



**MASARYKOVA UNIVERZITA**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Ústav experimentální biologie**

**Oddělení genetiky a molekulární biologie**

---



**Buněčné a molekulární mechanismy během  
vývoje zubů a kostí se zaměřením na funkce  
kaspáz**

**Disertační práce**

**Mgr. Eva Švandová**

# Bibliografický záznam

**Autorka:** Mgr. Eva Švandová  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav experimentální biologie

**Název práce:** Buněčné a molekulární mechanismy během vývoje zubů  
a kostí se zaměřením na funkce kaspáz

**Studijní program:** Biologie

**Studijní obor:** Molekulární a buněčná biologie

**Vedoucí práce:** prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.

**Akademický rok:** 2014/2015

**Počet stran:** 87

**Klíčová slova:** apoptóza; diferenciacce; endochondrální;  
intramembranózní; odontogeneze; osteogeneze

## Bibliographic Entry

**Author:** Mgr. Eva Švandová  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Experimental Biology

**Title of thesis:** Cellular and molecular mechanisms during tooth and bone development with focus on caspase functions

**Degree Programme:** Biology

**Field of Study:** Molecular and Cell Biology

**Supervisor:** Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.

**Academic Year:** 2014/2015

**Number of Pages:** 87

**Keywords:** Apoptosis; Differentiation; Endochondral; Intramembranous; Odontogenesis; Osteogenesis



## **Poděkování**

Poděkování patří prof. RNDr. Evě Matalové, Ph.D. za zajištění kvalitních pracovních podmínek, možnost účastnit se mnoha inspirativních vědeckých setkání a zahraničních stáží i za cenné rady a odborné vedení. Velké díky patří také Dr. Hervé Lesotovi, Dr. Abigail Tucker, doc. RNDr. Marcele Buchtové, Ph.D. za cenné podněty, rady a připomínky k vědecké práci. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře embryologie živočichů Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AVČR, v.v.i. za vytvoření motivující pracovní atmosféry, vstřícný přístup a podporu, technickým pracovníkům za pomoc při zpracování vzorků.

Tato práce byla podporována granty: P302/12/J059 a P502/12/1285 (Grantová agentura České republiky).

## Abstrakt

Apoptotická eliminace buněk má zásadní význam během vývoje a udržování homeostázy mnohobuněčných organismů. Její funkce byly popsány také během vývojových procesů zubních i peridentálních struktur. Kaspázy byly primárně identifikovány jako klíčové enzymy apoptózy. Finální exekuční fázi apoptózy zajišťuje trojice kaspáz-3, -6, -7. Kaspáza-3 je považována za centrální a nejfrekventovanější molekulu tohoto mechanismu. V současnosti však byly popsány i její další role mimo apoptózu. Tato práce se zaměřuje na studium funkcí strukturně i funkčně podobné kaspázy-7 ve vývoji tvrdých tkání.

Aktivace kaspázy-7 byla detekována v primárním sklovinném uzlu (PEK) myšního moláru a pozitivně korelovala s výskytem apoptotických buněk, podobně jako kaspáza-3. Na rozdíl od kaspázy-3 však kaspáza-7 nebyla pro apoptózu PEK klíčová. Mimo oblast PEK byla aktivace kaspázy-7 ve vývoji zubů pozorována během diferenciaci odontoblastů a ameloblastů, a také v dalších neapoptotických buňkách. Myši postrádající kaspázu-7 navíc vykazovaly statisticky významné snížení objemu skloviny řezáků, ne však molárů, což pravděpodobně souvisí s odlišným charakterem obou typů zubů.

Během studia molárů byla detekována aktivace kaspázy-7 také v okolní mandibulární kosti. Vzhledem k tomu, že se osifikační mechanismy vývoje intramembranózních a endochondrálních kostí odlišují, pozornost byla zaměřena na oba modely. V obou systémech byla aktivace kaspázy-7 přítomna již od časných stádií osteogeneze. Efekt deficiencie kaspázy-7 nebyl identický s dříve popsaným fenotypem myši postrádající kaspázu-3 a projevoval se odlišně u obou typů osifikace. Intramembranózní model vykazoval snížení objemu kostní tkáně, hustota kostní tkáně byla však intaktní. Naopak endochondrální model vykazoval konstantní objem kosti, ale snížení hustoty kostní tkáně.

Deficiencie kaspázy-7 způsobila pokles exprese významných osteogenních faktorů, které byly sledovány s využitím PCR Array. Přesný mechanismus zapojení kaspázy-7 do diferenciacních procesů však zatím není zcela jasný. V úvahu připadá štěpení pluripotentních markerů, které vede k aktivaci diferenciacních drah a následné specializaci buněk. Jednou z vhodných metod dalšího studia kaspáz se ukazuje analýza jejich aktivity na úrovni jedné buňky, která představuje vysoký potenciál pro přesné výstupy a zároveň snižuje nároky na množství biologického materiálu. Studium vícečetných funkcí kaspáz má význam z hlediska terapeutického využití u různých onemocnění a defektů tvrdých tkání, například při léčbě osteoporózy.

## Abstract

Apoptotic cell elimination has a great importance for development and homeostasis in multicellular organisms. Its functions have been described also in formation of dental and periodontal structures. Caspases were primarily identified as the crucial molecules of the apoptotic machinery. The final executioner phase is ensured by trio of caspases-3, -6, -7. Caspase-3 is considered to be the central molecule of this process. Recently, novel roles of this enzyme far from apoptosis also emerge. Based on the knowledge of caspase-3, this study focuses on functions of structurally and functionally similar caspase-7 in the development of hard tissues.

Activation of caspase-7 was detected in the primary enamel knot (PEK) of the mouse molar and positively correlated with distribution of apoptotic cells similarly to caspase-3. Contrary to caspase-3, however, caspase-7 was not crucial for PEK apoptosis. Beyond PEK area, activation of caspase-7 was observed during differentiation of odontoblasts and ameloblasts and in other non-apoptotic cells. Moreover, caspase-7 deficient mice showed statistically significant decrease in the enamel volume of incisors but not in molars, which may result from different characters of both teeth.

During examination of tooth regions of the jaw, activation of caspase-7 was observed also in the mandibular bone. Since mechanisms of osteogenic development in the intramembranous and endochondral ossification are different, our attention was paid to both models. Activation of caspase-7 was detected from early stages of osteogenesis in both systems. However, the effect of caspase-7 deficiency was not identical to the phenotype previously described in caspase-3 deficient mice and was manifested differently in both types of ossification. In the intramembranous model, the volume of bone was decreased and bone mineral density was intact. Whereas, in the endochondral development, the bone volume was constant and bone mineral density decreased.

Caspase-7 deficiency resulted in decreased expression of important osteogenic factors examined by PCR Array. However, the exact mechanism of caspase-7 engagement in osteogenic differentiation is not completely clear so far. Possibly, the cleavage of pluripotent markers could lead to the activation of differentiation pathways and cell specialisation. One possibility for further investigation is detection of caspase activity during single cell analysis, which has a large potential for accurate outcomes and also decreases demands on biological material. The examination of these multiple functions of caspase may have an importance also for therapeutic approaches in treatment of distinct diseases and defects in hard tissues, such as osteoporosis.

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
1.1. Odontogeneze .....	11
1.1.1. Vývoj moláru.....	11
1.1.2. Vývoj řezáku.....	14
1.2. Osteogeneze .....	16
1.2.1. Intramembranózní osifikace .....	17
1.2.2. Endochondrální osifikace .....	18
1.3. Apoptóza .....	20
1.4. Kaspázy.....	22
1.4.1. Kaspázy – faktory buněčné smrti a dalších buněčných procesů .....	22
1.4.1. Struktura a aktivace kaspáz .....	23
1.4.2. Subcelulární lokalizace a substráty kaspáz.....	24
1.4.3. Efektorové (exekuční) kaspázy-3 a -7 .....	24
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>26</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>27</b>
3.1. Biologický materiál.....	27
3.2. Histologické vzorky.....	27
3.3. Imunohistochemie.....	27
3.4. TUNEL .....	28
3.5. MicroCT analýza .....	29
3.6. Izolace RNA .....	30
3.7. PCR Array.....	31
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>33</b>
4.1. Kaspáza-7 v odontogenezi .....	33
4.1.1. Lokalizace aktivované kaspázy-7 ve vývoji moláru.....	33
4.1.2. Lokalizace aktivované kaspázy-7 ve vývoji řezáku .....	33
4.1.3. Aktivace kaspázy-7 vs. distribuce apoptotických buněk v zubních tkáních .....	36
4.1.4. Fenotyp moláru postrádajícího kaspázu-7.....	36
4.1.5. Fenotyp řezáku postrádajícího kaspázu-7.....	37
4.2. Kaspáza-7 v osteogenezi.....	40
4.2.1. Lokalizace aktivované kaspázy-7 v intramembranózní osifikaci.....	40



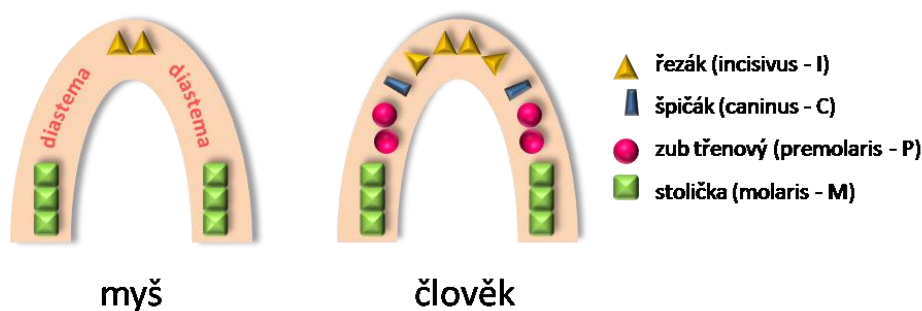
4.2.2.	Lokalizace aktivované kaspázy-7 v endochondrální osifikaci .....	40
4.2.3.	Aktivace kaspázy-7 vs. distribuce apoptotických buněk v kostních tkáních .....	43
4.2.4.	Fenotyp intramembranózního typu kosti postrádajícího kaspázu-7 .....	46
4.2.5.	Fenotyp endochondrálního typu kosti postrádajícího kaspázu-7 .....	47
4.2.6.	Vliv deficiencie kaspázy-7 na expresi osteogenních faktorů .....	50
4.3.	Aktivace kaspázy-7 a kaspázy-3 .....	50
<b>5.</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>52</b>
5.1.	Apoptóza se vyskytuje ve většině stádií odontogeneze .....	52
5.2.	Apoptóza v odontogenezi uplatňuje různé molekulární faktory .....	53
5.3.	Kaspáza-7 není klíčová pro apoptotickou eliminaci primárního sklovinného uzlu... ..	54
5.4.	Aktivovaná kaspáza-7 se vyskytuje během diferenciacie buněk zubních tkání .....	55
5.5.	Subcelulární lokalizace kaspázy-7 může ovlivňovat funkce enzymu.....	55
5.6.	Kaspáza-7 vykazuje neapoptotické funkce během odontogeneze .....	56
5.7.	Aktivovaná kaspáza-7 se vyskytuje v osteogenezi .....	56
5.8.	Kaspáza-7 není klíčová pro apoptózu buněk kostních tkání.....	57
5.9.	Kaspáza-7 vykazuje neapoptotické funkce během osteogeneze.....	58
5.10.	Kaspáza-7 ovlivňuje expresi osteogenních markerů.....	59
5.11.	Mechanismus neapoptotických účinků kaspázy-7 může zahrnovat štěpení faktorů pluripotence .....	60
5.12.	Role kaspázy-7 a -3 během vývoje tvrdých tkání nejsou identické.....	61
5.13.	Budoucnost studia kaspáz směřuje k analýze jedné buňky .....	63
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCE</b> .....	<b>68</b>
<b>9.</b>	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>84</b>
9.1.	Seznam obrázků.....	84
9.2.	Publikace autorky k tématu disertační práce v časopisech s impakt faktorem .....	85
9.3.	Abstrakta k tématu disertační práce v časopisech s impakt faktorem .....	85
9.4.	Abstrakta k tématu disertační práce ve sbornících .....	86
9.5.	Přednášky k tématu disertační práce.....	86
9.6.	Postery k tématu disertační práce .....	86

# 1. Úvod

Lidská dentice hraje významnou úlohu z hlediska přijímání potravy či správné artikulace, zároveň jde o důležitý estetický faktor. Přestože ztráta zubu nepředstavuje pro člověka život ohrožující událost, významně ovlivňuje jeho komfort. Na správné funkci dentice se podílí také kostní tkáň, ve které je zub ukotven. Formování tvrdých tkání (zubních i kostních) je aktuální otázkou tkáňového inženýrství. Nezbytnou podmínkou pro diferenciaci a kultivaci těchto tkání *in vitro* je porozumění komplexní síti molekul ovlivňující vývoj *in vivo*.

V současnosti je jedním z hlavních systémů využívaných v experimentální oblasti myší model. Obecné principy tvorby zubů umožňují interpolovat dosažené výsledky do humánní sféry (Fleischmannova *et al.*, 2008). Z hlediska utváření dentice však existuje mezi myším modelem a člověkem několik rozdílů (Obr. 1). U myši nacházíme redukovanou dentici (jeden řezák oddělený diastemou od tří molárů v každém kvadrantu), bezsklovinné oblasti molárů, pouze jednu generaci zubů, ale také neustále dorůstající řezáky. První myší mandibulární molár (M1) je nejčastější model studia odontogeneze (Fleischmannova *et al.*, 2008; Maas *et Bei*, 1997; Matalova *et al.*, 2008).

Apoptóza se podílí na vývoji mnoha orgánů včetně zubů a kostí. Kaspázy, molekuly dříve striktně spojované s apoptotickým a zánětovým procesem, jsou však v současnosti popisovány také v oblasti buněčné diferenciaci nebo proliferace (Lamkanfi *et al.*, 2007). Tyto multiplicitní vlastnosti je nezbytné definovat nejen z důvodu rozšíření poznatků o funkcích kaspáz v procesech mimo apoptózu, ale také potenciálního využití těchto faktorů pro terapeutické účely.



**Obr. 1: Srovnání myší a lidské dentice.** Zubní vzorec: myši 1I-3M, zubní vzorec člověka: 2I-1C-2P-3M.

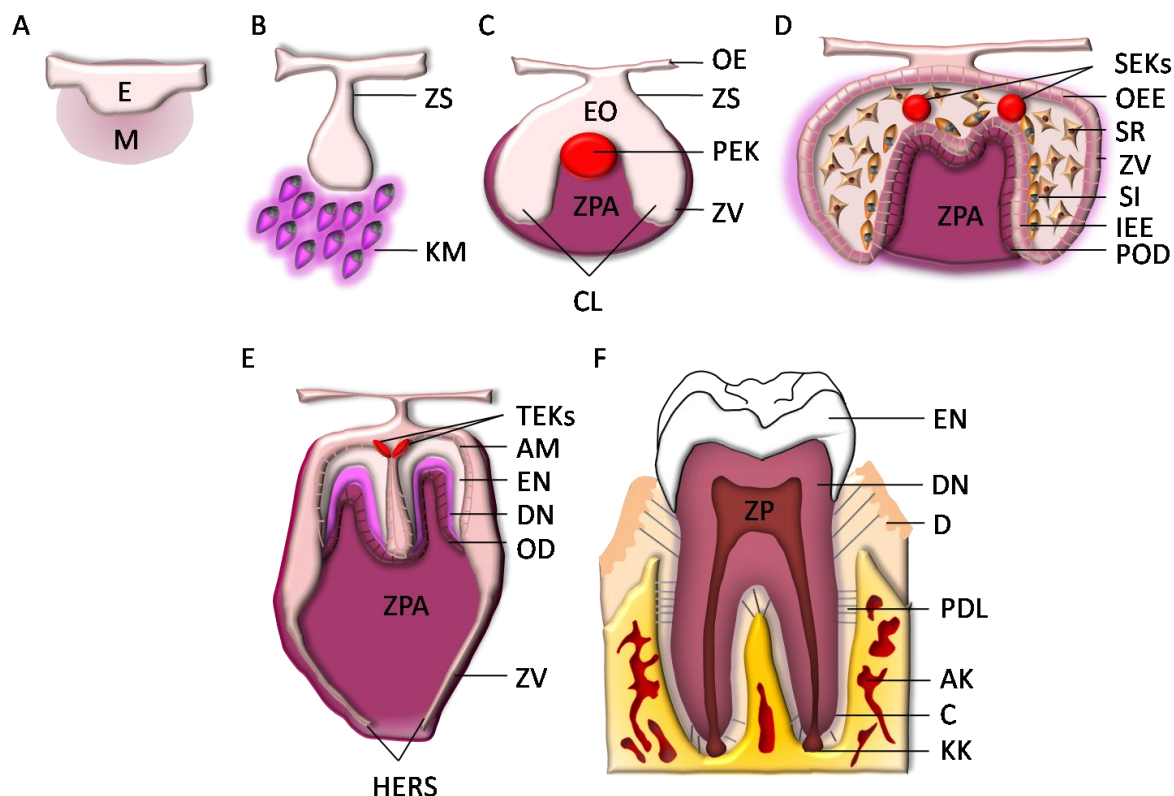
## 1.1. Odontogeneze

Vývoj zubů neboli odontogeneze je iniciován již v časném embryonálním vývoji. Zubní zárodek se vyvíjí na základě recipročných interakcí mezi zubním epitelem a ektomesenchymovými buňkami, které pocházejí z neurální lišty (Miletich *et* Sharpe, 2004; Tucker *et* Sharpe, 1999). Bez ohledu na typ zubu prochází zubní zárodek stádiem morfogeneze (definování základního tvaru), histogeneze (formování specifických typů tkání) a mineralizace (ukládání anorganických látek).

### 1.1.1. Vývoj moláru

Myší dentice obsahuje tři moláry (M1, M2, M3). Odlišují se především velikostí a iniciací zubního vývoje (v čase iniciace i molekulárních signálech). Nejdříve je iniciován vznik M1, a to v embryonálním dni (E) 9,5. Přibližně o den později následuje iniciace M2 a M3 se zakládá až postnatálně. Morfologie myších molárů během vývoje byla studována pomocí histologických řezů i trojrozměrných modelů (Cohn, 1957; Gaunt, 1966; Lesot *et al.*, 1996; Peterkova *et al.*, 1996). Molár prochází několika charakteristickými stádii (Obr. 2). První morfologicky zřetelnou strukturou zubního vývoje M1 je ztlustění zubního epitelu (E11). Epitelové buňky proliferují, kolem nich kondenzují mesenchymové buňky a vzniká zubní pupen (E12,5). Na dalším růstu zubu se podílí signální centrum zvané primární sklovinný uzel (PEK), který se zakládá na vrcholu epitelové části pupenu. V této oblasti byla detekována přítomnost mnoha proliferačních a diferenciacních faktorů, mezi nimi sonic hedgehog (SHH), kostní morfogenetický faktor (BMP) 2, 4, 7, fibroblastový růstový faktor (FGF) 4 (Jernvall *et al.*, 1998; Jernvall *et* Thesleff, 2000; Thesleff *et* Sharpe, 1997; Vaahtokari *et al.*, 1996a; kompletní seznam genů je uveden na stránce <http://bite-it.helsinki.fi/>). Vlivem signálů PEK dochází k prodloužení cervikální smyčky (CL) (Jernvall *et al.*, 1994) a přechodu pupenu do stádia pohárku (E14,5). V této fázi vývoje je již patrný zubní vak, který obklopuje vyvíjející se zubní zárodek (Zhang *et al.*, 2003). Zubní vak obsahuje populace progenitorů, které diferencují v perinatálním vývoji ve fibroblasty periodontálního ligamenta, osteoblasty a cementoblasty (Luan *et al.*, 2006). V následujícím stádiu zvonku (E16) pokračuje proliferace epitelových buněk, CL se zanořuje do mesenchymu. U báze CL se vytváří sekundární sklovinné uzly (SEK) (Keranen *et al.*, 1998). Tato signalizační centra pravděpodobně vznikají migrací části buněk PEK (Coin *et al.*, 1999; 2000a), přestože některé experimenty tuto hypotézu nepotvrdily (Matalova *et al.*, 2005a). Vlivem signálů SEK dochází ke vzniku epitelových invaginací, které dávají základ zubním hrbolům (Luukko *et al.*, 2003; Tucker *et* Sharpe, 2004). Jako poslední signalizační

oblasti se objevují terciální sklovinné uzly (TEK). Jsou patrné od perinatálního období a mohou se podílet na formování výsledného tvaru zubní korunky (Luukko *et al.*, 2003).



**Obr. 2: Vývoj moláru (frontální řez).** Ztlustění zubního epitelu (A), zubní pupen (B), zubní pohárek (C), časný zubní zvoněk (D), pozdní zubní zvoněk (E), molár dospělého jedince (F). AK (alveolární kost), AM (ameloblasty), C (cement), CL (cervikální smyčka), D (dásěň), DN (dentin), E (epitel), EN (sklovina), EO (sklovinný orgán), IEE (vnitřní sklovinný epitel), HERS (Hertwigova epitelová kořenová pochva), KK (kořenový kanál), KM (kondenzovaný mesenchym), M (mesenchym), OD (odontoblasty), OE (orální epitel), OEE (vnější sklovinný epitel), PDL (periodontální ligamentum), PEK (primární sklovinný uzal), POD (preodontoblasty), SEK (sekundární sklovinné uzly), SI (stratum intermedium), SR (hvězdčicové retikulum), TEK (terciální sklovinné uzly), ZP (zubní pulpa), ZPA (zubní papila), ZS (zubní stopka), ZV (zubní vak).

Sklovinný orgán (EO) neboli epitelová část zubního zvonku, je od E16 tvořen čtyřmi odlišnými vrstvami buněk. V těsné blízkosti zubní papily se nachází vrstva prizmatických buněk označovaná jako vnitřní sklovinný epitel (IEE) obsahující prekurzory funkčních ameloblastů a ameloblastů bezsklovinných oblastí na vrcholech myších molárů (Addison *et* Appleton, 1921). K IEE přiléhá vrstva hustě uspořádaných epitelových buněk vřetenovitého tvaru: *stratum intermedium* (SI) zajišťující přísun živin a regulaci diferenciace IEE. Nad SI se nachází hvězdčicové retikulum (SR), rozvolněná vrstva epitelových buněk představující ochranu a dobře prostupnou tkáň pro živiny nezbytné při amelogenezi. Zevní vrstvu sklovinného orgánu tvoří kubické buňky vnějšího sklovinného epitelu (OEE). IEE a OEE se

od sebe liší morfologicky, metabolickou aktivitou, mitotickou aktivitou či přítomností hemidesmozomů (Lesot *et al.*, 2002).

Po dokončení histogeneze sklovinného orgánu následuje formování tvrdých tkání korunky: dentinogeneze - tvorba zuboviny neboli dentinu (E18,5) a amelogeneze - tvorba skloviny neboli enamelu (P0). Dentinogeneze je zahájena indukčními signály, které jsou produkovány orgánem skloviny, na příklad WNT či transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), (Begue-Kirn *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2013). Vlivem iniciačních signálů dochází k diferenciaci a polarizaci mesenchymových buněk přiléhajících k bazální membráně IEE v preodontoblasty/odontoblasty. Odontoblasty mají prizmatický tvar a dobře vyvinutý sekreční aparát. Směrem k IEE produkují odontoblasty preentin (směs glykoproteinů, proteoglykanů a kolagenních vláken), sekrece probíhá pomocí apikálního cytoplazmatického výběžku, který se nazývá Tomesovo vlákno. Organická matrix preentinu je následně mineralizována ukládáním krystalů hydroxyapatitu, což vede k přeměně na dentin. Depozicí preentinu/dentinu se odontoblasty posunují směrem do budoucí zubní pulpy a Tomesovo vlákno se prodlužuje. Aktivita odontoblastů na rozdíl od ameloblastů pokračuje i po prořezání zubu (sekundární, terciální nebo reparativní dentin).

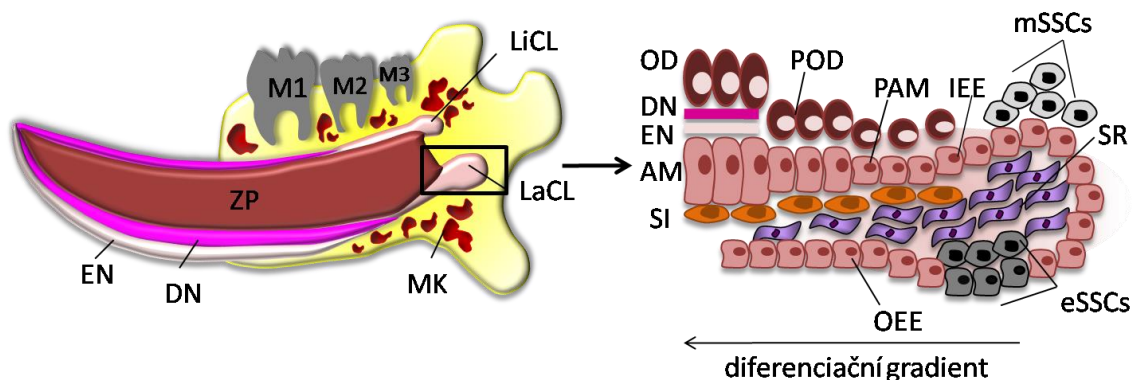
V důsledku vzniku dentinové bariéry mění preameloblasty svoji polaritu a dochází k jejich diferenciaci v ameoblasty, během tohoto procesu se uplatňují faktory BMP a FGF (Plikus *et al.*, 2005; Takamori *et al.*, 2008). Ameloblasty produkují organickou matrix (mimo jiné amelogenin, ameloblastin, enamelin, tuftelin), která je následně mineralizována hydroxyapatitovými krystaly. V maturační fázi skloviny ameloblasty produkují matrixové metaloproteinázy (MMP), které se podílejí na zpětné resorpci organických složek a vzniku vysoce mineralizované tkáně (Smith, 1998). Dentinogeneze i amelogeneze jsou iniciovány nejprve v růstových zónách korunky a dále pokračují směrem k CL.

Po ukončení vývoje korunky začíná vývoj kořene. Tento proces je iniciován tvorbou Hertwigovy kořenové epitelové pochvy (HERS) z buněk CL. Na tvorbě bazální membrány HERS se podílejí epitelové i mesenchymové buňky. HERS ovlivňuje růst a tvar kořene (Andreasen *et al.*, 1990), řídí diferenciaci buněk zubní papily v odontoblasty a zubního vaku v cementoblasty. Dentinogeneze korunky a kořene probíhá podobným, ale pravděpodobně ne zcela identickým mechanismem; odontoblasty korunky mají prizmatický (styloidní) tvar, kdežto odontoblasty kořene nabývají kubického tvaru (Park *et al.*, 2007; Steele-Perkins *et al.*, 2003). Regulace diferenciaci odontoblastů se účastní pravděpodobně SHH a proteiny sklovinné matrix (Bosshardt *et Nanci*, 2004).

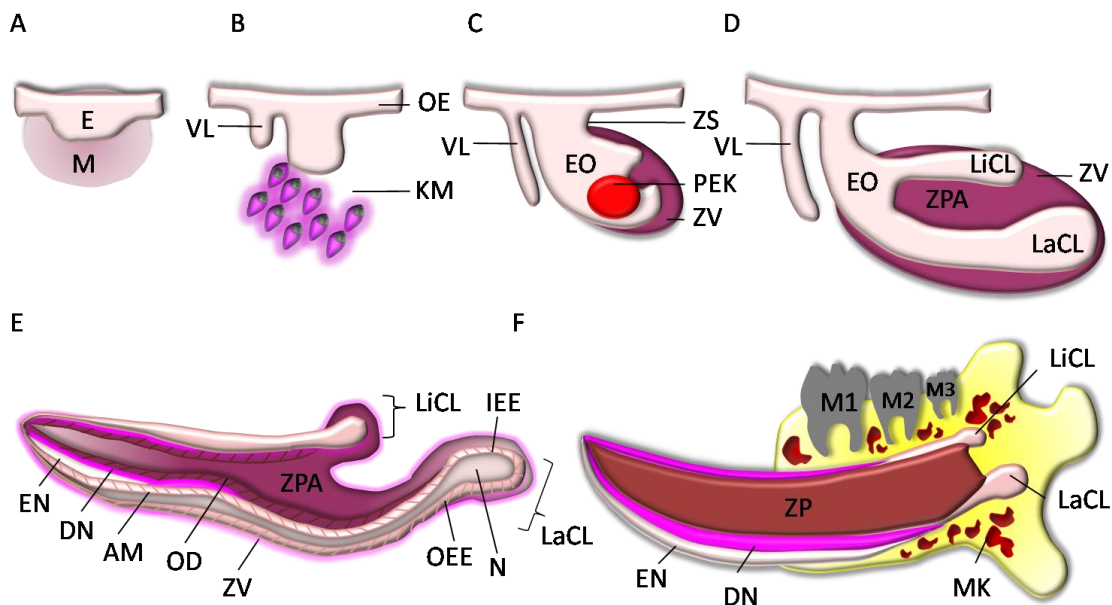
Během tvorby dentinu dochází ke vzniku fenestrací v HERS. Mesenchymové buňky vnitřní vrstvy zubního vaku migrují pomocí těchto otvorů na povrch dentinu, kde diferencují v cementoblasty a zahajují cementogenezi (Bosshardt *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2008). Během cementogeneze se uplatňuje exprese molekul, mezi které patří osteonektin, kostní sialoprotein, proteoglykany (MacNeil *et al.*, 1993). Regulace cementogeneze je pravděpodobně řízena BMP2 (Zhao *et al.*, 2003). Ze zubního vaku pocházejí také buněčné prekurzory formující Sharpeyova vlákna periodontálního ligamenta (PDL), která spojují alveolární kost s cementem (Han *et al.*, 2010; Luan *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009). Další fází vývoje M1 je erupce v postnatálním stádiu (P) 17 (Caton *et al.*, 2009), která je doprovázena resorpcí alveolární kosti i kostní apozicí (Lungova *et al.*, 2011; Marks *et al.*, 1986). Správně formovaný myší M1 má 6 zubních vrcholů: tři linguální, tři bukální.

### 1.1.2. Vývoj řezáku

Myší řezák se od molárů odlišuje především svým tvarem, má pouze jediný zubní vrchol, jehož vývoj řídí jeden sklovinný uzel (Kieffer *et al.*, 1999). Řezáky myši jsou schopny sebeobnovy (Obr. 3), která je dána přítomností somatických kmenových buněk (SSCs) (Harada *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).



**Obr. 3: Niche kmenových buněk myších řezáků (sagitální řez).** Zdroj epitelových somatických kmenových buněk, ze kterých diferencují ameloblasty, se nachází v OEE a SR labiální části cervikální smyčky. AM (ameloblasty), DN (dentin), EN (sklovina), eSSCs (epitelové somatické kmenové buňky), IEE (vnitřní sklovinný epitel), LaCL (labiální část cervikální smyčky), LiCL (linguální část cervikální smyčky), M1 (první molár), M2 (druhý molár), M3 (třetí molár), MK (mandibulární kost), mSSCs (mesenchymové somatické kmenové buňky), OD (odontoblasty), OEE (vnější sklovinný epitel), PAM (pre-ameloblasty), POD (pre-odontoblasty), SI (stratum intermedium), SR (hvězdicovité retikulum), ZP (zubní pulpa). Převzato a upraveno podle Chang *et al.* (2013).



**Obr. 4: Vývoj řezáku (sagitální řez).** Ztluštění zubního epitelu (A), zubní pupen (B), zubní pohárek (C), časný zubní zvonek (D), pozdní zubní zvonek (E), řezák dospělého jedince (F). AM (ameloblasty), DN (dentin), EN (sklovina), E (epitel), EO (sklovinný orgán), IEE (vnitřní sklovinný epitel), KM (kondenzovaný mesenchym), LaCL (labiální část cervikální smyčky), LiCL (linguální část cervikální smyčky), M (mesenchym), M1 (první molár), M2 (druhý molár), M3 (třetí molár), MK (mandibulární kost), N (niche kmenových buněk), OD (odontoblasty), OE (orální epitel), OEE (vnější sklovinný epitel), PEK (primární sklovinný uzel), VL (vestibulární lišta), ZP (zubní pulpa), ZPA (zubní papila), ZS (zubní stopka), ZV (zubní vak).

Vývoj mandibulárního řezáku (Obr. 4) začíná v období E11,5 ztluštěním zubního epitelu, pokračuje stádiem pupene (E12,0 – 13,0), pohárku (E13,5 – 15,5) a zvonku (E16,0) (Kieffer *et al.*, 1999). Řezák je charakteristický svou asymetrickou strukturou, sklovina je přítomna pouze na labiální (La) straně, což zajišťuje jeho správnou funkci při zpracování potravy. Asymetrická morfologie vychází z asymetrické distribuce signálních molekul (Kuang-Hsien Hu *et al.*, 2014). Během vývoje dochází k diferenciaci ameloblastů z buněk IEE, které jsou obnovovány ze zdroje epitelových SSCs v LaCL skrze přechodné dělicí se buňky (TA). Podobně jsou obnovovány či regenerovány buňky zubní pulpy a odontoblasty. Mesenchymové SSCs se nachází v apikální části řezáku v niche mezi Li a LaCL. Současné studie ukazují, že tyto buňky mohou pocházet z gliových buněk či pericytů (Kaukua *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014). V řezáku je tedy patrný diferenciační gradient od CL k distálnímu konci řezáku. Vývoj zubních tkání řezáku je regulován FGF signalizací (Harada *et al.*, 2002), geny sprouty (Klein *et al.*, 2008), aktivinem (Harada *et al.*, 2002), BMP4 (Plikus *et al.*, 2005),

SHH (Seidel *et al.*, 2010) a geny NOTCH (Fortini *et al.*, 1993), které spolu vzájemně interagují.

## 1.2. Osteogeneze

Tvorba kostí neboli osteogeneze probíhá dvěma základními mechanismy: intramembranózní osifikací, kterou vznikají kosti lebky, sternum, klíční kost či mandibula, nebo osifikací endochondrální, kterou vzniká většina kostí skeletu (kosti končetin, obratle, žebra). Během intramembranózního vývoje diferencují osteoblasty přímo z kondenzovaných mesenchymových buněk. Endochondrální osifikace je naopak charakteristická tvorbou chrupavčité struktury, která je následně přestavěna na kostní tkáň. V obou formách osifikace se na výstavbě kosti podílí tři typy buněk: osteoblasty (aktivní buňky produkující kostní matrix), osteocyty (buňky obklopené kostní matrix s redukováným sekrečním aparátem a buněčným objemem) a osteoklasty (menší populace mnohobuněčných buněk původem z monocytové/makrofágové linie, které se podílejí na degradaci chrupavčitého základu a resorpci kosti) (Clarke, 2008). Pro diferenciaci osteoblastů je klíčovou molekulou transkripční faktor RUNX2 (Komori *et al.*, 1997), který spouští expresi genů kostní matrix: osteopontinu, kolagenu (COL) 1 a kostního sialoproteinu (Ducy *et al.*, 1997; Karsenty, 2001). Tento faktor lze využít jako časný marker osteogeneze, neboť je přítomen v mesenchymových kondenzacích již před zahájením osteogeneze. Diferenciace osteoklastů je řízena řadou transkripčních faktorů: PU.1, c-FOS, NF $\kappa$ B a MI (Wagner *et al.*, 2001). Dále osteoklastogenezi ovlivňují i sekretované proteiny M-CSF a systém zahrnující receptor pro jaderný aktivátor faktoru  $\kappa$  B (RANK)/ ligand receptoru pro jaderný aktivátor faktoru  $\kappa$  B (RANKL)/ osteoprotegrin (OPG) (Dougall *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 1999; Simonet *et al.*, 1997). Interakcí RANKL produkovaného osteoblasty a RANK, který je exprimován na prekurzorech osteoklastů, dochází k aktivaci osteoklastogeneze. Naopak neutralizací RANKL pomocí návnadového (tzv. „decoy“) receptoru OPG je osteoklastogeneze inhibována.

Osteogeneze je komplexní proces, osteoblasty nejprve syntetizují organickou matrix (kolageny, osteokalcin, osteopontin, osteonektin, sialoprotein *etc.*), následně dochází k její mineralizaci usazováním hydroxyapatitových krystalů a remodelaci. Osteocyty vznikající maturací osteoblastů nejsou zcela neaktivní a dále se podílejí na regulaci diferenciaci osteoblastů a osteoklastů. Během tvorby buněčné matrix nejprve vzniká primární (vláknitá) kost, která je následně přestavěna na kost sekundární (lamelózní) (Tichy *et al.*, 2000).

Vývoj kostní tkáně reguluje rozsáhlá síť signálních drah, kromě výše uvedených byly popsány jako klíčové faktory osteogeneze následující molekuly: faktory rodiny BMP



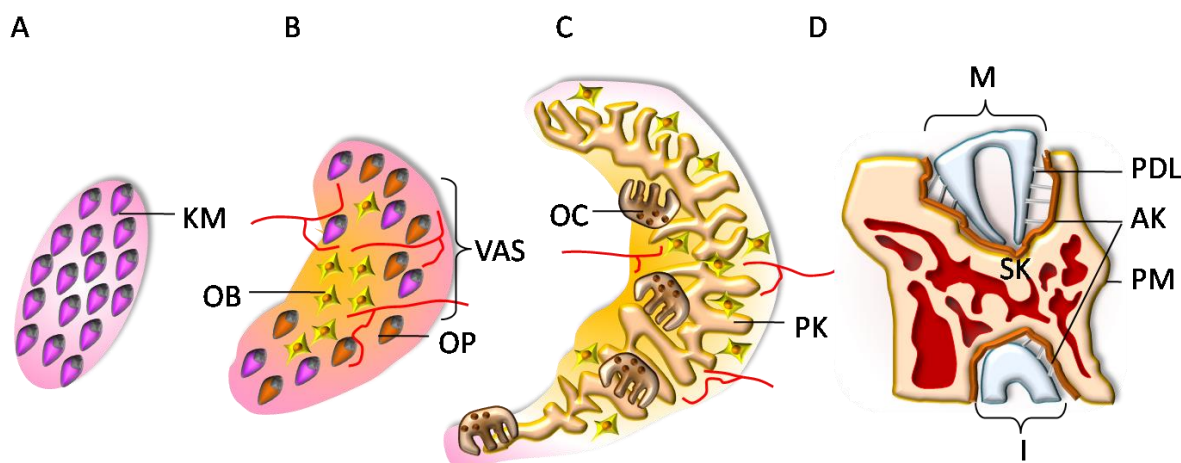
(Groeneveld *et al.*, 2000), rodina FGF (Marie, 2012), hedgehog proteiny (Spinella-Jaegle *et al.*, 2001), vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) (Clarkin *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012), dráha TGF $\beta$  (Chen *et al.*, 2012), transkripční faktory MSX (Bendall *et al.*, 2000) a SOX9 (Wright *et al.*, 1995). V poslední době se ukazuje, že zastoupení signálních molekul během endochondrální a intramembranózní osifikace není identické (Chung *et al.*, 2004).

### **1.2.1. Intramembranózní osifikace (mandibulární a alveolární kost)**

Mandibula se zpočátku vyvíjí intramembranózně, na proximálních koncích se však tvoří sekundární chrupavky, které podléhají endochondrální osifikaci (Shibata *et al.*, 1996). Mandibulární kost vzniká laterálně od Meckelovy chrupavky, která zajišťuje oporu mandibuly během časného embryonálního vývoje. V pozdějších stádiích zaniká střední část Meckelovy chrupavky, rostrální výběžek podstupuje endochondrální osifikaci a stává se součástí mandibuly a kaudální konec se podílí na formování kůstek středního ucha (Bhaskar *et al.*, 1953; Bernick *et al.*, 1969; Frommer *et al.*, 1971; Harada *et al.*, 1998; Ishizeki *et al.*, 1997). Počátek vývoje mandibulární kosti (Obr. 5) je iniciován v E12 kondenzací buněk neurální lišty, tyto buňky prolifерují a následně diferencují do linie osteoblastů. První známky organické matrix se objevují v E13 (Dixon, 1977), tvoří ji převážně COL1 a nekolagenní proteiny: osteokalcin, osteopontin, kostní sialoprotein (Sodek *et al.*, 2000). K mineralizaci dochází ukládáním hydroxyapatitových krystalů (E14,5). Během maturace kostní tkáň podléhá některé osteoblasty apoptóze, ostatní jsou plně obklopeny kostní matrix a stávají se osteocyty. Cévy jsou přinášeny živiny a prekurzory osteoklastů podílejících se na remodelaci kostní tkáň. V superficiální části mandibulární kosti se v E15,5 začínají formovat alveolární výběžky (Cho *et al.*, 2000; Radlanski *et al.*, 1998; Ramaesh *et al.*, 2003). Později (E17,5) je již možné pozorovat tyto výběžky nálevkovitě nasedající na zubní zvonek M1 (Zhang *et al.*, 2003). Největší změny v morfologii alveolárních výběžků mandibulární kosti však nastávají až postnatálně během vývoje zubních kořenů a zubní erupce (Cho *et al.*, 2000).

Alveolární kost se spojuje s alveolárními výběžky mandibulární kosti a stává se součástí mandibuly. Na formování alveolární kosti se podílejí osteoblasty diferencované z mesenchymových prekurzorů zubního vaku. Původ alveolárních osteoblastů byl prokázán několika nezávislými experimenty sledujícími migraci buněk ze zubního vaku, schopnost jejich indukce do osteogenních linií či charakteristickou genovou expresí (Diekwisch, 2002; Diep *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2007; Ten Cate *et al.*, 1971; Ten Cate *et al.*, 1972; Zhao *et al.*,

2002). K expanzi alveolární kosti dochází v období formování zubních kořenů. Zralá alveolární kost je tvořena kompaktní kostí s Haversovým systémem lamel a upínají se do ní Sharpeyova vlákna periodontia. Primární kost není nahrazena kostí sekundární. Periost není přítomen, jeho funkci plní periodontium (Malinsky *et al.* 1995).



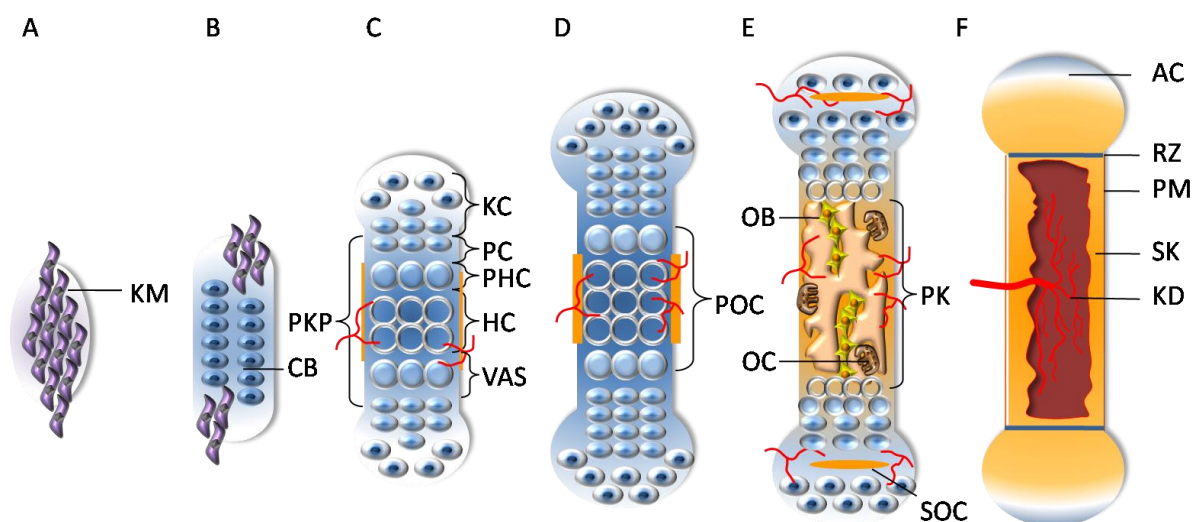
**Obr. 5: Vývoj mandibulární kosti.** Kondenzovaný mesenchym pocházející z buněk neurální lišty (A), diferenciace osteogenních progenitorů a následně osteoblastů (B), tvorba primární kostní matix osteoblasty a diferenciace osteoklastů z buněk imunitního systému (C), frontální řez dospělé mandibulární/ alveolární kosti obklopující molár a řezák (D). AK (alveolární kost), I (fragment řezáku), KM (kondenzovaný mesenchym), M (kořen moláru), OB (osteoblast), OC (osteoklast), OP (osteogenní progenitor), PDL (periodontální ligamentum), PK (primární kost), PM (perichondrium), SK (sekundární kost), VAS (vaskularizace).

Alveolární/mandibulární kost se podílí na regulaci expanze zubního zárodku (Alfaqeeh *et al.*, 2013). Vývoj i remodelaci alveolární/mandibulární kosti ovlivňují signální molekuly (Ohazama *et al.*, 2004) v těsné součinnosti s mechanickými silami (Benjamin *et Hillen*, 2003; Ingber, 2005; Radlanski *et Renz*, 2006). Členové rodiny DLX regulují formaci čelistí a jejich identitu (Depew *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 1995;). Růst mandibulární a alveolární kosti dále ovlivňuje MSX1 a MSX2 (Aioub *et al.*, 2007; Satokata *et Maas*, 1994; Zhang *et al.*, 2003). Signální dráha RANK/RANKL/OPG reguluje nejen remodelaci kosti, ale podílí se také na koordinaci interakce kosti a zubu (Ohazama *et al.*, 2004).

### 1.2.2. Endochondrální osifikace (dlouhé kosti končetin)

Vývoj končetin je zahájen tvorbou končetinového pupene, který je polarizován molekulárními signály: antero-posteriorně SHH, dorzo-ventálně WNT7a a proximo-distálně působí členové rodiny FGF (Niswander, 2002; Taher *et al.*, 2011). Přední i zadní končetiny

jsou formovány podobným způsobem, vývoj zadní končetiny je však zpožděn přibližně o polovinu dne (Towers *et al.*, 2009). Pupen horní končetiny u myši se zakládá v E9,5. Je tvořen mesenchymovými buňkami laterálního mezodermu a okolním ektodermem. Formování dlouhých kostí zahrnuje několik stádií (Obr. 6). V E12 dochází ke kondenzaci mesenchymových buněk (Olsen *et al.*, 2000) a následně vlivem SOX9 (~E13) k jejich diferenciaci do linie chondroblastů (Akiyama *et al.*, 2002; Bi *et al.*, 1999).



**Obr. 6. Vývoj dlouhých kostí končetiny.** Kondenzace buněk laterálního mezodermu (A), diferenciace chondroblastů (B), maturace chondrocytů a přechod do hypertrofie (C), vznik primárního osifikačního centra (D), expanze primárního osifikačního centra (E), přestavba primární kosti na kost sekundární (F). AC (artikulární chrupavka), CB (chondroblasty), HC (hypertrofické chondrocyty), KC (klidové chondrocyty), KD (kostní dřeň), M (mesenchymové prekurzory), OB (osteoblasty), OC (osteoklasty), PC (proliferující chondrocyty), PHC (prehypertrofické chondrocyty), PK (primární kost), PKP (periostální kostní prstenec), PM (periost), POC (primární osifikační centrum), RZ (růstová zóna), SK (sekundární kost), SOC (sekundární osifikační centrum), VAS (vaskularizace).

Současně se během diferenciace chondrocytů uplatňuje dráha BMP, WNT/ $\beta$ -katenin (Urist, 1965; Tamamura *et al.*, 2005; Wang, 1993; Yoon *et al.*, 2004) a FGF regulující růst, diferenciaci či apoptózu (Ornitz *et al.*, 2002). Chondroblasty přecházejí do stádia chondrocytů, které lze morfologicky i biochemicky rozdělit do čtyř subpopulací (E15,5). Jedná se o chondrocyty v zónách klidových, proliferujících, pre-hypertrofických a hypertrofických. Od distálního a proximálního konce směrem ke středu budoucí kosti chondrocyty proliferují, produkují matrix obsahující COL2 (Kosher *et al.*, 1986; Zhao *et al.*, 1997), vstupují do pre-hypertrofického stádia a finálně hypertrofují.

Regulaci hypertrofického přechodu zajišťuje Indian Hedgehog (IHH), který je produkován pre-hypertrofickými chondrocyty (St-Jacques *et al.*, 1999), a parathormonu příbuzný protein (PTHrP), který je exprimován v klidové a proliferující zóně chondrocytů (Lanske *et al.*, 1996). Hypertrofické chondrocyty produkují COL10 (Schmid *et Linsenmayer*, 1985), MMP13 uplatňující se během přestavby kalcifikované chrupavky na kostní tkáň (Behonick *et al.*, 2007; Inada *et al.*, 2004) a VEGF (Gerber *et al.*, 1999; Maes *et al.*, 2002).

Osifikace dlouhých kostí je iniciována uprostřed diafýzy, kde vzniká perichondrální vaskularizovaný prstenec. Jeho buňky se na vnitřní straně mění v osteoblasty a perichondrium získává osteogenní vlastnosti (Colnot *et al.*, 2004). Výsledkem tohoto procesu je uzavření centrální oblasti diafýzy periostálním kostním prstencem. Současně také dochází k hypertrofii chondrocytů a vzniku primárního osifikačního centra (E17,5). Chrupavka následně kalcifikuje a je rozrušována chondroklasty. Během této přestavby zůstává chrupavka zachována pouze v oblasti kloubu (artikulární chrupavka) a v růstových ploténkách zanikajících v dospělosti. Vrstující cévy přinášejí mesenchymové buňky, které diferencují v osteoblasty produkující organickou hmotu - osteoid. V epifýzách dochází ke vzniku sekundárních osifikačních center. Vznikající primární kost (vláknitá) je opět rozrušována a přestavována na kost sekundární (kompaktní a spongiózní v oblastech epifýz) (Tichy *et al.*, 2000).

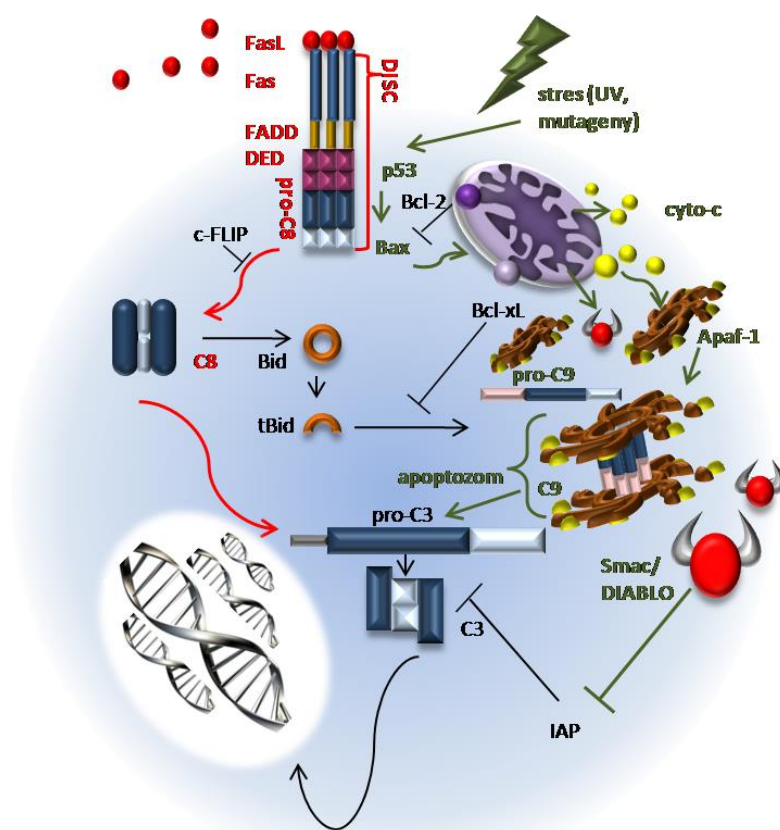
### **1.3. Apoptóza**

Apoptóza je definována jako fyziologický proces, který se uplatňuje v prenatálních i postnatálních procesech, čímž se podílí na udržování homeostázy organismu. Tento jev byl popsán v roce 1972 (Kerr *et al.*, 1972), název pochází z řeckého από (apo) πτώσις (ptosis), což v překladu znamená opadávání (například listů, okvětních plátků *etc.*). Apoptóza se podílí na vývoji orgánů ve smyslu eliminace „nadbytečných“ buněk. Její vliv byl podrobně popsán při formování nervové soustavy či končetin (Doseff, 2004; Meier *et al.*, 2000). Dále se apoptóza uplatňuje při likvidaci buněk napadených patogeny nebo při odstraňování starých a potenciálně nebezpečných buněk. Nepřiměřená (zvýšená i snižená) apoptóza vede k patologickým stavům. Ve spojení s deregulací apoptózy byly popsány četné vývojové defekty, autoimunitní choroby, neurodegenerativní onemocnění či iniciace karcinogeneze (Meier *et al.*, 2000).

Od zahájení apoptotického procesu prochází buňka několika stádii s charakteristickými morfologickými znaky, podle kterých je možné apoptózu rozpoznat. Patrné je zaškrcování cytoplazmatické membrány, kondenzace chromatinu, fragmentace jádra a celkové smršťování buněčného objemu (Hacker, 2000; Kerr *et al.*, 1972). Ve finální fázi se

buňka rozpadá na apoptotická tělíška, která jsou odstraněna fagocyty bez vyvolání zánětu. Důležitým parametrem apoptózy je dynamičnost, která umožňuje rychle reagovat na různé situace v organismu. Celý proces trvá 30 až 60 minut (Bronckers *et al.*, 2000; Satchell *et al.*, 2003; Savill *et al.*, 1993). Klíčovými proteiny apoptózy jsou kaspázy (Crawford *et Weells*, 2011). Ukazuje se však, že apoptóza může probíhat i bez aktivace kaspáz (Abraham *et Shaham*, 2004; Borner *et Monney*, 1999). Apoptóza byla popsána také za účasti dalších proteolytických faktorů například granzymu B či katepsinů (Mathiasen *et al.*, 1999; Mathiasen *et al.*, 2002).

Obecně existují dvě hlavní cesty spouštění apoptózy (Obr. 7). Jedná se o vnitřní (mitochondriální) a vnější (receptorovou) formu.



**Obr. 7: Schématické znázornění apoptotického procesu.** Vnitřní cesta apoptózy (zelená): p53 transaktivuje Bax, což vede k narušení membrány mitochondrií a úniku cytochromu-c do cytoplazmy, kde dochází k formaci apoptozomu (pro-C9, Apaf-1, cyto-c za účasti ATP), a aktivaci C9. Vnější cesta apoptózy (červená): proces je zahájen vazbou ligandu na receptor smrti, pomocí signálního komplexu indukujícího buněčnou smrt (DISC: FasL, Fas, FADD, pro-C8) je aktivována C8. C8 a C9 štěpí/aktivují C3. Aktivace centrální C3 vede ke štěpení jaderné DNA. Obě cesty se mohou prolínat přes molekulu Bid/tBid. C (kaspáza), pro-C (prokaspáza), cyto-c (cytochrom-c), FADD (Fas-asociovaná doména smrti), IAP (inhibitory apoptotických proteinů), Smac/Diablo (druhý mitochondriální aktivátor kaspáz).

Oba procesy vedou k aktivaci exekučních kaspáz, které štěpí cytoplazmatické faktory, čímž dochází k amplifikaci apoptózy a jaderné proteiny, což vede k finální fázi apoptózy. V této fázi štěpí exekuční kaspázy konstitutivní inhibitor kaspázou aktivované DNázy (ICAD), tím dochází k aktivaci kaspázou aktivované DNázy (CAD) a intenzivnímu štěpení DNA (Enari *et al.*, 1998). Dále je štěpena poly-(ADP-ribóza)-polymeráza (PARP), která se podílí na reparaci DNA zlomů (Kaufman *et al.*, 1993; Tewari *et al.*, 1995), proteiny chromozomálních komplexů (Faragher *et al.*, 2007), či složky jaderné membrány: lamininu (Lazebnik *et al.*, 1995; Orth *et al.*, 1996).

Na regulaci apoptózy se podílí proapoptotické (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, Bim, Puma, Blk, Hrk, BNIP3, BimL) a antiapoptotické faktory (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, *etc.*), jejichž poměr rozhoduje o indukci apoptózy či přežití buňky (Zimmermann *et Green*, 2001).

## **1.4. Kaspázy**

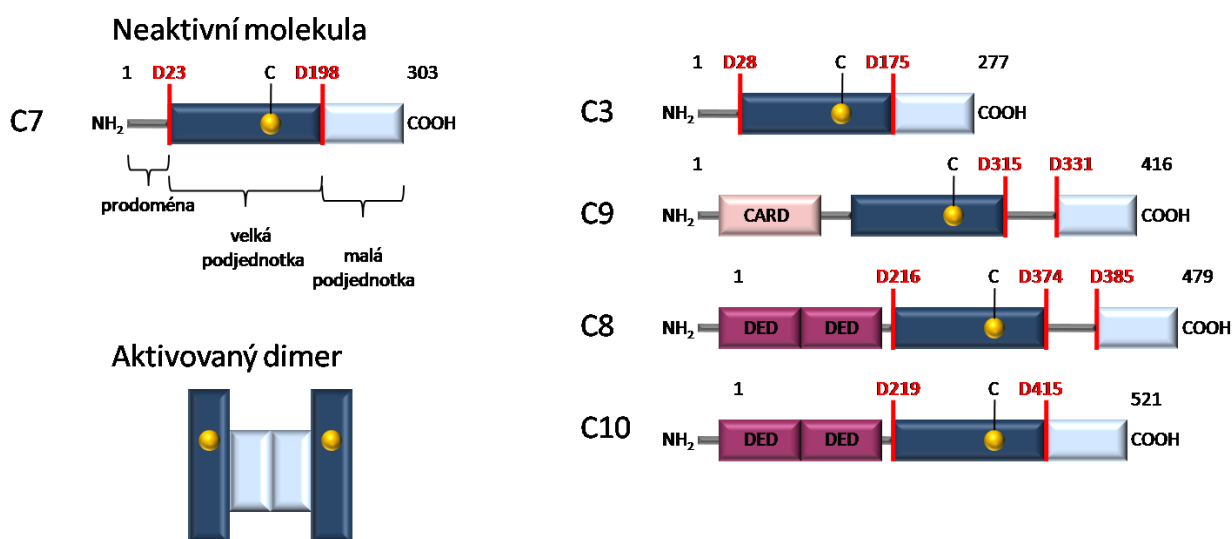
Název kaspáz je odvozen od jejich funkce a struktury aktivního místa (*caspases* – *cystein dependent aspartate proteases*) (Alnemri *et al.*, 1996). Ke štěpení substrátů kaspáz dochází v místě za aspartátem (Asp, D) pomocí aktivního místa obsahujícího cystein (Stennicke *et Salvesen*, 1999). Tato specifická proteázová aktivita má v buňkách unikátní postavení. Kaspázy se účastní řízeného štěpení proteinů buňky, které může mít inaktivační, ale také aktivační charakter. Na základě struktury a funkce bylo u savců identifikováno 15 různých kaspáz (Chowdhury *et al.*, 2008).

### **1.4.1. Kaspázy – faktory buněčné smrti a dalších buněčných procesů**

Dlouhou dobu byly kaspázy spojovány výhradně s apoptotickými a zánětovými procesy. V současnosti jsou účinky kaspáz popisovány také při proliferaci T-lymfocytů, během regulace buněčného cyklu, tvorby erytrocytů a krevních destiček a diferenciaci různých buněk, například keratinocytů, osteoblastů, myoblastů či neurálních kmenových buněk (Lamkanfi *et al.*, 2007). Kromě diferenciačních procesů nesouvisejících přímo s apoptotickým procesem (makrofágy, kosterní svalstvo), se mohou kaspázy účastnit buněčné diferenciace formou nekompletního apoptotického procesu, jako je tomu u buněk oční čočky (Schwerk *et Schulze-Osthoff*, 2003).

### 1.4.1. Struktura a aktivace kaspáz

Kaspázy jsou syntetizovány v neaktivní formě (prokaspázy). Struktura monomeru se skládá z N-koncové prodomény, velké (17-20 kDa) a malé (10-12 kDa) podjednotky (Obr. 8). Velká podjednotka obsahuje katalytické místo s cysteinem, malá podjednotka obsahuje zbytky aminokyselin formující žlábek pro vazbu substrátu. Na základě velikosti prodomény jsou rozlišovány prokaspázy s dlouhou prodoménou (kaspázy-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -14) a prokaspázy s prodoménou krátkou (kaspázy -3, -6, -7).



**Obr. 8. Struktura pro/kaspázy-7 a dalších významných prokaspáz účastnících se apoptózy.** Během aktivace kaspázy-7 dochází k odštěpení prodomény a tvorbě homodimeru, kdy dojde k odhalení aktivních míst. Pozice aminokyselin uvedených molekul odpovídají lidským kaspázám. C (cystein), C3-10 (kaspázy), D (asparagin).

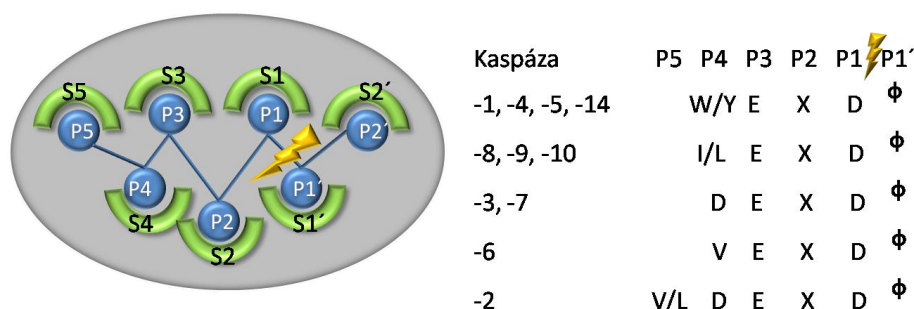
První skupina je aktivována pomocí adaptorových proteinů, na příklad s využitím Fas-asociované domény smrti (FADD). Adaptorové proteiny interagují s prodoménou kaspáz obsahující efektorovou doménu smrti (DED) (kaspázy-8 a -10) nebo kaspázovou aktivační doménu (CARD) (na příklad kaspázy-1, -2, -4, -5, -9). Aktivace těchto kaspáz je závislá na dimerizaci. Skupina prokaspáz s krátkou prodoménou se vyskytuje již ve stavu dimeru, vyžaduje však aktivační štepení. Malá a velká podjednotka katalytické domény je oddělena krátkým „linkerem“, jeho odštěpení umožňuje přestavbu smyček a formování katalytického místa (Riedl *et Shi*, 2004; Stennicke *et al.*, 1998).

Na základě pozice v proteolytické kaskádě lze v buňkách rozlišovat dva typy kaspáz. První skupinou jsou kaspázy iniciační (kaspázy-8, -9, -10), jejichž funkcí je aktivace skupiny efektorových (Thornberry *et al.*, 1997) neboli exekučních kaspáz (kaspázy -3, -6, -7).

Aktivovaná kaspáza má formu homodimeru složeného ze dvou heterodimerů: velké a malé podjednotky (Walker *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1994). Každý enzym obsahuje dvě aktivní místa, výjimkou je kaspáza-9 s jedním aktivním místem (Renatus *et al.*, 2001).

### 1.4.2. Subcelulární lokalizace a substráty kaspáz

Prokaspázy/kaspázy byly detekovány nejen v cytoplazmě, ale také v různých buněčných organelách: jádře, Golgiho aparátu, endoplazmatickém retikulu, mitochondriích (Chandler *et al.*, 1998; Krajewski *et al.*, 1999; Mancini *et al.*, 1998; Mancini *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2000; Quin *et al.*, 2001; Samali *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999; Zhivotovsky *et al.*, 1999). K aktivaci exekučních kaspáz dochází v cytoplazmě, následně jsou kaspázy translokovány do jádra, kde se podílejí na finální fázi apoptózy. Kromě jaderných proteinů kaspázy rozpoznávají a štěpí celou škálu dalších faktorů (Earnshaw *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2003). Obecně jsou kaspázami rozpoznávány specifické tetrapeptidy substrátů (Obr. 9), tyto sekvence se mohou mezi různými kaspázami překrývat, jak je tomu například u exekučních kaspáz-3 a 7 (Chen *et al.*, 1996; Kayalar *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997).



**Obr. 9: Znázornění míst substrátů, ve kterých dochází ke štěpení kaspázami.** Oblasti štěpení se mezi jednotlivými kaspázami liší, ke štěpení substrátu dochází mezi místem P1' a P1. D (Asn), E (Glu), Φ (aminokyseliny: Gly, Ala, Thr, Ser, Asn), I (Ile), L (Leu), P (místa substrátu rozpoznávaná enzymem), S (katalytická místa enzymu), V (Val), W (Trp). Převzato z Timmer *et Salvesen* (2007).

### 1.4.3. Efektorové (exekuční) kaspázy-3 a -7

#### Kaspáza-3

Jedná se o nejfrekventovanější a nejlépe probádanou efektorovou kaspázu. Prokaspáza-3 se nachází v cytoplazmě a mitochondriích (Mancini *et al.*, 1998; Samali *et al.*, 1998). Po aktivaci se přesouvá do jádra (Faleiro *et Lazebnik*, 2000; Chandler *et al.*, 1998), kde štěpí proteiny PARP, ICAD, MDM2, p21, laminin, pRb *etc.* (Chowdhury *et al.*, 2008).



Podílí se také na aktivaci prokaspázy-8 a dalších proapoptotických molekul, čímž amplifikuje proces apoptózy (Ferreira *et al.*, 2012). Fenotyp myši postrádajících kaspázu-3 se liší v závislosti na genetickém pozadí: kmen 129/ SvJ vykazoval perinatálně letální neurodegenerativní abnormality (Kuida *et al.*, 1996; Leonard *et al.*, 2002), kdežto u kmene C57BL16J nebyly tyto závažné změny pozorovány (Houde *et al.*, 2004; Leonard *et al.*, 2002). Tyto rozdíly by mohly spočívat v aktivaci alternativní dráhy na genetickém pozadí C57BL16J indukující apoptózu, která se u kmene 129/ SvJ neuplatňuje (Leonard *et al.*, 2002).

Kaspáza-3 byla popsána jako klíčový faktor pro eliminaci buněk PEK (Matalova *et al.*, 2006). Deficience kaspázy-3 stejně jako kaspázy-9 a apoptotického proteázového aktivačního faktoru (Apaf-1) vedla k inhibici apoptózy v PEK. Tato data poukázala na vnitřní cestu apoptózy jako hlavní mechanismus pro apoptotickou eliminaci PEK (Matalova *et al.*, 2006; Setkova *et al.*, 2007). Kaspáza-3 byla identifikována také jako významný faktor diferenciaci kostní tkáně. Osteoblasty derivované z kostní dřeně jedinců postrádajících kaspázu-3 vykazovaly nižší proliferační aktivitu a osteogenní potenciál proti kontrolám. Dále byl u myši postrádajících kaspázu-3 odhalen opožděný vývoj kostních tkání, dospělci měli sníženou kostní denzitu, separaci a tloušťku trámčů (Miura *et al.*, 2004).

### **Kaspáza-7**

Neaktivní kaspáza-7 se nachází v cytoplazmě (Zhivotovski *et al.*, 1999), po aktivaci byla detekována převážně v mitochondriální a mikrozomální frakci (Chandler *et al.*, 1998). Účastní se štěpení PARP a dalších jaderných proteinů (Faragher *et al.*, 2007), může se podílet také na štěpení prokaspázy-6 (Chowdhury *et al.*, 2008). Deficientní jedinci kmene C57BL16J jsou životaschopní a fertilní (Duprez *et al.*, 2011). Mimo apoptózu byla aktivace kaspázy-7 prokázána během zánětových procesů (Hotchkiss *et al.*, 2006). Mutace v genu pro kaspázu-7 byly pozorovány u pacientů s revmatoidní artritidou (Teixeira *et al.*, 2008). Zapojení kaspázy-7 během vývoje tvrdých tkání však doposud nebylo popsáno.

## 2. Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo rozšíření poznatků o zapojení kaspáz v apoptotických a především neapoptotických procesech během formování tvrdých tkáních na buněčné i molekulární úrovni. Na základě popsaných vlastností u kaspázy-3 se tato práce zaměřila na funkčně i strukturně podobnou a doposud opomíjenou kaspázu-7. Experimentální část byla prováděna na myším modelu. Jako systém pro studium zubní tkáně byl zvolen myší mandibulární řezák a první molár. Kostní tkáně byly zkoumány z hlediska intramembranózní (mandibulární/alveolární kost) i endochondrální osifikace (dlouhé kosti končetin).

### Dílčí cíle:

- 1) Zhodnotit a doplnit dosavadní poznatky související s apoptotickou signalizací během odontogeneze.
- 2) Detekovat aktivaci kaspázy-7 během vývoje moláru a řezáku.
- 3) Korelovat aktivaci kaspázy-7 s výskytem apoptotických buněk v zubních tkáních.
- 4) Analyzovat efekt deficience kaspázy-7 během vývoje moláru.
- 5) Analyzovat efekt deficience kaspázy-7 během vývoje řezáku.
- 6) Detekovat aktivaci kaspázy-7 během intramembranózní a endochondrální osifikace.
- 7) Korelovat aktivaci kaspázy-7 s výskytem apoptotických buněk v kostních tkáních.
- 8) Analyzovat efekt deficience kaspázy-7 v intramembranózním modelu kosti.
- 9) Analyzovat efekt deficience kaspázy-7 v endochondrálním modelu kosti.
- 10) Zhodnotit zapojení kaspázy-7 v osteogenních molekulárních sítích.

### **3. Materiál a metody**

#### **3.1. Biologický materiál**

Experimenty byly prováděny na myších *Mus musculus* var. *alba* (kmen CD1), které pocházely z chovu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity Brno. Myši postrádající kaspázu-7 (Casp7<sup>-/-</sup>) byly získány darem od prof. P. Vandenabeele (Ghent University, Belgium). Casp7<sup>-/-</sup> linie byla připravena zpětným křížením minimálně 10 generací na genetickém pozadí C57BL16J podle Duprez *et al.* (2011). Nakládání se zvířaty bylo schváleno projekty pokusů.

Pro experimentální část byla vybrána stádia zachycující významné fáze vývoje. Myší hlavy (kmen CD1) byly testovány ve stádiích: E12,5; E13,5; E15,5; E17,5 a v postnatálních stádiích P0, P5, P10. Horní končetiny byly studovány ve stádiích: E13,5; E14,5; E17,5 a P0, P6, P10. Casp7<sup>-/-</sup> jedinci byli zkoumáni ve stádiích: E15,5 a P28.

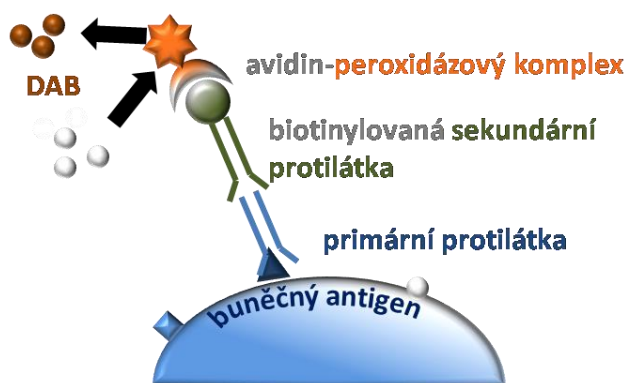
#### **3.2. Histologické vzorky**

Orgány byly po odběru fixovány v 4% pufrovaném roztoku paraformaldehydu (dle typu a stáří tkáně). Následně byly promyty tekoucí vodou, odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou, převedeny do xylenu a zality do parafínu. Z parafinových bločků byly zhotoveny série frontálních, sagitálních či longitudinálních řezů (5 µm). Vzorky pro morfologické hodnocení byly barveny hematoxylin-eosinovým barvením či kombinací hematoxylin-eosin a alciánová modř (barvení chrupavky dlouhých kostí). Stádia od E17,5 (včetně) byla dekalifikována v EDTA/37°C.

#### **3.3. Imunohistochemie**

Imunohistochemická metoda (IHC) založená na principu vazby specifické protilátky na antigen umožňuje detekci široké škály proteinů (Obr. 10). Parafín z histologických řezů byl odstraněn xylenem, vzorky byly zavodněny sestupnou řadou etanolu. Revitalizace antigenů byla provedena v citrátovém pufru (pH 6,0) 5-15 min/98°C (detekce kaspázy-3, -7 a osteokalcinu). Endogenní peroxidáza byla inhibována 3% peroxidem v PBS/5 min/laboratorní teplota (RT). Nespecifické vazby protilátek byly eliminovány blokačním sérem/20 min/RT. Pro detekci antigenů byly použity následující primární protilátky: Cleaved caspase-3 (9664, Cell Signaling, Danvers, USA), Cleaved caspase-7 (9491S, Cell Signaling, Danvers, USA), Osteocalcin (ab93876, Abcam, Cambridge, UK) a Dentin matrix protein 1 (ab103203, Abcam, Cambridge, UK). Primární protilátky byly nanášeny v koncentracích 1:50 (kaspáza-3,

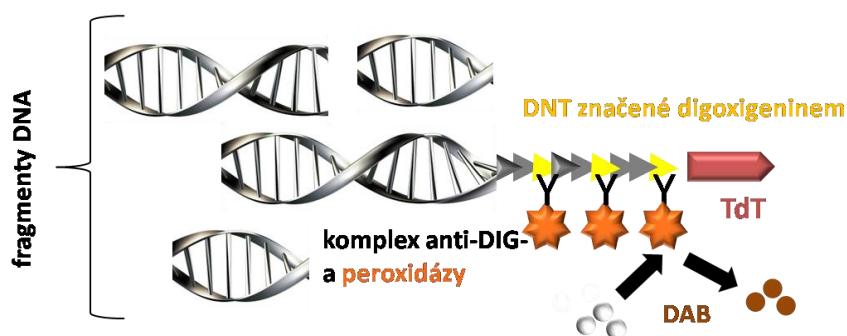
-7, DMP1), 1:100 (osteokalcin)/noc/4°C. Sekundární protilátky konjugované s biotinem a následně peroxidáza vázaná na streptavidin (Vectastain, Burlingame, USA) byly aplikovány po dobu 30 min/RT. Detekce pozitivních buněk byla provedena na základě rozkladu substrátu 3,3'-diaminobenzidin tetrachlorid (DAB, K3466, Dako, Carpinteria, USA) křenovou peroxidázou. Pozitivní buňky měly hnědou barvu. Tkáň byla dobarvena hematoxylinem. Fotografie histologických řezů byly zhotoveny pomocí mikroskopu Leica DH LB2 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) a programu Leica IM 500 Image Manager (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland). Buňky vykazující aktivaci kaspázy-7 a -3 byly počítány pod zvětšením 1000x (n=500 pro osteoblasty, n=50 pro osteoklasty).



**Obr. 10: Schématické znázornění principu IHC.** Primární protilátka se váže na antigen, na ni se specificky váže sekundární biotinylovaná protilátka. Na biotin je následně navázán komplex avidinu a křenové peroxidázy, která zajistí hnědé zbarvení buněk či extracelulární matrix obsahujících sledovaný antigen rozkladem substrátu DAB (3, 3' - diaminobenzidin tetrachlorid).

### 3.4. TUNEL

Detekce apoptotických buněk byla provedena značením zlomů DNA (Obr. 11) pomocí enzymu terminální deoxyribonukleotidyl transferázy (TdT) (TUNEL, Millipore, S7100, Billeveica, USA). Histologické řezy byly zbaveny parafínu xylenem a zavodněny sestupnou řadou etanolu. Tkáň byla vystavena působení proteinázy K z důvodu zpřístupnění jader pro reakční směs s enzymem TdT. Endogenní peroxidáza byla inhibována 3% peroxidem v PBS/5 min/RT. Ekvilibrační pufr (20 min/RT), reakční směs s TdT (45 min/RT) a komplex protilátky (anti-digoxigenin) s peroxidázou (30 min/RT) byly použity v souladu s doporučeným postupem výrobce detekční sady. Reakcí peroxidázy se substrátem DAB se jádra apoptotických buněk barvila hnědě. Tkáň byla dobarvena hematoxylinem.

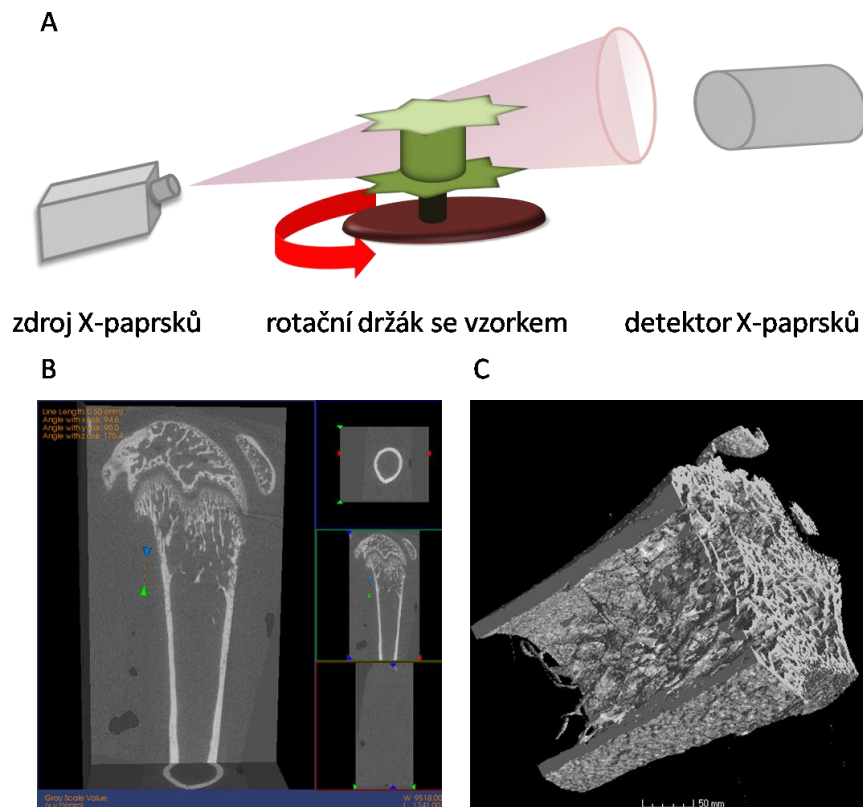


**Obr. 11: Schématické znázornění principu metody TUNEL.** Fragmenty DNA, které vznikají ve finální fázi apoptózy, jsou prodlužovány enzymem terminální deoxyribonukleotidyl transferázou, která je schopná připojovat je koncům DNA další nukleotidy. Uřčité procento nukleotidů je značeno digoxigeninem. Na něj se váže komplex obsahující protilátku proti digoxigeninu s křenovou peroxidázou, která rozkládá DAB. Buňky obsahující fragmentovanou DNA se zbarvují hnědě. DAB (3, 3'- diaminobenzidin tetrachlorid), DIG (digoxigenin), TdT (terminální deoxyribonukleotidyl transferáza).

### 3.5. MicroCT analýza

MicroCT analýza byla prováděna na pracovišti King's College London. Tato metoda je klíčová pro zkoumání morfologie a hodnocení parametrů kostní tkáně *ex vivo* (Obr. 12). Hlavy a končetiny byly analyzovány pomocí Locus SPmicroCT scanner (GE Healthcare, London, Canada). Kalibrace přístroje byla provedena pomocí hydroxyapatitových standardů. Myší hlavy či končetiny byly imobilizovány v bavlněném smotku. Pro snímání byl použit zdroj X-paprsků o napětí 80 kVp a elektrické proudu 80  $\mu$ A. Distribuce X-paprsků byla regulována aluminiovým filtrem (0,05 mm).

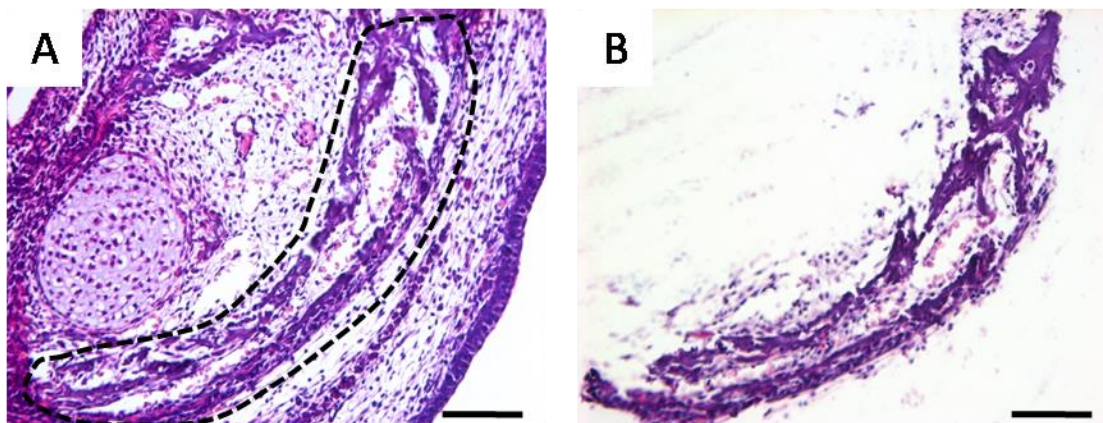
Analýza stehenní kosti byla provedena v distální oblasti. Oblast kortexu a systému trámčů byla na jednotlivých snímcích oddělena a analyzována individuálně. Alveolární kost byla analyzována jako jedna doména. Získaná data byla zpracována pomocí Microview 2.2 software package (GE Healthcare, London, Canada), který vyhodnotil dané parametry: obsah minerálů v kostech (BMC), hustotu kostní tkáně (BMD), objem kosti (BV), objem tkáně (TV), tloušťku trámčů (Tb.Th), separaci trámčů (Tb.Sp). Prostorové řezy byly rekonstruovány pomocí VGStudio MAX 2.2 software (VGStudio MAX, Heidelberg, Germany). Statistická analýza byla v obou případech (alveolární kost, stehenní kost) provedena na osmi jedincích (4 Casp7<sup>-/-</sup> myši, 4 kontrolní jedinci) pomocí Sigma Plot 11.2 (Systat software GmbH, Erkrath, Germany). T-test ( $p < 0,05$ ) byl určen pro hodnocení statistické významnosti všech parametrů kromě poměru BV/TV, pro který byl použit Mann-Whitney test.



**Obr. 12: Schématické znázornění principu metody microCT.** Objekt zájmu je umístěn do rotačního držáku, zdroj emituje rentgenové paprsky, které procházejí objektem a jsou zachycovány detektorem (A). Počítačový systém sestavuje jednotlivé vrstvy objektu (B), ze kterých lze tvořit jeho trojrozměrný obraz (C); na obrázcích B a C je zobrazena stehenní kost myši (P28).

### 3.6. Izolace RNA

Pro izolaci RNA z mandibulární kosti byla použita komerční sada RNeasy FFPE Kit (Quiagen, Valencia, USA). RNA byla izolována z mandibulární kosti ve stádiu E15,5. Hlavy byly uskladněny v RNA Lateru (Ambion, Foster City, USA). Před zpracováním vzorku byly hlavy promyty v PBS, odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou a xylenem a zality do parafinových bločků, ze kterých byly zhotoveny histologické řezy (5  $\mu$ m). Pod stereoskopem byla z těchto vzorků vyjmuta mandibulární kost za pomoci jehel a čepele skalpelu (Obr. 13). Tímto postupem byla zajištěna přesná selekce mandibulární kosti. Všechny kroky během přípravy vzorku a izolace byly prováděny v podmínkách bez RNáz.



**Obr. 13: Separace mandibulární kosti určené pro izolaci RNA.** Mandibulární kost obklopená tkáněmi dolní čelisti (A), odstranění okolních tkání tenkými jehlami (B). Barvení: hematoxylin-eosin, měřítko = 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.7. PCR Array

Expres osteogenních faktorů mandibulární kosti *Casp7<sup>-/-</sup>* a normálních jedinců byla analyzována pomocí PCR Array PAMM-026A-24 (SA Biosciences, Frederick, USA). Touto metodou lze během jedné reakce analyzovat expresi 84 genů (Tab. 1). Celková mRNA byla přepsána do cDNA pomocí SuperScript VILO (Invitrogen, Carlsbad, USA). Analýza byla provedena pomocí Mastercycler ep realplex 4S (Eppendorf, NY, USA) Data byla analyzována pomocí PCR array Data Analysis V4 (SA Biosciences, Frederick, USA). Statistická significance byla stanovena t-testem, tzv. fold-change 2/-2 (100% nárůst/pokles hladiny RNA) byl stanoven jako hranice významnosti.

**Tab.1. Seznam genů sledovaných metodou PCR Array**

Účinek genové skupiny	Geny obsažené v panelu PCR Array
Faktory podílející se na mineralizaci	<i>Ahsg, Ambn, Bgn, Comp, Ctsk, Dmp1, Enam, Flt1, Phex, Serpinh1, Tfip11, Tuft1, Alpl, Anxa5, Sost</i>
Adhezivní molekuly	<i>CD36, Cdh11, Fn1, Icam1, Scarb1, Vcam1</i>
Kolageny	<i>Coll10a1, Coll11a1, Coll12a1, Coll14a1, Coll1a1, Coll1a2, Col2a1, Col3a1, Col4a1, Col4a2, Col5a1, Col6a1, Col6a2, Col7a1</i>
Kostní morfogenetické proteiny	<i>Bmp1, Bmp2, Bmp3, Bmp4, Bmp5, Bmp6, Bmpr1a, Bmpr1b</i>
Růstové faktory	<i>Csf2, Csf3, Egf, Gdf10, Igf1, Igf1r, Pdgfa, Vegfa, Vegfb</i>

<b>Fibroblastové růsové faktory</b>	<i>Fgf1, Fgf2, Fgf3, Fgfr1, Fgfr2</i>
<b>Integriny</b>	<i>Itga2, Itga2b, Itga3, Itgam, Itgav, Itgb1</i>
<b>Matrixové metaloproteinázy</b>	<i>Mmp10, Mmp2, Mmp8, Mmp9</i>
<b>Smad geny</b>	<i>Smad1, Smad2, Smad3, Smad4</i>
<b>Transformující růstové faktory</b>	<i>Tgfb1, Tgfb2, Tgfb3, Tgfbr1, Tgfbr2, Tgfbr3</i>
<b>Transkripční faktory</b>	<i>Msx1, Nfkb1, Runx2, Sox9, Tnf, Twist1, Vdr</i>

Pozn. Další podrobný popis metod a experimentálních designů je součástí příložených publikací.



## **4. Výsledky**

### **4.1. Kaspáza-7 v odontogenezi**

#### **4.1.1. Lokalizace aktivované kaspázy-7 ve vývoji moláru**

V E15,5 se M1 nacházel ve stádiu pozdního pohárku. Štěpená/aktivovaná kaspáza-7 byla v tomto období přítomna v buňkách PEK (Obr. 14 A), dále pak v IEE (oblasti budoucích ameloblastů) a OEE sklovinného orgánu. Mesenchymové buňky zubní papily (budoucí zubní pulpy) nevykazovaly v tomto stádiu aktivaci kaspázy-7.

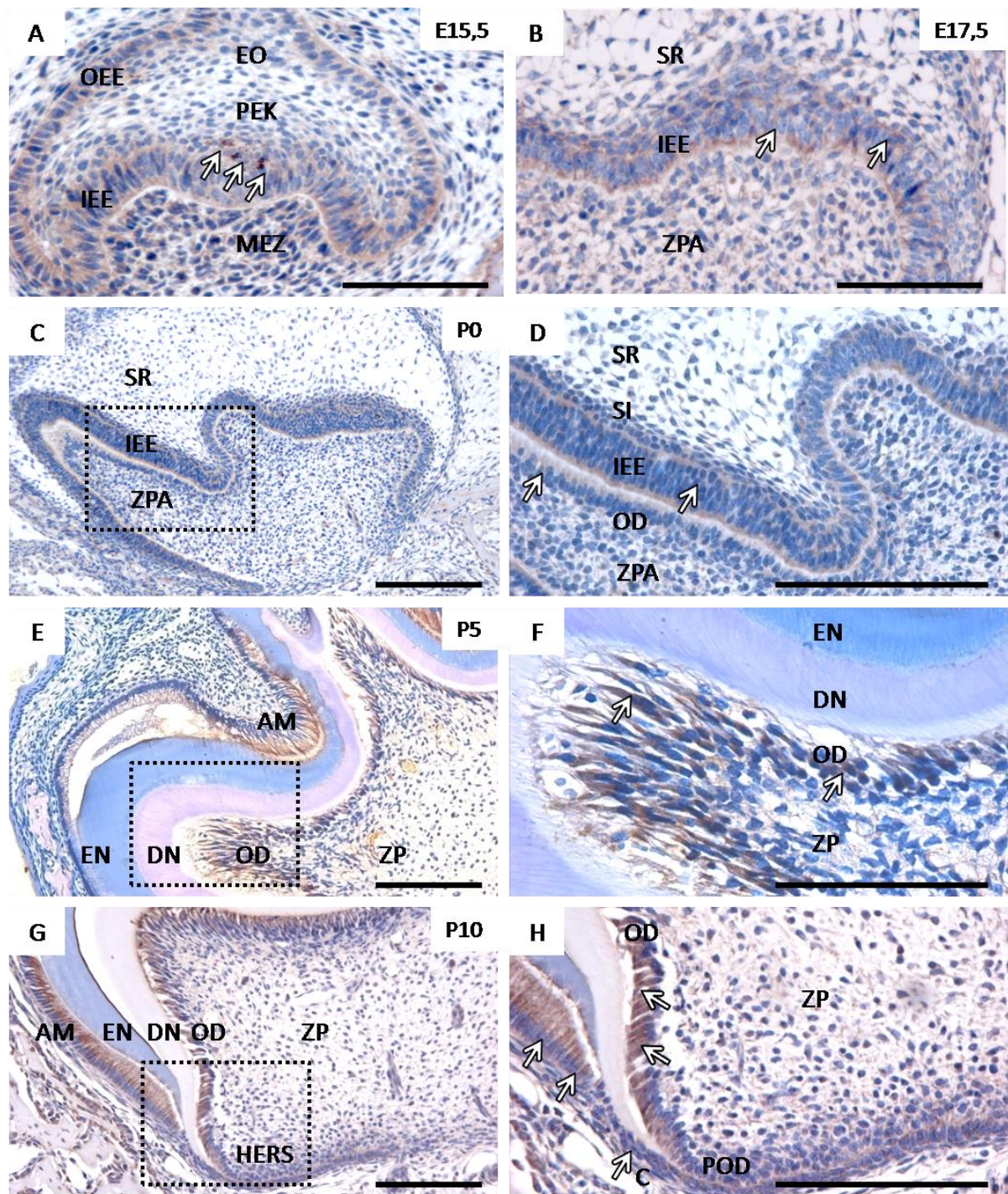
V E17,5 dospěl M1 do stádia zvonku. Aktivovaná kaspáza-7 byla v této fázi vývoje detekována převážně v IEE, dále bylo možné pozorovat buňky s aktivovanou kaspázou-7 v SI (Obr. 14 B).

V perinatálním období (P0) byly ve struktuře M1 rozlišitelné základy budoucích zubních vrcholů, budoucí zubní pulpa a HERS. Odontoblasty byly polarizovány a připraveny k produkci organické matrix. Ameloblasty se nacházely ve stavu diferenciaci. Aktivovaná kaspáza-7 byla patrná v cytoplazmě diferencujících a diferencovaných odontoblastů i ameloblastů budoucí zubní korunky (Obr. 14 C, D).

Aktivovanou kaspázu-7 v cytoplazmě odontoblastů a ameloblastů bylo možné pozorovat také v P5 (Obr. 14 E, F). Aktivace kaspázy-7 stále přetrvávala i v P10 (Obr. 14 G, H). V tomto stádiu byla aktivovaná kaspáza-7 pozorována především v odontoblastech a ameloblastech v oblasti korunky, dále pak v cementoblastech a buňkách HERS.

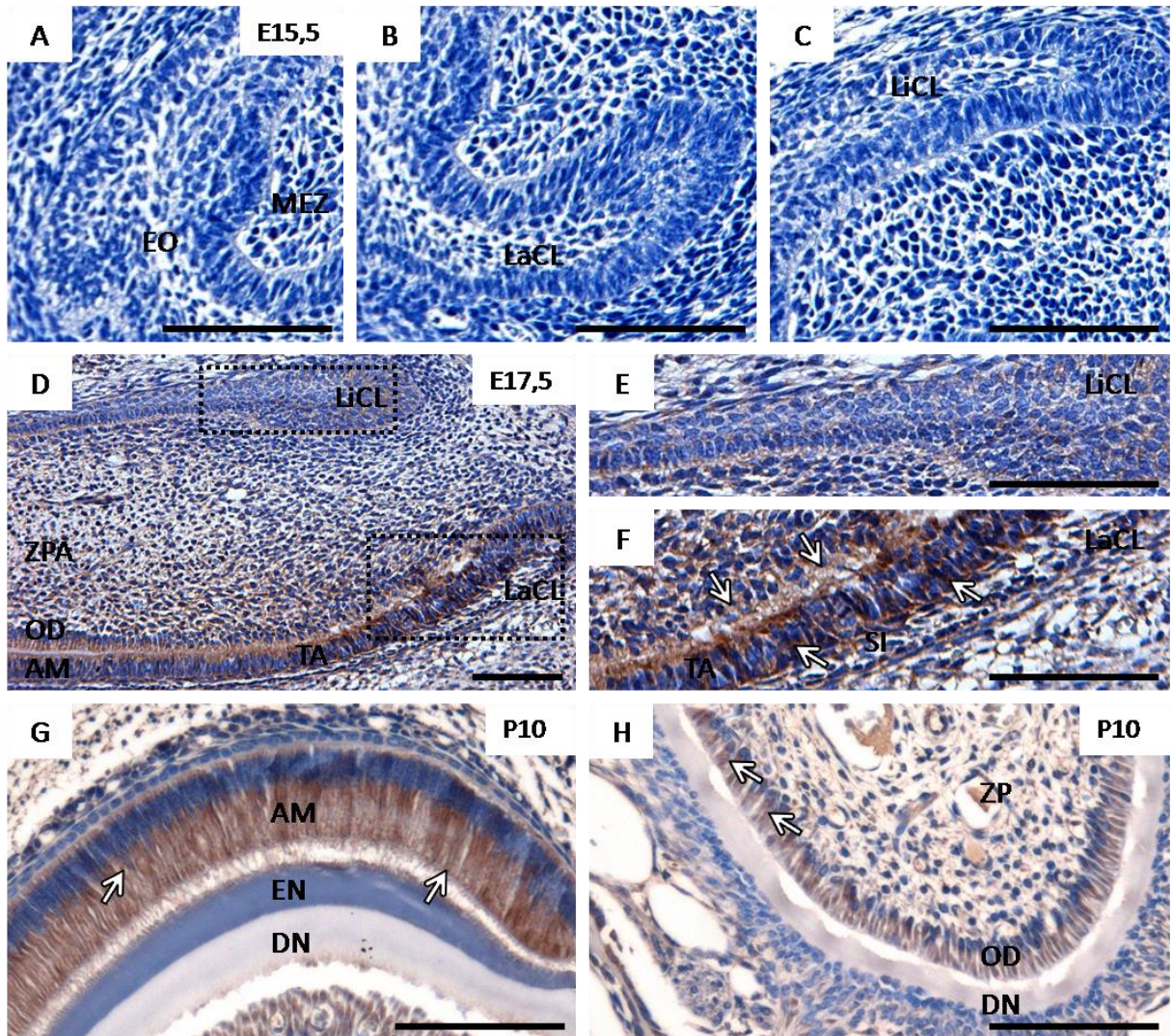
#### **4.1.2. Lokalizace aktivované kaspázy-7 ve vývoji řezáku**

V E15,5 dospěl řezák do stádia pohárku. Aktivace kaspázy-7 nebyla v tomto stádiu detekována ve sklovinném orgánu ani v přiléhajícím mesenchymu (Obr. 15 A). Aktivace kaspázy-7 nebyla přítomna v labiální (Obr. 15 B) ani v lingvální (Obr. 15 C) části vyvíjejícího se řezáku nebyly pozorovány.



**Obr. 14: Aktivace kaspázy-7 během vývoje moláru.** Stádium pohárku (A), stádium časného zvonku (B), stádium pozdního zvonku (C, D), stádia produkce dentinu a skloviny (E, F a G, H). AM (ameloblasty), C (cementoblasty), DN (dentin), EN (sklovina), EO (sklovinný orgán), HERS (Hertwigova epitelová kořenová pochva), IEE (vnitřní sklovinný epitel), MEZ (mesenchym), OD (odontoblasty), PEK (primární sklovinný uzel), POD (preodontoblasty), SI (*stratum intermedium*), SR (hvězdicovité retikulum), ZP (zubní pulpa), ZPA (zubní papila). Šipky ukazují na pozitivní buňky; měřítko = 100  $\mu\text{m}$ .

V E17,5 se řezák nacházel ve stádiu zvonku, k jeho prodlužování docházelo směrem od CL k distálnímu konci řezáku. V tomto směru bylo možné pozorovat gradient diferenciaci odontoblastů. Ameloblasty se v tomto období nacházely na počátku diferenciaci. Aktivovaná kaspáza-7 byla v E17,5 detekována v IEE, převážně v cytoplasmě diferencujících ameloblastů a v TA oblasti, dále v SI a v polarizovaných odontoblastech (Obr. 15 D). Pozitivní buňky byly přítomny výhradně v labiální (Obr. 15 E) nikoli v linguální (Obr. 15 F) části.



**Obr. 15: Aktivace kaspázy-7 během vývoje řezáku.** Stádium pohárku (A - C), stádium zvonku (D - F), stádia produkce matrix (G, H). AM (ameloblasty), CL (cervikální smyčka), DN (dentin), EN (sklovina), EO (sklovinný orgán), La (labiální), Li (linguální), MEZ (mesenchym), OD (odontoblasty), SI (stratum intermedium), TA (přechodné dělicí se buňky), ZP (zubní pulpa), ZPA (zubní papila). Šipky ukazují na pozitivní buňky; měřítko = 100  $\mu$ m.

V P10 byla patrná progresse zubních tkání řezáku vytvořených v předešlých stádiích. Aktivovaná kaspáza-7 byla detekována v cytoplazmě ameloblastů (Obr. 15 G) a odontoblastů (Obr. 15 H), zatímco jádra buněk byla negativní. Ostrý přechod v aktivaci kaspázy-7 byl pozorován mezi pozitivní linií ameloblastů/odontoblastů a peridentálním mesenchymem, který byl zcela negativní. Zubní pulpa se jevila ve většině stádií a buněk negativní.

#### **4.1.3. Aktivace kaspázy-7 vs. distribuce apoptotických buněk v zubních tkáních**

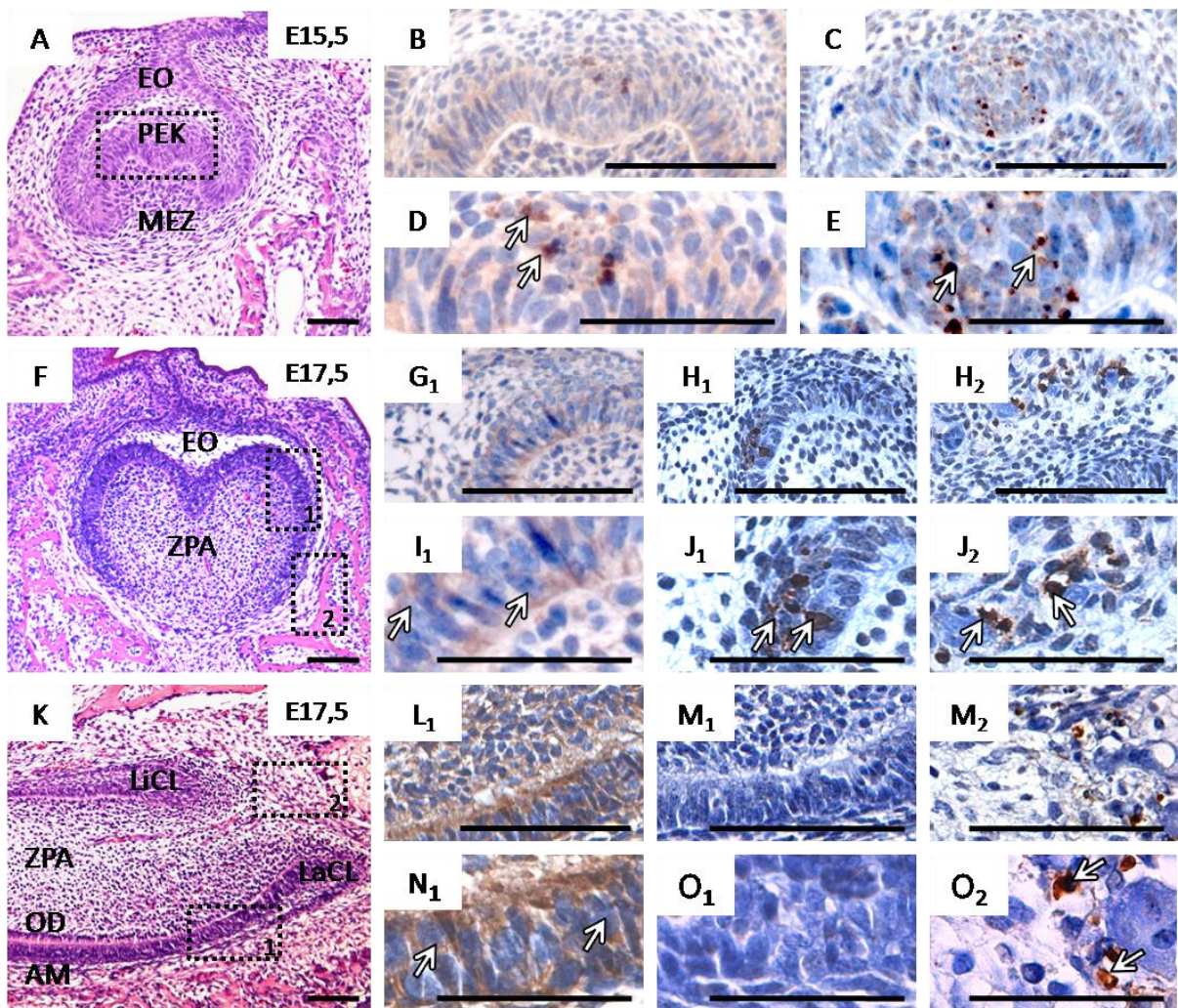
V E15,5 (Obr. 16 A) se jaderná aktivace kaspázy-7 v moláru omezovala na PEK (Obr. 16 B, D) a pozitivně korelovala s výskytem apoptotických buněk (Obr. 16 C, E). Cytoplazmatická lokalizace kaspázy-7 byla však patrná také v OEE a IEE. Později (E17,5) (Obr. 16 F) byla aktivovaná kaspáza-7 detekována převážně v cytoplazmě buněk IEE (Obr. 16 G<sub>1</sub>, I<sub>1</sub>). Její aktivace v IEE nebyla identická s výskytem apoptózy, která se vyskytovala výhradně v oblasti SEK (Obr. 16 H<sub>1</sub>, J<sub>1</sub>). V tomto stádiu vývoje zubních a peridentálních struktur byly apoptotické buňky detekovány převážně v mandibulární kosti (Obr. 16 H<sub>2</sub>, J<sub>2</sub>).

Řezák ve stejném dni vývoje (Obr. 16 K) nevykazoval pozitivní korelaci mezi aktivací kaspázy-7 (Obr. 16 L<sub>1</sub>, N<sub>1</sub>) a distribucí apoptotických buněk (Obr. 16 M<sub>1</sub>, O<sub>1</sub>). Apoptóza byla patrná v peridentálních strukturách a sousedící Meckelově chrupavce (Obr. 16 M<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>).

#### **4.1.4. Fenotyp moláru postrádajícího kaspázu-7**

Do analýzy fenotypu Casp7<sup>-/-</sup> molárů byla zahrnuta embryonální (Obr. 17 A-D) i postnatální stadia (Obr. 17 E-L). Změny v počtu TUNEL-pozitivních buněk v PEK (E15,5) nebyly u Casp7<sup>-/-</sup> jedinců (Obr. 17 C) ve srovnání s normálními jedinci (Obr. 17 D) pozorovány. U myší postrádajících kaspázu-7 (Obr. 17 A) nebyly dále detekovány rozdíly v aktivaci kaspázy-3 ve srovnání s kontrolami (Obr. 17 B).

M1 dospělých jedinců (P28) postrádajících kaspázu-7 (Obr. 17 E, G, H) nevykazovaly abnormality v prořezávání ani v morfologii zubních tkání vzhledem k M1 kontrolních jedinců (Obr. 17 F, I, J). Specifické změny v mineralizaci zubních tkání, velikosti či objemu M1 nebyly statisticky významné (Obr. 17 K, L, M).

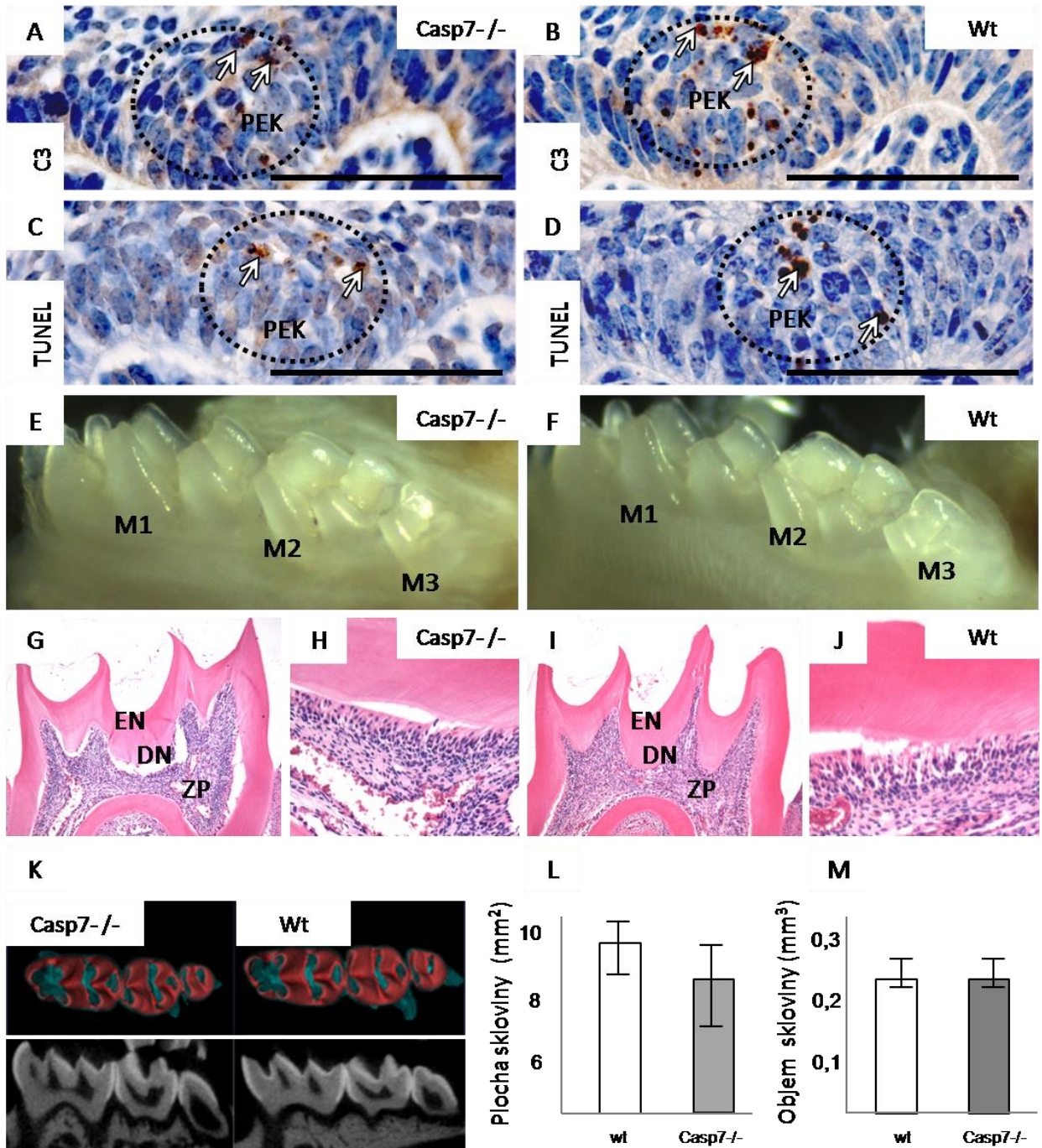


**Obr. 16: Korelace aktivované kaspázy-7 a distribuce apoptózy v zubních tkáních.** Morfologie M1, barvení: hematoxylin-eosin (A, F), morfologie I, barvení: hematoxylin-eosin (K), imunohistochemická detekce aktivované kaspázy-7 (B, D, G<sub>1</sub>, I<sub>1</sub>, L<sub>1</sub>, N<sub>1</sub>), detekce apoptotických buněk metodou TUNEL (C, E, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>). AM (ameloblasty), CL (cervikální smyčka), EO (sklovinný orgán), La (labiální), Li (linguální), MEZ (mesenchym), OD (odontoblasty), PEK (primární sklovinný uzel), ZPA (zubní papila). Šipky ukazují na pozitivní buňky; A, B, C, F, G, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, K, L, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> měřítko = 100 μm; D, E, I, J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, N, O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> měřítko = 50 μm

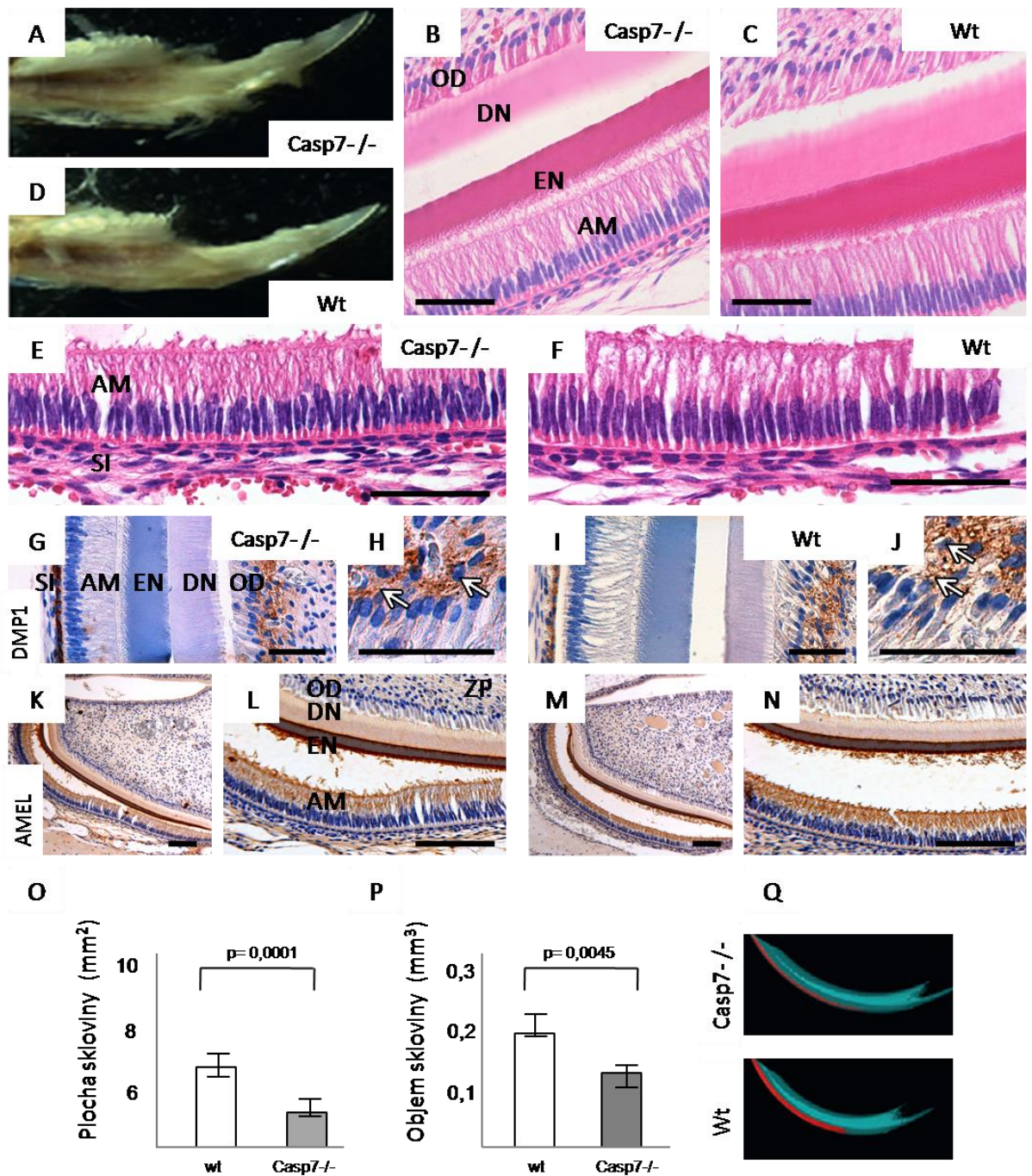
#### 4.1.5. Fenotyp řezáku postrádajícího kaspázu-7

U dospělých (P28) *Casp7<sup>-/-</sup>* myši (Obr. 18 A) nebyly patrné změny v erupci řezáků ve srovnání s kontrolní skupinou stejně starých jedinců (Obr. 18 D). Morfologie řezáků myši postrádající kaspázu-7 (Obr. 18 B, E) nejevila výrazné změny ve srovnání s kontrolami (Obr. 18 C, F). Přestože v rozložení exprese amelogeninu (Obr. 18 K, L) a dentinového matrixového proteinu 1 (DMP1) (Obr. 18 G, H) nebyly pozorovány výrazné změny ve srovnání s kontrolami (Obr. 18 M, N a I, J), microCT analýza odhalila statisticky významné

rozdíly v ukládání skloviny v řezácích *Casp7<sup>-/-</sup>* myši (Obr. 18 O, P, Q). Tito jedinci vykazovali snížené množství (plochu i objem) skloviny.



**Obr. 17:** Analýza embryonálních (E15,5) a postnatálních (P28) *Casp7<sup>-/-</sup>* molárů. Aktivace kaspázy-3 v PEK E15,5 (A, B), distribuce apoptotických buněk v PEK E15,5 (C, D), morfologie eruptovaných molárů v P28 (E, F), frontální řez prvním molárem, barvení: hematoxylin-eosin (G, H a I, J), microCT analýza (K, L, M). C3 (kaspáza-3), EN (sklovina), DN (dentin), M1 (první molár), M2 (druhý molár), M3 (třetí molár), PEK (primární sklovinný uzel), ZP (zubní pulpa). Šipky ukazují na pozitivní buňky; měřítko = 100  $\mu$ m.



**Obr. 18: Analýza postnatálních (P28) Casp7<sup>-/-</sup> řezáků.** Mandibulární kvadrant ve stádiu P28 (A, D), morfoloická struktura řezáku, barvení: hematoxylin-eosin (B, C), morfologie diferencovaných ameloblastů a přiléhajícího *stratum intermedium*, barvení: hematoxylin-eosin (E, F), imunohistochemická detekce DMP1 (G - J), imunohistochemická detekce amelogeninu (K - N), microCT analýza řezáků (O - Q). AM (ameloblasty), EN (sklovina), DN (dentin), OD (odontoblasty), SI (*stratum intermedium*), ZP (zubní pulpa). Šipky ukazují na pozitivní buňky; G, I, K - N měřítko = 100  $\mu$ m; B, C, E, F, H, J měřítko = 50  $\mu$ m.

## **4.2. Kaspáza-7 v osteogenezi**

### **4.2.1. Lokalizace aktivované kaspázy-7 v intramembranózní osifikaci (mandibulární, alveolární kost)**

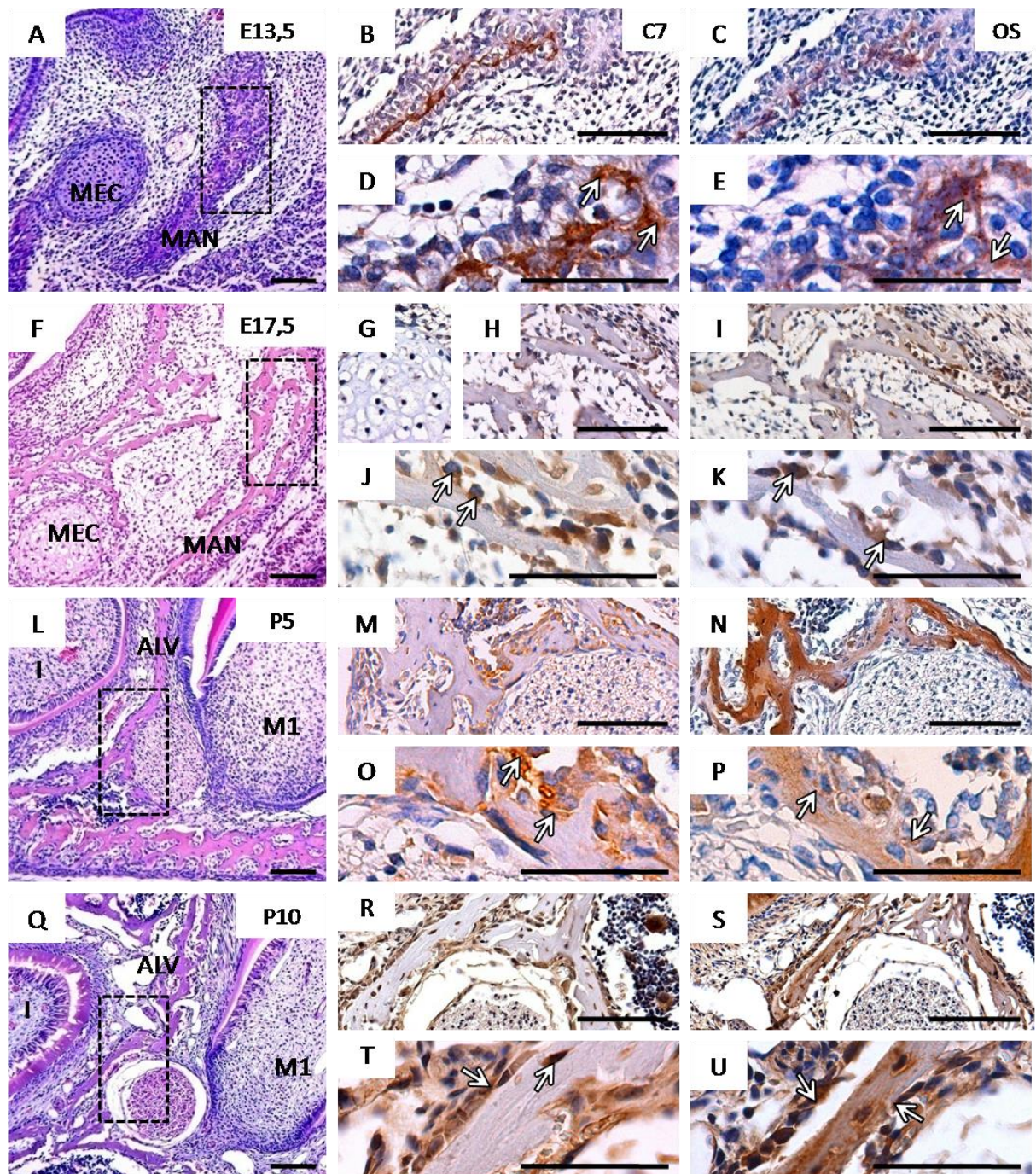
Ve stádiu E12,5 se v místě budoucí mandibuly (laterálně od Meckelovy chrupavky) vyskytoval pouze kondenzovaný mesenchym. V tomto období nebyla patrná přítomnost aktivované kaspázy-7 ani osteokalcinu, který byl použit jako marker osteogeneze. Aktivovaná forma kaspázy-7 (Obr. 19 B, D) v oblasti vznikající mandibulární kosti (Obr. 19 A) byla pozorována v cytoplazmě osteoblastů současně se sekrecí organické kostní matrix (E13,5) a pozitivně korelovala s expresí osteokalcinu (Obr. 19 C, E). Během následujícího vývoje (E17,5) se mandibulární kost progresivně zvětšovala (Obr. 19 F). Aktivace kaspázy-7 měla podobný vzorec jako v předešlém stádiu (Obr. 19 H, J), stejně jako exprese osteokalcinu (Obr. 19 I, K). Meckelova chrupavka v E17,5 (Obr. 19 G) nejevila známky aktivace kaspázy-7 (podobně jako v dalších sledovaných stádiích).

V P5 byla aktivovaná kaspáza-7 (Obr. 19 M, O) lokalizována také v alveolární kosti (Obr. 19 L), která je součástí mandibuly, a stále pozitivně korelovala s expresí osteokalcinu (Obr. 19 N, P). Ve stádiu P10 (Obr. 19 Q) se rozložení aktivace kaspázy-7 (Obr. 19 R, T) a exprese osteokalcinu (Obr. 19 S, U) neodlišovalo od předchozího stádia. Zatímco sekretovaný protein osteokalcin se vyskytoval v cytoplazmě buněk, ale také v okolní kostní matrix, aktivovaná kaspáza-7 byla detekována téměř výhradně v cytoplazmě pozitivních buněk.

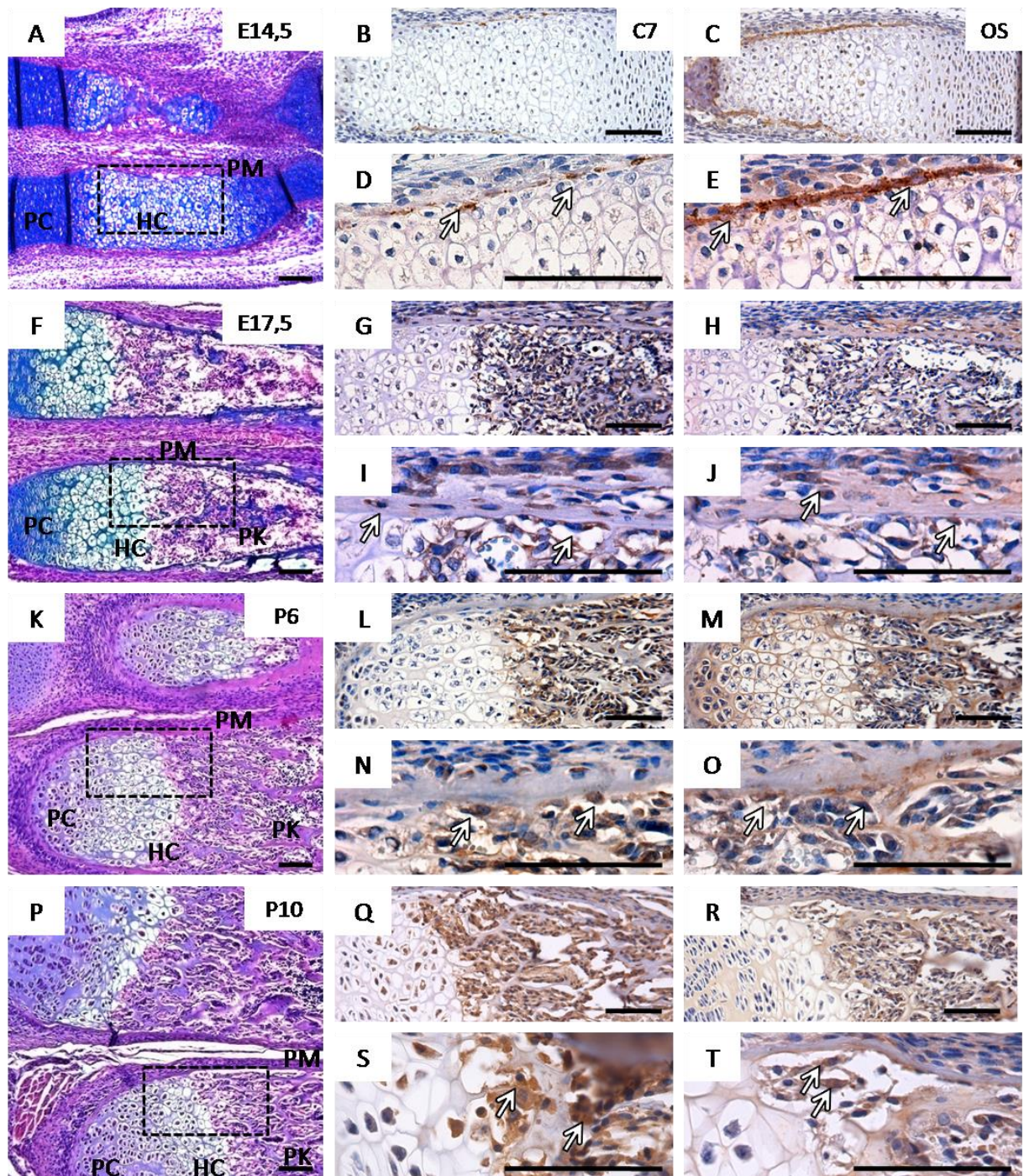
### **4.2.2. Lokalizace aktivované kaspázy-7 v endochondrální osifikaci (vřetenní a loketní kost)**

Ve stádiu E13,5 se v místě budoucích dlouhých kostí horní končetiny vyskytoval pouze chrupavčitý základ. Přítomnost kostní tkáně ani aktivace kaspázy-7 a exprese osteokalcinu nebyly v tomto stádiu patrné. V E14,5 (Obr. 20 A) byl pozorován vznik osifikační zóny v podobě tenké vrstvy buněk přiléhající k povrchové oblasti hypertrofických chondrocytů. Aktivovaná kaspáza-7 (Obr. 20 B, D) byla pozorována ve vznikajícím osifikačním centru společně s osteokalcinem (Obr. 20 C, E). S dalším růstem v E17,5 (Obr. 20 F) docházelo k progresi osifikace a expanzi primárního osifikačního centra. Od tohoto stádia bylo možné jasně rozlišit proliferující, pre-hypertrofickou, hypertrofickou zónu chrupavky a primární kost. Aktivace kaspázy-7 (Obr. 20 G, I) se v E17,5 zvyšovala s rostoucím osifikačním centrem a pozitivně korelovala s expresí osteokalcinu (Obr. 20 H, J).





**Obr. 19: Aktivace kaspázy-7 během intramembranózní osifikace.** Struktura mandibulární/alveolární kosti během vývoje, barvení: hematoxylin-eosin (A, F, L, Q), aktivace kaspázy-7 během vývoje mandibulární/alveolární kosti (B, D, G, H, J, M, O, R, T), exprese osteokalcinu během vývoje mandibulární/alveolární kosti (C, E, I, K, N, P, S, U). ALV (alveolární kost), C7 (kaspáza-7), I (řezák), M1 (první molár), MAN (mandibulární kost), MEC (Meckelova chrupavka), OS (osteokalcin). Šipky ukazují na pozitivní buňky; A, B, C, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S měřítko = 100  $\mu\text{m}$ ; D, E, J, K, O, P, T, U měřítko = 50  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 20: Aktivace kaspázy-7 během endochondrální osifikace.** Struktura vřetenní a loketní kosti během vývoje, barvení: hematoxylin-eosin (A, F, K, P), aktivace kaspázy-7 během vývoje kosti vřetenní a loketní (B, D, G, I, L, N, Q, S), exprese osteokalcinu během vývoje kosti vřetenní a loketní (C, E, H, J, M, O, R, T). C7 (kaspáza-7), HC (hypertrofní chondrocyty), PC (proliferující chondrocyty), PK (primární kost), PM (perichondrium), OS (osteocalcin). Šipky ukazují na pozitivní buňky; měřítko = 100  $\mu$ m.

Ve stádiu P6 (Obr. 20 K) byly jak aktivovaná kaspáza-7 (Obr. 20 L, N), tak i osteocalcin (Obr. 20 M, O) detekovány v primární kosti. V dalším postnatálním vývoji (P10)

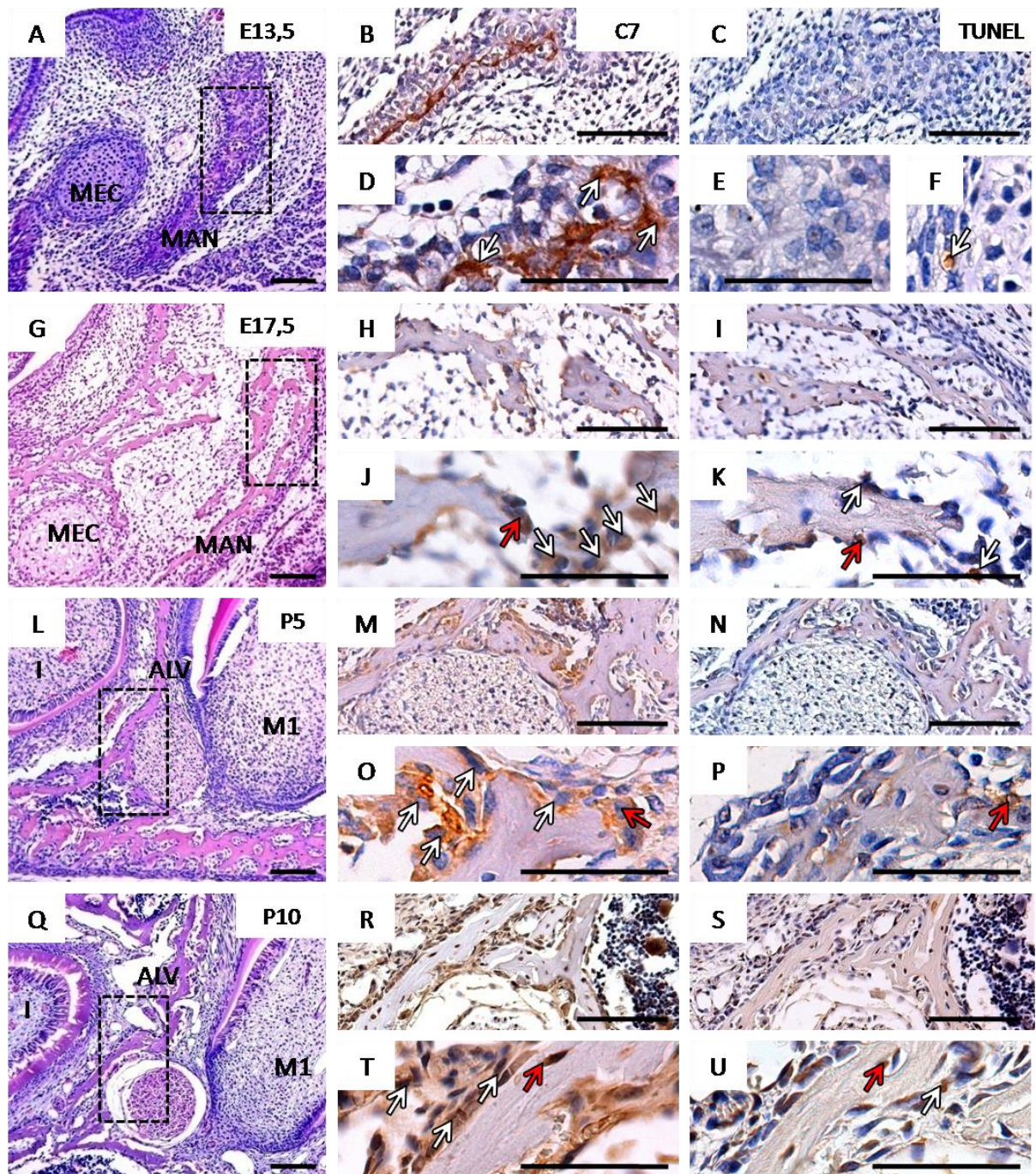
(Obr. 20 P) byly aktivace kaspázy-7 (Obr. 20 Q, S) a exprese osteokalcinu (Obr. 20 R, T) pozorovány v podobných oblastech jako v předešlých stádiích. Stejně jako v případě intramembranózního modelu, byla kaspáza-7 detekována ve všech stádiích téměř výhradně v cytoplazmě buněk a osteokalcin se vyskytoval i v okolní kostní matrix.

### **4.2.3. Aktivace kaspázy-7 vs. distribuce apoptotických buněk v kostních tkáních**

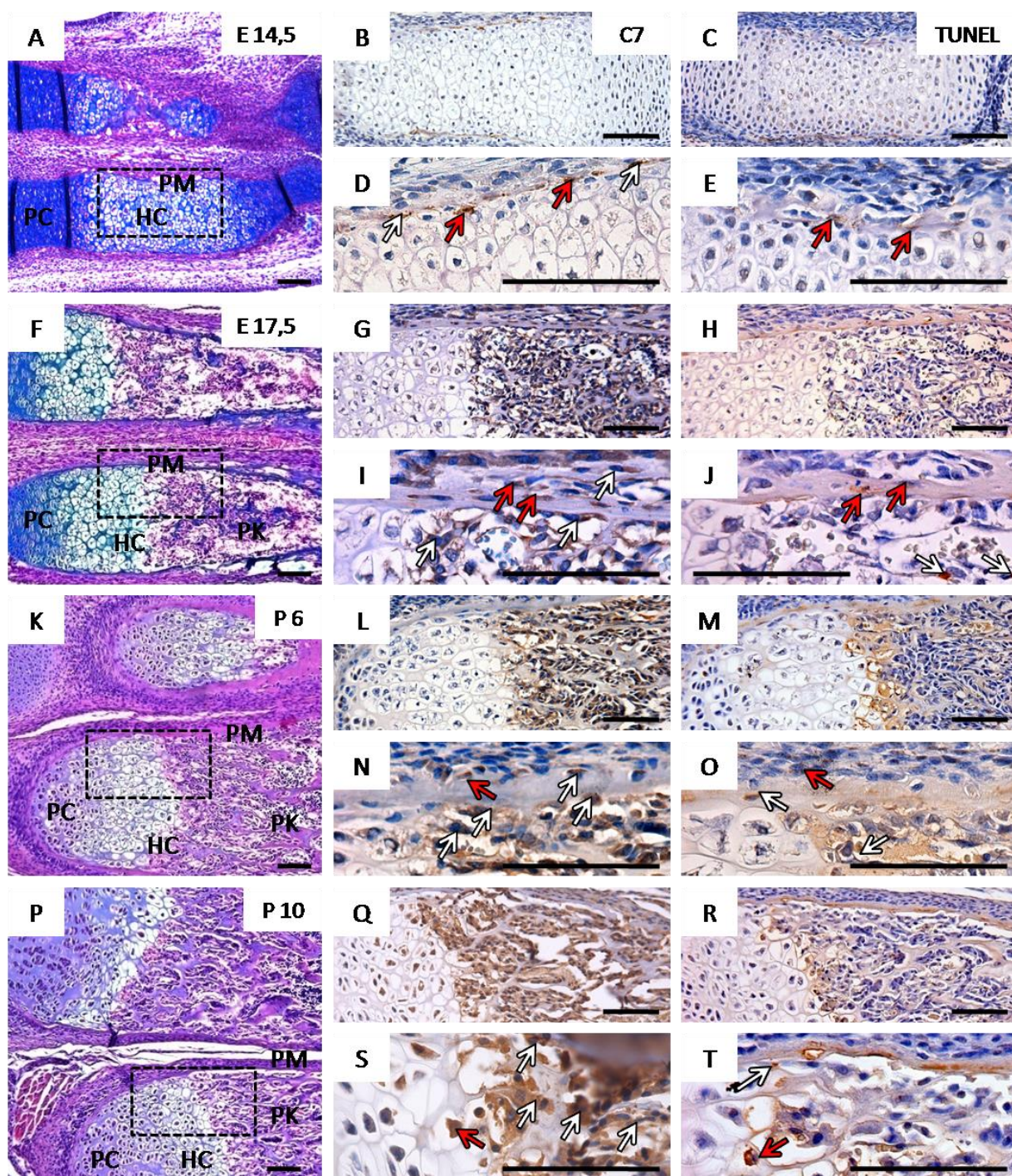
V E13,5 (Obr. 21 A) se aktivace kaspázy-7 vyskytovala v cytoplazmě diferencujících osteoblastů mandibulární kosti (Obr. 21 B, D), apoptotické buňky nebyly v této časně fázi vývoje kosti detekovány (Obr. 21 C, E). Několik buněk pozitivních na detekci apoptózy se objevovalo v povrchové vrstvě Meckelovy chrupavky (Obr. 21 F). V E17,5 (Obr. 21 G) bylo možné pozorovat množství osteoblastů s aktivovanou kaspázou-7 (Obr. 21 H, J), některé z nich korelovaly s distribucí apoptotických buněk (Obr. 21 I, K). V následujících postnatálních stádiích P5 (Obr. 21 L) a P10 (Obr. 21 Q) opět některé buňky s aktivovanou kaspázou-7 (Obr. 21 M, O a R, T) korelovaly s výskytem apoptózy (Obr. 21 N, P a S, U). Většina buněk s aktivovanou kaspázou-7 vykazovala cytoplazmatickou lokalizaci a nebyly u ní patrné znaky apoptózy.

Během počáteční fáze osifikace horní končetiny E14,5 (Obr. 22 A) se apoptóza vyskytovala velmi sporadicky v oblasti perichondria (Obr. 22 C, E), zatímco aktivace kaspázy-7 byla patrná ve větším množství buněk této oblasti (Obr. 22 B, D). V E17,5 (Obr. 22 F) se oblast aktivace kaspázy-7 zvětšovala s růstem primárního osifikačního centra (Obr. 22 G, I), to však neplatilo o distribuci apoptózy (Obr. 22 H, J). V P6 (Obr. 22 K) se apoptotické buňky vyskytovaly v oblasti hypertrofických chondrocytů a ojediněle také v zóně primárního osifikačního centra a budoucího periostu (Obr. 22 M, O). Na rozdíl od distribuce apoptotických buněk byla kaspáza-7 přítomna v mnoha buňkách vyvíjející se kosti. V populaci hypertrofických chondrocytů se její aktivace objevovala velmi sporadicky. V následujícím stádiu P10 (Obr. 22 P) byla aktivace kaspázy-7 (Obr. 22 Q, S) i distribuce apoptotických buněk (Obr. 22 R, T) obdobná.

Ze sledování obou modelů osifikace tedy vyplývá, že pouze některé buňky vykazující aktivaci kaspázy-7 byly TUNEL pozitivní. V této části buněk byla patrná jaderná aktivace kaspázy-7. Naopak buňky s výhradně cytoplazmatickou lokalizací aktivované kaspázy-7 nejevily známky apoptózy a nebyly pozitivní na TUNEL barvení.



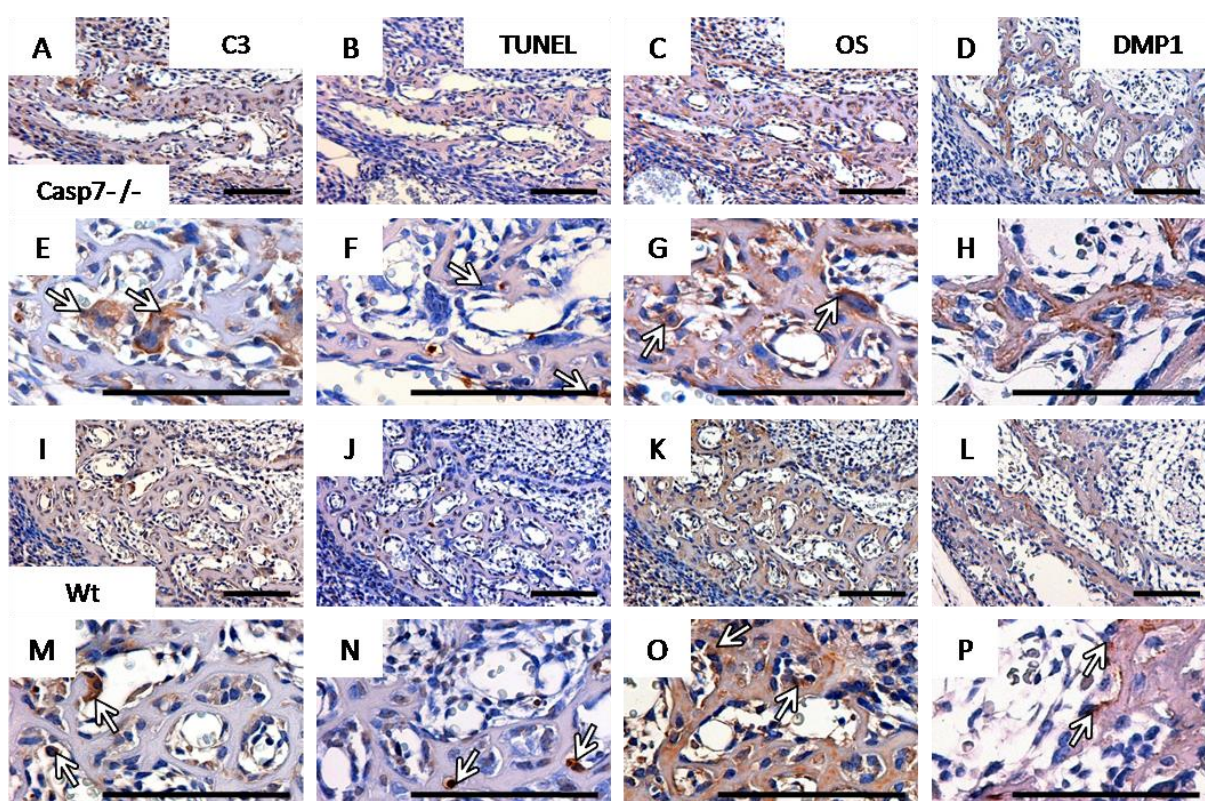
**Obr. 21: Aktivace kaspázy-7 vs. distribuce apoptotických buněk během intramembranózní osifikace.** Struktura mandibulární/alveolární kosti během vývoje, barvení: hematoxylin-eosin (A, G, L, Q), aktivace kaspázy-7 během vývoje mandibulární/alveolární kosti (B, D, H, J, M, O, R, T), distribuce apoptózy během vývoje mandibulární/alveolární kosti (C, E, F, I, K, N, P, S, U). ALV (alveolární kost), C7 (kaspáza-7), I (řezák), M1 (první molár), MAN (mandibulární kost), MEC (Meckelova chrupavka). Červené šipky ukazují na oblasti buněk, ve kterých koreluje aktivace kaspázy-7 s výskytem apoptózy, bílé šipky ukazují na oblasti buněk, ve kterých aktivace kaspázy-7 nekoreluje s výskytem apoptózy; A, B, C, G, H, I, L, M, N, Q, R, S měřítko = 100  $\mu$ m; D, E, F, J, K, O, P, T, U měřítko = 50  $\mu$ m.



**Obr. 22: Aktivace kaspázy-7 vs. distribuce apoptotických buněk během endochondrální osifikace.** Struktura kosti vřetenní a loketní během vývoje, barvení: hematoxylin-eosin (A, F, K, P), aktivace kaspázy-7 během vývoje kosti vřetenní a loketní (B, D, G, I, L, N, Q, S), distribuce apoptózy během vývoje kosti vřetenní a loketní (C, E, H, J, M, O, R, T). C7 (kaspáza-7), HC (hypertrofické chondrocyty), PC (proliferující chondrocyty), PK (primární kost), PM (perichondrium). Červené šipky ukazují na oblasti buněk, ve kterých koreluje aktivace kaspázy-7 s výskytem apoptózy, bílé šipky ukazují na oblasti buněk, ve kterých aktivace kaspázy-7 nekoreluje s výskytem apoptózy; měřítko = 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.4. Fenotyp intramembranózního typu kosti postrádajícího kaspázu-7

Efekt deficiencie kaspázy-7 byl studován u embryonálních i postnatálních stádií. V rozložení exprese osteokalcinu (Obr. 23 C, G) a DMP1 (Obr. 23 D, H) nebyly v  $Casp7^{-/-}$  mandibulární kosti postrádající kaspázu pozorovány změny proti normálním jedincům (Obr. 23 K, O a L, P). Distribuce buněk s aktivovanou kaspázou-3 byla podobná u  $Casp7^{-/-}$  (Obr. 23 A, E) i kontrolních jedinců (Obr. 23 I, M). Navíc výskyt apoptotických buněk nebyl u  $Casp7^{-/-}$  mandibulární kosti (Obr. 23 B, F) nižší než u kontrol (Obr. 23 J, N).



**Obr. 23: Analýza mandibulární kosti  $Casp7^{-/-}$  jedinců v embryonálním vývoji (E15,5).** Aktivace kaspázy-3 u  $Casp7^{-/-}$  (A, E) a normálních jedinců (I, M), distribuce apoptotických buněk u  $Casp7^{-/-}$  (B, F) a normálních jedinců (J, N), exprese osteokalcinu u  $Casp7^{-/-}$  (C, G) a normálních jedinců (K, O), exprese DMP1 u  $Casp7^{-/-}$  (D, H) a normálních jedinců (L, P). Šipky ukazují na pozitivní buňky; měřítko = 100  $\mu$ m.

V postnatálním vývoji (P28) opět nebyla pozorována odlišná exprese osteokalcinu v mandibulární kosti u  $Casp7^{-/-}$  myši (Obr. 24 A, B) ve srovnání s normálními jedinci (Obr. 24 C, D). Morfologie dolní čelisti  $Casp7^{-/-}$  jedinců nejevila abnormality ve srovnání s kontrolními jedinci. Sagitální ani frontální řezy 3D strukturami mandibul neodhalily významné změny v uspořádání mandibuly  $Casp7^{-/-}$  myši (Obr. 24 E, G) ve srovnání s kontrolami (Obr. 24 F, H).

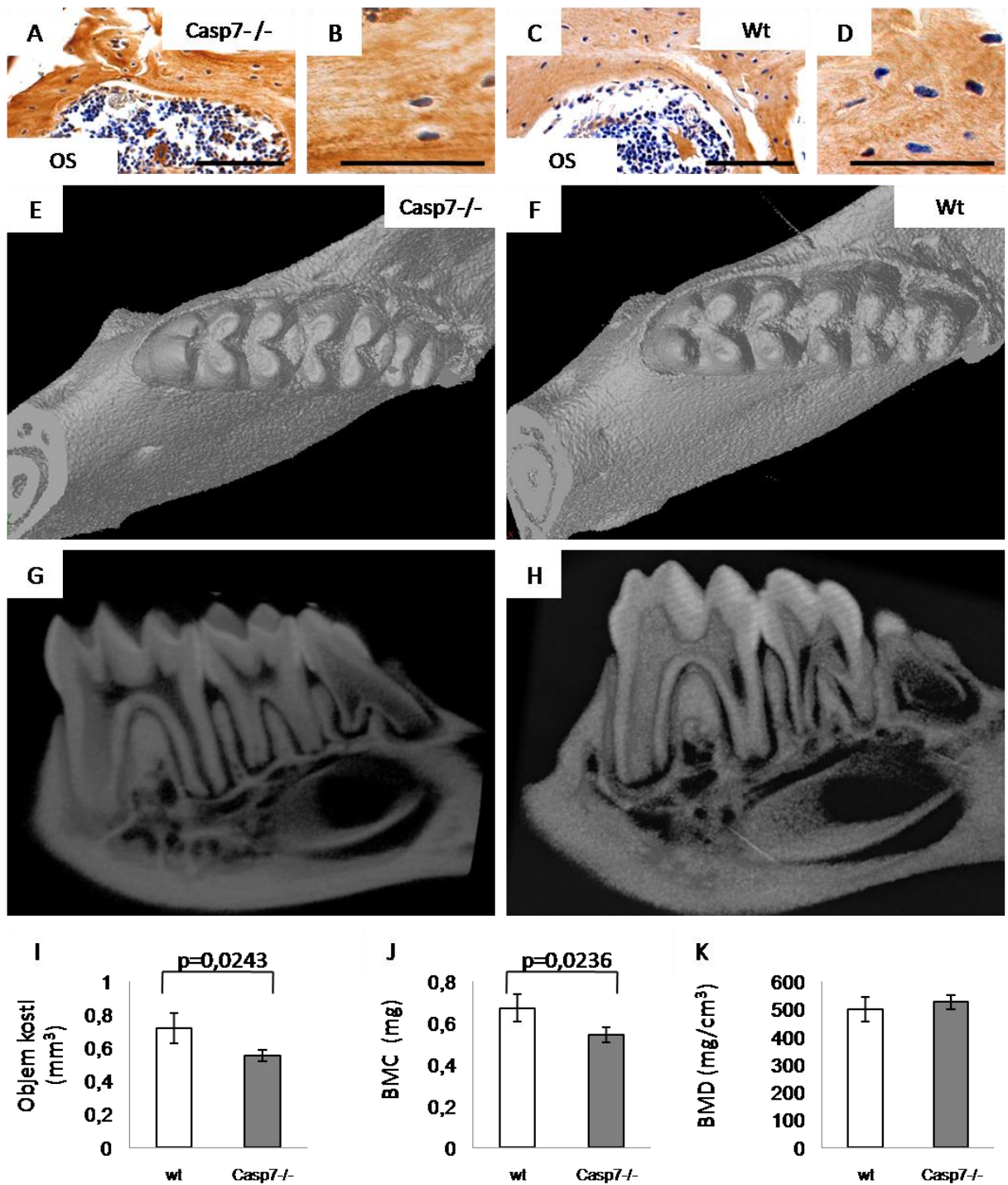
MicroCT analýza alveolární kosti mandibuly u Casp7<sup>-/-</sup> jedinců odhalila statisticky významný pokles BMC (Obr. 24 J). BMD však nebyla u deficientních jedinců snížena (Obr. 24 K). Naopak objem kosti byl v případě Casp7<sup>-/-</sup> jedinců statisticky významně snížen (Obr. 24 I).

Tyto výsledky poukazují na celkové zmenšení alveolární kosti. Pokles objemu alveolární kosti byl u myši postrádajících kaspázu-7 přibližně 24 %, což znamená zmenšení méně než 3 % v jednom rozměru, které je obtížné rozpoznat z 3D rekonstrukcí a histologických řezů. Podobný trend byl pozorován i při analýze mandibuly.

#### **4.2.5. Fenotyp endochondrálního typu kosti postrádajícího kaspázu-7**

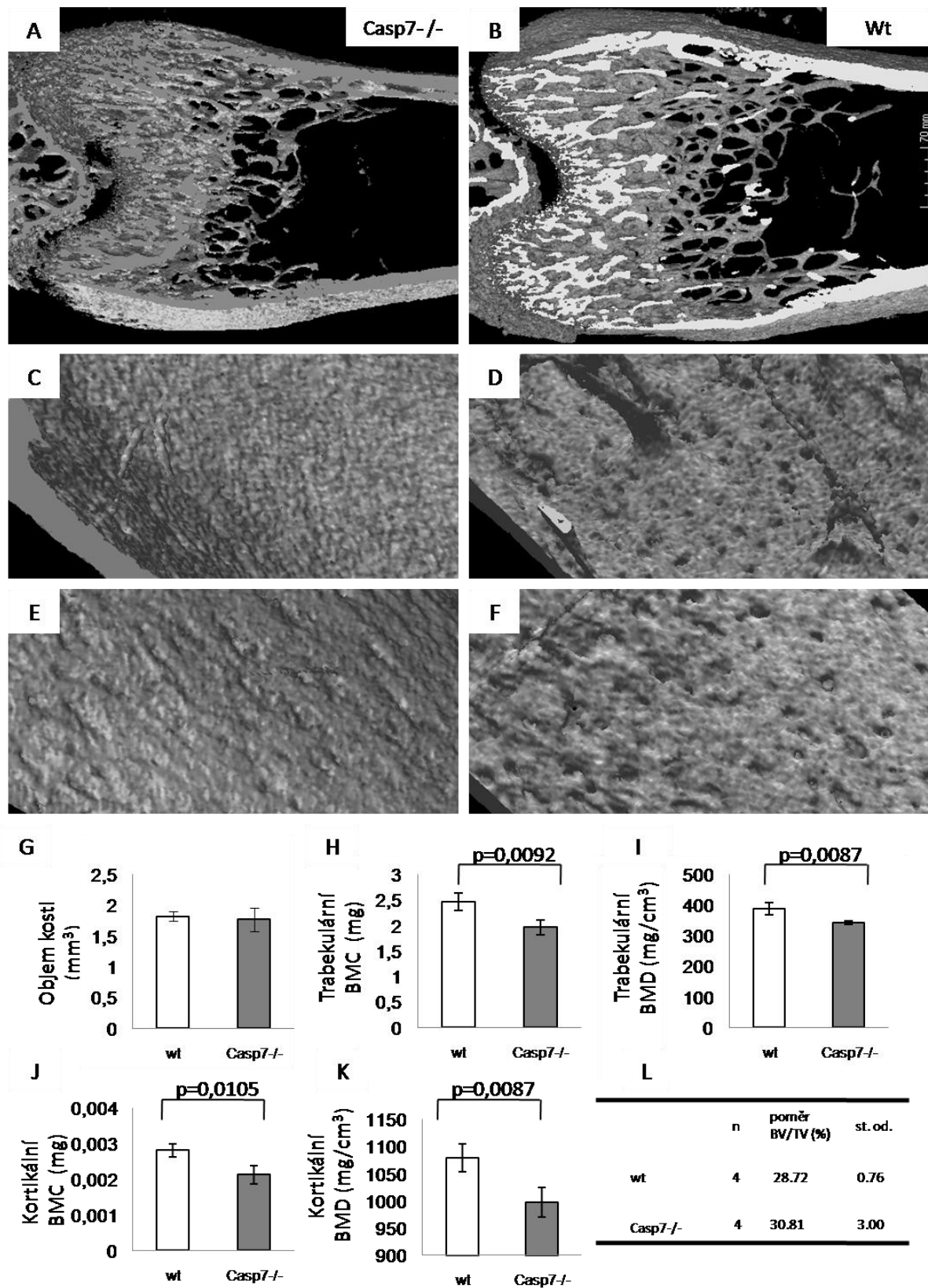
Na rozdíl od intramembranózního modelu osifikace, prostorové řezy 3D rekonstrukcemi distální části kosti stehenní odhalily viditelné změny v organizaci kostní tkáně u Casp7<sup>-/-</sup> myši. Oblast trámců u jedinců postrádajících kaspázu-7 (Obr. 25 A) byla výrazně zmenšena ve srovnání s normálními jedinci (Obr. 25 B). Rozdíly byly patrné také ve struktuře endostálního a periostálního povrchu. U jedinců postrádajících kaspázu-7 (Obr. 25 C, E) byla pozorována hladší struktura povrchu, v kontrastu k poróznímu povrchu normálních jedinců (Obr. 25 D, F).

Kvantitativní analýza kosti stehenní pomocí microCT dále odhalila statisticky významný pokles v BMC (Obr. 25 H) i BMD (Obr. 25 I) v oblasti trámců. Pokles BMC (Obr. 25 J) i BMD (Obr. 25 K) vykazoval i kortex Casp7<sup>-/-</sup> jedinců. Naopak objem kosti (Obr. 25 G) ani poměr BV/TV (Obr. 25 L) nevykazovaly statisticky významné snížení u Casp7<sup>-/-</sup> jedinců. Separace a tloušťka trámců nebyly deficiencí kaspázy-7 ovlivněny.



Obr. 24: Charakterizace mandibulární/alveolární kosti Casp7<sup>-/-</sup> jedinců v postnatálním vývoji (P28). Expres osteokalcinu v mandibulární kosti Casp7<sup>-/-</sup> (A, B) a normálních jedinců (C, D), 3D rekonstrukce kvadrantu mandibuly Casp7<sup>-/-</sup> (E) a normálních jedinců (F) pořízená na základě microCT analýzy, sagitální řez mandibulou Casp7<sup>-/-</sup> (G) a normálních jedinců (H) pořízený na základě microCT analýzy, kvantitativní microCT analýza alveolární kosti (I, J, K). OS (osteokalcin). A, C měřítko = 100  $\mu$ m; B, D měřítko = 50  $\mu$ m.

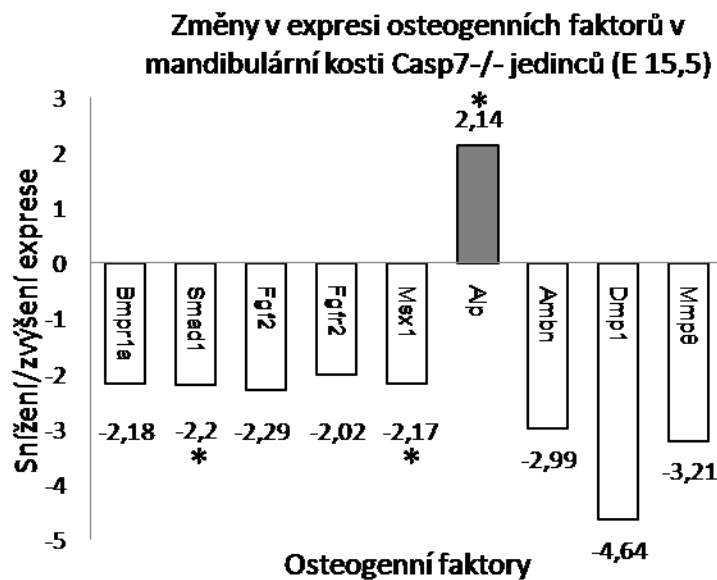




Obr. 25: Charakterizace kostí stehenní Casp7<sup>-/-</sup> jedinců v postnatálním vývoji (P28). Longitudinální řez stehenní kostí Casp7<sup>-/-</sup> (A) a normálních jedinců (B), endostální a periostální povrch Casp7<sup>-/-</sup> (C a E) a normálních jedinců (D a F), kvantitativní microCT analýza kostí stehenní (G-L).

#### 4.2.6. Vliv deficience kaspázy-7 na expresi osteogenních faktorů

Hladiny mRNA osteogenních faktorů (84 genů ovlivňujících osteogenezi) byly zkoumány z celkové RNA izolované z mandibulární kosti (E15,5) pomocí PCR Array. V mandibulární kosti (Obr. 26) postrádající kaspázu-7 bylo nalezeno statisticky významné snížení *Msx1* (*fold change*: -2,17;  $p=0,0058$ ) a *Smad1* (*fold change*: -2,2;  $p=0,0147$ ). Dále bylo pozorováno statisticky významné zvýšení *Alp* (*fold change*: 2,14;  $p=0,0438$ ). Kromě těchto statisticky významných změn byly detekovány další změny v trendu exprese, které však nevykazovaly statistickou signifikanci. Jednalo se o snížení ameloblastinu (*Ambn*; *fold change*: -2,99), receptoru kostních morfogenetických proteinů 1a (*Bmpr1a*) (*fold change*: -2,18), *Dmp1* (*fold change*: -4,64), *Fgf2* (*fold change*: -2,29), receptoru fibroblastového růstového faktoru 2 (*Fgfr2*) (*fold change*: -2,02), *Mmp8* (*fold change*: -3,21).



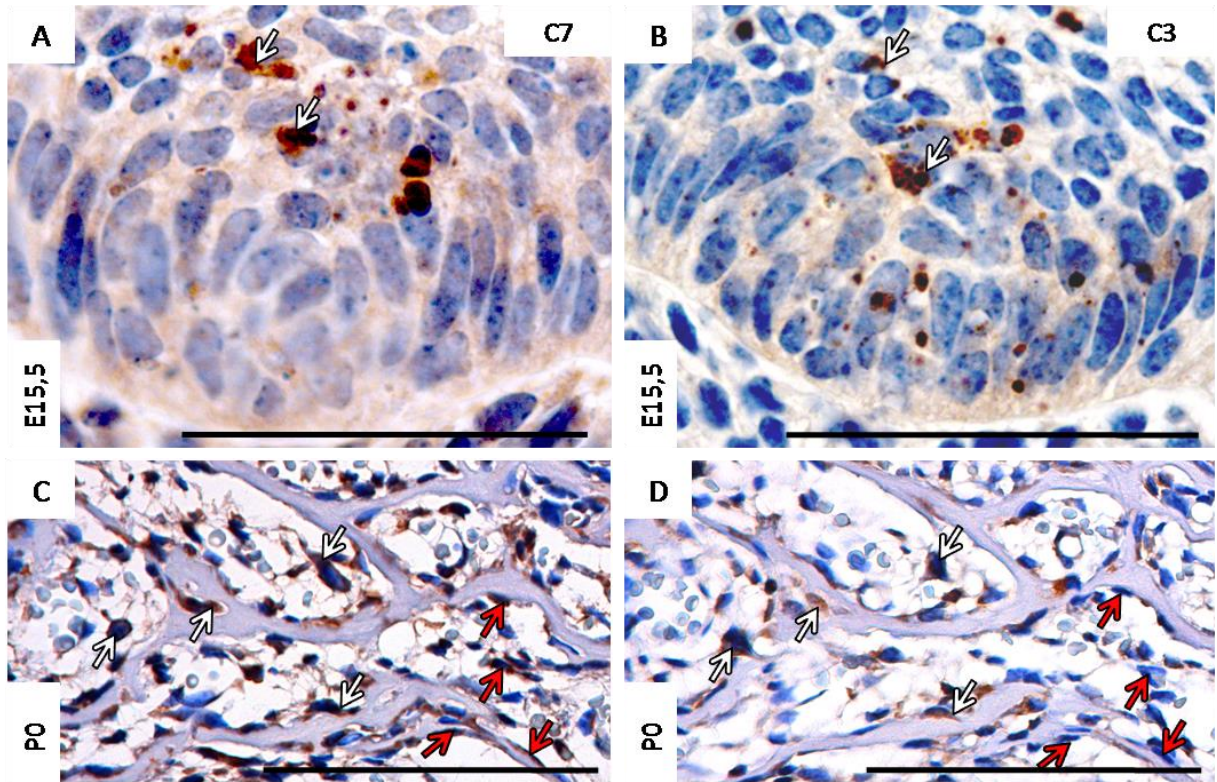
Obr. 26: Změny v genové expresi osteogenních faktorů u Casp7<sup>-/-</sup> jedinců ve stádiu E15,5 detekované pomocí PCR Array. Statisticky signifikantní změny jsou označeny hvězdičkou.

#### 4.3. Aktivace kaspázy-7 a kaspázy-3

Korelace mezi aktivací kaspázy-7 a kaspázy-3 byla sledována v zubních i kostních tkáních. Zatímco v apoptotické oblasti PEK (E15,5) korelovala aktivace kaspázy-7 s aktivací kaspázy-3 (Obr. 27 A a B), v neapoptotických zónách mandibulární kosti (P0) nedocházelo k úplnému překrytí aktivace těchto dvou enzymů (Obr. 27 C a D).

Dále byla v mandibulární kosti (P0) pozorována podobná aktivace kaspázy-7 a -3 v osteoklastech (aktivace kaspázy-3 byla pozorována v 54 % osteoklastů, aktivace kaspázy-7

byla pozorována v 50 % osteoklastů). Kdežto v osteoblastech aktivace kaspázy-7 převažovala nad aktivací kaspázy-3 (aktivace kaspázy-3 byla pozorována v 28 % osteoblastů, aktivace kaspázy-7 byla pozorována v 72 % osteoblastů).



**Obr. 27: Aktivace kaspázy-7 a kaspázy-3.** Imunohistochemická detekce aktivované kaspázy-7 a -3 v PEK v E15,5 (A, B), aktivace kaspázy-7 a -3 v mandibulární kosti v P0 (C, D). C3 (kaspáza-3), C7 (kaspáza-7). Bílé šipky ukazují na oblasti buněk aktivující obě kaspázy, červené šipky ukazují na oblasti buněk, ve kterých se aktivace liší; měřítko = 100 μm.

## 5. Diskuze

### 5.1. Apoptóza se vyskytuje ve většině stádií odontogeneze (publikace 1)

Apoptóza hraje nezastupitelnou roli během vývoje (embryonálně) a udržování homeostázy (postnatálně) většiny orgánů včetně zubu (sklovina, dentin). Apoptóza byla detekována ve všech stádiích zubního vývoje (Matalova *et al.*, 2004): v časně morfogenezi, během eliminace buněk sklovinných uzlů či v dospělé dentici. Časově-prostorová distribuce apoptotických buněk svědčí o mnohočetných funkcích apoptózy při formování zubu: regulaci finálního počtu zubů (Tureckova *et al.*, 1996), redukci sklovinného orgánu, eliminaci buněk sklovinných uzlů (Vaahtokari *et al.*, 1996b), regulaci buněčných populací (Baratella *et al.*, 1999; Nishikawa *et Sasaki*, 1995; 1996; 1999; Pycroft *et al.*, 2002; Vaahtokari *et al.*, 1996b; Yoshioka *et al.*, 1996) či zubní erupci (Shibata *et al.*, 1995; Wise *et King*, 2008).

Během časného embryonálního vývoje (E11) myších čelistí jsou v oblasti budoucí diastemy pozorovány útvary podobné základům molárů, jedná se o zubní rudimenty (D1-D5, R1, R2 /MS, R2). Tyto útvary byly během evoluce redukovány a nevedou k vývoji funkčního zubu (Peterkova *et al.*, 2000). Rudimenty MS a R2 se vyvíjí v těsné blízkosti M1, zpočátku vývoje (E11-12) je tato oblast masivnější než samotný M1 (Prochazka *et al.*, 2010). Apoptóza se podílí na redukci zubních rudimentů (Tureckova *et al.*, 1996). Potlačení apoptotické likvidace vede k vytvoření dalšího (nadpočetného) zubu.

Apoptóza eliminuje buňky signalizačního centra PEK (E14,5-E15,5), které řídí histogenezi epitelu (Jernvall *et al.*, 1998; Jernvall *et Thesleff*, 2000; Thesleff *et Sharpe* 1997; Vaahtokari *et al.*, 1996a). Tato oblast se vyznačuje absencí proliferace (Matalova *et al.*, 2006; Shigemura *et al.*, 2001). V současné době se apoptóze přisuzuje spíše role při likvidaci buněk PEK než při ukončení funkce PEK. V E18 dochází k apoptotickému odstranění dalších signalizačních center: sekundárních sklovinných uzlů (Vaahtokari *et al.*, 1996b).

Zejména v postnatálním vývoji se apoptóza objevuje na periférii kondenzovaného mesenchymu, tedy v oblasti budoucí zubní pulpy (Vaahtokari *et al.*, 1996b). Apoptotická eliminace v této oblasti se uplatňuje také v dospělém organismu, kde se podílí na udržování homeostázy a regulaci počtu buněk zubní pulpy a odontoblastů (Bronckers *et al.*, 1996; Nishikawa *et Sasaki*, 1999). Nejvíce apoptotických buněk bylo detekováno v periferních oblastech korunky (Vermelin *et al.*, 1996).

Ojedinele je možné apoptózu detekovat v raných ameloblastech. Výrazná redukce ameloblastů (25 %) se však objevuje až v post-sekretorické fázi a pokračuje i v pozdní maturační fázi (Nishikawa *et Sasaki*, 1995; Shibata *et al.*, 1995; Smith *et Warshavski*, 1977). Přítomnost apoptózy v oblasti ameloblastů byla popsána v P4 - P7 (Vaahtokari *et al.*, 1996b) s kulminací v P6 (Lungova *et al.*, 2011).

Po dokončení vývoje kořene je část buněk HERS (klíčové struktury během vývoje kořene) eliminována apoptózou. Kromě apoptózy je HERS odstraňována začleněním do vznikajícího cementu, epitelu-mesenchymovou transformací či migrací do okolního periodontia, která vede k tvorbě Malassezových epitelových zbytků (ERM) (Cerri *et Katchburian*, 2005; Shimazu *et al.*, 2009). Vznikající ERM se podílí na prevenci resorpce kořene a na reparativních procesech (Keinan *et Kohen*, 2013).

Apoptóza se podílí také na formování rozhraní zub/kost (Fleischmannova *et al.*, 2010). Distribuce apoptotických buněk v kostní tkáni se mění s odlišnými stádii vývoje, výrazné zastoupení apoptotických buněk v alveolární kosti bylo detekováno v období P10-P12 (Lungová *et al.*, 2011). Nejvýznamnější změny v morfologii alveolárních výběžků mandibulární kosti a alveolární kosti pravděpodobně probíhají během vývoje zubního kořene a zubní erupce (Cho *et Garant*, 2000). Při této remodelaci se uplatňuje resorbční funkce osteoklastů, ale také apoptóza.

Apoptóza se vyskytuje také v populaci fibroblastových buněk již během časných stádií formace PDL (Cerri *et al.*, 2000). Zvýšení apoptózy v PDL či dásních bylo pozorováno u starších zvířat nebo v lidských tkáních (Pycroft *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 1996). Je však možné, že mechanismus apoptózy časného a post-erupčního vývoje je odlišný (Bronckers *et al.*, 2000).

## **5.2. Apoptóza v odontogenezi uplatňuje různé molekulární faktory (publikace 1)**

Doposud bylo identifikováno několik proapoptotických molekul, které se zdají významné pro apoptózu v zubních tkáních. Pro apoptózu PEK jsou klíčové kaspázy-3, -9 a Apaf-1 (Matalova *et al.*, 2006; Setkova *et al.*, 2007). Tento proces tedy probíhá mitochondriální cestou s možnou amplifikací skrze receptory smrti (Matalova *et al.*, 2005b; Matalova *et al.*, 2006; Setkova *et al.*, 2007). Další molekulou identifikovanou v EK je inhibitor cyklin dependentních kináz p21 (Jernvall *et al.*, 1998). Jeho exprese je řízena proteinem p53, který je také exprimován v zubním zárodku. Myši postrádající p21 či p53 se

vyvíjely normálně (Deng *et al.*, 1995; Donehower *et al.*, 1992). Naopak deficience příbuzného proteinu p63 vedla k anodoncii (Mikkola, 2007).

V zubních tkáních byly detekovány také anti- a proapoptoticky působící produkty genů *Bcl-2* a *Bax* (Kalibovic Govorko *et al.*, 2010). Zvýšení exprese genu *Bcl-2* mělo dopad na diferenciaci odontoblastů (Zhang *et al.*, 2010).

Další faktory jako například produkty genů *Egr1*, *N-Myc*, *c-Fos*, či *Msx2* byly detekovány v zubním zárodku. Korelace výskytu těchto molekul (až na *Msx2*) a apoptózy však nebyla pozorována (Jernvall *et Thesleff*, 2000).

Deregulace apoptózy v zubních tkáních jsou spojovány s rozličnými poruchami: oligodoncií, hypondoncií, zubní agenezí, paradentózou či tvorbou dentigerózních cyst (Fleischmannova *et al.*, 2008). Na základě inhibičních pokusů byla apoptóza navržena i jako kandidátní mechanismus makrodoncie (Kim *et al.*, 2006), na druhou stranu však komplexní inhibice kaspáz nevedla k detekovatelným změnám v morfologii zubních hrbolů (Coin *et al.*, 2000b).

### **5.3. Kaspáza-7 není klíčová pro apoptotickou eliminaci primárního sklovinného uzlu (*publikace 2*)**

Kaspáza-7 vykazuje vysokou strukturní podobnost s kaspázou-3 (Talanian *et al.*, 1997), která byla popsána jako jeden z klíčových faktorů pro apoptózu PEK (Matalova *et al.*, 2006). Aktivace kaspázy-7 byla detekována v PEK prvního myšího moláru (E15,5), její výskyt pozitivně koreloval s aktivací kaspázy-3 i s lokalizací apoptotických buněk. Na rozdíl od kaspázy-3 (Matalova *et al.*, 2006) však deficience kaspázy-7 nevedla k inhibici apoptózy v PEK. *Casp7<sup>-/-</sup>* PEK nevykazovaly změny v počtu apoptotických buněk ani v aktivaci kaspázy-3 ve srovnání s kontrolami. To vede k předpokladu, že kaspáza-3 má v tomto procesu esenciální roli a kaspáza-7 pouze přispívá specifickými funkcemi k celkovému efektu. Alternativně může kaspáza-3 převzít funkce kaspázy-7 během apoptózy v PEK, ne však naopak. Navržené funkce obou enzymů při apoptotické eliminaci PEK se zdají být v souladu s centrálním postavením kaspázy-3 během apoptotického procesu (Brental *et al.*, 2013).

#### **5.4. Aktivovaná kaspáza-7 se vyskytuje během diferenciacie buněk zubních tkání (*publikace 2, 3*)**

Kromě oblasti PEK prvního myšího moláru byla aktivovaná kaspáza-7 lokalizována také ve strukturách, které nevykazovaly morfologické znaky apoptózy a nebyly v předchozích studiích popsány jako oblasti výskytu apoptotické eliminace (Vahtokari *et al.*, 1996b). V E17,5 se aktivace kaspázy-7 objevovala zejména v IEE, ze kterého později diferencují ameloblasty. V perinatálních i postnatálních stádiích (P0, P5) byla aktivace kaspázy-7 detekována v diferencujících/diferencovaných odontoblastech a ameloblastech. Aktivace kaspázy-7 se zvyšovala se stupněm diferenciacie. Aktivace kaspázy-7 byla pozorována zejména v terminálně diferencovaných odontoblastech sousedících s budoucími zubními hrboly, dále pak v oblasti HERS, kde je stupeň diferenciacie odontoblastů nižší.

Kaspáza-7 byla detekována také během vývoje řezáků, kde byla její aktivace nerovnoměrně rozložena mezi labiální a linguální stranou řezáku. Aktivace kaspázy-7 se vyskytovala pouze v labiální části řezáku. Buňky linguální strany neprodukující sklovinu nevykazovaly aktivaci kaspázy-7. V E17,5 byla aktivovaná kaspáza-7 detekována v SI a IEE, zejména v oblasti TA buněk, které pocházejí z kmenových buněk labiální části cervikální smyčky a jsou charakteristické vysokou proliferační aktivitou (Harada *et al.*, 1999) a dále v polarizovaných odontoblastech. Během dalšího vývoje se aktivace kaspázy-7 vyskytovala v diferencujících/diferencovaných ameloblastech a odontoblastech.

Asymetrická distribuce signálních molekul během vývoje řezáku není ojedinělou záležitostí. Vyskytuje se mimo jiné v případě aktivinu (Wang *et al.*, 2007), folistatinu (Wang *et al.*, 2004), faktorů rodiny Sprouty (Klein *et al.*, 2008) či zástupců rodiny Notch (Harada *et al.*, 1999) a souvisí s asymetrickým rozložením tvrdých tkání v řezáku. Detekce aktivované kaspázy-7 během vývoje molárů a řezáků poukazuje na zapojení kaspázy-7 také mimo apoptotické procesy.

#### **5.5. Subcelulární lokalizace kaspázy-7 může ovlivňovat funkce enzymu (*publikace 2, 3*)**

Ve většině zubních buněk vykazujících přítomnost aktivované kaspázy-7 byla evidentní její cytoplazmatická lokalizace, zatímco jádra buněk zůstávala negativní. Buňky vykazující aktivaci kaspázy-7 výhradně v cytoplazmě většinou nekorelovaly s rozložením apoptotických buněk. Naopak v PEK, kde se aktivace kaspázy-7 vyskytovala v jádrech epitelových buněk, byla patrná pozitivní korelace s distribucí apoptózy.

Obecně probíhá aktivace kaspáz v cytoplazmě, kde může docházet ke štěpení různých substrátů souvisejících i nesouvisejících s apoptózou. Pro vykonání jejich apoptotické exekuční funkce je však nezbytný transport do jádra, kde dochází ke štěpení PARP, iCAD a dalších jaderných proteinů vyústující ve fragmentaci DNA (Fischer *et al.*, 2003). Jaký mechanismus rozhoduje o subcelulární lokalizaci kaspáz, a potažmo také o „přepnutí“ mezi jejich apoptotickými/neapoptotickými funkcemi, není doposud jasné. Velikost dimeru kaspáz se zdá být příliš velká pro pasivní transport. Na druhou stranu však u kaspáz nebyla detekována jaderná lokalizační sekvence (NLS) nezbytná pro aktivní transport. Jedna z hypotéz navrhuje funkci kaspázy-9 při rozšíření jaderných pórů, což usnadní difuzní vstup exekuční kaspázy (Faleiro *et Lazebnik*, 2000). Tato teorie však neobjasňuje selektivitu procesu pro jednotlivé kaspázy. Dalším mechanismem může být vazba exekuční kaspázy na substráty, které mají funkci nosiče pro aktivní jaderný transport (Kamada *et al.*, 2005).

Skutečnost, že výskyt kaspázy-7 v jádře nebyl ve sledovaných stádiích diferenciaci odontoblastů a ameloblastů pozorován, potvrzuje funkce kaspázy-7 v procesech nesouvisejících s apoptózou.

### **5.6. Kaspáza-7 vykazuje neapoptotické funkce během odontogeneze (publikace 2, 3)**

Moláry postrádající kaspázu-7 (P28) nevykazovaly morfologické změny ve struktuře zubních tkání ani statisticky signifikantní změny v mineralizaci či objemu tkání ve srovnání s normálními jedinci. Je však možné, že existují subtilní změny v organizaci tkáně či v celulární/subcelulární struktuře, které pomocí microCT nebylo možné odhalit.

MicroCT analýza řezáků naopak odhalila statisticky významné změny v objemu/ploše skloviny u *Casp7<sup>-/-</sup>* jedinců ve srovnání s kontrolami. Zřetelnější efekt deficiencie kaspázy-7 v řezáku může být daný odlišným charakterem obou typů zubů. Myší řezáky se liší od molárů v několika aspektech: asymetrickou stavbou (sklovina je přítomna pouze na labiální straně řezáku), která vychází z asymetrické distribuce signálních molekul (Harada *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2008; Thesleff *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). Řezáky jsou dále specifické přítomností somatických kmenových buněk (Harada *et al.*, 1999; Kaukua *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014) a kontinuálním růstem, který kmenové buňky umožňují.

### **5.7. Aktivovaná kaspáza-7 se vyskytuje v osteogenezi (publikace 4)**

Během studia kaspázy-7 v zubních tkáních bylo patrné, že se aktivace kaspázy-7 vyskytuje také v mandibulární a alveolární kosti obklopující dentici. Oba typy kostí vznikají



intramembranózní osifikací. Vzhledem k tomu, že se mechanismus tvorby kostní tkáně i genová exprese v intramembranózním a endochondrálním typu kostí odlišuje (Abzhanov *et al.*, 2007; Aghaloo *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2004), pozornost jsme věnovali oběma typům osifikace. Pomocí imunohistochemické detekce byla aktivovaná kaspáza-7 detekována v intramembranózním i endochondrálním modelu kosti během prenatalního i postnatálního vývoje.

V mandibulární kosti (intramembranózní model) se aktivace kaspázy vyskytovala již v prvních fázích osifikace (E13,5), kdy docházelo k iniciaci diferenciaci osteoblastů a produkci organické matrix. V předchozím stádium, ve kterém se mandibulární kost nacházela ve stavu kondenzovaného mesenchymu, nebyla aktivace kaspázy-7 zřetelná. V dalším vývoji se aktivace kaspázy-7 zvyšovala s plochou rostoucí kostní tkáně a byla stále patrná v časných postnatálních stádiích. Podobně i dlouhé kosti horní končetiny (endochondrální model) vykazovaly aktivaci kaspázy-7 od počátku formování kostní tkáně (E14,5) v oblasti budoucího perioste. Oblast vykazující aktivaci kaspázy-7 v endochondrálním modelu se s růstem primárního osifikačního centra zvětšovala a opět přetrvávala do postnatálních stádií.

Oba modely osifikace se lišily v čase počáteční aktivace kaspázy-7, což nejspíše spočívá v různém načasování iniciace osifikačního procesu těchto dvou modelů. Podobné jednodenní zpoždění u endochondrálního modelu bylo popsáno také v souvislosti s expresí genu *Runx2*, jehož produkt je klíčovým transkripčním faktorem pro osifikaci (Kim *et al.*, 1999).

## **5.8. Kaspáza-7 není klíčová pro apoptózu buněk kostních tkání (publikace 4)**

Apoptóza se uplatňuje v různých fázích osteogeneze. Během expanze primárního osifikačního centra endochondrálních kostí apoptóza odstraňuje hypertrofické chondrocyty (Roach *et al.*, 1995), dále reguluje počet osteoblastů, podílí se na eliminaci osteocytů a ovlivňuje kostní resorpci skrze osteoklasty (Hughes *et Boyce*, 1997).

V postnatálních stádiích byla apoptóza popsána jako součást remodelace při formaci rozhraní zub/kost (Lungova *et al.*, 2011). Aktivace kaspázy-7 byla detekována v některých buňkách mandibulární/alveolární kosti podstupujících apoptózu. Na druhou stranu však byla aktivace kaspázy-7 pozorována v mnoha buňkách, které nebyly TUNEL-positivní a nevykazovaly morfologické znaky apoptózy. Navíc u *Casp7<sup>-/-</sup>* mandibulárních kostí nebylo pozorováno snížení apoptózy.

V endochondrálním modelu byl pozorován velmi podobný trend jako v mandibulární/alveolární kosti. Subcelulární lokalizace aktivované kaspázy-7 v obou modelech osifikace, stejně jako v případě odontoblastů a ameloblastů, převažovala v cytoplazmě. Tyto výsledky ukazují, že kaspáza-7 může přispívat k apoptóze v kostních tkáních, ale vypovídají o její další a patrně významnější funkci mimo apoptózu.

## **5.9. Kaspáza-7 vykazuje neapoptotické funkce během osteogeneze (publikace 4)**

Z trojrozměrných rekonstrukcí myších mandibul vytvořených na základě microCT analýzy nebyly patrné rozdíly v organizaci kostní tkáně mezi jedinci postrádajícími kaspázu-7 a normálními zvířaty. Kvantitativní analýza pomocí microCT však odhalila statisticky signifikantní snížení objemu alveolární kosti a BMC u *Casp7<sup>-/-</sup>* myši. BMD se naopak od normálních jedinců neodlišovala. Výsledky tedy poukazují na celkové snížení alveolární kosti. Podobný trend byl pozorován také v případě mandibulární kosti.

Odlišný efekt deficience kaspázy-7 byl detekován u endochondrálního modelu osifikace (kost stehenní). Rozdíl v organizaci kostní tkáně byl patrný již z morfologického hlediska. U deficientních myši byla zjevná redukce oblasti trámců a odlišná porozita u endostálního i periostálního povrchu kortexu. Kvantitativní analýza dále odhalila snížení BMD u *Casp7<sup>-/-</sup>* jedinců ve srovnání s normálními jedinci. Objem kostní tkáně, separace i šířka trámců se však neodlišovaly od kontrol.

Rozdílný efekt kaspázy-7 během intramembranózní a endochondrální osifikace může spočívat v odlišné fyziologii obou modelů. Klíčové mechanismy obou typů osifikace jsou shodné, diferenciace osteoblastů se v obou případech účastní produkt genu *Runx2* či osterix (Ducy *et al.*, 1997; Komori *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Nakashima *et al.*, 2002). Principy realizace i tkáň samotná se však v mnoha aspektech liší. Rozdílný je původ osteoblastů. V alveolární/mandibulární kosti pocházejí osteoblasty z neuroektodermu, osteoblasty dlouhých kostí končetin mají původ v laterálním mezodermu.

S tímto faktem úzce souvisí odlišná morfologie tkáně, vnitrobuněčná stavba buněk a exprese signálních molekul (Abzhanov *et al.*, 2007; Aghaloo *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2004). Experimenty prokázaly, že stromální buňky kostní dřene (BMSC) derivované z mandibuly mají vyšší osteogenní potenciál než BMSC dlouhých kostí (Aghaloo *et al.*, 2010). Jedním z příkladů odlišné genové exprese je periostin navržený jako marker intramembranózní osifikace (Kashima *et al.*, 2009). Rozdíly byly detekovány také v expresi genů *Bmp* (Suttapreyarsi *et al.*, 2006) a v mechanismech angiogeneze (De Spiegelaere *et al.*, 2010).

## 5.10. Kaspáza-7 ovlivňuje expresi osteogenních markerů (publikace 4)

Analýza genové exprese mandibulární kosti (E15,5) jedinců postrádajících kaspázu-7 odhalila statisticky signifikantní snížení *Msx1* a *Smad1*, dvou významných genů osteogeneze (Bendall *et Abate-Shen*, 2000). Produkt genu *Smad1* je klíčovou molekulou transdukce BMP dráhy, zajišťuje přenos signálu mezi membránovým receptorem a jádrem, ve kterém probíhá genová exprese (Nohe *et al.*, 2004). Tato signální molekula byla popsána při terminální diferenciaci osteoblastů (Hellingman *et al.*, 2011). Inhibice exprese genu *Bmp6*, jehož produkt účinkuje v signalizaci jako předcházející molekula SMAD1, způsobila inhibici osteogeneze alveolární kosti (Wise *et al.*, 2011). Snížení exprese genů *Smad1* i *Msx1* během embryonálního vývoje podporují pokles objemu intramembranózní kosti pozorovaný u dospělých *Casp7<sup>-/-</sup>* jedinců.

Kromě snížení exprese *Smad1* a *Msx1* však analýza odhalila také statisticky signifikantní zvýšení transkriptu *Alp*. Tato molekula je přítomna na povrchu osteoblastů a řídí produkci vysoké koncentrace fosfátu, která je nezbytná pro mineralizaci kosti (Golub *et Battaglia*, 2007). ALP je používána jako významný marker osteogeneze. Zvýšení hladiny transkriptu genu *Alp*, které bylo detekováno pomocí PCR Array, však nekoreluje se sníženým objemem a normálním BMD alveolární kosti u *Casp7<sup>-/-</sup>* myši, který odhalilo microCT. Mezi úrovní transkripce genu *Alp* a aktivitou ALP byla popsána pozitivní korelace (San Miguel *et al.*, 1999; Gianni *et al.*, 1991). Na druhou stranu však existují i opačné případy (Rambaldi *et al.*, 1989). Vysoká aktivita ALP byla dokonce pozorována v souvislosti s nízkou hladinou transkriptu genu *Alp* (Kyeyune-Nyombi *et al.*, 1995). Aktivitu ALP tedy nelze jednoznačně hodnotit na základě stanovení množství mRNA. Během tvorby aktivního enzymu se evidentně mohou uplatňovat post-transkripční či post-translační modifikace, které ovlivňují tvorbu funkčního enzymu.

Kromě těchto statisticky významných změn odhalila PCR Array analýza klesající (ne však statisticky významný) trend v hladinách exprese dalších genů podílejících se na osifikaci. Ve srovnání s normálními jedinci došlo v případě *Casp7<sup>-/-</sup>* jedinců ke snížení exprese genů rodiny FGF (*Fgf2*, *Fgfr2*). Tato dráha se během vývoje kostní tkáně podílí na regulaci proliferace, diferenciaci a apoptózy (Ornitz *et Marie*, 2002; Ornitz, 2000). Pokles množství mRNA byl detekován také u genu *Bmpr1a*, jehož produkt má funkci během přenosu signálu BMP dráhy. Podobně byl pokles genové exprese zaznamenán u *Mmp8*, produkt tohoto genu se uplatňuje při remodelaci kosti (Murphy *et Docherty*, 1992). Dále byla snížená exprese pozorována u genů, které jsou součástí kostní matrix (*Ambn*, *Dmp1*), a následně se podílejí

na její mineralizaci. Funkce AMBN v intramembranózní osifikaci je dosud diskutována (Kuroda *et al.*, 2011; Wazen *et al.*, 2009), v současné době je zvažována jeho role během růstu čelisti a remodelace kostí (Jacques *et al.*, 2014). DMP1 je členem skupiny proteinů nekolagenní povahy, které se účastní ukládání hydroxyapatitových krystalů do organické matrix dentinu a kosti (Jain *et al.*, 2002).

Obdobná analýza nebyla možná v případě dlouhých kostí. Izolace RNA je komplikována přítomností látek interagujících s RNA, které jsou přítomny v chrupavčitém primordiū. Tyto faktory znemožňují izolaci kvalitní RNA pro účely PCR Array (Mallein-Gerin *et Gouttenoire*, 2004).

### **5.11. Mechanismus neapoptotických účinků kaspázy-7 může zahrnovat štěpení faktorů pluripotence (*publikace 3*)**

Přestože funkce kaspáz během diferenciačního procesu byly popsány u mnoha buněčných typů (Lamkanfi *et al.*, 2007), mechanismus jejich působení nebyl zatím zcela objasněn. Aktivace kaspáz během diference je pravděpodobně závislá na typu buněk a konkrétní expresi signálních molekul. Jedním z možných mechanismů zapojení kaspáz právě při buněčné diferenciaci je štěpení (destrukce) transkripčních faktorů.

Kaspáza-7 byla popsána jako faktor, který je schopen štěpit/destruovat transkripční faktor OCT4 (Musch *et al.*, 2010), významný marker pluripotence. OCT4 byl detekován v LaCL (Li *et al.*, 2011). Pluripotentní markery OCT4, NANOG, SOX2 jsou klíčové pro udržování nediferenciovaného stavu embryonálních kmenových buněk. Ztráta faktoru OCT4 je popisována jako jedna z událostí, která umožňuje vstup nediferencované buňky do diferenciačního procesu (Munoz Descalzo *et al.*, 2013). Kaspáza-3 byla popsána jako hlavní faktor podílející se na deaktivaci NANOG a tedy ztrátě pluripotence buněk (Fujita *et al.*, 2008). Pozdější studie diferenciačních faktorů pro léčbu nádorových buněk však odhalila, že pouze kaspáza-7 (nikoli kaspáza-3) zajišťuje degradaci pluripotentního markeru OCT4, což vede k inaktivaci NANOG (Musch *et al.*, 2010). Vzhledem k tomu, že aktivace kaspázy-7 byla detekována pouze v labiální části řezáku, je pravděpodobné, že se štěpení OCT4 kaspázou-7 může podílet na diferenciaci ameloblastů řezáku.

Je tedy možné usuzovat, že kaspázy mohou štěpit (destruovat) i další transkripční faktory a tím se podílet na řízení osudu buňky. Jejich role by naopak mohla mít i charakter aktivačního štěpení, při němž dochází k aktivaci faktorů typických pro určité buněčné typy. Je pravděpodobné, že mechanismus tohoto procesu může být spojen s aktivační kaskádou či amplifikační smyčkou.

Kromě transkripčních faktorů však kaspázy mohou účinkovat i skrze další substráty. Zvýšení p21 v BMSC bylo pozorováno u myši postrádajících kaspázu-3 (Miura *et al.*, 2004). p21 byl popsán jako jeden ze substrátů kaspázy-3 (Jin *et al.*, 2000). Zvýšené množství p21 by mohlo dále vést k inhibici cyklin dependentních kináz a navození buněčné senescence. Jako možný „záchranný“ mechanismus pro indukci proliferace v těchto buňkách může sloužit zvýšená aktivace TGF $\beta$  dráhy, která by mohla ovlivňovat expresi genu *Runx2* v preosteoblastech a podmiňovat nefyziologické formování kostní tkáně u myši postrádajících kaspázu-3 (Miura *et al.*, 2004). Na základě inhibičních experimentů bylo navrženo, že kaspáza-7 může rozpoznávat a štěpit p21 (Levkau *et al.*, 1998). Tento proces však může být ovlivňován dalšími faktory a nemusí být zcela identický ve všech tkáních.

## **5.12. Role kaspázy-7 a -3 během vývoje tvrdých tkání nejsou identické (publikace 2, 4)**

Na základě současných studií lze usuzovat, že kaspázy se podílí nejen na apoptotické eliminaci buněk tvrdých tkání, ale také na jejich diferenciaci. Efekt různých kaspáz se však během zmíněných procesů může lišit. Kaspáza-3 je na rozdíl od kaspázy-7 klíčová pro apoptózu PEK (Matalova *et al.*, 2006). Dále se kaspáza-3 jeví jako účinnější faktor osteogenní diferenciaci. Na rozdíl od relativně mírného efektu deficiencie kaspázy-7 na strukturu kosti stehenní vykazovaly myši postrádající kaspázu-3 závažnější poruchy v uspořádání kostní tkáně (Miura *et al.*, 2004).

Inhibice kaspázy-3 pomocí farmakologického inhibitoru Z-DEVD-FMK, který je považován za specifický inhibitor kaspázy-3, během kultivace BMSC způsobila pokles exprese genu *Runx2* (Miura *et al.*, 2004). Analogický inhibiční experiment *in vitro* zatím není možné provést v případě kaspázy-7, specifický inhibitor této kaspázy dosud není komerčně dostupný. Navíc se o specifitě stávajících inhibitorů začíná spekulovat (Katao *et al.*, 2014). Během PCR Array analýzy nebyl podobný pokles pozorován u *Casp7<sup>-/-</sup>* mandibulární kosti (E15,5) *in vivo*. Tyto odlišné výsledky mohou být ovlivněny odlišnými typy experimentů (*in vitro* vs. *in vivo*), nicméně by mohly vypovídat o rozdílech v rozpoznávání různých substrátů kaspázou-3 a -7.

Kaspáza-3 a -7 vykazují vysokou strukturní podobnost, obě jsou klasifikovány jako exekuční kaspázy, rozpoznávají a štěpí aminokyselinovou sekvenci DEXD. Studium deficientních zvířat odhalilo, že absence kaspázy-3 nebo -7 na pozadí C57BL/6 nevykazují s životem neslučitelné vývojové defekty. Jedinci postrádající obě však hynou krátce po narození (Lakhani *et al.*, 2006; Leonard *et al.*, 2002), což podporuje teorii alespoň částečně

se překrývajícími funkcí a/nebo částečnou redundancí. Experimenty na různých buněčných typech a tkáních potvrdily tuto parciální zastupitelnost, která je pravděpodobně závislá na typu buněk, ale také charakteru vnějších stimulů (Houde *et al.*, 2004; Lakhani *et al.*, 2006).

V současnosti se objevuje stále více důkazů o odlišnosti těchto dvou enzymů. Rozdíly mezi kaspázou-3 a -7 byly popsány také v proteázové aktivitě (Nakatsumi *et al.*, 2010), substrátové specifitě (Walsh *et al.*, 2008) a účinnosti štěpení identických substrátů (Sgorbissa *et al.*, 1999). Během apoptotického procesu dochází k proteolytickému štěpení ICAD a aktivaci CAD. ICAD je efektivněji štěpen kaspázou-3 než kaspázou-7 (Wolf *et al.*, 1999). Naopak PARP je štěpen s větším účinkem kaspázou-7 (Boucher *et al.*, 2012). Na základě funkčních studií se kaspáza-3 jeví asi desetkrát efektivnější ve štěpení malých molekul (Demon *et al.*, 2009; Nakatsumi *et al.*, 2010) a také je schopna štěpit větší spektrum substrátů (Walsh *et al.*, 2008). Kaspáza-3 a -7 i jejich proformy dále vykazují rozdílné subcelulární lokalizace, přítomnost kaspázy-7 byla ve větší míře patrná v mitochondriální a mikrosomální frakci, kde může vykonávat specifické funkce (Chandler *et al.*, 1998).

Otázka možné kompenzace kaspázy-3 během vývoje Casp7<sup>-/-</sup> tvrdých tkání zatím není zcela vyřešena. Distribuce buněk PEK aktivujících kaspázu-3 a kaspázu-7 byla velmi podobná, možnou kompenzací deficience kaspázy-7 pomocí centrální kaspázy-3 tedy nelze vyloučit. Na druhou stranu během diferenciačních procesů může být situace zcela odlišná. Aktivace kaspázy-3 a -7 v mandibulární kosti se nepřekrývala ve všech kostních buňkách. Kompenzace kaspázy-7 pomocí kaspázy-3 tedy pravděpodobně neslouží jako univerzální mechanismus v buňkách kostní tkáně.

Z hlediska apoptotického procesu je kaspáza-3 popisována jako centrální a nejfrekventovanější exekuční enzym (Porter *et al.*, 1999), což potvrzuje také studium apoptózy v PEK. Kaspáza-7 je pravděpodobně mnohem specifičtější ve svých účincích během apoptotického procesu, například může vzhledem ke své lokalizaci hrát roli při změnách membránových struktur a podílet se tak na zajištění fagocytózy (Slee *et al.*, 2001). Stejně tak se kaspáza-7 jeví specifičtější při diferenciaci buněk tvrdých tkání.

Přestože konkrétní mechanismy doposud nejsou známy, zapojení další proapoptotických faktorů jako je například Fas/FasL (Park *et al.*, 2005) v diferenciačních procesech tvrdých tkání je podpořeno studiemi, ve kterých zvýšení exprese antiapoptotického Bcl-2 vedlo ke snížení diferenciaci osteoblastů (Moriishi *et al.*, 2011) a odontoblastů (Zhang *et al.*, 2010). Tyto údaje svědčí o multiplicitě apoptotických molekul, které je třeba věnovat pozornost.

### **5.13. Budoucnost studia kaspáz směřuje k analýze jedné buňky** *(publikace 5)*

Jednou z atraktivních možností studia kaspáz je analýza aktivity enzymu na principu bioluminiscence. Tato metoda je založena na principu přeměny substrátu aminoluciferinu na luciferin v přítomnosti aktivované kaspázy a jeho následného rozpoznání a štěpení luciferázou. Během této reakce dochází k uvolnění světlené energie, kterou lze zachytit detektorem a vyhodnotit. Metody založené na bioluminiscenci nevykazují téměř žádné pozadí a zajišťují velmi nízký detekční práh. Miniaturizace systému na objem stovek femtolitrů umožňuje snižování počtu buněk nezbytných k analýze. Tyto postupy vedou k precizním metodám, které dovolí analyzovat jedinou buňku.

## 6. Závěr

Korelace aktivované kaspázy-7 s apoptotickými buňkami podpořená studiem deficientních jedinců ukazuje, že kaspáza-7 nehraje klíčovou roli v apoptotické eliminaci buněk tvrdých tkání. Aktivace kaspázy-7 v cytoplazmě diferencujících buněk tvrdých tkání však poukazuje na její dosud neznámou roli v procesech mimo apoptózu nebo zánětové procesy. Současné experimenty ukazují, že také další proapoptotické molekuly mají v buňkách multiplicitní funkce: apoptózu, zánětové procesy, diferenciaci buněk či regulaci proliferace.

Studium kaspáz (a proapoptotických molekul obecně) během diferenciacních a apoptotických procesů otevírá diskuzi, zda buněčná smrt a diferenciaci mohou sdílet podobné molekulární mechanismy nebo dokonce, zda může být buněčná smrt extrémní formou diferenciacního procesu. Další otázkou je, jaký mechanismus rozhoduje o přepnutí mezi těmito dvěma procesy. Vzhledem k tomu, že se v současnosti zvažuje využití molekul blokujících aktivitu kaspáz jako terapeutických prostředků při léčbě mnoha různých onemocnění, je třeba pečlivě zvažovat veškeré funkce kaspáz a možné důsledky jejich inhibice.

Kaspáza-3 byla popsána jako klíčová molekula apoptózy, ale také jako faktor významně ovlivňující osteogenezi. Zvýšení její aktivity i její inhibice při léčbě různých onemocnění může přinášet závažné komplikace. Kaspáza-7 proti tomu vykazuje specifitější účinky během apoptotického procesu a pravděpodobně i během diferenciaci. Její využití jako potenciálního terapeutického cíle přináší méně rizik. Poznatky ze studia kaspázy-7 by tedy mohly přispět k léčbě onemocnění kostních tkání jako je osteoporóza, nebo podpoře tvorby kostní tkáně často nezbytné při aplikaci zubních implantátů do alveolární/mandibulární kosti.



## 7. Seznam zkratk

Ambn	<b>A</b> meloblastin
Apaf-1	<b>A</b> poptotic <b>P</b> rotease <b>A</b> ctivating <b>F</b> actor- <b>1</b> , apoptotický proteázový aktivační faktor 1
ATP	<b>A</b> denosin <b>t</b> riphosphate, adenosin <b>t</b> rifosfát
BMC	<b>B</b> one <b>M</b> ineral <b>C</b> ontent, obsah minerálů v kosti
BMD	<b>B</b> one <b>M</b> ineral <b>D</b> ensity, hustota kostní tkáně
BMP	<b>B</b> one <b>M</b> orphogenetic <b>P</b> rotein, kostní morfogenetický protein
BMPR	<b>B</b> one <b>M</b> orphogenetic <b>P</b> rotein <b>R</b> eceptor, receptor kostních morfogenetických proteinů
BMSC	<b>B</b> one <b>M</b> arrow <b>S</b> tralal <b>C</b> ells, stromální buňky kostní dřeně
BV	<b>B</b> one <b>V</b> olume, objem kosti
CAD	<b>C</b> aspase <b>A</b> ctivated <b>D</b> Nase, kaspázou aktivovaná DNáza
CARD	<b>C</b> aspase <b>A</b> ctivation and <b>R</b> ecruitment <b>D</b> omain, kaspázová aktivační doména
Casp7 <sup>-/-</sup>	<b>C</b> aspase- <b>7</b> deficient, kaspáza-7 deficientní
CL	<b>C</b> ervical <b>L</b> oop, cervikální smyčka
COL	<b>C</b> ollagen, kolagen
DAB	3, 3' - <b>d</b> iaminobenzidin tetrachlorid
DED	<b>D</b> eath <b>E</b> ffector <b>D</b> omain, efektorová doména smrti
DISC	<b>D</b> eath- <b>I</b> nducing <b>S</b> ignalling <b>C</b> omplex, signální komplex indukující buněčnou smrt
DMP1	<b>D</b> entin <b>M</b> atrix <b>P</b> rotein 1, dentinový matrixový protein 1
E	<b>E</b> mbryonální den
EO	<b>E</b> namel <b>O</b> rgan, sklovinný orgán
ERM	<b>E</b> pithelial <b>R</b> ests of <b>M</b> alassez, Malassezovy epitelové zbytky
FADD	<b>F</b> as- <b>A</b> sociated protein with <b>D</b> eath <b>D</b> omain, Fas-asociovaná doména smrti
FGF	<b>F</b> ibroblast <b>G</b> rowth <b>F</b> actor, fibroblastový růstový faktor
FGFR	<b>F</b> ibroblast <b>G</b> rowth <b>F</b> actor <b>R</b> eceptor, receptor fibroblastového růstového faktoru
HERS	<b>H</b> ertwig's <b>E</b> pithelial <b>R</b> oot <b>S</b> heet, Hertwigova epitelová kořenová pochva
IHH	<b>I</b> ndian <b>H</b> edgehog
IAP	<b>I</b> nhibitor of <b>A</b> poptosis <b>P</b> roteins, inhibitory apoptotických proteinů
ICAD	<b>I</b> nhibitor of <b>C</b> aspase <b>A</b> ctivated <b>D</b> Nase, inhibitor kaspázou aktivované DNázy

IEE	<b>I</b> nner <b>E</b> namel <b>E</b> pithelium, vnitřní sklovinný epitel
IHC	<b>I</b> mmunohistochemistry, imunohistochemie
La	<b>L</b> abialní
Li	<b>L</b> inguální
M1	První myši mandibulární <b>m</b> olár
MMP	<b>M</b> atrix <b>M</b> etaloproteinase, matrixová metaloproteináza
NLS	<b>N</b> uclear <b>L</b> ocalisation <b>S</b> equence, jaderná lokalizační sekvence
OEE	<b>O</b> uter <b>E</b> namel <b>E</b> pithelium, vnější sklovinný epitel
OPG	<b>O</b> steoprotegrin
P	<b>P</b> ostnatální den
PARP	<b>P</b> oly (ADP-Ribose) <b>P</b> olymerase, poly-(ADP-ribóza)-polymeráza
PBS	<b>P</b> hospate <b>B</b> uffer <b>S</b> aline, fosfátový pufr
PDL	<b>P</b> eriodontal ligament, periodontální ligamentum
PEK	<b>P</b> rimary <b>E</b> namel <b>K</b> not, primární sklovinný uzel
PTHrP	<b>P</b> arathyroid <b>H</b> ormone-related <b>P</b> rotein, parathormonu příbuzný protein
RANK	<b>R</b> eceptor <b>A</b> ctivator of <b>N</b> uclear <b>F</b> actor $\kappa$ <b>B</b> , receptor pro jaderný aktivátor faktoru $\kappa$ B
RANKL	<b>R</b> eceptor <b>A</b> ctivator of <b>N</b> uclear <b>F</b> actor $\kappa$ <b>B</b> <b>L</b> igand, ligand receptoru pro jaderný aktivátor faktoru $\kappa$ B
RT	<b>R</b> oom <b>T</b> emperature, laboratorní teplota
SEK	<b>S</b> econdary <b>E</b> namel <b>K</b> not, sekundární sklovinné uzly
SHH	<b>S</b> onic <b>H</b> edgehog
SI	<i>Stratum Intermedium</i>
SMAC	<b>S</b> econd <b>M</b> itochondria-derived <b>A</b> ctivator of <b>C</b> aspases“, druhý mitochondriální aktivátor kaspáz
SR	<b>S</b> tellate <b>R</b> eticulum, hvězdčovitě retikulum
SSCs	<b>S</b> omatic <b>S</b> tem <b>C</b> ells, somatické kmenové buňky
TA	<b>T</b> ransit <b>A</b> mplifying, přechodné dělicí se (buňky)
Tb.Sp	<b>T</b> rabecular <b>S</b> eparation, separace trámců
Tb.Th	<b>T</b> rabecular <b>T</b> hickness, tloušťka trámců
TdT	<b>T</b> erminal deoxynucleotidyl <b>T</b> ransferase, terminální deoxyribonukleotidyl transferáza
TEK	<b>T</b> ertiary <b>E</b> namel <b>K</b> not, terciární sklovinné uzly
TGF $\beta$	<b>T</b> ransforming <b>G</b> rowth <b>F</b> actor $\beta$ , transformující růstový faktor $\beta$

TUNEL	<b>T</b> dT-mediated dUTP-biotin <b>N</b> ick <b>E</b> nd- <b>L</b> abeling“, enzymatické značení fragmentů DNA
TV	<b>T</b> issue <b>V</b> olume, objem tkáně
VEGF	<b>V</b> ascular <b>E</b> ndothelial <b>G</b> rowth <b>F</b> actor, vaskulární endotelový růstový faktor
Wt	<b>W</b> ild <b>t</b> ype, standardní typ

Pozn. Použité zkratky genů byly převzaty z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

## 8. Reference

- Abraham MC, Shaham S. 2004. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol.* 14(4):184-193.
- Abzhanov A, Rodda SJ, McMahon AP, Tabin CJ. 2007. Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Development.* 134(17):3133-3144.
- Addison WHF, Appleton JL. 1921. On the development of the ameloblasts of the albino rat, with special references to the enamel-free area. *Anat Rec.* 21:43-45.
- Aghaloo TL, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Kang B, Franco R, Dry SM, Atti E, Tetradis S. 2010. Osteogenic potential of mandibular vs. long-bone marrow stromal cells. *J Dent Res.* 89(11):1293-1298.
- Aioub M, Lezot F, Molla M, Castaneda B, Robert B, Goubin G, Nefussi JR, Berdal A. 2007. Msx2 *-/-* transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis. *Bone.* 41(5):851-859.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 16(21):2813-2828.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87(2):171.
- Alfaqueh SA, Gaete M, Tucker AS. 2013. Interactions of the tooth and bone during development. *J Dent Res.* 92(12):1129-1135.
- Andreasen JO, Paulsen HU, Yu Z, Bayer T. 1990. A long-term study of 370 autotransplanted premolars. Part IV. Root development subsequent to transplantation. *Eur J Orthod.* 12(1):38-50.
- Baratella L, Arana-Chavez VE, Katchburian E. 1999. Apoptosis in the early involuting stellate reticulum of rat molar tooth germs. *Anat Embryol (Berl).* 200(1):49-54.
- Begue-Kirn C, Smith AJ, Loriot M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. 1994. Comparative analysis of TGFβs, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and *in vitro*-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 38(3):405-420.
- Behonick DJ, Xing Z, Lieu S, Buckley JM, Lotz JC, Marcucio RS, Werb Z, Mclau T, Colnot C. 2007. Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration. *PLoS One.* 2(11):e1150.
- Bei M, Kratochwil K, Maas, RL. 2000. BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of Msx1 in tooth development. *Development.* 127(21):4711-4718.
- Bendall AJ, Abate-Shen C. 2000. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene.* 247(1-2):17-31.
- Benjamin M, Hillen B. 2003. Mechanical influences on cells, tissues and organs – „Mechanical morphogenesis“. *Eur J Morphol.* 41(1):3–7.
- Bernick S, Patek PQ. 1969. Postnatal development of the rat mandible. *J Dent Res.* 48(6):1258-1263.

- Bhaskar SN, Weinmann JP, Schour I. 1953. Role of Meckel's cartilage in the development and growth of the rat mandible. *J Dent Res.* 32(3):398-410.
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 22(1):85-89.
- Borner C, Monney L. 1999. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ.* 6(6):497-507.
- Bosshardt DD, Nanci A. 2004. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol.* 31(3):184-192.
- Bosshardt DD, Schroeder HE. 1996. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec.* 245(2):267-292.
- Boucher D, Blais V, Denault JB. 2012. Caspase-7 uses an exosite to promote poly(ADP ribose) polymerase 1 proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(15):5669-5674.
- Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. 2013. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol.* 14:32.
- Bronckers AL, Lyaruu DM, Goei W, Litz M, Luo G, Karsenty G, Wöltgens JH, D'Souza RN. 1996. Nuclear DNA fragmentation during postnatal tooth development of mouse and hamster and during dentin repair in the rat. *Eur J Oral Sci.* 104(2(Pt 1)):102-111.
- Bronckers AL, Goei SW, Dumont E, Lyaruu DM, Woltgens JH, van Heerde WL, Reutelingsperger CP, van den Eijnde SM. 2000. In situ detection of apoptosis in dental and periodontal tissues of the adult mouse using annexin-V-biotin. *Histochem Cell Biol.* 113(4):293-301.
- Caton J, Tucker AS. 2009. Current knowledge of tooth development: patterning and mineralization of the murine dentition. *J Anat.* 214(4):502-515.
- Cerri PS, Freymuller E, Katchburian E. 2000. Apoptosis in the early developing periodontium of rat molars. *Anat Rec.* 258(2):136-144.
- Cerri PS, Katchburian E. 2005. Apoptosis in the epithelial cells of the rests of Malassez in the periodontium of rat molars. *J Periodontal Res.* 40(5):365-372.
- Clarke B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* Suppl 3:S131-9.
- Clarkin CE, Gerstenfeld LC. 2013. VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication? *Cell Biochem Funct.* 31(1):1-11.
- Cohn SA. 1957. Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am J Anat.* 101(2):295-319.
- Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikel Y, Ruch JV. 1999. Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int J Dev Biol.* 43(3):261-267.
- Coin R, Schmitt R, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV. 2000a. Regeneration of halved embryonic lower first mouse molars: correlation with the distribution pattern of non dividing IDE cells, the putative organizers of morphogenetic units, the cusps. *Int J Dev Biol.* 44(3):289-295.

- Coin R, Kieffer S, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV. 2000b. Inhibition of apoptosis in the primary enamel knot does not affect specific tooth crown morphogenesis in the mouse. *Int J Dev Biol.* 44(4):389-396.
- Colnot C, Lu C, Hu D, Helms JA. 2004. Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev Biol.* 269(1):55-69.
- Crawford ED, Wells JA. 2011. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem.* 80:1055-1087.
- Demon D, Van Damme P, Vanden Berghe T, Vandekerckhove J, Declercq W, Gevaert K, Vandenaabeele P. 2009. Caspase substrates: easily caught in deep waters? *Trends Biotechnol.* 27(12):680-688.
- Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. 1995. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell.* 82(4):675-684.
- Depew MJ, Lufkin T, Rubenstein JL. 2002. Specification of jaw subdivisions by Dlx genes. *Science.* 298(5592):381-385.
- De Spiegelaere W, Cornillie P, Casteleyn C, Burvenich C, Van den Broeck W. 2010. Detection of hypoxia inducible factors and angiogenic growth factors during foetal endochondral and intramembranous ossification. *Anat Histol Embryol.* 39(4):376-384.
- Diekwisch TG. 2002. Pathways and fate of migratory cells during late tooth organogenesis. *Connect Tissue Res.* 43(2-3):245-256.
- Diep L, Matalova E, Mitsiadis TA, Tucker AS. 2009. Contribution of the tooth bud mesenchyme to alveolar bone. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 312B(5):510-517.
- Dixon AD. 1997. Prenatal development of the facial skeleton. In: Dixon, A.D., Hoyete, D.A.N., Rönning, O. (Eds.), *Fundamentals of Craniofacial Growth*. CRC Press LLC.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.* 356(6366):215-221.
- Dougall WC, Gladdum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometski ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. 1999. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 13(18):2412-2424.
- Doseff AI. 2004. Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells Dev.* 13(5):473-483.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. 1997. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 89(5):747-754.
- Duprez L, Takahashi N, Van Hauwermeiren F, Vandendriessche B, Goossens V, Vanden Berghe T, Declercq W, Libert C, Cauwels A, Vandenaabeele P. 2011. RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity.* 35(6):908-918.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68:383-424.

- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 391(6662):43-50.
- Faleiro L, Lazebnik Y. 2000. Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol*. 151(5):951-959.
- Faragher AJ, Sun XM, Butterworth M, Harper N, Mulheran M, Ruchaud S Earnshaw WC, Cohen GM. 2007. Death receptor-induced apoptosis reveals a novel interplay between the chromosomal passenger complex and CENP-C during interphase. *Mol Biol Cell*. 18(4):1337-1347.
- Ferreira KS, Kreutz C, Macnelly S, Neubert K, Haber A, Bogyo M, Timmer J, Borner C. 2012. Caspase-3 feeds back on caspase-8, Bid and XIAP in type I Fas signaling in primary mouse hepatocytes. *Apoptosis*. 17(5):503-515.
- Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 10(1):76-100.
- Fleischmannova J, Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT. 2008. Mouse models of tooth abnormalities. *Eur J Oral Sci*. 116(1):1-10.
- Fleischmannova J, Matalova E, Sharpe PT, Misek I, Radlanski RJ. 2010. Formation of the tooth-bone interface. *J Dent Res*. 89(2):108-115.
- Fortini ME, Artavanis-Tsakonas S. 1993. Notch: neurogenesis is only part of the picture. *Cell*. 75(7):1245-1247.
- Frommer J, Margolies MR. 1971. Contribution of Meckel's cartilage to ossification of the mandible in mice. *J Dent Res*. 50:1260-1267.
- Fujita J, Crane AM, Souza MK, Dejosez M, Kyba M, Flavell RA, Thomson JA, Zwaka TP. 2008. Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2(6):595-601.
- Gaunt WA. 1966. The disposition of the developing cheek teeth in the albino mouse. *Acta Anat*. 64(4):572-585.
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*. 5(6):623-628.
- Gianni M, Studer M, Carpani G, Terao M, Garattini E. 1991. Retinoic acid induces liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *Biochem J*. 274(Pt 3):673-678.
- Golub EE, Battaglia KB. 2007. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin in Orthop*. 18:444-448
- Groeneveld EHJ, Burger EH. 2000. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*. 142(1):9-21.
- Hacker G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 301(1):5-17.
- Han C, Yang Z, Zhou W, Jin F, Song Y, Wang Y, Huo N, Chen L, Qian H, Hou R, Duan Y, Jin Y. 2010. Periapical follicle stem cell: a promising candidate for cementum/periodontal ligament regeneration and bio-root engineering. *Stem Cells Dev*. 19(9):1405-1415.

- Harada Y, Ishizeki K. 1998. Evidence for transformation of chondrocytes and site-specific resorption during the degradation of Meckel's cartilage. *Anat Embryol (Berl)*. 197(6):439-450.
- Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. 1999. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol*. 147(1):105-120.
- Harada H, Toyono T, Toyoshima K, Yamasaki M, Itoh N, Kato S, Sekine K, Ohuchi H. 2002. FGF10 maintenance stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development*. 129(6):1533-1541.
- Hellingman CA, Davidson EN, Koevoet W, Vitters EL, van den Berg WB, van Osch GJ, van der Kraan PM. 2011. Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: inhibition of Smad1/5/8P prevents terminal differentiation and calcification. *Tissue Eng Part A*. 17(7-8):1157-1167.
- Hotchkiss RS, Nicholson DW. 2006. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 6(11):813-822.
- Houde C, Banks KG, Coulombe N, Rasper D, Grimm E, Roy S, Simpson EM, Nicholson DW. 2004. Caspase-7 expanded function and intrinsic expression level underlies strain-specific brain phenotype of caspase-3-null mice. *J Neurosci*. 24(44):9977-9984.
- Hughes DE, Boyce BF. 1997. Apoptosis in bone physiology and disease. *Mol Pathol*. 50(3):132-137.
- Chandler JM, Cohen GM, MacFarlane M. 1998. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem*. 273(18):10815-10818.
- Chang JY, Wang C, Jin C, Yang C, Huang Y, Liu J, McKeehan WL, D'Souza RN, Wang F. 2013. Self-renewal and multilineage differentiation of mouse dental epithelial stem cells. *Stem Cell Res*. 11(3):990-1002.
- Chen Z, Naito M, Mashima T, Tsuruo T. 1996. Activation of actin cleavable interleukin 1beta-converting enzyme (ICE) family protease CPP-32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*. 56(22):5224-5229.
- Chen G, Deng C, Li YP. 2012. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*. 8(2):272-288.
- Cho MI, Garant PR. 2000. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000*. 24:9-27.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. 2008. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 151(1):10-27.
- Chung UI, Kawaguchi H, Takato T. 2004. Nakamura K. Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. *J Orthop Sci*. 9(4):410-414.
- Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, Lopez-Otin C, Krane SM. 2004. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(49):17192-17197.
- Ingber DE. 2005. Mechanical control of tissue growth: function follows form. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(33):11571-11572.



- Ishizeki K, Hiraki Y, Kubo M, Nawa T. 1997. Sequential synthesis of cartilage and bone marker proteins during transdifferentiation of mouse Meckel's cartilage chondrocytes *in vitro*. *Int J Dev Biol*. 41:83–89.
- Jacques J, Hotton D, De la Dure-Molla M, Petit S, Asselin A, Kulkarni AB, Gibson CW, Brookes SJ, Berdal A3, Isaac J. 2014. Tracking endogenous amelogenin and ameloblastin *in vivo*. *PLoS One*. 9(6):e99626.
- Jain A, Karadag A, Fohr B, Fisher LW, Fedarko NS. 2002. Three SIBLINGs (small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins) enhance factor H's cofactor activity enabling MCP-like cellular evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem*. 277(16):13700-13708.
- Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I. 1994. Evidence for the role of the enamel knot as a control centre in mammalian tooth cusp formation: non dividing cells express growth factor Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol*. 38(3):463-469.
- Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keranen S, Thesleff I. 1998. The life history of an embryonic signalling center: BMP-4 induces p-21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development*. 125(2):161-169.
- Jernvall J, Thesleff I. 2000. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*. 92(1):19–29.
- Jin YH, Yoo KJ, Lee YH, Lee SK. 2000. Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *J Biol Chem*. 275(39):30256-30263.
- Kalibovic Govorko D, Becic T, Vukojevic K, Mardesic-Brakus S, Biocina-Lukenda D, Saraga-Babic M. 2010. Spatial and temporal distribution of Ki-67 proliferation marker, Bcl-2 and Bax proteins in the developing human tooth. *Arch Oral Biol*. 55(12):1007-1016.
- Kamada S, Kikkawa U, Tsujimoto Y, Hunter T. 2005. Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). *J Biol Chem*. 280(2):857-860.
- Karsenty G. 2001. Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 142(7):2731-2733.
- Kashima TG, Nishiyama T, Shimazu K, Shimazaki M, Kii I, Grigoriadis AE, Fukayama M, Kudo A. 2009. Periostin, a novel marker of intramembranous ossification, is expressed in fibrous dysplasia and in c-Fos-overexpressing bone lesions. *Hum Pathol*. 40(2):226-237.
- Katao Y, Shishido M, Inami K, Matsumoto N, Sawai H. 2014. An inhibitory role for caspase-3 at the late stage of RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264 cells and mouse bone marrow macrophages. *Cell Biol Int*. 38(6):723-728.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 53(17):3976-3985.
- Kaukua N, Shahidi MK, Konstantinidou C, Dyachuk V, Kaucka M, Furlan A, An Z, Wang L, Hultman I, Ahrlund-Richter L, Blom H, Brismar H, Lopes NA, Pachnis V, Suter U, Clevers H, Thesleff I, Sharpe P, Ernfors P, Fried K, Adameyko I. 2014. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature*. doi: 10.1038/nature13536.

- Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE. 1996. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(5):2234–2238.
- Keinan D, Cohen RE. 2013. The significance of epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament. *J Endod*. 39(5):582-587.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie A. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26(24):239-257.
- Keranen SV, Aberg T, Kettunen P, Thesleff I, Jernvall J. 1998. Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Dev Genes Evol*. 208(9):477-486.
- Kieffer S, Peterkova R, Vonesch JL, Ruch JV, Peterka M, Lesot H. 1999. Morphogenesis of the lower incisor in the mouse from the bud to early bell stage. *Int J Dev Biol*. 43(6):531-539.
- Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. 1999. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev*. 80(2):159-170.
- Kim JY, Cha YG, Cho SW, Kim EJ, Lee MJ, Lee JM, Cai J, Ohshima H, Jung HS. 2006. Inhibition of apoptosis in early tooth development alters tooth shape and size. *J Dent Res*. 85(6):530-535.
- Kim JY, Cho SW, Hwang HJ, Lee MJ, Lee JM, Cai J, Choi SH, Kim CK, Jung HS. 2007. Evidence for expansion-based temporal BMP4/NOGGIN interactions in specifying periodontium morphogenesis. *Cell Tissue Res*. 330(1):123-132.
- Klein OD, Lyons DB, Balooch G, Marshall GW, Basson MA, Peterka M, Boran T, Peterkova, R, Martin GR. 2008. An FGF signaling loop sustains the generation of differentiated progeny from stem cells in mouse incisors. *Development*. 135(2):377-385.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 89(5):755-764.
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 397(6717):315-323.
- Kosher RA, Kulyk WM, Gay SW. 1986. Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J Cell Biol*. 102(4):1151–1156.
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie ZH, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. 1999. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(10):5752-5757.
- Kuang-Hsien Hu J, Mushegyan V, Klein OD. 2014. On the cutting edge of organ renewal: Identification, regulation, and evolution of incisor stem cells. *Genesis*. 52(2):79-92.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. 1996. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 384(6607):368-372.
- Kuroda S, Wazen R, Sellin K, Tanaka E, Moffatt P, Nanci A. 2011. Ameloblastin is not implicated in bone remodelling and repair. *Eur Cell Mater*. 22:56-66.

- Kyeyune-Nyombi E, Nicolas V, Strong DD, Farley J. 1995. Paradoxical effects of phosphate to directly regulate the level of skeletal alkaline phosphatase activity in human osteosarcoma (SaOS-2) cells and inversely regulate the level of skeletal alkaline phosphatase mRNA. *Calcif Tissue Int.* 56(2):154-159.
- Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA. 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science.* 2006311(5762):847-851.
- Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* 14(1):44-55.
- Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Juppner H, Segre GV, Kronenberg HM. 1996. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science.* 273(5275):663-666.
- Lazebnik YA, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. 1995. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(20):9042-9046.
- Leonard JR, Klocke BJ, D'Sa C, Flavell RA, Roth KA. 2002. Strain-dependent neurodevelopmental abnormalities in caspase-3-deficient mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61(8):673-677.
- Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Tureckova J, Peterkova R, Ruch JV. 1996. Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. II. Spatial distribution of mitoses and apoptoses in cap to bell staged first and second upper molar teeth. *Int J Dev Biol.* 40(5):1017-1031.
- Lesot H, Kieffer-Combeau S, Fausser JL, Meyer JM, Perrin-Schmitt F, Peterkova R, Peterka M, Ruch JV. 2002. Cell-cell and cell-matrix interactions during initial enamel organ histomorphogenesis in the mouse. *Connect Tissue Res.* 43(2-3):191-200.
- Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross R. 1998. Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell.* 1(4):553-563.
- Li L, Kwon HJ, Harada H, Ohshima H, Cho SW, Jung HS. 2011. Expression patterns of ABCG2, Bmi-1, Oct-3/4, and Yap in the developing mouse incisor. *Gene Expr Patterns.* 11(3-4):163-170.
- Luan X, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch TG. 2006. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev.* 15(4):595-608.
- Lungova V, Radlanski RJ, Tucker AS, Renz H, Misek I, Matalova E. 2011. Tooth-bone morphogenesis during postnatal stages of mouse first molar development. *J Anat.* 218(6):699-716.
- Luukko K, Loes S, Furmanek T, Fjeld K, Kvinnsland IH, Kettunen P. 2003. Identification of a novel putative signaling center, the tertiary enamel knot in the postnatal mouse molar tooth. *Mech Develop.* 120(3):270-276.
- Maas R, Bei M. 1997. The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 8(1):4-39.
- MacNeil RL, Somerman MJ. 1993. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodontal Res.* 28(6 Pt 2):550-559.

- Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D, Bouillon R, Carmeliet G. 2002. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev.* 111(1-2):61-73.
- Malinsky J. 1995. Histologie a embryologie orofacialní oblasti: Vývoj zubu. Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci.
- Mallein-Gerin F, Gouttenoire J. 2004. RNA extraction from cartilage. *Methods Mol Med.* 100:101-104.
- Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. 1998. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: Implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol.* 140(6):1485–1495.
- Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA, Rosen A. 2000. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol.* 149(3):603–612.
- Marie PJ. 2012. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: an update. *Gene.* 498(1):1-4.
- Marks SC, Cahill DR. 1986. Ultrastructure of alveolar bone during tooth eruption in the dog. *Am J Anat.* 177(3):427-438.
- Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT. 2004. Death in the life of a tooth. *J Dent Res.* 83(1):11-16.
- Matalova E, Antonarakis GS, Sharpe PT, Tucker AS. 2005a. Cell lineage of primary and secondary enamel knots. *Dev Dyn.* 233(3):754-759.
- Matalova E, Tucker AS, Misek I. 2005b. Apoptosis-related factors (Fas receptor, Fas ligand, FADD) in early tooth development of the field vole (*Microtus agrestis*). *Arch Oral Biol.* 50(2):165–169.
- Matalova E, Sharpe PT, Lakhani SA, Roth KA, Flavell RA, Setkova J, Misek I, Tucker AS. 2006. Molar tooth development in caspase-3 deficient mice. *Int J Dev Biol.* 50(5):491-497.
- Matalova E, Fleischmannova J, Sharpe PT, Tucker AS. 2008. Tooth agenesis: from molecular genetics to molecular dentistry. *J Dent Res.* 87(7):617-623.
- Mathiasen IS, Lademann U, Jaattela M. 1999. Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by Bcl-2 but does not involve known caspases or p53. *Cancer Res.* 59(19):4848-4856.
- Mathiasen IS, Sergeev IN, Bastholm L, Elling F, Norman AW, Jaattela M. 2002. Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 277(34):30738-30745.
- Meier P, Finch A, Evan G. 2000. Apoptosis in development. *Nature.* 407(6805):796-801.
- Mikkola ML. 2007. p63 in skin appendage development. *Cell Cycle.* 6(3):285-290.
- Miletich I, Sharpe PT. 2004. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 72(2):200-212.
- Miura M, Chen XD, Allen MR, Bi Y, Gronthos S, Seo BM, Lakhani S, Flavell RA, Feng XH, Robey PG, Young M, Shi S. 2004. A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 114(12):1704-1713.

- Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Kitaura H, Ohnishi H, Furuichi T, Kawai Y, Masuyama R, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T. 2011. Overexpression of Bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis. *PLoS One*. 6(11):e27487.
- Munoz Descalzo S, Rue P, Faunes F, Hayward P, Jakt LM, Balayo T, Garcia-Ojalvo J, Martinez Arias A. 2013. A competitive protein interaction network buffers Oct4-mediated differentiation to promote pluripotency in embryonic stem cells. *Mol Syst Biol*. 9:694.
- Murphy G, Docherty AJ. 1992. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 7(2):120-125.
- Musch T1, Oz Y, Lyko F, Breiling A. 2010. Nucleoside drugs induce cellular differentiation by caspase-dependent degradation of stem cell factors. *PLoS One*. 5(5):e10726.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 403(6765):98-103.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 108(1):17-29.
- Nakatsumi H, Yonehara S. 2010. Identification of functional regions defining different activity in caspase-3 and caspase-7 within cells. *J Biol Chem*. 285(33):25418-25425.
- Nishikawa S, Sasaki F. 1995. DNA localization in nuclear fragments of apoptotic ameloblasts using anti-DNA immunoelectron microscopy: programmed cell death of ameloblasts. *Histochem Cell Biol*. 104(2):151-159.
- Nishikawa S, Sasaki F. 1996. Apoptosis (programmed cell death) of transitional ameloblasts and MHC class II expression in rat incisors. *Kaibogaku Zasshi*. 71(6):597-603.
- Nishikawa S, Sasaki F. 1999. Apoptosis of dental pulp cells and their elimination by macrophages and MHC class II expressing dendritic cells. *J Histochem Cytochem*. 47(3):303-312.
- Niswander L. 2002. Interplay between the molecular signals that control vertebrate limb development. *Int J Dev Biol*. 46(7):877-881.
- Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. 2004. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal*. 16(3):291-299.
- Ohazama A, Courtney JM, Sharpe PT. 2004. Opg, Rank, and Rankl in tooth development: coordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res*. 83(3): 241-244.
- Olsen BR, Reginato AM, Wang W. 2000. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16:191-220.
- Ornitz DM. 2000. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays*. 22(2):108-112.
- Ornitz DM, Marie PJ. 2002. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev*. 16(12):1446-1465.

- Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM. 1996. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem.* 271(28):16443-16446.
- Park H, Jung YK, Park OJ, Lee YJ, Choi JY, Choi Y. 2005. Interaction of Fas ligand and Fas expressed on osteoclast precursors increases osteoclastogenesis. *J Immunol.* 175(11):7193-7201.
- Park JC, Herr Y, Kim HJ, Gronostajski RM, Cho MI. 2007. Nfic gene disruption inhibits differentiation of odontoblasts responsible for root formation and results in formation of short and abnormal roots in mice. *J Periodontol.* 78(9):1795–1802.
- Peterkova R, Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV. 1996. Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. I. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *Int J Dev Biol.* 40(5):1009-1016.
- Peterkova R, Peterka M, Viriot L, Lesot H. 2000. Dentition development and budding morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 20(4):158-172.
- Plikus MV, Zeichner-David M, Mayer JA, Reyna J, Bringas P, Thewissen JG, Snead ML, Chai Y, Chuong CM. 2005. Morphoregulation of teeth: modulating the number, size, shape and differentiation by tuning Bmp activity. *Evol Dev.* 7(5):440-57.
- Porter AG, Janicke RU. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6(2):99-104.
- Prochazka J, Pantalacci S, Churava S, Rothova M, Lambert A, Lesot H, Klein O, Peterka M, Laudet V, Peterkova R. 2010. Patterning by heritage in mouse molar row development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(35):15497-15502.
- Pycroft JM, Hann A, Moxham BJ. 2002. Apoptosis in the connective tissues of the periodontal ligament and gingivae of rat incisor and molar teeth at various stages of development. *Connect Tissue Res.* 43(2-3):265-279.
- Qiu M, Bulfone A, Martinez S, Meneses JJ, Shimamura K, Pedersen RA, Rubenstein JL. 1995. Null mutation of Dlx-2 results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain. *Genes Dev.* 9(20):2523-2538.
- Quin ZH, Wang Y, Kikly KK, Sapp E, Kegel KB, Aronin N, DiFiglia M. 2001. Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem.* 276(11):8079-8086.
- Radlanski RJ, Mocker E, Rahlfs D. 1998. Computer-aided graphical reconstructions of the development of murine dental primordia and surrounding structures from day 12 until birth. *Eur J Oral Sci.* 106 Suppl 1:71-79.
- Radlanski RJ, Renz H. 2006. Genes, forces, and forms: mechanical aspects of prenatal craniofacial development. *Dev Dyn.* 235(5):1219-1229.
- Ramaesh T, Bard JBL. 2003. The growth and morphogenesis of the early mouse mandible: a quantitative analysis. *J Anat.* 203(2):213–222.
- Rambaldi A, Terao M, Bettoni S, Bassan R, Battista R, Barbui T, Garattini. 1989. Differences in the expression of alkaline phosphatase mRNA in chronic myelogenous leukemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 73(5):1113-1115.

- Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. 2001. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(25):14250-14255.
- Riedl SJ, Shi Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(11):897-907.
- Roach HI, Erenpreisa J, Aigner T. 1995. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J Cell Biol*. 131(2):483-494.
- Samali A, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. 1998. Detection of procaspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues. *FEBS Lett*. 431(2):167-170.
- San Miguel SM, Goseki-Sone M, Sugiyama E, Watanabe H, Yanagishita M, Ishikawa I. 1999. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase mRNA expression and alkaline phosphatase activity following application of retinoic acid in cultured human dental pulp cells. *Arch Oral Biol*. 44(10):861-869.
- Satchell PG, Gutmann JL, Witherspoon DE. 2003. Apoptosis: an introduction for the endodontist. *Int Endod J*. 36(4):237-245.
- Satokata I, Maas R. 1994. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*. 6(4):348-356.
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*. 14(3):131-136.
- Seidel K, Ahn CP, Lyons D, Nee A, Ting K, Brownell I, Cao T, Carano RA, Curran T, Schober M, Fuchs E, Joyner A, Martin GR, de Sauvage FJ, Klein OD. 2010. Hedgehog signaling regulates the generation of ameloblast progenitors in the continuously growing mouse incisor. *Development*. 137(22):3753-3761.
- Setkova J, Matalova E, Sharpe PT, Misek I, Tucker A. 2007. Primary enamel knot cell death in Apaf-1 and caspase-9 deficient mice. *Arch Oral Biol*. 52(1):15-19.
- Sgorbissa A, Benetti R, Marzinotto S, Schneider C, Brancolini C. 1999. Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 *in vitro*: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *J Cell Sci*. 112 ( Pt 23):4475-4482.
- Shibata S, Suzuki S, Tengan T, Yamashita Y. 1995. A histochemical study of apoptosis in the reduced ameloblasts of erupting mouse molars. *Arch Oral Biol*. 40(7):677-680.
- Shibata S, Suzuki S, Tengan T, Ishii M, Kuroda T. 1996. A histological study of the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible using coronal sections. *Arch Oral Biol*. 41(1):47-54.
- Shigemura N, Kiyoshima T, Sakai T, Matsuo K, Momoi T, Yamaza H, Kobayashi I, Wada H, Akamine A, Sakai H. 2001. Localization of activated caspase-3-positive and apoptotic cells in the developing tooth germ of the mouse lower first molar. *Histochem J*. 33(5):253-258.
- Shimazu Y, Sato K, Aoyagi K. 2009. Hertwig's epithelial cells and multi-root development of molars in mice. *J Oral Biosci*. 51(4):210-217.
- Schmid TM, Linsenmayer TF. 1985. Developmental acquisition of type X collagen in the embryonic chick tibiotarsus. *Dev Biol*. 107(2):373-381.
- Schwerk C, Schulze-Osthoff K. 2003. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol*. 66(8):1453-1458.

- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 89(2):309-319.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 2001. Executioner caspase-3, -6 and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 276:7320–7326.
- Smith CE, Warshawsky H. 1977. Quantitative analysis of cell turnover in the enamel organ of the rat incisor. Evidence for ameloblast death immediately after enamel matrix secretion. *Anat Rec*. 187(1):63-98.
- Smith CE. 1998. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 9(2):128-161.
- Sodek J, McKee MD. 2000. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology 2000*. 24:99–126.
- Song Q, Wei T, Lees-Miller S, Alnemri E, Watters D and Lavin MF. 1997. Resistance of actin to cleavage during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(1):157–162.
- Spinella-Jaegle S, Rawadi G, Kawai S, Gallea S, Faucheu C, Mollat P, Courtois B, Bergaud B, Ramez V, Blanchet AM, Adelmant G, Baron R, Roman-Roman S. 2001. Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J Cell Sci*. 114(Pt 11):2085-2094.
- Steele-Perkins G, Butz KG, Lyons GE, Zeichner-David M, Kim HJ, Cho MI, Gronostajski RM. 2003. Essential role for NFI-C/CTF transcription replication factor in tooth root development. *Mol Cell Biol*. 23(3):1075–1084.
- Stennicke, HR, Salvesen, GS. 1999. Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ*. 6(11):1054-1059.
- Stennicke HR, Jurgenmeister JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green GR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. 1998. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem*. 273(42):27084-27090.
- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & Dev*. 13(16):2072–2086.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer, G. 1999. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med*. 189(2):381–394.
- Suttapreyasri S, Koontongkaew S, Phongdara A, Leggat U. 2006. Expression of bone morphogenetic proteins in normal human intramembranous and endochondral bones. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 35(5):444-452.
- Taher L, Collette NM, Muruges D, Maxwell E, Ovcharenko I, Loots GG. 2011. Global gene expression analysis of murine limb development. *PLoS One*. 6(12):e28358.
- Takamori K, Hosokawa R, Xu X, Deng X, Bringas P Jr, Chai Y. 2008. Epithelial fibroblast growth factor receptor 1 regulates enamel formation. *J Dent Res*. 87(3):238-43.



- Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW. 1997. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem.* 272(15):9677-9682.
- Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, Yamada Y, Constantini F, Wakisaka S, Pacific M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. 2005. Developmental regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem.* 280(19):19185-19195.
- Teixeira VH, Jacq L, Lasbleiz S, Hilliquin P, Oliveira CR, Cornelis F, Petit-Teixeira E; European Consortium on Rheumatoid Arthritis Families. 2008. Genetic and expression analysis of CASP7 gene in a European Caucasian population with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 35(10):1912-1918.
- Ten Cate AR, Mills C, Solomon G. 1971. The development of the periodontium. A transplantation and autoradiographic study. *Anat Rec.* 170(3):365-380.
- Ten Cate AR, Mills C. 1972. The development of the periodontium: the origin of the alveolar bone. *Anat Rec.* 170(1):365-380.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. 1995. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 81(5):801-809.
- Thesleff I, Wang Xiu-Ping, Suomalainen M. 2007. Regulation of epithelial stem cells in tooth regeneration. *C R Biol.* 330(6-7):561-564.
- Thesleff I, Sharpe P. 1997. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 67(2):111-123.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem.* 272(29):17907-17911.
- Tichy F, Horky D, Kocianova I, Gorosova A. 2000. Cytologie a obecná histologie. Ediční středisko Veterinární a Farmaceutické Unverzity Brno.
- Timmer JC, Salvesen GS. 2007. Caspase substrates. *Cell Death Differ.* 14(1):66-72.
- Towers M, Tickle C. 2009. Growing models of vertebrate limb development. *Development.* 136(2):179-190.
- Tucker AS, Sharpe, PT. 1999. Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning, the right shape in the right place. *J Dent Res.* 78(4):826-834.
- Tucker A, Sharpe P. 2004. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet.* 5(7):499-508.
- Tureckova J, Lesot H, Vonesh JL, Peterka M, Peterkova R., Ruch JV. 1996. Apoptosis is involved in disappearance of the diastemal dental primordia in mouse embryo. *Int J Dev Biol.* 40(2):483-489.
- Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 150(3698):893-899.
- Vaahokari A, Aberg T, Jernvall J, Keranen S, Thesleff I. 1996a. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech Dev.* 54(1):39-43.

- Vahtokari A, Aberg T, Thesleff I. 1996b. Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development*. 122(1):121-129.
- Vermelin L, Lecolle S, Septier D, Lasfargues JJ, Goldberg M. 1996. Apoptosis in human and rat dental pulp. *Eur J Oral Sci*. 104(5-6):547-553.
- Wagner EF, Karsenty G. 2001. Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev*. 11(5):527-532.
- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD. 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme: A (p20/p10) 2 homodimer. *Cell*. 78(2):343-352.
- Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Luthi AU, Gerner C, Martin SJ. 2008. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(35):12815-12819.
- Wang EA. 1993. Bone morphogenetic proteins (BMPs): therapeutic potential in healing bony defects. *Trends In Biotechnology*. 11(9):379-383.
- Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I. 2004. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Dev Cell*. 7(5):719-730.
- Wang XP, Suomalainen M, Felszeghy S, Zelarayan LC, Alonso MT, Plikus MV, Maas RL, Chuong CM, Schimmang T, Thesleff I. 2007. An integrated gene regulatory network controls stem cell proliferation in teeth. *PLoS Biol*. 5(6):e159.
- Wazen RM, Moffatt P, Zalzal SF, Yamada Y, Nanci A. 2009. A mouse model expressing a truncated form of ameloblastin exhibits dental and junctional epithelium defects. *Matrix Biol*. 28(5):292-303.
- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA. 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Nature*. 370(6487):270-275
- Wise GE, King GJ. 2008. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 87(5):414-434.
- Wise GE, He H, Gutierrez DL, Ring S, Yao S. 2011. Requirement of alveolar bone formation for eruption of rat molars. *Eur J Oral Sci*. 119(5):333-338.
- Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR. 1999. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem*. 274(43):30651-30656.
- Wright E1, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P. 1995. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet*. 9(1):15-20.
- Wu J, Jin F, Tang L, Yu J, Xu L, Yang Z, Wu G, Duan Y, Jin Y. 2008. Dentin non-collagenous proteins (dNCPs) can stimulate dental follicle cells to differentiate into cementoblast lineages. *Biol Cell*. 100(5):291-202.
- Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, Ma ZF, Xu L, Wu JJ, Sun YJ, Duan YZ, Lin Z, Jin, Y. 2009. Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues. *J Periodontal Res*. 44(2):199-210.

- Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie AB. 2012. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci.* 4(2):64-68.
- Yoon BS, Lyons KM. 2004. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem.* 193(1):93-103.
- Yoshioka C, Muraki Y, Fukuda J, Haneji T, Kobayashi N. 1996. Identification of the Fas antigen in human gingiva. *J Dent Res.* 75(6):1353-1357.
- Zhang Z, Song Y, Zhang X, Tang J, Chen J, Chen Y. 2003. Msx1/Bmp4 genetic pathway regulates mammalian alveolar bone formation via induction of Dlx5 and Cbfa1. *Mech Dev.* 120(12):1469-1479.
- Zhang W, Ju J, Gronowicz G. 2010. Odontoblast-targeted Bcl-2 overexpression impairs dentin formation. *J Cell Biochem.* 111(2):425-432.
- Zhang R, Yang G, Wu X, Xie J, Yang X, Li T. 2013. Disruption of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in odontoblasts and cementoblasts arrests tooth root development in postnatal mouse teeth. *Int J Biol Sci.* 9(3):228-236.
- Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, De Crombrughe B. 1997. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn.* 209(4):377-386.
- Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A, Somerman M. 2002. Bone Morphogenetic Protein 2 Induces Dental Follicle Cells to Differentiate Toward a Cementoblast/Osteoblast Phenotype. *JBMR.* 17(8):1441-1451.
- Zhao M, Berry JE, Somerman MJ. 2003. Bone morphogenetic protein-2 inhibits differentiation and mineralization of cementoblasts *in vitro*. *J Dent Res.* 82(1):23-27.
- Zhao H, Feng J, Seidel K, Shi S, Klein O, Sharpe P, Chai Y. 2014. Secretion of shh by a neurovascular bundle niche supports mesenchymal stem cell homeostasis in the adult mouse incisor. *Cell Stem Cell.* 14(2):160-173.
- Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. 1999. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ.* 6(7):644-651.
- Zimmermann KC, Green DR. 2001. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 108(4 Suppl):99-103.

## 9. Přílohy

### 9.1. Seznam obrázků

- Obr. 1: Srovnání myši a lidské dentice.
- Obr. 2: Vývoj moláru (frontální řez).
- Obr. 3: Niche kmenových buněk myších řezáků (sagitální řez).
- Obr. 4: Vývoj řezáku (sagitální řez).
- Obr. 5: Vývoj mandibulární kosti.
- Obr. 6: Vývoj dlouhých kostí končetiny.
- Obr. 7: Schématické znázornění apoptotického procesu.
- Obr. 8: Struktura pro/kaspázy-7 a dalších významných prokaspáz účastnících se apoptózy.
- Obr. 9: Znázornění míst substrátů, ve kterých dochází ke štěpení kaspázami.
- Obr. 10: Schématické znázornění principu IHC.
- Obr. 11: Schématické znázornění principu metody TUNEL.
- Obr. 12: Schématické znázornění principu metody microCT.
- Obr. 13: Separace mandibulární kosti určené pro izolaci RNA.
- Obr. 14: Aktivace kaspázy-7 během vývoje moláru.
- Obr. 15: Aktivace kaspázy-7 během vývoje řezáku.
- Obr. 16: Korelace aktivované kaspázy-7 a distribuce apoptózy v zubních tkáních.
- Obr. 17: Analýza embryonálních (E15,5) a postnatálních (P28) Casp7<sup>-/-</sup> molárů.
- Obr. 18: Analýza postnatálních (P28) Casp7<sup>-/-</sup> řezáků.
- Obr. 19: Aktivace kaspázy-7 během intramembranózní osifikace.
- Obr. 20: Aktivace kaspázy-7 během endochondrální osifikace.
- Obr. 21: Aktivace kaspázy-7 vs. distribuce apoptotických buněk během intramembranózní osifikace.
- Obr. 22: Aktivace kaspázy-7 vs. distribuce apoptotických buněk během endochondrální osifikace.
- Obr. 23: Analýza mandibulární kosti Casp7<sup>-/-</sup> jedinců v embryonálním vývoji (E15,5).
- Obr. 24: Charakterizace mandibulární/alveolární kosti Casp7<sup>-/-</sup> jedinců v postnatálním vývoji (P28).
- Obr. 25: Charakterizace kosti stehenní Casp7<sup>-/-</sup> jedinců v postnatálním vývoji (P28).
- Obr. 26: Změny v genové expresi osteogenních faktorů u Casp7<sup>-/-</sup> jedinců ve stádiu E15,5 detekované pomocí PCR Array.
- Obr. 27: Aktivace kaspázy-7 a kaspázy-3.

## **9.2. Publikace autorky k tématu disertační práce v časopisech s impakt faktorem**

### **Publikace 1**

Matalova E, **Svandova E**, Tucker AS. 2012. Apoptotic signaling in mouse odontogenesis. *OMICS*. 16(1-2):60-70.

### **Publikace 2**

Matalova E, Vanden Berghe T, **Svandova E**, Vandenabeele P, Healy C, Sharpe PT, Tucker AS. 2012. Caspase-7 in molar tooth development. *Arch Oral Biol*. 57(11):1474-1481.

### **Publikace 3**

Matalova E, Lesot H, **Svandova E**, Vanden Berghe T, Sharpe PT, Healy C, Vandenabeele P, Tucker AS. 2013. Caspase-7 participates in differentiation of cells forming dental hard tissues. *Dev Growth Differ*. 55(5):615-621.

### **Publikace 4**

**Svandova E**, Lesot H, Vanden Berghe T, Tucker AS, Sharpe PT, Vandenabeele P, Matalova E. 2014. Non-apoptotic functions of caspase-7 during osteogenesis. *Cell Death Dis*. 5:e1366.

### **Publikace 5**

Liskova M, Kleparnik K, Matalova E, Hegrova J, Prikryl J, **Svandova E**, Foret F. 2013. Bioluminescence determination of active caspase-3 in single apoptotic cells. *Electrophoresis*. 34(12):1772-1777.

## **9.3. Abstrakta k tématu disertační práce v časopisech s impakt faktorem**

Matalova E, Tucker, AS, **Svandova E**, Vanden Berghe T, Sharpe PT. 2011. Caspase-7 and dental apoptosis. *Phys Res*. 60: 35.

#### **9.4. Abstrakta k tématu disertační práce ve sbornících**

**Svandova E**, Lesot H, Vanden Berghe T, Tucker AS, Matalova E. 2014. MicroCT analysis of caspase-7 deficient mice revealed impaired osteogenesis. Bone Abstracts 3: PP54, DOI:10.1530/boneabs.3.PP54.

**Svandova E**, Janeckova E, Vanden Berghe T, Radlanski RJ, Matalova E. 2014. Caspase-7 participates in osteogenic molecular networks. Bone Abstracts 3: PP53, DOI:10.1530/boneabs.3.PP53.

**Svandova E**, Tucker AS, Sharpe PT, Lesot H, Vanden Berghe T, Matalova E. 2013. Caspase-7 in odontogenesis. 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation. Plenary poster sessions abstrakt program: PC5.

Kleparnik K, Chlastakova I, Liskova M, **Svandova E**, Dubska L, Buchtova M, Misek I, Matalova E. 2011. Quantification of caspase-3 activity: a step towards single-cell analysis at femtogram level. EMBO Molecular medicine, EMBL. Abstract book: 58.

#### **9.5. Přednášky k tématu disertační práce**

**Svandova E**, Matalova E. 2012. Physiological functions of caspase-7 in hard tissues Konference mladých vědeckých pracovníků, Brno (Česká republika), 31. 5. 2012.

**Svandova E**. 2014. Kaspázy nejen smrtící. Mendel Forum, Brno (Česká republika), 13.-15. 5. 2014).

#### **9.6. Postery k tématu disertační práce**

**Svandova E**, Lesot H, Vanden Berghe T, Tucker AS, Matalova E. MicroCT analysis of caspase-7 deficient mice revealed impaired osteogenesis. European Calcified Tissue Society, Praha (Česká republika), 17.-20. 5. 2014.

**Svandova E**, Tucker AS, Sharpe PT, Lesot H, Vanden Berghe T, Matalova E. Caspase-7 in odontogenesis. 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, La Londe (France), 26.-31. 5. 2013.

Kleparnik K, Chlastakova I, Liskova M, **Svandova E**, Dubska L, Buchtova M, Misek I, Matalova E. Quantification of caspase-3 activity: a step towards single-cell analysis at femtogram level. EMBO Molecular medicine, Heidelberg (Germany), 1-3. 12. 2011.

## **Apoptotic signaling in mouse odontogenesis**

Matalova E, Svandova E, Tucker AS

Apoptosis is an important morphogenetic event in embryogenesis as well as during postnatal life. In the last two decades, apoptosis in tooth development (odontogenesis) has been investigated with gradually increasing focus on the mechanisms and signaling pathways involved. The molecular machinery responsible for apoptosis exhibits a high degree of conservation but also organ and tissue specific patterns. This review aims to discuss recent knowledge about apoptotic signaling networks during odontogenesis, concentrating on the mouse, which is often used as a model organism for human dentistry. Apoptosis accompanies the entire development of the tooth and corresponding remodeling of the surrounding bony tissue. It is most evident in its role in the elimination of signaling centers within developing teeth, removal of vestigial tooth germs, and in odontoblast and ameloblast organization during tooth mineralization. Dental apoptosis is caspase dependent and proceeds via mitochondrial mediated cell death with possible amplification by Fas-FasL signaling modulated by Bcl-2 family members.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3275810/>



## **Caspase-7 in molar tooth development**

Matalova E, Vanden Berghe T, Svandova E, Vandenabeele P, Healy C, Sharpe PT,  
Tucker AS

The primary enamel knot (PEK) is a population of cells that shows spatio-temporal restricted apoptosis during tooth development. It has been shown that caspase-9 and Apaf-1 are essential for apoptosis in the PEK as well as the central caspase-3. Caspase-7, as another executioner member in the caspase machinery, is considered to have caspase-3 like properties. The aim of this study was to detect caspase-7 activation during molar tooth development with a special focus on the cells of the PEK and to correlate the expression with the pattern of apoptosis and caspase-3 activation. Apoptosis in the PEK was investigated in caspase-7 deficient mice to examine the functional consequence of loss of this specific caspase. In addition, odontoblasts and ameloblasts, which are known to undergo cell death during their secretory and maturation stages, were investigated. Cleaved caspase-7 was found in the apoptotic region of the PEK, however, caspase-7-deficient mice still possessed apoptotic cells in the PEK in a similar distribution to the wild type. Caspase-7 is therefore not essential for apoptosis in the PEK. Notably, cleaved caspase-7-positive cells were found at later stages in odontoblasts and ameloblasts, but expression did not correlate with apoptosis in these tissues. The results indicate a non-essential apoptotic role of caspase-7 in the PEK apoptosis but suggest also possible non-apoptotic functions for caspase-7 in tooth development.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996912002166>

## **Caspase-7 participates in differentiation of cells forming dental hard tissues**

Matalova E, Lesot H, Svandova E, Vanden Berghe T, Sharpe PT, Healy C, Vandenabeele P, Tucker AS

Apoptosis during tooth development appears dependent on the apoptotic executioner caspase-3, but not caspase-7. Instead, activated caspase-7 has been found in differentiated odontoblasts and ameloblasts, where it does not correlate with apoptosis. To further investigate these findings, the mouse incisor was used as a model. Analysis of caspase-7-deficient mice revealed a significant thinner layer of hard tissue in the adult incisor. Micro computed tomography scan confirmed this decrease in mineralized tissues. These data strongly suggest that caspase-7 might be directly involved in functional cell differentiation and regulation of the mineralization of dental matrices.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dgd.12066/abstract;jsessionid=0A3471E1C3523BF8ED66867D45E98F66.f02t04>

## **Non-apoptotic functions of caspase-7 during osteogenesis**

Svandova E, Lesot H, Vanden Berghe T, Tucker AS, Sharpe PT, Vandenabeele P, Matalova E

Caspase-3 and -7 are generally known for their central role in the execution of apoptosis. However, their function is not limited to apoptosis and under specific conditions activation has been linked to proliferation or differentiation of specialised cell types. In the present study, we followed the localisation of the activated form of caspase-7 during intramembranous (alveolar and mandibular bones) and endochondral (long bones of limbs) ossification in mice. In both bone types, the activated form of caspase-7 was detected from the beginning of ossification during embryonic development and persisted postnatally. The bone status was investigated by microCT in both wild-type and caspase-7-deficient adult mice. Intramembranous bone in mutant mice displayed a statistically significant decrease in volume while the mineral density was not altered. Conversely, endochondral bone showed constant volume but a significant decrease in mineral density in caspase-7 knock-out mice. Cleaved caspase-7 was present in a number of cells that did not show signs of apoptosis. PCR array analysis of the mandibular bone of caspase-7-deficient versus wild-type mice pointed to a significant decrease in mRNA levels for *Msx1* and *Smad1* in early bone formation. These observations might explain the decrease in the alveolar bone volume of adult knock-out mice. In conclusion, this study is the first to report a non-apoptotic function of caspase-7 in osteogenesis and also demonstrates further specificities in endochondral versus intramembranous ossification.

<http://www.nature.com/cddis/journal/v5/n8/full/cddis2014330a.html>

## **Bioluminescence determination of active caspase-3 in single apoptotic cells**

Liskova M, Kleparnik K, Matalova E, Hegrova J, Prikryl J, Svandova E, Foret F

Caspase-3 is an executive caspase, in the central position within apoptotic machinery. Apoptosis as a way of programmed cell death is a physiological process that plays an essential role in the development and homeostasis maintenance; moreover, its deregulations are linked to tumor progression or various autoimmune disorders. Therefore, an investigation of apoptosis pathways on the level of individual cells is not only of biological but also medical importance. In this work we report on the development of a high-sensitivity instrumentation and protocol for detection of active caspase-3 in individual mammalian apoptotic cells. The technology is based on the specific cleavage of modified luciferin by caspase-3, an immediate bioluminescence reaction of free luciferin with luciferase followed by emissions of photons and their detection by photomultiplier tube working in the photon counting regime. Three different instrumental arrangements are compared for the determination of caspase-3 in free cells or tissue samples. Thus, in our best miniaturized system the mean amount as low as about 6.5 fg corresponding to 122 000 molecules of caspase-3 can be detected in individual apoptotic mouse leg cells.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201200675/abstract>