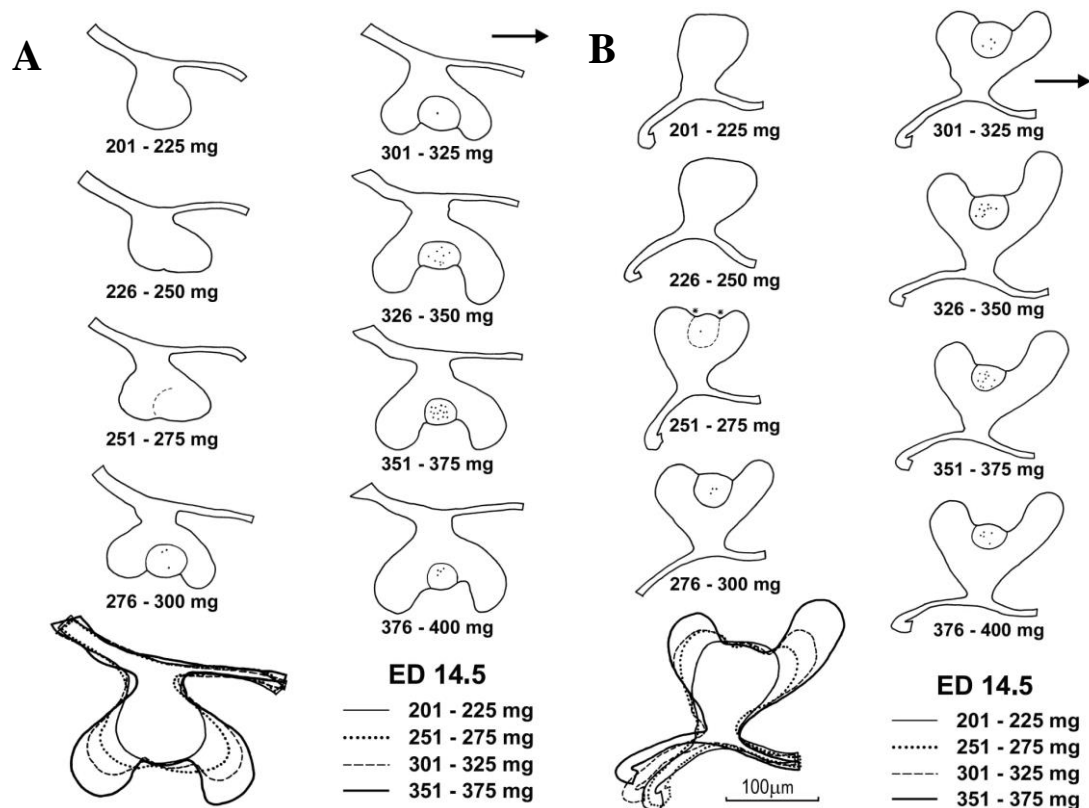


Obr. 6 Apoptoza na 3D rekonstrukcích zubního epitelu ED 15.5 dolní čelisti u myšičího zárodka na stádiu ED 15.5. Apoptoza charakterizována apoptotickými buňkami a tělísky (černé tečky) je zvýšena u Tabby myšičí (vpravo) ve srovnání s wild type myšičí (vlevo). Šipka označuje apoptozu v primárním sklovinném uzlu. (Převzato z Boráň et al., 2005).

3.4 DETERMINACE STÁDIA ZÁRODEČNÉHO A ZUBNÍHO VÝVOJE

Růst během embryonálního vývoje je obecně zprostředkován buněčnou proliferací, která je kontrolována růstovými faktory, které mohou být ovlivněny epigenetickými faktory. Vývojový stupeň jednotlivých myšičích embryí ani v jednom vrhu proto nebývá stejný, liší se tedy stádium jejich vývoje (biologický věk), ačkoli chronologický věk (embryonální den) je totožný. Genová exprese je časově závislá, znalost biologického stádia vývoje zárodka proto není nutná pouze pro morfologické studie, ale i studie signálních molekul, jejich exprese a vzájemných interakcí. Je proto důležité nalézt snadno měřitelnou veličinu, která napomůže správnému vyhodnocení biologického stádia vývoje experimentálních zárodků určitého stáří. Během časných stádií může pro tento účel sloužit počet somitů (Goedbloed, 1986). Pro pozdější stádia lze použít morfologická kritéria- porovnání vývoje vnějších a vnitřních orgánů dle Kaufmanova atlasu myšičího vývoje. Ukázalo se však, že tato kritéria nejsou dostatečně přesná pro detailní určování stádia myšičích zárodků především během časného období morfogeneze. Metodicky velice nenáročnou metodou je použití hmotnosti zárodků k upřesnění jejich stádia vývoje. V práci Peterky (2002) je uvedeno porovnání mezi embryonálním dnem, hmotností a zubním věkem myšičí. Bylo zkoumáno 749 zárodků od ED 12.5 až po narození. Zubní věk byl určován porovnáváním histologických řezů procházejících středem prvního horního a dolního moláru. Výsledky ukázaly rozdíly hmotností zárodků mezi jednotlivými vrhy různých samic, ale i v rámci vrhu jedné samice. Byla prokázána korelace mezi hmotností zárodka a stádiem zubního vývoje (obr. 7). Metoda vážení embryí se ukazuje jako velmi snadná a rychlá, která usnadní především interpretaci dat získaných z experimentů

(Peterka et al., 2002). Správné stádiování je nesmírně důležité ve správné interpretaci výsledků experimentů prováděných (nejen) v časném zubním vývoji (Miletich a Sharpe, 2004-review).



Obr. 7 Korelace mezi stádiem zubního vývoje a hmotností myších zárodků na ve stáří ED 14.5. Znázorněny jsou obrysy zubního epitelu na frontálních řezech středem sklovinného orgánu. (A) dolní první molár, (B) horní první molár. Zubní stádia jsou prezentována pro jednotlivé třídy po 25 mg dle hmotnosti zárodku. Plné nebo čárkované kruhy označují přibližnou hranici sklovinného uzlu. Černé tečky ukazují apoptozu. (Převzato z Peterka et al., 2002).

4. PROLIFERACE

Proliferace je termín označující buněčné dělení, často zahrnující i buněčný růst (Hipfner a Cohen, 2004-review). Počet buněk orgánu je ovlivňován měrou jejich proliferace, diferenciací a smrti. Buněčná proliferace je výsledkem kontrolované aktivace či inaktivace regulátorů buněčného cyklu jako jsou cykliny, protein kinázy nebo fosfatázy. Jak jsou signály buněčných receptorů zapojeny v regulaci buněčných událostí jako je proliferace, diferenciací a apoptóza je však ne zcela známo (Bonney- Berard et al., 2004- review).

Extracelulární signální molekuly regulující buněčnou velikost a počet jsou obecně rozpustné proteiny vázané k buněčnému povrchu, nebo komponenty extracelulární matrix. U většiny živočišných buněk mitogeny (faktory stimulující buněčnou proliferaci) kontrolují míru buněčného dělení v G1 fázi a stimulují přechod buněk do S fáze. Prvotní signál je vazba mitogenu k extracelulárnímu receptoru a zahájení signální kaskády vedoucí k regulaci exprese genů v jádře. Většina mitogenů má mnoho jiných funkcí mimo stimulaci buněčného dělení,

např. stimulace buněčného růstu, přežívání, diferenciace nebo migrace. Mnoho mitogenních signalizací začíná aktivací malé GTPázy Ras, která vede k aktivaci MAP kinázové kaskády, to vede ke zvýšení hladiny genového regulátoru (protoonkogenu) Myc, který podporuje vstup buňky do buněčného cyklu (zvyšuje expresi D-cyklinů). Ačkoli není známo, jakým způsobem buňky detekují nadměrné množství mitogenů, stimulace často vede k produkci inhibitoru buněčného cyklu p19^{ARF}, který inhibuje Mdm2. To má za následek zvýšení hladiny p53 a tím zastavení buněčného cyklu nebo apoptozu (více viz „Regulace buněčného cyklu“) (Alberts et al., 2003).

Myc rodina transkripčních faktorů (TF) kontroluje buněčnou proliferaci. Savci mají tři Myc proteiny (c-Myc, N-Myc a L-Myc), které pravděpodobně spíše ladí expresi cílových genů, než-li ji vypíná či zapíná. Myc TF ovlivňují přibližně 10-15% všech genů v buňce kódující enzymy proteinové syntézy a regulátory buněčného cyklu (Hipfner a Cohen, 2004- review). Chyba v jakémkoli kroku buněčného cyklu vede k zastavení buněčného cyklu a/nebo apoptoze. Buněčný cyklus a buněčná smrt jsou proto dva důvěrně spojené procesy (Bonney-Berard et al., 2004- review). Rychle rostoucí tkáně typické pro embryonální vývoj vyžadují proliferaci i apoptozu. Overexpresí c-Myc u *Drosophily* a podobně i u myši je zvýšena proliferace a kompenzační apoptóza, naopak odstranění genu c-Myc vede ke snížení růstu embrya a jeho smrti. Důsledek aktivace c-Myc genu je proto závislý na dostatečném množství přeživacích faktorů (survival factors), aby zabránily apoptoze. Přeživací faktory jsou mitogeny a růstové faktory.

Kontrola proliferace a buněčného přežívání na tkáňové úrovni závisí na buněčné kompetici, kdy pomalu se dělicí buňky jsou eliminovány apoptozou v důsledku rychle se dělicích se buněk. Buněčná kompetice je mechanismus, který pravděpodobně zajišťuje regulaci konečné velikosti tkáně či orgánu. Regulace růstu během embryonálního vývoje závisí na hladině sekretovaných ligandů podporujících proliferaci a buněčné přežívání. Nesprávná regulace Wnt, HH nebo EGF signalizace může vést ke vzniku nádorů u myši. Je otázkou, zda kompetice o signální proteiny je důležitým mechanismem udržení rovnováhy mezi buněčnou proliferací a apoptozou v embryonálním vývoji obratlovců (Hipfner a Cohen, 2004- review).

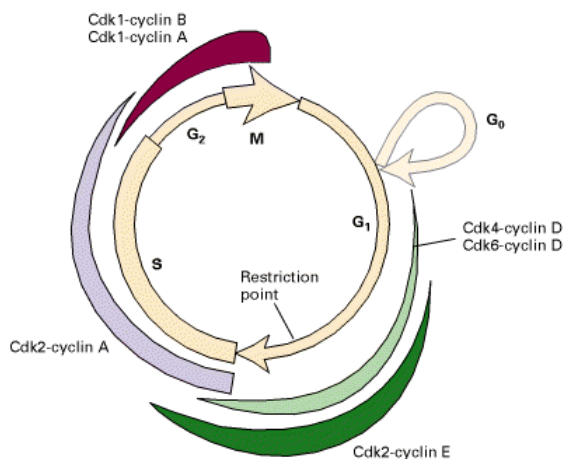
Geny, jejichž mutace jsou zodpovědné za vznik nádorového bujení, jsou označovány jako protoonkogeny. Porucha v regulaci proliferace dohromady se supresí apoptozy jsou minimální požadavky proto, aby se buňka stala rakovinnou (Hipfner a Cohen, 2004- review).

4.1 STRUČNÝ PŘEHLED BUNĚČNÉHO CYKLU

Buněčný cyklus se skládá ze čtyř fází: G₁, S, G₂ a M fáze. V interfázi je zahrnuta G₁, S (syntetická) a G₂ fáze, na kterou navazuje buněčné dělení-mitóza, která v savčích buňkách trvá přibližně 1 hodinu. Funkce buněčného cyklu je zdvojit množství DNA chromozomů a rozdělit ji do dceřinných buněk.

4.1.1 Regulace buněčného cyklu

Proteiny kontrolující buněčný cyklus jsou evolučně konzervované a stejné pro všechna eukaryota. Cdc geny (cell-division-cycle genes) identifikované u kvasinek kódují nepostradatelné komponenty systému kontroly buněčného cyklu. Kontrolní body (checkpoints) zajišťují, že buňky vstoupí do další fáze buněčného cyklu, pouze pokud předcházející fáze byla dokončena bez chyb. Základním prvkem v kontrolním systému buněčného cyklu jsou serin-threoninové cyklin-dependentní kinázy (Cdks), které jsou enzymaticky aktivní pouze pokud se pevně váží k cyklinům a společně vytváří cyklin-Cdk komplexy (G₁-Cdk, G₁/S-Cdk, S-Cdk a M-Cdk) (Alberts et al., 2002). Cykliny jsou regulátory Cdks a kolísají během cyklu, cykliny D a E regulují průběh G₁-S fáze, cykliny A a B průběh S-G₂-M (Hipfner a Cohen, 2004- review) (obr. 8).



Obr. 8 Aktivita savčích Cdk-cyklin komplexů během buněčného cyklu. Šířka barevných pruhů přibližně odpovídá aktivitě protein kináz v příslušném Cdk- cyklin komplexu. (Převzato z Lodish et al., 2000).

Cdks integrují extracelulární a intracelulární signály a regulují průchod buněčným cyklem. K plné aktivaci cyklin-Cdk komplexu je zapotřebí kináza CAK (Cdk- activating kinase) (Humbert et al., 2004-review). Regulace buněčného cyklu je zajištěna např. Wee1 kinázou inhibující aktivitu Cdk nebo fosfatázou Cdc25, která může Cdks aktivitu zpět zvýšit. Cyklin-Cdk komplexy mohou být regulovány vazbou Cdk-inhibitorovými proteiny (CKIs). CKI se dělí do dvou skupin: INK4 (Inhibitors of kinase 4) a CIP (Cdk inhibitory proteins).

P21 patří mezi CIP inhibitory, obsahuje NLS (jaderný lokalizační signál), váže a inhibuje PCNA, který je nutný pro replikaci DNA. V savčích buňkách poškození DNA vede k aktivaci genového regulátoru p53. Ten stimuluje transkripci dalších genů, např. gen pro CKI protein p21, který se váže k G1/S-Cdk a S-Cdk komplexům a inhibuje jejich aktivitu a tím vstup do S fáze. V nepoškozených buňkách p53 interaguje s proteinem Mdm2, který funguje jako E3-ubiquitin ligáza a směřuje p53 k degradaci do proteazomu (Alberts et al., 2002). P53 je TF fungující jako tumor supresorový protein, reguluje expresi genů blokující průběh buněčným cyklem a nebo ty, které zahajují apoptozu jako odpověď na poničení DNA a buněčný stres (Hipfner a Cohen, 2004- review).

4.1.2 Průchod buněčným cyklem

Vstup a průchod G1 fází jsou závislé na buněčném typu. G1 fáze obsahuje tzv. restriční bod, ve kterém se buňka dle vnějších vlivů (extracelulárních signálů, např. mitogenů) rozhoduje, zda vstoupí do buněčného cyklu nebo unikne vstupem do G0-fáze. Tkáňové kmenové buňky vystupují z G0 do G1 fáze za účelem obnovy opotřebované nebo poškozené tkáně a tento proces je závislý na Wnt nebo HH signalizaci (uplatňuje se např. při obměně vnitřní výstelky tenkého střeva nebo při obnově epidermis). Extrémním příkladem průchodu buněčným cyklem je časný embryonální vývoj, kde G1 a G2 fáze de facto chybí a v cyklu se střídají pouze S-fáze a mitóza (Massague, 2004- review). Jakmile je buněčný cyklus rozběhnut a buňka se dostane do S-fáze, je regulace cyklu otázkou nezávislou na vnějších vlivech. Členové rodiny TF E2F kontrolují expresi genů zahrnutých v průběhu buněčného cyklu, např. expresi cyklinu E, Cdc25 fosfatázy a komponent DNA syntézy (Humbert et al., 2004- review). Cyklin D v komplexu s Cdk 4 a 6 zajišťuje kritické spojení mezi extracelulárními signály a hlavním mechanismem buněčného cyklu. Přejít z G0 do časně G1 fáze je regulován cyklin D/Cdk 4 a Cdk 6 komplexy, které fosforylují p130 (člen Rb proteinové rodiny), a tím uvolňují a aktivují E2F4 potřebný pro přechod do G1 fáze (Bonney- Berard et al., 2004- review).

Pro přechod z G1 do S-fáze je nutná interakce Cdk2 a cyklinu E . Exprese cyklinu E je inhibována pRb vazbou na E2F. Fosforylací pRb (vyvolaná mitogeny přes Cdk 6/4) je uvolněn gen E2F a je možná jeho transkripce (Massague, 2004- review).

S-fáze slouží jako prostor pro syntézu potřebných komponent před rozdělením buňky. Hlavním procesem je replikace DNA.

V mitotické fázi dochází k segregaci zduplikovaných chromozomů. Mitóza se skládá ze čtyř fází: profáze, metafáze, anafáze a telofáze. V profázi se rozpadá jaderná membrána a

dochází ke kondenzaci chromatinu, chromozomy putují do středu buňky. V metafázi se chromozomy vyrovnají v ekvatoriální rovině, každá chromatida je plně kondenzována. V anafázi dochází k oddělení chromatid v oblasti centromery a sesterské chromatidy putují k opačným pólům buňky. V telofázi dochází k obnově jaderné membrány a dekonenzaci chromatinu. Ze všech známých mutantů v genech buněčného cyklu vyplývá, že u myši jsou pro mitotickou fázi nepostradatelné geny pro cyklin A2, cyklin B1 a Cdk1. Cyklin B a Cdk 1 vytváří MPF (M-phase promoting factor) a pro přechod do mitotické fáze je nutný cyklin A2. Cdc25 reguluje stabilitu komplexu Cdk1/cyklin B (MPF) (Humbert et al., 2004-review).. MPF v časně profázi fosforyluje seriny jaderných lamin a dochází k rozpadu jaderného obalu na vezikuly. Specifické fosfatázy pak zajistí v telofázi reorganizaci jaderného obalu. Aktivace APC (anaphase promoting complex) je zahájena polyubiquitinací anafázového inhibitoru. APC zajišťuje správné rozdělení chromozomů a zabraňuje akumulaci mitotických regulátorů v G1 fázi, a tím zabraňuje předčasný vstup do buněčného cyklu. MPF fosforylací inhibuje i segregací aparát, specifické fosfatázy v pozdní anafázi aktivují myosin a umožní rozdělení chromozomů (Lodish et al., 2000)

5. Přehled hlavních růstových faktorů a signálních molekul důležitých v embryogenezi

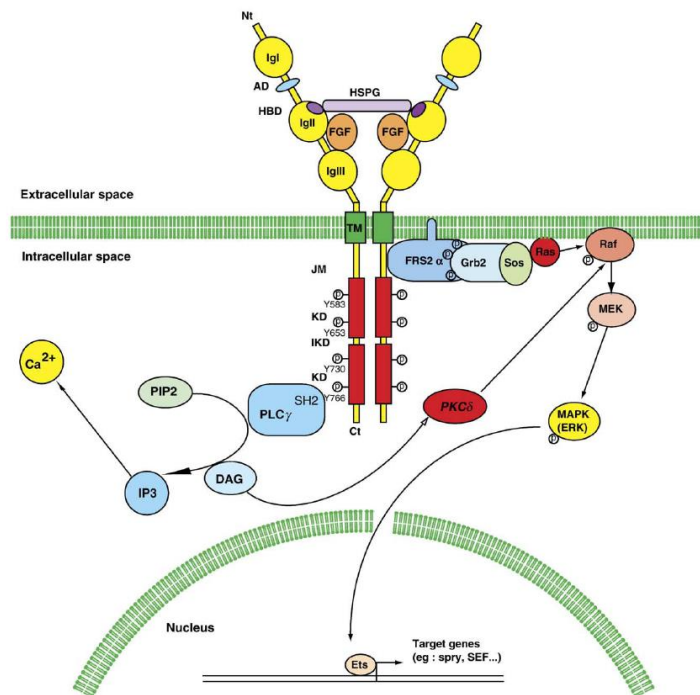
Nejspecifičtější pro embryonální vývoj jsou parakrinní interakce (signální molekula difunduje na malé vzdálenosti a indukuje změny v sousedních buňkách). Parakrinní faktory rozdělujeme do rodin založených na jejich struktuře. Jsou to: FGF, HH, Wnt, TGF- β nadrodina.

Tyto faktory jsou zároveň nejdůležitějšími složkami signalizace ve vývoji zubu (Gilbert, 2003). Proteiny různých signálních rodin se vzájemně ovlivňují, jejich exprese musí být časoprostorově přísně regulována.

Nebyly nalezeny žádné myší mutanty, které by nevykazovaly alespoň počátečné stádium zubního vývoje- vznik epitelového ztluštění. Minimální stádium, ve kterém lze zubní vývoj zastavit je epitelové ztluštění. Mutacemi v genech, které jsou nezbytné pro časný vývoj zubů jako je Lef-1, Msx-1, Pax-9, lze zubní vývoj zastavit v pozdním stádiu pupenu (Tucker a Sharpe, 1999- review; Peters a Balling, 1999- review).

5.1 FIBROBLAST GROWTH FACTORS (FGFs)

FGFs se uplatňují v mnoha vývojových morfogenetických procesech jako je adheze, buněčná proliferace, přežívání, apoptóza nebo migrace. Významnou roli hrají při vzniku mezodermu, gastrulačních pohybů, nervové indukci a vzniku endodermu, ve vývoji kostí, tvorbě středního a zadního mozku atd. Zatím nebyly identifikovány pouze v jednobuněčných organismech. U myši byly nalezeny FGF 1-18, 20-23, u člověka FGF 1-14, 16-23. Receptory FGF (FGFRs) jsou tyrozin-kinázové receptory (RTKs), které obsahují extracelulární oblast tvořenou třemi Ig-like doménami, a heparin vazebné sekvence, které ovlivňují vazebnou afinitu a specifitu k ligandu (Boetcher a Niehrs, 2005- review). Různé izoformy FGFR vznikají dvěma různými cestami- alternativním sestřihem genu FGFR (produkuje dvě varianty- IIIb exprimovaný hlavně v epitelu a IIIc exprimovaný hlavně v mezenchymu) (Nie et al., 2006- review) nebo expresí různých genů pro FGFR (u obratlovců jsou známy 4). Interakce a signalizace FGF a FGFR jsou časoprostorově regulovány endogenními heparan sulfát proteoglykany (HSPGs), což jsou makromolekuly buněčného povrchu a extracelulární matrix. Pravděpodobná funkce HSPGs je: 1) usnadnit interakci ligand- receptor a 2) zvyšovat stabilitu FGF-FGFR komplexu. FGF receptory existují jako inaktivní monomery, které jsou aktivovány dvěma molekulami FGF. Následná homodimerizace receptorů vede k autofosforylaci tyrosinových zbytků (obr. 9).



Obr. 9 FGF receptory a FGF signální transdukcce. Hlavní signalizace funguje přes Ras/MAP kinázovou dráhu, jejíž poslední členové- MAPK (ERK 1,2) vstupují do jádra a mohou fosforylovat transkripční faktory jako jsou c-myc, AP1 nebo Ets. V další signální dráze je zahrnuta fosfolipáza C. Fosfolipáza C může hydrolyzovat PIP2 na DAG a IP3. IP3 indukuje uvolnění Ca^{2+} z vnitrobuněčných zásob a DAG je aktivátorem proteinkinázy C, která je schopna fosforylovat a tím aktivovat Raf kinázu a zajistit aktivaci MAP kinázové dráhy. (Převzato z Thisse, 2005).

FGFR1 mutantní embrya umírají v pozdní gastrulaci, pravděpodobně také proto, že si buňky udržují vysokou hladinu E-kadherinu a nemohou dále migrovat.

Jeden ze zpětnovazebných regulátorů FGF dráhy je Sprouty (Spry), což je evolučně konzervovaný inhibitor RTK signalizace (MAP kinázy ERK). Exprese Spry je indukována FGF signalizací a má různé biologické následky- regulace buněčné proliferace a diferenciaci, kontrolu koncentrace cytosolického vápníku a regulace migrace buněk. Tímto způsobem se Spry uplatňuje v plicním a kostním vývoji. Dalšími faktory zahrnutými v zeslabení FGF signálu jsou Sef, MAP kinázová fosfatáza 3, XFLRT 3 (Thisse, 2005- review).

5.1.1 Ovlivnění zubního vývoje

Všechny studované FGFs fungují in vitro jako mitogeny a jsou obecně silnými stimulatory buněčné proliferace v mezenchymu i epitelu na různých stádiích zubního vývoje. Zvyšují proliferaci v zubním zárodku kromě oblasti sklovinného uzlu, ve které chybí exprese FGF receptorů (Kettunen et al., 1998).

V zubech byla pozorována exprese Fgf-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10 a 20*. Fgf-4, 8, 9 a 20 jsou exprimovány pouze v buňkách zubního epitelu, Fgf-3, 7, 10 jsou exprimovány výhradně v zubním mezenchymu (Thesleff a Mikkola, 2002- review). **FGF2** je detekovatelný na bazální membráně, v zubním mezenchymu a epitelovém stellate reticulum. FGF2 hraje významnou roli během stádia pohárku a zvonku při vzniku skloviny a zuboviny, regulací proliferace a diferenciaci buněk během zubního vývoje (Tsuboi et al., 2003). **FGF4** je významným regulátorem proliferace v mezenchymu vyvíjejícího se zubního zárodka a snížení exprese Fgf4 na ED 19 je pravděpodobně spojeno s únikem odontoblastů a ameloblastů z buněčného cyklu (Nadiri et al., 2004). FGF-4, 9 jsou exprimovány pouze ve sklovinném uzlu a stimulují proliferaci v epitelu i mezenchymu (Jernavall a Thesleff, 2000- review). **Fgf8** -/-mutant má vážné gastrulační defekty, chybějící mezodermální a endodermální tkáň, epiblastové buňky neumějí vycestovat ven z primitivního proužku. Předpokládá se, že FGF8 by mohl být iniciátorem genové kaskády, která je odpovědná za vznik zubů (Tucker a Sharpe, 1999- review) a je zapojen v časně determinaci polarity 1. žaberního oblouku. Iniciale končetinového pupenu je spuštěna FGF8, podobně jako iniciace pupenu u zubního vývoje (Thisse, 2005 - review). Ztráta funkce FGF8 v ektodermu 1. žaberního oblouku způsobí téměř celkovou ztrátu kosterních (skeletálních) struktur, avšak dále se vyvíjí malleus a řezáky (Cobourne et al., 2003- review). Na počátku zubního vývoje je Fgf-8 exprimován v orálním epitelu a určuje pozici budoucích zubních základů (Nie et al., 2006- review). **Fgf-9** deleční mutant nevykazuje zubní fenotyp. Fgf9 je exprimován v zubním epitelu sklovinného uzlu a

* V této práci je malým písmem označován gen, velkým písmem protein.

během stádia zvonku, což souvisí s terminální diferenciací ameloblastů a odontoblastů (Kettunen a Thesleff, 1998). **FGF-10** má silný chemoatraktivní efekt a řídí správné umístění plicních epitelových pupenů během vývoje (Boetcher a Niehrs, 2005- review). Fgf10 je exprimován v zubním mezenchymu stádia pohárku a zvonku, stimuluje buněčné dělení pouze v zubním epitelu, kde jsou exprimovány jeho odpovídající FGFR2b (Kettunen et al. 1998; Coin et al., 1999).

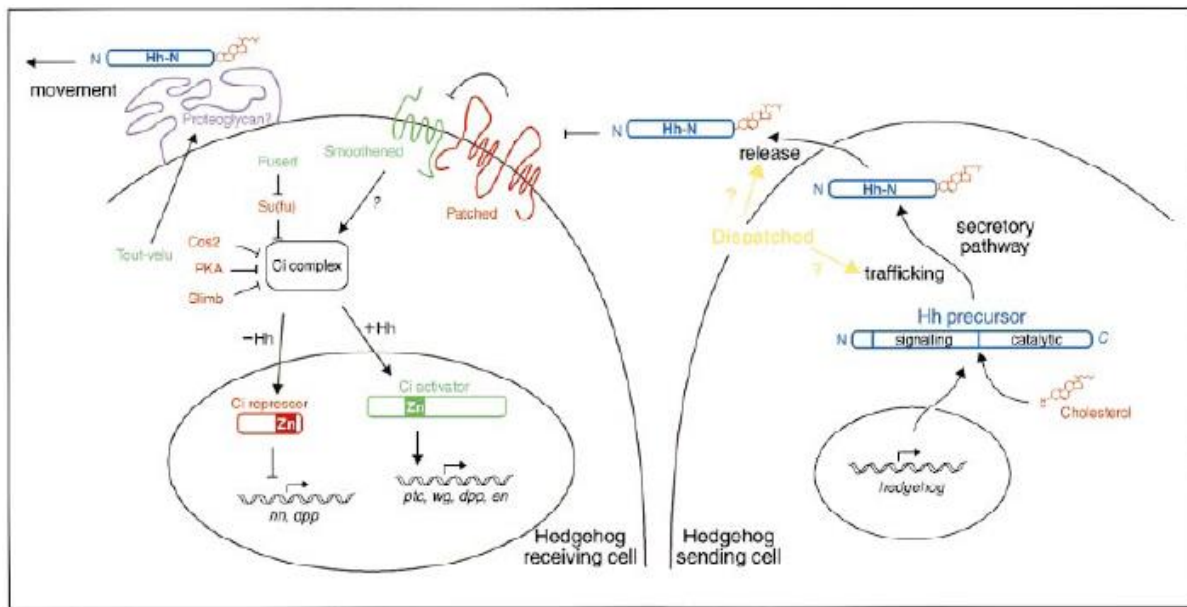
Myší řezák byl použit jako model, který ukázal, že FGF10 reguluje buněčnou proliferaci, předchází apoptoze a podílí se na regulaci rozhodnutí osudu kmenových epitelových buněk. U Fgf10 deficientních myší nebyly pozorovány zubní morfologické defekty až do ED 14, z čehož vyplývá, že Fgf10 neovlivňuje časný zubní vývoj. V pozdějším vývoji však chybí cervical loops řezáků společně s kmenovými buňkami. Tato změna způsobí ztrátu schopnosti neustálého růstu myších řezáků. Fgf10 signalizace z mezenchymu nepřímo reguluje buněčné dělení a buněčný osud kmenových epitelových buněk modulací Notch dráhy v cervical loops přes stimulaci exprese lunatic fringe (Harada et al., 2002).

FGFR tyrozin-kinázy jsou exprimovány v epitelu i mezenchymu vyvíjejícího se zubu. Receptory pro FGF- Fgfr-1b a 2b jsou exprimovány v cervical loops a jsou pravděpodobně odpovědné za jejich růst (obr. 4) (Pispa a Thesleff, 2003- review). Výskyt FGFR1 a 2 v odontoblastech a ameloblastech napovídá, že FGF signalizace se pravděpodobně účastní v regulaci jejich diferenciaci a sekreční funkce (Nie et al., 2006- review).

5.2 HEDGEHOG (HH)

Hedgehog signalizace reguluje obrovské množství událostí během embryonálního vývoje nejen obratlovců, ale i bezobratlých, a hraje hlavní roli při vzniku některých typů nádorových bujení (McMahon, 2000- review). Obratlovci mají minimálně tři homology hedgehog genů *Drosophily*: sonic (SHH), desert (DHH), indian (IHH). DHH protein je exprimován v Sertoliho buňkách varlat, IHH ve střevě, chrupavkách a je důležitý pro postnatální růst kostí (Gilbert, 2003). HH signalizace vede k aktivaci transkripčních efektorů Ci u *Drosophily*, což odpovídá Gli rodině u obratlovců. Ci/Gli jsou regulační proteiny motivu zinkového prstu. U savců byly nalezeny tři Gli geny (McMahon, 2000- review). Ci/Gli proniká do jádra a váže se k CBP proteinu a chová se jako transkripční aktivátor (Gilbert, 2003). HH se váže k Patched (Ptc, několikrát transmembránový protein), který je v nepřítomnosti hedgehog ligandu odpovědný za inhibici proteinu Smoothed (Smo, 7x transmembránový protein) sdílející homologii s G-proteinovými receptory. U savců byly nalezeny dva Patched proteiny, schopné vázat hedgehog ligandy se stejnou afinitou. HH

ligand podstupuje autokatalytické zpracování, které uvolňuje 19 kDa velký ligand s kovalentně vázaným cholesterolem na C-konci. Nemodifikovaný ligand HH aktivuje buňky ve zřetelně zvýšené vzdálenosti od zdroje ligandu, než-li je tomu u ligandu s vázaným cholesterolem. Modifikace ligandu proto může mít za následek omezenou pohyblivost a dosah HH signálu. Vazba ligandu HH způsobí represi Patched aktivity, a tím aktivaci Smoothened-ligand nezávislou HH signalizaci (obr. 10) (McMahon, 2000- review).



Obr. 10 Schématický přehled Hedgehog signální dráhy. Červené komponenty fungují negativně a modré komponenty pozitivně. Proteoglykany pravděpodobně hrají důležitou roli v transcelulárním pohybu cholesterol-modifikovaného hedgehog ligandu. Modifikovaný hedgehog ligand se váže k Patched receptoru, tím uvolňuje aktivitu Smoothened a Ci/Gli transkripčních faktorů ovlivňující cílové geny v jádře. (Převzato z McMahon, 2000).

5.2.1 Sonic hedgehog- SHH

SHH specifikuje dorsoventrální polaritu nervové trubice a somitů. Také funguje jako významný faktor v buněčném přežívání a proliferaci, určuje anterior-posteriorní osu orgánů. Pokusy, ve kterých byla zablokována signalizace Shh, ukázaly významnou redukci velikosti hlavy, ztrátu struktur žaberních oblouků, a tím prokázaly klíčovou roli SHH v buněčném přežívání, zejména buněk neurální lišty migrujících do oblasti žaberních oblouků. Tyto pokusy také prokázaly zvýšení apoptozy v nervové trubici a hlavovém mezenchymu a snížení proliferace buněk CNS (Britto et al., 2000- review). SHH často spolupracuje s FGF a Wnt proteiny (Gilbert, 2003). SHH je postradatelný pro indukci a diferenciaci, avšak nepostradatelný pro morfogenetické procesy zahrnující buněčnou proliferaci, mezenchymální kondenzaci a pro determinaci buněčného osudu (např. segmentaci) (Chuong et al., 2000- review). Shh signalizace je také nezbytná pro organizaci cytoskeletu a komplexů buněčných propojení (Gritli-Linde et al., 2002).

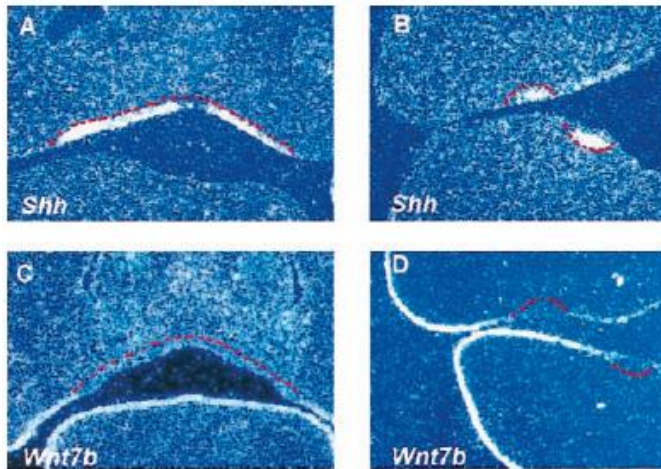
5.2.1.1 Ovlivnění zubního vývoje

Exprese Shh byla jako jediná z ligandů HH rodiny nalezena v zubních základech a je omezena na jejich epitel od stádia epitelového ztlustění po diferenciaci v pozdním stádiu zvonku. Shh je silně exprimován v časných signalizačních centrech zubních základů (Dassule et al., 2000; Sarkar et al., 2000). Odstraněním Shh aktivity z vyvíjejících se zubů vede k narušení růstu, morfogeneze a k neuspořádanosti tkáně epitelu i mezenchymu (Dassule et al., 2000). Ptc, Smo i Gli jsou široce exprimovány v epitelu i mezenchymu vyvíjejícího se zubu (Hardcastle et al., 1998). SHH má dvojí roli během časně odontogeneze. První je vznik zubního pupene stimulací proliferace v zubním epitelu a druhá ve stádiu pohárku, kdy dochází díky Shh signalizaci ke zvýšení přežívání epitelových buněk (Cobourne et al., 2001). SHH je specificky exprimován v epitelu primárních a sekundárních sklovinných uzlů a sekretován do přilehlého epitelu nebo mezenchymu, kde funguje jako stimulant proliferace (Chuong et al., 2000- review). Interakce závislé na Shh signalizaci regulují vývoj pouze v zubním epitelu. Vyplývá to z pokusů, kdy byla přerušena Shh signalizace odstraněním Smo aktivity. Mezenchym se vyvíjí zcela normálně, na rozdíl od epitelových derivátů, které vykazují pozměněnou proliferaci, růst, diferenciaci a polarizaci. Vývoj primárních a sekundárních sklovinných uzlů je u Smo $-/-$ myši normální a uzly exprimují většinu patřičných signálů (Bmp2 a 4, Shh, Ptc2 a Msx2). A tak chybná morfogeneze hrbolků stoliček u těchto mutantů je pravděpodobně způsobena změnou proliferace ve vnějším zubním (sklovinném) epitelu (Gritli-Linde et al., 2002). Avšak v této práci autoři neporovnávají exprese genů u WT (wild type) myši a Smo mutantů na stejných stádiích zubního vývoje.

Některé z inhibitorů Shh dráhy jsou exprimovány ve vnější oblasti zubního mezenchymu, např. Gas-1 a Hip (Hedgehog interacting protein). Hip gen kóduje protein, který se může přímo vázat na SHH a zeslabit jeho signál. Jeho pravděpodobná funkce je zabránit rozšíření nadbytku SHH ligandu za hranice zubního ektomezenchymu (Cobourne et al., 2003- review). V oblasti diastemy se objevuje mechanismus omezení Shh signalizace spíše regulací Shh aktivity než jeho transkripce. Je pravděpodobné, že významnou roli zde hraje Gas-1 (membránový glykoprotein schopný vázat SHH), který je schopen inhibovat Shh aktivitu (Cobourne et al., 2004).

Hranice mezi zubním a ústním epitelem je kontrolována přes vzájemné interakce mezi SHH a Wnt-7b. Wnt-7b je exprimován v celém ústním epitelu kromě oblasti exprese Shh v zubním epitelu. Pokusy ukázaly, že Wnt-7b vymezuje Shh expresi a zajišťuje správnou polohu zubního pupene (obr. 11). Pevné vymezení Shh exprese je rozhodující pro správný vznik pupene související s funkcí SHH jako mitogenu stimulujícího proliferaci v zubním epitelu.

Zastavení zubního růstu ve stádiu epitelového ztlustění je spojováno s nízkou epitelovou proliferací a pokusy s inhibitory Shh signalizace tyto výsledky podporují (Sarkar et al., 2000).

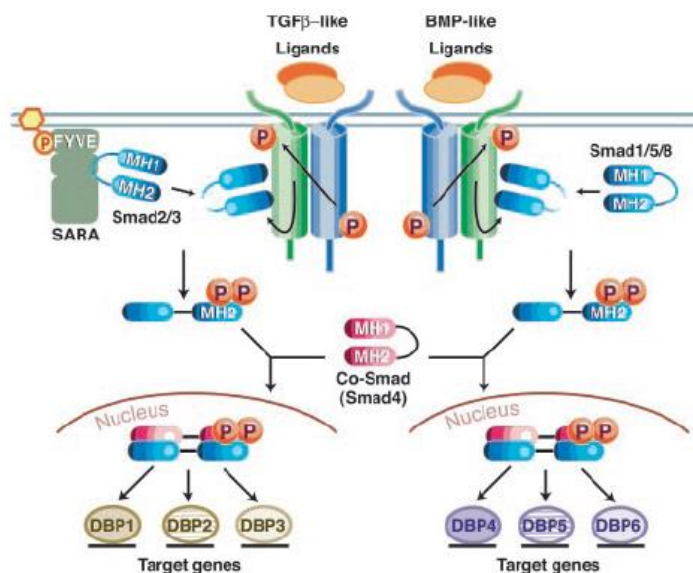


Obr. 11 Exprese Shh a Wnt-7b v ústním a zubním ektodermu. Frontální řezy, ED 10.5. Oblast horních řezáků (A a C), oblast horních a dolních molárů (B a D). Exprese Shh (A, B) je omezena na oblast zubního epitelu, zatímco exprese Wnt-7b se objevuje pouze v ústním epitelu (C, D). Červeně je vymezena oblast budoucího zubního zárodku. (Převzato z Sarkar et al., 2000).

5.3 TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β (TGF- β) NADRODINA

TGF- β nadrodina u obratlovců obsahuje více než 35 strukturně příbuzných cytokinů jako jsou Aktivin, Nodal a BMPs, hrají důležitou roli v embryonálním vývoji a homeostázi tkání. TGF- β proteiny regulují nespočet buněčných odpovědí jako je proliferace, diferenciace, migrace a apoptóza (Attisano a Wrana, 2002- review). Jsou syntetizovány jako velké prekurzorové molekuly, které jsou později proteolyticky štěpeny a vytvořeny funkční dimery. Follistatin je inhibítozem aktivin signalizace, Noggin váže BMPs a brání jejich vazbě k receptoru. Narušení TGF- β aktivity způsobuje různá lidská onemocnění, od rakoviny k chondrodysplázii a plicní hypertenzi (Thesleff a Mikkola, 2002). TGF- β samotný hraje významnou roli v nádorovém bujení, funguje jako antiproliferující faktor a zároveň jako nádorový zakladatel (Attisano a Wrana, 2002- review). Členové TGF- β nadrodiny se váží a aktivují specifické povrchové receptory, které mají vlastní serin/threonin kinázovou aktivitu. Skládají se ze dvou transmembránových proteinů, známých jako typ I a II receptory. U obratlovců bylo nalezeno sedm typů I receptorů označovaných také jako ALKs- activin receptor-like kinases a pět typů II receptorů. Vazbou dvou ligandů dojde k asociaci typu I a II receptoru, typ II fosforyluje typ I v oblasti glycinových a serinových zbytků (GS doména). Uvnitř buňky je pak signál přenášen fosforylací receptorem regulovaných Smad proteinů (R-Smads, 1, 2, 3, 5 a 8), jejich přístup k receptorům je usnadněn pomocnými proteiny jako jsou SARA (Smad anchor for receptor activation). ALK1, 2, 3, 6 fosforylují Smad 1, 5, 8, zatímco ALK 4, 5, 7 fosforylují Smad 2, 3. U TGF- β signalizace je ALK5 široce exprimována v různých tkáních, zatímco ALK 1 je exprimována hlavně v endotelových buňkách a specifických oblastech interakce epitelových a mezenchymálních buněk.

Smads se rozdělují do tří oddělených skupin, postupně tvoří komplexy se Smad 4, akumulují se v jádře a regulují transkripci cílových genů. Smad proteiny jsou jadernými efektery dráhy TGF- β nadrodiny a mohou transkripci regulovat pozitivně i negativně. Váží se na DNA buď velmi slabě nebo vůbec, a tak vyžadují spolupráci s jinými transkripčními faktory (DNA-binding proteins, DBPs) (Dijke a Hill, 2004- review) (obr. 12).



Obr. 12 Přehled signalizace TGF- β nadrodiny. TGF- β /activin a BMPs se váží k receptorovým komplexům, které následně fosforylují R-Smads. R-Smads dále vytváří komplexy se Smad 4 a tyto komplexy jsou translokovány do jádra. Specifické R-Smads rozeznávají různé DNA vazebné proteiny (DBPs) a regulují různé cílové geny. (Převzato z Attisano a Wrana, 2002).

Smads mohou být fosforylovány i MAP kinázami a pravděpodobně existují Smad-nezávislé TGF- β dráhy aktivující Rho GTPázy, MAPKs a ERKs, p38, JNKs a protein kinázu B (PKB) (Attisano a Wrana, 2002- review). I-Smads (Inhibitory Smad 6 a 7) fungují proti signalizaci R-Smads kompeticí o receptor typu I, později se také ukázalo, že mají funkci i v posílení E3-ubiquitin ligáz známých jako Smurf 1 a 2 (Smad ubiquitination regulatory factors). Ty ubiquitinují receptor typu I a ukončují signalizaci (Dijke a Hill, 2002- review).

TGF- β 1-3,5 jsou důležité pro tvorbu extracelulární matrix mezi buňkami a pro regulaci buněčného dělení. TGF- β 1 zvyšuje množství extracelulární matrix epitelových buněk stimulací syntézy kolagenu a fibronektinu a inhibicí degradace matrix (Gilbert, 2003).

5.3.1 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

BMPs mají 7 konzervovaných cysteinů ve zralém polypeptidu. BMPs okruh působnosti je determinovaný aminokyselinami v N-koncové části, které určují, zda specifický BMP bude vázán proteoglykany. Během vývoje BMPs indukují apoptózu, buněčný růst nebo diferenciaci. BMPs hrají klíčovou roli ve vývoji srdce, nervové soustavy a chrupavek, je důležitý pro vývoj kostí i v postnatálním vývoji (Gilbert, 2003). Existují tři receptory pro BMP typu I (ALK 2, ALK 3, ALK 6) a tři receptory typu II (BMPRII, ActR-II, ActRIIb).

Smad 1, 5 a 8 jsou přímými molekulami obsažené v signální dráze BMP receptorů. **Smad-1** mutanti umírají okolo ED 10.5, protože nedochází k propojení pupečníku s placentou. Mutace ve **Smad 5** pak ukazuje významnou roli v angiogenezi.

BMP-2 řídí vývoj buněk neurální lišty a jejich přeměnu v nervový fenotyp, Bmp-2 mutantní zárodek umírá mezi ED 7.5 a ED 10.5 kvůli chybnému vývoji srdce, **BMP-4** homozygotní embrya umírají mezi ED 6.5 a ED 9.5 a vykazují nulovou mezodermální diferenciaci. **BMP-6** mutanti jsou životaschopní a plodní, funkci BMP-6 je schopen pravděpodobně vykompenzovat BMP-2 (Chen et al., 2004- review).

5.3.1.1 Ovlivnění zubního vývoje

BMP-2, 4, 7 jsou exprimovány brzy v zubním epitelu a stimulují expresi homeobox genů Msx-1, 2 (Vainio et al., 1993). Expres těchto tří faktorů se přesouvá z epitelu do mezenchymu během vývoje, jsou také exprimované ve sklovinném uzlu. Antagonistická funkce BMP-2, 4 a FGF8 určuje polohu zubních základů. BMP-4 je jeden z nejvýznamějších členů TGF- β nadrodiny během zubního vývoje (Thesleff a Mikkola, 2002- review). BMP-2 a BMP-4 v časném stádiu zubního vývoje regulují buněčnou proliferaci a apoptozu, v pozdějších stádiích pak diferenciaci ameloblastů a odontoblastů (Nadiri et al., 2006). **BMP-2** pravděpodobně ovlivňuje vznik primárního a sekundárního sklovinného uzlu. **BMP-4** pravděpodobně zprostředkovává kondenzaci přilehlého zubního mezenchymu ve stádiu pupene (Aberg et al., 1997). BMP-4 je pravděpodobně zahrnut při kontrole morfogeneze zubu prostorovou regulací apoptozy v epitelu a buněčnou proliferací v mezenchymu (Thesleff a Sharpe, 1997- review). BMP-4 je schopen zachránit zubní vývoj v Msx1 delečních mutantech. Bmp-4 také indukuje expresi Lef-1. Expres Bmp-5 je omezena na oblast ameloblastů. **BMP-7** deficientní myši umírají brzy po narození kvůli špatnému vývoji ledvin a také oka, nevykazují zubní fenotyp (Thesleff a Mikkola, 2002- review).

Další člen TGF- β nadrodiny, aktivin, také ovlivňuje zubní vývoj. Aktivin funguje jako dimer β A a β B pojednotek. I když je β A exprimován v mezenchymu všech zubních zárodků, jeho ztráta neovlivňuje zubní vývoj stejně: chybí všechny zuby kromě horních stoliček. Z toho vyplývá, že vývoj horních stoliček je pravděpodobně nezávislý na signalizaci aktivinu (Miletich a Sharpe, 2004- review).

Noggin je polypeptid, který se váže a inaktivuje BMP2, 4 a 7 a blokuje vazebné epitopy obou receptorů pro BMP (Chen et al., 2004- review). Epitelová signalizace BMP negativně reguluje expresi Barx-1 (specifický znak moláru) a po působení Nogginu může být exprese Barx-1 zvýšena. Pokusy, při kterých byly mandibulární oblouky vystaveny

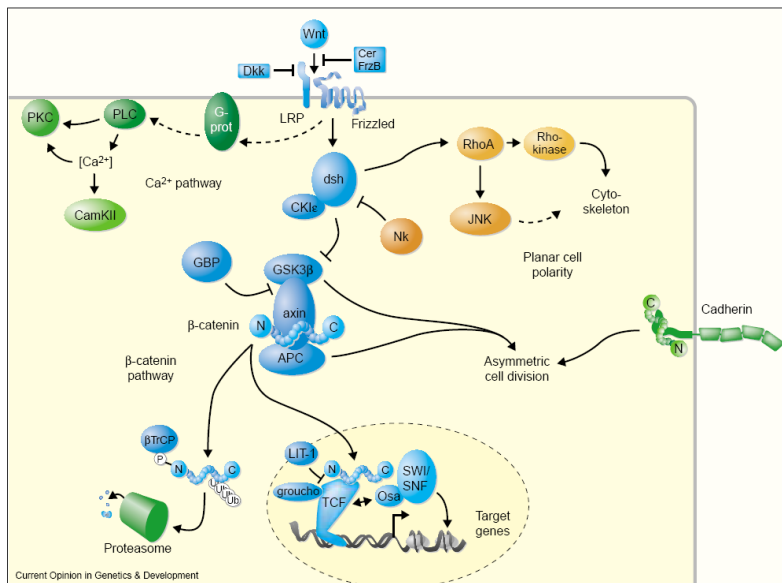
efektivnímu inhibitoru BMP signalizace- Nogginu, vyústily v přeměnu řezáků na stoličky (Tucker et al., 1998b).

5.4 WINGLESS (WNT)

Členové Wnt rodiny jsou sekretované glykoproteiny (u člověka 18 glykoproteinů), které se uplatňují v nejrůznějších vývojových procesech jako je vznik nádorů, regulace buněčné proliferace a apoptozy, buněčné interakce během embryonálního vývoje, migrace, diferenciaci a agregace. Jedna z nejčastějších příčin lidské rakoviny jsou abnormality v signalizaci Wnt/ β -kateninové dráhy. Wnts jsou u obratlovců často zodpovědné za determinaci buněčného osudu v mnoha embryonálních tkáních zahrnujících nervový systém, svaly, kůže, střevo, srdce, plíce a kost (Brennan a Brown, 2004- review). Wnt proteiny inhibují c-Myc indukovanou apoptozu kultivovaných buněk in vitro a in vivo v rakovinných nádorech (Hipfner a Cohen, 2004- review).

WNTs jsou charakterizovány konzervovaným vzorem cysteinových zbytků po celé délce proteinu. Jednotliví zástupci rodiny sdílejí 40 – 90% identitu (Thesleff a Mikkola, 2002). Wnt dráha se rozděluje do minimálně tří větví. 1. β -kateninová dráha aktivující cílové geny v jádře (Wnt kanonická dráha). 2. dráha cytoskeletálního přeskupení (planar cell polarity pathway), kde Frizzled aktivují JNK (jun N-terminal kinase) a řídí asymetrickou polarizaci cytoskeletálních buněk. 3. Wnt/Ca²⁺ dráha zahrnující aktivaci fosfolipázy C (PLC) a proteinkinázy C (PKC), vede k uvolnění intracelulárního vápníku, pravděpodobně přes G-proteiny.

Wnt signalizace pro kanonickou dráhu vede ke stabilizaci β -kateninu, který se akumuluje v cytoplasmě a je translokován do jádra, kde interaguje s LEF/TCF rodinou transkripčních faktorů a aktivuje genovou expresi. β -katenin má dvojí roli v buňkách: interaguje přímo s Lef-1 v cytoplasmě a zprostředkovává transport k jádru, 2. funkce je interakce s cadheriny v procesech buněčné adheze. β -katenin se váže přes α -katenin k aktinovému cytoskeletu (Behrens et al., 1996). Receptory pro Wnt dráhu (7x-transmembránové receptory proteinové rodiny Frizzled) fungují společně s LRP koreceptory (jsou členy rodiny LDL-related proteins) a interagují a aktivují protein Disheveled, který inhibuje aktivitu GSK-3 enzymu (glykogen syntázová kináza) (Huelsenken a Birchmeier, 2001- review). Tím může β -katenin disociovat od APC proteinu a vstoupit do jádra, kde může vytvářet heterodimer s LEF nebo TCF DNA-vazebným proteinem, čímž vzniká transkripční faktor. Disheveled protein může také interagovat s Rho GTPázou a ovlivňovat aktinový a mikrotubulární cytoskelet (Gilbert, 2003) (obr 13).



Obr. 13 Schématický přehled Wnt signální dráhy. Wnt signální dráha se rozděluje do tří větví: 1) Wnt kanonická dráha (modrá), 2) dráha cytoskeletálního přeskupení (žlutá), 3) Wnt/ Ca²⁺ dráha (zelená).

AD 1) V nepřítomnosti Wnts ligandů je β -katenin fosforylován kasein kinázou CK1α, což umožní fosforylaci GSK 3 β kinázou N-konce β -kateninu na serin/threoninové zbytky a následnou ubiquitinaci a likvidaci v proteasomu. Fosforylace probíhá v multiproteinovém komplexu obsahujícím scaffold protein axin vytvářející dimer conductin/axin2, APC (tumor supresorový genový produkt) a diversin (více viz text). (Převzato z Huelsken a Birchmeier, 2001).

5.4.1 Ovlivnění zubního vývoje

I přes to, že exprese některých členů Wnt signální dráhy byly nalezeny v zubním vývoji, jen málo se ví o jejich vlivu na zubní vývoj (Thesleff a Mikkola, 2002- review). Lef-1 (Lymphoid enhancer-binding factor 1) je členem skupiny transkripčních faktorů HMG (high mobility group) a aktivuje cílové downstream geny během Wnt signalizace. Lef- 1 je exprimován v epitelovém ztluštění zubního vývoje a během stádia pupene se přesouvá do mezenchymu (Kratochwil et al., 1996). Práce Kratochwil et al. 2002 ukazuje, že epitel zubních zárodků Lef-1 -/- myši neexprimuje Fgf4, Shh a Bmp4 a zubní vývoj je zastaven ve stádiu pupene. Dále, že Fgf4 je přímým transkripčním cílem pro Lef-1 a rekombinantní FGF4 protein je schopen plně předejít zastavení zubního růstu u Lef-1 -/- embryí. Hlavní funkcí Lef-1 v odontogenezi je aktivace Fgf4 a propojení Wnt a FGF signálních drah ve specifickém kroku zubního vývoje. Ztrátou Lef-1 signálu jsou přerušeny epitel- mezenchymální interakce zubního vývoje v kritickém stádiu přechodu ze stádia pupene v pohárek. FGF4 aktivuje expresi mezenchymálních Fgfs (Fgf3 a 10) a ty indukují expresi epitelového Shh (Kratochwil et al., 2002).

Overexprese Lef-1 v epitelových buňkách transgenních myši vede ke zvýšené invaginaci epitelu a vzniku nadpočetných vlasových folikulů a struktur podobných zubům (Zhou et al., 1995).

Je pravděpodobné, že Lef-1 funguje v zubním vývoji jako významný faktor přežívání v zubním epitelu. Ztráta Lef-1 nenarušuje migraci buněk neurální lišty (NCC) ani kondenzaci NCC odvozeného mezenchymu (Sasaki et al., 2005).

Expresie β -kateninu je zřetelná v epitelu i mezenchymu vyvíjejícího se zubu od stádia epitelového ztlustění po stádium zvonku. Je silně exprimován v primárních i sekundárních sklovinných uzlech, dále i ve vnitřním zubním (sklovinném) epitelu a stratum intermedium. Mezenchymální exprese mizí v pozdním stádiu zvonku po diferenciaci mezenchymálních buněk na odontoblasty. Zvýšená exprese β -kateninu v epitelu proto pravděpodobně hraje významnou úlohu v epitelové morfogenezi (Obara et al., 2005). Wnt 10b pravděpodobně stimuluje proliferaci epitelu i mezenchymu během zubního vývoje (Nadiri et al., 2004).

5.5 TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)

TNF rodina se skládá z více než 15 členů, které působí na řadu buněčných událostí (hostitelskou obranu, zánět, apoptozu, autoimunitu a organogenezi). TNF receptory mohou být rozděleny do tří hlavních skupin. 1. obsahující doménu smrti, kdy adaptorové molekuly postupně aktivují kaspázovou kaskádu a indukují apoptozu; 2. označované jako TRAF, aktivující mnoho signálních drah, např. dráhu NF- κ B (Nuclear factor- κ B); 3. neobsahující funkční intracelulární doménu nebo motiv, fungují jako lákající receptory pro kompetici s ostatními receptory odpovídajících ligandů (Ohazama a Sharpe, 2004- review). NF κ B dráha určuje, zda buňky podstoupí apoptozu, přežijí nebo budou proliferovat. Například myši, které mají potlačenou aktivitu NF κ B, mají silně zvýšenou apoptozu ve vyvíjejících se vlasových folikulech (Schmidt- Ullrich et al., 2001).

Ektodysplasin je součástí TNF nadrodiny, jejichž hlavní funkcí je indukce apoptozy nebo proliferace a buněčného přežívání. Spontánní myši mutanti Tabby mají mutaci v homologu lidského genu EDA, který produkuje transmembránový protein ektodysplasin A. Mutace tohoto genu způsobuje u lidí i u myši syndrom hypohidrotické ektodermální dysplázie. Syndrom je charakterizován abnormálním vývojem epitelových derivátů jako jsou zuby, chlupy a slinné žlázy. Tabby myši proto slouží jako dobrý model pro studium vývoje ektodermálních orgánů. Tabby mají mimo jiné i defektní vývoj zubních hrbolků (Jernvall a Thesleff, 2000- review). Tvorba hrbolků je regulována rovnováhou mezi apoptozou a proliferací zubního epitelu (Ohazama a Sharpe, 2004- review). Je pravděpodobné, že ke vzniku defektních zubních hrbolků dochází v důsledku nedostatečného růstu zubního epitelu, což vyplývá z pokusů, kdy vývoj hrbolků v Tabby myších může být částečně zachráněn FGF rekombinantními proteiny (FGF4 a 10). FGF4 a 10 představují mitogeny schopné zprostředkovat další růst epitelu nutný pro vznik sekundárních sklovinných uzlů a iniciaci nových hrbolků. Overexpresí EDA receptoru (EDAR) prostřednictvím K14 promoteru

dochází dokonce ke zvýšení počtu zubních hrbolků a vzniku premolárového zubu v diastemě (Miletich a Sharpe, 2004- review). Tabby myši, které ztratily Eda signalizaci často ztrácejí poslední molár. TNF hraje roli v počtu zubů a hrbolků, a proto se ukazuje jako velmi důležitá dráha v morfogenezi a evoluci (Ohazama a Sharpe, 2004- review).

5.6 NOTCH SIGNALIZACE

Prvně byl Notch receptor identifikován u *Drosophily* jako velký transmembránový receptor, který je vyžadován během vývoje k regulaci časoprostorového určení osudu buněk, existují 4 Notch homology. Notch signalizace hraje klíčovou roli v modulaci buněčného osudu během vývoje obratlovců i bezobratlých (Baron, 2003- review). Ligandy jako jsou Jagged (Serrate) a Delta-like molekuly jsou membránově vázané, a proto je nutné pro Notch signalizaci blízký buněčný kontakt. Notch signální aktivita je modifikována glykosyltransferázami Fringe, které glykosylují molekuly buněčného povrchu zahrnuté v Notch signalizaci. U savců existují 3 různé geny pro Fringe: Lunatic, Radical a Manic (Thesleff a Mikkola, 2002- review). Aktivace Notch receptoru zahrnuje 3 proteolytická štěpení ve 3 polohách S1, S2, S3. Signalizace je iniciována vazbou ligandu Delta. Intracelulární Notch doména-NIc je uvolněna S3 štěpením, NIc je translokován do jádra, kde se váže k transkripčním faktorům (Baron, 2003- review).

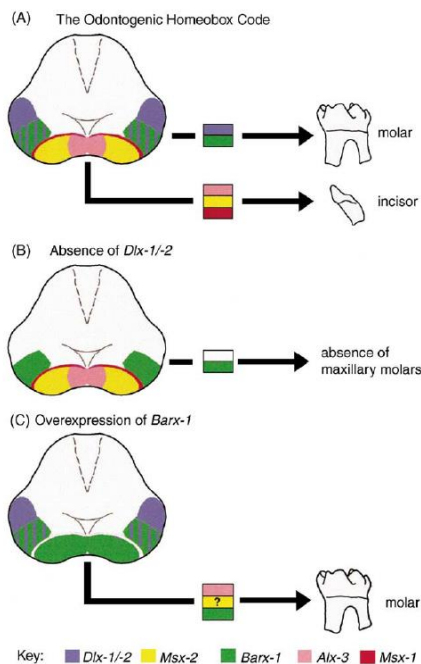
Notch 1, 2, 3 a jejich ligandy jsou exprimovány v zubních epitelových buňkách a Notch pravděpodobně hraje roli v diferenciaci ameloblastů. Exprese Lunatic Fringe (L-Fng) je stimulována FGFs a vytváří ostrou hranici se sklovinným uzlem, je tedy pravděpodobné, že L-Fng je důležitý pro tvorbu sklovinného uzlu, avšak u *L-fng* mutantních myši není morfogeneze zubu nijak poznamenána (Thesleff a Mikkola, 2002- review). Notch dráha je vázána s rozhodnutím buněčného osudu v zubním epitelu a neustálého růstu myších řezáků. Na apikálním konci řezáků jsou pravděpodobně epitelové kmenové buňky umožňující jejich neustálý růst regulovaný Notch signální dráhou a FGF10 (Harada et al., 2002).

5.7 HOMEBOX

Homeobox je sekvence vysoce konzervovaných 180 párů bází objevená u *Drosophily melanogaster*. Jejich homology u obratlovců se nazývají Hox geny a určují tělní (anterior-posteriorní) osu embrya během vývoje. Exprese Hox genů v migrujících buňkách neurální lišty je odpovědná za rozmanitost v systému žaberních oblouků. Pro vývoj zubů nejsou Hox geny důležité, jelikož se neexprimují v prvním žaberním oblouku. Evolučně byla ztráta

exprese Hox genů pravděpodobně důležitá pro vývoj čelistí, což ukazují pokusy, kde overexprese Hox genů v 1. žaberním oblouku způsobuje diferenciaci buněk neurální lišty na chrupavku nebo kost. V ektomezenchymu 1. žaberního oblouku je exprimována řada podrodin transkripčních faktorů obsahujících homeobox doménu, jako jsou např. Alx, Barx, Dlx, Lhx, Pitx, Msx, Gsc třídy. Pro určení čelistí a dentice je zapotřebí ojedinělé kombinace homeobox genů, popsané jako Odontogenic homeobox gene code (Sharpe, 1995). Pro zubní vývoj je prostorově omezená exprese homeobox genů ektomezenchymu (regulována epitelovými signály) důležitá v indukci vzniku zubního zárodku, určení zubního typu i pozice budoucího zubu.

U savců se Dlx geny rozdělují do tří genových párů (Dlx 1/2, Dlx 5/6, Dlx 3/7) a jejich exprese je umístěna v ektomezenchymu 1. (mandibulárního) a 2. (hyoidního) žaberního oblouku (Miletich a Sharpe, 2006- review). Dlx exprese hraje významnou roli v založení identity různých žaberních oblouků, ale i mandibulárních a maxilárních výběžků 1. žaberního oblouku. Porušením genů Dlx-1,2 získáme mutanty s chybějícími horními moláry a při Dlx-1,2 nepřítomnosti se ektomezenchymové buňky mění na chondrogenní (Cobourne et al., 2003-review). Model Odontogenic homeobox gene code předpokládá, že homeobox geny Dlx-1, 2 a Barx-1 exprimované v zadním ektomezenchymu řídí vznik tvaru molárů, zatímco homeobox geny Msx-1 a 2, Alx-4 exprimované v předním ektomezenchymu řídí vznik tvaru řezáků (Sharpe, 1995) (obr. 14).



Obr. 14 Odontogenic homeobox gene code. Schématický přehled exprese homeobox genů v ektomezenchymu maxilárních a mandibulárních výběžků. **(A)** Expresa transkripčních faktorů Dlx 1, Dlx 2 a Barx 1 je nezbytná pro vytvoření stoliček, zatímco exprese transkripčních faktorů Alx 3, Msx 1 a Msx 2 v přední oblasti je třeba k tvorbě řezáků. **(B)** U dvojité knockout myši Dlx 1^{-/-} a Dlx 2^{-/-} nedojde ke vzniku maxilárních stoliček. **(C)** Ektopická exprese (overexprese) Barx 1 a zároveň ztráta Msx 1 v přední oblasti vede ke vzniku zubu podobného stoličkám na místě řezáků. (Převzato z Cobourne et al., 2003).

FGF8 je sekretován ektodermem molárové oblasti a indukuje mezenchymální expresi Dlx-1,2 a Barx-1, zatímco Bmp-4 vylučovaný ektodermem v oblasti řezáků indukuje

mezenchymální expresi Msx1 a 2 (Thesleff a Sharpe, 1997- review). Přidání Bmp-4 k molárovému ektomezenchymu má silný inhibiční efekt na Barx-1 expresi. In vivo to pak znamená, že Bmp-4 pravděpodobně vytváří hranici mezi Msx-1 a Barx-1 a to represí Barx-1 a zároveň indukci Msx-1 exprese (Tucker et al., 1998a).

Epitelové ztlustění je charakteristické expresí homeobox genu Pitx-2, ektomezenchym genem Pax-9. Pax-9 je člen rodiny transkripčních faktorů obsahujících paired-box. Pax-9 vytváří svou expresí 4 oblasti na mandibule odpovídající poloze budoucích řezáků a molárů. FGF8 pak hraje roli induktora zubního vyvoje indukci exprese Pax-9 a Pitx-2, zatímco Bmp-2 a 4 indukci zabraňují (Neubueser et al., 1997).

Mutací Prx1 a 2 genů dochází k redukci nebo ztrátě kostních struktur v oblasti lebky, obličejce, končetin a také řezáků dolní čelisti. Prx1 a 2 regulují expresi Shh v epitelu, a tím kontrolu buněčné proliferace během vývoje dolní čelisti (ten Berge et al., 2001).

6. OBECNÉ MECHANISMY MIGRACE

Buněčná migrace je vysoce integrovaný mnohokrokový proces, který řídí embryonální morfogenezi a homeostázi. Např. během gastrulace velké skupiny buněk společně migrují a vytvářejí tři zárodečné listy. Migrace není omezena jen na embryonální vývoj, v postnatálním životě je významná např. pro obnovování kůže, hojení ran nebo leukocytární migraci do tkání (Guan, 2005). Uplatňuje se však i při vzniku některých patologických procesů jako jsou cévní onemocnění (arterioskleróza), mentální retardace, nebo vznik metastáz rakovinných nádorů. Buňky migrují jako odpověď na různé podněty- chemokiny, růstové faktory nebo molekuly extracelulární matrix (ECM). Nádorové buňky mohou měnit svou morfologii a povahu migrace jako odpověď na změny vnějšího prostředí.

Migrace buňky může být považována za cyklický proces, který se skládá z několika kroků: 1) polarizace buňky a tvorba výběžků na povrchu buňky, 2) fixace výběžků adhezivními komplexy k substrátu, 3) kontrakce a následně pohyb buněčného těla ve směru fixovaného výběžku, 4) uvolnění adheze a stáhnutí buňky. Tento proces je dobře pozorovatelný u pomalu se pohybujících buněk. Rychle migrující buňky jako jsou keratocyty a leukocyty spíše hladce kloužou přes substrát bez viditelných upevnění (Ridley et al., 2003- review).

Pohyb buněk je zprostředkován aktin-myosinovým komplexem a jeho časoprostorová regulace je kontrolována Rho kinázami (Guan, 2005). Výběžky jsou řízeny polymerací aktinu a stabilizovány adhezí k ECM. Rychlost a organizaci polymerace aktinu řídí některé z aktin-vazebných proteinů, jako je profilin, capping proteiny nebo proteiny coffilinové rodiny. Prvotní odpověď buňky na signál k migraci je polarizace a vystrčení výběžku ve směru

migrace. Malá GTPáza Rac indukuje vznik malých adhezí na vedoucím konci a ovlivňuje mikrotubuly, které pravděpodobně také fungují v regulaci adheze. Malé Rho GTPázy jsou klíčovými regulátory aktinu a adheze, kontrolují vznik lamelipodia nebo filopodia (Ridley et al., 2003- review). Lamelipodia jsou široké a ploché výběžky, zatímco filopodia výběžky hubené a válcovité (Lauffenburger et al., 1996- review). Molekuly zahrnuté v uvolnění adheze jsou proteáza calpain a fosfatáza calcineurin (Guan, 2005).

Polarizace buňky je podstatou migrace, vytvoření a udržení polarity buňky jako odpověď na extracelulární signál je zprostředkováno pozitivními zpětnovazebnými smyčkami zahrnující Rho GTPázy, PI3Ks (phosphoinositide 3-kinase), integriny, mikrotubuly a vezikulární transport. Vnitřní zesílení signálu, které zajišťuje mimo jiných PIP3, vede k polarizaci aktinového a myosinového cytoskeletu a směrovanému pohybu (Dormann a Weijer, 2003- review).

Chemokiny jsou molekuly zahajující migrační fenotyp. Chemotaxe je schopnost buňky odpovědět směrovaně na velmi nízký gradient chemoatraktantů a zprostředkovává migraci na krátké i dlouhé vzdálenosti během vývojových procesů.

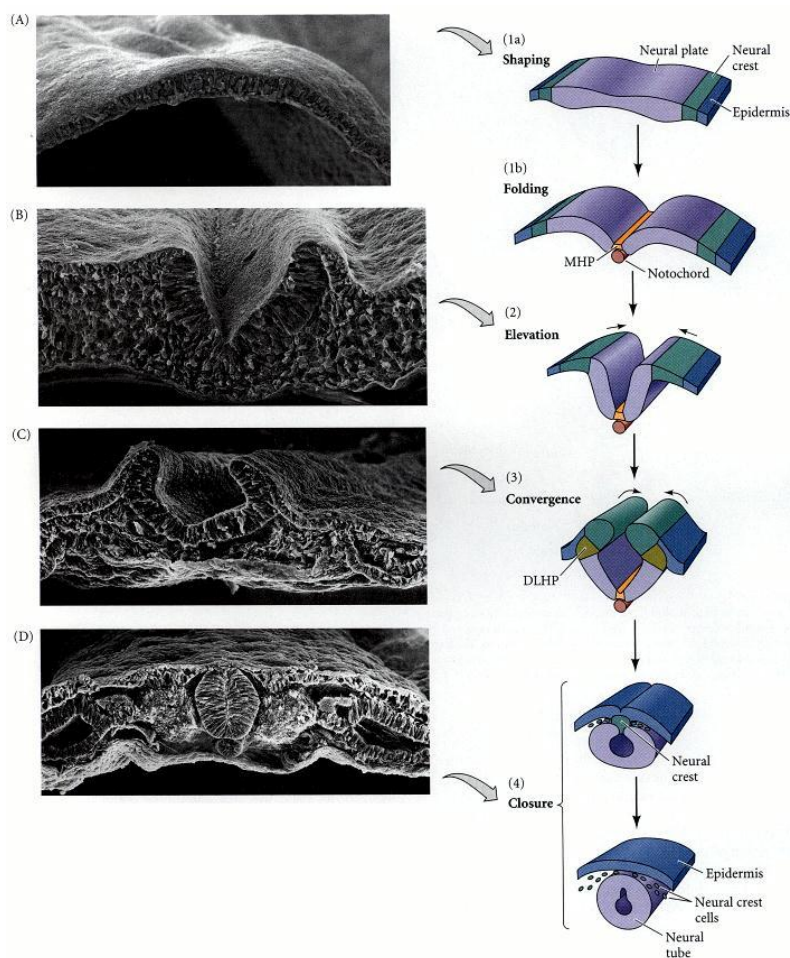
Integriny jsou hlavní proteinovou rodinou transmembránových receptorů buněčné migrace. Skládají se z α a β podjednotek. Zprostředkovávají adhezi buněk k ECM nebo jiným buňkám a přes adaptéry k aktinovému cytoskeletu (Ridley et al., 2003- review).

Vznik průdušnice a vzdušnic u *Drosophily* je výsledkem buněčné migrace zprostředkované FGF a FGF receptory. Během gastrulace buňky migrují k primitivnímu proužku, kde podstoupí epitel-mezenchymální přeměnu zprostředkovanou FGF. Po průchodu proužkem buňky vycestují a formují různé mezodermální a extraembryonální struktury. Mezodermální buňky jsou přitahovány FGF4 a odpuzovány FGF8 (Dormann a Weijer, 2003- review).

7. BUŇKY NEURÁLNÍ LIŠTY (NCC)

Neurální lišta je přechodná populace pluripotentních buněk pocházející z laterálních hřebenů uzavírajícího se neuroepitelu neurální ploténky (Hall, 1999)- tedy z hranice mezi budoucím neurálním a epidermálním ektodermem.

Z rekombinačních experimentů vyplývá, že pro vznik neurální lišty jsou dostačující interakce mezi budoucí epidermis a neurální ploténkou (Basch et al., 2004- review). Hranice mezi neurální ploténkou (neurálním ektodermem) a epidermálním ektodermem je charakterizována vysokou expresí BMPs. Tam, kde se tato hladina stýká s expresí Wnt6 v oblasti budoucí epidermis, vznikají buňky neurální lišty (obr. 15) (Gilbert, 2003).



Obr. 15 Vznik neurální trubice u kuřecího embrya. **(A, 1)** Neurální ploténka mění svůj tvar. **(B, 2)** Neurální valy jsou vyzdvižovány a buňky budoucí epidermis se pohybují k dorzální střední linii. **(C, 3)** Dochází ke sbližování zevních okrajů neurálních valů. **(D, 4)** Neurální valy se vzájemně dotýkají a dochází ke vzniku uzavřené nervové trubice. Buňky neurální lišty se uvolňují a opouštějí neurální trubici a epidermis. Fialově je označena neurální ploténka, zeleně neurální lišta, modře epidermis. (Převzato z Gilbert, 2003).

7.1 INDUKCE NEURÁLNÍ LIŠTY

Indukce neurální lišty může být definována jako proces, při kterém se ektodermální buňky specifikují jako prekurzory neurální lišty. Rozděluje se na dva kroky: 1) přijetí signálu říkajícího „staň se prekurzorem neurální lišty“, a 2) prekurzory NCC musí prosadit svou identitu ve vyvíjejícím se embryu. Členové proteinových rodin Wnt, BMP a FGF se účastní procesu indukce neurální lišty. BMP-4 a 7 společně s Wnt-6 jsou pravděpodobně epidermálními signály odpovědnými za indukci vzniku neurální lišty. Proteiny zahrnuté ve specifikaci NCC jsou: •Snail/Slug-TF motivu zinkového prstu, jsou exprimovány v premigratorních a migratorních NCC myši, kuřat, žab a ryb a byly označeny jako nejčasnější markery pro neurální lištu. Slug může zprostředkovat epitel-mezenchymální přeměnu snížením exprese adhezivních molekul. •Msx 1 a 2 hrají důležitou roli v NCC specifikaci, jsou přímými downstream cíly BMP a Wnt signalizace. •BMPs a Wnt6 vyvolávají expresi Slug a FoxD3. Pro specifikaci NCC jsou významné také Sox 9 a 10, Pax-3 a 7 (Basch et al., 2004- review). •Dále endogenní Wnt signalizace v premigratorních NCC může způsobovat různorodost osudů NCC (Dorsky et al., 1998). Např. cílená mutace Wnt-1 a Wnt-3a a vede ve zřetelné defekty v derivátech neurální lišty (Ikeya et al., 1997).

7.2 ROZDĚLENÍ BUNĚK NEURÁLNÍ LIŠTY

NCC mohou být rozděleny do čtyř hlavních překrývajících se skupin:

1. Hlavové NCC

2. Trupové, které migrují podél dvou základních drah- dorzolaterální a ventrální. Tyto buňky migrují přes přední část každého sklerotomu a vytvářejí dorzální ganglia, dřeh nadledvin a nervy kolem aorty. Dorzolaterální dráha migrace trupových NCC dává vznik melanocytům, které migrují mezi dermis a epidermis. Buňky ventrální dráhy se stanou smyslovými a sympatickými neurony, buňkami dřeh nadledvin a Schwannovými buňkami.

3. NCC produkující parasympatická ganglia střeva

4. Srdeční NCC, mohou se vyvíjet v melanocyty, neurony, chrupavky a pojivovou tkáň 3., 4., a 6. žaberního oblouku (Gilbert, 2003).

Buňky neurální lišty (NCC) se rozptýlí z dorzálního povrchu nervové trubice a migrují uvnitř embrya a dávají vznik široké rozmanitosti diferenciovaných buněčných typů. Obrovské množství buněčných typů vznikajících z tak jednoduché embryonální oblasti je pádným důvodem nazývat neurální lištu 4. zárodečným listem (Hall, 1999).

Jakmile se NCC uvolní z neurální trubice podstupují epitel-mezenchymální přeměnu asociovanou s indukci migrace NCC (Hall, 1999) a tento proces je podobný situaci, kdy nádorové buňky uniknou z primárního nádoru a vstoupí do oběhu (Guan, 2005). Dnes je termín ektomezenchym používán pro označení mezenchymálních buněk odvozených od neurální lišty (Le Douarin a Kalcheim, 1999).

7.3 HLAVOVÉ BUŇKY NEURÁLNÍ LIŠTY

Během kraniofaciálního vývoje NCC z oblasti zadní části středního mozku a přední části zadního mozku migrují ventrálně a jejich akumulací a proliferací na ventrální straně hlavy vznikají žaberní oblouky (Basch et al., 2004- review). Hlavními deriváty hlavových NCC je celá obličejová a hypobranchiální kostra, tak jako buňky hlavových ganglií (Le Douarin a Kalcheim, 1999). Žaberní oblasti řídí diferenciaci buněk modulací exprese Hox genů. Specifická delece BMP receptoru typu I způsobuje u myši mnoho kraniofaciálních defektů, zahrnující rozštěp patra a hypotrofickou mandibulu (Basch et al., 2004- review.)

Zadní mozek je segmentován v posterior-anteriorní ose na rhombomery. Hlavové NCC migrují třemi hlavními drahami: 1) Z rhombomery 1 a 2 migrují do 1. žaberního oblouku, vytváří čelisti, kosti ucha a frontonazální výběžky. 2) NCC pocházející z rhombomery 4 osidlují 2. žaberní oblouk a vytvářejí jazykovou chrupavku krku a třmínek středního ucha. 3) NCC z rhombomery 6 migrují do 3. a 4. žaberního oblouku a napomáhají

vytvářet brzlík, příštítná tělíska a štítnou žlázu. Migrace hlavových NCC probíhá ve dvou vlnách. V první vlně migruje pluripotentní populace buněk vytvářejících žaberní oblasti, chrupavky, kosti hlavy a krku. Druhá vlna migrace vytváří hlavové plakody- ztlustění ektodermu hlavy a krku, ze kterých vznikají smyslové orgány nosu, ucha, čočka oka a chuťové pohárky (Gilbert, 2003).

Zatímco hlavové i trupové NCC mohou vytvářet melanocyty, neurony a gliové buňky, pouze hlavové NCC mají jedinečnou schopnost produkovat mezenchymální buňky schopné diferenciaci na pojivovou tkáň, dermis, šlachy nebo tvrdou tkáň jako je chrupavku, kost a dentin.

7.4 MIGRACE BUNĚK NEURÁLNÍ LIŠTY

7.4.1 Počátek migrace NCC

Počátek buněčné migrace znamená dramatické změny v buněčných interakcích mezi buňkami samotnými a mezi buňkami a extracelulární matrix (ECM). Jeden z mechanismů počátku migrace je ztráta mezibuněčné adheze zprostředkované Ca^{2+} dependentními molekulami k uvolnění NCC od epitelové vrstvy. Migrace proto může být zahájena snížením exprese Ca^{2+} dependentních adhezivních molekul (N-cadherinu, cadherinu 6B) nebo jejich biochemickými změnami jako je fosforylace. Dále byly pozorovány změny v rovině buněčného dělení. 70% mitotických vřetének v dorzální neurální trubici je orientováno tak, že jedna z dceřinných buněk by se oddělila od epitelu, zatímco jinde v neurální trubici je rovina dělení buněk orientována tak, že dceřinné buňky zůstávají ve spojení s lumenálním povrchem. Pokud je tento předpoklad správný, znamenalo by to, že faktor stimulující proliferaci premigratorních NCC by mohl být součástí procesu, který vede k jejich emigraci z epitelu (Le Douarin a Kalcheim, 1999).

7.4.2 Extracelulární matrix (ECM)

ECM vytváří substrát pro adhezi a kontrolu buněčné migrace. ECM hraje významnou roli během migrace a společně s mechanickými bariérami jako je bazální membrána nebo krevní cévy, jsou důležité i pro determinaci kdy a kde migrace skončí. ECM je bohatá na glykosaminoglykanové hyaluronany, chondroitin sulfát a obsahuje chondroitin sulfát proteoglykany (aggrecan a versican), kolageny typu I a II, tenascin, laminin a fibronectin. Fibronectin je hlavní ECM molekula kontroly migrace NCC a ve vysoké koncentraci se nachází na epitelové bazální membráně.

Pro normální průběh migrace NCC je potřeba dostatečné množství ECM. NCC produkují proteázy jako je plasminogenní aktivátor a jiné, které napomáhají vytvářet ECM (Hall, 1999). Ačkoli NCC mohou přispívat k produkci specifických ECM komponent, mnoho molekul ECM (fibronektin, laminin, kolagen I a IV) je vyžadováno na správném místě již před emigrací (Le Douarin a Kalcheim, 1999). Funkce některých ze složek ECM je: Aggregan a versican inhibují migraci; fibronektin a kolagen typu I a IV migraci podporují; kolagen II, V a IX inhibují nebo odchyľují migrující buňky.

Hlavové a trupové NCC používají odlišné molekuly ECM k adhezi, hlavové se na rozdíl od trupových neváží k oběma typům kolagenů a váží se k bazální membráně. Složky ECM spolu interagují a společně s interakcemi mezi NCC jsou časoprostorově regulovány. Interakce mezi komponenty ECM a NCC jsou zprostředkovány členy integrinové proteinové rodiny.

Diferenciace je zprostředkována díky ECM a epitel-mezenchymálním interakcím.

K diferenciaci NCC jsou proto nutné interakce s jinými buňkami, ECM, růstovými faktory nebo hormony. Ačkoli se NCC dělí souběžně s migrací, buněčné dělení se zvyšuje, jakmile dosáhnou cílového místa (Hall, 1999).

7.4.3 Další komponenty důležité pro migraci NCC

Cadheriny jsou významnými komponenty buněčné adheze a jsou exprimovány během migrace NCC. N-cadherin a cadherin-6B jsou exprimovány v NCC před emigrací. Mezi sebou jsou migrující NCC propojeny specifickými cadheriny, např. U-cadherinem a cadherinem-7 (Hall, 1999).

Mezerové spoje jsou membránové kanály umožňující tok iontů a metabolitů mezi buňkami a jsou důležitými složkami NCC. Skládají se z connexonů, členů connexinové rodiny. Connexin 43 je exprimován v NCC a jeho overexprese způsobuje zvýšení migrační rychlosti NCC, inhibice funkce mezerových spojů oleamidem způsobuje zastavení migrace (Maschnoff a Baldwin, 2000- review).

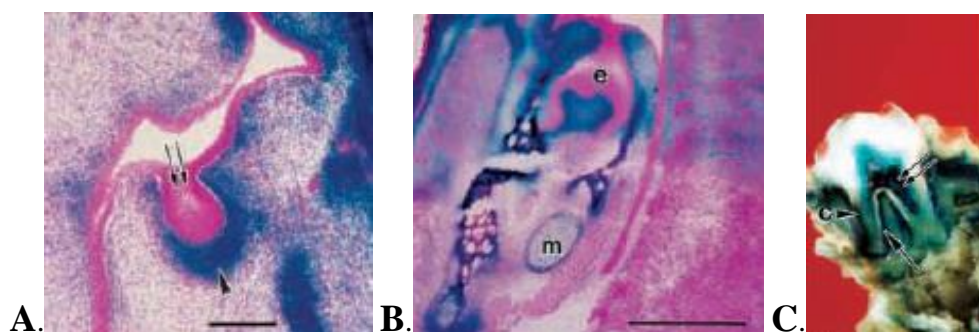
Následky poruchy v migraci NCC jsou jedny z nejčastějších defektů při narození. Patří mezi ně například některé rozštěpy patra, Hirschsprungova choroba nebo Di George syndrom (Basch et al., 2004- review).

Mechanismy putování NCC mohou být rozdílné mezi různými druhy, např. myší kraniální NCCs se začínají oddělovat mnohem dříve, než se uzavře nervová trubice, zatímco u kuřat se nervová trubice uzavírá před vycestováním NCCs (Le Douarin a Kalcheim, 1999).

7.5 BUŇKY NEURÁLNÍ LIŠTY A ZUBNÍ VÝVOJ

U savců se zuby vyvíjejí v čelistech. Horní čelist vzniká z mediálních nazálních výběžků (vznikajících z původně frontonazálního výběžku) a maxilárních výběžků. Dolní čelist vzniká z 1. žaberního (mandibulárního) oblouku. V časném stádiu embrya hlavové buňky neurální lišty migrují z oblasti předního, středního a zadního mozku přes oční základy k nosu a osidlují frontonazální, maxilární a mandibulární výběžky. Iniciují vznik zubů a vytvářejí jednotlivá centra v horní a dolní čelisti (Miletich a Sharpe, 2004-review). Konečné umístění hlavových migrujících buněk v maxilárních a mandibulárních výběžcích je spojeno s původním umístěním buněk v neurální liště a také s časem, kdy buňky neurální lišty opustily (Imai et al., 1996; Koentges a Lumsden, 1996).

Wnt-1 je protoonkogen, který kóduje protein exprimující se pouze během vývoje centrálního nervového systému (CNS) (Chai et al., 2000) a je zahrnut v determinaci hranice mezi středním a zadním mozkem (Hall, 1999). Hlavové a spinální ganglia, skeletogenní NCC v žaberních obloucích jsou odvozené od Wnt-1 exprimujících prekursorů v CNS. Wnt-1-lacZ transgenní exprese představuje ideální způsob studia vývoje NCC. Společně s Cre-lox systémem a křížením myši s reportéřským transgenem R26R byl vyvinut způsob, jak buňky neurální lišty sledovat až do dospělosti. Jakmile jednou Wnt-1-Cre exprese začala v premigratorních NCC, signál β -galaktosidázy je nesmazatelný. NCC odvozený ektomezenchym přispívá ke vzniku kondenzovaného mezenchymu v počátečním stádiu zubního vývoje, dále ke vzniku mezenchymu zubní papily, preodontoblastů, odontoblastové/dentinové matrix, dřeni, cementu, periodontálnímu ligamentu a Meckelovy chrupavky (obr. 16) (Chai et al., 2000).



Obr. 16 Přispění buněk neurální lišty během morfogeneze zubu. (A) Stádium pupene, ED 13.5. Buňky kondenzovaného zubní mezenchymu jsou odvozeny od buněk neurální lišty (šipka). Buňky zubního epitelu nevykazují expresi β -galaktosidázy a nepocházejí z NCC (dvojitá šipka). Měřítko ukazuje vzdálenost 100 μ m. (B) Stádium zvonku (ED 15.5). Zubní papila a Meckelova chrupavka (m) obsahují buňky odvozené od NCC. Měřítko ukazuje vzdálenost 0,5 mm. (C) Řez horní čelistí 6-ti týdenní dospělé transgenní myši. Pozitivní buňky β -galaktosidázy jsou obsaženy v dentinu, pulpě (dvojitá šipka) a cementu (c) a periodontálním ligamentu (jednoduchá šipka). Měřítko ukazuje vzdálenost 1 mm. (Převzato z Chai et al., 2000).

8. ZÁVĚR

Růst a morfogeneze zubních zárodků je závislá na vzájemných tkáňových epitel-mezenchymálních interakcích, které jsou provázeny expresí signálních molekul, transkripčních a růstových faktorů. Podrobná znalost těchto molekulárních kaskád a jejich úlohy při regulaci morfogenetických mechanismů (buněčné proliferace, migrace, adheze a apoptozy) je nezbytná pro pochopení indukce, progresu nebo regenerace zubního vývoje. V tomto směru zatím zůstává mnoho otázek nevyjasněno- například úloha buněčné proliferace a migrace během vzniku zubního pupene v časném stádiu odontogeneze. V mé budoucí diplomové práci bych se ráda na tuto problematiku zaměřila.

Znalost molekulární regulace zubního vývoje je nezbytná i pro současný výzkum, který se zaměřuje na vypracování technologie zubní regenerace (metodami in vitro a tkáňového inženýrství), jejímž cílem je vytvářet živé zubní náhrady. Krokem vpřed v tomto výzkumu je i objev lidských tkáňových kmenových buněk v dospělé zubní tkáni.

9. VÝHLEDY DO BUDOUCNA

Cílem této práce bylo získat literární přehled o úloze proliferace a migrace buněk v zubním vývoji. Tento přehled by měl sloužit jako zdroj odborných dat pro mou budoucí diplomovou práci, ve které bych se ráda zaměřila na úlohu proliferace a migrace buněk při vzniku zubního pupene v časně odontogenezi. Imigrace a kondenzace ektomezenchymálních buněk bude hodnocena mapováním exprese adhezivních molekul a pomocí velikosti kondenzace zubního mezenchymu, který je předchůdcem zubního vaku. Aspekty proliferace a migrace budou porovnány mezi základem budoucího funkčního prvního moláru a vestigiálními předmolárovými základy. Ráda bychom využili metod imunohistochemie pro sledování exprese adhezivních molekul a míry proliferace. Proliferaci bychom sledovali i pomocí hodnocení mitotického indexu na klasických histologických preparátech.

10. PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce MUDr. Renatě Peterkové Csc. za mnoho užitečných rad a trpělivé čtení mé práce.

11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aberg T, Wozney J, Thesleff I.** Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn.* **1997**; 210(4), 383-96. (Citováno dle Nadiri et al., 2006)
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** *Molecular Biology of the Cell* (4th edition); New York: Garland Publishing **2002**.
- Attisano L., Wrana J. L.** Signal transduction by the TGF- β superfamily. *Science* **2002**; 296, 1646- 1647.
- Baron M.** An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol.* **2003** Apr;14(2):113-9.
- Basch M. L., Garcia-Castro M.I., Bronner-Fraser M.** Molecular mechanisms of neural crest induction. *Birth defects research* **2004**; 72, 109-123.
- Berge ten Derk, Brouwer A., Korving J., Reijnen M., Raaij E. J., Verbeek F., Gaffield W., Meijlink F.** Prx1 a Prx2 are upstream regulators of sonic hedgehog and control cell proliferation during mandibular arch morphogenesis. *Development* **2001**; 128, 2929-2938.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W.** Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **1996**; 382(6592), 638-642. (Citováno dle Thesleff a Sharpe, 1997)
- Boettcher RT, Niehrs C.** Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev* **2005**; 26(1), 63-77.
- Bonnefoy-Berard N, Auouacheria A, Verschelde C, Quemeneur L, Marcais A, Marvel J.** Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta.* **2004**;1644(2-3),159-68.
- Boráň T., Lesot H., Peterka M., Peterková R.** Increased apoptosis during morphogenesis of the lower cheek teeth in Tabby(EDA mice. *J Dent Res* **2005**; 84, 228-233.
- Brennan KR, Brown AM.** Wnt proteins in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2004**; 9(2), 119-31.
- Britto JM, Tannahill D, Keynes RJ.** Life, death and Sonic hedgehog. *Bioessays* **2000**; 22(6), 499-502.
- Cobourne M. T., Hardcastle Z., Sharpe P. T.** Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *J Dent Res* **2001**; 80, 1974-1979.
- Cobourne M. T., Sharpe P. T.** Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Archives of Oral Biology* **2003**; 48, 1-14
- Cobourne M., Miletich I., Sharpe P. T.** Restriction of sonic hedgehog signaling during early tooth development. *Development* **2004**; 131, 2875-2885.
- Coin R., Lesot H., Vonesch J.L. Haikel Y, Ruch JV.** Aspects of cell proliferation kinetics of the dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int. J. Dev. Biol.* **1999**; 43, 261- 267.
- Dassule H. R., Lewis P., Bei M., Maas R., McMahon A. P.** Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* **2000**; 127, 4775-4785.
- Dassule H. R., McMahon A. P.** Analysis of epithelial- mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev. Biol.* **1998**; 202, 215- 227.
- Dijke P., Hill C.** New insights into TGF- β - Smad signaling. *Trends in biochemical sciences* **2004**; 29, 265-273.

- Dormann D, Weijer CJ.** Chemotactic cell movement during development. *Curr Opin Genet Dev* **2003**; 13(4), 358-64.
- Dorsky R. I., Moon R. T., Raible D. W.** Control of neural crest cell fate by the Wnt signaling pathway. *Nature* **1998**; 396, 370-373. (Citováno dle Chai et al., 2000)
- Ferguson C. A., Tucker A. S., Sharpe P. T.** Temporal cell interactions regulating mandibular and maxillary arch patterning. *Development* **2000**; 127, 403-412.
- Gilbert S. F.** *Developmental biology* (Seventh edition), Sinauer Associates Inc. **2003**.
- Gluecksmann A.** Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* **1951**; 26, 59-86. (Citováno dle Peterková et al., 2003)
- Goedloed J.F., Smits-van Prooije A.E.** Quantitative analysis of the temporal pattern of somite formation on the mouse and rat. A simple and accurate method for age determination. *Acta Anat* **1986**; 125, 76-82. (Citováno dle Peterka et al., 2002)
- Gritli-Linde A., Bei M., Maas R., Zhang X., Linde A., McMahon A. P.** Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development* **2002**; 129, 5323-5337.
- Guan Jun-Lin** (Ed.). *Cell migration. Methods in molecular biology*; Humana Press **2005**.
- Hall B., K.** *The Neural crest in development and evolution*; Springer **1999**.
- Harada H., Toyono T., Toyoshima K., Yamasaki M., Itoh N., Kato S., Sekine K., Ohuchi H.** Fgf-10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development* **2002**; 129, 1533-1541.
- Hardcastle Z., Mo R., Hui C. C., Sharpe P. T.** The Shh signaling pathway in tooth development- defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development* **1998**; 125, 2803- 2811.
- Hipfner D. R., Cohen S. M.** Connecting proliferation and apoptosis in development and disease. *Nature* **2004**; 5, 805-815.
- Huelsken J., Birchmeier W.** New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Current opinion in genetics & development* **2001**; 11, 547- 553.
- Humbert PO, Brumby AM, Quinn LM, Richardson HE.** New tricks for old dogs: unexpected roles for cell cycle regulators revealed using animal models. *Curr Opin Cell Biol* **2004**;16(6), 614-22.
- Chai Y., Jiang X., Ito Y., Bringas P., Han J., Rowitch D. H., Soriano P., McMahon A., Sucov H. M.** Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* **2000**; 127, 1671-1679.
- Chen D., Zhao M., Mundy G. R.** Bone morphogenetic proteins. *Growth factors* **2004**; 22(4), 233-241.
- Chuong C., Palel N., Lin J., Jung H., Widelitz R. B.** Sonic hedgehog signaling pathway in vertebrate epithelial appendages morphogenesis: perspectives in development and evolution. *Cell. Mol. Life* **2000**; 57, 1672-1681.
- Ikeya M., Lee S., Johnson J. E., McMahon A. P., Takada S.** Wnt signaling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* **1997**; 389, 966-970. (Citováno dle Chai et al., 2000)
- Imai H., Osumi-Yamashita, Ninomiya Y., Eto K.** Contribution of early-emigrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of mandibular molar teeth in rat embryos. *Dev. Biol.* **1996**; 176, 151-165. (Citováno dle Thesleff a Sharpe, 1997)
- Jernvall J., Kettunen P., Ravanova I., Martin L. B., Thesleff I.** Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf 4 gene. *J. Dev. Biol.* **1994**; 38, 463-469.

- Jernvall J., Thesleff I.** Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mechanisms of development* **2000**; 92, 19-29.
- Kaufman M.H.** The atlas of mouse development. Academic Press, London **1992**; p. 525. (Citováno dle Peterka et al., 2002)
- Keranen S., Kettunen P., Aberg T., Thesleff I., Jernvall J.** Gene expression patterns associated with suooression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Dev Genes Evol* **1999**; 209, 495-506.
- Kettunen P., Karavanova I., Thesleff I.** Responsiveness of developing dental tissues to fibroblast growth factors: expression of splicing alternatives of FGFR1, -2, -3, and of FGFR4; and stimulation of cell proliferation by FGF-2, -4, -8, and -9. *Dev Genet* **1998**; 22(4), 374-85.
- Koentges G., Lumsden A.** Rhombocephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* **1996**; 122, 3229- 3242. (Citováno dle Thesleff a Sharpe, 1997)
- Kratochwil K., Dull M., Farinas I., Galceran J., Grosschedl R.** Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev.* **1996**; 10, 1382- 1394. (Citováno dle Thesleff a Sharpe, 1997)
- Kratochwil K., Galceran J., Tontsch S., Roth W., Grosschedl R.** FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in Lef1 *-/-* mice. *Genes Dev.* **2002**; 16, 3173- 3185.
- Lauffenburger D. A., Horwitz A. F.** Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* **1996**; 84, 359-369.
- Le Douarin N. M., Kalcheim C.** The neural crest. New York: Cambridge University Press **1999**.
- Lesot H., Peterková R., Schmitt R., Meyer J. M., Viriot L., Vonesch J.L., Senger B., Peterka M., Ruch J.V.** Initial features of the inner dental epithelium histo-morphogenesis in the first lower molar. *Int. J. Dev. Biol.* **1999**; 43, 245-254.
- Lodish H., Lawrence A. B., Zipursky S, Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.** *Molecular Cell Biology*, **2000**; 4 th edition, New York, W. H. FREEMAN and company.
- Lumsden A. G.** Spatial organization of the epithelium and the role of the neural crest cells in the intiation of the mammalian tooth germ. *Dev. Suppl.* **1988**; 103, 155-169. (Citováno dle Peters a Balling, 1999)
- Maschnoff K. L., Baldwin H. S.** Molecular determinants of neural crest migration. *American journal of medical genetics* **2000**; 97, 280-288.
- Massague J.** G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **2004**; 432, 298-306.
- Matalová E, Antonarakis GS, Sharpe PT, Tucker AS.** Cell lineage of primary and secondary enamel knots. *Dev Dyn* **2005**; 233(3), 754-9.
- Matalová E., Tucker A. S. Sharpe P. T.** Death in the life of tooth. *J Dent Res* **2004**; 83(1), 11-16.
- McMahon A. P.** More surprises in the hedgehog signaling pathway. *Cell* **2000**; 100, 185- 188.
- Miletich I., Sharpe P. T.** Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth defect research* **2004**; 72, 200-212.
- Mina M., Kollar E. J.** The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch. Oral. Biol.* **1987**; 32, 123- 127. (Citováno dle Peters a Balling, 1999)
- Moore K., Persaud T.** Zrození člověka. Embryologie s klinickým zaměřením. ISV nakladatelství, Praha **2002**.
- Nadiri A., Kuchler- Bopp S., Haikel Y., Lesot H.** Immunolocalization of BMP-2/4, FGF-4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *Journal of histochemistry & cytochemistry* **2004**; 52(1), 103-112.

Nadiri A., Kuchler- Bopp S., Perrin- Schmitt F., Lesot H. Expression patterns of receptors for bone morphogenetic proteins in the developing mouse molar. *Cell tissue Res* **2006**; 324, 33-40.

Neubueser A., Peters H., Balling R., Martin G.R. Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways- a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* **1997**; 90, 247- 255. (Citováno dle Jernvall a Thesleff, 2000)

Nie X., Luukko X. N., Kettunen P. FGF signaling in craniofacial development and developmental disorders. *Oral diseases* **2006**; 12, 102-111.

Obara N, Lesot H. Subcellular localization of beta-catenin and cadherin expression in the cap-stage enamel organ of the mouse molar. *Histochem Cell Biol.* **2004**;121(4), 351-8.

Ohazama A., Sharpe P. Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: The right shape in the right place. *J Dent Res* **1999**; 78 (4), 826-834.

Peterka M., Lesot H., Peterková R. Body weight in mouse embryos specifies staging of tooth development. *Connective tissue research* **2002**; 43, 186-190.

Peterková R., Peterka M., Lesot H. The developing mouse dentition. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* **2003**; 1010, 453-466.

Peterková R., Peterka M., Viriot L., Lesot H. Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connective tissue research* **2002**; 43, 120-128.

Peters H., Balling R. Teeth-Where end how to make them. *Trends Genet.* **1999**; 15, 59-65.

Pispa J., Thesleff I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Developmental biology* **2003**; 262, 195-205.

Pourtois M. Contribution a l'étude des bourgeons dentaires de la souris: I. Périodes d'induction et de morphodifférentiation. *Arch. Biol.* **1961**; 72, 17-95. (Citováno dle Peterková et al., 2002)

Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R. A., Ginsberg M. H., Borisy G., Parsons J. T., Horwitz A. R. Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science* **2003**; 302, 1704-1709.

Ruch J.V. Tooth morphogenesis and differentiation. *Dentin and odontogenesis* **1984**; 47-79.

Sarkar L., Cobourne M., Naylor S., Smalley M., T., Sharpe P. T. Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. *Developmental biology* **2000**; 97, 4520-4524.

Sasaki T, Ito Y, Xu X, Han J, Bringas P Jr, Maeda T, Slavkin HC, Grosschedl R, Chai Y. LEF1 is a critical epithelial survival factor during tooth morphogenesis. *Dev Biol.* **2005**; 278(1), 130-43.

Sharpe P. T. Homeobox genes and orofacial development *Connect tissue* **1995**; 32, 17-25.

Shi S., Bartold P.M., Miura P. M., Seo B.M, Robey P. G., Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod craniofacial Res* **2005**; 8, 191-199.

Schmidt-Ullrich R, Aebischer T, Hulsken J, Birchmeier W, Klemm U, Scheidereit C. Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development* **2001**; 128, 3843-3853. (Citováno dle Boráň et al., 2005)

Slavkin H. Embryonic tooth formation. A tool for developmental biology. *Oral Sci Res* **1974**; 4, 7-136. (Citováno dle Gritli-Linde at al., 2002)

Slavkin H., Bringas P. Epithelial- mesenchymal interactions during dentinogenesis. IV. Morphological evidence for direct heterotopic cell-cell contact. *Dev. Biol.* **1976**; 50, 428-442. (Citováno dle Gritli-Linde at al., 2002)

- Thesleff I., Sharpe P.** Signalling networks regulating dental development. *Mechanisms of development* **1997**; 67, 111-123.
- Thesleff I., Mikkola M.** The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol.* **2002**; 217, 93-135.
- Thisse B, Thisse C.** Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* **2005**; 287(2), 390-402.
- Tsuboi T, Mizutani S, Nakano M, Hirukawa K, Togari A.** Fgf-2 regulates enamel and dentine formation in mouse tooth germ. *Calcif Tissue Int* **2003**; 73(5), 496-501.
- Tucker A. S., Al Khamis A., Sharpe P. T.** Interactions between Bmp-4 and Msx-1 act to restrict gene expression to odontogenic mesenchyme. *Dev. Dyn.* **1998a**; 212, 533-539.
- Tucker A.S, Matthews K.L., Sharpe P. T.** Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* **1998b**; 282, 37-72.
- Tucker AS, Sharpe PT.** Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. *J Dent Res* **1999**; 78(4):826-34.
- Turečková J., Sahlberg C., Aberg T., Ruch J. V., Thesleff I., Peterková R.** Comparison of expression of the msx-1, msx-2, BMP-2 and BMP-4 genes in the mouse upper diastemal and molar tooth primordia. *Int J Dev Biol* **1995**; 39, 459-468.
- Vahtokari A., Aberg T., Jernvall J., Keranen S., Thesleff I.** The enamel knot as a signaling center in developing mouse tooth. *Mechanisms of development* **1996**; 54, 39-43.
- Vainio S., Karavanova I., Jowett A., Thesleff I.** Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* **1993**; 75, 45-58. (Citováno dle Tucker a Sharpe et al., 1999)
- Zhou P., Byrnc C., Jacobs J., Fuchs E.** Lef 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev.* **1995**; 9, 700-713. (Citováno dle Thesleff a Sharpe, 1997)