

En fallstudie om hur ett svalg utvecklas

Lovisa Wretman

Populärvetenskaplig sammanfattning av Självständigt arbete i biologi VT 2010
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala Universitet

I över 150 år har embryologer och utvecklingsbiologer försökt förstå hur ett befruktat ägg utvecklas till en vuxen och fungerande individ. Men det är inte förrän idag som man har de tekniska verktygen för att undersöka hur generna samspelar för att en fullt komplett individ skall utvecklas. Alltsedan man upptäckte att DNA bär på ritningen för hur hela organismen skall se ut har forskarna försökt ta reda på hur den molekylära informationen i DNA:t överförs till de strukturer vi ser med våra ögon. Gentekniken utvecklas med en rasande fart och under 1990-talet togs en rad olika tekniker fram för att undersöka genernas funktion på makroskopisk nivå. Idag är det möjligt att ta reda på vilka gener som styr utvecklingen av en specifik struktur. Hyoidbågen är en struktur som förekommer hos alla ryggradsdjur, men ser olik ut i olika djurgrupper. Vad som gör att den ser ut på olika sätt inom olika grupper förbryllar forskarna. Moderna metoder gör det dock möjligt att undersöka detta och på så vis avslöja något om en struktur som spelat en stor roll i vertebraternas framgång och som också säger något om vårt eget ursprung.

Budskapet från gener till anatomi förmedlas via cellerna

Utvecklingsbiologi är alltså den vetenskapliga disciplin som studerar hur en organism utvecklas och växer från befruktningens ögonblick till dess att den vuxna individen tagit form. Den vuxna individen har ett fullt integrerat och komplext system av vävnader och organ. Utvecklingsbiologin delas in i tre fält. Den första är celltillväxt, vilken behandlar hur cellen utvecklas och delar sig. Den andra är celldifferentiering och med detta menas hur olika specialiserade celltyper uppstår. Den tredje kallas morfogenes och bygger på de två förstnämnda och inbegriper hur vävnadstyper, organ och anatomi utvecklas. Under 1800-talets andra hälft lades grunderna för embryologin som då var en deskriptiv vetenskap som byggdes på studiet av mikroskopbilder och histologiska snitt. Med hjälp av 1900-talets landvinningar inom genetik har man börjat förstå de genetiska mekanismer som styr utvecklingsprocessen från befruktat ägg till vuxen individ.

Svalget är unikt för ryggradsdjur

En struktur som enbart innehas av vertebrater är svalget, vilket inbegriper munhåla samt hals- och nackregionen. Det byggs upp av brosk, skelett, muskler och nerver samt några organ som körtlar. Hos olika ryggradsdjur har svalgets olika ben och muskler olika form och funktion. Gemensamma för alla vertebrater är benelementen i svalget som utgörs av en rad bågar som alla har samma grundläggande utformning. Den första svalgbågen utgörs hos alla vertebrater av under- och överkäke. Den andra svalgbågen utgörs också av samma struktur hos alla vertebrater, nämligen en stödjande struktur till käkarna som kallas hyoidbågen. Bakom dessa ligger fem ytterligare svalgbågar i hals- och nackregion. Dessa innehar olika utformning och funktion hos olika ryggradsdjursgrupper. Hos fiskar stödjer de gälarna och kallas därför gälbågar medan de hos amfibier, kräldjur, fåglar och däggdjur har reducerats till olika stödjande element i hals och nacke.

En struktur i svalget, vars embryologiska utveckling och genetik man vet mindre om än andra, är den andra svalgbågen, också kallad hyoidbågen. Hos människan byggs den upp av tinningbenet, som sitter i tinningen och tungbenet, som sitter i halsen.

Hos nu levande vertebrater är de muskler och ben ofta mycket modifierade, det vill säga att de är annorlunda än hur ben och muskler såg ut hos förfäderna. Detta gör det svårt att spekulera i hur våra förfäder såg ut. Endast fossil kan säga oss hur våra förfäders skelett verkligen såg ut. Dessutom kan man sällan avgöra av utseendet på benen eller muskeln hos den vuxna individen och hur dessa strukturer såg ut hos embryot. För att få tillförlitlig information måste man kartlägga hur celler rör sig och ta reda på vilka gener som uttrycks i vilka populationer.

Alla ryggradsdjur som idag existerar har mycket långa evolutionära historier. Även om deras morfologi är olika, representerar de alla variationer av samma gemensamma grundläggande plan. Med andra ord är det samma sorts grupper av celler i ett fisk-, grod-, fågel- och däggdjursembryo som ger upphov till exempelvis hyoidbågen hos de alla. Detta trots att hyoidbågen antar olika former hos de tre olika grupperna.

Många benfiskar såsom laxfiskar och torskfiskar och alla andra vanliga benfiskar vi tänker på när vi hör ordet benfisk, har behållit vad som tros vara det primitiva mönstret av svalget för käkförsedda vertebrater. Det muskulära svalget utgörs av käkar och den stödjande hyoidbågen samt gälbågar. Svalgbågarna har tillsammans funktion i matintag och andning. Man tror alltså att alla ryggradsdjurs förfäder visade en liknande såg ut ungefär som benfiskar ser ut idag.

En specifik grupp celler styr utvecklingen av skallen

I princip har alla svalgets vävnader utvecklats ifrån en viss grupp av celler i det tidiga embryot. Denna grupp av celler kallas neurallistcellerna. Denna grupp av celler uppstår i det tidiga embryot i närheten av ryggraden. Neurallistcellerna vandrar nedåt mot strupen och intar olika lägen i svalget. Sedan följer differentiering av cellerna till olika vävnader och organ såsom kraniets ben, brosk, muskler och nerver.

Neurallistcellerna rör sig i grupper till olika områden; det främre ansiktet samt den första, andra respektive bakre bågar. Denna uppdelning orsakas av tre mekanismer: celler dör i vissa distinkta områden, barriärer mellan cellgrupper etableras och slutligen en utvecklas en förmåga till hophäftning mellan neurallistcellerna. Tidigare trodde man att det var neurallistcellernas ursprung som bestämde deras öde. Nu vet man att neurallistcellernas rörelse och segregering involverar samverkan mellan neuralröret och kringliggande vävnader med andra embryologiska ursprung

Ett antal pionjärarbeten har gjorts för att mönsterlägga neurallistcellerna och de genetiska kontroller som styr deras utveckling; dock har det bara gjorts större undersökningar på afrikansk klogroda, kyckling, mus och i ett mindre antal studier på zebrafisk och människa. Tekniker som används för att kartlägga en cellernas rörelse och interaktionen mellan de olika cellgrupperna är transplantation och infärgning, manipulation av gener på lokal nivå såsom gen-utslagning och nedreglering av en gen. Med transplantation menas att man ympar en bit vävnad eller några specifika celler till en annan plats i embryot och observerar hur de beter sig efteråt. Oftast sätts också en gen in som kodar för ett protein som ger en specifik färg. På så vis kan man se hur de cellerna som transplanteras rör sig. Genutslagning innebär att man slår ut en gen så att genen inte uttrycks och sedan observerar vad som förändras hos organismen.

Om en gen styr utvecklingen av en viss struktur kan en gen-utslagning leda till att hela denna struktur försvinner eller visar stora defekter av något slag. Med nedreglering menas att man manipulerar genen så att dess uttryck minskar och dess proteinprodukt produceras i mindre koncentration än normalt.

Neurallistcellernas rörelse har framförallt kartlagts hos mus och kyckling och i mindre utsträckning på zebrafisk och groda. Fiskarna står närmare vertebraternas gemensamme förfäder i många morfologiska avseenden. Det kan tyckas synd att det inte gjorts fler studier på just fiskarna på grund av de ur evolutionära perspektiv är mycket intressanta.

Bakhjärnan är segmenterad och uttrycker Hox-gener

Den bakre delen av hjärnan är organiserad i sju stycken segment. Studier av neurallistceller som vandrar från dessa segment visar att de från de två främre segmenten migrerar och rör sig till den första svalgbågen (käkarna) medan de från det fjärde segmentet invaderar hyoidbågen (Figur 1). Cellerna från det tredje segmentet rör sig inte alls utan dör innan de hinner förflytta sig någonstans. I ett experiment baserat på transplantationsteknik visades att om man skär ut och förflyttar delar av mellanhjärnan till en position i bakhjärnan, utvecklas ett exemplar av den första bågen i området där den andra svalgbågen i normala fall sitter. Således utvecklades två bågar med den första bågans anatomi i detta embryo. Denna och senare studier har lett till antagandet att neurallistceller förvärvar sin information om hur de skall migrera innan de lämnar bakhjärnan.

I princip alla djur har så kallade homeoboxgener. En homeobox är en DNA-sekvens i genen som uttrycker proteiner. Homeoboxgenerna delas in i olika grupper. En av dessa klasser kallas Hox-gener, vilka bestämmer hur segment i djuret skall ligga. Det har föreslagits att Hox-gener och andra homeoboxgener är ansvariga för mönsterläggning av bakhjärna och svalg. Forskarna tror att om Hox-generna ansvarar för bakhjärnans segmentering så spelar de också en roll för differentiering och utveckling av svalgbågarna.

Genetiken bakom hyoidbågen

Ett flertal Hox-gener har visats vara av betydelse för svalgets utveckling. Hox-generna finns i flera olika kopior som har utvecklat olika funktioner. Dessa benämns *Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc* och *Hoxd*. Vidare delas varje kopia in i flera olika varianter som nummereras 1-4. Ju längre bak i neuralröret desto högre nummer på de Hox-gener som uttrycks. *Hoxa2* tros vara en nyckelgen som medför identitet till hyoidcellerna som migrerar till den andra svalgbågen. Om man på konstgjord väg får *Hoxa2* att uttryckas extra mycket i cellerna i den första bågen hos kyckling och afrikansk klogroda (*Xenopus*) utvecklas en hyoidbåge istället för en käke. En senare studie gjord på *Xenopus* visade också att om *Hoxa2* slås ut, ombildas hyoidbågen till käkar.

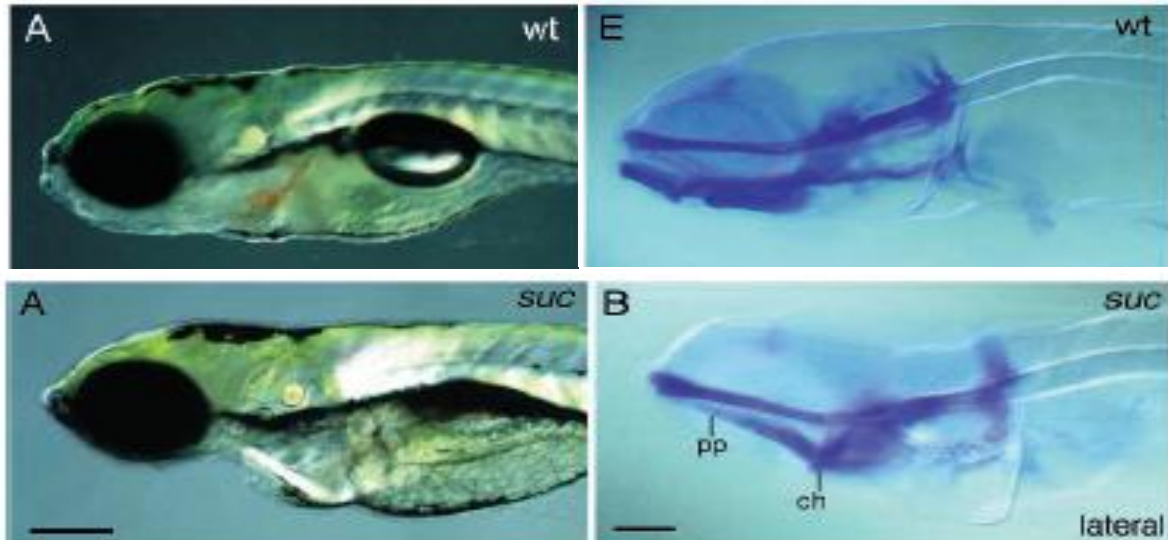
Genom att slå ut *Hoxa2s* så har forskarna alltså kunnat visa att denna dirigerar andra bågans utveckling. Dessa tre studier som visar på samma resultat vid utslagning av *Hoxa2* hos mus, groda och zebrafisk har lett forskare till att anse *Hoxa2* vara nyckelgenen för utveckling av r4 och andra bågen.

Mutanter avslöjar gener som styr svalgets morfologi

I ett stort samarbetsprojekt mellan två laboratorier, ett i Tübingen och ett i Boston screenades (undersöktes) zebrafiskembryon för defekta strukturer med avseende på kraniets och gälarnas skelett. Totalt hittades 158 mutanter som representerar 30 gener. Defekterna kategoriserades utifrån en kombination av de strukturer som påverkades i huvud och svalg. Stora grupper av

mutationer som verkar på mönsterläggning av svalg och broskdifferentiering. *Lockjaw*-mutanten har förminskade eller saknar helt båge två till fem. Hos *duckbill* och *flathead* utvecklas inte bågar fyra till sex. Mutationerna som leder till *sucker* och *schmerle* påverkar första och andra bågregionerna men inte de bakre.

Dessa resultat tyder på att det finns ett set av gener som specificerar neurallistens utbredning längs längdaxeln i flera distinkta regioner. Mutationer i gener som stör hela regioner gör det möjligt att bestämma vilka gener som är viktiga för svalgets utveckling.



Figur 1. Bilderna överst visar helt normala zebrafiskembryon. Det övre, till vänster visar ett foto taget i ett mikroskop och den övre, till höger visar ett embryo där ben är färgade med blå färg. De nedre bilderna visar *sucker*-mutanter som saknar underkäkar till följd av att en mutation har skett. Den nedre, bilden till vänster visar ett foto av ett mutantembryo och den nedre, till höger visar ett mutantembryo där ben är färgade med blå färg. Denna mutation kan ha inverkat på *Hoxa2*-uttrycket. (Piotrowski m fl, 1996) (Återgiven med upphovsrättsinnehavarens tillstånd)

Framtiden och teknikens framsteg

Hur neurallistcellerna migrerar i huvudet är framförallt undersökt på mus och kyckling och i mindre utsträckning på fiskar. Att kartlägga hur neurallisten migrerar hos zebrafisk är av intresse eftersom fiskar liknar alla ryggradsdjur mer än möss och fåglar. Ett test som är av intresse är att undersöka om zebrafiskmutanter har defekter i bakhjärnan. Nya transgenetiska tekniker som använder sig av metoden att sätta in gener som kodar för protein som ger upphov till färg kan användas för att undersöka hur celler rör sig och var gener uttrycks.

Alltsedan 1950-talet när DNAt upptäcktes har forskarna velat förstå hur generna kodar för morfologin man ser på makroskopisk nivå. Idag har forskare möjlighet att med nya tekniker och metoder studera de strukturer, processer och mekanismer som råder i celler och på högre vävnads- och anatomisk nivå. Teknikerna utvecklas i rasande fart och snart kan forskarna förklara hur informationen överförs från molekylerna som kallas DNA till den en helt fungerande levande varelse.

Intressant läsning på området

Piotrowski T, Schilling TF, Brand M, Jiang YJ, Heisenberg CP, Beuchle D, Grandel H, van Eeden FJM, Furutani-Seiki M, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M, Kane DA, Kelsh

RN, Mullins MC, Odenthal J, Warga RM, Nüsslein-Volhard C. 1996. Jaw and branchial arch mutants in zebrafish II: anterior arches and cartilage differentiation. *Development* 123: 345-356.