

GRA W RĘKĘ

SLEIGHT OF HAND

Przemko TYLZANOWSKI

Lab of Skeletal Development and Joint Disorders, University of Leuven, Belgium

Streszczenie: Rozwijające się kończyny kręgowców są powszechnie używanym modelem doświadczalnym do badania mechanizmów różnicowania tkankowego. Metody badawcze oparte na nowoczesnych technikach genetycznych i molekularnych pozwoliły na powtórne przeanalizowanie, i czasami podważenie, długo istniejących hipotez dotyczących rozwoju kończyn u kręgowców. Jedną z nich dotyczy mechanizmu różnicowania się kończyny wzdłuż osi proksymalno-dystalnej (P-D), opartego na obecności tak zwanej Strefy Rozwoju. Wyniki ostatnich badań sugerują inny model różnicowania się wzdłuż tej osi, oparty na tak zwanej predeterminacji. Nowe doświadczenia wykazały też nieoczekiwaną rolę, jaką szlak regulowany przez *Sonic hedgehog* (*Shh*) odgrywa w określaniu ilości i tożsamości palców. Wyniki tych prac są dyskutowane w tym artykule.

Słowa kluczowe: embriologia, rozwój kończyn, czynnik wzrostu fibroblastów, Fgf, Shh, Wnt, palce, różnicowanie tkankowe.

Summary: Developing vertebrate limb is a model system frequently used to study tissue differentiation and patterning. Research methods based on sophisticated genetic and molecular embryology techniques allowed revising some of the longstanding hypotheses in this field of research. One of them proposed the mechanism of limb development along proximal-distal axis based on the existence of Progress Zone. Recent results propose an alternative model of limb differentiation along this axis, so called Predetermination Model. Additionally, an unexpected function of sonic hedgehog in the determination of digit number and identity was recently proposed. Some of those findings will be discussed in this article.

Keywords: embryology, limb development, Fgf, Shh, Wnt, digits, patterning.

Lista skrótów: **AER** (*Apical Ectodermal Ridge*) – szczytowy grzebień ektodermalny; **AP** – oś anterioposterialna; **BMP** (*Bone Morphogenetic Protein*) – morfogenetyczne białko kości; **dpc** (*days post coitus*) – dni po zapłodnieniu; **DV** – oś dorsalno-wentralna; **Fgf** (*Fibroblast Growth Factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów; **PD** – oś proksymalno-dystalna; **PTH** (*Parathyroid Hormone*) – parathormon; **PZ** (*Progress Zone*) – strefa postępu; **Shh** (*Sonic hedgehog*) – stadium HH – stadium rozwoju zarodka kury według Hamburgera i Hamiltona; **TGFβ** – (*Transforming Growth Factor beta*) – transformujący czynnik wzrostu beta; **ZPA** (*zone of polarizing activity*) – strefa polaryzującej aktywności.

WSTĘP

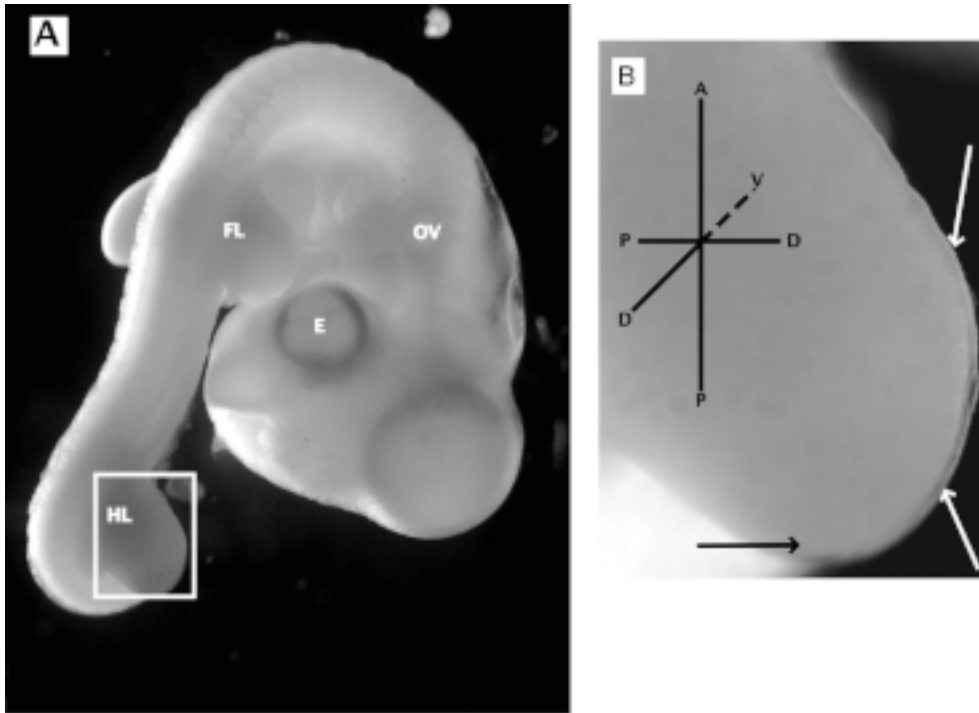
Proces rozwoju embrionalnego jest przedmiotem badań od wielu dekad, a nawet wieków [3]. Pionierskie doświadczenia zostały przeprowadzone przez Spemann i Mangold, którzy używając techniki przeszepów, wykazali obecność centrów organizacyjnych w rozwijających się zarodkach żab [33]. Centra te dostarczają wydzielanych białek, które wpływają na otaczające je komórki regulując ich proliferację i różnicowanie. Potrzeba było dodatkowych 50 lat, aby te bardzo ważne odkrycia zostały przeanalizowane na poziomie molekularnym. Jedną z interesujących konsekwencji tej pracy było uświadomienie sobie, że takie centra sygnalizacyjne nie tylko istnieją u organizmów innych niż żaby, ale pozostają aktywne w czasie późniejszych etapów rozwoju organizując inne „mniejsze” struktury, takie jak: serce, nerki czy kończyny.

W wyniku nagromadzenia większej ilości molekularnych i genetycznych danych okazało się, że tylko kilka sygnalizacyjnych szlaków jest wielokrotnie używanych poprzez rozwój embrionalny. Oddziałują one na siebie poprzez czasami bardzo skomplikowane sieci powiązań uformowane w tych centrach sygnalizacyjnych. Większość z tych szlaków jest regulowana przez ligandy należące do jednej z następujących rodzin białek: Wnt, TGF β /BMP, Fgfs, Hedghogs, Notch i/lub hormonów (steroidowych, parathormon – PTH, kwas retinowy) [44].

Istnieje wiele systemów doświadczalnych używanych w badaniach molekularnych i genetycznych podstaw regulujących indukcję tkanek i ich różnicowanie. Jednym z bardziej popularnych modeli doświadczalnych są rozwijające się kończyny kręgowców [40]. Dla uproszczenia, w tym artykule kończyny przednie i tylne będą nazywane kończynami, chyba że zaznaczono inaczej.

Rozwój kończyny zaczyna być morfologicznie widoczny u myszy około 9,5 dnia po zapłodnieniu (ang. *days post coitum* – dpc), a u kurczaka po około trzech dniach (ryc. 1A). Proces ten rozpoczyna się od tworzenia zawiązka kończyny składającego się z komórek mezenchymalnych pochodzących z płytki bocznej mezodermy otoczonych ektoderłą. Podczas indukcji kończyny, ektoderma grubieje i tworzy strukturę zwaną ektodermalnym grzebieniem szczytowym – AER (*Apical Ectodermal Ridge*). Potem kończyna kontynuuje wzrost tworząc stylopodium (ramię do łokcia), zygotopodium (łokieć do nadgarstka) i autopodium (dłoń) (ryc. 2). Jako w pełni uformowana, kończyna staje się skomplikowanym organem składającym się z licznych tkanek i struktur, niektórych powstałych lokalnie (kość i chrząstka), a niektórych takich, które przywędrowały do kończyny ze sklerotomu (mięśnie), naczyń krwionośnych i tkanek nerwowych [11].

Kończyna ma trzy osie symetrii, określone przez trzy centra sygnalizacyjne. Oś proksymalno-dystalna (PD lub bliższodalsza) przechodzi w kierunku od ramienia do czubków palców. Jest to kierunek głównego wzrostu ręki, regulowany przez białka wydzielane z AER. Oś anterioralno-posterialna (AP lub przednio-tylna) przechodzi od kciuka (palec 1) do małego palca (palec 5). Ta oś jest regulowana przez centrum sygnalizacyjne umieszczone w posterialnej części pączka kończyny, tak zwanej Strefie Polaryzującej Aktywności – ZPA (*zone of polarizing activity*). Trzecia oś, dorsalno-wentralna (DV lub plecowo-brzuszną), określa grzbiet i wewnętrzną stronę dłoni. Jest



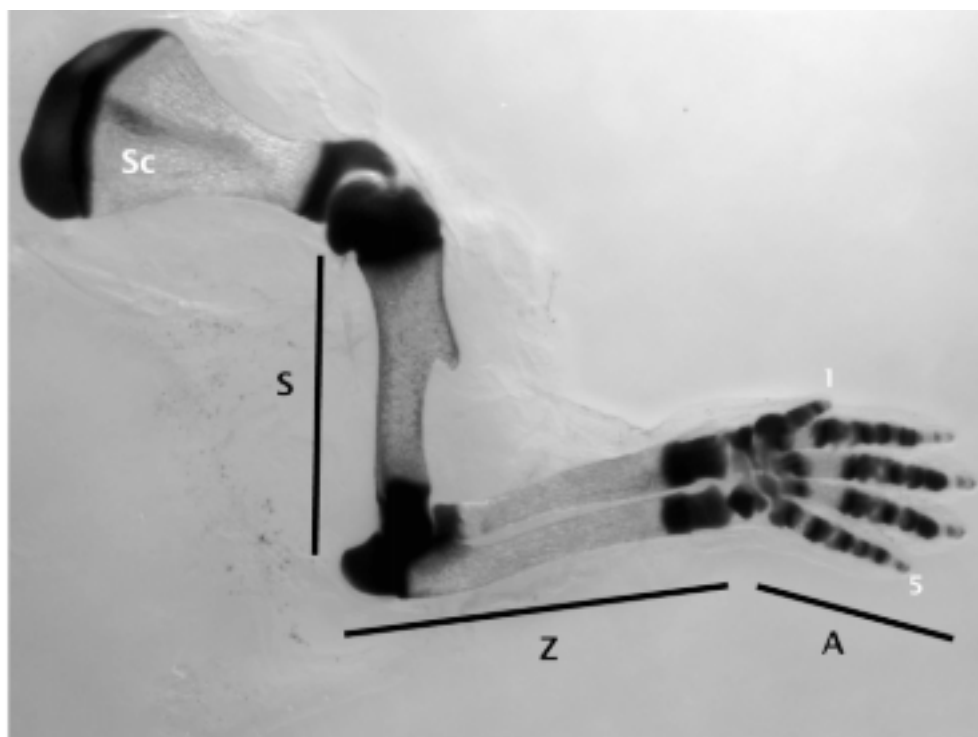
RYCINA 1. A) Zdjęcie rozwijającego się zarodka kury w stadium HH 23. E – oko, OV – rozwijające się ucho, FL – pąk skrzydła, HL – pąk nogi. Białym prostokątem jest zaznaczona kończyna tylna, powiększona w B). Schemat w B) pokazuje kierunki osi AP (górną - dół), PD (blisko - daleko) i DV (przód - tył). Czarna strzałka wskazuje obszar zajmowany przez ZPA. Struktura zaznaczona białymi strzałkami to AER

ona regulowana przez sygnały pochodzące z brzusznej ektodermy pokrywającej mezenchymę kończyny [41]. W tym artykule skoncentruję się na wynikach ostatnich badań, które poszerzają nasze zrozumienie, jak tworzą się osie PD i AP w trakcie rozwoju kończyn (ryc. 1B).

Jedną grupą czynników odpowiedzialną za układanie planu kończyny są produkty genów z rodziny *hox*. Funkcja tych genów została niedawno opisana i dlatego nie będzie poruszona w tym artykule [18]. Podstawy biologii rozwoju kończyn zostały też przedstawione w niedawno opublikowanym Zarysie Organogenezy [4].

PORÓWNANIE MODELI STREFY ROZWOJU I PREDETERMINACJI

Wczesne wyniki badań, których celem było zrozumienie mechanizmu wzrostu wzdłuż osi PD i różnicowania komórkowego w tym kierunku, wskazywały na regulacyjną funkcję AER w tych procesach. Jego usunięcie lub jakiegokolwiek inne uszkodzające



RYCINA 2. Preparat szkieletowy barwiony Alcian blue (czarne na zdjęciu) i Alizaryną Czerwoną (jasnoszare na zdjęciu) przedniej kończyny myszy w stadium 18.5 dpc. Czarny kolor zaznacza rozwijającą się chrząstkę, szary kolor barwi rozwijającą się kość. Sc – łopatką, S – stylopod, Z – zygopod, A – autopod. Numer 1 oznacza palec 1 – kciuk, numer 5 oznacza palec 5 – mały palec. Palec 1 określa anterioralną stronę autopodu, a palec 5 – posterioralną

manipulacje zawsze wywołują deformacje kończyn wzdłuż głównej osi wzrostu [45, 42, 32, 35]. Co ważniejsze, fenotyp spowodowany tymi manipulacjami jest bezpośrednio uzależniony od stadium rozwoju, w którym taka manipulacja zostanie przeprowadzona. Usunięcie AER we wczesnych stadiach pozwala tylko na rozwój stylopodium, podczas gdy usunięcie AER w późniejszych stadiach pozwala na utworzenie zygo-, a nawet autopodium [28]. Poszukiwania białek odpowiedzialnych za aktywność AER wykazały, że Czynniki Wzrostu Fibroblastów (*Fibroblast Growth Factor*) Fgf4 lub Fgf8 są wystarczające i konieczne do regulacji wzrostu kończyn wzdłuż osi PD. Na przykład u rozwijających się zarodków kurczaków, wszczepienie perełek nasączonych Fgf4 lub Fgf8 w odległych częściach kończyn, zapobiega hamowaniu wzrostu i różnicowania komórek wywołanych brakiem AER [24, 43].

Rezultaty otrzymane w wyżej wymienionych pracach dostarczyły molekularnych podstaw do tak zwanego Modelu Strefy Postępu [35]. W tym modelu, długość czasu spędzonego przez komórki mezenchymalne znajdujące się tuż pod AER, w tak zwanej Strefie Postępu – PZ (*Progress Zone*), określałaby ich tożsamość. Innymi słowy, im dłużej te komórki pozostają w tej strefie, tym bardziej odległe struktury kończyn z

nich powstają. Ostatnio nowe badania, jak też reinterpretacja poprzednich wyników doprowadziły do stworzenia nowego modelu opisującego różnicowanie kończyn wzdłuż osi PD. Ten nowy model tak zwanej prespecyfikacji proponuje, że komórki mezenchymalne są zaprogramowane, aby uczestniczyć w tworzeniu stylo-, zygo- i autopodium już we wczesnym stadium tworzenia pąka kończynowego. W konsekwencji nie byłoby ważne, ile czasu spędzają one w Strefie Postępu. Zamiast tego komórki byłyby „naznaczone” do uczestniczenia w tworzeniu odpowiednich struktur kończyn niezależnie od czynnika czasowego.

Wykorzystując technikę inaktywacji genu kodującego *Fgf8* w myszach zostało pokazane, że jak przewidziano w modelu Strefy Postępu, białko *Fgf8* było niezbędne do wzrostu wzdłuż osi PD [17, 23]. Podobnie więc, jak u kurczaków, białko *Fgf8* było niezbędne do rozwoju kończyn, ale kilka kwestii zostało w dalszym ciągu nierozwiązanych. Jedną z nich był czasowy wymóg obecności *Fgf8*. Czy jest to białko potrzebne tylko do indukcji kończyny, czy też do jej utrzymania? Kolejna kwestia opierała się na fakcie, że inne białka z rodziny *Fgf* mogłyby być zaangażowane we wzrost wzdłuż osi PD. Tak więc, podczas gdy *Fgf8* byłoby konieczne, nie byłoby wystarczające do całkowitej regulacji tego procesu. Zamiast tego *Fgf8* mogłoby indukować inne białka z rodziny *Fgf*, które regulowałyby proces wzrostu wzdłuż osi PD.

Aby rozwiązać pierwszy problem, Gail Martin i współpracownicy udoskonalili strategię regulowanej inaktywacji genów [36]. W tych doświadczeniach zastosowano powszechnie używaną technologię opartą na rekombinacji DNA za pośrednictwem *Cre* rekombinazy [30]. Używając tej strategii, można wygenerować myszy, u których gen przeznaczony do inaktywacji zostaje otoczony sekwencjami *LoxP*. Krzyżując te myszy z myszami, u których *Cre* rekombinaza jest pod kontrolą promotora aktywnego w określonych tkankach, spowoduje się rekombinację pomiędzy sekwencjami *LoxP* i usunięcie genu tylko w tkankach, gdzie *Cre* uległo ekspresji. *Cre* rekombinaza w doświadczeniach przeprowadzonych przez grupę Gail Martin była pod kontrolą promotora genu *msx2*, który ulega ekspresji tylko w AER.

Interesującą cechą ekspresji *msx2* jest jego dynamika. Rozwój kończyn przednich, włączając w to indukcję AER i ekspresję *Fgf8*, wyprzedza rozwój kończyn tylnych o około pół dnia [36]. Ponieważ kończyna przednia rozwija się wcześniej, *Fgf8* ulega ekspresji wcześniej w kończynie przedniej niż w tylnej. Z drugiej strony ekspresja genu *msx2* ma dokładnie odwrotną dynamikę, ulega ono ekspresji w kończynie tylnej, zanim zostanie aktywowane w kończynie przedniej, z różnicą kilku godzin. Zatem w doświadczeniach Gail Martin i współpracowników, *msx2* było aktywowane w kończynie przedniej po aktywacji *Fgf8*, podczas gdy w kończynie tylnej było ono aktywowane przed aktywacją *Fgf8*. W opisanych badaniach *Cre* rekombinaza w kończynach tylnych była zatem aktywowana, zanim *Fgf8* uległ ekspresji, powodując takie same dramatyczne zniekształcenia, jak podczas całkowitej inaktywacji tego genu. Otrzymany fenotyp w kończynie przedniej był jednak zaskakujący. Jej rozwój, jakkolwiek niecałkiem normalny, przebiegał bez dramatycznych zmian i pozwalał na tworzenie wszystkich elementów kostnych. Ponieważ dezaktywacja *Fgf8* w tej kończynie nastąpiła około jednej godziny po indukcji *Fgf8*, ten wynik sugerował, że krótki okres aktywacji *Fgf8* był wystarczający do utrzymania rozwoju całej kończyny. *Fgf8* byłby więc potrzebny do indukcji, ale nie do podtrzymania wzrostu kończyn.

Niemniej istniała możliwość, że względnie łagodny fenotyp spowodowany zakłóceniami w ekspresji Fgf8 w kończynach mógł być spowodowany kompensacyjnym działaniem innych białek z rodziny Fgf. Dlatego też grupa Gail Martin stworzyła myszy, z których usunięto nie jeden, ale dwa geny, używając powyżej opisanej metody opartej na *msx2-Cre* regulowanej inaktywacji genów [36]. Poza Fgf8, autorzy zdezaktywowali Fgf4, znany cel sygnalizacji przez Fgf8 w kończynach. Dezaktywacja tylko Fgf4 nie powodowała deformacji kończyn [23]. Natomiast myszy po dezaktywacji obu genów Fgf4 i Fgf8 w ogóle nie miały tylnych kończyn. Wynik ten wskazuje, że Fgf4/8 są konieczne i wystarczające do indukcji kończyny tylnej. Natomiast kończyny przednie u tych myszy mogły jednak powstać, chociaż ich fenotypy były różne, począwszy od raczej poważnych (tylko jeden dystalny segment był obecny) do raczej łagodnych (stylo-, zygo i autopod elementy były obecne) wskazując na to, że okres działania Fgf4/8 przez około 60 minut był wystarczający, aby wzbudzić rozwój kompletnej kończyny. Podobne wyniki zostały otrzymane przez Capecchi i współpracowników [5].

Rezultaty tych badań kontrastowały z proponowanym wymogiem obecności Fgf8 we wszystkich stadiach rozwoju kończyn, jak było to sugerowane przez model Strefy Postępu. Z powodu wątpliwości, czy może ten nieoczekiwany fenotyp był wynikiem kompensacji przez jeszcze inne Fgf obecne w rozwijającej się kończynie i wymieniające/zastępujące Fgf8, zostały przeprowadzone dodatkowe doświadczenia oparte na analizie myszy, u których zdezaktywowano geny kodujące innych członków rodziny Fgf. Dokonano tego stosując powyżej opisaną strategię z wykorzystaniem rekombinazy Cre (przedstawione na Limb Conference w Dundee, July 2004). Te podwójne i potrójne nokauty genów z rodziny Fgf w rozwijających się kończynach myszy dostarczyły dodatkowych i interesujących informacji. Na przykład, jednoczesna dezaktywacja obu genów Fgf8 i 9 spowodowała pośredni fenotyp pomiędzy Fgf4/8 i Fgf8. Potrójna dezaktywacja Fgf4, 9 i 17 nie miała jakiegokolwiek wpływu na rozwój kończyny potwierdzając ważną funkcję, jaką pełnią Fgf4/8 w tym procesie (Dundee Limb Conference 2004). W sumie, spośród 23 znanych Fgf, tylko Fgf4 może zastąpić Fgf8 w testach *in vitro*, a w czasie rozwoju kończyn transkrypcja tego genu jest zahamowana u myszy, które nie mają Fgf8, co tłumaczy relatywnie łagodny fenotyp spowodowany inaktywacją tylko genu Fgf8. Te wyniki pozwoliły stwierdzić, że ekspresja Fgf8, pomimo że jest wymagana do kontroli liczby komórek na początku formowania kończyny, nie jest potrzebna do jej utrzymywania, oraz że Fgf4 mogło kompensować nieobecność Fgf8 podczas wzrostu wzdłuż osi PD. Ta kompensacja jest jednak bardzo dokładnie określona w czasie, ponieważ około 90 min ekspresji było wystarczające, aby kończyny rozwinęły się prawie normalnie. Zatem, wbrew długo przeważającej hipotezie, sygnalizacja regulowana przez Fgf nie jest wymagana do utrzymywania osi PD.

Badania przeprowadzone w rozwijających się zarodkach kurzych dostarczyły dodatkowych wyników stawiających pod znakiem zapytania model Strefy Postępu. W tym przypadku badacze jeszcze raz przeanalizowali konsekwencje usunięcia AER z rozwijającej się kończyny [10]. Podczas tych eksperymentów, tak jak już wiele lat temu zauważono, że usunięcie AER powodowało apoptozę w komórkach mezodermy znajdującej się pod AER [15]. Problem apoptozy w tych warunkach nie był badany przez wiele lat, ale łatwo sobie wyobrazić, że usunięcie AER mogło spowodować

skrócenie kończyn, nie dlatego, że brakowało jakiegoś szczególnego sygnału, ale po prostu dlatego, że komórki, które miały wchodzić w skład kończyny, umierały w skutek mikromanipulacji. Dlatego też usunięcie AER w późniejszych stadiach rozwoju powodowało mniej drastyczne skrócenie kończyn, ponieważ już znaczna część kończyny została utworzona. Aby sprawdzić, czy FGF8 funkcjonowało w AER jako stymulator proliferacji komórkowej, eksperyment polegający na zastąpieniu AER czynnikiem wzrostu Fgf8 został powtórzony [10]. Autorzy pokazali, że rzeczywiście dodanie Fgf8 wzbudziło proliferację komórkową i mogło odwrócić efekt usunięcia AER. A co ważniejsze, ten efekt nie pojawiał się, jeśli okres pomiędzy usunięciem AER i dodaniem Fgf8 był zbyt długi. Było to prawdopodobnie spowodowane śmiercią zbyt wielu komórek zainicjowaną usunięciem AER, a tym samym brakiem Fgf8.

Następnie przeprowadzono eksperymenty znakowania komórek używając barwników fluorescencyjnych. W tych badaniach, barwniki zostały wstrzyknięte w rozwijające się kończyny kurzych embrionów i tak wyznakowane komórki były obserwowane w trakcie rozwoju kończyn. Precyzyjna lokalizacja zastrzyków pozwoliła na prześledzenie losu komórek w regionach tuż pod AER. Autorzy wstrzyknęli Dil, fluoryzujący barwnik, w różnej odległości od AER w stadium Hamburgera-Hamiltona (HH) 19 [12] i przeanalizowali lokalizację tego barwnika trzy dni później. Byli oni w stanie pokazać, że Dil oznaczył regiony stylo-, zygo- lub autopodu, co wskazuje na to, że komórki w mezenchymie kończyny były bardzo wcześnie zaprogramowane do udziału w formowaniu tych struktur. Wyniki eksperymentów polegających na przeszczepach regionów sub-AER na kikuty kończyn dawców dodatkowo umocniły hipotezę mówiącą, że komórki są zdeterminowane do formowania struktur kończyn bardzo wcześnie w rozwoju [10].

Czy zatem Model Strefy Postępu nadaje się do lamusa? Obecnie badacze w dziedzinie biologii rozwoju kończyn są podzieleni na dwa współzawodniczące ze sobą obozy i nie jest jeszcze całkiem rozstrzygnięte, który model lepiej tłumaczy wzrost kończyn w osi PD [21]. Podczas gdy nowy model tłumaczy stare i nowe rezultaty lepiej niż poprzednia hipoteza, nie jest jeszcze w stanie wytłumaczyć wszystkich uzyskanych wyników, tak więc na ostatnie słowo w tej kwestii trzeba będzie jeszcze poczekać.

TOŻSAMOŚĆ PALCA, CZYLI HISTORIA Shh

Tworzenie osi AP było przedmiotem intensywnych badań i także w tej kwestii ostatnie wyniki przyniosły kilka niespodzianek. Jednym z doświadczalnych systemów najczęściej używanych do studiowania tworzenia się tej osi jest proces formowania się palców i określania ich tożsamości. Doświadczenia te są przeprowadzane u myszy lub kur, jednak rozwijający się kurczak jest ciągle najbardziej popularnym modelem badawczym. Jedną z zalet tego systemu jest to, że palce u kurczaka mają zmienną liczbę stawów zależnie od miejsca, jakie ten palec zajmuje wzdłuż osi AP. Podczas gdy u myszy wszystkie palce, poza kciukiem (palec 1), mają tę samą liczbę stawów, u kurczaka każdy palec ma wzrastającą liczbę stawów w kierunku AP. Tak więc najbardziej anterioralny palec (kciuk) ma dwa stawy, kolejny 3 itd., co pozwala na łatwe określanie tożsamości palców i tworzy system bardzo przydatny do badania czynników interferujących z tworzeniem się osi AP.

Podczas rozwoju embrionalnego, mezenchyma znajdująca się w przyszłym autopodzie kondensuje się tworząc tak zwane promienie palcowe, które następnie ulegają różnicowaniu. Region odpowiedzialny za to różnicowanie jest nazywany Strefą Aktywności Polaryzującej – ZPA (*zone of polarizing activity*) i jest ulokowany w najbardziej posterioralnej (tylnej) części pąka kończyny (ryc. 1B, strzałka). Ten region został zidentyfikowany w latach sześćdziesiątych XX wieku przez J. Saundersa i współpracowników, którzy przeprowadzili różnego rodzaju transplantacje tkanek kończyny [31]. Na przykład, gdy tylna część tego pąka została przeszczepiona na przednią część innego pąka, powstający autopod rozwinął się z lustrzaną duplikacją palców. Tak więc zamiast porządku 2, 3, 4 palców w skrzydle w kierunku AP, powstał autopod z palcami 4, 3, 2, 2, 3, 4. Poszukiwania molekularnych podstaw tego procesu wykazały, że głównym białkiem odpowiedzialnym za polaryzację w kierunku AP był *Sonic Hedgehog* (Shh) [14, 27]. Wszczepienie perełki nasyconej Shh w przednią część pąka kończyny, tak jak i transplantacja ZPA, powodowały bowiem lustrzaną duplikację palców. Ponieważ nowoutworzone palce utrzymywały poprawną tożsamość zdefiniowaną za pomocą liczby stawów, badania te sugerowały, że Shh nie tylko byłby odpowiedzialny za tworzenie osi AP i indukcję palców, ale też określałby ich tożsamość w zależności od stężenia, zachowując się tym samym jak morfogen.

Nowe wyniki sugerują jednak, że funkcja Shh w określaniu osi AP nie jest tak prosta, jak było to początkowo postulowane. Na przykład, można by oczekiwać, że dezaktywacja Shh spowoduje nieobecność wszystkich palców, a nawet utratę całej kończyny. Niespodziewanie, dezaktywacja Shh pozwoliła na powstanie stylo- i zygopodu, a nawet na częściowe utworzenie autopodu z jednym palcem w kończynach tylnych myszy i pozostałości palca w kończynach przednich [7, 34, 8]. Ten wynik zakwestionował dotychczas proponowaną rolę Shh jako kluczowego białka regulującego różnicowanie się kończyn i powstawanie palców. Nawet więcej, dostarczył dowodów, że Shh nie jest wcale wymagany do tworzenia stylo- lub zygopodu, ani do tworzenia przynajmniej jednego palca. Te wyniki stały się jeszcze bardziej interesujące, gdy przeanalizowano myszy, u których zdeaktywowano geny kodujące białka zaangażowane w przekazanie sygnału przez Shh.

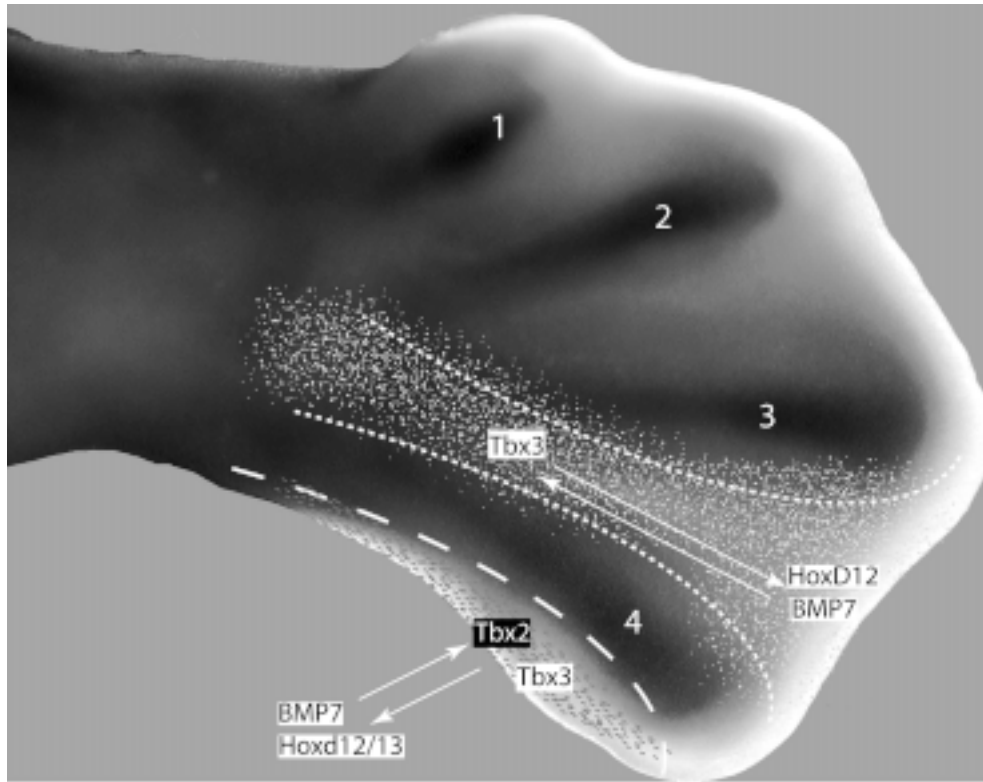
Shh bierze udział w przekazywaniu sygnałów w komórce poprzez wiązanie się do kompleksu receptorów *Patched-Smoothed* (Ptc-Smo) znajdujących się na błonie komórkowej. Wiązanie się Shh do tego kompleksu, a w szczególności do Ptc, powoduje, że represja Smo przez Ptc zostaje usunięta pozwalając Smo na aktywację członków rodziny czynników transkrypcyjnych Gli w komórce. Znane są trzy białka z tej rodziny: Gli1, 2 i 3. Wszystkie trzy ulegają ekspresji w rozwijających się kończynach, głównie w niepokrywających się obszarach [6, 22]. Zostało zaproponowane, że Gli3 jest najważniejszym czynnikiem z tej rodziny przekazującym sygnał pochodzący od białka Shh w rozwijających się kończynach. Ta hipoteza została oparta na wynikach analizy myszy, u których geny Gli1, 2 lub 3 zostały zdeaktywowane. Tylko dezaktywacja Gli3 powodowała zmiany fenotypu kończyn [22, 25]. Zaskakująco, dezaktywacja Gli3 odkryta w spontanicznym mysim mutancie *extratoes* spowodowała przedosiową polidaktylię, sugerując, że szlaki przekazywania sygnału przez Shh zależne od Gli3

ograniczyłyby raczej niż indukowały ilość palców [16]. Ponadto, podwójna dezaktywacja genów *Shh/Gli3* „ratowała” do pewnego stopnia fenotyp dezaktywacji genu *Shh*, przywracając wielopalczastość i tym samym wskazując, że ani *Gli3*, ani *Shh* nie są potrzebne do indukcji lub regulacji liczby palców [19].

Jak można by tłumaczyć te wyniki? *Gli3* jest bipotencjalnym czynnikiem transkrypcyjnym, który może działać jako represor lub aktywator transkrypcji. Jeśli białko *Gli3* jest poddane specyficznej wewnątrzkomórkowej proteolizie, działa ono jako represor (*Gli3R*). *Shh*, poprzez *Smo*, blokuje proces proteolizy przekształcając *Gli3* w formę aktywatora (*Gli3A*) [29]. Tak więc w normalnej sytuacji *Gli3R* jest obecne w całym autopodzie, a *Shh*, produkowany w ZPA, formuje gradient wzdłuż osi AP. *Gli3R* znajdujący się blisko ZPA jest pod wpływem *Shh*, który regulując przekształcenie *Gli3R* w *Gli3A*, pozwala tym samym na formowanie określonej liczby palców (pięciu u myszy). Pod nieobecność genu kodującego *Gli3* (mysi mutant *extratoes*), *Gli3A* nie może powstać, a jednocześnie pojawiają się dodatkowe palce. Ten wynik sugeruje, że *Gli3A* reguluje ilość palców w negatywny sposób, poprzez ograniczanie ich ilości do pięciu. Z kolei podczas nieobecności *Shh*, tylko *Gli3R* jest obecne w komórkach, pozwalając na tworzenie tylko palca 1 (kciuka) [19]. Przedstawione wyniki wskazują na dwie istotne rzeczy.

Jedną z nich jest to, że represorowa forma *Gli3* (*Gli3R*) skutecznie blokuje tworzenie się palców 2–5. Drugą jest możliwość, że szlaki regulowane przez *Shh* nie są zaangażowane w tworzenie się przynajmniej pierwszego palca, kciuka. Pod nieobecności obu genów wielopalczastość zostaje znów przywrócona wskazując na to, że jeszcze inny, dotychczas niezny mechanizm reguluje tworzenie się palców. Interesującym aspektem tego wyniku jest możliwość, że być może istnieje ewolucyjna determinacja do utrzymania stałej ilości palców u kręgowców.

Jeśli *Shh* nie jest wymagany do indukcji palców, czy jest wymagany do określania ich tożsamości? Niedawno przetestowano tę hipotezę korzystając z modelu rozwijającego się zarodka kurczaka i faktu, że jak już wspomniałem, tożsamość palców w tym modelu jest, między innymi, określana poprzez ilość stawów w palcach. Przeprowadzając mikromanipulacje, Dahn i Fallon pokazali, że usunięcie międzypalcowej mezenchymy pomiędzy palców 2 i 3 przekształciło palec 2 w palec 1 [9]. Następnie, separując dwa rozwijające się palce folią aluminiową autorzy pokazali, że czynnik odpowiedzialny za to przekształcenie dyfundował do przestrzeni pozakomórkowej. W końcu, poprzez pokazanie, że tożsamość palców była wrażliwa na zbyt dużą ilość białek *Bmp* lub *Noggin* (antagonista *Bmp*), udowodnili, że *Bmp*, a nie *Shh*, było bezpośrednio odpowiedzialne za określanie tożsamości palców [19]. Kolejne prace, wykonane przez Ogura i współpracowników pokazały, że *Bmp* regulowało tożsamość palców poprzez indukcję czynników transkrypcyjnych *Tbx2* i *Tbx3* [37]. Dodatkowo wykazano, że *Shh* było wymagane do posteryornalnej indukcji palców, ale nie było wymagane do określania ich tożsamości. Zamiast tego, pętla regulacyjna złożona z *Bmp/Hoxd12/13* i *Tbx2/3* była wymagana do określania najbardziej posteryornalnego palca (czwarty u kurczaka). Palec 3 natomiast był określany przez ścieżki sygnałowe zależne od *Bmp7*, *Hoxd12* i *Tbx2*, a najbardziej anterioralny palec był niezależny od tych szlaków (ryc. 3). Te wyniki dodatkowo poparły tezę, że proces tworzenia osi AP w końcu jest o wiele bardziej skomplikowany niż początkowo zakładano i że jest on tylko częściowo pod wpływem sygnalizacji zależnej od *Shh*.



RYCINA 3 (zmodyfikowana z [37]). Rozwijająca się kończyna tylna zarodka kury w stadium HH 31. Palce są ponumerowane 1–4 w kierunku A/P. Linia przerywana określa granicę pomiędzy IV palcem i mezenchymą (obszar oznaczony szarymi cętkami). Linie kropkowane wydzielają obszar mezenchymy międzypalcowej (obszar oznaczony białymi kropkami) pomiędzy palcami 3 i 4. Strzałki reprezentują pozytywne interakcje

Inny interesujący zwrot w zrozumieniu funkcji Shh w określaniu tożsamości palców pojawił się w związku z analizą myszy, u których ekspresja rekombinazy Cre była pod kontrolą elementów regulatorowych pochodzących z promotora genu Shh, wiernie odtwarzających dynamikę ekspresji Shh podczas rozwoju kończyn (Shh-Cre). Otóż zaproponowano, że Shh mógłby działać jako prawdziwy morfogen, działając na odległość i wywołując różne efekty biologiczne w zależności od stężenia. Na przykład, gdy Shh ulegał ekspresji w ZPA, mógłby on regulować tożsamość palców w zależności od odległości od ZPA, poprzez precyzyjną modulację stosunku Gli3R do Gli3A. Aby zbadać tę możliwość, autorzy prześledzili los komórek, u których Shh uległ ekspresji w kończynie. Zostało to osiągnięte przez skrzyżowanie Shh-Cre transgenicznych myszy z innymi transgenicznymi myszami, ROSA26-βgal. U tych myszy gen reporterowy kodujący β-galaktozydazę jest aktywowany tylko w obecności rekombinazy Cre. Tak więc w potomstwie pochodzącym z takiej krzyżówki, Cre rekombinaza powodowała permanentną aktywację β-galaktozydazy w komórkach, w których Shh kiedykolwiek uległ ekspresji ujawniając czasowo-przestrzenną regulację tego genu. Analiza tych myszy

pokazała, że komórki, w których Shh uległ ekspresji, znajdowano początkowo w ZPA, później wykryto w mezenchymie palców 5, 4 i 3 [2].

Białko Shh może zostać wydzielone do przestrzeni międzykomórkowej po potranslacyjnej modyfikacji, polegającej na dodaniu do niego cząsteczki cholesterolu. Dezaktywacja genu odpowiedzialnego za ten proces, *dispatched 1 (disp1)*, powoduje zahamowanie dyfuzji Shh i pozwala na rozdzielenie autokrynych i parakrynych efektów działania Shh. Ten fakt, razem z opartą na systemie Cre-lox dezaktywacją genów, pozwolił badaczom na zbadanie krótko i długodystansowych efektów, jakie Shh wywiera na formowanie palców u myszy. Cre rekombinaza, ulegająca ekspresji pod kontrolą elementów promotora *shh*, została użyta do usunięcia genu kodującego *disp1* z rozwijającego się pąka kończyny [13]. Powstałe w ten sposób potomstwo miało normalne palce 5, 4 i 3, palca 2 nie było, a palec 1 był normalny. Ten wynik pozwolił na wyciągnięcie wniosku, że Shh oddziałuje autokrynnie w trakcie tworzenia palców 5, 4 i 3 oraz parakrynnie w czasie tworzenia palca 2. Ta praca dodatkowo potwierdziła, że Shh nie jest potrzebny do tworzenia palca 1.

W dwóch kolejnych pracach przedstawiono wyniki badań, w których wykazano, że czynnik transkrypcyjny dHand działa powyżej białek Shh/Gli na szlaku przekazywania sygnału [39, 38].

Model różnicowania wzdłuż osi AP oparty na sygnalizacji regulowanej przez Shh, zaproponowany jakieś 30 lat temu, został więc ostatnio poddany przeglądowi i rewizji dzięki wyżej wspomnianym badaniom. Rzeczywiście, podczas gdy ekspresja Shh jest krytyczna dla prawidłowego rozwoju kończyn, mogłaby ona ograniczać raczej niż indukować liczbę palców, nie być krytyczna dla określania ich tożsamości i wcale nie być związaną z tworzeniem stylo- lub zygotodu.

PERSPEKTYWY

W jakim punkcie zatem znajduje się obecnie biologia rozwoju kończyn? Sekwencje genomów wielu organizmów zostały już poznane, różne rodzaje „omics” (*transcriptomics*, *proteomics* itd.) są stosowane do analizy molekularnego stanu tkanek, jak również ciągle pojawiają się nowe sposoby na modyfikowanie genów. Wszystko to razem pozwala nam na nowe podejście do klasycznych eksperymentów embriologicznych. To nowe spojrzenie ujawniło, że nawet dobrze opisane i zbadane modele doświadczalne ciągle dostarczają nam niespodzianek, które zmuszają nas do przepisania niektórych rozdziałów w podręcznikach. Kombinacja bogactwa informacji otrzymanej z biologii rozwoju embrionalnego i dostępność molekularnych narzędzi zwiastuje bardzo interesującą przyszłość w biologii rozwoju generalnie, a w biologii kończyn w szczególności.

Ciągle jeszcze dużo pytań dotyczących rozwoju kończyn pozostaje bez odpowiedzi, czasami od dość dawna. Uwaga badaczy skupia się obecnie bardziej na osiach AP i PD niż DV. Ta ostatnia oś jest regulowana poprzez interakcję pomiędzy dwoma białkami. Jednym z nich jest sekrecyjne białko regulujące dorsalną część kończyny, Wnt7a. Drugim

z nich jest czynnik transkrypcyjny *Engrailed*, regulujący wentralny aspekt kończyny poprzez regulowanie ekspresji jego białka docelowego, *Lmx1* [26]. Bardzo mało wiadomo o białkach docelowych *Wnt7a* albo *Engrailed* w tych procesach. Wczesne doniesienia wskazywały, że *Engrailed* (transkrypcyjny represor *Wnt7a*) obecny w wentralnej ektodermie, byłby zaangażowany w indukcję *Shh* w ZPA, ale jego dezaktywacja spowodowała defekty w osiach DV i PD, ale nie w osi AP prawdopodobnie poprzez indukcję defektów w AER [1].

Podczas gdy więcej wiadomo o rozwoju osi AP, ciągle nie wiadomo, jak jest określana ilość palców (4 w nodze i 3 w skrzydle u kurczaka, 5 u myszy), ani co jest bezpośrednio odpowiedzialne za indukcję stawów. Dodatkowo, ostatnie doniesienia, inaczej niż dotychczas zakładano, opisały rolę, jaką *Wnt* mógłby odgrywać w określaniu osi AP. W tych badaniach przeanalizowano pętlę regulatorową składającą się z białek *Wnt*, *Dkk1* (antagonista *Wnt*) i *Lrp6* (putatywny receptor *Wnt*) [20]. Proponowany nowy system, niezależnie od *Shh*, regulowałby ilość palców poprzez pętlę *Wnt/Dkk1/Lrp6* i działałby poprzez doprecyzowywanie przekazywania sygnałów przez *Wnt*. Potrzeba jednak więcej badań, aby te obserwacje potwierdzić.

Formowanie osi PD, być może najintensywniej badane, nie jest jeszcze w pełni poznane, ponieważ niektóre z opisanych wyników nie mogą być wytłumaczone ani przez modele Strefy Postępu, ani Prespecyfikacji. Dlatego też nowe eksperymenty powinny zostać przeprowadzone, co obiecuje ekscytujący okres w dziedzinie biologii rozwoju kończyn.

Szczegółowa wiedza dotycząca molekularnych podstaw kierujących procesami rozwoju kończyn jest niezbędna, aby lepiej zrozumieć procesy chorobowe występujące w okresie postnatalnym. Staje się coraz bardziej oczywiste, biorąc pod uwagę raczej ograniczoną liczbę szlaków sygnalizacyjnych, że niektóre z nich są prawdopodobnie reaktywowane w nieodpowiednim czasie lub miejscu, prowadząc do różnego rodzaju patologii, na przykład artretyzmu. Dokładna molekularna i genetyczna analiza dróg przekazywania sygnałów w komórce, które są aktywne w trakcie normalnego rozwoju kończyn, jest zatem bardzo ważną do zrozumienia procesów chorobowych i odpowiedniego zaprojektowania indywidualnych, molekularnych strategii do leczenia symptomów lub nawet całkowitego wyleczenia schorzenia. Ta taktyka, razem z pojawiającą się technologią opartą na komórkach macierzystych oraz z uzupełniającym podejściem opartym na inżynierii tkankowej, tworzy podstawy długoterminowych rozwiązań w leczeniu chorób.

PODZIĘKOWANIA

Chciałbym podziękować Frankowi Luyten, Kristin Verschueren oraz członkom mojego laboratorium za krytyczne przeczytanie angielskojęzycznej wersji tego manuskryptu, a także Joannie Dzwonek za ogromną pomoc w przetłumaczeniu oryginału na język polski. Wszystkie błędy w tym artykule są jednak moje.

Ryciny prezentowane w tym artykule zostały zaczerpnięte z pracy własnej, finansowanej w ramach grantu Narodowej Fundacji Nauki w Belgii, FWO G.0168.03.

LITERATURA

- [1] ADAMSKA M, MACDONALD BT, SARMAST ZH, OLIVER ER, MEISLER MH. En1 and Wnt7a interact with Dkk1 during limb development in the mouse. *Dev Biol* 2004; **1**: 134–144.
- [2] AHN S, JOYNER AL. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* 2004; **4**: 505–516.
- [3] ARISTOTLE. Generation of animals. wznowienie 1943; , A. L. Peck, ed. (Cambridge, Mass: Harvard University Press).
- [4] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Zarys Organogenezy. PWN, Warszawa 2004.
- [5] BOULET AM, MOON AM, ARENKIEL BR, CAPECCHI MR. The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Dev Biol* 2004; **15**: 361–372.
- [6] BUSCHER D, RUTHER U. Expression profile of Gli family members and Shh in normal and mutant mouse limb development. *Dev Dyn* 1998; **1**: 88–96.
- [7] CHIANG C, LITINGTUNG Y, HARRIS MP, SIMANDL BK, LI Y, BEACHY PA, FALLON JF. Manifestation of the limb prepatter: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol* 2001; **2**: 421–435.
- [8] CHIANG C, LITINGTUNG Y, LEE E, YOUNG KE, CORDEN JL, WESTPHAL H, BEACHY PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996; **6599**: 407–413.
- [9] DAHN RD, FALLON JF. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* 2000; **5478**: 438–441.
- [10] DUDLEY AT, ROS MA, TABIN CJ. A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* 2002; **6897**: 539–544.
- [11] GILBERT SF. Developmental biology. Sinauer Associates Inc. 2003.
- [12] HAMBURGER V, HAMILTON HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 1992; **4**: 231–272.
- [13] HARFE BD, SCHERZ PJ, NISSIM S, TIAN H, MCMAHON AP, TABIN CJ. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 2004; **4**: 517–528.
- [14] HELMS J, THALLER C, EICHELE G. Relationship between retinoic acid and sonic hedgehog, two polarizing signals in the chick wing bud. *Development* 1994; **11**: 3267–3274.
- [15] JANNERS MY, SEARLS RL. Effect of removal of the apical ectodermal ridge on the rate of cell division in the subridge mesenchyme of the embryonic chick wing. *Dev Biol* 1971; **4**: 465–476.
- [16] JOHNSON DR. Extra-toes: a new mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 1967; **3**: 543–581.
- [17] LEWANDOSKI M, SUN X, MARTIN GR. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* 2000; **4**: 460–463.
- [18] LI X, CAO X. BMP signaling and HOX transcription factors in limb development. *Front Biosci* 2003; s805–s812.
- [19] LITINGTUNG Y, DAHN RD, LI Y, FALLON JF, CHIANG C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 2002; **6901**: 979–983.
- [20] MACDONALD BT, ADAMSKA M, MEISLER MH. Hypomorphic expression of Dkk1 in the doubleridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6. *Development* 2004; **11**: 2543–2552.
- [21] MARIANI FV, MARTIN GR. Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature* 2003; **6937**: 319–325.
- [22] MO R, FREER AM, ZINYK DL, CRACKOWER MA, MICHAUD J, HENG HH, CHIK KW, SHI XM, TSUI LC, CHENG SH, JOYNER AL, HUI C. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 1997; **1**: 113–123.
- [23] MOON AM, CAPECCHI MR. Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* 2000; **4**: 455–459.
- [24] NISWANDER L, TICKLE C, VOGEL A, BOOTH I, MARTIN GR. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 1993; **3**: 579–587.
- [25] PARK HL, BAI C, PLATT KA, MATISE MP, BEEGHLY A, HUI CC, NAKASHIMA M, JOYNER AL. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 2000; **8**: 1593–1605.
- [26] RIDDLE RD, ENSINI M, NELSON C, TSUCHIDA T, JESSELL TM, TABIN C. Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 1995; **4**: 631–640.

- [27] RIDDLE RD, JOHNSON RL, LAUFER E, TABIN C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 1993; **7**: 1401–1416.
- [28] ROWE DA, FALLON JF. The effect of removing posterior apical ectodermal ridge of the chick wing and leg on pattern formation. *J Embryol Exp Morphol* 1981; **65** Suppl. 309–325.
- [29] SASAKI H, NISHIZAKI Y, HUI C, NAKAFUKU M, KONDOH H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 1999; **17**: 3915–3924.
- [30] SAUER B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 1998; **4**: 381–392.
- [31] SAUNDERS JW jr., GASSELING MT. Ectodermal-mesodermal interactions in the origin of limb symmetry. 1968; 78–97. In: Epithelial-Mesenchymal Interactions (Eds. Fleischmajer, R. and Billingham, R.F.). Williams and Wilkins, Baltimore.
- [32] SMITH JC, TICKLE C, WOLPERT L. Attenuation of positional signalling in the chick limb by high doses of gamma-radiation. *Nature* 1978; **5654**: 612–613.
- [33] SPEMANN H, MANGOLD H. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species (Reprinted from Archiv Mikroskopische Anatomie Entwicklungsmechanik, vol 100, pg 599–638, 1924). *Inter J Develop Biol* 2001; **1**: 13–38.
- [34] ST JACQUES B, DASSULE HR, KARAVANOVA I, BOTCHKAREV VA LI J, DANIELIAN PS, MCMAHON JA, LEWIS PM, PAUS R, MCMAHON AP. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol* 1998; **19**: 1058–1068.
- [35] SUMMERBELL D, LEWIS JH, WOLPERT L. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 1973; **5417**: 492–496.
- [36] SUN X, MARIANI FV, MARTIN GR. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 2002; **6897**: 501–508.
- [37] SUZUKI T, TAKEUCHI J, KOSHIBA-TAKEUCHI K, OGURA T. Tbx Genes Specify Posterior Digit Identity through Shh and BMP Signaling. *Dev Cell* 2004; **1**: 43–53.
- [38] TE WELSCHER P, FERNANDEZ-TERAN M, ROS MA, ZELLER R. Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes Dev* 2002; **4**: 421–426.
- [39] TE WELSCHER P, ZUNIGA A, KUIJPER S, DRENTH T, GOEDEMANNS HJ, MEIJLINK F, ZELLER R. Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science* 2002; **5594**: 827–830.
- [40] TICKLE C. Limb development: an international model for vertebrate pattern formation. *Int J Dev Biol* 2000; **1**: 101–108.
- [41] TICKLE C. Molecular basis of vertebrate limb patterning. *Am J Med Genet* 2002; **3**: 250–255.
- [42] TICKLE C, SUMMERBELL D, WOLPERT L. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* 1975; **5497**: 199–202.
- [43] VOGEL A, RODRIGUEZ C, IZPISUA-BELMONTE JC. Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development* 1996; **6**: 1737–1750.
- [44] WOLPERT L. Principles of development. Oxford University Press. 2002.
- [45] WOLPERT L, LEWIS J, SUMMERBELL D. Morphogenesis of the vertebrate limb. *Ciba Found. Symp.* 1975; **29**: 95–130.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 31.08. 2005 r.

Przyjęto: 07.09. 2005 r.

Box 813, University of Leuven

Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium

email: przemko@med.kuleuven.be