

MOLEKULARNY ZEGAR I GRADIENT MORFOGENÓW REGULUJĄ SOMITOGENEZĘ U KRĘGOWCÓW

MOLECULAR OSCILLATORY CLOCK AND MORPHOGEN GRADIENT
REGULATE THE SOMITOGENESIS IN VERTEBRATES

Zofia BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA

Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Streszczenie: Somitogeneza, w czasie której z przyosiowej mezodermy tworzą się somity, jest podstawą segmentacji ciała u kręgowców. Somity są strukturami przejściowymi dającymi początek kręgom, mięśniom szkieletowym i skórze właściwej. U kręgowców wszystkie komórki przyosiowej mezodermy przechodzą przez trzy fazy różnicowania i dojrzewania, które są ściśle regulowane na poziomie przestrzennym i czasowym. W pierwszej fazie komórki macierzyste, zlokalizowane w smudze pierwotnej, a następnie w pączku ogonowym, przekształcają się w komórki progenitorowe, które tworzą mezodermę przedsomitową w formie dwóch pasm komórek mezenchymatycznych biegnących po obu stronach cewy nerwowej i struny grzbietowej. Faza przygotowania do segmentacji zachodzi w przedsomitowej mezodermie na poziomie molekularnym. W fazie segmentacji tworzą się granice somitu i zachodzi epitelizacja komórek mezenchymatycznych. Dane z ostatnich kilku lat wskazują, że somitogeneza jest kontrolowana przez molekularny zegar oscylacyjny oraz przez gradienty morfogenów. Podstawą zegara oscylacyjnego jest periodyczna ekspresja pewnych genów, z których większość jest związana z sygnalizacją Notch. Z zegarem oscylacyjnym powiązany jest dynamiczny gradient morfogenów FGF, Wnt3a oraz kwasu retinowego. W artykule omówiono mechanizm działania molekularnego oscylacyjnego zegara u zarodków danio, kury i myszy.

Słowa kluczowe: somitogeneza, zegar molekularny, zarodek kręgowców.

Summary: The segmentation of the vertebrate body is established by somitogenesis, during which somite form sequentially in a rhythmic fashion from the paraxial presomitic mesoderm. The somites are transient embryonic segments giving rise to the vertebrae, the skeletal muscles and dorsal epidermis. In vertebrates, all cells of the paraxial mesoderm go successively through the three phases of differentiation and maturation, which are tightly regulated at the spatio-temporal level. A growth phase during which progenitor cells are produced from mesodermal stem cells, which are localised in the primitive streak and later in the tail bud, and become organised as two streaks of the mesenchymal cells bilaterally to the neural tube and notochord forming the presomitic mesoderm. A patterning phase occurring in the presomitic mesoderm

during which the segmental pattern is established on the molecular level. A segmentation phase in which the somite boundaries are formed and epithelization of mesenchymal cells occurs. Recent data suggest that the molecular oscillatory [segmentation] clock and gradients of signalling molecules control the somitogenesis. The periodic expression of several genes, most of which are related to the Notch signalling pathway, is the base of the oscillatory clock. Dynamic gradient of retinoic acid and morphogens FGF6 and Wnt3a are coupled with molecular oscillatory clock. In this review the mechanism of oscillatory clock in zebrafish, chick and mouse embryos is described.

Key words: somitogenesis, molecular clock, vertebrate embryo.

WSTĘP

Jednym z podstawowych procesów w rozwoju zarodków kręgowców jest somitogeneza, w wyniku której powstają somity, odrębne segmenty ułożone parami wzdłuż struny grzbietowej i cewy nerwowej. Somity tworzą się kolejno od przodu ku tyłowi, pierwsza para widoczna jest na poziomie pęcherzyka ocznego zarodka. Liczba somitów jest stała dla danego gatunku, np. u kury wynosi 52, u myszy 65 [37]. Z somitów tworzą się kręgi, mięśnie szkieletowe i skóra właściwa. Różnicowanie się somitów w te struktury jest dobrze poznane i opisane w podręcznikach [8,39]. W ostatnich kilku latach zainteresowano się specjalnie początkowymi etapami somitogenezy, ponieważ, jak się okazało, w tym okresie zachodzi w mezodermie przedsomitowej naprzemienne regularne aktywowanie i hamowanie ekspresji niektórych genów, co w zasadniczy sposób wpływa na wyodrębnianie i różnicowanie się somitów.

Badania nad somitogenezą są prowadzone głównie na zarodkach 3 gatunków kręgowców: ryby danio pęgowany (*Danio regio*), kury i myszy. Zarodki danio są dostępne w dużej liczbie, przechodzą szybki rozwój, somitogeneza trwa u nich około 14 godzin, można również łatwo uzyskać u tych ryb ukierunkowane mutacje genetyczne. Podobnie ze względu na dostępność do manipulacji eksperymentalnej badana jest somitogeneza u zarodków kur. Z kolei analiza rozwoju licznych mutacji genetycznych spontanicznych i ukierunkowanych wywołanych u myszy dostarcza wielu cennych informacji o zaburzeniach w prawidłowej somitogenezie.

POWSTAWANIE I RÓŻNICOWANIE MORFOLOGICZNE PRZYOSIOWEJ MEZODERMY SOMITOWEJ

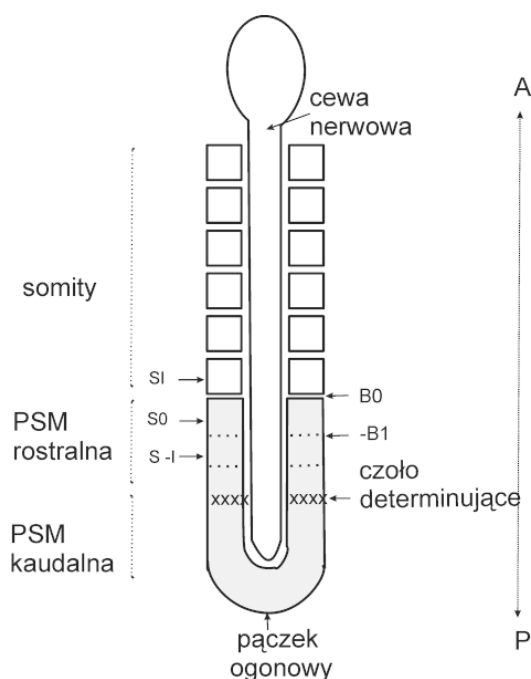
Na wstępie należy przypomnieć, że u owodniowców (ptaki i ssaki) gastrulacja rozpoczyna się w obrębie tarczki zarodkowej, złożonej z dwóch warstw komórek epiblastu i hypoblastu. Komórki epiblastu tworzą następnie właściwy zarodek. Tarczka zarodkowa jest spolaryzowana i można w niej wyróżnić część przednią (A – *anterior*) poprawnie nazywaną rostralną, z której rozwijają się głównie przednie części zarodka oraz część tylną (P – *posterior*) nazywaną kaudalną. Część komórek epiblastu

przemieszcza się przez smugę pierwotną i węzeł pierwotny (Henzena) pod epiblast i tworzy mezodermę. Na skutek tej migracji smuga pierwotna stopniowo się skraca i zanika. Zależnie od położenia, czasu migracji i późniejszego różnicowania oraz funkcji wyróżnia się mezodermę głowową, osiową, przyosiową, pośrednią i boczną. W pierwszej kolejności z epiblastu wysuwają się w linii środkowej tarczki zarodkowej komórki mezodermy głowowej i osiowej, tj. struny grzbietowej i razem z formującą się cewą nerwową przemieszczają się rostralnie. W następnej kolejności migrują po obydwóch stronach struny grzbietowej komórki przeznaczone na somity tworzące przyosiową, przedsomitową mezodermę – **PSM** (*presomatic mesoderm*). Komórki przeznaczone na PSM zatrzymują się na rostralnym końcu smugi pierwotnej i stają się rezydującą pulą komórek macierzystych dla PSM. Po zaniku smugi pierwotnej te komórki macierzyste lokują się w przedniej części pączka ogonowego. [7]. Komórki macierzyste dostarczają puli komórek prekursorowych tworzących PSM i somity. Pula komórek prekursorowych rozdziela się na dwie części, które przesuwają się wzdłuż pomiędzy ektodermą powierzchniową a endodermą jelitową po obu bokach cewy nerwowej i struny grzbietowej. Tworzą się dwa równoległe pasma PSM, których rozwój i dalsze różnicowanie są ściśle ze sobą zsynchronizowane (ryc. 1). PSM wydłuża się przez apozycję, tj. odkładanie, gdy przyłącza się do niej grupa nowopowstałych komórek prekursorowych. Wydłużanie się PSM zachodzi w kierunku kaudalnym (ku tyłowi), podczas gdy rostralnie (na przodzie) następuje oddzielenie się nowego somitu. PSM ma więc dwa etapy rozwoju: pierwszy z komórek macierzystych, które migrują przez smugę pierwotną i węzeł pierwotny, oraz drugi, kiedy PSM tworzy się z komórek macierzystych rezydujących w pączku ogonowym. Z PSM powstałej w pierwszym etapie tworzą się somity szyjne, położone najbardziej rostralnie, pozostałe somity tworzą się z komórek macierzystych rezydujących w pączku ogonowym. Na przykład u zarodka kury migracja komórek z epiblastu i regresja smugi pierwotnej kończy się po wytworzeniu około 16 somitów szyjnych, a komórki uczestniczące w tworzeniu somitów lędźwiowych, krzyżowych i ogonowych pochodzą z pączka ogonowego [18].

Liczba komórek macierzystych dla PSM rezydujących w smudze pierwotnej jest niewielka. U zarodka myszy w 7,5 dpc¹ jest ich 100 do 150 [54]. Ulegają one niesymetrycznym podziałom mitotycznym, przez co dostarczają nowej puli komórek prekursorowych dla PSM, a jednocześnie część ich pozostaje nadal rezydującymi, samoodnawiającymi się komórkami macierzystymi [36, 57]. Nie wiadomo, jak regulowane są te podziały.

Samoodnawiające się komórki macierzyste mają charakter komórek mezenchymatycznych, stanowią zwartą (koherentną) grupę. Uważa się, że pochodzące z nich komórki prekursorowe PSM zachowują również zwartość dzięki podziałom klonalnym. Ruchy komórek w obrębie grupy komórek prekursorowych, a następnie w PSM są bardzo ograniczone. Komórki zachowują ułożenie klonami, a wbrew dawnym poglądom [74] w PSM nie zachodzi mieszanie się komórek wzdłuż osi A/P. Co więcej wykazano, że już w tarczce zarodkowej odmiennie są zlokalizowane komórki przeznaczone na przyśrodkowe i boczne części PSM, a następnie także na przyśrodkowe i boczne części

¹Dpc – dzień po zapłodnieniu – *day post coitum*



RYCINA.1. Schemat rozmieszczenia pęczka ogonowego, mezodermu przedsomitowej – PSM i somitów u zarodków kręgowców: SI – ostatnio wytworzony somit, S0 – szczytowa część PSM, z której zostanie wytworzony następny somit; S-I – materiał na presumptywny kolejny somit; B0 – szpara pomiędzy S0 a SI; B-1 – presumptywna szpara pomiędzy somitami. Oznaczenia według nomenklatury proponowanej przez Pourquie i Tam [60]

somitów. Presumptywne komórki przyśrodkowe są ułożone bardziej z przodu tarczki niż presumptywne komórki boczne. Wykazano również, że tylko komórki przyśrodkowe PSM mają informacje dla rozwoju w somity, gdyż po rozdzieleniu podłużnie PSM kury tylko jej część przyśrodkowa rozwija się w somity *in vitro* [24].

Koherentne ułożenie komórek prekursorowych prowadzi do tworzenia statycznej struktury z nielicznymi podziałami komórkowymi i niewielkimi ruchami komórek, zwanej kohortą komórek stanowiącej w istocie zawiązek pojedynczego somitu [20]. Komórki kohorty pozostają w jednym miejscu na określonym poziomie osi A/P zarodka i w tym jednym miejscu realizują one cały program rozwoju somitu. Podlegają więc stale takim samym wpływom sąsiednich narządów pierwotnych, tj. cewy nerwowej, struny grzbietowej, mezodermi bocznej i ektodermi powierzchniowej. PSM jest więc zespołem liniowo ułożonych kohort komórek o różnym stopniu zaawansowania somitogenezy (ryc. 1 i 2).

Stąd oglądana w całości odbija wszyst-

kie kolejne etapy somitogenezy zachodzące w pojedynczej kohorcie. Cała PSM, począwszy od pęczka ogonowego do pierwszego somitu szyjnego, może być traktowana jak taśma filmowa złożona z kolejnych klatek, z których każda odpowiada kolejnemu stadium rozwojowemu w innym czasie. Większość autorów opisujących somitogenezę traktuje PSM jako dynamiczną całość i wyróżnia w niej dwa obszary: rostralny (przedni) i kaudalny (tylny). W obszarze rostralnym znajdują się kohorty komórek o zaawansowanej somitogenezie, w kaudalnym w początkowych jej etapach. Kaudalny obszar jest dynamiczny, bowiem tu w określonych odstępach czasu dołączane są nowe kohorty komórek prekursorowych i dzięki temu obszar ten przesuwa się ku tyłowi zarodka. Tworzą go stosunkowo luźno ułożone komórki mezenchymatyczne. Obszar kaudalny u zarodka kury obejmuje 2/3 PSM [18]. Obszar rostralny jest stabilny, nie obserwuje się w nim ruchów komórek ani mitoz. Od rostralnej części oddzielają się kolejno somity jako odrębne struktury. Oddzielanie się nowego somitu od PSM na ogół nazywane jest segmentacją. Jest ona związana z epitelizacją komórek (tj. przekształcaniem się komórek mezenchymatycznych w nabłonkowe) oraz z wytworzeniem granic somitu i jego polaryzacją.

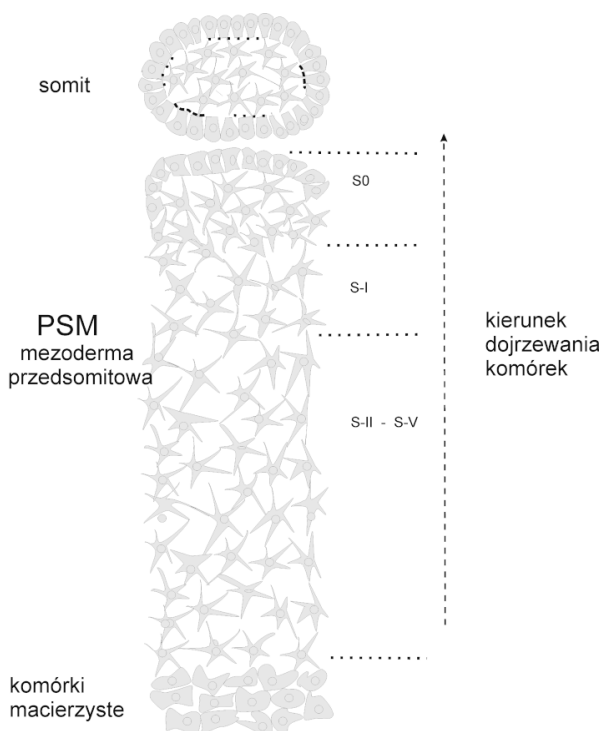
Nowopowstały somit jest wyraźnie spolaryzowany wzdłuż osi A/P oraz grzbietowo-brzuszenie, można w nim wyróżnić część rostralną i kaudalną oraz grzbietową i brzuszną, o odmiennym charakterze morfologicznym komórek. Części te różnicują się następnie w odmienne tkanki. Część grzbietowa daje początek dermatomiotomowi, część brzuszna sklerotomowi.

Przemiany morfologiczne komórek w kohorcie, prowadzące do wytworzenia somitu, polegają na zagęszczeniu komórek przez zmniejszenie przestrzeni międzykomórkowej, a następnie ich epitelizacji, czyli zmianie ich kształtu z typu mezenchymatycznego na nabłonkowy. Z kolei pomiędzy nowopowstałym somitem a rostralną częścią PSM tworzy się wyraźna szpara. Zmiany te zachodzą u wszystkich kręgowców, mimo różnic w ich

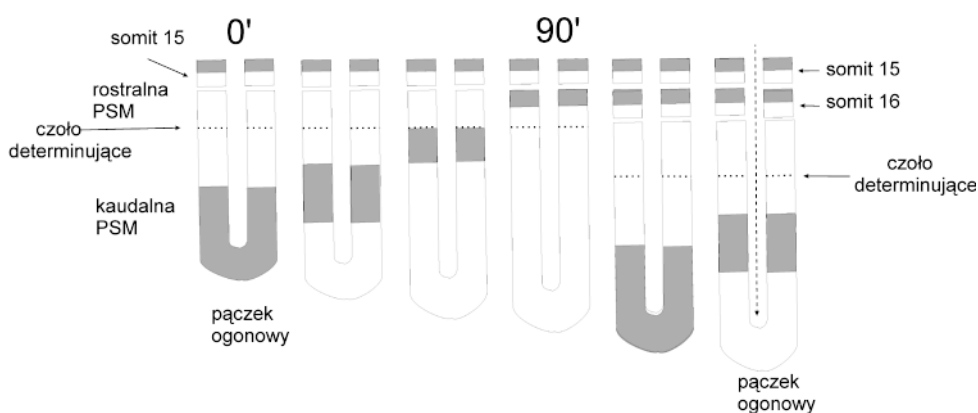
przebiegu w poszczególnych gromadach. U owodniowców wyodrębnia się najpierw, na skutek kompaktacji, grupa komórek zwana somitomerem, który przekształca się w somit. U kury i przepiórki nowopowstały somit ma charakter kuli wypełnionej w środku komórkami mezenchymatycznymi, otoczonej zewnętrzną warstwą nabłonkową komórek. Somit kury na poziomie skrzydła ma około 2500 komórek [11]. U myszy epitelizacji podlega tylko część grzbietowa i boczna powstającego somitu, podczas gdy część przyśrodkowa zachowuje charakter mezenchymatyczny. Somit żaby szponiastej *Xenopus* składa się z równolegle ułożonych, wydłużonych środkowo-bocznie komórek i w czasie tworzenia ulega rotacji. Somit ryby danio, podobnie jak u owodniowców, jest kulisty.

Podkreślić trzeba, że komórki w obrębie PSM komunikują się ze sobą przez połączenia szczelinowe (*nexus*). Dowodzi tego obserwacja, że wprowadzony do kaudalnej części PSM barwnik rodamina pojawia się kolejno w komórkach przesuwając ku przodowi i zatrzymuje dopiero w komórkach położonych na samym brzegu rostralnym PSM [76].

Dla ujednolicenia opisów eksperymentów prowadzonych przez różnych badaczy oraz dla łatwiejszego porozumienia, Pourquie i Tam [61] zaproponowali nomenklaturę dla mezodermy przyosiowej, różniącą się od powszechnie stosowanego oznaczania somitów liczbami według kolejności ich powstawania. Poszczególne somity zostały



RYCINA 2. Schemat struktury komórkowej mezodermy przedsomitowej zarodka kury, oznaczenia poziomów wg Pourquie i Tam [60] jak na ryc. 1



RYCINA 3. Schemat cyklicznej ekspresji genu *c-hairy 2* w ciągu 90 minut na przykładzie tworzenia się 15 i 16 kolejnego somitu u zarodka kury

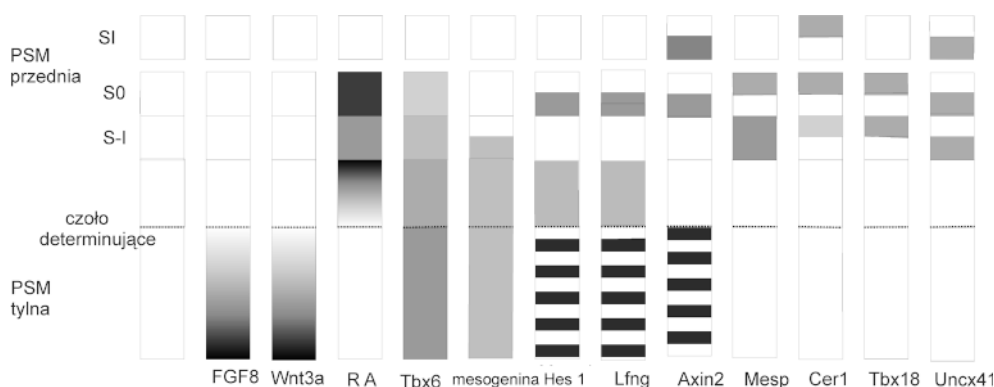
przez nich ponumerowane cyframi rzymskimi zgodnie z ich położeniem wzdłuż osi A/P, poczynając od pierwszego ostatnio utworzonego somitu oznaczonego jako SI. W ten sposób numer somitu określa jego stan zróżnicowania, a nie położenie na osi A/P. PSM została podzielona na prospektywne somity (presomity) oznaczone S0, S-I, S-II, S-III itd. Prospektywne granice między nimi oznaczono odpowiednio literą B z numeracją arabską, np. prospektywną granicę między S0 a S-I jako B-1 (ryc.1 i 2).

Komórki PSM są ukierunkowane na wytworzenie somitu i każda komórka w kohorcie przechodzi przez kolejne fazy różnicowania się od komórki macierzystej do komórki wykształconego somitu. Nie są one jednak jeszcze całkowicie zdeterminowane i są pluripotentne. Komórki PSM, wszczepione do młodszy zarodek, są zdolne do różnicowania się w boczną mezodermę, śródbłonek i endodermę [76].

CZYNNIKI MOLEKULARNE W PSM

Podział PSM na rostralną i kaudalną, początkowo czysto morfologiczny znalazł potwierdzenie w odmiennym rozmieszczeniu w niej niektórych czynników wzrostowych oraz odmiennej ekspresji genów. Najważniejszą jednak właściwością kaudalnej PSM oraz pęczka ogonowego jest powtarzająca się regularnie aktywacja i zahamowanie ekspresji niektórych genów w ramach zegara oscylacyjnego.

W całej PSM ulegają ekspresji geny czynników transkrypcyjnych charakterystycznych dla mezodermy *Tbx*, *evx* (*even shipped*), *caudal*, *brachyury T* [59, 81]. Tylna PSM u wszystkich kręgowców charakteryzuje się aktywnością konserwatywnych genów, takich jak: *fgf8*, *wnt3a*, *brachyury T*, *mezogenin*, *mespo*, *tbx6*. Białko *Tbx6*, występujące w smudze pierwotnej, pęczku ogonowym i całej PSM, bierze udział w początkowym ukierunkowaniu komórek tych struktur w komórki mezenchymatyczne.



RYCINA 4. Schemat ekspresji niektórych genów w mezoderмии przedsomitowej – PSM i somicie SI u zarodka myszy, cykliczna ekspresja zaznaczona prążkowaniem

Mutanty myszy pozbawione genu *tbx6* mają somity zmienione w dodatkowe cewy nerwowe [80]. W rostralnej PSM wykrywa się obecność kwasu retinowego i białek transkrypcyjnych *Mesp* (*mesoderm posterior*), *Foxc* (*Forkhead/winged helix transcription factor*) i *paraxis* [18,77].

Czynniki wzrostowe FGF8 (*fibroblast growth factor 8*) i Wnt3a (*Wingless integrated 3a*) występują w kaudalnej PSM w gradiencie zmniejszającym się rostralnie (ryc. 4). Obydwa te czynniki są wytwarzane w smudze pierwotnej oraz w pączku ogonowym i dyfuzyjnie rozchodzą się dogłównowo w PSM. Transkrypcja ich zostaje zahamowana, kiedy komórki z pączka ogonowego przesuwane są do PSM. FGF8 działa za pośrednictwem kaskady kinaz MAPK (*mitogen activated protein kinase*) [64], a Wnt3a poprzez szlak kanoniczny z udziałem kateniny β i GSK-3 (kinazy syntazy glikogenowej 3) [4]. Zawartość FGF8 i Wnt3a i ich mRNA zmniejsza się na skutek rozpadu transkryptu, stąd w PSM ustala się ich gradient malejący dogłównowo [3,18]. Przypuszcza się, że istnieje współzależność działania FGF8 i Wnt 3a, przy czym FGF8 wzmacnia sygnalizację Wnt3a [3]. W kaudalnej PSM danio sygnalizacja FGF8/MAPK utrzymuje komórki w stanie niedojrzałym, nie wpływając na ich proliferację i migrację [64]. U myszy gra podobną rolę Wnt3a [23].

Szereg obserwacji wskazuje, że zasięg rozmieszczenia FGF8 jest ograniczony przez kwas retinowy – RA (ryc. 4). RA jest trudny do bezpośredniej lokalizacji w tkankach i komórkach. Proporcjonalnie do syntezy uwalniany z komórki dyfunduje na duże odległości oraz jest szybko metabolizowany przez różnego rodzaju komórki [46]. Na rozmieszczenie RA w tkankach pośrednio wskazuje lokalizacja enzymów związanych z jego metabolizmem. W somitach wykrywa się enzym *Raldh2*, który bierze udział w wytwarzaniu RA. W niższym stopniu występuje ten enzym w rostralnej PSM. Natomiast w pączku ogonowym czynny jest *Cyp 26*, enzym związany z katabolizmem RA [23, 62]. Można więc przypuszczać, że RA tworzy w PSM gradient malejący doogonowo [46]. Uważa się, że RA i FGF działają antagonistycznie wobec siebie. RA hamuje

ekspresję *fgf8* i odwrotnie FGF8 blokuje ekspresję *raldh2*, a więc pośrednio syntezę RA [18, 62]. Skutkiem takiego antagonistycznego działania FGF i RA, na granicy części rostralnej i kaudalnej PSM powstaje obszar „neutralny” pozbawiony wpływu tych czynników. Nazywany jest on frontem lub **czołem determinującym**. Nie jest jasne, jak RA stabilizuje FGF8 na poziomie czoła determinującego [17, 18]. Wiadomo tylko, że RA odgrywa rolę w dojrzewaniu komórek PSM [23].

W czasie wzrostu i rozwoju zarodka czoło determinujące przesuwa się doogonowo w stałym tempie. Położenie czoła determinującego jest regulowane przez Wnt3a, FGF8, RA i prawdopodobnie przez nieznany jeszcze szlak sygnalizacyjny, być może Tbx24 [23, 51, 53, 65]. Na poziomie czoła determinującego dochodzi do ostrej zmiany regulacji i aktywacji genów, zostaje zatrzymana oscylacja genów w komórkach PSM. Czoło determinujące oddziela dwa etapy somitogenezy, przebiegające inaczej w kaudalnej niż w rostralnej PSM; rozgranicza komórki niekompetentne od kompetentnych do pełnego realizowania programu somitogenezy. Najważniejszą właściwością kaudalnej PSM oraz pęczka ogonowego jest powtarzająca się regularnie aktywacja i zahamowanie ekspresji niektórych genów w zegarze oscylacyjnym.

ZEGAR OSCYLACYJNY

Już bardzo dawno zauważono, że nowa para somitów regularnie powstaje w stałych, określonych odstępach czasu i przyjęto określanie stanu rozwoju (wieku) zarodka według liczby widocznych par somitów. Tę periodyczność próbowano wytłumaczyć proponując różne teoretyczne modele somitogenezy. Między innymi Cooke i Zeemane w 1976 [13] zakładali, że komórki PSM periodycznie przechodzą ze stanu receptywności (zdolności odpowiedzi) do stanu niereceptywności. Zmiany te przesuwały się przez PSM od tyłu ku przodowi na kształt fali. Teoria ta w sposób znaczący zaważyła na sposobie opisu i interpretacji wyników badań molekularnych nad somitogenezą.

Periodyczną ekspresję genów w PMS po raz pierwszy opisali Palmeirini i wsp. [57] w 1997 r. badając rozmieszczenie mRNA *c-hairy* w kolejnych stadiach rozwoju somitów w zarodku kury. Od tego czasu posypały się doniesienia o innych genach wykazujących periodyczną ekspresję w kaudalnej PSM zarodków kręgowców. Nazwano je genami oscylacyjnymi. Ze względu na regularnie trwające i powtarzające się okresy aktywacji i zahamowania ekspresji tych genów, mechanizm, w jakim one funkcjonują, nazwano **zegarem oscylacyjnym** lub **zegarem somitogenetycznym**. Mechanizm działania zegara oscylacyjnego jest jak dotychczas tylko częściowo poznany. Wykryte geny oscylujące w kaudalnej PSM kręgowców przedstawiono w tabeli I.

Ekspresję genów oscylacyjnych najczęściej bada się w zarodkach *in toto*. W miejscach ekspresji genu występuje jego transkrypt – mRNA, który uwidocznic można odpowiednimi metodami. Badane mRNA występuje w PSM w postaci jednego, dwóch lub trzech prążków leżących w poprzek osi A/P zarodka (ryc. 3). Każdy prążek odpowiada innej kohorcie komórek w innym stadium somitogenezy. Ponieważ kolejne pulsy ekspresji rozpoczynają się na kaudalnym końcu PSM co stale określony period

w nowej kohorcie dołączanej do PSM, w zarodkach obserwowanych *in toto* prążki sprawiają wrażenie jakby przesuwały się przez PSM w czasie kolejnych faz rozwoju zarodka. Liczba prążków widocznych równocześnie w PSM zależy także od tempa zaniku transkryptu w kohorcie. Jeszcze raz podkreślić trzeba, że komórki różnicującej się kohorty „stoją w miejscu” i w każdej kohorcie zachodzi kolejno pulsacja ekspresji genów i wszystkie dalsze etapy somitogenezy.

Wykazano, że oscylacja ekspresji genów jest w wysokiej mierze autonomiczna w kohorcie i w niewielkim stopniu zależy od czynników zewnętrznych. Izolowane, małe wycinki kaudalnej PSM kury i myszy hodowane *in vitro* wykazują oscylacyjną ekspresję genów, co najmniej przez kilka cykli oscylacyjnych. Natomiast pojedyncze komórki PSM tych zwierząt hodowane w zawiesinie (a więc niekontaktujące się ze sobą) mają zaburzoną i nieregularną ekspresję genów [47, 49]. Oscylacja ekspresji genów zachodzi równocześnie we wszystkich komórkach kohorty, co wskazuje że musi istnieć mechanizm pozwalający na synchronizację tego procesu w obrębie kohorty. Taki mechanizm może opierać się na połączeniach międzykomórkowych szczelinowych (*nexus*), cząsteczkach adhezyjnych na powierzchni komórek, a także na takim systemie sygnalizacji, który działając w jednej komórce powoduje takie same zmiany w komórce sąsiedniej. Co raz więcej jest dowodów, że mechanizm zegara oscylacyjnego ma za podstawę także molekularne negatywne pętle sprzężenia zwrotnego. Negatywna pętla sprzężenia zwrotnego (*negative feedback loop*) jest mechanizmem, w którym ekspresja genu jest hamowana przez białko kodowane przez ten gen. Warunkom tym odpowiada system sygnalizacyjny Notch, który ponadto może być regulowany przez poziom FGF8 i Wnt3a. Wykazano rzeczywiście, że system sygnalizacyjny Notch leży u podstaw oscylacji genów w kaudalnej PSM, a następnie odgrywa istotną rolę w tworzeniu granicy między somitami i polaryzacji somitu.

Istotna funkcja sygnalizacji Notch w PSM polega prawdopodobnie na utrzymaniu synchronizacji oscylacji w sąsiadujących komórkach [23]. Można także przypuszczać, że sygnalizacja Notch odgrywa rolę w rozgraniczaniu poszczególnych puli komórek macierzystych emigrujących z pęczka ogonowego. Sygnalizacja Notch jest bowiem także mechanizmem, który pozwala na odmienną ekspresję genów w dwóch sąsiadujących komórkach i skierowanie ich na inne drogi różnicowania.

Warto może przypomnieć krótko, jak funkcjonuje sygnalizacja Notch (zwana także Delta/Notch). Działa ona między co najmniej dwoma komórkami w jakiś sposób kontaktującymi się ze sobą. Zarówno bowiem ligandy Delta, jak i receptory Notch są białkami błonowymi, mającymi domeny tak pozakomórkowe, jak i śródkomórkowe. Szczególną właściwością tego szlaku jest to, że komórka może równocześnie produkować receptor i ligand. Zależnie od przewagi produkcji białka Notch lub Delta komórka działa jako receptorowa lub jako nadająca sygnał. Po związaniu się liganda z receptorem od domeny śródkomórkowej Notch zostaje odcięty drogą proteolityczną odcinek NICD, który przemieszcza się do jądra komórkowego wraz z czynnikiem transkrypcyjnym Su(H) (*Suppressor of Hairless*), u ssaków RBJk (*Recombination signal sequence binding Protein for JK*) z rodziny bHLH i aktywuje transkrypcję genów *Hairy/E (spl)* (*Hairy and Enhancer of split*). Te ostatnie, z rodziny białek z domeną bHLH, działają jako czynniki transkrypcyjne regulujące aktywność wielu genów. Białka *Hairy/*

En(spl) hamują ekspresję genu *delta* i równocześnie zwiększają produkcję białka Notch. Komórka staje się wtedy odbiorcą sygnałów. Jeżeli natomiast gen *Hairy/En(spl)* zostanie zablokowany, wzrasta produkcja białka Delta i komórka przemienia się w sygnalizacyjną. Poznano wiele białek należących do rodziny Hairy/En(spl), np. u danio wyizolowano ich co najmniej 14 [69]. Mają one zdolność tworzenia homo- i heterodimerów [58]. Uważa się, że różne ich kombinacje, współdziałając z białkiem Su(H) odpowiadają za pleiotropowe działanie systemu Notch. Sygnalizacja Notch jest również regulowana przez endocytozę liganda i receptora przy udziale ubikwityny [45]. Sygnalizacja Notch bierze udział w wielu procesach komórkowych zachodzących w rozwoju zarodkowym kręgowców i bezkręgowców, zwłaszcza prowadzących do odmiennego zachowania się sąsiadujących ze sobą komórek. Wiemy, że jest odpowiedzialna za tzw. boczne hamowanie mitozy, za odmienne różnicowanie się sąsiednich komórek (*lateral specification*).

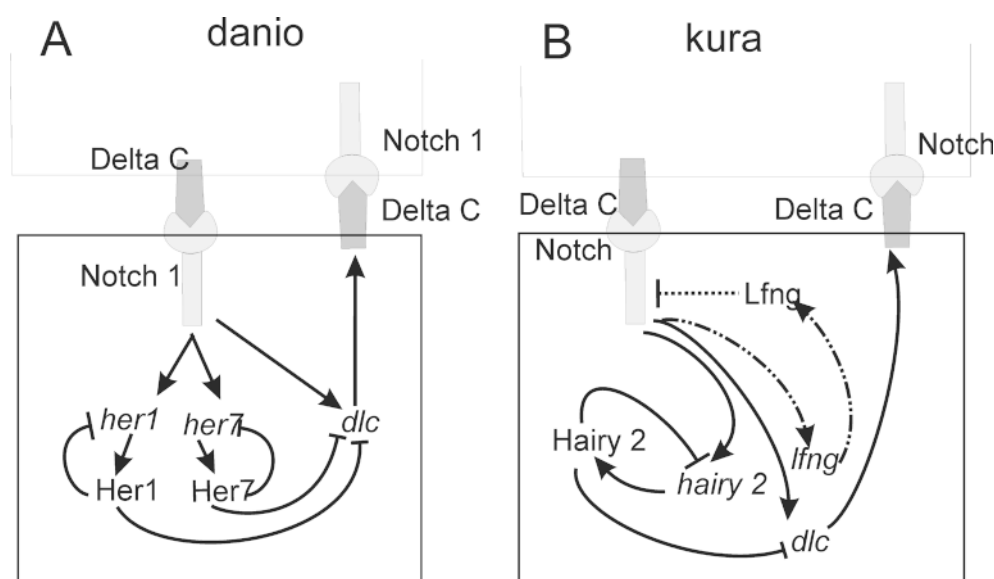
Czy zegar oscylacyjny działa jednakowo u wszystkich kręgowców, nie wiadomo. Dotychczasowe wyniki badań wskazują na różnice między gromadami. U ryb regulacja działania zegara, jak się wydaje, jest prostsza niż u ptaków, a najbardziej skomplikowana jest u ssaków. Być może za mało jeszcze wiemy na ten temat.

Mechanizm zegara oscylacyjnego funkcjonującego w kaudalnej PSM i pączku ogonowym zarodka danio został stosunkowo dobrze zbadany. Jak już wyżej zaznaczono, rdzeniem mechanizmu zegara jest sygnalizacja Notch. Oscylują w niej geny *deltaC* oraz *her1*, *her7* i *her11*, należące do rodziny *Hairy/E (spl)* (tab. I). *Notch1* ma stałą, nieoscylacyjną ekspresję w całej PSM. Według Holley i współautorów [33,34] ligand DeltaC łącząc się z Notch1 powoduje ekspresję genu *her1* i *her7*, które kodują białka Her1 i Her7. Powstające białka Her hamują z kolei ekspresję genu *deltaC* i swoich własnych genów *her1* i *her7* (ryc. 5 A). Zahamowanie ekspresji tych genów trwa, dopóki Her1 i Her7 są obecne w komórce. Białka te są stopniowo degradowane przy udziale ubikwityny i proteasomów. W ten sposób tworzy się samoregulująca się, molekularna pętla sprzężenia zwrotnego, powodująca cykliczną ekspresję wymienionych genów.

Rola poszczególnych białek Her i ich wzajemne współdziałanie nie są jeszcze w pełni wyjaśnione. Lokalizacja ekspresji genów *her1*, *her7* i *her11* jest jednakowa. Nie jest jasne, jaka jest współzależność tych genów. Wykazano tylko, że białka Her1 i Her7 działają odmiennie. Her7 potrzebne jest dla rozpoczęcia oscylacji *her1* w pączku ogonowym, bowiem mutanty danio pozbawione genu *her7* wykazują stałą (ciągłą) nieoscylacyjną ekspresję *her1*. Her 1 i Her7 odgrywają również odmienną rolę w dalszej somitogenezie przy tworzeniu się granic między somitami (o czym niżej). Gen *her1* ma prawdopodobnie co najmniej dwa odmienne elementy regulacyjne w promotorze, jeden już wykryty jest

TABELA I. Geny o cyklicznej ekspresji w przed-somitowej mezodermie zarodków danio, kury i myszy

Danio	Kura	Mysz
<i>her1</i> [33,34]	<i>hairy 1</i> [56]	<i>hes 1</i> [37]
<i>her7</i> [55]	<i>hairy 2</i> [37]	<i>hes 7</i> [5,6]
<i>delta c</i> [33]	<i>hey 2</i> [23,59]	<i>hey 2</i> [23,59]
	<i>lfng</i> [27]	<i>Lfng</i> [22]
		<i>axin 2</i> [4]
		<i>ndk 1</i> [35]

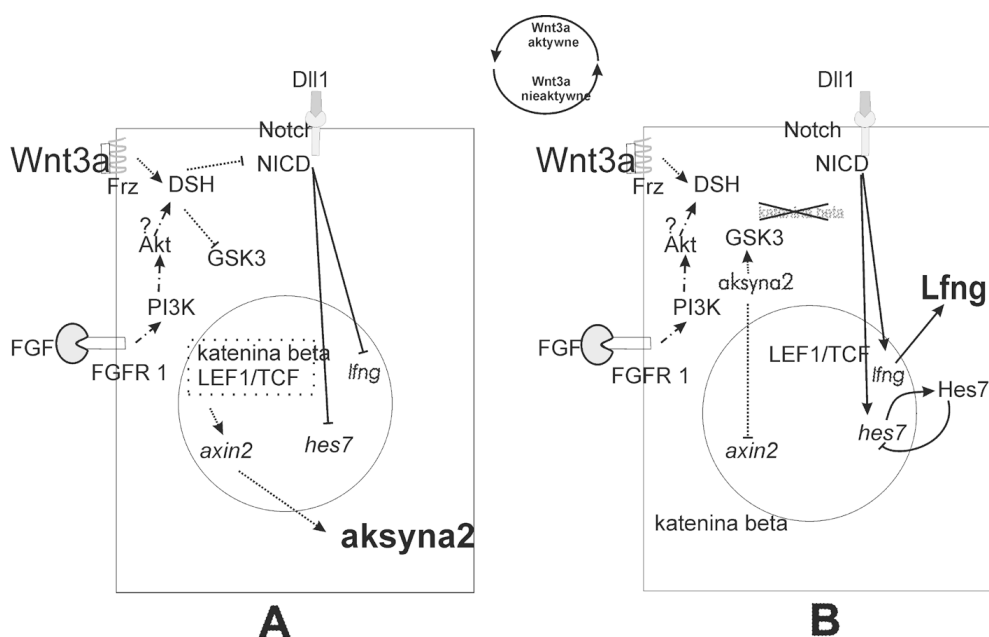


RYCINA 5. Schemat działania zegara oscylacyjnego: A – u zarodka danio, B – u zarodka kury; sygnalizacja Notch zaznaczona ciągłą kreską, pętla sprzężenia zwrotnego z udziałem *Lfn* kreską przerywaną

odpowiedzialny za ekspresję w pączku ogonowym (kaudalnej PSM), drugi hipotetyczny za ekspresję w rostralnej PSM [25]. Większość autorów uważa, że *Her1* działa jako represor podobnie jak inne białka z rodziny *Hairy/En(spl)* [34, 55], natomiast Gajewski i współautorzy [25] przypisują mu rolę aktywatora, który działa za pośrednictwem dodatkowego czynnika. Rola oscylującego genu *her11* jest nieznana [69]. W mezodermie przysiosowej danio obok wymienionych wyżej genów z rodziny *Hairy/E (spl)* wykryto w somitogenezie ekspresję kilkunastu innych nieoscylujących genów z tej samej rodziny, o niewyjaśnionej funkcji. Mogą one współdziałać z genami oscylującymi, wiadomo bowiem, że geny z tej rodziny działają w sygnalizacji Notch jako homo- lub heterodimery [33, 34]. Geny nieoscylujące *her4* i *her6* ulegają wczesnej i przejściowej ekspresji w pączku ogonowym, wykazano, że odpowiadają one za synchronizację komórek w kohorcie. Ich mRNA jest prawdopodobnie produkowane w takiej ilości, która wystarcza dla synchronizacji całej kaudalnej PSM przez kilka cykli oscylacyjnych [58].

Sama aktywność sygnalizacji Notch nie determinuje zegara oscylacyjnego. W regulację zegara oscylacyjnego u danio jest włączony szlak sygnalizacyjny FGF [23] oraz zapewne wiele innych czynników jeszcze niewykrytych.

U zarodków kury i myszy do regulacji działania zegara oscylacyjnego włącza się białko *Lfn* (*Lunatic fringe*) [12, 66]. Białko to moduluje powinowactwo receptora Notch do ligandów, działając jako glikozylotransferaza. U zarodków kury oscylującymi genami są *hair* 1, *hair* 2 i *hey* 2 z rodziny *Hairy/E (spl)* oraz *lfn* (tab. I). Czynnikiem regulującym molekularną pętlę sprzężenia zwrotnego jest białko *Hairy2* [27, 36, 47] (ryc. 5 B). U ptaków i ssaków gen kodujący ligand Delta nazwany jest *dll* (*delta*



RYCINA 6. Schemat działania zegara oscylacyjnego w kaudalnej PSM myszy według koncepcji Aulehla i Herman [3] oraz Galceran i współautorów [23]: A – Wnt3a wiążąc się z receptorem Frz powoduje wejście kateniny β związanej w kompleks z LEF1/Tcf do jądra komórkowego, oddziaływanie tego kompleksu z DNA i aktywację ekspresji genu *axin2*. W cytoplazmie gromadzi się białko aksyna 2. Równocześnie DSH wiąże się z NICD odcięty od receptora Notch i blokuje dalsze etapy sygnalizacji Notch w tym aktywację genów *hes 1*, *hes 7* i *lfng* (Wnt3a aktywne – Notch nieaktywne); B – Następnie nagromadzona w komórce aksyna 2 wiąże się z GSK3, przez co blokuje wejście kateniny β do jądra komórkowego, co powoduje zahamowanie sygnalizacji Wnt3a i w konsekwencji hamuje syntezę nowej aksyny. Równocześnie DSH uwalnia związany uprzednio NICD, dzięki czemu odblokowana zostaje sygnalizacja Notch i syntetyzowane są białka Hes1, Hes7 oraz Lfng (Wnt3a nieaktywne – Notch aktywne). Aksyna związana z GSK3 ulega degradacji i sygnalizacja Wnt3a zostaje ponownie aktywowana i cykl rozpoczyna się na nowo. Sygnalizacja Wnt3a pozostaje pod stałą kontrolą FGF8, który transdukuje sygnał przez receptor FGFR1 oraz kinazę PI3k i Akt. Mechanizm oddziaływania Akt na GSK-3 jest niejasny. Szlaki sygnalizacyjne zaznaczone: Notch linią ciągłą, Wnt3a linią kropkowaną, FGF8 linią przerywaną

like). Ekspresja genu *dll1* u ptaków jest regulowana także przez białka Brachyury-T i Tbx 26 oraz niezależnie od nich bezpośrednio przez WNT3a [31].

U zarodków myszy w kaudalnej PSM oscylują geny: *hes1*, *hes7* z rodziny *Hairy/E (spl)* oraz *lfng* i *axin 2* (tab. I). Ekspresja *hes7*, podstawowego czynnika sygnalizacji Notch, kontrolowana jest przez negatywne sprzężenie zwrotne. Cykliczna ekspresja tego genu zachodzi co 2 godziny, koreluje to z powstawaniem co 2 godziny nowego somitu. Długość fazy cyklu zegara jest zależna od okresu półtrwania białka Hes7, który u dzikich myszy wynosi około 22 minuty. Synteza Hes7 jest prawdopodobnie opóźniona o 30 minut w stosunku do syntezy jego mRNA [5]. Białko Hes7 jest degradowane przez system ubikwityna - proteasomy. Uzyskano mutanty o wydłużonym okresie półtrwania Hes do około 30 minut, u których zegar oscylacyjny i segmentacja

somitów były zaburzone po kilku normalnych cyklach oscylacyjnych. Zrobiono symulację matematyczną oscylacji *hes7* i wykazano, że dla utrzymania oscylacji i funkcji zegara oscylacyjnego istotna jest niestabilność Hes7 [5, 30]. Białko Hes7 hamuje ekspresję swojego genu i genu *lfng* oraz jest istotne dla regulacji ekspresji *hes 1* i *hey 2* (rys. 6 B). Tak samo jak ekspresja *hes7* oscyluje ekspresja *hes1* [5].

Lfng ulega ekspresji zarówno w kaudalnej, jak i rostralnej PSM myszy, ale oscyluje tylko w kaudalnej PSM, natomiast w rostralnej PSM ekspresja jest stała. Oscylacyjna ekspresja *lfng* odbywa się synchronicznie z ekspresją *hes7*. Kolejne „fale” nakładają się w czasie, ale nie przestrzennie, rozpoczynają się na kaudalnym końcu PSM co 2 godziny. (Stąd na PSM badanej *in toto* występuje równocześnie dwa lub trzy prążki) [22]. Cytoplazmatyczny transkrypt jest niestabilny i szybko rozpada się po ustaniu syntezy. Szereg różnych czynników reguluje periodyczność ekspresji *lfng* w zegarze oscylacyjnym. Ekspresja *lfng* nie oscyluje w razie braku aktywności sygnalizacji Notch [50]. Wykazano, że u zarodków myszy i człowieka gen *lfng* jest odmiennie regulowany w kaudalnej i rostralnej PSM [50]. W 2003 r. ukazały się jednocześnie w tym samym numerze czasopisma dwie prace na ten temat. Morales i współautorzy [50] stwierdzili, że promotor *lfng* zawiera kilka elementów regulujących:

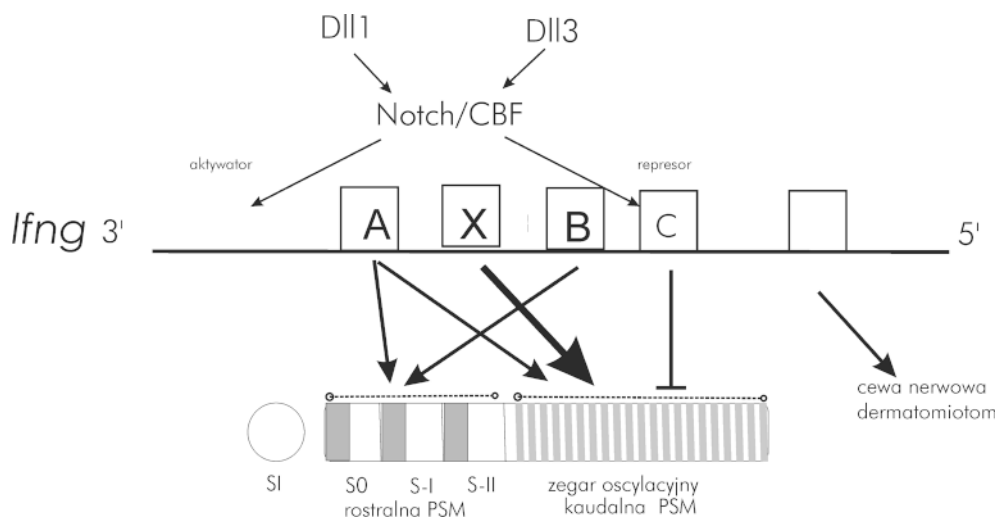
1. blok A wystarczający dla ekspresji *lfng* w rostralnej PSM i konieczny dla cyklicznej ekspresji *lfng* w kaudalnej PSM;
2. blok B wystarczający i prawdopodobnie konieczny dla ekspresji w rostralnej PSM;
3. blok C potrzebny dla represji w PSM;
4. blok X potrzebny dla wysokiej ekspresji w kaudalnej PSM;
5. blok regulujący ekspresję w cewie nerwowej i dermatomitomie (ryc. 7).

Pozytywne i negatywne impulsy wymagane do cyklicznej ekspresji działają poprzez odmiennie miejsca w promotorze. Natomiast Cole i współautorzy [12] wykazali, że promotor *Lfng* ma dwa odrębne elementy regulatorowe. Jeden kieruje oscylacją *lfng* w kaudalnej PSM, a drugi reguluje ekspresję *lfng* w rostralnej PSM i wpływa również na precyzyjne działanie zegara oscylacyjnego. W rejonie pierwszym jest miejsce wiążące białka Hes oraz czynnik transkrypcyjny Su(H)/Rbp-Jk powodujące represję ekspresji *lfng*.

Komórki kaudalnej PSM myszy przechodzą w ciągu trwającej somitogenezy przez szereg cykli oscylacyjnych, w których na przemian aktywne są szlaki Wnt i Notch. Ze względu na malejący kaudalno-rostralny gradient stężenia WNT3a w kaudalnej PSM w każdym kolejnym cyklu aktywność WNT jest słabsza niż w poprzednim i wygasa na poziomie czoła determinującego, w którym zegar oscylacyjny zostaje zatrzymany. Na tym poziomie sygnalizacja Notch stabilizuje się i zostaje wzmocniona ekspresja genów związanych z tworzeniem granic i polarność somitu [3, 4].

Sygnalizację Notch z sygnalizacją Wnt3a, obok DSH (*Dishewelled*) oraz LEF1/TCF (*Lymphoid enhancer binding factor/-T-cell factor*)² łączy także aksyna 2. W kaudalnym PSM myszy gen *lfng* ulega ekspresji na przemian z oscylacyjną ekspresją genu *axin2* [3, 4, 59].

²DSH jest białkiem pośredniczącym w transdukcji sygnału Wnt w cytoplazmie, wiąże się między innymi z kinazą GSK3 i hamuje jej aktywność, przez co blokuje rozpad kateniny β i powoduje jej nagromadzenie w jądrze komórkowym, tu katenina β wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym LEF/TCF [43].



RYCINA 7. Schemat promotora genu *lfng*, miejsca [bloki] regulatorowe zaznaczone kwadratami, strzałki wskazują poziomo na PSM podlegające regulacji danego miejsca, na podstawie Cole i współautorów [11] i Morales i współautorów [49]

Aulehla i współautorzy [4] zaproponowali następujący model cyklicznej, naprzemiennnej aktywacji i wzajemnej regulacji szlaków Wnt3a i Notch w kaudalnej PSM u zarodka myszy (ryc. 6). Wnt3a wiąże się z receptorem Frz (*Frizzled*) i aktywuje szlak kanoniczny [43], w którym białko adaptorowe DSH wiążąc się z kinazą Gsk3 blokuje jej aktywność. Na skutek tego nie dochodzi do degradacji kateniny β . Przemieszcza się ona z cytoplazmy do jądra komórkowego i za pośrednictwem białek transkrypcyjnych TCF/LEF wiąże się z DNA. Zostaje aktywowana transkrypcja genu *axin 2* i aksyna 2 gromadzi się w cytoplazmie. Aksyna 2 z kolei aktywuje GSK 3, przez co powoduje rozpad kateniny β . Ponieważ nie dochodzi do przemieszczania się kateniny β do jądra komórkowego, transdukcja szlaku Wnt3a zostaje zablokowana. Zachodzi negatywne sprzężenie zwrotne między Wnt3a a aksyną. Aksyna 2, tak jak jej transkrypt, jest wysoce niestabilna, jest ona destabilizowana przez fosforylację. Wnt3a jest stale obecne w substancji międzykomórkowej kaudalnej PSM, ale dopiero periodyczne pojawianie się i zanikanie aksyny 2 powoduje pulsacyjne aktywowanie sygnalizacji Wnt3a w komórkach kaudalnej PSM. Aksyna 2 pośrednio blokuje również sygnalizację Notch. Bowiem po związaniu się Wnt3a z receptorem Frz, DSH wiąże się także z odcinkiem NICD (patrz str. 401) i hamuje cytoplazmatyczne etapy szlaku Notch (Wnt aktywne – Notch nieaktywne *Wnt on* – *Notch off*) (ryc. 6 A). W takiej sytuacji w cytoplazmie gromadzi się aksyna 2 i hamuje działanie Wnt3a. Równocześnie NICD zostaje uwolniony ze związania z DSH i sygnalizacja Notch zostaje przywrócona i uruchomiona jest ekspresja *lfng* (Wnt nieaktywne – Notch aktywne *Wnt off* – *Notch on*) (ryc. 6B). Tak więc na skutek naprzemiennego aktywacji sygnalizacji Wnt3a i Notch w komórkach kaudalnego PSM oscylują na przemian geny *axin 2* i *lfng* [4]. Efektywność działania WNT3a według tego modelu zostaje wzmocniona przez FGF8, które za pośrednictwem kinaz PI-3 (1,4,5-trifosforanu inozytolu) i Akt blokuje GSK 3 [3, 4].

Zależności pomiędzy sygnalizacjami Wnt3a i Notch są prawdopodobnie bardziej skomplikowane, gdyż wykazano, że promotory genów *dll1* i *notch* mają kilka miejsc wiążących LEF1/TCF, ponadto stwierdzono, że kompleks LEF1/TCF - katenina β indukuje ekspresję *dll1* oraz *axin2* [26].

Rola zegara oscylacyjnego nie jest w pełni wyjaśniona. Może on służyć do koordynowania periodycznej aktywności sygnalizacji Notch w PSM, która prowadzi ostatecznie do rytmicznej determinacji granic somitów i wyodrębnienia w nich przedniej i tylnej części. Ponieważ komórki PSM zapamiętują liczbę pulsacji, przez jaką przeszły w części kaudalnej, nim weszły w skład somitu, liczba oscylacji może być związana z informacją pozycyjną (o czym niżej) [23]. Zegar odgrywa także rolę w zapoczątkowaniu synchronizacji rozwoju somitów po prawej i lewej stronie zarodka [59].

ROSTRALNA PSM

W rostralnej części PSM następuje wydzielenie się presomitów, epitelizacja komórek presomitów, rozpoczęcie ich polaryzacji w osi A/P oraz tworzenie się granic między somitem a PSM. Są to zmiany prowadzące do segmentacji. Rostralnie od czoła determinującego ustaje oscylacyjna ekspresja genów zegara oscylacyjnego. Stabilna ekspresja tych genów zachodzi w S-I i S0 (ryc. 3). Zanik oscylacji wiąże się z pojawieniem się w komórkach rostralnej PSM u wszystkich przebadanych kręgowców białek Mesp i Foxc, a u danio także białek Fss i Tbx24 [51].

Białka Mesp (*Mesoderm posterior*) to: Mesp1 i Mesp2 u myszy, c-Mesol u kury, Mesp-a i Mesp-b u danio. Są to czynniki transkrypcyjne z podrodziny bHLH [64]. Mesp zmienia aktywność receptora Notch. Równocześnie z wystąpieniem ekspresji *mesp* w rostralnej PSM zahamowana zostaje pulsacja *lfng*. Następuje zmiana w regulacji ekspresji genu *lfng*, który aktywowany jest tu poprzez inną domenę regulacyjną niż w kaudalnej PSM [12, 50, 51] (ryc. 7). Ekspresja genów *mesp* w czasie somitogenezy zachodzi u wszystkich przebadanych kręgowców w całym S-1, a w rostralnej części S0 pozostaje u danio ekspresja *mesp-a*, a u myszy *mesp2* [64, 73]. Białka Mesp są związane z tworzeniem się granicy między somitami oraz z determinacją polarności A/P somitu (patrz dalej). Uważa się, że Mesp odpowiada za „przetłumaczenie” zegara oscylacyjnego na liniowe ułożenie somitów [18].

Zarówno u danio, jak i u myszy w rostralnej PSM i nowowytworzonych somitach aktywne są geny *foxc1a* i *foxc1b* z rodziny forkhead (*Forkhead/winged helix transcription factor*). Białka Foxc odgrywają zasadniczą rolę w tworzeniu somitu, regulując w rostralnej PSM ekspresję wielu genów, takich jak: *mesp1*, *mesp2*, *hes5*, *notch1*, *dll1*, *lfng*, *paraxis* [18, 44]. Zahamowanie bowiem syntezy białka Foxc1a u danio blokuje oddzielanie się somitu od PSM i polaryzację somitu, powoduje zanik ekspresji *mesp-b*, *ephrinB2*, *ephA4*, *Notch5* i *Notch6* oraz *paraxis*, zaburza także ekspresję *dll12* i *lfng*. Normalna pozostaje ekspresja *mesp-a*, *papc*, *deltaC* i *deltaD* [18]. Foxc może działać jako permissywny sygnał dla programu segmentacyjnego [18, 77].

Jak wyżej zaznaczono, u danio w rostralnej PSM ulegają ekspresji geny *fss* i *Tbx24*. Przypuszcza się, że FSS i Tbx24 działają w końcowym etapie segmentacji. Białko Fss (*fussed somites*) pobudza ekspresję *mesp-a* i *mesp-b* oraz genów markerów rostralnej części somitu, to jest *papc*, *fgfr1*, *notch6*, a hamuje ekspresję markerów kaudalnych: *myoD* i *notch5*, *efryna A1* [64]. U mutantów *fss null* zanika polaryzacja somitów i granice pomiędzy somitami, dochodzi do ich fuzji (stąd pochodzi nazwa tego genu).

Gen *Tbx24*, ulega ekspresji w dojrzewających komórkach środkowej i rostralnej PSM, z granicą na rostralnej krawędzi S0. Presomitowe komórki utrzymują tę ekspresję aż do zakończenia tworzenia granicy segmentu. Gen *Tbx24* koduje białko odbiegające nieco od innych białek z rodziny Tbx [52]. Tbx24 jest istotnym czynnikiem dojrzewania komórek PSM prowadzącym do stanu, w którym zachodzi indukcja ekspresji *mesp* i zatrzymanie oscylacji *her1*. Tbx24 działa w procesie tworzenia granic między somitami. Zahamowanie działania Tbx24 przez wstrzyknięcie morfolino *Tbx24* do zarodka wstrzymuje całkowicie segmentację i daje fenotyp podobny do mutacji *fss null*. Nikaido i współautorzy [53] wykazali znaczne podobieństwo białka Tbx24 do białka Fss i sugerują, że koduje je jeden gen, być może jest to *fss* lub że białko Tbx24 jest kodowane w ramach szlaku sygnalizacji Fss.

U danio w rostralnej PSM ulega ekspresji gen *Gadd45* (*growth and DNA damage*) Jest ona ściśle regulowana, bowiem nadekspresja lub nokaut tego genu powodują zaburzenia w segmentacji [40].

EPITELIZACJA PSM

W części rostralnej PSM zachodzi równocześnie epitelizacja komórek i polaryzacja przyszłego somitu. Uważa się, że FGF8 blokuje epitelizację w kaudalnej PSM, a w rostralnej stymuluje ją *Mesp1* [7, 59, 72].

Proces epitelizacji jest częściowo autonomiczny, a częściowo indukowany przez przyległą do PSM ektodermę powierzchniową. Rozpoczęcie jego zbiega się z pojawieniem się w PSM u danio białka Tbx24, a u kury białka paraxis, czynnika transkrypcyjnego z rodziny bHLH. Paraxis uważane jest za znaczące w indukcji procesu epitelizacji [15, 52, 59]. W komórkach PSM wytwarzana jest integryna 5 α , wydzielana jest fibronektyna [38,41]. Ważną rolę w zmianie kształtu komórek mezenchymatycznych w nabłonkowate w czasie epitelizacji u zarodka kury odgrywają białka Cdc42 (*cell division cycle 42 = GTP binding protein*) i Rac1. Są to GTPazy z rodziny Rho wpływające między innymi na cytoszkielet komórki poprzez zmiany polimeryzacji aktyny. „Decyzja” komórki, czy ma pozostać mezenchymatyczną czy przekształcić się w nabłonkową, zależy od poziomu w niej Cdc42. Przy wysokim poziomie komórka pozostaje mezenchymatyczną z licznymi wypustkami, przy niskim traci wypustki i zaokrągla się. Rac1 powoduje ostateczną epitelizację, tj. polaryzację komórki i pojawienie się na niej złączy międzykomórkowych (*adherens junctions*) wraz z N-kadheryną. Odpowiedni optymalny poziom aktywnego Rac1 w komórce jest potrzebny dla działania

paraxis w uruchomieniu pełnej epitelizacji. Wspólne działanie Cdc42 i Rac1 powoduje także przemieszczanie się komórek w obrębie somitomeru i rozdzielenie (sortowanie) komórek nabłonkowych od mezenchymatycznych [52]. Do zmiany kształtu komórek przyczynia się również działanie efryn (o czym niżej).

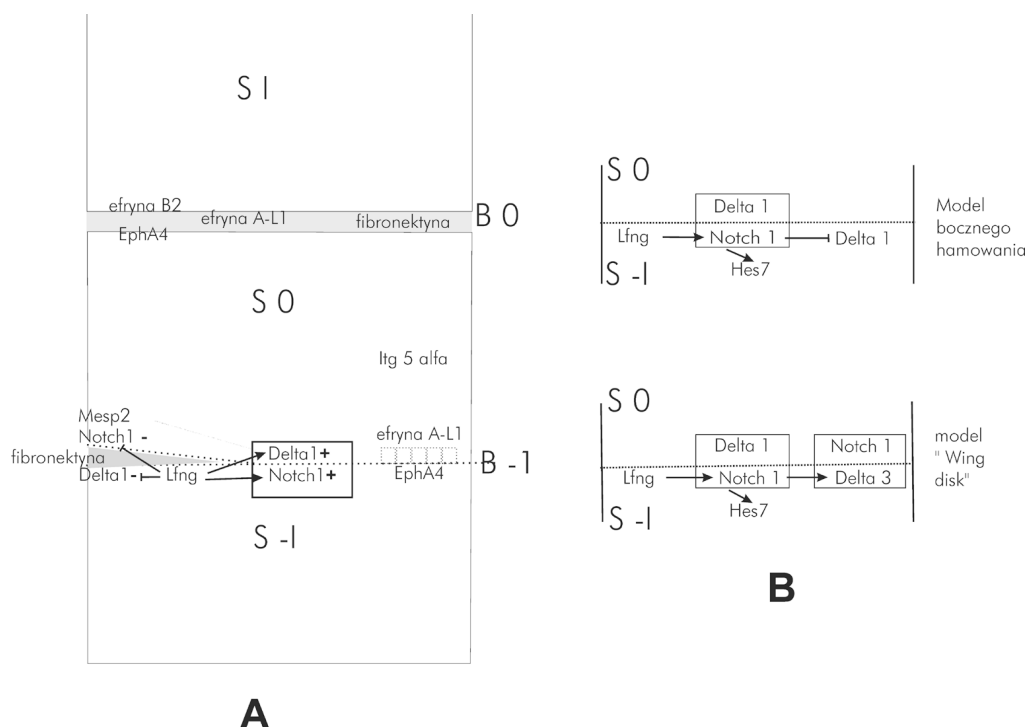
Do dobrego przylegania komórek nabłonkowych w czasie epitelizacji, oprócz obecności integryn na ich powierzchni, przyczynia się zapewne sygnalizacja Notch. Połączenie pozakomórkowych domen Delta i Notch wzmacnia adhezję komórek. Zaznaczyć trzeba, że działanie preseniliny (patrz niżej) w ciągu kilku minut niweluje to silne połączenie [2].

POWSTAWANIE SZPARY I GRANIC SOMITU

Pierwszym morfologicznym przejawem oddzielania się somitu od PSM jest tworzenie się na poziomie B-1 szczeliny prostopadłej do długiej osi PSM. W obrębie niej zanika bezpośredni kontakt między komórkami. Zachodzi tu prawdopodobnie odpychanie się komórek. Po utracie przylegania u danio kaudalne komórki presomitu grupują się (*coalescent*) i przesuują nieco ku przodowi. Równocześnie na rostralnym brzegu PSM komórki grzbietowe, boczne i brzuszne obkurczają się (retrakcja) i zmieniają kształt. Stanowią one następnie rostralny brzeg tworzącego się kolejnego somitu. W szparze gromadzi się substancja międzykomórkowa zawierająca fibronektynę [18].

Wykazano, że w tworzeniu się szpary biorą udział kadheryny, białka szlaków sygnalizacyjnych Eph/efryna oraz Notch. System Eph/efryna działa dwukierunkowo, zależnie od rodzaju efryny powoduje zwiększenie przylegania lub rozsuniecie się sąsiednich komórek. Efryny występują w dwóch postaciach, jedne są związane z błoną komórkową, drugie sekrecyjne są wydzielane z komórki. Zarówno efryny transbłonowe, jak i ich receptory Eph po aktywacji mogą jednocześnie przekazywać sygnał do komórek. Stąd związanie się takiej efryny z Eph może spowodować zmiany w obu komórkach biorących udział w przekazywaniu sygnału. System ten działający w dwóch kierunkach nazwano „*forward and reverse signaling*” [18,32]. Sekrecyjne efryny mogą działać jako negatywnie dominujące białka, gdyż mogą się wiązać z receptorami, lecz ich nie aktywują i nie powodują ich agregacji.

Transbłonowa efryna B2 zdolna do sygnalizacji śródkomórkowej oraz sekrecyjna efryna A-L1 obecne są na kaudalnym końcu S0 (tj. przyszłym kaudalnym końcu somitu I), a w rostralnej części S-I występuje receptor EphA4, zdolny do wiązania się z oboma rodzajami efryn (ryc. 8 A). Przed wytworzeniem szpary można uwidocznić efrynę B2 oraz receptor EphA4 w PSM w postaci dwóch równoległych prążków poprzecznych do osi A/P, początkowo oddzielonych od siebie pasmem pojedynczych komórek niezawierających tych białek. Położenie naprzeciw siebie liganda efryny B2 i receptora EphA4 umożliwia ich łatwe wiązanie. Aktywowany receptor EphA4 wpływa na cytoszkielet i przez to ułatwia zmiany kształtu komórek i ich epitelizację. Powoduje bowiem polaryzację komórki i przybranie przez komórkę kształtu cylindrycznego,



RYCINA 8. Schemat tworzenia się szpary między S0 a S-I: A – rozmieszczenie Delta1, Notch1, Lfng, efryny i jej receptora EphA4 oraz fibronektyny, B – modele działania sygnalizacji Notch w tworzeniu szpary (wg Sato i współautorów [62] zmienione)

przesunięcie jąder komórkowych do jej części podstawowej, przemieszczenie się kateniny β do apikalnej części komórki. W nowowytworzonym somicie SI efryny występują wyłącznie na bocznej jego krawędzi [18, 19].

W kaudalnej części presomitu S0 u danio gromadzi się fibronektyna [39]. Zarówno epitelizacja, jak i gromadzenie się fibronektyny zależą od integryn. W przyśrodkowej części presomitu wykryto ekspresję genu integryny *itg 5 α* . Integryna ta współpracuje z systemem efryna/Eph dla utrzymania granic somitu. Działanie efryny może w tym obszarze powodować odpychanie się komórek na styku S-I i S0, a działanie kadheryn ich segregację w obrębie presomitu na dwa rodzaje nabłonkowe i mezenchymatyczne [41].

Niewątpliwy jest udział genów szlaku Notch w tworzeniu się szpary. Powstaje ona w miejscu, w którym stykają się ze sobą komórki o aktywnym Notch1 z komórkami o nieaktywnym Notch 1. Takie rozgraniczenie komórek rozpoczyna się tworzyć na linii B-1, tj. między S-I a S0. W rostralnej części S-I gromadzi się Lfng, które w tym obszarze modyfikuje i aktywuje Notch1 i równocześnie hamuje ekspresję *dll1*. Ostra granica nagromadzenia mRNA *Lfng* na poziomie linii B-1 jest, jak się przypuszcza, nieodzowna dla wytworzenia szpary. Natomiast lokalizacja nieaktywnego Notch1 w S0 pokrywa się z obecnością MESP2 (ryc. 8 A). Aktywne Notch1 w komórkach na

rostralnym brzegu S-I łączy się z Delta1 na komórkach kaudalnego S0 i powoduje, że komórki w kaudalnej części S0 nie podlegają epitelizacji [18, 51, 59, 63].

Sato i wsp. [62] przypuszczają, że przy tworzeniu szpary sygnalizacja Notch może działać albo przez mechanizm „hamowania bocznego” lub/i przez mechanizm *wing disk* (tarczka imaginalna skrzydła). W mechanizmie hamowania bocznego Notch1 na komórkach rostralnego brzegu S-I wiąże się z Delta1 na powierzchni komórek kaudalnego brzegu S0 i hamuje w tych komórkach aktywność Notch. Równocześnie komórki brzegu rostralnego S-1 produkują bliżej jeszcze nieznaną substancję indukującą zmiany w komórkach kaudalnego S0. Czynnikiem takim nazwany został przez autorów segmenterem, być może jest nim Hes7 (ryc. 8 B). W mechanizmie *wing disk* Lfng modyfikując Notch1 w komórkach brzegu rostralnego S-I pobudza także ekspresję *delta3*. W takim przypadku dochodzi do równoczesnego wiązania się Notch1 z Delta 1, jak w modelu poprzednim, i do wiązania się Delta 3 zlokalizowanego na komórkach brzegu rostralnego S-I z Notch 1 na komórkach kaudalnego brzegu S0. W tym przypadku Lfng powodowałoby odmienną odpowiedź Notch 1 na działanie Delta 1 i Delta 3 [62]. Obydwa te mechanizmy powodują powstanie dwóch rodzajów komórek – być może wzajemnie się odpychających.

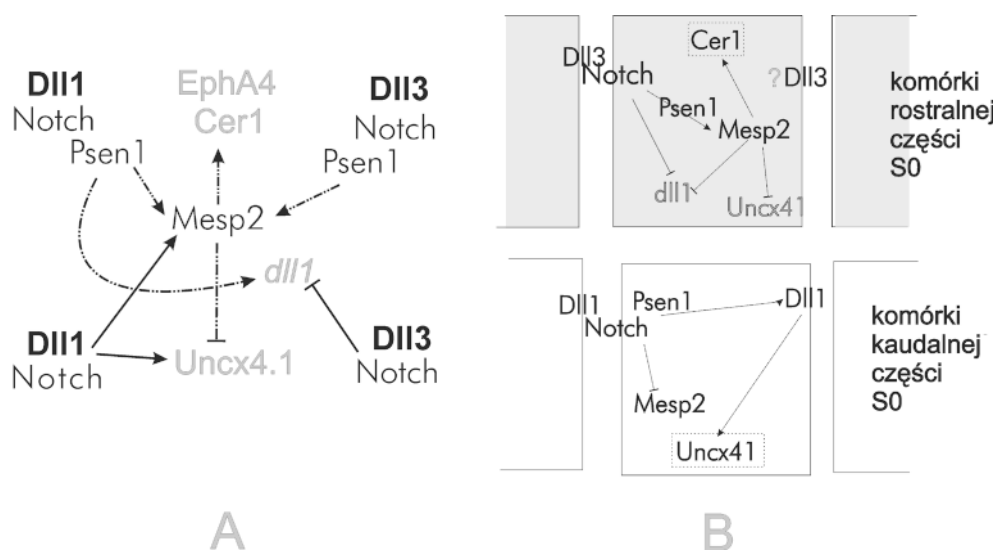
W ustalaniu położenia szpary odgrywa rolę także białko Sip1 (*Smad integrating protein1*), które zapobiega rozprzestrzenianiu się rostralnie (ku przodowi) FGF8, Wnt3a, Dll3, Tbx6, ale nie hamuje rozciągania się ku przodowi Lfng, Hes7, Dll1 i wpływa na granicę RA [48].

Szczególnie silne zdolności indukowania tworzenia się szpary mają komórki brzuszno-rostralne brzegu PSM. Komórki takie bowiem przeniesione w kaudalną, niesegmentowaną PSM indukują powstanie ektotopowej szpary. Komórki te działają w kierunku dogrzebietowym niezależnie od tego, jak przeszczep został zorientowany. Przypuszczalnie w wytworzeniu szpary działają dwa odrębne jednokierunkowe sygnały, jeden w osi A/P, a drugi w osi D/V [63].

Kontakt PSM z narządami pierwotnymi, a szczególnie z ektoderłą powierzchniową jest także potrzebny dla powstania szpary. W tworzeniu jej instruktywną rolę grają komórki grzbietowej ektodermy zlokalizowane z tyłu linii B-1, prawdopodobnie indukując ekspresję genu *tcf15* kodującego paraxis. Natomiast komórki endodermy jelitowej stykające się z PSM mają jedynie właściwości permissyjne [63].

POLARYZACJA SOMITU

Nowopowstały somit jest spolaryzowany wzdłuż dwóch osi: A/P i D/V. Polaryzacja D/V jest narzucona w pewnym stopniu już komórkom macierzystym tworzącym kohortę, jak już zaznaczono uprzednio. Polaryzacja wzdłuż osi A/P rozpoczyna się w rostralnej PSM dopiero po ustaniu oscylacyjnej ekspresji genów. Segregacja na komórki rostralne i kaudalne somitu ma miejsce na poziomie S-1, kiedy to pojawia się w presomicie mRNA molekularnych markerów somitu: rostralnego *papc* (*paraxial protocadherin C*) u danio, *cerr1* (*cerberus1*) u kury, *tbx18* u myszy oraz kaudalnego *myoD* (*myogenic determinant factor*) u danio, *uncx4.1* u myszy [10, 34, 67, 68, 73].



RYCINA 9. Zmiany molekularne związane z segregacją komórek na rostralne i kaudalne somitu według przypuszczeń Kozumi i współautorów [43] oraz Takahasi i współautorów [72]: A – Sieć interakcji molekularnych między Dll1, Dll3, Mesp2 i preseniliną zachodzących w S-I, B – Odmienna regulacja sygnalizacji Notch w komórkach rostralnej i kaudalnej części presomitu S0. Sygnalizacja Notch z udziałem preseniliny zaznaczona przerywanymi liniami

Według Oates i Rhode [56] u danio polaryzacja somitu zachodzi w trzech etapach, najpierw wyodrębniają się komórki rostralne, po czym komunikują się z częściowo skaudalizowanymi sąsiadkami i indukują w nich pełną kaudalizację.

U myszy w polaryzacji A/P biorą udział Dll1, Dll3, Mesp2 oraz presenilina. Białka te tworzą w S-1 skomplikowaną sieć interakcji molekularnych pomiędzy sąsiednimi komórkami (ryc. 9A). Dll1 i Dll3 ulegają ekspresji w rostralnej PSM. Jak już zaznaczono, ekspresja *mesp2* w presomicie S0 zostaje ograniczona do jego rostralnej części. Ograniczenie to spowodowane jest różną regulacją sygnalizacji Notch w rostralnej i kaudalnej części tego presomitu (ryc. 9B). W obrębie S0 następuje segregacja: Dll1 i Dll3. Dll1 lokuje się w komórkach kaudalnej części tego presomitu, a Dll3 w komórkach rostralnych, co wiąże się z ich odmiennymi funkcjami. Dll1 i Dll3 działają w dwóch różnych pętlach sprzężenia zwrotnego, jako antagoniści w wyznaczaniu rostralnej i kaudalnej części somitu. Do ich regulacji włącza się białko presenilina – Ps1 (*presenilin 1*)³. Dll3 wiążąc się bezpośrednio z Notch hamuje w części rostralnej ekspresję *dll1*. Natomiast Dll3 wiążąc się z Notch za pośrednictwem preseniliny zwiększa produkcję Mesp, które aktywuje geny markerów rostralnych *cer1* i *EphA4* oraz zawiesza ekspresję *uncx4.1*. W komórkach kaudalnej części S0 działa negatywna pętla sprzężenia zwrotnego przy pośrednictwie preseniliny, w której Dll1 indukuje ekspresję swojego własnego genu oraz *uncx4.1* [42, 73].

³Presenilina Ps1 – *presenilin*; transbłonowe białko, kodowane przez gen *Psen1* reguluje działanie receptora Notch, działa proteolitycznie jak γ -sekretaza, reguluje translokację śródkomórkowej domeny Notch [NICD] do jądra komórkowego.

Nie wiadomo, jakie jeszcze inne czynniki wpływają także na polaryzację somitu. U kury w rostralnej PSM zachodzi ekspresja genu *tbx18*, która następnie ogranicza się do rostralnej części somitu. U myszy *Tbx18* występuje w całej PSM [28].

INFORMACJA POZYCYJNA SOMITÓW

Morfologiczne zróżnicowanie kręgów w obrębie kręgosłupa na szyjne, piersiowe, lędźwiowe, krzyżowe i ogonowe jest odbiciem informacji pozycyjnej, jaką uzyskują somity w czasie ich rozwoju. Informacja pozycyjna jest nadawana w dwóch wymiarach przednio-tylnym (rostralno-kaudalnym) i przyśrodkowo-bocznym (medio-lateralnym) [24]. Informację pozycyjną boczno-przyśrodkową uzyskują już komórki wyodrębniającej się kohorty (o czym już wyżej wspomniano). Informacja o położeniu przednio-tylnym decyduje o odmiennych właściwościach, czyli identyczności poszczególnych somitów i następnie kręgów. Ta informacja pozycyjna jest także wcześniej determinowana w somitogenezie. Jest zależna od czasu wyodrębniania się kohorty komórek macierzystych. Im później w rozwoju kohorta wyodrębnia się i im więcej cykli oscylacyjnych przejdzie w pączku ogonowym i kaudalnej PSM, tym bardziej kaudalny charakter ma powstały z niej somit. Informacja pozycyjna jest mocno „zapisana” w każdym rozwijającym się somicie. Wycinek PSM lub nowowytworzony somit przeszczepiony w inne ektotopowe miejsce (inny poziom) na osi A/P zachowuje zaprogramowaną identyczność pozycyjną i tworzy ektotopową strukturę, taką jakby rozwijał się w swoim normalnym miejscu. Komórki każdej kohorty są zdolne do interpretacji zewnętrznych sygnałów, ale tworzą strukturę według nadanej im informacji pozycyjnej [21].

Już stosunkowo dawno wykazano, że identyczność somitów jest w dużej mierze determinowana przez ekspresję genów tak zwanego kodu Hox [8, 43]. Geny te kodują czynniki transkrypcyjne zawierające domenę homeoboks. Charakteryzują się tym, że występują w 4 kompleksach zlokalizowanych na różnych chromosomach. Każdy kompleks obejmuje 9–13 genów paralogicznych⁴, ułożonych liniowo na chromosomie. Mutacje pojedynczych genów paralogicznych powodują homeotyczne zmiany somitu, to jest zmianę ich właściwości na bardziej kaudalne lub bardziej rostralne. Geny kodu Hox ulegają ekspresji w PSM i somitach zgodnie z zasadą kolinearności przestrzennej i czasowej w coraz większej liczbie w kierunku doogonowym. W somitomerach czaszkowych zachodzi ekspresja tylko pierwszych trzech (1–3) grup paralogicznych, a w somitach ogonowych wszystkich grup paralogicznych (1–13) [9].

Aktywacja genów Hox jest zależna od czasu powstawania kohorty i od jej położenia na osi A/P zarodka. Ekspresja genów Hox w somitogenezie myszy wg Cordes et al. [14] zachodzi w dwóch etapach. Prawdopodobnie już w komórkach prekursorowych PSM w smudze pierwotnej są aktywowane geny Hox i może zachodzić ich transkrypcja. W drugim etapie w rostralnej PSM po „przejściu” kohorty przez czoło determinujące,

⁴ Geny paralogiczne mają taką samą strukturę, wzorzec transkrypcji i analogiczną funkcję, w ramach kodu Hox oznaczane są kolejnymi cyframi arabskimi.

zachodzi w jej komórkach definitywna ekspresja odpowiednich genów dla danego kolejno powstającego somitu. Jest ona przynajmniej częściowo kontrolowana przez sygnalizację Notch i związana jest z zegarem oscylacyjnym, które to mechanizmy zapewniają aktywację genów Hox odpowiednich dla danego segmentu. Interakcja między zegarem oscylacyjnym i genami Hox może ustanawiać poprawną koordynację kolejnego formowania się segmentów i ukierunkowywanie (specyfikację) ich wzdłuż osi A/P [23]. Są również dowody, że FGF8 i Wnt3a wpływają na ekspresję genów Hox. Poziom Wnt3a w smudze pierwotnej i pęczku ogonowym może kontrolować, zgodnie z gradientem, kolejną ekspresję genów Hox, dostarczając informacji pozycyjnej komórkom wzdłuż osi A/P [3,4,16]. Aktywacja genów Hox jest zależna od czasu powstawania kohorty i od jej położenia na osi A/P zarodka.

SYNCHRONIZACJA ROZWOJU SOMITÓW

Kolejne zmiany zachodzące w obrębie kohorty komórek począwszy od komórek macierzystych do uformowanego somitu są zsynchronizowane. Przypuszcza się, że za tą synchronizację odpowiedzialna jest sygnalizacja Notch, jak wspomniano wyżej. Ponadto zsynchronizowane są przemiany w każdej parze tworzących się somitów, zarówno pod względem morfologicznym jak i przemian molekularnych. Mechanizm tej dwubocznej synchronizacji jest nieznany. Przypuszcza się, że bierze w niej udział kwas retinowy, ponieważ przy jego braku zostaje opóźniony rozwój somitów po prawej stronie, co także związane jest z desynchronizacją zegara oscylacyjnego [79]. Wnt3a działając jako sygnał o dalekim zasięgu może niwelować działanie mechanizmu kierującego odróżnieniem prawej i lewej strony zarodka, rozpoczynającym działanie już w węźle Henzena [52]. Symetria pary jest prawdopodobnie utrzymywana przy udziale czynnika transkrypcyjnego Cdx1 obecnego w komórkach somitu.

UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione powyżej procesy molekularne zachodzące w czasie somitogenezy u kregowców są tylko czubkiem góry lodowej w stosunku do istotnych, ale niepoznanych jeszcze mechanizmów regulujących różnicowanie się somitów. Świadczą, jak bardzo złożone są mechanizmy powodujące różnicowanie się narządów w czasie rozwoju zarodkowego. Molekularny mechanizm, jaki kieruje zegarem oscylacyjnym, jest jeszcze daleki od pełnego wyjaśnienia. Dowodem mogą być doniesienia o udziale coraz to nowych genów w somitogenezie, jak np. u danio genu receptora fosfatazy ψ – RPTP ψ (*receptor protein phosphatase ψ*), którego ekspresja oscyluje w kaudalnej PSM [1]. Do wyjaśnienia zostaje wiele problemów, choćby takich, w jaki sposób zegar oscylacyjny jest tłumaczony na zmiany morfologiczne wyrażające się w tworzeniu oddzielnych segmentów? Czy zegar oscylacyjny może występować w trakcie różnicowania się innych narządów? Nie zaobserwowano go w segmentacji tyłomózgowia, która również

jest oparta na sygnalizacji Notch. Masamizu i współautorzy [49] przypuszczają, że oscylacja ekspresji genów może zachodzić w różnego rodzaju komórkach w różnych procesach biologicznych, lecz jest odmiennie regulowana niż w zegarze oscylacyjnym w somitogenezie. Ostatnio wykazano, że *in vitro* w fibroblastach myszy i w pewnych ustalonych liniach komórkowych geny *hes1* wykazują pulsacyjną ekspresję. Pulsacja ta jest jednak nieregularna i krótkotrwała [23, 49].

Morfogeneza somitów u kręgowców jest procesem konserwatywnym, można także przypuszczać na podstawie obserwacji przedstawicieli tylko 3 gromad, że również procesy molekularne kierujące somitogenezą są konserwatywne. U przebadanych gatunków somitogeneza opiera się na oddziaływaniu sygnalizacji Notch, Wnt i FGF oraz ich wzajemnej regulacji poprzez różnego rodzaju molekularne pętle sprzężenia zwrotnego. Model ten odbiega znacznie od powszechnie przedstawianego modelu molekularnego segmentacji u zarodków *Drosophila*, który opiera się o tak zwane geny segmentacyjne, geny reguły parzystej i geny polarności [39,43]. Somitogeneza bardziej zbliżona jest do przebiegu różnicowania się skrzydeł z dysków imaginalnych larw tego gatunku, w którym ważną rolę gra sygnalizacja Notch. Mało wiemy o mechanizmach kierujących segmentacją u bezkręgowców, nawet takich o wysokim stopniu metameryzacji jak pierścienice. Ostatnio ukazały się publikacje świadczące, że u niektórych pajaków w segmentacji zarodka bierze udział kanoniczna sygnalizacja Notch oraz ulegają ekspresji geny homologiczne do aktywnych w somitogenezie [66,71].

Podziw dla natury budzi obserwowanie, jak jeden szlak sygnalizacyjny może być regulowany przez różne czynniki, na różnych poziomach translacji dając całkowicie odmienne, a niekiedy przeciwne efekty. Taka ekonomia komórkowa prowadzi do wykorzystywania jednego szlaku wielokrotnie w ciągu rozwoju w wielu różnorodnych procesach. Czy wobec tak skomplikowanych i subtelnych mechanizmów molekularnych i możliwości różnorodnych zmian w regulacji nawet jednego genu będzie możliwe łatwe wyprodukowanie z komórek macierzystych narządów *in vitro*?

PIŚMIENNICTWO

- [1] AERNE B, ISH-HOROWICZ D. Receptor tyrosine phosphatase ϕ is required for Delta/Notch signalling and cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Development* 2004; **131**: 3391–339.
- [2] AHIMOU F, MOK LP, BARDOT B, WESLEY C. The adhesion force of Notch with Delta and the rate of Notch signalling. *J Cell Biol* 2004; **167**: 1217–1220.
- [3] AULEHLA A, HERMANN BG. Segmentation in vertebrates clock and gradient finally joined. *Gen Dev* 2004; **18**: 2060–2067.
- [4] AULEHLA A, WEHRL E, BRAND-STABER B, KEMLER R, GOSSLER A, KANZLER B, HERMANN BG. Wnt3a plays a major role in segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev Cell* 2003; **4**: 395–406.
- [5] BESSHO Y, HIRATA H, MASAMIZU Y, KAGEYAMA R. Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. *Gen Dev* 2003; **7**: 1451–1456.
- [6] BESSHO Y, SAKATA R, KOMATSU S, SHIOTA K, YAMADA S, KAGEYAMA R. Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Gen Dev* 2001; **15**: 2642–2647.
- [7] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Pączek ogonowy. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 681–702.
- [8] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Zarys Organogenezy. Różnicowanie się komórek w narządach. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.

- [9] BURKE AC, CRAIG EN, MORGAN BM, TABIN C. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* 1995; **121**: 333–346.
- [10] BUSSE M, PETRY M, SCHUSTER-GOSSLER K, LEITGES M, GOSSLER A, KISPERS A. The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartment. *Gen Dev* 2004; **18**: 1209–1220.
- [11] CHRIST B, ORDAHL CP. Early stages of chick somite. *Anat Embryol* 1995; **191**: 381–396.
- [12] COLE SE, LEVORSE JM, TIGHMAN M, VOGT TF. Clock regulatory elements control cyclic expression of Lunatic fringe during somitogenesis. *Dev Cell* 2002; **3**: 75–84.
- [13] COOKE J, ZEEMAN EC. A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J Theor Biol* 1976; **58**: 455–476.
- [14] CORDES R, SCUSTER-GOSSLER K, SERTH K, GOSSLER A. Specification of vertebral identity is coupled to Notch signalling and the segmentation clock. *Development* 2003; **131**: 1221–1233.
- [15] CORREIA KM, CONLON R. Surface ectoderm is necessary for the morphogenesis of the somites. *Mech Dev* 2000; **91**: 19–30.
- [16] DUBRULLE J, MCGREW MJ, POURQUIE O. Fgf signalling controls somite boundary position and regulate segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* 2001; **106**: 219–232.
- [17] DUBRULLE J, POURQUIE O. *fgf8* mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning vertebrate embryo. *Nature* 2004; **427**: 419–422.
- [18] DUBRULLE J, POURQUIE O. Coupling segmentation to axis formation. *Development* 2004; **131**: 5783–5793.
- [19] DURBIN L, BRENNAN C, SHIOMI K, COOKE J, BARRIOS A, SHANMUGALINGAM S, GUTHRIE B, LINDBERG R, HOLDER N. Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites. *Gen Dev* 1998; **12**: 3096–3109.
- [20] ELOY-TRINQUET S, NICOLAS JF. Cell coherence during production of the presomitic mesoderm and somitogenesis in the mouse embryo. *Development* 2002; **129**: 3609–3619.
- [21] FOMENOU MD, SCAAL M, STOCKDALE FE, CHRIST B, HUANG R. Cells and all somitic compartments are determined with respect to segmental identity. *Dev Dyn* 2005; **233**: 13876–1393.
- [22] FORSBERG H, CROZET F, BROWN NA. Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four-hour cycle at two intervals, precede somite boundary formation. *Curr Biol* 1998; **8**: 1027–1030.
- [23] FREITAS C, RODRIGUES S, SAUDE L, PALMEIRIM I. Running after the clock. *Int J Dev Biol* 2005; **49**: 317–324.
- [24] FREITAS C, RODRIGUES S, CHARRIER JB, TEILLET MA, PALMEIRIM I. Evidence for medial/lateral specification and positional information within the presomitic mesoderm. *Development* 2001; **128**: 5139–5147.
- [25] GAJEWSKI M, SIEGER D, ALT BA, LEVE C, HANS S, WOLFF C, ROHR KB, TAUTZ D. Anterior and posterior waves of cyclic *her1* gene expression are differentially regulated in the presomitic mesoderm of zebrafish. *Development* 2003; **130**: 4269–4278.
- [26] GÁLGERAN J, SUSTMANN C, HSU SC, FOLBERTH S, GROSSCHEDL R. LEF1-mediated regulation of *Delta-like 1* links WNT and Notch signaling in somitogenesis. *Gen Dev* 2004; **18**: 2718–2723.
- [27] MCGREW MJ, DALE JK, FRABOULET S, POURQUIE O. The *Lunatic Fringe* gene is target of the molecular clock linked to segmentation in avian embryo. *Curr Biol* 1998; **8**: 979–982.
- [28] HENRY CA, URBAN MK, DILL KK, MERLIE JP, PAGE MF, KIMMEL CB, AMACHER SL. Two linked *hairy/Enhancer-of-split-related* zebrafish genes, *her1* and *her7* function together to refine alternating somites boundaries. *Development* 2002; **129**: 3693–3704.
- [29] HAENIG B, KISPERS A. Analysis of Tbx18 expression in chick embryo. *Dev Genes Evol* 2004; **214**: 407–411.
- [30] HIRATA H, BESSHO Y, KOKUBU H, MASAMIZU Y, YAMADA S, LEWIS J, KAGEYAMA R. Instability of Hes7 protein is crucial for the somite segmentation clock. *Nat Genet* 2004; **36**: 750–754.
- [31] HOFMANN M, SCHUSTER-GOSSLER K, WATANABE-RUDOLPH M, AULEHLA A, HERRMANN BG, GOSSLER A. WNT signalling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signalling by regulating *Dll1* expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *Gen Dev* 2004; **18**: 2712–2717.
- [32] HOLDER N, KLEIN R. Eph receptors and ephrins; effectors of morphogenesis. *Development* 1999; **126**: 2033–2044.
- [33] HOLLEY SA, GEISLER R, NÜSSEIN-VOLHARD C. Control of *her1* expression during zebrafish somitogenesis by a *Delta*-dependent oscillator and an independent wave-front activity. *Gen Dev* 2000; **14**: 1678–1690.
- [34] HOLLEY SA, JULICH D, RAUCH GJ, GOSSLER R, NÜSSEIN-VOLHARD C. *her1* and the *notch* pathway function within the oscillator mechanism that regulates zebrafish somitogenesis. *Development* 2002; **129**: 1175–1183.

- [35] ISHIKAWA A, KITAJIMA S, TAKAHASHI Y, KUKOBO H, KANNO J, INOUE TR, SAGA Y. Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev* 2004; **121**: 1443–1453.
- [36] JOUVE C, IIMURA T, POURQUIE O. Onset of the segmentation clock in the chick embryo evidence for oscillation's in somite precursors in the primitive streak. *Development* 2002; **129**: 1107–1117.
- [37] JOUVE C, PALMEIRIM I, HENRIQUE D, BECKERS J, GOSSLER A, ISH-HOROWICZ D, POURQUIE O. Notch signaling is required for cyclic expression of hairy-like gene *HES1* in the presomitic mesoderm. *Development* 2000; **127**: 1421–1429.
- [38] JULICH D, GEISLER R, HOLLEY SA. Integrin alpha5 and delta/notch signaling have complementary spatiotemporal requirements during zebrafish somatogenesis. *Dev Cell* 2005; **8**: 575–586.
- [39] JURA C, KLAG J [red.] Podstawy embriologii zwierząt i człowieka, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- [40] KAWAHARA A, CHE YS, HANAOKA R, TAKEDA H, DAWID IB. Zebrafish *GADD45b* genes are involved in somite segmentation. *PNAS* 2005; **102**: 361–366.
- [41] KOSHIDA S, KISHIMOTO Y, USTUMI H, SHIMIZU T, FURUTANI-SEIKI N, KONDOH H, TAKADA S. Integrin alpha-dependent fibronectin accumulation for maintenance of somite boundaries in zebrafish embryos. *Dev Cell* 2005; **8**: 587–598.
- [42] KOIZUMI K, NAKAJIMA M, YUASA S, SAKAI T, KURIYAMA T, SHIRASAWA T, KOSEKI H. The role of presenilin 1 during segmentation. *Development* 2001; **128**: 1391–1402.
- [43] KRZANOWSKA H, SOKÓŁ-MISIAK W. [red.] Molekularne mechanizmy rozwoju zarodkowego. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
- [44] KUME T, HANG HY, TOPCZEWSKA JM, HOGAN BLM. The murine winged helix transcription factors, *Foxc1* and *Foxc2*, are both required for cardiovascular development and somitogenesis. *Gen Dev* 2001; **15**: 2470–2482.
- [45] LE BORGNE R, REMAUD S, HMEL S, SCHWEISGUTH F. Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulations of Delta and Serrate signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol* 2005; e96.
- [46] MADEN M, SONNEVELD E, van den SAAG PT, GALE E. The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo implications for developmental mechanisms. *Development* 1998; **125**: 4133–4144.
- [47] MAROTO M, DALE KJ, DEQUEANT ML, PETIT AC, POURQUIE O. Synchronised cycling gene oscillations in presomitic mesoderm cells require cell-cell contact. *Int J Dev Biol* 2005; **49**: 309–315.
- [48] MARUHASHI H, van de PUTTE T, HUYLEBROECK D, KONDOH H, HIGASHI Y. Involvement of SIP1 in positioning of somites boundaries in the mouse embryo. *Dev Dyn* 2005; **234**: 332–338.
- [49] MASAMIZU Y, OHTSUKA T, TAKASHIMA Y, NAGAHARA H, TAKENKA Y, YOSHIKAWA K, OKAMURA H, KAGEYAMA R. Real-time imaging of the somite segmentation clock: Revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. *PNAS* 2005; **103**: 1313–1318.
- [50] MORALES AV, YASUDA Y, ISH-HOROWICZ D. Periodic Lunatic fringe expression is controlled during segmentation by a cyclic transcriptional enhancer responsive to Notch signaling. *Dev Cell* 2002; **3**: 63–74.
- [51] MORIMOTO M, TAKAHASHI Y, ENDO M, SAGA Y. The *Mesp2* transcription establishes segmental borders suppressing Notch activity. *Nature* 2005; **435**: 354–359.
- [52] NAKAYA Y, KURODA S, KATAGIRI YT, KAIBUCHI K, TAKAHASHI Y. Mesenchymal-epithelial transition during somite segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1. *Dev Cell* 2004; **7**: 425–438.
- [53] NIKAIIDO M, KAWAKAMI A, SAWADA, FURUTANI-SEIKI M, TAKEDA H, ARAKI K. *Tbx24*, encoding a T-Box protein, is mutated in the zebrafish somite – segmentation mutant *fused somites*. *Nature Gen* 2002; **31**: 195–199.
- [54] NICOLAS JF, MATHIS L, BONNEROT C, SAURIN W. Evidence in the mouse for self renewing stem cell in the formation of segmented longitudinal structure, the myotome. *Development* 1995; **122**: 2933–296.
- [55] OATES AC, HO RK. *Hairy/E(spl)-related (Her)* genes are central components of the segmentation oscillator and display redundancy with the Delta/Notch signalling pathway in the formation of anterior segmental boundaries in the zebrafish. *Development* 2002; **129**: 2929–2946.
- [56] OATES AC, RHODE LA, HO RK. Generation of segment polarity in the paraxial mesoderm of the zebrafish through a T-box-dependent inductive event. *Dev Biol* 2005; **283**: 204–214.
- [57] PALMEIRIM I, HENRIQUE D, ISH-HOROWICZ D, POURQUIE O. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 1997; **91**: 639–648.
- [58] PASINI A, JIANG YJ, WILKINSON DG. Two zebrafish Notch-dependent *hairy/Enhancer-of-split-related* genes *her6* and *her4*, are required to maintain the co-ordination of cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Development* 2003; **131**: 1529–1541.

- [59] POURQUIE O. Vertebrate somitogenesis a novel paradigm for animal segmentation? *Int J Dev Biol* 2003; **47**: 597–503.
- [60] POURQUIE O, KUSUMI K. When body segmentation goes wrong. *Clin Genet* 2001; **60**: 409–416.
- [61] POURQUIE O, TAM PPL. A nomenclature for prospective somites and phases of cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Dev Cell* 2001; **1**: 619–620.
- [62] SAKAI Y, MENO C, FUJII H, NISHINO J, SHIRATORI H, SAIJOH Y, ROSSANT J, HAMADA H. The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the anterior-posterior axis within the mouse embryo. *Gen Dev* 2001; **15**: 213–225.
- [63] SATO Y, YASUDA K, TAKAHASI Y. Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic fringe and notch during somitic segmentation. *Development* 2002; **129**: 3633–3644.
- [64] SAWADA A, FRITZ A, JIANG YJ, YAMAMOTO A, YAMASU K, KUROIWA A, SAGA Y, TAKEDA H. Zebrafish *Mesp* family genes, *mesp-a* and *mesp-b* are segmentally expressed in the presomitic mesoderm. And *Mesp-b* confers the anterior identity to the developing somites. *Development* 2000; **127**: 1691–1702.
- [65] SAWADA A, SHINHYA M, JIANG YJ, KAWAKAMI A, KUROIWA A. Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development* 2001; **128**: 4873–4880.
- [66] SCHOPPEMEIER M, DAMEN WG. Suppressors of Hairless and presenilin phenotypes imply involvement of canonical Notch signaling in segmentation of the spider *Cupiennius salei*. *Dev Biol* 2005; **280**: 1211–1224.
- [67] SERTH K, SCHUSTER-GOSSLER K, CORDES R, GOSSLER A. Transcriptional oscillation of Lunatic fringe is essential for somitogenesis. *Gen Dev* 2003; **17**: 912–925.
- [68] SHAWLOT W, DENG JM, BEHRINGER RR. Expression of the mouse cerberus related gene, *Cerr1*, suggests a role in anterior neural induction and somitogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 6198–6203.
- [69] SIEGER D, TAUTZ D, GAJEWSKI M. The role of the Suppressor of Hairless in Notch mediated signaling during zebrafish somitogenesis. *Mech Dev* 2004; **120**: 1083–1094.
- [70] SIEGER D, TAUTZ D, GAJEWSKI M. Her11 is involved in the somitogenesis in zebrafish. *Dev Genes Evol* 2004; **214**: 393–406.
- [71] STOLLEWERK A, SCHOPPEMEIER M, DAMEN WG. Involvement of Notch and Delta genes in spider segmentation. *Nature* 2003; **423**: 863–865.
- [72] TAKAHASI Y, KITAJIMA S, INOUE T, KANNO J, SAGA Y. Differential contributions of *Mesp1* and *Mesp2* to the epithelization and rostro-caudal patterning of somites. *Development* 2005; **132**: 787–796.
- [73] TAKAHASI Y, INOUE T, GOSSLER A, SAGA Y. Feedback loops comprising *Dll1*, *Dll3* and *Mesp2*, and differential involvement of *Psen1* are essential for rostrocaudal patterning of somites. *Development* 2003; **130**: 4259–4268.
- [74] TAM PPL, BEDINGTON RSP. The formation of the mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis. *Development* 1987; **99**: 109–106.
- [75] TAM PPL, TAN SS. The somitogenetic potential of cells in the primitive streak and tail bud of the organogenesis – stage mouse embryo. *Development* 1992; **115**: 703–715.
- [76] TAM PPL, TRAINOR A. Specification and segmentation of the paraxial mesoderm. *Anat Embryol* 1994; **189**: 275–305.
- [77] TOPCZEWSKA JM, TOPCZEWSKI J, SHOSTAK A, KUME T, SOLNICA-KREZEL L, HOGAN BLM. The winged helix transcription factor *Foxc1a* is essential for somitogenesis in zebrafish. *Genes Dev* 2001; **15**: 2483–2490.
- [78] TWYMAN TM. Krótkie wykłady, Biologia rozwoju. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- [79] VERMOT J, POURQUIE O. Retinoic acid co-ordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos. *Nature* 2005; **435**: 1215–1220.
- [80] WHITE PH, CHAPMAN DL. *Dll1* is a downstream target of *Tbx6* in the paraxial mesoderm. *Genesis* 2005; **42**: 193–202.
- [81] YOON JK, WOLD B. The bHLH regulator *pMesogenin 1* is required for maturation and segmentation of paraxial mesoderm. *Gen Dev* 2000; **14**: 3204–3214.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 10.04. 2006 r.

Przyjęto: 10.05. 2006 r.

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa