



UPPSALA
UNIVERSITET

Mönsterläggningen av hyoidbågen

Utvecklingsbiologi och genetik

Lovisa Wretman

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2010
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Alla vertebrater har en struktur i huvudet som kallas hyoidbågen. Denna är uppbyggd av ben, brosk och muskler och stöder djurets käkar. Forskning på framförallt mus och kyckling tyder på att Hox- och andra homeoboxgener är involverade i mönsterläggningen av denna struktur. Färre undersökningar för att utreda huruvida homeoboxgener styr mönsterläggningen av hyoidbågen har gjorts på de mest basala vertebraterna, nämligen fiskarna. Dock har man kunnat visa att *Hoxa2* agerar som nyckelgen för utvecklingen av hyoidbågen hos mus, kyckling, groda och zebrafisk. Det mest moderna verktyget för att undersöka geners funktion är transgenteknik. Denna teknik använder sig av möjligheten att förflytta en gen från en organism till en annan och se hur denna exogena gen uttrycks samt påverkar och förändrar anatomin hos djuret. Ett antal mutationer och gener har visats påverka mönsterläggningen av bland annat hyoidbågen. Vilka mekanismer som förmedlar budskapet mellan en uttryckt gen och en normalt utvecklad hyoidbåge är fortfarande dåligt kända och bör utforskas i närmare detalj, särskilt hos fiskarna. Vidare är det av intresse att undersöka hur de olika Hox- och homeoboxgenerna samverkar för utvecklingen av hyoidbågen hos alla modellorganismer. Även i denna fråga är fiskarna underrepresenterade i forskningen och därför är det av speciellt intresse att lägga fokus på dem i framtida studier.

Inledning

Alla vertebrater delar anatomiska drag varav ett är det differentierade huvudet med sinnesorgan. En ytterligare egenskap som utmärker vertebraterna är ett muskulärt svalg som har både födointags- och andningsfunktioner. Svalgbågarna är en rad likartade strukturer som ligger i serie ryggradsdjurets huvud och de antar olika former i olika grupper av vertebrater. De två första svalgbågarna är de främre medan de som ligger bakom dessa är de bakre. Den första av svalgbågarna utgörs av käkar hos alla käkförsedda ryggradsdjur. Den andra kallas hyoidbågen. De bakre kallas gälbågar hos fiskar men utgörs av andra strukturer hos ryggradsdjur som saknar gälar. Dessa strukturer härrör från så kallade neurallistceller, vilka är en cellpopulation som uppstår i det unga vertebratembyot.

De senaste 100 åren har utvecklingsbiologin växt sig successivt allt starkare i takt med den molekylära teknikens landvinningar. Man har med dessa nya tekniker kunnat studera mönsterläggningen av organ och anatomiska strukturer samt genetiken bakom dem. Anledningen till att vi studerar dessa utvecklingsprocesser är att vi vill förstå genernas funktion hos organismen.

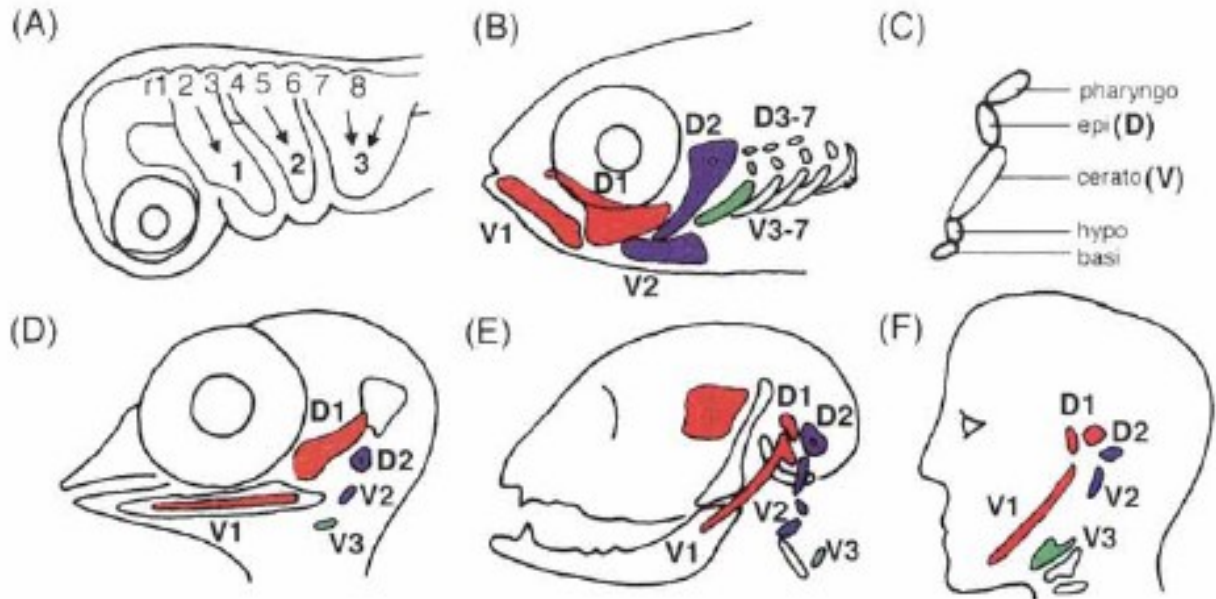
Denna uppsats har som uppgift att sammanfatta forskningen och det forskarna vet om den andra svalgbågens (hyoidbågens) mönsterläggning. Även om forskning på groda, kyckling och mus behandlas, ligger fokus på studier med zebrafisk. Denna specifika struktur är av intresse dels för att det inte bedrivits mycket forskning på den tidigare, dels för att huvuddelen av de forskningsprojekt som faktiskt har behandlat hyoidbågen har använt sig av mus, kyckling eller groda för att studera den. Frågorna som diskuteras är hur hyoidbågen mönsterläggs och vilka gener som ligger bakom detta samt vilka de senaste teknikerna är som kan användas vid utredning av detta hos zebrafisken.

Uppkomsten av det avancerade huvudet, svalget samt modifieringar och varianter av detta i form av gälar och käkar är av avgörande värde för vertebraternas framgång och utgör i mångt och mycket troligtvis grunden till deras breda funktionella mångfald. Det är min mening att med en genomgång av denna anatomiska detalj visa på något som förtäljer en del om varför vertebraterna ser ut och fungerar som de gör och därmed förtjänar ett kapitel i berättelsen om vårt eget ursprung.

Neurallisten samt svalgets utvecklingsbiologi och morfologi

Vertebratgruppers svalgmorfologier är alla variationer av ett gemensamt mönster

Enligt sammanfattande studier är uppkomsten av käkar och gälar oerhört betydelsefullt för vertebraternas morfologiska och funktionella diversitet (Olsson m fl, 2005). Hos alla käkförsedda vertebrater utgörs den första bågen av käkarna medan den andra utgörs av den så kallade hyoidbågen, vilken stödjer käken (Figur 1). Hyoidbågens element hos människa är tinningbenet och tungbenets mindre utskott samt associerade ligament, flera av ansiktets och nackens muskler samt ansiktetsnerven. Alla vertebrater som idag existerar har mycket långa evolutionära historier och även om deras morfologi är olika, representerar de alla variationer av samma gemensamma grundläggande plan. Med andra ord är det samma cellpopulationer 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.



Figur 1. Schematisk representation av svalgbågeelementens homologa strukturer hos olika grupper. Alla element inom en båge har samma färg: 1: mandibler, (röda); 2: hyoid, (blå), 3: första gälbågen, (grön), och 4-7: andra till femte gälbågen, (vita). (A) Under den tidiga utvecklingen av rombencefalon segmenteras denna i rhombomerer och neurallistceller migrerar i strömmar ut i svalgbågarna. (B) Under larvstadiet hos en benfisk utformas de distinkta ventrala och dorsala benen i svalgbågarna. (C) Schematisk bild av de fem primitiva elementen i en svalgbåge. D och V syftar till den stora, dorsala (epi-) och ventrala (cerato-) elementen. (D-F) Svalgets anatomi hos kyckling, mus och människa. D1: Palatoquadrat (fisk), pterygoquadrat (kyckling), städet (mus och människa); V1: Meckelbrosk (alla arter); D2: hyosymplectic (fisk), colummella, (kyckling), stigbygeln (mus och människa); V2: ceratohyal (fisk), Reicherts brosk (mus och människa); D3: epibranchial 1 (fisk); V3: ceratobranchial (fisk), styloidben (mus och människa). (Schilling, 1997) (Återgiven med upphovsrättsinnehavarens tillstånd)

Hos nu levande vertebrater är de muskulära och skeletala elementen utvecklade från neurallistpopulationer som ofta är modifierade. Dessutom bär elementen sällan tydliga identifierbara tecken på sina utvecklingsbiologiska föregångare. Detta försvårar identifiering av evolutionära föregångare till anatomiska strukturer. För att få tillförlitlig information måste man kartlägga cellpopulationer och ta reda på vilka gener som uttrycks i vilka populationer (Noden & Trainor, 2005).

Benfiskarna med strålar i fenorna kallas teleoster. Dessa har behållit vad som tros vara det primitiva mönstret av skalle och hals för käkförsedda vertebrater. Neurokraniet skyddar hjärna och sensoriska organ medan det muskulära svalget utgörs av käkar och den stödjande hyoidbågen samt gälbågar som alla tillsammans har funktion i matintag och andning (Schilling, 1997).

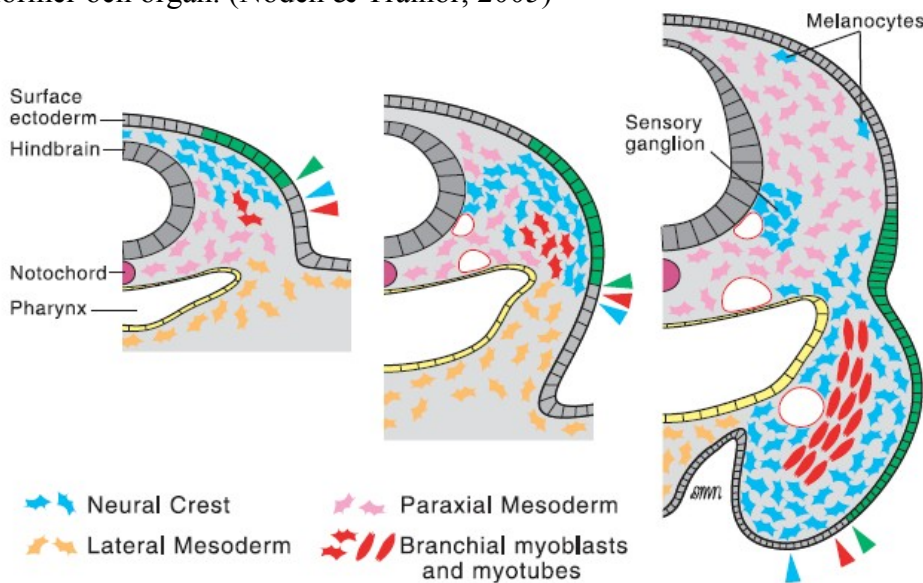
Varje båge har ett yttre ektoderm, ett inre endoderm och en kärna av mesenchymvävnad som härrör från både neurallist och mesoderm (Noden, 1988). Externt separeras bågarna av de ektodermala svalgklyftorna och internt av de endodermala gälfickorna. Olika embryonala cellpopulationer ger upphov till distinkta komponenter i svalget. Ektoderm producerar epidermis och nerver (Couly m fl, 1990), medan endoderm ger upphov till epitel som avgränsar svalget och de endokrina körtlarna som sköldkörtel, bisköldkörtel och bräss (Grevellec m fl, 2010).

Svalgskelettet utvecklas först av brosk som senare förbenas. Första bågen utgör käkarna hos samtliga gnathostomer, andra bågen kallas hyoidbågen och denna varierar i form och funktion

hos olika vertebratgrupper. Homologerna är dock tydliga och det är lätt att se vilka ben som motsvarar vilka i de olika grupperna. De tre ben som hittas i däggdjurens mellanöra kallas hammaren, städet och stigbygeln. Hammaren utvecklades från en ventral del av den primitiva underkäken, medan städet och stigbygeln härrör från dorsala element i första och andra bågen hos däggdjurens förfäder (Schilling, 1997).

Neurallisten utgör grunden för många av svalgets vävnader och organ

Det muskulösa svalget och de förbenade svalgbågarna, vilka utvecklas på sidorna av huvudet i det tidiga embryot, är utmärkande för vertebraterna (Graham & Smith, 2001, Chambers & McGonnell, 2002). Dessa bågar utvecklas från en rad olika cellpopulationer som härrör från ektoderm, endoderm, neurallist och mesoderm som alla interagerar och samverkar på ett mycket komplext och svårförstått vis (Graham & Smith, 2001). Ett huvud är uppbyggt av en dorsalt neuralrör och ett ventral svalgrör, vilka båda består av epitelvävnad. Dessa rör är omgivna av mesenkym, och det är i denna vävnad som muskoskeletala och kardiovaskulära vävnader uppstår (Noden & Trainor, 2005). Neuralröret är föregångaren till det centrala nervsystemet i den unga vertebraten. Neuralröret är en pluripotent cellpopulation som uppstår vid neuralplattan strax efter att neuraltuben slutits (Chambers & McGonnell, 2002). Den uppstår i ett område som kallas neuralplattsgården, vilken är den distinkta övergången mellan ektoderm och neuralplattsvävnad. Neurallistcellerna migrerar sedan utåt och nedåt (Figur 2) mot svalgröret och differentierar till specialiserade celltyper och bildar distinkta vävnader, former och organ. (Noden & Trainor, 2005)



Figur 2. Schematisk representation av tre stadier i utvecklingen av fågelhuvudet. Bilden visar rörelse och expansion av ytektoderm (grön), neurallist (blå) och paraxial- och lateralmesoderm (mörkröd). Pilspetsar visar fronten av rörliga populationer. (Noden & Trainor, 2005) (Återgiven med upphovsrättsinnehavarens tillstånd)

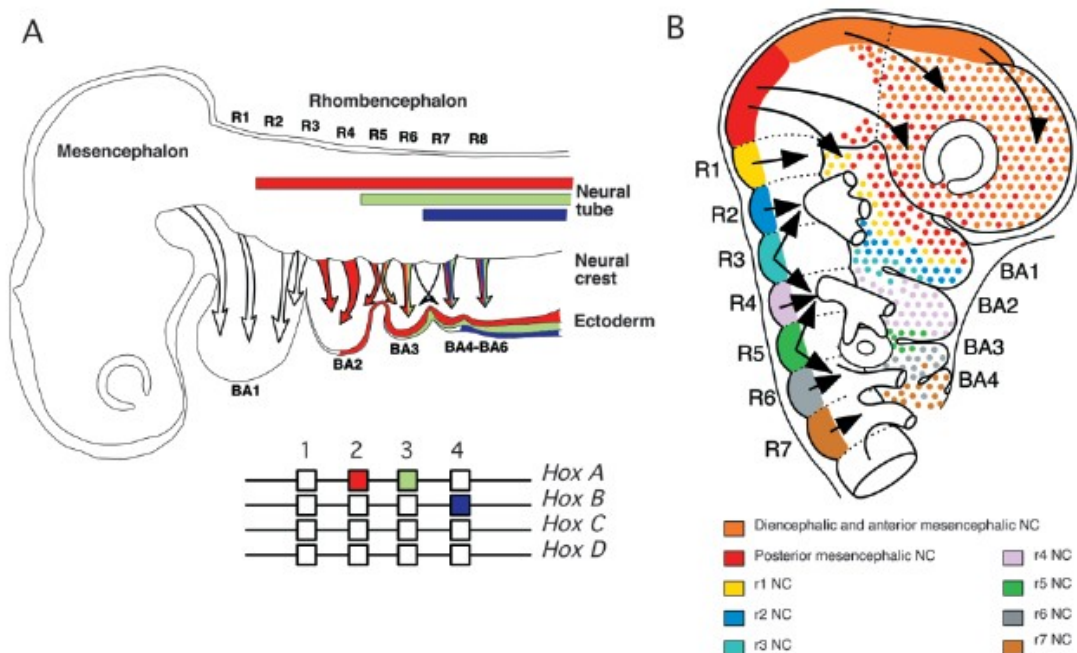
Neurallistcellerna migrerar och segregerar i grupper till olika områden; den frontonasala samt den första, andra respektive tredje bågen. Denna uppdelning orsakas av tre olika mekanismer. Dessa är apoptos i vissa distinkta områden och etablering av barriärer för spridning såsom gälfickor, ögonhålur och möjligtvis underliggande mesoderm. Slutligen inverkar också en förmåga hos neurallistcellerna att i periferin av en population utveckla cell-cellhophäftning, vilket är tillräckligt för att upprätthålla gränser. Tidigare trodde man att det var neurallistcellernas ursprung som bestämde deras öde. Nu vet man att neurallistcellernas rörelse och segregering involverar samverkan mellan neuralröret, mesoderm, ektoderm och svalgendoderm. Tekniker som används för att kartlägga neurallistcellernas rörelse och interaktion med andra cellpopulationer är transplantation och infärgning, manipulation av

gener på lokal nivå såsom gen-knock-out samt nedreglering av gener. 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. Sådana studier har visat att när väl neurallistcellerna lämnat neuralröret behåller de sin uppdelning i specifika populationer och bebländar sig inte med varandra. Hur svalgbågarna mönsterläggs beror på hur respektive cellpopulation migrerar och den omgivning de passerat under tidigare rörelse. Cellerna samlar på sig ett ”minne” av den vägen de vandrat med hjälp av proteiner som påverkat dem under vägens gång. (Noden & Trainor, 2005)

Att neurallistcellernas ytegenskaper begränsar dem till specifika populationer står klart. Gränserna mellan bågarna är mycket skarpa och att neurallistceller inte passerar dem visar en studie på zebrafisk (Schilling & Kimmel, 1994). Genom att byta ut specifika rombomerer i kyckling mot vaktelceller kan man kartlägga hur cellpopulationer som tillhör en region rör sig. Sådana studier har visat att delar av käkarna utgörs av både första och andra bågen. När celler från olika regioner möts, i ett brosk- eller benelement upprättas en skarp gräns som inte motsvarar någon morfologisk gräns (Köntges & Lumsden, 1996).

Rombencefalons segmentering och dess relation till svalgets regionalisering

rombencefalonen, också kallad bakhjärnan, är organiserad i segment, dessa kallas rombomerer 1, 2, 3... 7 och förkortas r1, r2, r3... r7. Studier på neurallistceller från rombomererna visar att de från r1 och r2 migrerar och rör sig till den första svalgbågen (käkarna) medan de från r4 invaderar hyoidbågen (Figur 3). Cellerna från r6 och r7 migrerar till de bakre bågarna (Lumsden m fl, 1991, Schilling m fl, 1994).



Figur 3. Genexpression i rombencefalonen samt neurallistpopulationernas rörelse. (A) Expressionsmönster för Hox-gener i rombencefalonen samt i svalgbågarna (BA1-6) och i det associerade ektoderm som avgränsar bågarna. *Hoxa2*, *Hoxa3* och *Hoxb4* ses i rött, grönt och blått. Hox-genkartan under den schematiska bilden av embryot visar vilka olika Hox-gener som uttrycks var i motsvarande neurallist samt ektoderm i svalget. (B) Neurallistens kolonisering av skallen, svalgbågar och ansikte. NC är en förkortning av det engelska Neural Crest, vilket betyder neurallist. (Couly m fl, 1998) (Återgiven med upphovsrättsinnehavarens tillstånd)

I mellanhjärnan produceras normalt celler som invaderar den första bågen. Ifrån rombencefalonen migrerar celler som normalt koloniserar den andra bågen. I ett experiment baserat på transplantationsteknik visades att om man skär ut och förflyttar delar av

mellanhjärnan till en bakre position i rombencefalonen, utvecklas ett exemplar av den första bågen i området där den andra svalgbågen i normala fall sitter (Noden, 1983). Således utvecklades två bågar med den första bågens anatomi i detta embryo. Den naturliga kopian av ett element kallas ektopisk. Denna och senare studier har lett till antagandet att neurallistceller förvärvar sin information om hur de skall migrera innan de lämnar neuralröret (Noden, 1983).

Under 1990-talet växte en interdisciplinär vetenskap fram som kombinerar utvecklingsbiologi med makroevolutionära perspektiv. Genom att relatera molekylära data till fossila kan man dra slutsatser om när och hur vissa strukturer och embryonala processer tog form i livets historia. Genom att använda sig av transgenetik kunde forskare sluta sig till att kryptiska cellgränser etableras i ben mellan mesoderm och neurallist. Vidare föreslog forskarna en ny metod för att bestämma skeletala homologier grundat på muskelfästen. Ett muskelfäste utgör således nyckeln för vilken cellpopulation muskeln härrör ifrån medan benet i sig kan vara en blandning av flera populationer. Genom att studera muskelfästen hos utdöda vertebratanfäder kunde man bestämma vilka cellpopulationer som fanns närvarande då. Värdefull insikt om de skelettelement man undersökte kom från studier på missbildningar i huvud och nacke. Faktum är att mycket av den genetiska kunskapen om svalgets mönsterläggning är baserat på just studier av ansiktets defekter och syndrom. (Matsuoka m fl, 2005)

Genetiken bakom svalgets mönsterläggning

Hox-gener påverkar mönsterläggningen längs längdaxeln i svalget

Homeoboxgener har hittats hos alla undersökta metazoer. En homeobox är en ~180 baspar lång DNA-sekvens i gener som uttrycker transkriptionsfaktorer, vilka är proteiner. Den del av transkriptionsfaktorn som kodas från homeoboxen kallas homeodomän och kan binda till DNA på ett sekvensspecifikt vis och kan på så sätt starta kaskader av uttryckta gener. Homeodomänsekvenser kategoriseras på basis av sekvensidentifiering, organisation av genkluster och introner i åtminstone 20 klasser. En av dessa klasser kallas Hox-gener, vilka agerar längst alla embryons längdaxel och bestämmer lägespositionering av segment samt regioner längs denna axel. Av anledningar ännu inte kända kan Hox-geners tidsmässiga aktivering korreleras med deras position i ett kluster. (Martinez & Amemiya, 2002)

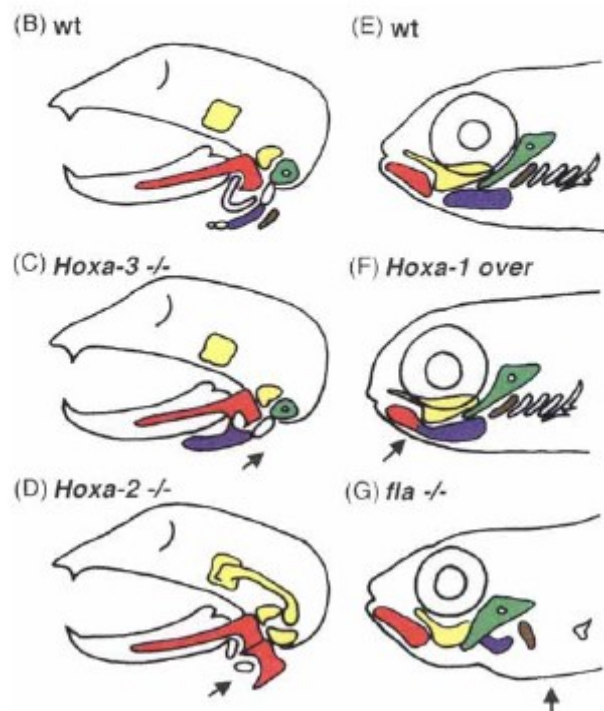
Homeoboxgenernas transkriptionsfaktorer är involverade i etablering av lägespositionering längs kroppens längdaxel hos både vertebrater och evertebrater. Det har föreslagits att Hox-gener och andra homeoboxgener är ansvariga för att koordinera mönsterläggning för rombenencefalonen och svalg (McGinnis & Krumlauf, 1992). Nämnda forskare tror att om Hox-geners spatiala uttryck ligger bakom rombencefalons segmentering så spelar de således också en roll för segregeringen av neurallistceller i olika strömmar. I förlängningen inverkar de också på differentiering och utveckling av svalgbågarna. Exempelvis uttrycks *Hoxb2* i hela neuralröret fram till gränsen mellan r2 och r3 (Figur 3) samt i neurallistcellerna som migrerar till alla svalgbågar förutom just den första (käkarna). Detta har setts som en indikation på att det slutgiltiga målet för varje neurallistcell är förutbestämt redan innan den lämnar neuralröret (Chambers & McGonnell, 2002). Dock finns det inget som säger att uttrycksmönstret i bågarna nödvändigtvis alltid och i alla fall är beroende av det som förekommer i rombomererna (Trainor & Krumlauf, 2001). Exempelvis är *Hoxa2* uttryckt i r2 men nedreglerad i cellerna som rör sig från r2 till käkarna. Hox-gener uttrycks bara fram till gränsen r1/r2 samt i neurallistcellerna som återfinns i käkarna. Ansiktsskelettet kontrolleras inte av Hox-genexpression (Prince & Lumsden, 1994).

Hoxa2 menas vara en nyckelgen som medför identitet till r4 och hyoidcellerna som migrerar till hyoidbågen (Gendron-Maguire m fl, 1993, Rijli m fl, 1993). Inducerat överuttryck av *Hoxa2* i den första bågen hos kyckling och afrikansk klogroda (*Xenopus*) har visats leda till utveckling av en hyoidbåge istället för en käke (Grammatolopoulos m fl, 2000, Pasqualetti m fl, 2000). En senare studie gjord på *Xenopus* visade också att om *Hoxa2* slås ut, ombildas hyoidbågen till käkar (Baltzinger m fl, 2005).

Senare studier visar att neurallisten snarare förvärvar sin identitet via en interaktion mellan signaler från omgivande celler samt gener de själva uttrycker (Chambers & McGonnell, 2002). Det skulle också kunna vara så att hur Hox-gener uttrycks i rombomererna respektive i neuralröret är oberoende av varandra (Trainor & Krumlauf, 2001).

Hox-gener uttrycks normalt i stora områden med olika främre expressionsgränser och som ett resultat av detta uttrycks ett specifikt set Hox-gener i varje givet segment eller region med undantag för första bågen som helt saknar Hox-uttryck. Främre gränsen för *Hoxa1* är gränsen mellan r3 och r4, *Hoxa2* uttrycks fram till och med r2. Av dessa gener är det bara *Hoxa2* som uttrycks i hyoidbågen. *Hoxa3*s uttryck sträcker sig från och med gränsen r4/r5 och bakåt samt i tredje bågen och bakåt (Schilling, 1997). Överexpression av *Hoxa1* orsakar sammansmältning av första och andra bågen hos zebrafisk, (Figur 4), (Alexandre m fl, 1996) men inte hos mus (Zhang m fl, 1994). När en Hox-gen uttrycks längre fram än normalt, som i detta fall, orsakas duplicering av regionspecifika nerver i bakre rombencefalon och detta

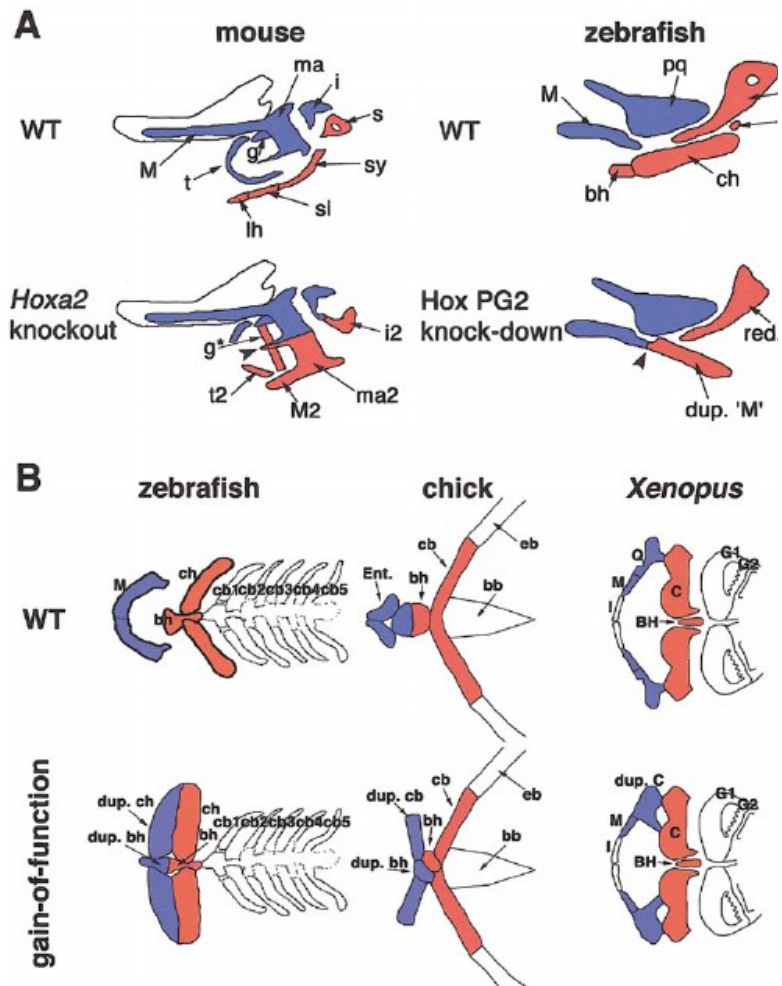
leder till att första bågen förloras och ersätts av en delvis duplicerad andra båge. Denna andra onormala båge smälter ihop med den normala versionen. *Hoxa1* är inte nödvändig för att bågutveckling, vilket visades i en studie av Lufkin m fl (1991). Istället tar andra gener över *Hoxa1*s funktion om denna slås ut (Hunter & Prince, 2002). Det har vid utslagning av *Hoxa2*s genfunktion visats att denna dirigerar andra bågens utveckling. När *Hoxa2* slagits ut hos mus har en så kallad 'homeotisk transformation' ägt rum, vilket innebär att andra bågens muskler och skelett har ersatts med första bågens. Denna ektopiska första båge saknar dock de mest ventrala elementen som finns i en normal första båge (Figur 5). Också detta ektopiska element smälter samman med den normala, första bågen. Dessutom smälter alisphenoiden och städet i örat samman till ett stort element (Rijli m fl, 1993, Gendron-Maguire m fl, 1993). Hos zebrafisk finns två *Hox2*-paraloger, *Hoxa2* och *Hoxb2*. Vid utslagning av dessa gener var för sig sågs inga defekter eller onormala fenotyper men om båda två slogs ut ersattes den ventrala delen av första



Figur 4. Expression av Hoxa-gener och skeletala defekter av Hox-mutationer hos mus (B-D) och zebrafisk (E-G). (B) Normalt utvecklas musen skalle i tre distinkta skeletala delar. (C) V3 saknas hos mutanter som saknar *Hoxa-3*-funktion (pil). (D) Duplicering av D1 istället för D2 hos *Hoxa-2*-mutanter (pil), V2 utvecklas inte. (E) Normal utveckling av zebrafiskens sju bågar. (F) Fusion av V1 och V2 vid *Hoxa-1*-överexpression (pil). (G) Avsaknad av svalgbågarna hos *fla*-mutanter (pil). D1, gul; V1, röd; D2, grön; V2, blå; V3, brun. (Schilling, 1997) (Återgiven med upphovsrättsinnehavarens tillstånd)

bågens element med andra bågens (Figur 5), (Hunter & Prince, 2002). 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 som medierar identiteten till r4 och andra bågen (Hunter & Prince, 2002). Ovan nämnda överexpressionsstudier på både kyckling och *Xenopus* tyder på att nedreglering av *Hoxa2* är viktig för normal käkutveckling. En gen som reglerar om *Hoxa2* skall uttryckas eller inte är *Fgf8* och denna verkar i främre rombencefalonen, alltså r1 (Meyers, 1998, Walshe & Mason, 2003).

Figur 5. En jämförelse av svalgbroskmorfologier i respons till förlust av Hox PG2-funktion och återställande av genfunktion. (A) Jämförelse av *Hoxa2*-knockout-fenotyper och zebrafisk PG2-knock-down-fenotyper. Svalgbrosket hos mus och zebrafisk visas i sidovy med en schematisk representation av första (blå) och andra bågen (röd). De vänstra bilderna visar vildtyp och *Hoxa2*-knock-out för dentare hos mus. Hos däggdjur har vissa av de första och andra bågelementen inkorporerats i mellanörats komponenter. Första bågen inkluderar Meckel, hammaren (ma), gonailbenet (g), trummhinnan (t) städet (i). Andra bågbrosket är hyoidbenets mindre horn (lh), styloidligamentet (sl), styloidben (sy) och stigbygel (s). Möss som saknar *Hoxa2* visar delning av andra bågelementet, vilket är ersatt med spegelkopior av första bågelementet. Andra bågens element saknas helt, för både dorsala och ventrala delar där *Hoxa2* slagits ut. Duplicering av första bågen inkluderar städet, hammaren, gonial- och squamosalbenet. Bilder till höger visar vildtyp och PG2-nedsättning hos zebrafisk, se tidigare figurer för förklaring. (B) *Hoxa2*-återställningsfenotyper (gain-of-function, GOF) hos zebrafisk, kyckling och *Xenopus* liknar varandra. I samtliga fall är första bågens element ersatta med duplikat av andra bågens. Det normala andra elementet är sammanvuxet med det ektopiska i alla tre arterna. För zebrafisken visas bara de ventrala elementen. Hos GOF-fenotypen förefaller det vara Meckels brosk som är ersatt med kopior av andra bågens element (ch, bh). För GOF-mutanten hos kyckling är entoglossum (ent) ersatt med duplikat av andra elementet (bh, cb). Hos *Xenopus* är GOF-fenotypen i första bågens kvadrat (q) ersatt med duplicerad ceratohyal. (Hunter & Prince, 2002) (Återgiven med upphovsrättsinnehavarens tillstånd)

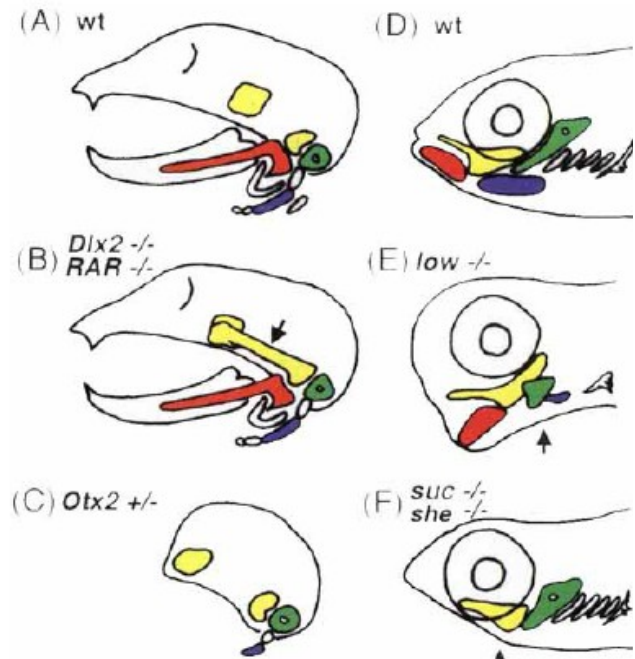


Andra homeoboxgener som påverkar svalgets mönsterläggning

Dlx är en familj av homeodomän-transkriptionsfaktorer som spelar roll i flera utvecklingsbiologiska processer. *Dlx2* är en homeoboxgen som hos mus dirigerar utvecklingen av ett set dorsala benelement i käken. *Dlx2* krävs för första och andra bågnas utveckling. Hos mus har forskare kunnat visa att *Dlx1* och *Dlx2* har överlappande uttryck (Qiu m fl, 1997). Om funktionen av *Dlx2* förloras (Figur 6), ersätts två dorsala element med ett stort ektopiskt ben (Qiu m fl, 1996). Liknande former ses hos mutanter som har förändringar i genen för retinoidsyreceptorn (RAR) (Lohnes m fl, 1994). För dubbel-homozygoterna

$RAR^{\alpha-/-\gamma-/-}$ $RAR^{\beta-/-\gamma-/-}$ har de flesta mutanter defekter i andra och tredje bågens element (Figur 6). Retinoidsyra aktiverar vissa Hox-gener genom att via retinoidsyrareceptorn binda till olika responselement som antingen reglerar uttryck upp eller ned (Studer m fl, 1994, Marshall m fl, 1994). När zebrafisk behandlats med retinoidsyra har *Hoxa1*-halten stigit (Holder & Hill, 1991). Mutationer i *Hoxa2*, *Dlx2* och RARs ger alla liknande defekter i de dorsala elementen av första bågen. En möjlig gemensam nämnare för dessa tre gener är att de är kopplade till retinoidsyra. Många zebrafiskmutanter visar defekter i höjdläsmönstret av broskelementen. Mutationer i *low* kan orsaka förlust av hela bågar och dessutom alltid förlust av andra bågens dorsala brosk (Schilling m fl, 1996). Mutationer i *suc* och *she* leder till avsaknad eller förminskning av det ventrala brosket i första och andra bågen, vilka är fragmenterade och i olika grad sammansmälta med dorsala element (Piotrowski m fl, 1996). Deras fenotyper indikerar att samma mönsterläggning styr den ventrala mönsterläggningen i både första och andra bågen. Hos mus samverkar *Hoxa1*, *Hoxa2*, *Hoxb1*, *Krox20* och *Kreisler* för att mönsterlägga rombencefalons segmentering. *Hoxa1*-aktivitet krävs för att sätta *Hoxb1*s främre gräns vid r3/r4. Då *Hoxb1* inte uttrycks hos *Hoxa1*-mutanter sätts en kaskad av felaktig genexpression igång i musembryots rombencefalons och r2-r5 utvecklas onormalt. (Barrow m fl, 2000)

Hoxa2 dirigerar normal benbildningen i den första och andra bågen genom att förhindra fortsatt broskbildning. I normala embryon uttrycks *Hoxa2* i andra bågens mesenkym men inte i broskbildande centra. När *Hoxa2* saknas startar broskbildning ektopiskt. Resultaten visar att *Cbfa1*-genen uppregleras i andra bågen hos *Hoxa2*-mutanter, vilket indikerar att *Cbfa1*-induktion kan medföra att *Hoxa2*-inhibering i benbildande områden under andra bågens normala utveckling. Vidare visar resultat från samma studie att *Hoxa2*^{-/-}-mutanter har ett onormalt *Sox9*-uttryck. (Kanzler m fl, 1998)



Ombildning av D1 (gul) till ett förlängt element som delar alisfenoiden och städet hos *Dlx2*- och *RAR*-mutanter. (D) Förlust av V1 (röd) och främre delar av skallen hos *Otx2*-mutanter. (E) Omlokalisering av D1 till D2-läge hos *low*-mutanter. (F) Avsaknad av V1 och V2 hos *suc*- och *she*-mutanter. (Schilling, 1997) (Återgiven med upphovsrättsinnehavarens tillstånd)

Screening av zebrafiskmutanter och identifiering av gener som påverkar svalgets utveckling

I ett stort samarbetsprojekt mellan två laboratorier, ett i Tübingen och ett i Boston undersöktes (screenades) zebrafiskembryon för defekta fenotyper med avseende på kraniets och gälarnas skelett. Totalt hittades 158 mutanter som representerar 30 gener och åtminstone fem alleler per gen. Defekterna kategoriserades utifrån en kombination av de strukturer som påverkades i huvud och svalg samt bröstfenan och pigmentceller. Stora grupper av mutationer som verkar på mönsterläggning av svalg och broskdifferentiering har identifierats (Tabell 1 & 2). Hos *duckbill* (*dul*) och *flathead* (*fla*) utvecklades inte bågar fyra till sex. För schematiska bilder av *low*^{-/-} och *she*^{-/-}, *suc*^{-/-}, *fla*^{-/-}-mutanter, se figur 4 respektive 6. Majoriteten av mutanter

uppvisade defekter i alla bågar, såsom *hammerhead* (*ham*), *bulldog* (*bul*) och *dackel* (*dak*). En av dessa klasser kallas 'flathead-like' på grund av mutanternas tillplattade huvud och små ögon och alla dessa saknade grupper av gälbågar. (Driever m fl, 1996, Haffter m fl, 1996, Schilling m fl, 1996, Piotrowski m fl, 1996)

Tabell 1. Resultat från en screening av käkmutanter

Kategori av mutant	Förkortning av gennamn (antal alleler)	Fenotyp	Referens ¹
'flatheads'	<i>fla(5), bab(2),</i>	Alla 'flatheads' har platt	a, b, c
'flatheads'	<i>ser(1), her(1),</i>	bakhuvud, små ögon och liten	
'flatheads'	<i>cod(1), dul(1),</i>	hjärna, förlust av gälbågar.	
'flatheads'	<i>fac(1), pio(5)</i>		
Främre svalgbågar	<i>stu(2), son(1)</i> <i>sel(1), suc(1)</i>	Stu, son, sel och suc uppvisar alla förminskning av de två främre bågarna.	d, e
'hammerheads'	<i>ham(2), hen(3),</i>	'Hammerheads' saknar alla vävnad	d, f
'hammerheads'	<i>pek(1), get(2),</i>	framför ögon och broskbildning	
'hammerheads'	<i>jef(1), koi(1),</i>	påverkad.	
'hammerheads'	<i>pit(4)</i>		

¹ Referenser: a, Schilling m fl. (1996); b, Furutani-Seiki m fl. (1996); c, Kelsh m fl. (1996); d, Piotrowski m fl. (1996); e, Whitfield m fl. (1996); f, Hammerschmidt m fl. (1996). Tabell baserad på Table 1 från Schilling m fl (1996).

Undersökningarnas 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 kandidatgener för uppdelningen av svalget. Ett test som är av intresse är att undersöka om dessa mutanter har defekter i rombencefalon enligt Schilling (1997). Det är också viktigt att veta om mutationer orsakar att en båge förvärvar karakteristika för en annan båge samt Hox-genexpressionen hos mutanterna, enligt tidigare nämnda författare.

Den mest allvarliga defekten *sucker* enligt Schilling, orsakas av en mutation i *edn1*. Resultat från studier på både mus och zebrafisk tyder på att *edn1* kodar för en peptid (Edn1) som signalerar från epitel och mesoderm till neurallistmesenchym i bågarna. Uttryck av *edn1* i de främre bågarna begränsas till det mest ventrala mesodermet och ytektodermet. Ceratohylen, ett ventralt element i hyoidbågen, saknas medan meckelbrosket är förminskat och omvänt. Hyomandibulan, belägen i den övre delen av hyoidbågen, visar bara marginella förändringar. (Miller m fl, 2000)

I ett experiment där man injicerade Edn1 proteinet i bågarna kunde man se att de dorsala delarna antog liknande strukturer som de ventrala delarna visar. Således drar man slutsatsen att en hög halt av Edn1 är tillräcklig för att mönsterlägga den ventrala broskfenotypen. Man tror att Edn1 är en morfogen som kontrollerar mönsterläggning i höjddled och att halten av proteinet bestämmer den resulterande formen. (Miller m fl, 2000)

Tabell 2. Översikt över mutationer som påverkar svalgbågarna

Gennamn	Allel	Fenotyp	Referens ⁵
Främre bågar förminskade			
<i>sucker (suc)</i>	tf216b	Båda förminskade	a
<i>schmerle (she)</i>	th210, tg203e	Båda förminskade	
<i>sturgeon (stu)</i>	td204e, tg419	Båda förminskade	
<i>hoover (hoo)</i>	tn213	Båda förminskade	
Missbildningar i flera bågar			
<i>van gogh (vgo)</i>	tm208, tu285	Meckel ³ omvänd, Ch ² förminskad	b
<i>dolphin (dol)</i>	ti230g	Främre ethmoidplatta förminskad, vävnad ovanför käke saknas	
<i>hanging out (hot)</i>	tq213d, tl20b,	Öppen mun,	
<i>hanging out (hot)</i>	tv49b, tl17d, to273e	ch pekar ventralt	
Främre bågar förminskade och bakre förminskade/saknas			
<i>screamer (ser)</i>	tk18	Främre bågar	c
<i>howler (how)</i>	tn14	förminskade	
<i>facelift (fac)</i>	tu45b	och bakre förminskade	
<i>compressed (cod)</i>	tj13c	/saknas	
<i>duckbill (dul)</i>	th34c		
<i>pistachio (pio)</i>	tb202, tc276c, tk17, to75a, ts41		
Främre bågar förminskade och bakre förminskade/saknas			
(Gen ej bestämd)	ty103a, tv60c, tm102e, tm9d, tm83c, tm88e, ta85d, tx238f, ty7c, tc294a, tg239a, tg279, tj229, tq235, tt227c, ty224	Främre bågar förminskade och bakre förminskade /saknas	c, d
Speciella strukturer			
<i>Lockjaw (low)</i>	ts213	Red ⁴ hyoid, vissa bågar saknas	
<i>Flathead (fla)</i>	ta53c, tf21c, th5b,	Främre bågar red,	
<i>Flathead (fla)</i>	ty76a, tu255e	bakre red/saknas ch sträcker sig bakåt och uppåt	
<i>Babyface (bab)</i>	tb210c, tw220c	Främre kraftigt red, bakre red/saknas	
<i>Compressed (cod)</i>	tj13c	Bakre red, ch böjd, bh saknas	

¹Bh=basihyal, ²Ch=ceratohyal, ³Meckel=Meckelbrosk, ⁴red=reducerad i storlek.

⁵Referenser: a, van Eeden m fl. (1996); b, Whitfield m fl. (1996); c, Kelsh m fl. (1996); d, Furutani-Seiki m fl. (1996). Tabell baserad på Table 3 och 4 från Schilling m fl (1996) och Table 2 från Piotrowski m fl (1996).

Metoder och tekniker för fortsatt forskning

Att kartlägga embryologiska cellpopulationer i skallen är av intresse inom utvecklingsbiologin, medicinen och för forskare som ställer frågor om evolution. Till ganska nyligen baserades nästan all vår kunskap om skallens utvecklingsbiologi på kyckling. På senare tid har allt mer forskning på mus, groda och zebrafisk bedrivits. Detta öppnar för

möjligheten att göra jämförande embryologiska studier och man kan börja sätta data i ett bredare fylogenetiskt perspektiv. Ett av utvecklingsbiologins mål är att utreda relation mellan cellpopulationer och hur dessa bidrar till den vuxna individens anatomi. Den huvudsakliga metoden för att utreda detta har varit så kallad 'fate mapping' eller destinationskartläggning, vilket innebär att man försöker förstå hur embryologiska cellpopulationer rör sig och bildar de adulta strukturerna i det långa loppet. (Gross & Hanken, 2008)

Försök att kartlägga cellpopulationer har gjorts med hjälp av histologi, alltså studiet av vävnader, ofta i skikt som skurits av den organism man studerar. Denna metod har dock visats vara mindre trovärdig i detta sammanhang eftersom det är svårt att spåra celler som inte är infärgade. Även vävnadsablation samt med färg och radioaktiva ämnen märkta celler samt transplantationsteknik har tillämpats i detta syfte. Vid vävnadsablation avlägsnar man en del av en vävnad, exempelvis neurallisten och efter två till tre dagar undersöker man embryot för avvikande och onormal morfologi till följd av ingreppet. På dessa tekniker baserades de första fate mapping-studierna. (Gross & Hanken, 2004)

Nyare tekniker har betydligt förbättrat möjligheterna att konstruera fate maps för vertebratens skalle. Märkning med fluorescerande ämnen, transgenteknik och så kallad 'genetic fate mapping' eller genetisk destinationskartläggning har avsevärt förändrat utsikterna för att förstå hur en skalle utvecklas. Vid 'genetic fate mapping' som undersöker neurallistcellernas öden använder man sig av rekombinaser som Cre och flp i kombination med neurallistspecifika promotorer. Till dags datum har dessa tekniker enbart används på mus och inga andra modellorganismer. (Gross & Hanken, 2008)

Analys av genreglering och genfunktion har förbättrats med sekvensering, transgenetik och andra metoder för att förstå interaktionen mellan DNA, gener och proteinproduktion. Med transgenetik menas att föra över en gen från en organisms genom till en annans genom och studerar dess funktion hos den nya organismen. Än så länge har transgenetik främst använts på mus och till mindre grad på zebrafisk (Yoshikawa m fl, 2008). I transgenstudier använder man oftast transgenexpression av exogena gener, från en annan organism eller tystade/onormala uttryck av gener.

För att avgöra om en gens uttryck är autonomt i en viss population eller om den induceras av omgivningen som populationen rör sig igenom kan man utföra en så kallad mosaikanalys. I ett sådant experiment transplanterar man celler från en population mellan mutant och vildtyp. Genom att tillämpa denna teknik kan man ordna gener, som orsakar liknande fenotyper i grupper baserat på vad som krävs för deras uttryck i avseende på signalering och omgivande celler (Schilling, 1997). Vidare kan man använda sig av insättningsmutagenes och markörbaserad screening för att ringa in specifika processer man vill undersöka.

En studie från 2005 visade att *Hoxa2* uttrycks selektivt i neurallisten. Denna slutsats kunde forskarna dra efter att ha utfört Cre-ERT2-rekombination för att inducera *Hoxa2*-deletion hos mus. *Hoxa2* inaktiveras när neurallistcellerna migrerar till svalgbågarna. Vid inaktivering sker en homeotisk transformation från hyoid- till käkbåge, som nämnts ovan i texten. Också denna knock-out-fenotyp utvecklades vid Cre-ERT2-rekombination. Man upptäckte också förändringar i uttrycksmönstret av *Alx4*, *Bapx1*, *Six2* och *Msx1*. (Santagati m fl, 2005)

Rekombination har använts länge för att manipulera DNA *in vivo* och studera genfunktion hos mus. Cre/*loxP*-systemet är ett lägespecifikt rekombinationssystem som använts mycket. I en två år gammal studie tillämpades detta system på zebrafisk för att studera hur metoden

fungerar hos denna modellorganism. I studien genererade man reporter-genlinjer för att kunna lokalisera Cre-rekombinas aktivitet *in vivo*. Linjer kallade G2R uttrycker två gener för fluorescerande proteiner kallade GFP och RFP (Grönt respektive Rött Fluorescerande Protein). Deras uttryck kontrollerades av en promotor, tillhörande *Xenopus* EF1 alpha-gen. GFP-fiskarna ändrade färg från grön till röd efter Cre-medierad rekombination. Cre/loxP-metoden är av användning för utveckling av cell- och vävnadsspecifika transgenlinjer och kartläggning av cellpopulationer hos zebrafisken. (Yoshikawa m fl, 2008)

ROSA26, beskriven av Soriano (1999) är ett av de mest utnyttjade reporter-systemen för mus. Detta system baseras på att *lacZ*-genen integreras med en alltid uttryckt *Rosa26*-gen och en specifik kasset (en sekvens). Denna kasset ligger uppströms om *Rosa26* och således möjliggörs *lacZ*-uttryck innan Cre-rekombination. Efter att kassetten kluvits ut, börjar *lacZ* uttryckas och kan ses med hjälp av infärgning. Cre/loxP-systemet bör vara av användning enligt Yoshikawa med fleras artikel från 2008.

Ny transgenteknik tillåter direkt analys av normal genexpression. I stora drag innebär tekniken att man konstruerar ett kromosomfragment från normala, humana kromosomer eller konstgjorda mänskliga kromosomer och överför det till ett annat djur såsom fisk, en grupp som studier har utförts på. Metoden kan användas för epigenetiskt underhåll och förändring av kromatinets organisation i specifika gener samt kan utgöra en plattform för genexpressionsstudier. (Ikeno, 2009)

Diskussion

I denna uppsats har utvecklingen av hyoidbågen hos mus, kyckling, groda och zebrafisk redogjorts för. Men tyngdpunkten har legat vid teleosternas modellorganism zebrafisken. Konstigt nog har mycket få utredningar använt sig av teleoster, vilka utgör den mest basala av ovan nämnda vertebratgrupper. Vidare visar yngre vertebratgrupper såsom däggdjur, fåglar och amfibier i högre grad modifierade mönster och strukturer än hos teleosterna. Av denna anledning är det möjligt att de egenskaper som teleosterna uppvisar liknar den gemensamma anfaderns karaktärer mer. Vidare har även molekylärt fokus i uppsatsen legat på just zebrafisken. Vilka gener och mekanismer som ligger bakom de morfologiska och anatomiska strukturer vi ser hos zebrafisken har tagits upp och behandlats.

Gross och Hanken (2008) menar att ett finns ett behov av data från andra modellorganismer än mus, kyckling och amfibie. Exempel på grupper som studier behövs göras på vad gäller neurallistcellernas är benfiskar och reptiler. Författarna observerar vidare att det inte finns några studier som utreder neurallistcellernas bidrag till benfiskarnas skalle. Dessa data skulle ge indikationer på hur vertebraternas förfäder har utvecklats och om detta utvecklingsmönster har bibehållits eller modifierats längst evolutionens förgreningar. (Gross & Hanken, 2008)

De mekanismer som styr neurallistcellernas rörelse och differentiering är mycket dåligt förstådda även om mycket möda är lagd på att försöka ta reda på detta. Den forskning som har gjorts redogör Noden och Trainor för i sin artikel från 2005. Ett antal pionjärarbeten har utförts för att mönsterlägga neurallistceller och undersöka de genetiska kontrollerna som styr deras utveckling. Dock har sådana studier bara gjorts i större utsträckning på afrikansk klogroda, kyckling, mus och i ett mindre antal på nejonöga, zebrafisk och människa. Ett projekt med detta syfte att kartlägga zebrafiskens neurallistceller skulle vara ett mycket tid- och resurskrävande sådant men inte desto mindre värdefullt. På grund av att zebrafiskar har yttre befruktning och deras ägg saknar amnion, kan man hypotetisera att designen av ett sådant experiment för zebrafisk skulle vara betydligt mindre avancerade än för mus och kyckling, som har amnion. Ett sådant experiment utfört på zebrafisk skulle troligtvis i större grad likna ett experiment med samma syfte utfört på groda. Men denna kartläggning av grodans neurallist lyser också med sin frånvaro i litteraturen. I min uppfattning är en sådan kartläggning av zebrafiskens neurallistceller värdefull att göra. Dessutom skulle man kunna skära ut och/eller transplantera olika rombomerer och undersöka de morfologiska följderna hos zebrafiskembryot. I det specifika fallet med hyoidbågen vore r4 av intresse eftersom cellerna från denna rombomer migrerar till hyoidbågen hos andra modellorganismer.

Trots att de mekanismer som styr neurallistcellernas rörelse hos zebrafisk är dåligt kända är mönsterläggning av hyoidbågen något mer undersökt och mer information om detta finns än om neurallisten. Ett flertal Hox-gener har visats styra utvecklingen av hyoidbågen hos mus, kyckling och zebrafisk. Detaljerna är dock i mindre grad undersökta. Exempelvis bör det undersökas vilka ytterligare homeoboxgener som samverkar med Hox-generna samt hur de olika homeoboxgenerna samverkar med varandra. Gener som är av intresse att antingen nedreglera eller helt slå ut är många; *Krox20*, *Kreisler*, *Cbfa1*, *Dlx1*, *Dlx2*, *Alx4*, *Bapx1*, *Six2* och *Msx* har alla visats ha ändrat gennuttryck då *Hoxa2s* uttryck har manipulerats i mus. Av denna anledning skulle det vara intressant att se huruvida deras uttryck förändras vid manipulering av zebrafiskens *Hoxa2*-gener.

Samtliga mutationer och gener som redovisas för och visades inverka på hyoidbågens utveckling i Schilling med fleras och Piotrowski med fleras artiklar från 1996 bör undersökas

närmare hos zebrafisken. Hur påverkar de nämnda generna (Tabell och 2) celldifferentiering och morfogenes av hyoidbågen. Med andra ord vilka mekanismer verkar på vägen från en uttryckt gen till ett fullt utvecklat element som är funktionellt och integrerat med en hel organism. Förslagsvis kan *Cre/loxP* och ROSA26-systemen användas för att undersöka detta.

Tack

Jag vill ge Bettina Ryll ett stort tack för att ha kommit på den fantastiska idén om uppsatsämne samt givande samtal om ämnet. Inte desto mindre tacksamhet riktas till Per E. Ahlberg för värdefulla kommentarer och synpunkter på texten samt ständig motpart i allehanda vetenskapliga diskussioner. Slutligen förtjänar mina idel tålmodiga föräldrar Eva och Björn Wretman tusen tack för ändlös uppmuntran och stöd samt korrekturläsning.

Referenser

- Alexandre D, Clarke JDW, Oxtoby, E, yan YI, Jowett T, Holder N. 1996 Ectopic expression of *Hoxa-1* in the zebrafish alters the fate of the mandibular arch neural crest and phenocopies a retinoic acid-induced phenotype. *Development* 122: 735-746.
- Baltzinger M, Ori M, Pasqualetti M, Nardi I, Rijli FM. 2005. *Hoxa2* Knockdown in *Xenopus* Results in Hyoid to Mandibular Homeosis. *Developmental Dynamics* 234: 858-867.
- Barrow JR, Stadler HS, Capecchi MR. 2000. Roles of *Hoxa1* and *Hoxa2* in patterning the early hindbrain of the mouse. *Development* 127: 933-944.
- Chambers D & McGonnell IM. 2002. Neural Crest: facing the facts of head development. *TRENDS in Genetics* 18: 381-384.
- Couly G, Le Dourain NM. 1990. Head morphogenesis in embryonic avian chimeras: evidence for a segmental pattern in ectoderm corresponding to neuromeres. *Development* 108: 543-558.
- Couly G, Graphin-Botton A, Coltey P, Ruhin B, Le Dourain NM. 1998. Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development. *Development* 125: 2445-3459
- Furutani-Seiki M, Jiang YJ, Brand M, Heisenberg CP, Houart C, Beuchle D, van Eeden FJ, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, Nüsslein-Volhard C. 1996. Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123:229-39.
- Gendron-Maguire M, Mallo M, Zhang M, Gridley T. 1993. *Hoxa-2* Mutant Mice Exhibit Homeotic Transformation of Skeletal Elements Derived from Cranial Neural Crest. *Cell* 75: 1317-1331.
- Graham A, Smith A. 2001. Patterning the pharyngeal arches. *BioEssays* 23: 54-61.
- Grammatopoulos GA, Bell E, Toole, L, Lumsden A, Tucker AS. 2000. Homeotic transformation of branchial arch identity after *Hoxa2* overexpression. *Development* 127: 5355-5365.
- Grevellec A, Tucker AS. 2010. The Pharyngeal pouches and clefts: Development, evolution, structure and derivatives. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21: 325-332.
- Gross JB, Hanken J. 2008. Review of fate-mapping studies of osteogenic neural crest in vertebrates. *Developmental Biology* 317: 389-400.
- Gross JB, Hanken J. 2004. Use of fluorescent dextran conjugates as a long-term marker of osteogenic neural crest in frogs. *Dev. Dyn.* 230: 100-106.
- Hammerschmidt M, Pelegri F, Mullins MC, Kane DA, Brand M, van Eeden FJ, Furutani Seiki M, Granato M, Haffter P, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kelsh RN, Odenthal J, Warga RM, Nüsslein-Volhard C. 1996. Mutations affecting morphogenesis during gastrulation and tail formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123:143-51.
- Holder N och Hill J. 1991. Retinoic acid modifies development of the midbrain-hindbrain border and affects cranial ganglion formation in zebrafish embryos. *Development* 113: 1159-1170
- Hunter PM och Prince VE. 2002. Zebrafish Hox Paralogue Group 2 Genes Function Redundantly as Selector Genes to pattern the Second Pharyngeal Arch. *Developmental Biology* 247: 367-389.
- Ikeno M, Suzuki N, Hasegawa Y, Okazaki T. 2009. Manipulating transgenes using a chromosome vector. *Nucleic Acids Res* 37: (6) e44 ??-??. PMID: 19223328, PMCID: PMC2665236.
- Kanzler B, Kuschert SJ, Liu YH, Mallo M. 1998. *Hoxa2* restricts the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area. *Development* 125: 2587-2597.

- Kelsh RN, Brand M, Jiang YJ, Heisenberg CP, Lin S, Haffter P, Odenthal J, Mullins MC, van Eeden FJM, Furutani-Seiki, Granato M, Hammerschmidt M, Kane DA, Warga RM, Beuschle D, Vogelsang L, Nüsslein-Volhard C. 1996. Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. *Development* 123: 369-389.
- Köntges G, Lumsden A. 1996. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* 122: 3229-3242.
- Linney E, Hardison NL, Lonze BE, Lyons S, DiNapoli L. 1999. Transgene Expression in Zebrafish: A Comparison of Retro-vector and DNA-Injection Approaches. *Developmental Biology* 213: 207-216.
- Lohnes m fl. 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development I. Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 12: 2723-2748.
- Lufkin T, Dierich A, LeMeur M, Mark M, Chambon P. 1991. Disruption of the Hox-1.6 homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* 66: 1105-1119.
- Lumsden A, Sprawson N, Graham A. 1991. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* 113: 1281-1291.
- Martinez P och Amemiya CT. 2002. genomics of HOX gene clusters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 133: 571-580.
- Matsuoka T, Ahlberg PE, Kessar N, Iannarelli P, Dennehy U, Richardson WD, McMahon AP, Koentges G. 2005. Neural crest origins of the neck and shoulder. *Nature* 436: 347-355.
- McGinnis W och Krumlauf R. 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68: 283-302.
- Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. 1998. An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre-and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* 18: 136-141.
- Miller C, Schilling TF, Lee K, Parker J, Kimmel CB. 2000. Sucker encodes a zebrafish endotelin-1 required for ventral pharyngeal arch development. *Development* 127: 3815-3828.
- Noden DM. 1983. The role of neural crest in patterning avian cranial skeleton, connective and muscle tissues. *Developmental Biology* 96: 114-165.
- Noden DM. 1988. Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. *Developmental Biology*: 103 Supplement: 121-140.
- Noden DM, Trainor PA. 2005. Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat.* 207: 575-601.
- Olsson L, Ericsson R, Cerny R. 2005. Vertebrate head development: Segmentation, novelties and homology. *Theory in Biosciences* 124: 145-163.
- Pasqualetti M, Ori M, Nardi I, Rijli FM. 2000. Ectopic *Hoxa2* induction after neural crest migration results in homeosis of jaw elements in *Xenopus*. *Development* 127: 5367-5378.
- 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.
- Prince V, Lumsden A. 1994. *Hoxa-2* expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development* 120: 911-923.
- Qiu M, Bulfone A, Martinez S, Meneses JJ, Shimamura K, Pedersen RA, Rubenstein JLR. 1997. Null mutations of *Dlx-2* results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain. *Genes Dev.* 9: 2523-2538.
- Rijli FM, Mark M, Lakkaraju S, Dierich A, Dolle P, Chambon P. 1993. A homeotic

- transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa-2*, which acts as a selector gene. *Cell* 75: 1333-1349.
- Rodríguez-Vázquez JF, Mérido-Valasco JR, Verdugo-López S, Sánchez-Montesinos I, Mérido-Valasco JA. 2006. Morphogenesis of the second pharyngeal arch cartilage (Reichert's cartilage) in human embryos. *Journal of Anatomy* 208: 179-189.
- Seok SH, Na YR, Han JH, Kim TH, Jung H, Lee BH, Emelyanov A, Parinov S, Park JH. 2009. Cre/loxP-regulated transgenic zebrafish model for neural progenitor-specific oncogenic Kras expression. *Cancer Sciences* 101:149-154.
- Schilling TF, Kimmel CB. 1994. Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. *Development* 122: 895-904.
- Schilling TF, Walker C, Kimmel CB. 1996. The *chinless* mutation and neural crest cell interactions in zebrafish jaw development. *Development* 122: 1417-1426.
- Schilling TF. 1997. Genetical analysis of craniofacial development in the vertebrate embryo. *BioEssays* 19: 459-468.
- Schilling TF, Piotrowski T, Grandel H, Brand M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Beuchle D, Hammerschmidt M, Kane DA, Mullins MC, van Eeden FJM, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Granato M, Haffter P, Odenthal J, Warga RM, Trowe T, Nüsslein-Volhard C. 1996. Jaw and branchial arch mutants in zebrafish I: branchial arches. *Development* 123: 329-344.
- Schilling TF, Kimmel CB. 1997. Musculoskeletal patterns in the pharyngeal segments in the zebrafish embryo. *Development* 124: 2945-2960.
- Schilling TF, Prince V, Ingham PW. 2001. Plasticity in Zebrafish hox Expression in the Hindbrain and Cranial Neural Crest. *Developmental Biology* 231: 201-216.
- Soriano P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature Genetics* 21: 70-71.
- Studer M, Popperl H, Marshall M, Kuroiwa A, Krumlauf R. 1994. Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of *Hoxb-1*. *Science* 265: 1728-1732.
- Trainor PA, Krumlauf R. 2001. Hox genes, neural crest cells and branchial arch patterning. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 698-705.
- Trowe T, Klostermann S, Baier H, Granato M, Crawford AD, Grunewald B, Hoffmann H, Karlstrom RO, Meyer SU, Müller B, Richter S, Nüsslein-Volhard C, Bonhoeffer F. 1996. Mutations disrupting the ordering and topographic mapping of axons in the retinotectal projection of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123: 439-450.
- Tümpel S, Macanochie M, Wiedermann LM, Krumlauf R. 2002. Conservation and Diversity in the cis-Regulatory Networks That Integrate Information Controlling Expression of *Hoxa2* in Hindbrain and Cranial Neural Crest Cells in Vertebrates. *Developmental Biology* 246: 45-56.
- Tümpel S, Cambroner F, Ferretti E, Blasi F, Wiedermann LM, Krumlauf R. 2007. Expression of *Hoxa2* in rhombomere 4 is regulated by a conserved cross-regulated mechanism depend upon *Hoxb1*. *Developmental Biology* 302: 646-660.
- van Eeden FJ, Granato M, Schach U, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, Warga RM, Nüsslein-Volhard C. 1996. Genetic analysis of fin formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123: 255-62.
- Walshe J, Mason I. 2003. *Fgf* signalling is required for formation of cartilage in the head. *Developmental Biology* 264: 522-536.
- Whitfield TT, Granato M, van Eeden FJ, Schach U, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, Nüsslein-Volhard C. 1996. Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development* 123:241-54.

- Yoshikawa S, Kawakami K, Zhao XC. 2008. G2R Cre Reporter Transgenic Zebrafish. *Dev. Dyn.* 237: 2460-2465.
- Zhang M m fl. 1994. Ectopic *Hoxa-1* induces rhombomere transformation in mouse hindbrain. *Development* 120: 2431-2442.