



FACULTAT DE BIOLOGIA

Departamento de Genética  
Programa de doctorado de Genética  
Bienio 2004-2006

Tesis Doctoral presentada por

**JUAN PASCUAL ANAYA**

bajo el título

**LOS COMPLEJOS *Hox* COMO MODELOS DE EVOLUCIÓN  
GENÓMICA EN CORDADOS: CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN  
DE LA EXPRESIÓN DEL CLÚSTER *Hox* EN EL ANFIOXO EUROPEO**

Para optar al título de Doctor por la Universitat de Barcelona

Firmado, el doctorando

Firmado,  
Los directores:

Dr. Jordi Garcia Fernàndez

Dr. Salvatore D'Aniello

Barcelona, 10 de MARZO de 2010







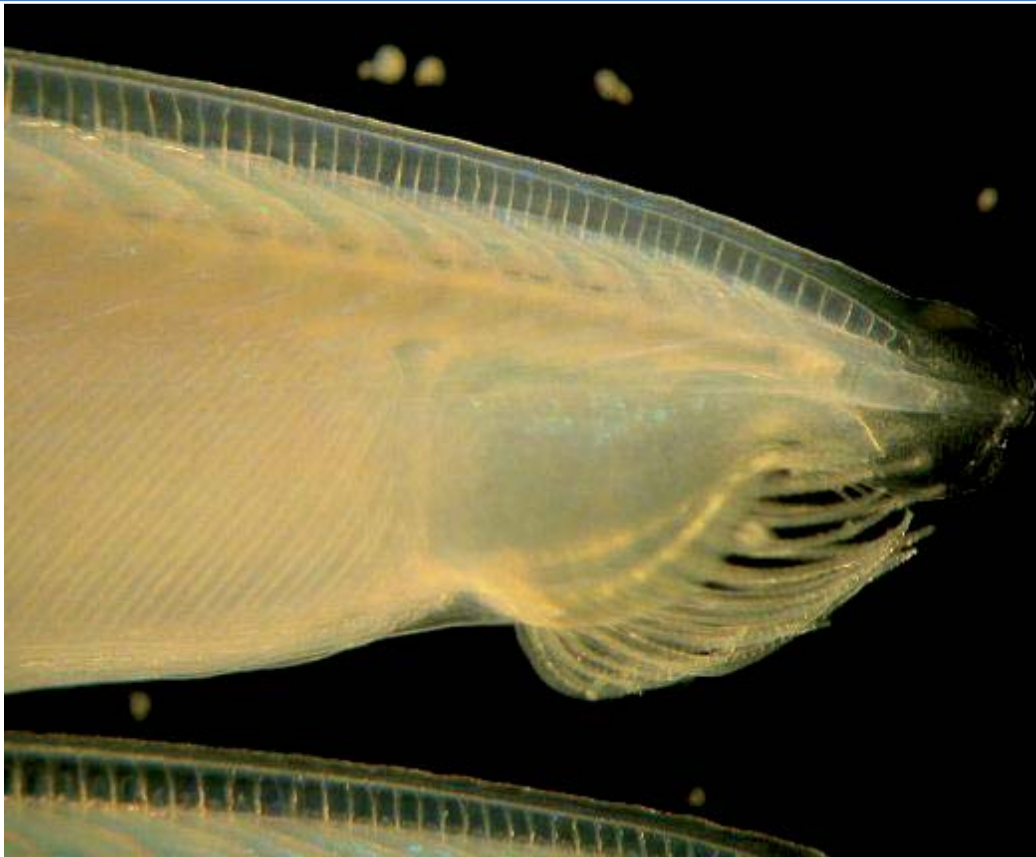
# ÍNDICE

---

|  |     |
|--|-----|
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | 9   |
| EL ANFIOXO COMO ORGANISMO MODELO PARA<br>EL ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE CORDADOS  | 12  |
| CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FILOGENÉTICAS   | 12  |
| Aparato digestivo  | 15  |
| Notocorda  | 16  |
| Sistema nervioso   | 16  |
| Sistema excretor   | 17  |
| Sistema vascular   | 18  |
| EL DESARROLLO EMBRIONARIO  | 19  |
| Segmentación y gastrulación  | 19  |
| Neurulación  | 21  |
| Desarrollo larvario  | 22  |
| La metamorfosis  | 23  |
| EL GENOMA DE <i>B. floridae</i>  | 23  |
| CULTIVO EN EL LABORATORIO  | 25  |
| LOS GENES <i>Hox</i> COMO MODELOS DE EVOLUCIÓN GENÓMICA: CARACTERIZACIÓN,<br>EXPRESIÓN Y FUNCIONES EN LOS DIFERENTES DEUTERÓSTOMOS | 26  |
| GENES <i>Hox</i> EN LOS DEUTERÓSTOMOS NO CORDADOS  | 28  |
| GENES <i>Hox</i> EN UROCORDADOS  | 30  |
| EL COMPLEMENTO <i>Hox</i> EN DIFERENTES VERTEBRADOS  | 31  |
| Ciclóstomos: ¿cuántos clústeres?   | 32  |
| Gnatóstomos. 2R, 3R... y 4R  | 35  |
| Condrictios y el ancestro común de los gnatostomados   | 35  |
| Actinoptirios: 3R y su enorme diversificación  | 36  |
| Sarcopterigios: evolución sin cambios en los complejos <i>Hox</i>  | 37  |
| EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>Hox</i> EN VERTEBRADOS   | 39  |
| EL CEFALOCORDADO ANFIOXO, Y EL CLÚSTER <i>Hox</i> ANCESTRAL DE CORDADOS  | 41  |
| REGULACIÓN DE LOS GENES <i>Hox</i>   | 42  |
| EL ÁCIDO RETINOICO: UN POTENTE MORFÓGENO   | 43  |
| SECUENCIAS NO-CODIFICANTES CONSERVADAS   | 45  |
| BIBLIOGRAFÍA   | 48  |
| <b>OBJETIVOS</b>   | 59  |
| <b>RESULTADOS</b>  | 63  |
| INORME DEL DIRECTOR SOBRE LOS ÍNDICES DE IMPACTO   | 65  |
| ARTÍCULO RI  | 67  |
| ARTÍCULO RII   | 83  |
| ARTÍCULO RIII  | 93  |
| ARTÍCULO RIV   | 117 |
| <b>DISCUSIÓN</b>   | 133 |
| UN ÚNICO CLÚSTER <i>Hox</i> DE 15 GENES EN CEFALOCORDADOS  | 136 |
| LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>Hox</i> ANTERIORES Y CENTRALES  | 136 |
| DESACOPLE DEL CÓDIGO <i>Hox</i> EN CORDADOS Y ROTURA DE LA COLINEARIDAD  | 139 |

|   |     |
|---|-----|
| LA REGULACIÓN DE LOS GENES HOX POR ÁCIDO RETINÓICO ES ANCESTRAL A TODOS<br>LOS GRUPOS | 142 |
| SUBFUNCIONALIZACIÓN DE LOS GENES HOX DURANTE LA EVOLUCIÓN DE LOS<br>VERTEBRADOS       | 143 |
| BIBLIOGRAFÍA  | 146 |
| <b>CONCLUSIONES</b>   | 149 |
| <b>APÉNDICES</b>  | 153 |
| ARTÍCULO AI   | 155 |
| ARTÍCULO AII  | 163 |
| ARTÍCULO AIII   | 179 |
| ARTÍCULO AIV  | 189 |
| ARTÍCULO AV   | 201 |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>  | 213 |

# INTRODUCCIÓN



Juan Pascual Anaya

LOS COMPLEJOS *Hox* COMO MODELOS DE EVOLUCIÓN GENÓMICA EN CORDADOS: CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CLÚSTER *Hox* EN EL ANFIOXO EUROPEO





# INTRODUCCIÓN

---

Todos los animales, vivos y fósiles, están comprendidos dentro de 35 fila. Éstos abarcan la enorme diversidad de morfologías que se han generado durante la evolución animal, desde una medusa, hasta una mosca o nosotros mismos, el hombre. Cada una de las diferentes morfologías son en último término el resultado de un proceso de desarrollo embrionario muy finamente regulado en el que participan cientos de genes, y que forman parte de decenas de redes génicas que interactúan unas con otras. A lo largo del tiempo, estas morfologías han ido evolucionando de forma que se han ido generando nuevas especies a partir de otras preexistentes o ancestros, compartidos por las especies que derivan de él.

Dado este marco, cobra fuerza una disciplina relativamente reciente, la Evo-Devo o Evolución del Desarrollo, que pretende explicar la evolución de la morfología animal buscando los cambios en los genes del desarrollo embrionario, ya que la primera es fruto del segundo. Sin embargo, la mayoría de los genes del desarrollo son los mismos en todos los animales, algo que se conoce como el *toolkit* genético, y esto lleva a lo que se conoce como la paradoja de la Evo-Devo: ¿cómo se explica entonces la gran diversidad morfológica, si los diferentes animales están contruidos con los mismos genes? Hay que buscar por tanto las diferencias que existan en los procesos del desarrollo de los diferentes animales. Una de estas diferencias puede recaer en cómo los genes del desarrollo se regulan: los genes han de ser por tanto expresados de manera diferente en el espacio y el tiempo para producir una innovación. Y estas expresiones están dirigidas por promotores y potenciadores, de estructura modular, que habrían ido cambiando durante la evolución, permitiendo la adquisición de nuevos territorios de expresión, nuevas uniones a diferentes factores de transcripción, etc. Uno de los procesos genómicos que permiten que se flexibilicen los elementos reguladores es la duplicación génica o la duplicación genómica. Con más de una copia para un gen, se relaja la presión de selección, ya que una de las copias puede mantener la función original y generarse una función nueva a partir de la copia (neofuncionalización) o pueden dividirse las funciones ancestrales (subfuncionalización).

En el origen de los vertebrados se han producido dos rondas de duplicación genómica (hipótesis 2R), y este proceso se cree que ha sido clave en la aparición de las innovaciones de los vertebrados, como las extremidades pares, las vértebras, las células de la cresta neural, las placodas y el desarrollo de un cerebro complejo. Una de las familias génicas que han podido tener un papel importante en estas innovaciones, son los genes Hox, de la familia de genes con homeobox. Los genes Hox son los encargados de determinar la identidad de las diferentes estructuras a lo largo del eje antero-posterior, y como se verá más adelante su historia evolutiva podría estar ligada a los cambios morfológicos más sustanciales que han ocurrido en el linaje de los vertebrados. Para entender mejor la

evolución de los vertebrados, es importante inferir la condición ancestral a partir de la cual se originaron. En este sentido, los cefalocordados, grupo basal de cordados que no ha sufrido las duplicaciones genómicas como los vertebrados, son una pieza clave, ya que es un grupo que ha evolucionado muy lentamente y su genoma puede reflejar condiciones ancestrales. En esta tesis doctoral por tanto, se ha llevado a cabo la caracterización del clúster Hox de anfioxo, tanto desde un punto de vista genómico, como de la expresión de los genes y de cómo estos están regulados, para poder inferir la condición del clúster Hox ancestral de cordados, a partir del cual se originaron los complejos de los vertebrados.

## EL ANFIOXO COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE CORDADOS

---

### CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FILOGENÉTICAS

(La mayoría de las descripciones de este apartado provienen de Jefferies, 1986, excepto cuando otras se citan específicamente otras referencias)

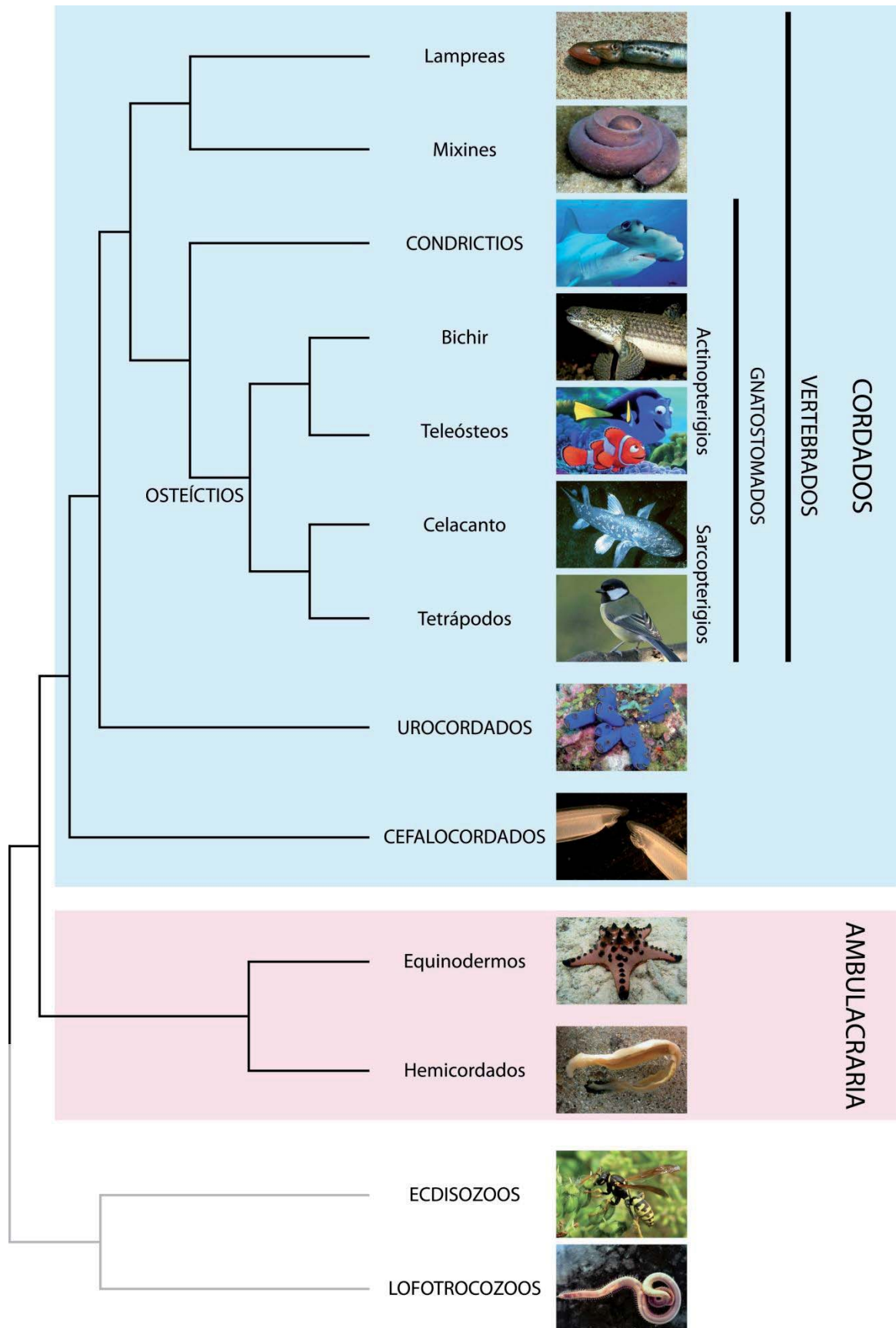
El anfioxo pertenece al subfilum Cephalochordata, que es basal dentro del *filum* Chordata, siendo el grupo hermano del grupo de los Olfactores, formado por los *subfila* Urochordata (ascidias y larváceas) y Vertebrata (Figura I.1) (Bourlat et al 2006, Delsuc et al 2006). Los cordados descienden de un ancestro común que vivió aproximadamente hace 550 millones de años. Las principales características que definen a los cordados son la presencia de una notocorda, que se extiende a lo largo de todo su eje longitudinal; de un tubo neural hueco y dorsal a la notocorda; de una faringe perforada con aperturas branquiales; de miómeros o bloques musculares segmentados, y de una cola postanal. Los cefalocordados, además de por las características que definen a los cordados, se caracterizan por la ausencia de estructuras craneales y en este apartado se describitá en cierto detalle su anatomía (Figura I.2). Al anfioxo se le ha considerado durante mucho tiempo el pariente invertebrado vivo más cercano a los vertebrados. Clasificado por primera vez como un molusco en 1774 por Pallas, las afinidades del anfioxo con los vertebrados fueron primeramente descritas en la primera mitad del siglo XIX (Costa, 1834; Yarrell, 1836).

El anfioxo es un animal invertebrado marino, que como adulto vive en el fondo de mares de aguas templadas, y su distribución es amplia a lo largo de las costas de todo el planeta. La especie que ha sido más estudiada desde un punto de vista morfológico ha sido *Branchiostoma lanceolatum*. Además del género *Branchiostoma*, existen otros dos, *Asymmetron* y *Epigonichthys*. Entre los tres géneros engloban unas 30 especies, y la gran mayoría pertenecen al género *Branchiostoma* (Kon et al 2006, Kon et al 2007, Nishikawa 2004, Nishikawa y Nishida 1997, Poss y Boschung 1996). La mayoría de las especies viven enterradas en la arena, ya sea el cuerpo entero, o manteniendo la porción anterior fuera,

mostrando la boca por donde se alimenta filtrando el agua en busca de partículas alimenticias. Los estados larvarios sin embargo son en su mayoría planctónicos, y por tanto llegan a ser arrastrados miles de kilómetros por las corrientes marinas mientras viven alimentándose de algas unicelulares y otras partículas. Recientemente, se ha descrito una especie, *Asymmetron inferum*, que vive en el ecosistema formado en los cadáveres de ballenas, en un ambiente rico en sulfuros a una profundidad de más de 200 m (Kon et al 2007).

La palabra anfioxo proviene del griego *amphi*= ambos, y *oxys*=puntiagudo, haciendo referencia a la morfología del animal, ya que en sus dos extremos acaba en punta (Figura 1.2). Morfológicamente, las estructuras externas más destacadas desde la zona más anterior hasta la posterior son la presencia de unos tentáculos o cirrios (unos 20) que rodean a la apertura bucal, una aleta dorsal que comienza en el extremo más anterior, justo por delante de la boca en lo que forma un lóbulo frontal, y continua posteriormente hasta que en el extremo más posterior se ensancha para formar la aleta caudal. En su parte ventral, presenta dos pliegues metapleurales. En el extremo posterior de estos, se encuentra el atrio poro, orificio de salida del atrio, por donde sale la corriente de agua que entra por la boca y por donde son expulsados los gametos. El ano es ventro-medial, pero desplazado ligeramente hacia la izquierda.

Ya que el organismo es transparente, gran parte de su estructura interna puede observarse desde fuera. En primer lugar, lo que más llama la atención son los bloques musculares que de forma seriada y paralela entre ellos se distribuyen a lo largo de todo el eje antero-posterior del animal en ambos lados del cuerpo, llegando a ser alrededor de unos 60 bloques por lado. Los bloques tienen forma de V, con el vértice en la parte anterior, y el brazo ventral más largo que el dorsal. Se encuentran separados por zonas de tejido conectivo, denominadas mioseptos, o miocommata. Los bloques musculares no se encuentran situados simétricamente, sino que existe un ligero desplazamiento, de forma que un bloque de un lado, coincide con la parte posterior y la parte anterior de dos bloques del otro lado. Cada segmento muscular hace una sinapsis directa con los laterales del cordón nervioso central, a través de extensiones musculares, denominadas “colas musculares”. Bajo la aleta media dorsal pueden distinguirse unos radios, que dividen una serie de cajas que dan soporte a la aleta. Las gónadas también pueden verse desde el exterior: se sitúan en la parte ventral, y como los segmentos musculares, también se encuentran situados de forma bilateralmente asimétrica. En el caso del género *Asymmetron*, las gónadas sólo se encuentran en el lado derecho. Los sexos en el anfioxo son separados, sin diferencias obvias a simple vista (en *B. Lanceolatum*), lo que hace que sea necesario observar las gónadas directamente bajo la lupa para diferenciarlos.



## Aparato digestivo

El aparato digestivo se inicia con la boca, rodeada de tentáculos o cirros bucales, cada uno de ellos con un soporte cartilaginoso. La cavidad bucal se encuentra delimitada por detrás por una estructura vertical, el *velum*, que se encuentra perforado centralmente, por lo que se denomina la boca velar, rodeada ésta por los tentáculos velares. Las paredes laterales y el techo de la boca se encuentran revestidos de un tejido ciliado denominado *wheel organ*. Una fosa aplanada situada en el techo de este órgano, ligeramente desplazada hacia la derecha pero en la línea media, es lo que se conoce como la fosa de Hatschek. La inervación de todas las estructuras bucales tiene su origen exclusivamente en el lado izquierdo del animal, reflejo de su ontogenia, ya que la boca se abre por primera vez en el lado izquierdo del embrión. La faringe ocupa lo que sería la parte ventral de los segmentos musculares, desde detrás de la cavidad bucal hasta casi la altura del atrioporo. Está perforada por unos 80-90 pares de hendiduras branquiales, situadas de forma paralela a ambos lados e inclinadas de forma que sus extremos ventrales son más posteriores. En la línea media de la parte dorsal de la faringe se encuentra el surco epifaríngeo, y en la parte ventral se encuentra otro surco mucho más aplanado, el endostilo. Las hendiduras faríngeas no dan al exterior, sino a una cámara que rodea la faringe, denominada atrio, que se abre al exterior a través del atrioporo. Las barras faríngeas que rodean las hendiduras pueden ser de dos tipos, primarias o secundarias, según su origen ontogenético, y distinguibles anatómicamente en el adulto, ya que las primarias, por ejemplo, son el soporte de los nefridios. Las barras branquiales primarias y secundarias se encuentran interconectadas mediante pequeños puentes denominados sinaptículas, por donde llega el sistema circulatorio a las barras secundarias. Al igual que ocurre con los segmentos musculares o las gónadas, las barras branquiales de ambos lados se encuentran situadas de forma asimétrica. El resto del sistema digestivo consiste en un corto esófago, un divertículo hepático en forma de bolsa que se extiende hacia la parte anterior, situado a la derecha de la faringe y encargado de secretar enzimas digestivas; finalmente, el sistema digestivo continúa en un intestino, que llega hasta el ano.

La principal función de la faringe es extraer partículas alimenticias del agua. Ello se consigue gracias a que las partículas se adhieren a una capa de *mucus* secretado por el endostilo en su camino hacia el surco epifaríngeo, donde el *mucus* es empujado hacia el

---

←

**Figura I.1.** Relaciones filogenéticas de los grupos de animales bilaterales. Se muestran en detalles los grupos de deuteróstomos: cordados (cuadro azul) y ambulacraria (cuadro rosa). Ecdisozoos (e. g.: artrópodos, nematodos) y Lofotrocozoos (e. g.: platelmintos, anélidos, moluscos) forman los protóstomos. Dentro de los cordados, el cefalocordado anfioxo representa la rama más basal, mientras que los urocordados son el grupo hermano de los vertebrados. Junto con éstos forman el grupo Olfactores. Dentro de los vertebrados, los agnatos (lampreas y mixines) son el grupo hermano de los gnatóstomos, formado por condictios (tiburones, rayas, quimeras) y los osteíctios (tetrápodos y teleósteos).

esófago (Nielsen et al 2007, Orton 1913). La corriente de agua que entra por la boca sale por el atrioporo. Esta forma de alimentarse basada en filtración es muy similar a la de los tunicados y a la de la larva ammocete de lampreas.

### ***Notocorda***

El anfioxo presenta numerosas peculiaridades anatómicas. La estructura de su notocorda no tiene igual en el resto de cordados, incluyendo una de sus principales rarezas, la que le ha hecho merecedor del nombre cefalocordado, la extensión de la notocorda hasta el extremo más rostral, que incluso sobrepasa la longitud del cordón nervioso en su parte anterior. Está formada por placas notocordales que en última instancia son células musculares. Está rodeada de tejido conectivo, pero éste se encuentra perforado dorsalmente en aquellos puntos donde las placas se extienden para conectar con el cordón nervioso central a través de colas musculares, como en el caso de los segmentos de músculos.

### ***Sistema nervioso***

El sistema nervioso del anfioxo está constituido por el sistema nervioso central (SNC), formado por un cordón nervioso dorsal, y por el sistema nervioso periférico (SNP), constituido por nervios craneales, nervios segmentales y plexos viscerales. El cordón nervioso dorsal tiene un canal central e inerva al animal a través de colas musculares (notocorda y músculo) y a través de nervios dorsales. El cordón nervioso se inicia a continuación de las cavidades celómicas rostrales, y a diferencia de los vertebrados, está escasamente regionalizado y en absoluto vascularizado. Externamente, sólo la dilatación de su extremo posterior, que forma la ampolla caudal, es prominente en el adulto, ya que el ensanchamiento anterior, que corresponde a la vesícula cerebral, se estrecha progresivamente a lo largo del desarrollo larvario tardío hasta adquirir un diámetro ligeramente superior al del resto del cordón nervioso. Sin embargo, el cordón nervioso del anfioxo es cuanto menos complejo, con una cuidadosa organización de tipos celulares tanto en su eje antero-posterior, como dorso-ventral (ampliamente revisada por Wicht y Lacalli 2005). Los nervios dorsales parten de la parte dorsal del tubo nervioso y se internan en los mioseptos dirigiéndose hacia la piel, para ramificarse allí hacia la parte dorsal y la parte ventral. La base de estos nervios dorsales se encuentra situada asimétricamente a ambos lados a partir del 3<sup>er</sup> par de nervios, consecuencia de su internalización en los *miocommata*, por lo que no se entrará en mucho detalle en este apartado. Dentro del cordón nervioso dorsal se encuentran las células de Rohde, cuyos axones forman fibras gigantes, probablemente encargadas de dar los impulsos nerviosos a los músculos, y las células de Hesse, que asociadas con melanocitos son las células encargadas de la fotorrecepción en el tubo nervioso. La vesícula anterior o cerebral, que corresponde a la parte anterior de la prominente vesícula cerebral de la larva temprana, presenta toda una

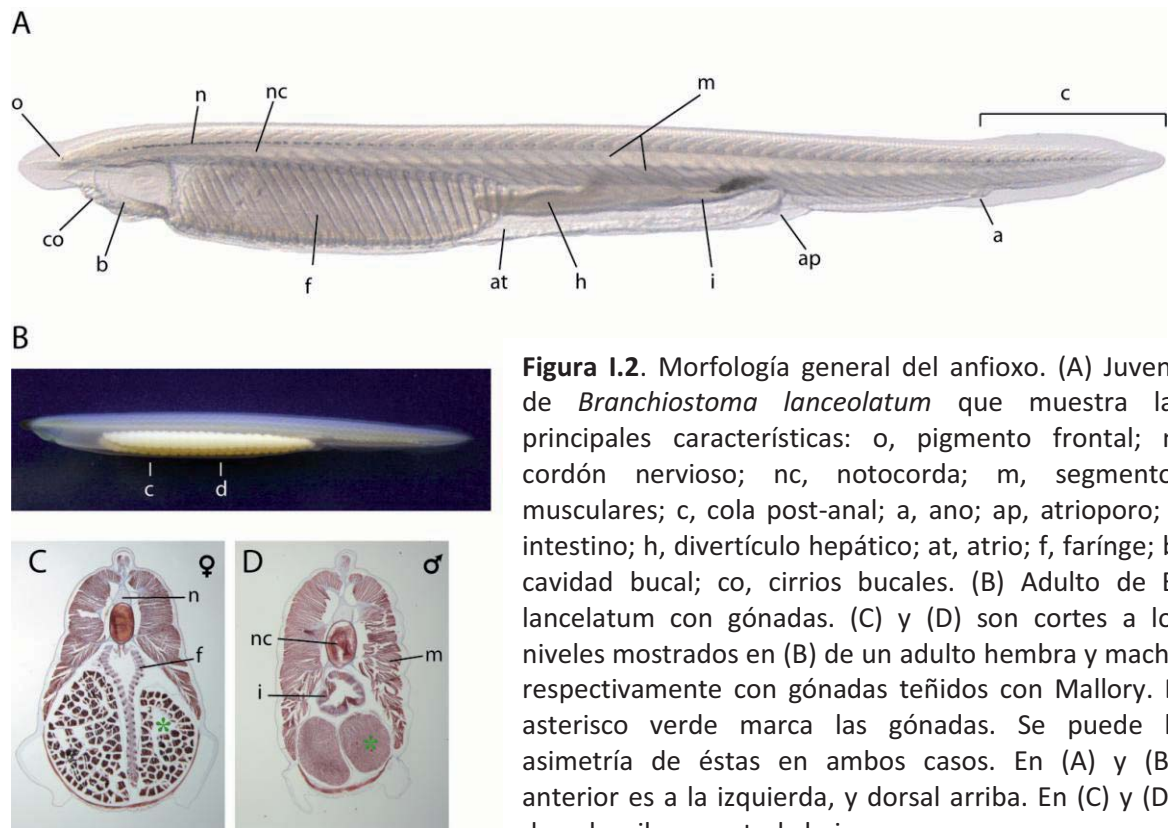


serie de características diferenciales con respecto al resto del cordón nervioso: en ella existen otros dos tipos celulares encargados de la fotorecepción, las células de Joseph y las células lamelares. Además, en el extremo rostral medio, las células pigmentarias del ojo frontal se agolpan contra la pared del cordón nervioso. La parte más rostral del canal del tubo nervioso se abre al exterior a través de los vestigios del neuroporo, generado durante la neurulación. En el adulto este estrecho canal, situado dorsalmente, está repleto de cilios y células especializadas, que pertenecen a la fosa de Kölliker. Justo por debajo del ojo frontal, en la parte ventral, las células de la zona preinfundibular descubren sus procesos apicales en el interior del ventrículo, seguidas por el órgano infundibular, productor de la fibra de Reissner. Rostralmente, el primer par de nervios sale de forma simétrica hacia la parte anterior, e inerva el lóbulo frontal. El segundo par de nervios sale también rostralmente de forma simétrica pero por la parte dorsal y también inerva el lóbulo anterior. A partir del 3er par de nervios, éstos salen de forma asimétrica. La cavidad bucal y todas sus estructuras, incluyendo el aparato velar, están invadidos por los nervios izquierdos de los pares 3º a 7º, y sus parejas de la parte derecha no presentan rama visceral.

Desde un punto de vista bioquímico y fisiológico, se han encontrado amino ácidos libres que podrían tener funciones neurotransmisoras en el sistema nervioso del anfibio de manera similar a mamíferos, siendo el L-Aspártico y la L-Glutamina los de mayor concentración, e incluyéndose la presencia de D-Aspártico, involucrado en el control del sistema endocrino (D'Aniello y Garcia-Fernandez 2007; ver Apéndice I: Pascual-Anaya y D'Aniello 2006).

### ***Sistema excretor***

El sistema excretor del anfibio está formado por los nefridios, y su ultraestructura citológica y funcionalidad han sido estudiadas en detalle por Moller y Ellis (1974) completando trabajos anteriores (Brandenburg y Kümmel 1961, Goodrich 1902, Goodrich 1909, Nakao 1965). Los nefridios son de dos tipos. El nefridio de Hatschek, y los nefridios branquiales. El primero es una estructura tubular simple que se encuentra en la parte anterior, justo a la izquierda de la notocorda. Anteriormente termina de forma ciega, pero en su parte posterior se abre en el techo de la faringa, justo detrás del velum. Los nefridios branquiales se encuentran asociados a cada barra faríngea primaria y presentan una estructura con dos brazos: uno vertical que circula hacia la parte dorsal de una barra secundaria, y uno horizontal que recorre la barra faríngea. Los nefridios presentan un lumen ciliado y además están íntimamente asociados con plexos del sistema circulatorio para desarrollar su función, una función que se cree importante para la osmoregulación del animal, que es capaz de vivir en agua marina con diferente concentración de sal (Moller y Ellis, 1974).



**Figura 1.2.** Morfología general del anfibio. (A) Juvenil de *Branchiostoma lanceolatum* que muestra las principales características: o, pigmento frontal; n, cordón nervioso; nc, notocorda; m, segmentos musculares; c, cola post-anal; a, ano; ap, atrioporo; i, intestino; h, divertículo hepático; at, atrio; f, farínge; b, cavidad bucal; co, cirrios bucales. (B) Adulto de *B. lanceolatum* con gónadas. (C) y (D) son cortes a los niveles mostrados en (B) de un adulto hembra y macho respectivamente con gónadas teñidos con Mallory. El asterisco verde marca las gónadas. Se puede la asimetría de éstas en ambos casos. En (A) y (B), anterior es a la izquierda, y dorsal arriba. En (C) y (D), dorsal arriba y ventral abajo.

### Sistema vascular

La mayor parte del conocimiento sobre el sistema circulatorio del anfibio proviene de estudios que datan de las décadas de los 70 y 80 (Moller y Philpott 1973a, Moller y Philpott 1973b, Rähr 1981). El sistema hemal del anfibio es semi-abierto ya que posee características tanto de sistemas circulatorios abiertos como de sistemas cerrados. Por una parte la circulación del fluido hemal es direccionada, pero reversible e irregular y, en general, presumiendo una cierta homología con los vasos principales de los vertebrados, se habla de una parte venosa y una arterial, que se encuentran interconectadas por plexos. Por otra parte, no existe un límite definido para los vasos ya que forman parte de la cavidad blastocélica y están delimitados por la lámina basal del epitelio adyacente o por tejido conectivo, por lo que el fluido puede estar en contacto con los tejidos circundantes. El anfibio no posee un verdadero corazón, pero tiene vasos contráctiles que se encargan de tal función. Los filamentos contráctiles de estos vasos están situados en la parte basal o rodeando el epitelio celómico que rodea el vaso en cuestión. Además, la presencia de células mioepiteliales contribuye al movimiento del fluido, en combinación con dichos filamentos o independientemente. La arteria endostilar parece ser la más contráctil, debido sobre todo a una gran cantidad de este tipo de células presentes en el celoma endostilar, por donde se extiende dicho vaso. De la misma forma los vasos hemales branquiales bañan la base de las barras faríngeas retornando la circulación hacia la aorta dorsal. De esta manera el fluido hemal circula por todo el sistema de forma direccionada - aunque existe



reflujo y circulación irregular-. Aunque no posea un verdadero corazón, durante el desarrollo se ha relacionado el desarrollo del vaso subentérico con el de corazón de vertebrados gracias al uso de marcadores moleculares como los genes *BfCsx* (Holland et al 2003) y *BfTbx4/5* (Minguillón et al 2009). Como se ha comentado anteriormente, el sistema circulatorio del anfióxico no posee un verdadero endotelio que delimite sus vasos aunque se ha observado la presencia de células tipo amebocito (hemocitos), citológicamente simples. Éstas forman parte del fluido hemal aunque en algunos casos se encuentran en contacto con el límite del vaso en forma de cúmulos. Estos cúmulos nunca forman complejos de unión ni se les observa lámina basal propia. Evolutivamente se ha asociado estos amebocitos con el tipo celular del que se originaron las células endoteliales de vertebrados (Muñoz-Chápuli et al 2005). Poco se sabe sobre el desarrollo de las estructuras del sistema hemal del anfióxico o de los genes implicados en éste. Se ha observado en larvas tempranas de anfióxico que sus hemocitos tienen capacidad fagocítica y proteolítica y comparten similitudes funcionales con los macrófagos de los vertebrados (Hartenstein 2006, Rhodes et al 1982). En uno de los estudios más recientes, Kučera y colaboradores (Kučera et al 2009) han observado que en zonas ricas en hemocitos, la matriz extracelular de la lámina basal del epitelio adyacente está reducida y sólo existe un alto contenido en laminina, mientras que en zonas con ausencia de hemocitos se mantiene la matriz extracelular, también con un alto contenido en laminina (Kučera et al 2009). En el caso de los vertebrados, las células endoteliales, derivadas del mesodermo, se desarrollan entre dos superficies de láminas basales aislando el lumen vascular que quedará en su interior.

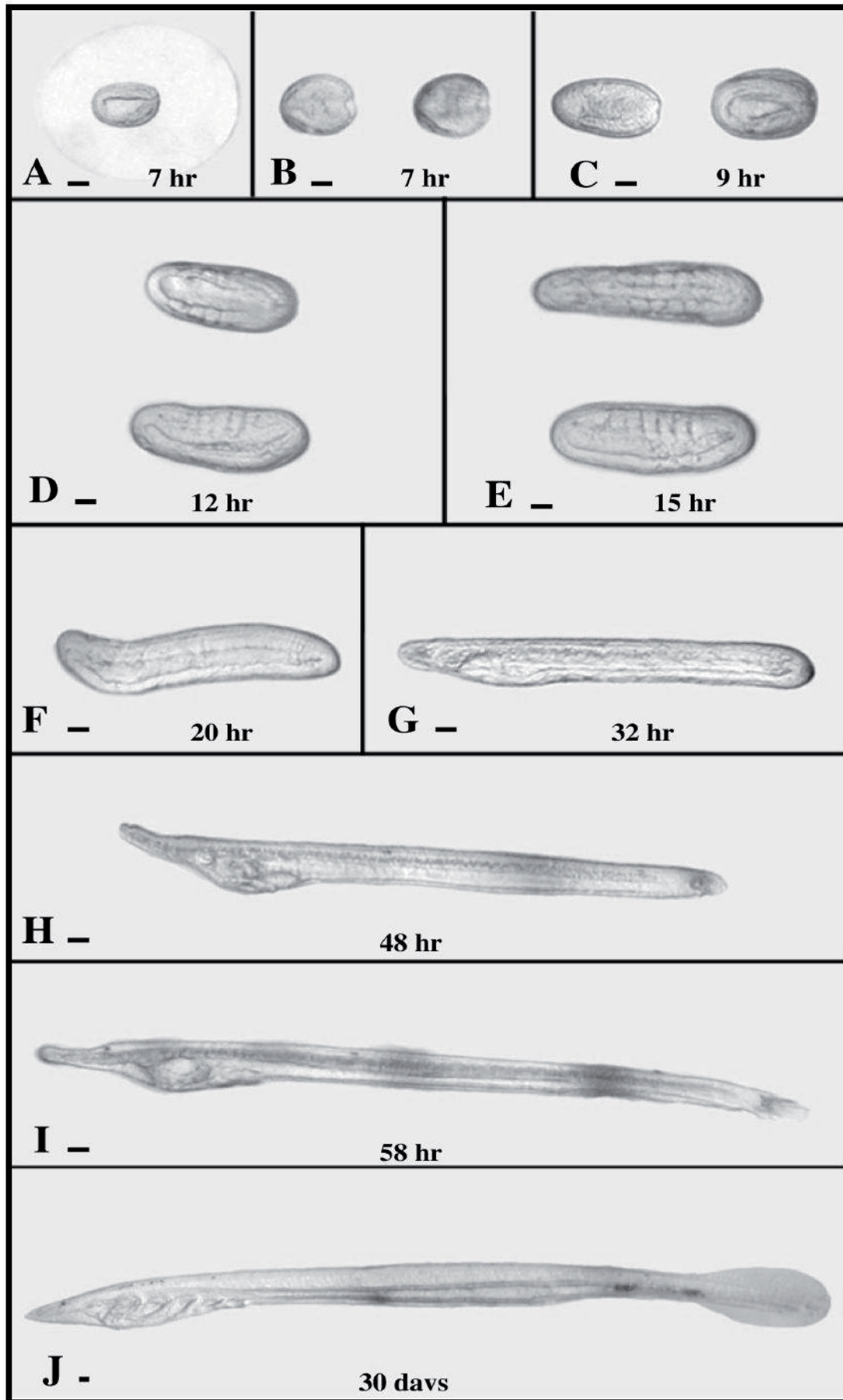
## **EL DESARROLLO EMBRIONARIO**

*(Las referencias generales de este apartado son: Hatschek, 1893; Stokes y Holland, 1995; Presley et al, 1996; Whittaker, 1997) (ver Figura I.3).*

El primero en describir un espécimen de anfióxico fue Pallas en 1774 y lo catalogó erróneamente como un molusco. No fue hasta casi cien años después cuando se escribieron los primeros tratados describiendo el desarrollo embrionario de este invertebrado marino. El primero en hacerlo fue Kowalesky en 1867 y le siguieron Hatschek (1893), Cerfontaine (1906) y Conklin (1932). Aunque muy detalladas, las descripciones son incompletas y son numerosas las discrepancias entre los diferentes autores.

### ***Segmentación y gastrulación***

La fecundación en el anfióxico tiene lugar en el mar. Las hembras liberan oocitos y los machos esperma durante las primeras horas de la noche en días señalados de su época reproductiva. El huevo del anfióxico mide entre 100 y 120  $\mu\text{m}$  y es isolecítico, es decir, el vitelo se distribuye uniformemente. Al ser fecundado la membrana vitelina del oocito se



hincha, indicando la correcta formación del cigoto. Éste empieza a dividirse rápidamente, de manera holoblástica (la división es total) formándose células cada vez de menor tamaño. Hasta el estadio de 128 células (séptima división) la segmentación es radial y aproximadamente sincrónica, como en los equinodermos. A partir de la octava división empieza la blastulación, formándose una blástula esférica y hueca. La capa celular que rodea el blastocelo (nombre que recibe la cavidad) es monoepitelial.

Al final de la blastulación y principio de la gastrulación, la blástula pierde su forma esférica y se aplana ligeramente por uno de sus polos. Este polo, el polo vegetal, empieza a invaginar progresivamente formándose la gástrula. La capa invaginada va creciendo hacia el interior del blastocelo en detrimento de éste. Al final de la gastrulación el embrión consta de dos capas celulares íntimamente unidas, dejando una cavidad central denominada arquéteron, futuro sistema digestivo, que se comunica con el exterior a través del pequeño blastoporo que determina la parte posterior del embrión. La capa interna de la gástrula contiene el mesodermo, que formará la notocorda y los somitas, y el endodermo. Las células de la capa externa desarrollan cilios que le permiten a la gástrula tardía moverse, girando sobre sí misma, dentro de la membrana que rodea al embrión (corion).

Hasta este estadio el desarrollo embrionario del anfioxo es, en términos generales, típico de deuteróstomos invertebrados. Al menos superficialmente es indistinguible del desarrollo de equinodermos o tunicados. Sin embargo, a partir de la neurulación el desarrollo es marcadamente similar al de los vertebrados, con la aparición de un cordón nervioso dorsal, una notocorda y bloques musculares segmentados o somitas (Holland y Holland, 1999).

### Neurulación

Es en los primeros momentos de este proceso cuando tiene lugar la rotura del corion y la eclosión del embrión, que pasa a nadar libremente gracias a los cilios que posee en la epidermis. La neurulación, o formación del tubo neural, empieza con un ligero



**Figura I.3.** Desarrollo embrionario de *B. lanceolatum*. (A) Neurula muy temprana dentro del corion antes de eclosionar (B). (C) Néurula temprana que comienza a crecer antero-posteriormente para dar lugar a una (D) néurula media y más tarde a una (E) néurula tardía. En (D) y en (E) pueden observarse los somitos en la zona dorsal. Las néurulas se desplazan mediante un movimiento iliar. (F) y (G) son larvas de diferentes tamaños antes de que abran la boca. En este estadio, los animales empiezan a moverse mediante movimientos natatorios probablemente debidos a la naturaleza de la notocorda y al desarrollo de fibras musculares. (H) Larva de dos días con la boca abierta en el lado izquierdo del animal. (I) y (J) representan estadios larvarios más tardíos en los que se han empezado a abrir las hendiduras faríngeas, primero ventro-medialmente, y finalmente desplazándose ligeramente hacia el lado derecho.

aplastamiento dorsal de la gástrula. El hundimiento del neuroectodermo, en forma de V, va creciendo en sentido postero-anterior, a la vez que el embrión se va alargando. La base del surco nervioso será la superficie ventral del tubo neural, como en los vertebrados. A medida que la neurulación avanza, se produce el cierre del tubo neural, gracias a que los flancos de la placa neural se extienden hacia arriba. Seguidamente una capa de ectodermo empieza a recubrir al tubo nervioso, progresando desde la parte posterior a la anterior, dejando una pequeña abertura en el extremo anterior llamada neuroporo. En este punto, el blastoporo está cubierto externamente por el ectodermo, permaneciendo como una vía de comunicación del arquéteron, el canal neuroentérico.

Paralelamente, la capa celular interna de la néurula está sufriendo muchos cambios. La placa cordomesodérmica, que forma el techo del arquéteron, se evagina formando tres interdigitaciones: una central, que dará lugar al primordio de la notocorda y dos laterales, que serán el primordio de los primeros somitas. Estos somitas se forman por un proceso llamado enterocelia, es decir, por la evaginación del arquéteron, mientras que los somitas que se formarán después y que ocuparán casi la totalidad del cuerpo del embrión, se formarán por esquizocelia, a partir del primordio de la cola (*tail bud*), un proceso mucho más común en vertebrados. La parte más ventral del epitelio del arquéteron se dobla sobre sí misma para formar el tubo digestivo, incluyendo la faringe y otros derivados endodérmicos.

### ***Desarrollo larvario***

Al principio del estadio de larva, el anfioxo posee una forma común al cuerpo embrionario primitivo de los embriones de vertebrados (el estadio filotípico del filo de los Cordados). Según Nelsen (1953) las características comunes entre ellos son: un forma corporal alargada, cilíndrica y comprimida lateralmente; un cuerpo regionalizado en cabeza, área faríngea, tronco y cola; y la posesión de cuatro tubos epiteliales formadores de órganos (epidérmico, neural, mesodérmico y endodérmico) situados alrededor de un eje primitivo: la notocorda.

Las formas larvarias son notoriamente asimétricas en el eje derecha-izquierda, afectando por ejemplo a la posición de la boca (que se sitúa en el lado izquierdo) así como de los somitas (el lado izquierdo está adelantado aproximadamente medio somita respecto el lado derecho (Minguillón y Garcia-Fernàndez, 2002) o los nervios.

Durante el desarrollo larvario tanto somitas como tubo neural y notocorda siguen desarrollándose a lo largo de todo el eje antero-posterior. La notocorda se desarrollará hasta alcanzar su posición definitiva en el extremo más rostral del cuerpo. Así mismo, el tubo neural se hincha progresivamente en su parte más rostral para formar la vesícula cerebral.

Los cambios más acusados durante este proceso se producen en la parte anterior de la larva, dónde tiene lugar varios procesos simultáneos: (i) Por un lado se forma la boca larvaria, por un engrosamiento en la parte ventral de la pared izquierda del arquéteron que se fusiona con el ectodermo subyacente. Cabe destacar de nuevo que la boca se sitúa a la izquierda, marcando la asimetría larvaria. (ii) El engrosamiento de la parte ventral derecha del arquéteron da lugar a la glándula *cup-shaped*. Ésta se desarrolla en el lado derecho, pero se abre al exterior por el lado izquierdo. Justo anterior a ésta se forma el endostilo, debido a un sobrecrecimiento de la parte anterior de la región faríngea. (iii) En la parte dorsal izquierda, subyacente a la notocorda, se forman los primordios de la fosa de Hatschek y del *wheel organ*, que en el adulto se encuentra localizado en el interior del espacio bucal. (iv) Además se forman las hendiduras branquiales primarias, por engrosamiento de la línea media ventral del arquéteron a la altura del tercer par de somitas. La fusión con el ectodermo que lo contacta da lugar a la hendidura en sí, situándose en el lado izquierdo de la larva.

### **La metamorfosis**

Durante la metamorfosis tiene lugar una redistribución de gran parte de los órganos para formar un individuo juvenil prácticamente simétrico. La aparición de las hendiduras branquiales secundarias, situadas al lado derecho marca el inicio de la metamorfosis. Éstas se forman de un modo muy parecido a las primarias. Ya en el adulto se forman las hendiduras branquiales terciarias, que se sitúan a lado y lado del animal, manteniendo así la simetría lograda durante la metamorfosis. Hay un reposicionamiento de la boca, que migra desde el lado izquierdo a una posición medio-ventral. También el ano migra desde el lado derecho situándose también en un plano ventral medio. En un plano sagital la larva post-metamórfica es totalmente simétrica, sin embargo los miótomos de la izquierda siguen avanzados con respecto a los de la derecha aproximadamente medio miótomo.

La asimetría que presenta el anfioxo en su estado larvario se ha usado como argumento para demostrar las afinidades de éste animal con los invertebrados. Sin embargo, otros autores la atribuyen a adaptaciones especiales de la larva, que podrían ser explicadas como parte de mecanismos de adaptación a la alimentación (proceso caenogenético) (Presley *et al.*, 1996). Estos autores defienden que en las etapas iniciales de su desarrollo el embrión de anfioxo es simétrico, y que incluso durante las fases larvarias asimétricas muchos de los caracteres dorsales y axiales retienen una simetría esencial, muy similar a vertebrados.

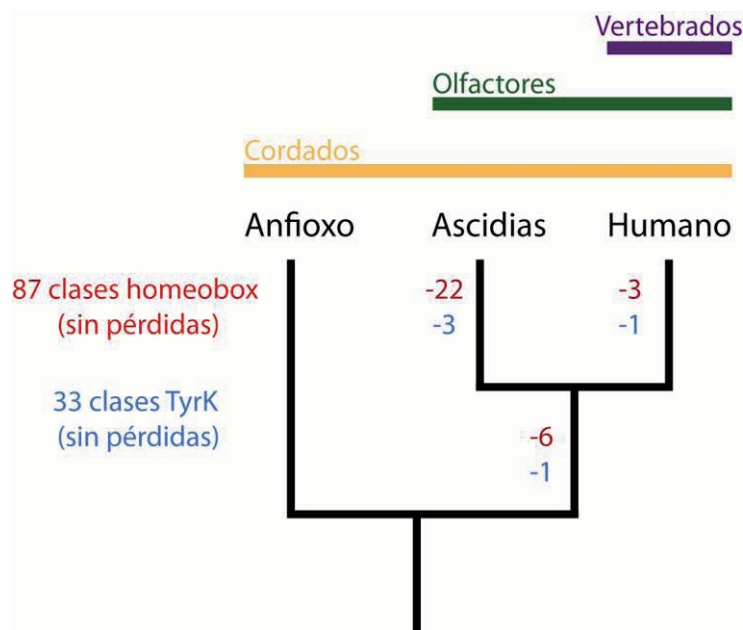
### **EL GENOMA DE *B. floridae***

El genoma del anfioxo americano (~520 Mb), presenta una variación alélica que supone el polimorfismo más alto publicado hasta ahora para ningún organismo individual, con un 3.7% de polimorfismo para mutaciones puntuales, y un 6.8% de variaciones de

inserciones/deleciones (Putnam et al 2008). La principal hipótesis sobre qué ocurrió en el origen de los vertebrados se basan aún hoy día en las ideas propuestas por Susumu Ohno en 1970 en su libro *Evolution by Gene Duplication* (Ohno 1970), en el que propone que el genoma de los vertebrados es el resultado de una serie de duplicaciones genómicas completas. Aunque la secuenciación del genoma humano y otros vertebrados ha mostrado que el número de genes de vertebrados es comparable o ligeramente mayor que el de algunos invertebrados, existen evidencias de que durante la evolución de los vertebrados han ocurrido duplicaciones de genomas completos o a gran escala de segmentos de estos, de manera que la mayoría de los genes duplicados han desaparecido (revisado por (Wolfe 2001). Aún así, la poca cantidad relativa de genes duplicados que se ha mantenido durante la evolución de los vertebrados proporciona evidencias de relaciones parálogas antiguas entre grupos de cromosomas humanos (Abi-Rached et al 2002, Dehal y Boore 2005, Lundin et al 2003, McLysaght et al 2002, Popovici et al 2001). Sin embargo, el número, el tiempo e incluso la escala genómica a la que se produjeron estos eventos y sus consecuencias para la evolución genómica subyacente, se desconoce, en parte porque los genomas de tunicados están muy reorganizados en comparación con el cariotipo no-duplicado de un ancestral cordado. Ya que el anfibio representa actualmente la condición más parecida a lo que se supone fue el ancestro de los cordados, el estudio de su genoma podía ayudar a validar estas hipótesis, y si ciertas, a qué nivel se produjeron las duplicaciones y pérdidas. En este sentido, Putnam y colaboradores (Putnam et al 2008) han descrito hasta 17 regiones de ligamiento conservadas entre anfibio y vertebrados, estando esta sintenia conservada de forma cuádruple. Además, más del 90% del genoma humano está englobado dentro de estas regiones, lo que demuestra que se produjeron dos rondas de duplicaciones genómicas completas en la rama de los vertebrados. Estos 17 grupos de ligamientos, por lo tanto, debieron estar presentes en el genoma del ancestro común de los cordados en forma de proto-cromosomas (Putnam et al 2008).

El genoma del anfibio pues, bien puede representar una condición pre-duplicativa del genoma de los vertebrados, esto es, similar al genoma del ancestro común de todos los vertebrados. Linda Z. Holland y colaboradores (Holland et al 2008) analizaron algunas familias génicas involucradas en estructuras importantes que suponen novedades evolutivas en el origen de los vertebrados, como los genes con *homeobox*, opsinas, genes relacionados con la células de la cresta neural, el sistema endocrino o genes relacionados con el sistema inmune innato y adaptativo (Holland et al 2008). En el caso de los genes con *homeobox*, se identificó por primera vez el gen *BfHox15*, como nuevo y último miembro del clúster *Hox* de anfibio. En total, se describen 133 genes *homeobox*, donde no se incluyen genes derivados que hayan perdido el *homeobox* como *Pax1/9* o *Pon*. Se deduce que el ancestro común de los cordados debió tener 103 genes *homeobox*. Sorprendentemente, a nivel de familias génicas, el genoma del anfibio representa el único cordado que no ha perdido ninguno de los genes representantes de familias que han sido secundariamente perdidas o en Olfactores (vertebrados + tunicados), o en vertebrados o en la rama de los





**Figura I.4.** Número de familias de genes con homeobox (rojo) y de tirosina quinasa (TK) (azul) presentes en el genoma del anfiexo y las pérdidas de familias en olfactores, ascidiarias y humanos (números en rojo para familias homeobox y en azul para TK). Figura adaptada de Garcia-Fernández y Benito-Gutiérrez, 2009.

tunicados. El análisis de otras familias génicas llega a la misma conclusión: el genoma del anfiexo retiene representantes de familias génicas cuyos miembros fueron perdidos secundariamente por los vertebrados (Figura I.4). Incluso se creyó hasta entonces que eran incluso exclusivos de protóstomos. Sin embargo, esto no implica que el genoma del anfiexo se haya mantenido completamente estático, y duplicaciones específicas de su linaje (Holland et al 2008, Minguillón y Garcia-Fernández 2003), algunas de ellas muy extensas

como en el caso de algunas subfamilias de tirosinas quinasa, han sido descritas (ver Apéndice II: D'Aniello et al 2008).

## CULTIVO EN EL LABORATORIO

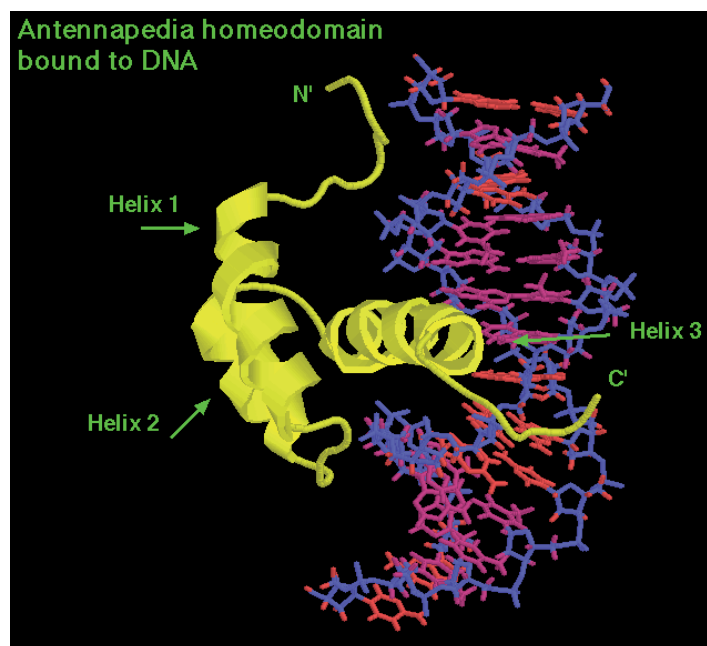
Desde el año 1992, en que se empezó a usar el anfiexo americano como modelo para estudios moleculares (Holland et al 1992), casi todos los análisis en este sentido se han realizado usando esta especie como modelo. Sin embargo, en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en el desarrollo de otras especies como la europea, *B. lanceolatum* (revisado en Garcia-Fernández et al 2009: ver Apéndice III) y la asiática, *B. belcheri*, especie con la que se ha podido realizar un cultivo continuo hasta una segunda generación (Zhang et al 2007).

*B. floridae* es una especie para la que sólo se logran las puestas en el laboratorio los mismos días que lo hacen en la naturaleza: una vez cada 2 ó 3 semanas. Los adultos se recogen en *Tampa Bay*, Florida (Estados Unidos), y todos los días se electroestimulan al anochecer (Holland y Yu 2004). De esta manera, durante el periodo estival se consiguen embriones sólo de 3 a 5 veces por temporada, limitándose muchísimo las posibilidades de realizar experimentos con embriones, y además hay que trabajar con ellos durante la noche, dado que la puesta coincide con el ocaso. En este sentido, desde hace unos años la

mayoría de grupos europeos que trabajan con anfibio están realizando un valioso esfuerzo en la mejora del cultivo de la especie *B. lanceolatum*, la cual presenta una densa población de individuos maduros durante la primavera y el verano en Argelès-sur-Mer (Francia) (Fuentes et al 2004). Como hito de los estudios con la especie europea cabe destacar el mantenimiento de esta especie en cautividad y la puesta a punto de un protocolo para la freza de gametos: con un choque térmico (incremento en 4 °C respecto de la temperatura de mantenimiento que es de 17-19° C) de 36 horas se consigue que el 80% de los animales chocados liberen sus gametos justo al anochecer (Fuentes et al 2004). Esto hace que entre los meses de abril y agosto, en el mejor de los casos, y entre mayo y julio en el peor de ellos, podamos obtener embriones a la carta. Esto nos permite diseñar los experimentos con mucha mayor libertad y planificación y además, es posible repetirlos dentro de este periodo casi tantas veces como sea necesario. Además, en el laboratorio de Barcelona hemos conseguido mantener el cultivo del anfibio lejos de una estación marina, en lo que sería un laboratorio “seco” (ver Apéndice IV: Fuentes et al 2007), lo que facilita la introducción del anfibio europeo como modelo en una mayor cantidad de laboratorios. En este mismo trabajo hemos descrito además la inversión del ciclo circadiano en el cultivo del animal, que resulta en una puesta de los gametos controlada, de manera que se puede disponer de los embriones durante el día natural (ver Apéndice IV: Fuentes et al 2007).

### LOS GENES *Hox* COMO MODELOS DE EVOLUCIÓN GENÓMICA: CARACTERIZACIÓN, EXPRESIÓN Y FUNCIONES EN LOS DIFERENTES DEUTERÓSTOMOS

Los genes que pertenecen a la superfamilia de *homeoboxes* se caracterizan por poseer una secuencia reconocible de 180 pares de bases (pb), denominada *homeobox*, que codifica para un motivo de 60 aminoácidos, denominado homeodominio, que da a estas proteínas la capacidad de unirse a ciertas regiones del ADN. Las predicciones de estructura secundaria, junto con estudios de estructuras de cristales, predicen para el homeodominio una conformación de tres hélices- $\alpha$  (Figura 1.5), de las



**Figura 1.5.** Modelo 3D del homeodominio de la proteína Antennapedia de *Drosophila melanogaster* unida al DNA mediante las  $\alpha$ -hélices 2 y 3.



cuales las dos más C-terminales constituyen una conformación en hélice-giro-hélice que es característica de factores de transcripción que se unen al ADN en el surco mayor de la doble hélice, mientras que la hélice N-terminal cae sobre la conformación de las otras dos estabilizando la estructura (Müller et al 1988, Otting et al 1990, Percival-Smith et al 1990). Las proteínas con homeodominio son generalmente factores de transcripción, y muchas de ellas regulan la expresión génica durante la formación de patrones o la diferenciación celular en el desarrollo embrionario. De hecho, las mutaciones en los genes con *homeobox* pueden causar cambios drásticos en los programas de desarrollo en muchos organismos, incluyendo el hombre (Banerjee-Basu y Baxevanis 2001).

Un subgrupo de estos genes son los genes *Hox*, de la subfamilia Antennapedia (ANTP) descubiertos por primera vez en *Drosophila* por E.B. Lewis (Lewis 1978). El llamado complejo Hox de *Drosophila melanogaster* está compuesto por 8 genes homeóticos divididos en dos complejos genéticos, *Antennapedia* y *Ultrabithorax* (ANTP-UBX)] (Figura I.6). Los genes Hox se encuentran conservados en casi todos los animales bilaterales que han sido analizados, y son importantes en la determinación de la identidad de diferentes estructuras a lo largo del eje antero-posterior (A-P). Que los mismos genes (*Hox* y otros) sean usados por organismos muy divergentes en la evolución (como una mosca de la fruta –protóstomo- y un ratón – deuteróstomo) para determinar el eje antero-posterior durante el desarrollo embrionario es lo que se ha denominado el “zootipo” (Slack et al 1993).

Una impresionante característica de estos genes es su organización en clúster (ligados en la misma región cromosómica, y con relativamente poca distancia intergénica entre ellos), y que la posición que ocupan en el cromosoma refleja sus sitios de acción en el embrión. Es decir, los genes en el extremo 3' son responsables del patrón anterior, y los genes a más 5', del patrón posterior: esto es lo que se denomina colinearidad espacial (Duboule y Dollé 1989). Además, en algunos animales (principalmente vertebrados), también se muestra una colinearidad temporal, es decir, los genes hacia 3' se expresan antes en el desarrollo que los que se encuentran en posición 5' a los anteriores (Duboule 1994, Izpisúa-Belmonte et al 1991). Algunos cambios de expresión de los genes *Hox* pueden correlacionarse con la evolución morfológica [e. g. extremidades de los crustáceos (Averof y Patel 1997), las vértebras (Burke et al 1995, Gaunt 1994), transición de aletas a patas (Ahn y Ho 2008, Sordino et al 1995), la homogeneidad del tronco de las serpientes (Cohn y Tickle 1999)]. En particular, la evolución de los vertebrados implicó el origen de nuevos tipos celulares y sistemas de órganos, incrementando la complejidad de la organización corporal. Esto, como se ha dicho anteriormente, coincidió con duplicaciones del genoma seguidas del mantenimiento de muchos miembros de distintas familias génicas y pérdidas diferenciales de genes según el linaje, incluyendo los genes *Hox* (Holland et al 1994). En la actualidad, la mayoría de los análisis filogenéticos destacan el genoma del anfibio como arquetípico de vertebrado (ver apartado del Genoma; Putnam et al 2008). Sin duda alguna, uno de los hallazgos más determinantes al respecto fue el descubrimiento de un único complejo de genes *Hox* en el anfibio, en contraposición a los 4 encontrados en

los mamíferos hasta la fecha analizados (García-Fernández y Holland 1994). Cada clúster de vertebrado contiene una selección de los 14 grupos parálogos (PGs) de los *Hox* de vertebrado, y no existe un clúster que contenga representantes de cada uno de ellos (Anteriores: PG1 y PG2; Grupo PG3; Centrales: PG4-8; Posteriores: PG9-14) (Zhang y Nei 1996). De los 56 posibles, el ratón sólo presenta 39 genes repartidos en los 4 clústeres. El anfibio presenta un clúster *Hox* de naturaleza arquetípica al de los vertebrados, con 15 genes (Figura 1.5), representantes de los diferentes grupos parálogos de vertebrados (Ferrier et al 2000, García-Fernández y Holland 1994, Holland et al 2008). Más adelante se discutirá la ortología del quinceavo gen *Hox* de anfibio.

Los genes *Hox* son un paradigma en el estudio de la evolución genómica (e. g., de Rosa et al 1999, Ferrier y Holland 2002, García-Fernández 2005b, Lemons y McGinnis 2006). Para entender esta evolución, es necesario caracterizar bien el complemento *Hox* de todos los grupos de metazoos, y en particular de los deuteróstomos, en cuyo seno evolutivo se han producido grandes duplicaciones genómicas que han permitido una evolución diferencial de éstos en diferentes linajes. En el siguiente apartado se hace una extensa revisión de los clústeres *Hox* y los genes que los componen identificados hasta la fecha en todos los deuteróstomos actuales, para intentar inferir el complemento *Hox* tanto el del ancestro común de cordados, como del ancestro común de deuteróstomos.

## GENES *Hox* EN LOS DEUTERÓSTOMOS NO CORDADOS

Entre los deuteróstomos no cordados, recientemente ha sido definido el género *Xenoturbella* como un deuteróstomo basal mediante una serie de análisis moleculares (Bourlat et al 2006, Bourlat et al 2003, Dunn et al 2008, Israelsson y Budd 2005, Perseke et al 2007) y por evidencias histoquímicas (Israelsson 2006, Stach et al 2005). Sin embargo, es una posición muy discutida, y recientemente otros análisis filogenéticos vuelven a colocar a *Xenoturbella* como un grupo basal a los bilaterales (Hejnol et al 2009). Lo único que se sabe sobre los *Hox* de *Xenoturbella* es a raíz de un estudio basado en PCRs sobre la región del homeobox (Fritzsche et al 2008). El complemento de genes *Hox* de *X. bocki* se reduce a un *XbHox1*, un gen posterior, *XbHoxP*, y tres genes, *XbHoxM1*, *XbHoxM2* y *XbHoxM3* de los grupos centrales pero que no han podido ser asignados a ningún grupo de paralogía de forma clara y específica. Respecto a un clúster ancestral del ancestro común de bilaterales, habría perdido al menos dos genes, uno del grupo de paralogía 2 y otro del 3. Esto sigue siendo una situación que concuerda con la nueva posición filogenética de *Xenoturbella* dentro de los deuteróstomos, ya que debido a la simplicidad de su estructura anatómica, no sería raro pensar que representa un grupo derivado y que por tanto ha perdido genes; por ejemplo, el urocordado *Oikopleura dioica* ha perdido junto con *Hox3* todos los grupos centrales excepto uno (Seo et al 2004). Otra explicación sería que dado que su posición no es definitiva, podría ser representante de un grupo muy basal dentro de los bilaterales, sin

embargo, las secuencias de los genes encontrados por Fritzscht y colaboradores (Fritzscht et al 2008) no se parecen a las de acelos o nemertodermátidos (bilaterales basales).

Los equinodermos y los hemicordados forman el grupo de deuteróstomos no cordados, el *filum* Ambulacraria. Los trabajos sobre los genes Hox han sido más exhaustivos en el caso de los equinodermos, y existen varios estudios basados en la búsqueda mediante PCR sobre estrella de mar (asteroideo; Mito y Endo 1997) y diferentes especies de erizos de mar [equinoideos, e. g.: *Heliocidaris erythrogramma*, (Popodi et al 1996); *Paracentrotus lividus*, (Di Bernardo et al 1994); *Tripneustes gratilla*, (Dolecki et al 1986)], un crinoideo, *Oxycomanthus japonicus*, y un ofiurideo, *Stegophiura sladeni* (Mito y Endo 2000). Además, en el caso del erizo *Strongylocentrotus purpuratus*, cuyo genoma está publicado (Consortium et al 2006), se sabe que existe un único clúster, de algo más de 500 Kb y compuesto por 11 genes, ligados pero con un orden alterado en comparación con otros clústeres de protóstomos y de cordados, de modo que los genes de los grupos anteriores se encuentran junto a los posteriores, y no todos están orientados en el mismo sentido (Figura I.7) (Cameron et al 2006, Martínez et al 1999). En el caso de los genes anteriores, el erizo de mar tiene un representante para cada PG del 1 al 3 (*SpHox1*, 2 y 3). En el caso de los centrales presenta 4 genes, un representante para PG5 (*SpHox5*), y otros 3 representantes de los PG6 a 8, pero sin poder asignarse claramente a uno u otro grupo. Respecto a PG4, éste se ha perdido en equinoideos, ya que está presente en asteroideos (Long et al 2003) y hemicordados (Peterson 2004), debido probablemente a la inversión que sufrió parte del clúster entre los genes Hox3 y Hox5 (Cameron et al 2006). Los genes posteriores se encuentran divididos en dos grupos diferenciados filogenéticamente, Hox9/10 y Hox11/13, y de este último hay 3 miembros (*SpHox11/13a*, *b* y *c*) que se supone se originaron por una duplicación independiente en el linaje de Ambulacraria (Peterson 2004). En cuanto a su expresión, en el caso de *S. purpuratus* sólo 2 genes, *SpHox7* y *SpHox11/13b* se expresan durante el desarrollo embrionario, mientras que todos ellos se expresan durante estadios larvarios y tejidos adultos. Los genes *SpHox7*, 8, 9/10, 11/13a y 11/13b se expresan colinealmente en el eje antero-posterior en los somatocelos (derivados mesodérmicos; Arenas-Mena et al 2000). Este tipo de expresión debe ser basal a los equinodermos, ya que Hara y colaboradores (Hara et al 2006) han encontrado también una expresión colinear en un crinoideo, *Metacrinus rotundus*, grupo basal dentro de los equinodermos.

Debido a que los equinodermos son organismos muy derivados, tanto desde un punto de vista morfológico y tal vez también molecular, el interés sobre los hemicordados ha crecido recientemente con el objetivo de poder entender mejor cómo fue el ancestro común de los deuteróstomos. El grupo más estudiado dentro de los hemicordados son los enteropneustos, con la especie *Saccoglossus kowalevskii* a la cabeza. Ésta presenta un complemento Hox de 12 genes: 11 de ellos han sido encontrados en colecciones de ESTs (del inglés *Expression Sequence Tag*), *SkHox1*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y los genes posteriores *SkHox9/10* y *SkHox11/13a*, *b* y *c* (Aronowicz y Lowe 2006, Freeman et al 2008, Lowe et al

2003). El gen que no está presente en las colecciones de ESTs es *SkHox8*, pero que he podido identificar en las secuencias publicadas del proyecto de secuenciación de su genoma (Baylor College of Medicine, <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/>; dato no mostrado) y que ha sido también descrito en otra especie de hemicordado, *Balanoglossus simodensis*, justo con el resto de genes ya descritos para *S. kowalevskii* (Ikuta et al 2009, Urata et al 2009). Estos genes son homólogos a sus respectivos de equinodermos (Peterson 2004) estableciéndose así un complejo Hox del ancestro común de equinodermos y hemicordados con 12 genes, 3 de los cuales derivan de una duplicación independiente de los genes del grupo 11/13 en Ambulacraria (Figura 1.7) (Peterson 2004). Sin embargo, ninguno de estos estudios profundiza sobre la estructura genómica de estos genes, por lo que se desconoce si se encuentran agrupados en clústeres, ni la naturaleza de estos. El patrón de expresión ha sido estudiado para todo los genes en *S. kowalevskii*, excepto para *SkHox8*, y presentan una expresión casi exclusiva en la capa ectodérmica durante el desarrollo donde muestran colinearidad espacial, pero no temporal (Aronowicz y Lowe 2006, Lowe et al 2003).

## GENES *Hox* EN UROCORDADOS

Los urocordados son el grupo hermano de los vertebrados, y junto con ellos forman el grupo monofilético de los Olfactores (Delsuc et al 2006). Los urocordados se dividen en tres grupos, las ascidias, el grupo más estudiado (Satoh 1994), las larváceas y las taliáceas. El ciclo de vida de las ascidias se divide en dos fases: por un lado un adulto sésil, que se alimenta mediante filtración, y que no presenta unas características típicamente de cordados, sino más bien unos rasgos derivados y específicos; y por otro, una larva móvil, que presenta notocorda, cordón nervioso hueco dorsal a ésta, faringe perforada y cola post-anal (características que describen a los cordados), rasgos que pierden durante la metamorfosis. En el caso de las larváceas la metamorfosis no supone una pérdida de las características de cordados, ya que sólo consiste en un cambio del ángulo del anclaje de la cola (Nishida 2008). Dentro del grupo de las ascidias, se han identificado hasta 9 genes Hox en la especie *Ciona intestinallis* repartidos en dos cromosomas, aunque muchos de ellos a distancias intergénicas muy grandes y además con el orden alterado de los genes, de modo que *CiHox10* se encuentra entre el clúster formado por los genes *CiHox2* a *4* y el formado por *CiHox5* y *6*. En el mismo cromosoma, pero a una enorme distancia, ~5 Mb (por lo que podría considerarse a efectos genéticos que no están ligados) se encuentra *CiHox1*. Entre este y el clúster *CiHox2-4* se encuentra el gen *CiEvxA*. *C. intestinallis* presenta otra copia del gen *Evx*, *CiEvxB*, que se encuentra en un cromosoma diferente, así como *CiMox*. *Evx* y *Mox* son genes muy parecidos a los Hox y ligados a estos en varios metazoos, y forman una subfamilia dentro de la familia ANTP, denominada *extended Hox* (Minguillón y García-Fernández 2003, Pollard y Holland 2000). Por otro lado, los genes *CiHox12* y *CiHox13* están estrechamente ligados en un cromosoma diferente (Figura 1.7) (Dehal et al 2002, Ikuta et al

2004, Spagnuolo et al 2003). Por tanto, el clúster de *Ciona* se encuentra bastante desintegrado debido a una serie de reorganizaciones genómicas que han afectado tanto al clúster como a su sintenia con los *extended Hox*. En cuanto a su expresión, algunos de estos genes siguen presentando colinearidad espacial, aunque residual. Los genes *CiHox1*, *3*, *5*, *10* y *12* se expresan con un patrón típicamente Hox antero-posterior en el sistema nervioso central de la larva (Ikuta et al 2004). El tubo nervioso de la larva de ascidias se encuentra dividido, de anterior a posterior, en una vesícula sensorial, el cuello, el ganglio visceral y el cordón nervioso caudal (Sato 2003). Se ha sugerido que la expresión de los genes de ascidia Hox1, 3 y 5 podrían estar involucrados en la regionalización del SNC de la larva (Gionti et al 1998, Katsuyama et al 1995, Lemaire et al 2002, Locascio et al 1999). *CiHox1* y *CiHox3* se expresan en el ganglio visceral, el cual se ha sugerido es homólogo al rombencéfalo de vertebrados (Meinertzhagen y Okamura 2001) y el límite de expresión de *Hox5* en vertebrados marca el límite entre el cerebro posterior y la espina dorsal, límite que corresponde con la expresión de *CiHox5* entre el ganglio visceral y el cordón nervioso. Los otros genes se expresan en otro tipo de estructuras como *CiHox2* que se expresa en las células laterales del tronco en el estadio de larva, y *CiHox4* se expresa desde neurula en un grupo de células mesenquimáticas y en las células laterales del tronco en estadios de tailbud hasta el estadio de larva (Ikuta et al 2004). Los genes *CiHox10*, *12* y *13* se expresan además en el tubo digestivo durante el desarrollo postlarva, donde también hay signos de cierta colinearidad espacial (Ikuta et al 2004). En cuanto a colinearidad temporal, ésta no existe, ya que los genes *CiHox1*, *5* y *12* se expresan antes que *CiHox3* y *10*. El estado de los genes Hox en el otro grupo de tunicados estudiados, las larváceas, es de mayor desintegración si cabe, ya que no hay rastro de ligamiento de ninguno de los 9 genes descritos en la especie *Oikopleura dioica*, donde sin embargo la colinearidad espacial se mantiene, como ha podido observarse en los patrones de expresión de estos genes en la cola del animal durante el desarrollo (Seo et al 2004). El hecho de la pérdida diferencial de genes, como el de varios Hox de los grupos centrales, así como de fuertes reorganizaciones genómicas afectando a los genes Hox tanto en larváceas como en ascidias parece haber sido determinante en la simplificación del patrón corporal durante la evolución de estos grupos (revisado por Ikuta y Saiga 2005). Además, la pérdida de colinearidad temporal en estos así como en *Drosophila* y *C. elegans* se asocia con un desarrollo temprano rápido y habría permitido la fracturación del clúster (Ferrier y Holland 2002).

## EL COMPLEMENTO *Hox* EN DIFERENTES VERTEBRADOS

El grupo de vertebrados que comparte el ancestro más basal con el resto de los vertebrados lo constituyen las lampreas y los mixines, que forman el grupo de los agnatos, o vertebrados sin mandíbulas. La inmensa mayoría de las especies de vertebrados se engloban en el grupo de los gnatóstomos, o vertebrados mandibulados. Los agnatos o ciclóstomos forman un grupo monofilético (aunque existe algo de controversia ya que



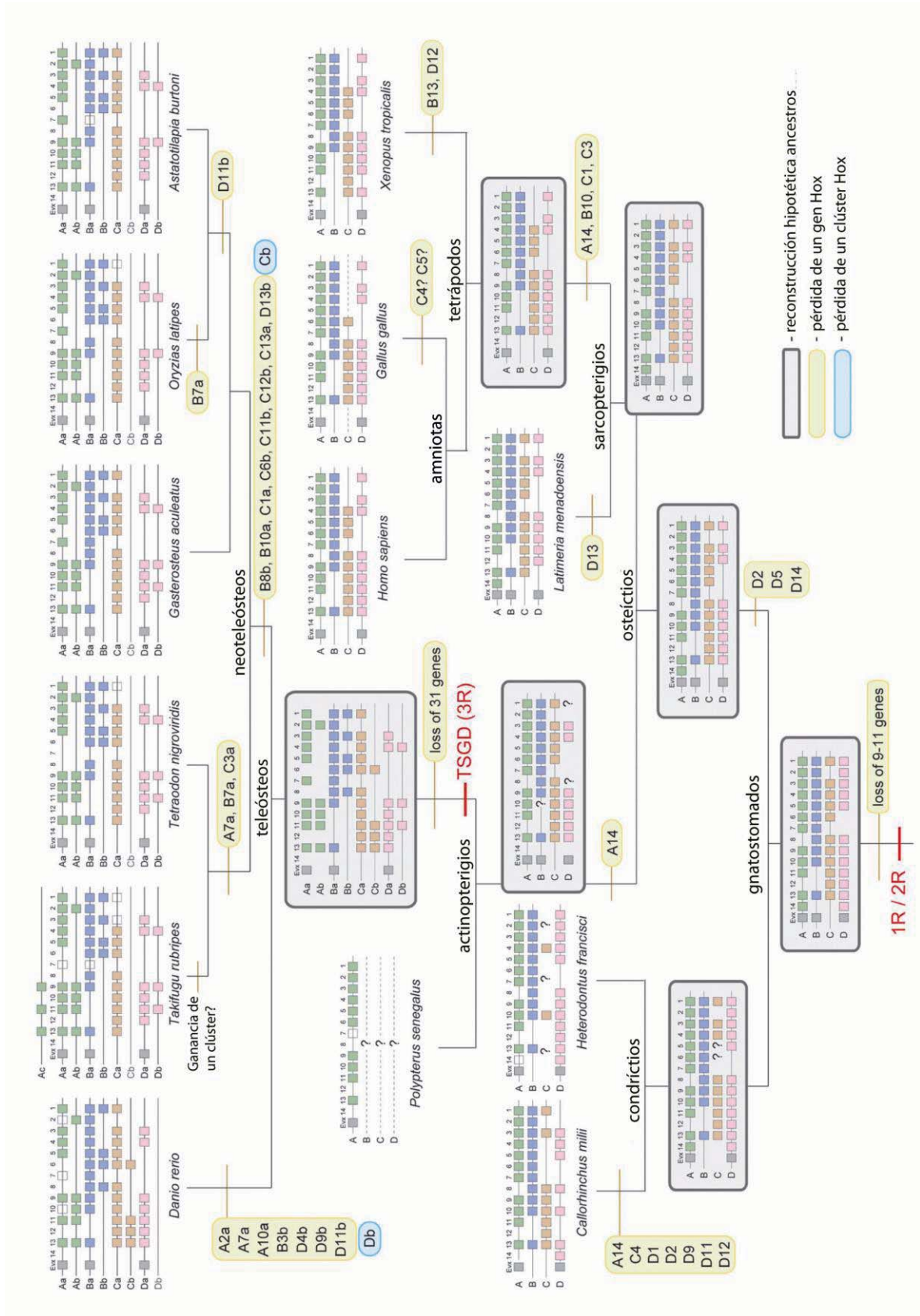
puede ser parafilético) hermano de los gnatóstomos. Los gnatóstomos se dividen en dos grandes grupos: los condriictios (tiburones y rayas) y los osteíctios. Éste último grupo está constituido por los sarcopterigios, con peces pulmonados, celacantos y tetrápodos (mamíferos, aves, reptiles y anfibios) y los actinopterigios, con los bichires y los teleósteos (peces zebra, pez globo, etc.) (Figura 1). El conocimiento acumulado sobre los genes Hox en el grupo de los vertebrados es inmenso, sin embargo, podemos decir que durante su evolución se originaron múltiples clústers, desde los 4 presentes en condriictios y tetrápodos con aproximadamente 40 genes, pasando por los 7-8 de la mayoría de los teleósteos hasta los 13 encontrados en salmónidos, con 118 genes (Mungpakdee et al 2008). Durante la evolución de cada grupo se han perdido diferentes genes *Hox* de forma específica o de linaje, lo que hace que cada uno de ellos pueda ser caracterizado por un complemento diferente de genes y clústers *Hox* (Figura 1.7).

### **Ciclóstomos: ¿cuántos clústeres?**

El grupo de los agnatos vivos está formado por los mixines (Myxiniformes) y las lampreas (Petromyzoniformes). La relación filogenética de este grupo con los gnatóstomos ha sido muy controvertida durante mucho tiempo. Sin embargo, los análisis moleculares más recientes lo sitúan como un grupo monofilético basal a los gnatóstomos (Blair y Hedges 2005, Delsuc et al 2006, Furlong y Holland 2002, Kuraku et al 1999, Kuraku y Kuratani 2006, Takezaki et al 2003). Está ampliamente aceptado que durante la evolución de los vertebrados se han producido dos rondas de duplicación genómica, pero lo que no se conoce es la magnitud de cada una de las duplicaciones ni la cronología de estas. En este aspecto, conocer la organización genómica de los grupos de ciclóstomos podría ayudar: si no existiese una relación 1:1 de genes ortólogos entre ambos grupos que implicase una historia común de duplicaciones, implicaría que las duplicaciones genómicas ocurrieron tras la divergencia entre agnatos y el resto de los vertebrados (Force et al 2002). Sin duda alguna, el análisis del genoma de *Petromyzon marinus* que hoy día está en marcha proveerá de nueva información sobre el tempo de las dos duplicaciones genómicas de los vertebrados (<http://genome.wustl.edu/>). En este sentido, el complemento de genes Hox en lampreas y mixines podría dar alguna indicación de cómo ha sido este tempo. Hasta ahora se han realizado varios estudios basados en búsquedas por PCR y secuenciación de clones de bibliotecas genómicas y de cDNA tanto de lampreas de agua dulce (*Lampetra planeri*, Sharman y Holland 1998) como de especies marinas (*P. marinus* - Force et al 2002, Irvine et al 2002, Pendleton et al 1993); *Lethenteron japonicum* - Takio et al 2007, Takio et al 2004). Algunos de estos genes se han encontrado ligados en la misma región genómica, por lo que la presencia de clústers parece confirmada, y aunque las relaciones de ortología no quedan nada claras debido a que los árboles filogenéticos son ambiguos, parece claro que algunos de los grupos de paralogía están representados con hasta cuatro genes, como el caso del grupo 9, lo que podría indicar la presencia de hasta 4 clústeres. No está claro si éstos son ortólogos a los de gnatóstomos o no porque, como se ha mencionado para el caso de asignar las relaciones de ortología de los genes de diferentes PGs, las relaciones

filogenéticas no son nada claras. Sin embargo, Force y colaboradores (Force et al 2002) han propuesto que antes de la divergencia agnatos-gnatóstomos se habría producido una duplicación y luego se expandieron los clústeres independientemente que en el caso de los gnatóstomos fue probablemente por una segunda ronda de duplicación genómica, aunque no es descartable que los clústeres de agnatos hayan surgido por duplicaciones independientes a los de gnatóstomos (Fried et al 2003). Lo que sí parece claro, es que alguno de los genes se han originado por una expansión específica del linaje, originada por duplicaciones en tándem, como es el caso de los genes *PmHoxN6* y *PmHoxN7*, idénticos a nivel nucleotídico en la secuencia correspondiente al homeobox y ligeramente diferentes fuera de este, y ligados además con *PmHoxN5* (en estos casos, los números de PG han sido dados por posición y no por ortología; Irvine et al 2002). El hecho más llamativo es la descripción de un gen del grupo 14, probablemente presente en el clúster del ancestro común de los vertebrados (Kuraku et al 2008). En el caso de los mixines, el único estudio realizado es el de Stadler y colaboradores (Stadler et al 2004) en el que identifican al menos 33 genes *Hox* diferentes en la especie *Eptatretus stoutii*, de los cuales 7 representan el grupo PG9, probablemente originados por duplicaciones independientes durante la evolución de los mixines. Stadler y colaboradores (2004) proponen que una duplicación del clúster ancestral ocurrió antes de la divergencia agnatos-gnatóstomos, pero que luego ocurrieron duplicaciones independientes tanto en mixines como en lampreas, algo que no sería sorprendente si tenemos en cuenta que ambos grupos divergieron hace más de 400 millones de años (Blair y Hedges 2005, Kuraku y Kuratani 2006).

Los patrones de expresión que se conocen han sido estudiados en la especie de lamprea *L. japonicum*, y de ellos se extrae que existe colinearidad espacial en los arcos faríngeos y en el sistema nervioso central para genes de los PG2 a 8 y los PG9-11 en el *tailbud* (Takio et al 2007, Takio et al 2004). Los genes del grupo 13 también se expresan en el *tailbud*, además de en regiones posteriores del tubo digestivo, pero no se ha analizado su posición relativa a los otros grupos (Kuraku et al 2008). Los genes *PmHox9y* y *PmHox10w* se expresan además en el mesénquima del primordio de la aleta dorsal, lo que ha relacionado el origen de las extremidades pares con las aletas medias (Freitas et al 2006). Además, ha sido descrita la expresión del gen *LjHox14α*, que no se expresa ni en el sistema nervioso central, ni en los somitos ni en el primordio de la aleta dorsal, tejidos donde se esperaría su ubicación, sino que se expresa únicamente en una región determinada del tubo digestivo posterior, algo que parece salirse de lo que sería una expresión canónica *Hox* (Kuraku et al 2008). En ninguno de estos estudios se han detectado indicios de colinearidad temporal, pero tampoco se conoce la estructura genómica de los genes analizados (se desconoce si los genes estudiados son miembros de un mismo clúster, o de diferentes).





## Gnatóstomos. 2R, 3R... y 4R

Los gnatóstomos más basales son los condriictios, grupo hermano de los osteíctios: estos últimos están divididos en (i) actinopterigios, con bichires como grupo basal y hermano de los teleósteos, y (ii) sarcopterigios, que engloban los tetrápodos, celacantos y peces pulmonados. Los gnatóstomos se caracterizan en cuanto al contenido de genes Hox en que están agrupados en 4 clústeres parálogos, denominados A, B, C y D, presentes en su ancestro común, y que en el caso de los peces teleósteos ha sido expandido debido a una tercera ronda de duplicación genómica específica de teleósteos, perdiéndose un duplicado C en el caso de los acantopterigios (medaka, fugu, cíclidos) y un duplicado D en pez cebra. La historia evolutiva de los genes Hox en gnatóstomos se basa en pérdidas diferenciales de algunos parálogos o duplicaciones específicas, y para conocerla, es necesario hacer inventario de los genes Hox presentes en especies clave de cada uno de los grandes grupos. En este apartado, se va a revisar aquí lo que se sabe hasta ahora de los complementos de genes Hox de diferentes vertebrados mandibulados.

### *Condriictios y el ancestro común de los gnatostomados*

Los peces cartilaginosos se dividen en dos grupos, los elasmobranquios (tiburones, rayas y mantas) y los holocéfalos (quimeras). La quimera fantasma, o pez elefante (*Callorhynchus milii*) tiene cuatro clústeres en su genoma con un total de 45 genes y 2 pseudogenes (*CmHoxA14* y *CmHoxB14*; Ravi et al 2009). Existen datos para un elasmobranquio, el tiburón cornudo (*Heterodontus francisci*), pero del que sólo se han caracterizado completamente los clústeres A y D (Kim et al 2000, Powers y Amemiya 2004a, Prohaska et al 2004) y algunos genes de los clústeres B y C (datos no publicados citados por Powers y Amemiya 2004b). *C. milii* presenta todos los parálogos de 7 grupos *Hox* (1, 3, 4, 5, 9, 10, 13) en los 4 complejos y los análisis filogenéticos realizados con ellos sugieren que la duplicación de los clústeres en gnatóstomos siguió una topología ((AB)(CD)) que es la hipótesis más apoyada hoy en día (Ravi et al 2009). Tanto *H. francisci* como *C. milii* tienen

←

**Figura 1.7.** Reconstrucción de la historia evolutiva de los clúster Hox. Los cuadrados cerrados representan genes que han sido previamente descritos. Los cuadrados abiertos son pseudogenes. Los cuadros transparentes son genes que no han sido secuenciados aún, pero que probablemente estén presentes en los clústeres. Basado en principios de parsimonia, se han reconstruido las hipotéticas organizaciones de los complejos Hox de los diferentes ancestros, encasillados en un cuadrado gris. Las pérdidas secundarias de genes Hox y de clústeres enteros se han marcado con cuadros en amarillo y azul, respectivamente. Ver el texto para obtener referencia a la literatura original que describe la organización de los clústeres Hox de una especie en particular. Los posibles eventos de duplicación genómica están indicados con barras rojas. La organización genómica del tiburón cornudo, *Heterodontus francisci*, está basada en datos no publicados presentados por Powers y Amemiya (2004b). El pseudogenización del gen HoxC1a de algunos teleósteos está basado en Thomas-Chollier y Ledent (2008). Abreviaturas: TSGD, duplicación genómica específica de teleósteos; 1R/2R, primera y segunda ronda de duplicación genómica.

un gen *HoxD14* activo, y para otra especie de tiburón (*Scyliorhinus torazame*), se conoce la expresión, que como ocurre en lampreas, se expresa también de forma no canónica sólo en una parte del tubo digestivo posterior, y no en tejidos como el sistema nervioso central, los somitos o la aleta dorsal (Kuraku et al 2008). *H. francisci* fue uno de los primeros vertebrados en las que se describió un miembro del grupo Hox14 (*HfHoxD14* y el pseudogen *HfHoxA14*), junto al de una especie de celacanto (*LmHoxA14*). Teniendo en cuenta la topología de las duplicaciones de los clústeres sugerida por Ravi y colaboradores (2009), el clúster preduplicativo ancestral debía tener un gen del grupo 14. Además, la presencia de un pseudogen de *HoxB14* en *C. milii* implica que éste se ha perdido independientemente en condriictios y en osteíctios, y se asume su presencia en el clúster B del ancestro común de los gnatóstomos, junto con un gen *HoxA14* y uno *HoxD14* (Figura 1.7) (Ravi et al 2009). De este modo, el pez elefante es la especie que mantiene la condición más parecida a la ancestral de los gnatostomados, ya que habría mantenido todos los genes, salvo *CmHoxA14* y *CmHoxB14* que han sufrido un proceso de pseudogenización (Ravi et al 2009).

#### *Actinoptergios: 3R y su enorme diversificación*

El grupo más numeroso de vertebrados es el de los teleósteos, para el que se estiman unas 27000 especies vivas de un total de 43000 especies de vertebrados reconocidos. Dentro de los teleósteos, el grupo Euteleostei es el más rico (con 17000 especies de Neoteleósteos: e. g. pez globo, medaka, cíclidos y pez espinoso) y es uno de los cuatro grandes grupos de teleósteos, junto con los más basales Clupeomorpha (con 8000 especies que pertenecen al grupo Ostariophysii: e. g. pez cebra), Osteoglossomorpha y Elopomorpha (Nelson 2006). Los grupos basales de actinoptergios son los Polypteriformes (bichires), Acipenseriformes (esturiones y pez espátula), Lepisosteidos (catán) y *Amia calva* (grupo con una sólo especie), siendo los bichires la rama más basal a todos (Inoue et al., 2003). Los teleósteos se caracterizan porque presentan un número extra de clústeres *Hox* debido a una tercera ronda de duplicación genómica (3R) ocurrida tempranamente durante la evolución de los teleósteos (Crow et al 2006). Esta 3R se ha demostrado también mediante el estudio de otros genes y familias génicas (Hoegg et al 2004, Taylor et al 2001; revisado por Hoegg y Meyer 2005). El estudio de los clústeres *Hox* en peces está ayudando a entender la evolución genómica después de las duplicaciones, como ejemplo modelo de lo que ocurre con los genes duplicados y sus regiones reguladoras.

Hace más de 10 años que se encontraron más de 4 clústeres *Hox* en pez cebra (*Danio rerio* - Amores et al 1998, Prince et al 1998a). Durante este tiempo se han identificado un número extra de complejos *Hox* en muchas otras especies de teleósteos: del grupo Neoteleostei, medaka (*Oryzias latipes*; Kasahara et al 2007, Kurosawa et al 2006), cíclidos (tilapia del nilo, *Oreochromis niloticus* - Santini y Bernardi 2005; *Astatotilapia burtoni* - Hoegg et al 2007, Thomas-Chollier y Ledent 2008) el pez espinoso ("threespine stickleback", *Gasterosteus aculeatus* - Hoegg et al 2007) y 3 especies de pez globo

(*Tetraodon nigroviridis* - Jaillon et al 2004; *Takifugu rubripes* - Aparicio et al 2002; *Spheroides nephelus* – Amores et al 2004); salmónidos, (*Salmo salar* - Mungpakdee et al 2008); otra especie del orden Cipriniformes (*Megalobrama amblycephala* - Zou et al 2007), que tiene un complemento Hox muy similar al de *Danio*; la anguila, basal al grupo Eutelesotei + Clupeomorpha (*Anguilla japonica* - Guo et al 2009); y un osteoglossomorfo, grupo más basal de teleósteos (*Hiodon alosoides* - Chambers et al 2009). Tanto *A. japonica* como *H. alosoides* tienen parálogos duplicados de todos los clústeres (8 en total) lo que implica que la duplicación tuvo que ocurrir antes de la radiación de los teleósteos (Figura I.7).

*S. salar* presenta 13 clústeres, producto de una duplicación genómica específica de los salmónidos (Allendorf et al 1984), tras la cual perdió un clúster parálogo HoxAb, y sólo mantiene las dos copias correspondientes al HoxDa, lo que implica que su ancestro común perdió el clúster HoxDb (Figura I.7). Los cipriniformes tampoco presentan el clúster HoxDb (reducido al microRNA *mir-10d*; Woltering y Durston 2006), pero se trata de una pérdida independiente a la de los salmónidos, ya que el grupo hermano de estos, los neoteleósteos, tienen el complejo HoxDb. Sin embargo, el ancestro común de los neoteleósteos perdió el clúster parálogo HoxCb (Figura I.7). Además, un pez globo, *T. rubripes*, tiene una duplicación parcial de un clúster, llamado HoxAc, probablemente originado a partir del HoxAa (Amores et al 2004). La historia de los teleósteos está llena pues de pérdidas diferenciales de clústeres, pero también de genes, muchas de ellas de forma convergente, como por ejemplo la pérdida de todos los parálogos HoxB7 de forma independiente en los Tetraodontiformes (*S. nephelus*, *T. rubripes*, *T. nigroviridis*) y en Beloniformes (*O. latipes*) (Figura I.7).

La historia evolutiva de los genes *Hox* en actinopterigios está representada en la figura I.7. En este sentido, de los grupos basales de actinopterigios sólo existen datos de los bichires, por ejemplo, para la especie *Polypterus palmas*, sólo se ha realizado una búsqueda sobre librerías de cDNA (Ledje et al 2002), mientras que de la especie *Polypterus senegalus* se ha caracterizado un clúster HoxA completo (Chiu et al 2004). De los datos de estos estudios se extrae como conclusión que los bichires tienen sólo 4 complejos *Hox*, y que por tanto la 3R se dio después de su divergencia con el resto de actinopterigios. Se ha llegado a sugerir que los otros grupos basales tampoco han sido afectados por esta 3R, aunque son datos muy preliminares basados solo en 4 genes *Hox* encontrados en *Amia* (Crow et al 2006). Sin duda, los datos que se puedan obtener de otros grupo basales, como los peces espátulas o esturiones, ayudarán a clarificar el tempo exacto de esta duplicación, pero por ahora lo único que se sabe es la expresión de algunos genes *Hox* de los grupos posteriores en la especie *Polyodon spathula* (Davis et al 2007).

*Sarcopterigios: evolución sin cambios en los complejos Hox.*

Los sarcopterigios mantienen 4 clústeres *Hox*, al igual que el ancestro común de los gnatóstomos, aunque han perdido diferencialmente algunos genes, sin llegar no obstante al nivel de los teleosteos. El grupo más basal del que se tienen datos es el celacanto (*Latimeria menadoensis*), para el que se han descrito los cuatro complejos (Koh et al 2003), y fue el primer vertebrado (junto al tiburón cornudo, *H. francisci*) en el que se identificó un miembro del PG14, abriendo el debate sobre la homología entre éste y el *Hox14* de anfibio, del que se hablará en el siguiente apartado (Ferrier 2004, Powers y Amemiya 2004a). También se tienen datos, aunque muy preliminares y no de la estructura genómica, de algunos genes *Hox* en un pez pulmonado australiano, el *Neoceratodus forsteri* (Longhurst y Joss 1999). Los tetrápodos son el grupo más estudiado dentro de los sarcopterigios, y dentro de estos, los mamíferos. Humano y ratón presentan 39 genes *Hox*, de los PG1 a PG13, repartidos en los correspondientes 4 clústeres (Acampora et al 1989, Duboule y Dollé 1989). Junto a ellos, diferentes estudios de análisis del genoma y de búsquedas en librerías genómicas y de cDNA, han determinado un complejo igual para *Gallus gallus*, con los mismos 39 genes (Burke et al 1995, Grapin-Botton et al 1995, Ladjali-Mohammedi et al 2001, Richardson et al 2007). En un reciente análisis del genoma de un reptil, *Anolis carolinensis* se han encontrado 40 genes, con un complemento igual al de mamíferos y pollo, pero con la excepción de que posee el gen *HoxC3* (Di-Poï et al 2009). Este gen ha sido identificado en un análisis de los datos genómicos disponibles hasta la fecha en *Xenopus tropicalis* por el mismo grupo (Di-Poï et al 2009). Esto significaría, pues, que aves y mamíferos habrían perdido este gen de forma independiente (Figura 1.7). *Xenopus* habría perdido respecto al ancestro común de tetrápodos los genes *HoxB13* y *HoxD12* (Di-Poï et al 2009, Kuraku y Kuratani 2006). Dentro de los tetrápodos, *Anolis* representa el caso más interesante: sus clústeres son desde 1,5 (*HoxA*) a 2,5 veces (*HoxD*) más grandes que los del resto de vertebrados, que tienden a mantener una compactación muy conservada (~100 Kb) en lo que se cree es un proceso de consolidación de los clústeres durante la evolución de los vertebrados (Duboule 2007). Los intrones y las distancias intergénicas son mayores en *Anolis* (y como excepción, también en el clúster *HoxC* de *Xenopus*), sobre todo en los extremos 5' y 3' (Di-Poï et al 2009). Además, los clústeres de *Anolis* contienen una gran cantidad de elementos repetitivos tales como elementos transponibles, principalmente retrotransposones de dos tipos de non-LTR (Di-Poï et al 2009), comparado con el resto de vertebrados, donde parece que hay limitaciones o restricciones a la presencia de estos elementos. Sin duda, la gran cantidad de elementos repetitivos está relacionada con el gran tamaño que presentan los clústeres de reptiles. Al igual que pasa con las duplicaciones genómicas específicas de peces, Di-Poï y colaboradores (2009) sugieren, a falta de más datos de otros reptiles, que la presencia inusual de elementos repetitivos podría ser una rica fuente de variabilidad, asociada con la gran diversificación que se ha producido durante la evolución de los reptiles.

## EXPRESIÓN DE LOS GENES *Hox* EN VERTEBRADOS

En cuanto a la expresión, los genes *Hox* de vertebrados han sido ampliamente estudiados y presentan tanto colinearidad espacial (Duboule y Dollé 1989) como colinearidad temporal (Duboule 1994), de forma que se establece una especie de código *Hox* para especificar las diferentes propiedades regionales a lo largo de los ejes embrionarios (Kmita y Duboule 2003).

En los vertebrados, los productos de los genes *Hox* se usan para impartir identidad posicional a lo largo del eje A-P en el mesodermo paraxial, el mesodermo de la placa lateral, neuroectodermo, células de la cresta neural, y el endodermo (Deschamps y van Nes 2005). Las vías de señalización de los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF, de sus siglas en inglés), del ácido retinóico (RA, del inglés) y la vía Wnt, juegan un importante papel en el establecimiento del código *Hox* en estos diferentes contextos del desarrollo. Posteriormente, el código *Hox* ha sido reubicado para asegurar el establecimiento del patrón de otras estructuras secundarias como las extremidades (Davis et al 2007, Freitas et al 2007, Tarchini y Duboule 2006, Zakany y Duboule 2007), el sistema genital (Dollé et al 1991) o el sistema excretor (Di-Poï et al 2007).

Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, la segmentación de diferentes estructuras como el cerebro posterior (rombencéfalo) y el mesodermo paraxial son controlados por mecanismos diferentes, pero sin embargo ambos están acoplados a la iniciación de una expresión diferencial de genes *Hox*, cuyos productos determinarán la identidad de cada segmento (revisado por Alexander et al 2009, y Tümpel et al 2009). El rombencéfalo se segmenta temporalmente durante el desarrollo en 7 rombómeros (en el desarrollo de mamíferos; Lumsden 2004, Lumsden y Krumlauf 1996, Moens y Prince 2002) y estos actúan como un centro organizador con importantes roles en la especificación neuronal, o en la determinación del destino de las células de la cresta neural en la formación de distintos nervios craneofaciales, influyendo determinantemente en el desarrollo de la cabeza y estructuras posteriores no segmentadas (Koentges y Matsuoka 2002, Le Douarin y Kalcheim 1999, Pasqualetti et al 2007, Wingate y Lumsden 1996). De los 12 genes que hay en vertebrados de PG1 a PG4, diez de ellos se expresan en el rombencéfalo con patrones solapantes, de forma colinear y con un límite anterior con periodicidad de 2 rombómeros, algo que se caracterizó primeramente en el embrión de ratón (Murphy et al 1989, Murphy y Hill 1991, Wilkinson et al 1989). De este modo, los genes *hoxa4*, *-b4* y *-d4* se expresan exclusivamente hasta el límite de los rombómeros r6/r7; *hoxa3*, *-b3* y *-d3* se expresan hasta el límite r4/r5 y el gen *hoxb2* hasta el límite r2/r3. El gen *hoxa2* se salta esta regla de la periodicidad de los dos rombómeros y se expresa hasta r1/r2, siendo el único *Hox* que se expresa en el rombómero 2. Los genes *hoxa1* y *hoxb1* se saltan la regla de la colinearidad: *hoxa1* y *hoxb1* se expresan hasta el límite r3/4, pero *hoxa1* tiene una expresión temporal y *hoxb1* va reduciendo su expresión más posterior hasta que queda restringido al rombómero 4. Por tanto, la expresión de los genes

*Hox* es muy dinámica tanto temporal como espacialmente en los rombómeros. Además, los niveles de expresión de un mismo gen no son los mismos en todos los rombómeros, teniendo niveles más fuertes en rombómeros o grupos de rombómeros específicos. Esta expresión está conservada con otros vertebrados como pollo o pez cebra y otros modelos de peces, aunque con ciertas variaciones de expresión tanto temporales como en los niveles de expresión en rombómeros (*G. gallus* - Grapin-Botton et al 1995, Manzanares et al 2001, Prince y Lumsden 1994, Sundin y Eichele 1990; pez globo - Amores et al 2004; medaka - Davis et al 2008; tilapia - Le Pabic et al 2007; pez cebra - Prince et al 1998a, Prince et al 1998b; y la perca rayada, *Morone saxatilis* - Scemama et al 2002, Scemama et al 2006).

La activación temporal de los genes *Hox* es importante en una fase temprana de la producción de mesodermo axial en la línea primitiva de vertebrados, lo que se traduce en una colinearidad espacial al ir expandiéndose las expresiones progresivamente hacia zonas más anteriores (revisado en (Alexander et al 2009, Deschamps y van Nes 2005). En una segunda fase se forma el mesodermo presomítico a partir del cual se irán formando los somitos. Estos expresarán también los genes *Hox* de forma colinear, de modo que cada somito o grupos de estos estarán caracterizados por una combinación *Hox*. La expresión de los genes en los somitos es directamente heredada de la primera fase en un principio, pero secundariamente es regulada para definir mejor tanto su límite anterior como posterior. El reflejo del papel de los genes *Hox* se observa claramente por experimentos de pérdida de función, en los que se producen transformaciones homeóticas de unos tipos de vértebras en otros (revisado por Wellik 2009). Aunque conservado, se asocian ligeras variaciones en este sistema con la variabilidad morfológica encontrada en vertebrados, como el diferente número de cada tipo de vértebras (cervicales, torácicas, lumbares, sacras y caudales) y la forma de estas encontradas entre ratón, pollo o peces (Amores et al 2004, Burke et al 1995).

Los genes *Hox* no se han relacionado con la identidad de los segmentos de derivados neuroectodérmicos y mesodérmicos, sino que también se le asocian funciones con la determinación del tracto digestivos, ya que se ha observado expresión coordinada y colinear durante el desarrollo de varios genes *Hox* genes en ratón (Pitera et al 1999, Sekimoto et al 1998), y en pollo (Roberts et al 1995, Yokouchi et al 1995) [ver Grapin-Botton y Melton (2000) para una revisión del tema].

El código *Hox* presente en estructuras axiales también ha sido co-optado para determinar el patrón de otros ejes secundarios. Así, durante el desarrollo de las extremidades pares los genes *Hox* se expresan en diferentes fases para determinar la formación de brazo, antebrazo y manos (para el caso de la extremidades superiores del humano), donde son esenciales para la determinación por ejemplo de los dígitos (Tarchini y Duboule 2006; revisado por Zakany y Duboule 2007; sistema también conservado en peces: Ahn y Ho 2008).



## EL CEFALOCORDADO ANFIOXO, Y EL CLÚSTER *Hox* ANCESTRAL DE CORDADOS

Frente a la enorme variación presentada en los apartados anteriores, debida a reorganizaciones genómicas, pérdidas de genes o duplicaciones génicas o genómicas, el anfioxo es el único animal que tiene un único clúster *Hox* con 15 genes, representantes de todos los grupos de paralogía, y todos con el mismo sentido de transcripción. Debido a la posición filogenética que ocupa, es sin duda, el organismo vivo que mejor refleja el clúster que probablemente hubo de tener el ancestro común de los cordados (Ferrier et al 2000, Garcia-Fernández y Holland 1994, Holland et al 2008). La entrada del anfioxo en la era molecular se debió a la clonación de un gen *Hox* en el año 1992, el *BfHox3* en la especie americana, y su caracterización mediante hibridación *in situ* (Holland et al 1992). Sólo dos años después, mediante una búsqueda por PCR en librerías genómicas, se describieron genes ortólogos a los PG1 a 10, ligados en una única región cromosómica (Garcia-Fernández y Holland 1994), lo que hizo ver a los cefalocordados como claves a la hora de entender el origen de los vertebrados, ya no sólo desde un punto de vista morfológico, sino también genómico (Gee 1994). No fue hasta seis años después que el clúster terminaría de caracterizarse, con la descripción de hasta 14 genes (Ferrier et al 2000), lo que incluía por primera vez 14 genes en un mismo clúster, y abriendo la posibilidad de que el ancestro común de cordados poseyese también PG14. Sin embargo, como se ha visto en apartados anteriores, también se describieron posteriormente miembros del grupo *Hox14* en vertebrados, primero en el celacanto y el tiburón cornudo (Powers y Amemiya 2004a) y también en lamprea y otros condriactos (Kuraku et al 2008, Ravi et al 2009). Sin embargo, los análisis filogenéticos de los genes de los PG9 a 14 son bastante ambiguos y con valores que los soportan muy débiles, por lo que no queda claro si estos genes son realmente ortólogos, o se han originado mediante duplicaciones independientes durante la evolución de los cefalocordados y los vertebrados (Ferrier 2004, Ferrier et al 2000, Kuraku et al 2008). Esta imposibilidad de realizar un análisis robusto es debido a que la secuencia del homeodominio utilizada tiene una tasa de evolución mayor para los genes posteriores que para los centrales y anteriores, y al ser una secuencia muy pequeña (60 aa) no se puede extraer información fiable. A este fenómeno se le ha denominado *flexibilidad posterior en deuteróstomos* (Ferrier et al 2000).

Tanto la caracterización genómica como la expresión de los genes *Hox* en cefalocordados ha sido estudiada única y exclusivamente en una especie, el anfioxo americano *B. floridae*. Los genes *Hox* caracterizados hasta la fecha son *BfHox1*, 2, 3, 4 y 6 (Schubert et al 2006, Wada et al 1999), y aunque en un principio se había descrito que *BfHox2* se saltaba la colinearidad espacial en el tubo neural (Wada et al 1999), su límite anterior de expresión ha sido descrito posteriormene entre los genes *BfHox1* y *BfHox3* (Schubert et al 2006). *BfHox1* se expresa además en la epidermis (Wada et al 1999). Además de la colinearidad espacial, y al igual que en vertebrados, la expresión también es

temporalmente colinear (Wada et al 1999). El código Hox que se establece en el sistema nervioso del embrión del anfibio hace que desde un punto de vista molecular sea comparable con el observado en el rombencéfalo y el cordón nervioso de vertebrados visto en el apartado anterior, aunque el tubo neural del anfibio no está morfológicamente segmentado.

### REGULACIÓN DE LOS GENES Hox

---

Como se ha visto en los apartados anteriores, los productos derivados de los genes *Hox* tienen un papel fundamental durante el desarrollo prácticamente de todas las estructuras del embrión de vertebrado (McGinnis y Krumlauf 1992). Cualquier cambio en la expresión de uno de estos genes produce malformaciones debido a la incorrecta formación del código *Hox*.

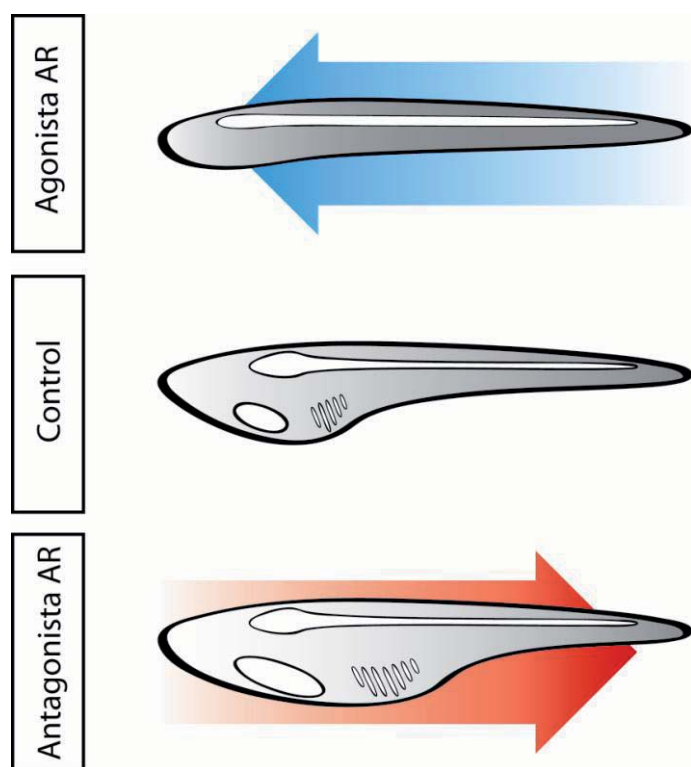
La expresión de los genes *Hox* en el sistema nervioso del embrión del anfibio y la del cerebro posterior de vertebrados podría indicar que en cierto sentido la regulación de éstos está conservada entre ambos, al menos en el SNC. Entender la regulación de los genes en ambos grupos se hace esencial para entender cómo estaba regulado este código en el ancestro común de cordados y cómo ha evolucionado luego en los diferentes linajes. Los genes *Hox* están muy finamente regulados a distintos niveles y de diferentes maneras según el tejido o el proceso de desarrollo: autoregulación, vía Wnt, FGFs, BMPs (proteínas morfogenéticas de hueso), factores de transcripción como *Krox20* o *Kreisler* en el rombencéfalo y factores morfogenéticos como el RA. En los últimos años también se ha descrito un papel muy importante de ciertos microRNAs en la regulación post-transcripcional. En vertebrados, dentro de los clústeres hay dos familias de microRNAs, el *miR-10* y el *miR-196* (Mansfield et al 2004, Pearson et al 2005, Tanzer et al 2005) que parecen tener un papel importante regulando los genes *Hox* (Woltering y Durston 2006, Yekta et al 2004). Ni en los deuteróstomos no vertebrados ni en protóstomos se ha encontrado ningún miembro de la familia de *miR-196*, pero sí se han encontrado copias de *miR-10*. *miR-196* se considera una innovación de vertebrados. En protóstomos, además de *miR-10* hay dentro del clúster un gen de otra familia, *miR-iab-4* (Pearson et al 2005). En el caso del anfibio, hay 3 copias de *miR-10*, (Wheeler et al 2009), distribuidas a lo largo del clúster (Figuras I.7): *miR-10a* está *upstream* del *Hox*, *miR-10b* del *Hox5* y *miR-10c* de *Hox9*, y podrían ser un reminisciente de la historia evolutiva de las duplicaciones que se dieron a partir de un clúster ancestral con 2, 3 ó 4 genes (García-Fernández 2005a), ya que también se ha encontrado un caso similar en un protóstomo, *Capitella*, con *miR-10a* entre *Dfd* (*Hox4*) y *Scr* (*Hox5*), *miR-10c* entre *Lox5* (*Hox6*) y *Antp* (*Hox7*) y *miR-10b* *upstream* de *Lox4* (*Hox8*).



Esta tesis se ha centrado en el estudio de la regulación de la expresión de los genes Hox del anfibio europeo a dos niveles: uno de ellos, estudiar el efecto del ácido retinóico en el establecimiento de sus límites de expresión, centrándose en los genes de los grupos posteriores, y en segundo lugar, el análisis de regiones conservadas no codificantes como posibles candidatos a secuencias reguladoras, mediante un análisis de *phylogenetic footprinting* mediante la comparación del clúster de *B. floridae* con *B. lanceolatum*, y de éstos con humano y otros vertebrados.

## EL ÁCIDO RETINOICO: UN POTENTE MORFÓGENO

El ácido retinóico (RA) es un morfógeno muy importante para establecer el patrón del



**Figura 1.8.** Efectos de los tratamientos con ácido retinóico (RA) o con un un antagonista de RA, como BMS009. Al tratar con RA se produce una posteriorización (marcado con una flecha azul) de estructuras anteriores (arriba) respecto a un animal control (centro), no formándose en los casos más extremos ni la boca ni la faringe. Al tratar con antagonista (abajo) se consigue el efecto contrario, se produce una anteriorización (marcado con una flecha roja) de las estructuras posteriores, extendiéndose estructuras anteriores como la boca o la faringe.

eje A-P del embrión ya que variaciones en su concentración implican cambios homeóticos a lo largo de este eje. Generalmente un exceso de RA posterioriza, es decir, que estructuras anteriores adquieren la identidad de estructuras más posteriores, mientras que deficiencias en RA, anterioriza (Figura 1.8) (Mark et al 2006, Ross et al 2000).

El RA es sintetizado endógenamente en dos pasos: el primero es una oxidación reversible de retinol a retinal llevado a cabo por enzimas alcohol deshidrogenasas (ADHs o RDHs/SDRs), y en segundo lugar el retinal es oxidado a RA, catalizado por retinaldehido deshidrogenasas (RALDHs). En cuanto a la degradación, esta se da por las enzimas CYP26. Los niveles de RA se regulan también gracias a proteínas con capacidad de mantener unido RA o algunos de los productos

de su ruta, como las proteínas de unión a retinol o a RA (CRBPs y CRABPs, de sus siglas en inglés) (Napoli 1999, Ross et al 2000). De todos los productos que participan en la ruta, ha sido demostrado que el RA es el único con un papel morfogénico en el desarrollo (Niederreither et al 2002). La señalización por RA es mediada mediante receptores de RA (RARs) que forman heterodímeros con receptores de retinoides X (RXRs), y estos se unen a los elementos de respuesta a RA (RAREs) situados en las regiones reguladoras de los genes diana. Entre estos genes diana, se encuentran los genes *Hox* (Balmer y Blomhoff 2002), cuya expresión es regulada por RA no sólo en el SNC sino también en las células de la cresta neural, epidermis y estructuras derivadas del mesodermo o el endodermo a lo largo del eje A-P. En el SNC una alteración de los niveles de RA produce variaciones en los límites anteriores de expresión de los *Hox*, de modo que un exceso de RA expande rostralmente dicha expresión, y un decrecimiento la contrae caudalmente. Se cree que estos cambios de expresión son la causa de la posteriorización de estructuras anteriores, como la ausencia de cerebro anterior y la expansión de la espina dorsal y el rombencéfalo (Maden 2002, Mark et al 2004). El destino de las diferentes poblaciones de células de la cresta neural se cree que depende del código *Hox* establecido en cada una de ellas (Trainor y Krumlauf 2000), y la regulación de dicho código *Hox* se da por un sistema que incluye el RA y miembros de la vía Wnt (Ishikawa y Ito 2009). Además, el RA está involucrado en la regulación de la segmentación del mesodermo (Moreno y Kintner 2004) donde niveles anormales de RA producen fallos en el patrón mesodérmico (Abu-Abed et al 2001, Niederreither et al 1999, Sakai et al 2001). Una correcta distribución de RA en el mesodermo presomítico es crucial para la correcta regulación de los genes *Hox*, ya que también se producen fallos en el patrón A-P debido a expresiones alteradas de los genes *Hox* (Kessel y Gruss 1991, Lohnes et al 1993). También el patrón A-P de los derivados endodérmicos como el tracto digestivo o el endodermo faríngeo está regulado por los niveles de RA, a través de los genes *Hox* entre otros factores (Bayha et al 2009).

En el anfibio, se ha comprobado que el RA es responsable del patrón del eje A-P, ya que tratamientos con RA producen la posteriorización de estructuras como la faringe, cuyo límite posterior se hace más rostral, y se pierden estructuras anteriores como la boca (Escriva et al 2002), y además los límites anteriores de los genes *Hox1*, *2*, *3*, *4* y *6* se hacen más rostrales (Schubert et al 2004, Schubert et al 2006). Tratamientos con un antagonista produce el efecto contrario (Schubert et al 2004, Schubert et al 2006). Se ha comprobado que el papel del RA en el patrón A-P, como en vertebrados, se da a través de la regulación transcripcional de estos genes, ya que una pérdida de función de *Hox1* produce una expansión de la faringe, expandiéndose caudalmente la expresión de este gen en el tercio medio del endodermo, como en el tratamiento con antagonistas (Schubert et al 2005). Los tratamientos con RA y un antagonista de RA de embriones de anfibio no sólo afectan al SNC, sino al papel clave que desempeñan los *Hox* en el establecimiento temprano del patrón A-P a través en la gastrulación (Koop et al 2010).

El papel del sistema RA-*Hox* en el patrón del eje A-P en urocordados no está totalmente claro. Los tratamientos con RA afectan la formación del tubo nervioso y la faringe pero no parece tratarse de una alteración del patrón A-P debido a una transformación homeótica, sino más bien un fallo en la organogénesis (Cañestro y Postlethwait 2007, Hinman y Degnan 1998, Hinman y Degnan 2000, Nagatomo y Fujiwara 2003, Yagi y Makabe 2002). Sin embargo, la expresión del gen *Hox1* se expande anteriormente tanto en el SNC como en la epidermis de embriones de la ascidia *Halocynthia roretzi* en tratamientos con RA (Katsuyama et al 1995) y se ha demostrado que la expresión ectodérmica de *Hox1* en *C. intestinalis* está directamente regulada por RA mediante heterodímeros RAR/RXR (Kanda et al 2009). La larvacea *O. dioica* desarrolla un patrón A-P de cordado independientemente del RA y que no posee los genes necesarios para las enzimas de la síntesis de éste (Cañestro y Postlethwait 2007). La pérdida del sistema RA-*Hox* para el control del patrón A-P en urocordados puede estar asociado a la ruptura del clúster *Hox* en este grupo y la pérdida de la colinearidad temporal (Cañestro y Postlethwait 2007).

## SECUENCIAS NO-CODIFICANTES CONSERVADAS

Ya que los genes que controlan el desarrollo están fuertemente conservados entre especies muy divergentes (Slack et al 1993), se piensa que los cambios morfológicos del plan corporal de los animales durante la evolución se producen por cambios en las redes de regulación de estos genes (Carroll et al 2001, Levine y Davidson 2005). Para detectar estos cambios es crucial identificar los elementos no codificantes clave de estas redes de regulación y sus respectivas interacciones en diferentes especies. Estas regiones genómicas no codificantes importantes en el control de la forma y la función se han llegado a denominar “la materia negra” de los genomas, e incluyen sobre todo elementos reguladores en *cis* (Gibson y Dworkin 2004). Las diferencias entre dichas regiones reguladoras pueden llevar a variaciones en los patrones espacio-temporales, produciéndose cambios morfológicos (Amemiya y Gomez-Chiarri 2006).

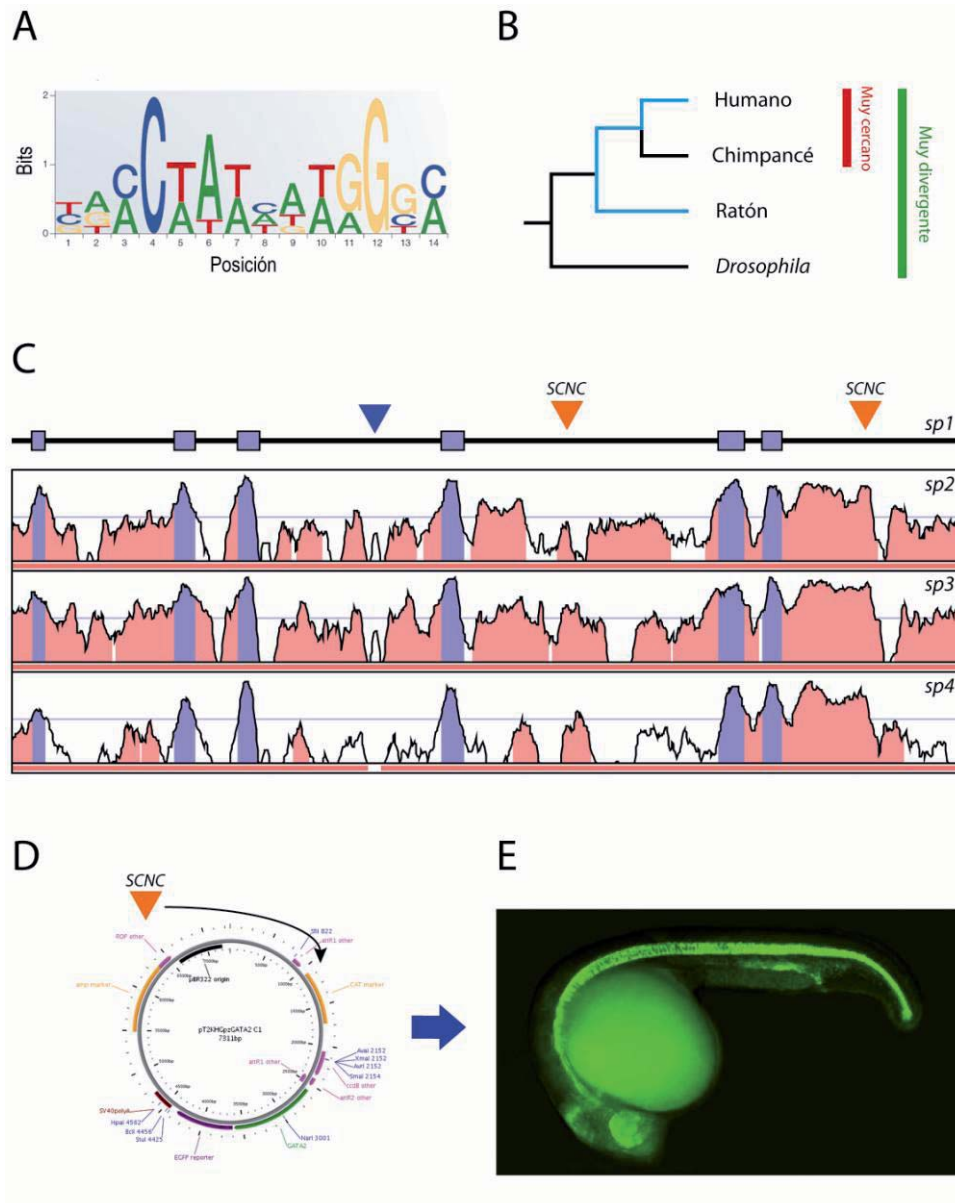
Estos elementos pueden ser identificados *in silico*. El objetivo último de las búsquedas *in silico* es determinar la posición de las secuencias de unión a factores de transcripción (u otros tipos de secuencias) que regulen el patrón de expresión de los genes de interés. La manera más simple es la de usar modelos de motivos conocidos para un único factor de transcripción (Gómez-Skarmeta et al 2006), basados en datos experimentales de diferentes laboratorios y que se basan en la generación de ‘matrices por peso de posición’ (Position Weight Matrix) y logos de secuencias (Figura 1.9A) (revisado en (Wasserman y Sandelin 2004). El uso de modelos de motivos conocidos para buscar sitios de unión funciona razonablemente bien para cortas regiones de regulación en las que uno sabe más o menos lo que buscar. En ausencia de esta información, por azar, en una secuencia compleja como un genoma es posible encontrar en incontable número de ocasiones una caja de unión

descrita en estos modelos, debido a la corta secuencia que caracteriza el núcleo de estas uniones. Por ejemplo, dependiendo del modelo y de los parámetros de aplicación, puede predecirse un lugar de unión para un factor de transcripción particular cada 500-5000 pb, lo que para el genoma humano serían aproximadamente  $10^6$  sitios de unión, de los que dependiendo también del factor en cuestión, sólo aproximadamente  $10^3$  serían ciertas. Esto implica que la mayoría de las predicciones serían falsas, lo que Wasserman y Sandelin (2004) han denominado 'Teorema de la Futilidad' de los programas de predicción. Sin embargo, aunque estas predicciones sean funcionalmente falsas se ha demostrado que estos factores de transcripción pueden unirse *in vitro* a esas secuencias (Tronche et al 1997).

Sin embargo, si tenemos en mente la asunción de que las partes no codificantes funcionalmente importantes tienen una tasa de cambio menor que las secuencias no codificantes no funcionales, la localización de zonas conservadas podría estrechar el rango en el que buscar elementos reguladores. Esta idea es la que subyace bajo lo que se denomina '*footprinting*' filogenético (Figura 8) (Wasserman et al 2000): podemos usar las secuencias ortólogas de distintas especies para buscar estas zonas. Este tipo de estrategia permite reducir muchísimo el ratio 'ruido de fondo'/'señal' que se encontraría al analizar por ejemplo genomas enteros (Wasserman y Sandelin 2004). Hay tres componentes importantes en los algoritmos de los programas de '*footprinting*' filogenético: definir las secuencias ortólogas adecuadas (Figura I.9B) (especies y distancia filogenética), alinear las secuencias promotoras de esos genes ortólogos e identificar y visualizar los segmentos conservados significativamente (Wasserman y Sandelin 2004). Una vez definidas las secuencias ortólogas, se alinean de forma global pero buscando pequeños alineamientos locales óptimos, como en el caso de los programas LAGAN, cuya extensión shuffle-LAGAN (Brudno et al 2003) permite detectar estas zonas conservadas aunque hayan sufrido reorganizaciones, tales como inversiones, dejando de lado la asunción de que las secuencias funcionalmente importantes se hayan mantenido en el mismo orden y orientación durante la evolución. Una vez el alineamiento se ha definido, hay que visualizarlo, y para ello existen varios programas, y uno de ellos es el mVISTA (Frazer et al 2004) que permite usar múltiples secuencias, alineándolas de dos en dos y visualizando siempre los alineamientos usando como base la misma secuencia (Figura I.9C).

En el caso de los genes *Hox*, experimentalmente se ha descrito que las regiones no codificantes alrededor de los genes *BfHox1*, *BfHox2* y *BfHox3* de *B. floridae* pueden dirigir la expresión en crestas neurales y placodas en ratón y pollo (Manzanares et al 2000, Wada et al 2006), lo cual implica que los elementos reguladores para dirigir la expresión en estas estructuras ya se encontraban en el ancestro de anfibio (que carece de crestas neurales) y vertebrados: estas regiones se cooptaron en vertebrados y anfibio hacia distintas funciones. Estos datos nos indican que buscar las zonas no codificantes conservadas entre anfibio y vertebrados nos permitirían identificar elementos que estén ya presentes en anfibio y que dirigen la expresión en estructuras de vertebrados de las que carecen los cefalocordados. Se han identificado mediante comparaciones de secuencias de humano,

tiburón y pez zebra varios elementos reguladores conservados en el clúster HoxA (Chiu et al 2004, Prohaska et al 2004, Santini et al 2003). También mediante la comparación de



**Figura I.9.** Esquema que muestra los pasos de un análisis de ‘*phylogenetic footprinting*’. (A) muestra un logo de secuencia de unión de un factor de transcripción, que presenta cada nucleótido en una escala según el total de bits de información multiplicado por la ocurrencia relativa de cada nucleótido en cada posición. Este tipo de logos permite ver las características del patrón de la secuencia de unión de un factor de forma rápida y visual. Sin embargo, estas secuencias son muy cortas y pueden ocurrir por azar en multitud de ocasiones en los genomas. El phylogenetic footprinting trata de buscar regiones conservadas entre especies a una distancia evolutiva adecuada (B), puesto que especies que han divergido hace poco presentarán muy pocas diferencias siendo poco informativo, y las muy lejanas demasiadas diferencias como para encontrar conservación. Una vez obtenidas las secuencias genómicas alrededor del gen de interés, se alinean y se puede observar el grado de conservación mediante una serie de gráficos que representan el porcentaje de identidad de una ventana de nucleótidos determinada a lo largo de nuestra secuencia (C). En rosa las regiones intergénicas, y en morado, las exónicas. De este modo, podemos



identificar las secuencias de unión de factores de transcripción conservadas (triángulos naranjas) de las no conservadas (triángulo azul). Éstas secuencias conservadas no-codificantes (SCNC) pueden clonarse en vectores reporter (D) para análisis mediante transgénesis en embriones de pez cebra para ver si son funcionales (E).

secuencias de partes del clúster HoxB (Hadrys et al 2004, Marshall et al 1994), y HoxC (Geada et al 1996, Wang et al 2004) y del *cluster* HoxD (Nolte et al 2003). El primer trabajo que incluye los 4 clústeres completos e incluso los 7 del pez globo, *Fugu rubripes*, es el de (Lee et al 2006) que incluye además las regiones adyacentes.

Por tanto, la comparación del clúster de anfibio con los diferentes clústeres de vertebrados nos ayudaría a entender qué elementos de regulación podrían haber estado presentes en el ancestro de los cordados, y cómo procesos como la subfuncionalización esculpieron el sistema regulador de los complejos *Hox* después de las duplicaciones genómicas acontecidas durante la evolución del linaje de los vertebrados.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Abi-Rached L, Gilles A, Shiina T, Pontarotti P, Inoko H. 2002. Evidence of en bloc duplication in vertebrate genomes. *Nat. Genet.* 31: 100-5
- Abu-Abed S, Dolle P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. 2001. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev.* 15: 226-40
- Acampora D, D'Esposito M, Faiella A, Pannese M, Migliaccio E, et al. 1989. The human HOX gene family. *Nucleic Acids Res.* 17: 10385-402
- Ahn D, Ho RK. 2008. Tri-phasic expression of posterior *Hox* genes during development of pectoral fins in zebrafish: implications for the evolution of vertebrate paired appendages. *Dev. Biol.* 322: 220-33
- Alexander T, Nolte C, Krumlauf R. 2009. *Hox* genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 25: 431-56
- Allendorf FW, Stahl G, Ryman N. 1984. Silencing of duplicate genes: a null allele polymorphism for lactate dehydrogenase in brown trout (*Salmo trutta*). *Mol. Biol. Evol.* 1: 238-48
- Amemiya CT, Gomez-Chiarri M. 2006. Comparative genomics in vertebrate evolution and development. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 305: 672-82
- Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, et al. 1998. Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282: 1711-4
- Amores A, Suzuki T, Yan YL, Pomeroy J, Singer A, et al. 2004. Developmental roles of pufferfish *Hox* clusters and genome evolution in ray-fin fish. *Genome Res.* 14: 1-10
- Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia JM, et al. 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297: 1301-10
- Arenas-Mena C, Cameron AR, Davidson EH. 2000. Spatial expression of *Hox* cluster genes in the ontogeny of a sea urchin. *Development* 127: 4631-43
- Aronowicz J, Lowe CJ. 2006. *Hox* gene expression in the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii* and the evolution of deuterostome nervous systems. *Integr. Comp. Biol.* 46: 890-901
- Averof M, Patel NH. 1997. Crustacean appendage evolution associated with changes in *Hox* gene expression. *Nature* 388: 682-6
- Balmer JE, Blomhoff R. 2002. Gene expression regulation by retinoic acid. *J. Lipid Res.* 43: 1773-808
- Banerjee-Basu S, Baxeavanis AD. 2001. Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 29: 3258-69
- Bayha E, Jørgensen MC, Serup P, Grapin-Botton A. 2009. Retinoic acid signaling organizes endodermal organ specification along the entire antero-posterior axis. *PLoS ONE* 4: e5845

- Blair JE, Hedges SB. 2005. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Mol. Biol. Evol.* 22: 2275-84
- Bourlat SJ, Juliusdottir T, Lowe CJ, Freeman R, Aronowicz J, et al. 2006. Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. *Nature* 444: 85-8
- Bourlat SJ, Nielsen C, Lockyer AE, Littlewood DT, Telford MJ. 2003. *Xenoturbella* is a deuterostome that eats molluscs. *Nature* 424: 925-8
- Brandenburg J, Kümmel G. 1961. Die Feinstruktur der Solenocyten. *J. Ultrastruct. Res.* 5: 437-52
- Brudno M, Do CB, Cooper GM, Kim MF, Davydov E, et al. 2003. LAGAN and Multi-LAGAN: efficient tools for large-scale multiple alignment of genomic DNA. *Genome Res.* 13: 721-31
- Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. 1995. *Hox* genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* 121: 333-46
- Cameron RA, Rowen L, Nesbitt R, Bloom S, Rast JP, et al. 2006. Unusual gene order and organization of the sea urchin *Hox* cluster. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 306: 45-58
- Cañestro C, Postlethwait JH. 2007. Development of a chordate anterior-posterior axis without classical retinoic acid signaling. *Dev. Biol.* 305: 522-38
- Carroll SB, Grenier JK, Weatherbee SD. 2001. *From DNA to Diversity. Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design*. Malden: Blackwell Science
- Cerfontaine P. 1906. Recherches sur le développement de l'Amphioxus. *Arch. de Biol.*, T. 22.
- Chambers KE, McDaniell R, Raincrow JD, Deshmukh M, Stadler PF, Chiu CH. 2009. *Hox* cluster duplication in the basal teleost *Hiodon alosoides* (Osteoglossomorpha). *Theory Biosci.* 128: 109-20
- Chiu CH, Dewar K, Wagner GP, Takahashi K, Ruddle F, et al. 2004. Bichir *HoxA* cluster sequence reveals surprising trends in ray-finned fish genomic evolution. *Genome Res.* 14: 11-7
- Cohn MJ, Tickle C. 1999. Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. *Nature* 399: 474-9
- Conklin EG. 1932. The embryology of amphioxus. *J. Morphol.* 54, 69-151.
- Consortium SUGS, Sodergren E, Weinstock GM, Davidson EH, Cameron RA, et al. 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314: 941-52
- Costa OG. 1834. Cenni zoologici, ossia descrizione delle specie nuove di animali discoperti in diverse contrade del regno nell'anno 1834. *Annuario Zoologico* 1834; 12:49.
- Crow KD, Stadler PF, Lynch VJ, Amemiya C, Wagner GP. 2006. The "fish-specific" *Hox* cluster duplication is coincident with the origin of teleosts. *Mol. Biol. Evol.* 23: 121-36
- D'Aniello S, Garcia-Fernandez J. 2007. D-aspartic acid and L-amino acids in the neural system of the amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. *Amino Acids* 32: 21-6
- D'Aniello S, Irimia M, Maeso I, Pascual-Anaya J, Jiménez-Delgado S, et al. 2008. Gene expansion and retention leads to a diverse tyrosine kinase superfamily in amphioxus. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1841-54
- Davis A, Scemama JL, Stellwag EJ. 2008. Japanese medaka *Hox* paralog group 2: insights into the evolution of *Hox* PG2 gene composition and expression in the Osteichthyes. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 310: 623-41
- Davis MC, Dahn RD, Shubin NH. 2007. An autopodial-like pattern of *Hox* expression in the fins of a basal actinopterygian fish. *Nature* 447: 473-6
- de Rosa R, Grenier JK, Andreeva T, Cook CE, Adoutte A, et al. 1999. *Hox* genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature* 399: 772-6
- Dehal P, Boore JL. 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol.* 3: e314
- Dehal P, Satou Y, Campbell RK, Chapman J, Degnan B, et al. 2002. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298: 2157-67
- Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H. 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439: 965-8
- Deschamps J, van Nes J. 2005. Developmental regulation of the *Hox* genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development* 132: 2931-42
- Di-Poi N, Montoya-Burgos JI, Duboule D. 2009. Atypical relaxation of structural constraints in *Hox* gene clusters of the green anole lizard. *Genome Res.* 19: 602-10
- Di-Poi N, Zakany J, Duboule D. 2007. Distinct roles and regulations for *HoxD* genes in metanephric kidney development. *PLoS Genet.* 3: e232
- Di Bernardo M, Russo R, Oliveri P, Melfi R, Spinelli G. 1994. Expression of homeobox-containing genes in the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) embryo. *Genetica* 94: 141-50



- Dolecki GJ, Wannakraioj S, Lum R, Wang G, Riley HD, et al. 1986. Stage-specific expression of a homeobox-containing gene in the non-segmented sea urchin embryo. *EMBO J.* 5: 925-30
- Dollé P, Izpisua-Belmonte JC, Brown JM, Tickle C, Duboule D. 1991. *Hox-4* genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. *Genes Dev.* 5: 1767-7
- Duboule D. 1994. Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Dev. Suppl.*: 135-42
- Duboule D. 2007. The rise and fall of *Hox* gene clusters. *Development* 134: 2549-60
- Duboule D, Dollé P. 1989. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* 8: 1497-505
- Dunn CW, Hejnal A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, et al. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452: 745-9
- Escriva H, Holland ND, Gronemeyer H, Laudet V, Holland LZ. 2002. The retinoic acid signaling pathway regulates anterior/posterior patterning in the nerve cord and pharynx of amphioxus, a chordate lacking neural crest. *Development* 129: 2905-16
- Ferrier DE, Holland PWH. 2002. *Ciona intestinalis* *ParaHox* genes: evolution of *Hox/ParaHox* cluster integrity, developmental mode, and temporal colinearity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 24: 412-7
- Ferrier DEK. 2004. Hox genes: Did the vertebrate ancestor have a Hox14? *Curr Biol* 14: R210-1
- Ferrier DEK, Minguillon C, Holland PWH, Garcia-Fernandez J. 2000. The amphioxus Hox cluster: deuterostome posterior flexibility and Hox14. *Evol Dev* 2: 284-93
- Force A, Amores A, Postlethwait JH. 2002. *Hox* cluster organization in the jawless vertebrate *Petromyzon marinus*. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 294: 30-46
- Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I. 2004. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 32: W273-9
- Freeman RM, Jr., Wu M, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH, Gruber CE, et al. 2008. cDNA sequences for transcription factors and signaling proteins of the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii*: efficacy of the expressed sequence tag (EST) approach for evolutionary and developmental studies of a new organism. *Biol. Bull.* 214: 284-302
- Freitas R, Zhang G, Cohn MJ. 2006. Evidence that mechanisms of fin development evolved in the midline of early vertebrates. *Nature* 442: 1033-7
- Freitas R, Zhang G, Cohn MJ. 2007. Biphasic *Hoxd* gene expression in shark paired fins reveals an ancient origin of the distal limb domain. *PLoS ONE* 2: e754
- Fried C, Prohaska SJ, Stadler PF. 2003. Independent *Hox*-cluster duplications in lampreys. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 299: 18-25
- Fritzschn G, Böhme MU, Thorndyke M, Nakano H, Israelsson O, et al. 2008. PCR survey of *Xenoturbella bocki* *Hox* genes. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 310: 278-84
- Fuentes M, Benito È, Bertrand S, Paris M, Mignardot A, et al. 2007. Insights into spawning behavior and development of the european amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *J Exp Zoolog B Mol Dev Evol* 308B: 484-93
- Fuentes M, Schubert M, Dalfo D, Candiani S, Benito E, et al. 2004. Preliminary observations on the spawning conditions of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) in captivity. *J Exp Zoolog B Mol Dev Evol* 302B: 384-91
- Furlong RF, Holland PW. 2002. Bayesian phylogenetic analysis supports monophyly of ambulacraria and of cyclostomes. *Zoolog. Sci.* 19: 593-9
- Garcia-Fernandez J. 2005a. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat. Rev. Genet.* 6: 881-92
- Garcia-Fernandez J. 2005b. Hox, ParaHox, ProtoHox: facts and guesses. *Heredity* 94: 145-52
- Garcia-Fernandez J, Holland PWH. 1994. Archetypal organization of the amphioxus Hox gene cluster. *Nature* 370: 563-6
- Garcia-Fernandez J, Jiménez-Delgado S, Pascual-Anaya J, Maeso I, Irimia M, et al. 2009. From the American to the European amphioxus: towards experimental Evo-Devo at the origin of chordates. *Int. J. Dev. Biol.* 53: 1359-66
- Gaunt SJ. 1994. Conservation in the *Hox* code during morphological evolution. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 549-52
- Geadam AM, Coletta PL, Sharpe PT. 1996. Characterization of the murine *Hoxc-5* gene. *Mamm. Genome* 7: 81-4
- Gee H. 1994. Vertebrate morphology. Return of the amphioxus. *Nature* 370: 504-5
- Gibson G, Dworkin I. 2004. Uncovering cryptic genetic variation. *Nat. Rev. Genet.* 5: 681-90
- Gionti M, Ristoratore F, Di Gregorio A, Aniello F, Branno M, Di Lauro R. 1998. *Cihox5*, a new *Ciona intestinalis* *Hox*-related gene, is involved in regionalization of the spinal cord. *Dev. Genes Evol.* 207: 515-23

- Gómez-Skarmeta JL, Lenhard B, Becker TS. 2006. New technologies, new findings, and new concepts in the study of vertebrate *cis*-regulatory sequences. *Dev. Dyn.* 235: 870-85
- Goodrich ES. 1902. On the structure of the excretory organs of amphioxus. *Q. J. microsc. Sci* 45: 493-501
- Goodrich ES. 1909. On the structure of the excretory organs of amphioxus. Part 2 - The nephridium in the adult. Part 3 - Hatschek's nephridium. Part 4 - The nephridium in the larva. *Q. J. microsc. Sci* 54: 185-205
- Grapin-Botton A, Bonnin MA, McNaughton LA, Krumlauf R, Le Douarin NM. 1995. Plasticity of transposed rhombomeres: *Hox* gene induction is correlated with phenotypic modifications. *Development* 121: 2707-21
- Grapin-Botton A, Melton DA. 2000. Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet.* 16: 124-30
- Guo B, Gan X, He S. 2009. *Hox* genes of the Japanese eel *Anguilla japonica* and *Hox* cluster evolution in teleosts. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 314B: 135-47
- Hadrys T, Prince V, Hunter M, Baker R, Rinkwitz S. 2004. Comparative genomic analysis of vertebrate *Hox3* and *Hox4* genes. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 302: 147-64
- Hara Y, Yamaguchi M, Akasaka K, Nakano H, Nonaka M, Amemiya S. 2006. Expression patterns of *Hox* genes in larvae of the sea lily *Metacrinus rotundus*. *Dev. Genes Evol.* 216: 797-809
- Hartenstein V. 2006. Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 22: 677-712
- Hatschek B. 1893. The amphioxus and its development. Swan Sonnenschein and Co., London.
- Hejnol A, Obst M, Stamatakis A, Ott M, Rouse GW, et al. 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc. Biol. Sci.* 276: 4261-70
- Hinman VF, Degnan BM. 1998. Retinoic acid disrupts anterior ectodermal and endodermal development in ascidian larvae and postlarvae. *Dev. Genes Evol.* 208: 336-45
- Hinman VF, Degnan BM. 2000. Retinoic acid perturbs *Otx* gene expression in the ascidian pharynx. *Dev. Genes Evol.* 210: 129-39
- Hoegg S, Boore JL, Kuehl JV, Meyer A. 2007. Comparative phylogenomic analyses of teleost fish *Hox* gene clusters: lessons from the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *BMC Genomics* 8: 317
- Hoegg S, Brinkmann H, Taylor JS, Meyer A. 2004. Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J. Mol. Evol.* 59: 190-203
- Hoegg S, Meyer A. 2005. *Hox* clusters as models for vertebrate genome evolution. *Trends Genet.* 21: 421-4
- Holland LZ, Albalat R, Azumi K, Benito-Gutierrez E, Blow MJ, et al. 2008. The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res* 18: 1100-11
- Holland LZ, Yu J-K. 2004. Cephalochordate (amphioxus) embryos: procurement, culture, and basic methods. *Methods Cell. Biol.* 74: 195-215
- Holland ND and Holland LZ. 1999. Amphioxus and the utility of molecular genetic data for hypothesizing body part homologies between distantly related animals. *Amer. Zool.* 39, 630-640.
- Holland ND, Venkatesh TV, Holland LZ, Jacobs DK, Bodmer R. 2003. *AmphiNk2-tin*, an amphioxus homeobox gene expressed in myocardial progenitors: insights into evolution of the vertebrate heart. *Dev. Biol.* 255: 128-37
- Holland PWH, Garcia-Fernández J, Williams NA, Sidow A. 1994. Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Dev. Suppl.*: 125-33
- Holland PWH, Holland LZ, Williams NA, Holland ND. 1992. An amphioxus homeobox gene: sequence conservation, spatial expression during development and insights into vertebrate evolution. *Development* 116: 653-61
- Ikuta T, Miyamoto N, Saito Y, Wada H, Satoh N, Saiga H. 2009. Ambulacrarian prototypical *Hox* and *Parahox* gene complements of the indirect-developing hemichordate *Balanoglossus simodensis*. *Dev. Genes Evol.* 219: 383-9
- Ikuta T, Saiga H. 2005. Organization of *Hox* genes in ascidians: present, past, and future. *Dev. Dyn.* 233: 382-9
- Ikuta T, Yoshida N, Satoh N, Saiga H. 2004. *Ciona intestinalis Hox* gene cluster: Its dispersed structure and residual colinear expression in development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15118-23
- Irvine SQ, Carr JL, Bailey WJ, Kawasaki K, Shimizu N, et al. 2002. Genomic analysis of *Hox* clusters in the sea lamprey *Petromyzon marinus*. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 294: 47-62
- Ishikawa S, Ito K. 2009. Plasticity and regulatory mechanisms of *Hox* gene expression in mouse neural crest cells. *Cell Tissue Res.* 337: 381-91
- Israelsson O. 2006. Observations on some unusual cell types in the enigmatic worm *Xenoturbella* (phylum uncertain). *Tissue Cell* 38: 233-42

- Israelsson O, Budd GE. 2005. Eggs and embryos in *Xenoturbella* (phylum uncertain) are not ingested prey. *Dev. Genes Evol.* 215: 358-63
- Izpisúa-Belmonte JC, Falkenstein H, Dollé P, Renucci A, Duboule D. 1991. Murine genes related to the *Drosophila AbdB* homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J.* 10: 2279-89
- Jaillon O, Aury JM, Brunet F, Petit JL, Stange-Thomann N, et al. 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431: 946-57
- Jefferies RPS. 1986. *The Ancestry of the Vertebrates*. London: British Museum Natural History
- Kanda M, Wada H, Fujiwara S. 2009. Epidermal expression of *Hox1* is directly activated by retinoic acid in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev Biol* 335: 454-63
- Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, et al. 2007. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447: 714-9
- Katsuyama Y, Wada S, Yasugi S, Saiga H. 1995. Expression of the labial group *Hox* gene *HrHox-1* and its alteration induced by retinoic acid in development of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development* 121: 3197-205
- Kessel M, Gruss P. 1991. Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of *Hox* codes induced by retinoic acid. *Cell* 67: 89-104
- Kim CB, Amemiya C, Bailey W, Kawasaki K, Mezey J, et al. 2000. *Hox* cluster genomics in the horn shark, *Heterodontus francisci*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 1655-60
- Kmita M, Duboule D. 2003. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* 301: 331-3
- Koentges G, Matsuoka T. 2002. Evolution. Jaws of the fates. *Science* 298: 371-3
- Koh EG, Lam K, Christoffels A, Erdmann MV, Brenner S, Venkatesh B. 2003. *Hox* gene clusters in the Indonesian coelacanth, *Latimeria menadoensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 1084-8
- Kon T, Nohara M, Nishida M, Sterrer W, Nishikawa T. 2006. Hidden ancient diversification in the circumtropical lancelet *Asymmetron lucayanum* complex. *Mar. Biol.* 149: 875-83
- Kon T, Nohara M, Yamanoue Y, Fujiwara Y, Nishida M, Nishikawa T. 2007. Phylogenetic position of a whale-fall lancelet (Cephalochordata) inferred from whole mitochondrial genome sequences. *BMC Evolutionary Biology* 7: 127
- Koop D, Holland ND, Semon M, Alvarez S, de Lera AR, et al. 2010. Retinoic acid signaling targets *Hox* genes during the amphioxus gastrula stage: insights into early anterior-posterior patterning of the chordate body plan. *Dev. Biol.* 338: 98-106
- Kowalevsky A. 1867. Entwicklungsgeschichte des Amphioxus lanceolatus. *Mém. Acad. Sci. St. Petersb.* 11, 1-17.
- Kučera T, Strilić B, Regener K, Schubert M, Laudet V, Lammert E. 2009. Ancestral vascular lumen formation via basal cell surfaces. *PLoS One* 4: e4132
- Kuraku S, Hoshiyama D, Katoh K, Suga H, Miyata T. 1999. Monophyly of lampreys and hagfishes supported by nuclear DNA-coded genes. *J. Mol. Evol.* 49: 729-35
- Kuraku S, Kuratani S. 2006. Time scale for cyclostome evolution inferred with a phylogenetic diagnosis of hagfish and lamprey cDNA sequences. *Zoolog. Sci.* 23: 1053-64
- Kuraku S, Takio Y, Tamura K, Aono H, Meyer A, Kuratani S. 2008. Noncanonical role of *Hox14* revealed by its expression patterns in lamprey and shark. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 0710947105
- Kurosawa G, Takamatsu N, Takahashi M, Sumitomo M, Sanaka E, et al. 2006. Organization and structure of *hox* gene loci in medaka genome and comparison with those of pufferfish and zebrafish genomes. *Gene* 370: 75-82
- Ladjali-Mohammedi K, Grapin-Botton A, Bonnini MA, Le Douarin NM. 2001. Distribution of HOX genes in the chicken genome reveals a new segment of conservation between human and chicken. *Cytogenet. Cell. Genet.* 92: 157-61
- Le Douarin N, Kalcheim C. 1999. *The Neural Crest*. New York: Cambridge University Press.
- Le Pabic P, Stellwag EJ, Brothers SN, Scemama JL. 2007. Comparative analysis of *Hox* paralog group 2 gene expression during Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) embryonic development. *Dev. Genes Evol.* 217: 749-58
- Ledje C, Kim CB, Ruddle FH. 2002. Characterization of *Hox* genes in the bichir, *Polypterus palmas*. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 294: 107-11
- Lee AP, Koh EG, Tay A, Brenner S, Venkatesh B. 2006. Highly conserved syntenic blocks at the vertebrate *Hox* loci and conserved regulatory elements within and outside *Hox* gene clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 6994-9

- Lemaire P, Bertrand V, Hudson C. 2002. Early steps in the formation of neural tissue in ascidian embryos. *Dev. Biol.* 252: 151-69
- Lemons D, McGinnis W. 2006. Genomic evolution of *Hox* gene clusters. *Science* 313: 1918-22
- Levine M, Davidson EH. 2005. Gene regulatory networks for development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 4936-42
- Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276: 565-70
- Locascio A, Aniello F, Amoroso A, Manzanares M, Krumlauf R, Branno M. 1999. Patterning the ascidian nervous system: structure, expression and transgenic analysis of the *CiHox3* gene. *Development* 126: 4737-48
- Lohnes D, Kastner P, Dierich A, Mark M, LeMeur M, Chambon P. 1993. Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* 73: 643-58
- Long S, Martinez P, Chen WC, Thorndyke M, Byrne M. 2003. Evolution of echinoderms may not have required modification of the ancestral deuterostome HOX gene cluster: first report of PG4 and PG5 Hox orthologues in echinoderms. *Dev. Genes Evol.* 213: 573-6
- Longhurst TJ, Joss JM. 1999. Homeobox genes in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 285: 140-5
- Lowe CJ, Wu M, Salic A, Evans L, Lander E, et al. 2003. Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* 113: 853-65
- Lumsden A. 2004. Segmentation and compartment in the early avian hindbrain. *Mech. Dev.* 121: 1081-8
- Lumsden A, Krumlauf R. 1996. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274: 1109-15
- Lundin LG, Larhammar D, Hallbook F. 2003. Numerous groups of chromosomal regional paralogies strongly indicate two genome doublings at the root of the vertebrates. *J. Struct. Funct. Genomics* 3: 53-63
- Maden M. 2002. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 843-53
- Mansfield JH, Harfe BD, Nissen R, Obenauer J, Srineel J, et al. 2004. MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover *Hox*-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat. Genet.* 36: 1079-83
- Manzanares M, Bel-Vialar S, Ariza-McNaughton L, Ferretti E, Marshall H, et al. 2001. Independent regulation of initiation and maintenance phases of *Hoxa3* expression in the vertebrate hindbrain involve auto- and cross-regulatory mechanisms. *Development* 128: 3595-607
- Manzanares M, Wada H, Itasaki N, Trainor PA, Krumlauf R, Holland PW. 2000. Conservation and elaboration of *Hox* gene regulation during evolution of the vertebrate head. *Nature* 408: 854-7
- Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. 2004. Retinoic acid signalling in the development of branchial arches. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 591-8
- Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. 2006. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46: 451-80
- Marshall H, Studer M, Popperl H, Aparicio S, Kuroiwa A, et al. 1994. A conserved retinoic acid response element required for early expression of the *homeobox* gene *Hoxb-1*. *Nature* 370: 567-71
- Martinez P, Rast JP, Arenas-Mena C, Davidson EH. 1999. Organization of an echinoderm *Hox* gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 1469-74
- McGinnis W, Krumlauf R. 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68: 283-302
- McLysaght A, Hokamp K, Wolfe KH. 2002. Extensive genomic duplication during early chordate evolution. *Nat. Genet.* 31: 200-4
- Meinertzhagen IA, Okamura Y. 2001. The larval ascidian nervous system: the chordate brain from its small beginnings. *Trends Neurosci.* 24: 401-10
- Minguillón C. and Garcia-Fernández J. 2002. The single amphioxus *Mox* gene: insights into the functional evolution of *Mox* genes, somites, and the asymmetry of amphioxus somitogenesis. *Dev. Biol.* 246 (2): 455-65.
- Minguillón C, Garcia-Fernández J. 2003. Genesis and evolution of the *Evx* and *Mox* genes and the extended *Hox* and *ParaHox* gene clusters. *Genome Biol.* 4: R12
- Minguillón C, Gibson-Brown JJ, Logan MP. 2009. *Tbx4/5* gene duplication and the origin of vertebrate paired appendages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 21726-30
- Mito T, Endo K. 1997. A PCR survey of *Hox* genes in the sea star, *Asterina minor*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 8: 218-24



- Mito T, Endo K. 2000. PCR survey of *Hox* genes in the crinoid and ophiuroid: evidence for anterior conservation and posterior expansion in the echinoderm *Hox* gene cluster. *Mol. Phylogenet. Evol.* 14: 375-88
- Moens CB, Prince VE. 2002. Constructing the hindbrain: insights from the zebrafish. *Dev. Dyn.* 224: 1-17
- Moller PC, Ellis RA. 1974. Fine structure of the excretory system of amphioxus (*Branchiostoma floridae*) and its response to osmotic stress. *Cell Tissue Res.* 148: 1-9
- Moller PC, Philpott CW. 1973a. The circulatory system of amphioxus (*Branchiostoma floridae*). I. Morphology of the major vessels of the pharyngeal area. *J. Morphol.* 139: 389-406
- Moller PC, Philpott CW. 1973b. The circulatory system of amphioxus (*Branchiostoma floridae*). II. Uptake of exogenous proteins by endothelial cells. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 143: 135-41
- Moreno TA, Kintner C. 2004. Regulation of segmental patterning by retinoic acid signaling during *Xenopus* somitogenesis. *Dev. Cell* 6: 205-18
- Müller M, Affolter M, Leupin W, Otting G, Wüthrich K, Gehring WJ. 1988. Isolation and sequence-specific DNA binding of the *Antennapedia* homeodomain. *EMBO J.* 7: 4299-304
- Mungpakdee S, Seo HC, Angotzi AR, Dong X, Akalin A, Chourrout D. 2008. Differential evolution of the 13 Atlantic salmon *Hox* clusters. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1333-43
- Muñoz-Chápuli R, Carmona R, Guadix JA, Macias D, Pérez-Pomares JM. 2005. The origin of the endothelial cells: an evo-devo approach for the invertebrate/vertebrate transition of the circulatory system. *Evol. Dev.* 7: 351-8
- Murphy P, Davidson DR, Hill RE. 1989. Segment-specific expression of a homoeobox-containing gene in the mouse hindbrain. *Nature* 341: 156-9
- Murphy P, Hill RE. 1991. Expression of the mouse labial-like homeobox-containing genes, *Hox 2.9* and *Hox 1.6*, during segmentation of the hindbrain. *Development* 111: 61-74
- Nagatomo K, Fujiwara S. 2003. Expression of *Raldh2*, *Cyp26* and *Hox-1* in normal and retinoic acid-treated *Ciona intestinalis* embryos. *Gene Expr. Patterns* 3: 273-7
- Nakao T. 1965. The excretory organ of *Amphioxus (Branchiostoma) belcheri*. *J. Ultrastruct. Res.* 12: 1-12
- Napoli JL. 1999. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63: 139-88
- Nelsen OE. 1953. Comparative embryology of vertebrates. Mc-Graw Hill, New York.
- Nelson JS. 2006. *Fishes of the world*. New York: John Wiley y Sons
- Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. 1999. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat. Genet.* 21: 444-8
- Niederreither K, Vermot J, Fraulob V, Chambon P, Dolle P. 2002. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-independent patterns of retinoic acid synthesis in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 16111-6
- Nielsen SE, Bone Q, Bond P, Harper G. 2007. On particle filtration by amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 87: 983-9
- Nishida H. 2008. Development of the appendicularian *Oikopleura dioica*: culture, genome, and cell lineages. *Dev. Growth Differ.* 50 Suppl 1: S239-56
- Nishikawa T. 2004. A new deep-water lancelet (Cephalochordata) from off Cape Nomamisaki, SW Japan, with a proposal of the revised system recovering the genus *Asymmetron*. *Zoolog. Sci.* 21: 1131-6
- Nishikawa T, Nishida M. 1997. Problems in lancelet systematics. In *Advances in comparative endocrinology. Volume I*, ed. S Kawashima, S Kikuyama, pp. 241-6. Bologna: Monduzzi Editore
- Nolte C, Amores A, Nagy Kovacs E, Postlethwait J, Featherstone M. 2003. The role of a retinoic acid response element in establishing the anterior neural expression border of *Hoxd4* transgenes. *Mech. Dev.* 120: 325-35
- Ohno S. 1970. *Evolution by gene duplication*. New York: Springer-Verlag. 160 pp.
- Orton JH. 1913. The ciliary mechanisms on the gill and the mode of feeding in amphioxus, ascidians and *Salenomya togata*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 10: 19-49
- Otting G, Qian YQ, Billeter M, Muller M, Affolter M, et al. 1990. Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J.* 9: 3085-92
- Pallas PS. 1774. *Spicilegia zoologica, quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque comentariis illustrantur*. Berlin: GA Lange.
- Pascual-Anaya J, D'Aniello S. 2006. Free amino acids in the nervous system of the amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. A comparative study. *Int. J. Biol. Sci.* 2: 87-92

- Pasqualetti M, Diaz C, Renaud JS, Rijli FM, Glover JC. 2007. Fate-mapping the mammalian hindbrain: segmental origins of vestibular projection neurons assessed using rhombomere-specific *Hoxa2* enhancer elements in the mouse embryo. *J. Neurosci.* 27: 9670-81
- Pearson JC, Lemons D, McGinnis W. 2005. Modulating *Hox* gene functions during animal body patterning. *Nat. Rev. Genet.* 6: 893-904
- Pendleton JW, Nagai BK, Murtha MT, Ruddle FH. 1993. Expansion of the *Hox* gene family and the evolution of chordates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 6300-4
- Percival-Smith A, Muller M, Affolter M, Gehring WJ. 1990. The interaction with DNA of wild-type and mutant *fushi tarazu* homeodomains. *EMBO J.* 9: 3967-74
- Perseke M, Hankeln T, Weich B, Fritzscht G, Stadler PF, et al. 2007. The mitochondrial DNA of *Xenoturbella bocki*: genomic architecture and phylogenetic analysis. *Theory Biosci.* 126: 35-42
- Peterson KJ. 2004. Isolation of *Hox* and *Parahox* genes in the hemichordate *Ptychodera flava* and the evolution of deuterostome *Hox* genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 1208-15
- Pitera JE, Smith VV, Thorogood P, Milla PJ. 1999. Coordinated expression of 3' *hox* genes during murine embryonal gut development: an enteric *Hox* code. *Gastroenterology* 117: 1339-51
- Pollard SL, Holland PW. 2000. Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry. *Curr. Biol.* 10: 1059-62
- Popodi E, Kissinger JC, Andrews ME, Raff RA. 1996. Sea urchin *Hox* genes: insights into the ancestral *Hox* cluster. *Mol. Biol. Evol.* 13: 1078-86
- Popovici C, Leveugle M, Birnbaum D, Coulier F. 2001. Coparalogy: physical and functional clusterings in the human genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 362-70
- Poss SG, Boschung HT. 1996. Lancelets (Cephalochordata: Branchiostomatidae): How many species are valid? *Israel J. Zool.* 42: S13-S66
- Powers TP, Amemiya CT. 2004a. Evidence for a *Hox14* paralog group in vertebrates. *Curr. Biol.* 14: R183-4
- Powers TP, Amemiya CT. 2004b. Evolutionary plasticity of vertebrate *Hox* genes. *Curr. Genomics* 5: 459-72
- Presley R, Horder TJ., Slípka J. (1996). Lancelet development as evidence of ancestral chordate structure. *Isr. J. Zool.* 42, S-97-116.
- Prince V, Lumsden A. 1994. *Hoxa-2* expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development* 120: 911-23
- Prince VE, Joly L, Ekker M, Ho RK. 1998a. Zebrafish *hox* genes: genomic organization and modified colinear expression patterns in the trunk. *Development* 125: 407-20
- Prince VE, Moens CB, Kimmel CB, Ho RK. 1998b. Zebrafish *hox* genes: expression in the hindbrain region of wild-type and mutants of the segmentation gene, *valentino*. *Development* 125: 393-406
- Prohaska SJ, Fried C, Flamm C, Wagner GP, Stadler PF. 2004. Surveying phylogenetic footprints in large gene clusters: applications to *Hox* cluster duplications. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 581-604
- Putnam NH, Butts T, Ferrier DE, Furlong RF, Hellsten U, et al. 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453: 1064-71
- Rähr H. 1981. The ultrastructure of the blood vessels of *Branchiostoma lanceolatum* (Pallas) (Cephalochordata). *Zoomorphology* 97: 53-74
- Ravi V, Lam K, Tay BH, Tay A, Brenner S, Venkatesh B. 2009. Elephant shark (*Callorhynchus milii*) provides insights into the evolution of *Hox* gene clusters in gnathostomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 16327-32
- Rhodes CP, Ratcliffe NA, Rowley AF. 1982. Presence of coelomocytes in the primitive chordate amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *Science* 217: 263-5
- Richardson MK, Crooijmans RP, Groenen MA. 2007. Sequencing and genomic annotation of the chicken (*Gallus gallus*) *Hox* clusters, and mapping of evolutionarily conserved regions. *Cytogenet. Genome Res.* 117: 110-9
- Roberts DJ, Johnson RL, Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. 1995. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing *Bmp-4* and *Hox* genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* 121: 3163-74
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80: 1021-54
- Sakai Y, Meno C, Fujii H, Nishino J, Shiratori H, et al. 2001. The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev.* 15: 213-25

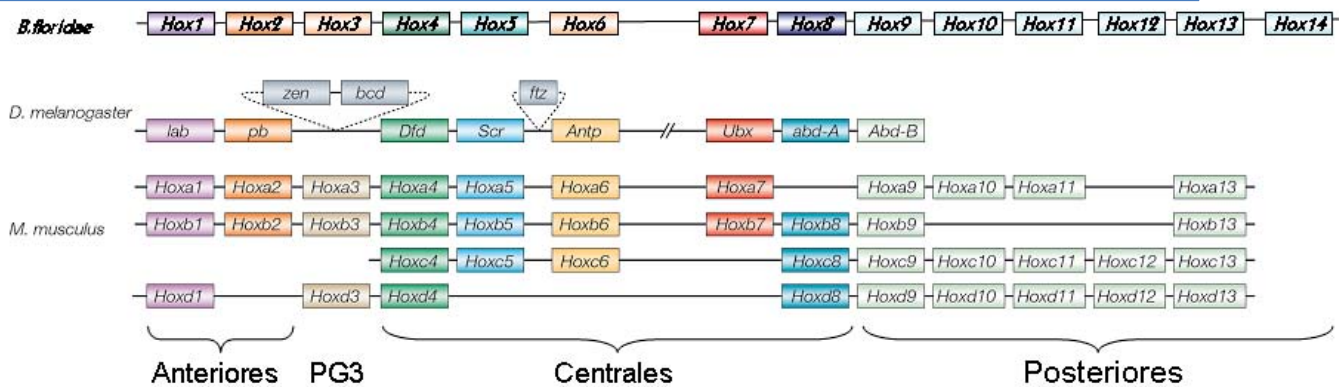
- Santini S, Bernardi G. 2005. Organization and base composition of tilapia *Hox* genes: implications for the evolution of *Hox* clusters in fish. *Gene* 346: 51-61
- Santini S, Boore JL, Meyer A. 2003. Evolutionary conservation of regulatory elements in vertebrate *Hox* gene clusters. *Genome Res.* 13: 1111-22
- Satoh N. 1994. *Developmental biology of ascidians*. New York: Cambridge University Press
- Satoh N. 2003. The ascidian tadpole larva: comparative molecular development and genomics. *Nat. Rev. Genet.* 4: 285-95
- Scemama JL, Hunter M, McCallum J, Prince V, Stellwag E. 2002. Evolutionary divergence of vertebrate *Hoxb2* expression patterns and transcriptional regulatory loci. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 294: 285-99
- Scemama JL, Vernon JL, Stellwag EJ. 2006. Differential expression of *hoxa2a* and *hoxa2b* genes during striped bass embryonic development. *Gene Expr. Patterns* 6: 843-8
- Schubert M, Holland ND, Escriva H, Holland LZ, Laudet V. 2004. Retinoic acid influences anteroposterior positioning of epidermal sensory neurons and their gene expression in a developing chordate (amphioxus). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 10320-5
- Schubert M, Holland ND, Laudet V, Holland LZ. 2006. A retinoic acid-*Hox* hierarchy controls both anterior/posterior patterning and neuronal specification in the developing central nervous system of the cephalochordate amphioxus. *Dev. Biol.* 296: 190-202
- Schubert M, Yu JK, Holland ND, Escriva H, Laudet V, Holland LZ. 2005. Retinoic acid signaling acts via *Hox1* to establish the posterior limit of the pharynx in the chordate amphioxus. *Development* 132: 61-73
- Sekimoto T, Yoshinobu K, Yoshida M, Kuratani S, Fujimoto S, et al. 1998. Region-specific expression of murine *Hox* genes implies the *Hox* code-mediated patterning of the digestive tract. *Genes Cells* 3: 51-64
- Seo H-C, Edvardsen RB, Maeland AD, Bjordal M, Jensen MF, et al. 2004. *Hox* cluster disintegration with persistent anteroposterior order of expression in *Oikopleura dioica*. *Nature* 431: 67-71
- Sharman AC, Holland PW. 1998. Estimation of *Hox* gene cluster number in lampreys. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 617-20
- Slack JM, Holland PWH, Graham CF. 1993. The zootype and the phylotypic stage. *Nature* 361: 490-2
- Sordino P, van der Hoeven F, Duboule D. 1995. *Hox* gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits. *Nature* 375: 678-81
- Spagnuolo A, Ristoratore F, Di Gregorio A, Aniello F, Branno M, Di Lauro R. 2003. Unusual number and genomic organization of *Hox* genes in the tunicate *Ciona intestinalis*. *Gene* 309: 71-9
- Stach T, Dupont S, Israelsson O, Fauville G, Nakano H, et al. 2005. Nerve cells of *Xenoturbella bocki* (phylum uncertain) and *Harrimania kupfferi* (enteropneusta) are positively immunoreactive to antibodies raised against echinoderm neuropeptides. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 85: 1519-24
- Stadler PF, Fried C, Prohaska SJ, Bailey WJ, Misof BY, et al. 2004. Evidence for independent *Hox* gene duplications in the hagfish lineage: a PCR-based gene inventory of *Eptatretus stoutii*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32: 686-94
- Stokes MD and Holland ND. 1996. Life-history of the Florida lancelet, *Branchiostoma floridae*: some factors affecting population dynamics in Tampa Bay. *Isr. J. Zool.* 42, S67-86.
- Sundin OH, Eichele G. 1990. A homeo domain protein reveals the metameric nature of the developing chick hindbrain. *Genes Dev.* 4: 1267-76
- Takezaki N, Figueroa F, Zaleska-Rutczynska Z, Klein J. 2003. Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes. *Mol Biol Evol* 20: 287-92
- Takio Y, Kuraku S, Murakami Y, Pasqualetti M, Rijli FM, et al. 2007. *Hox* gene expression patterns in *Lethenteron japonicum* embryos - Insights into the evolution of the vertebrate *Hox* code. *Dev. Biol.* 308: 606-20
- Takio Y, Pasqualetti M, Kuraku S, Hirano S, Rijli FM, Kuratani S. 2004. Evolutionary biology: lamprey *Hox* genes and the evolution of jaws. *Nature* 429: 1 p following 262
- Tanzer A, Amemiya CT, Kim CB, Stadler PF. 2005. Evolution of microRNAs located within *Hox* gene clusters. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 304: 75-85
- Tarchini B, Duboule D. 2006. Control of *Hoxd* genes' collinearity during early limb development. *Dev. Cell* 10: 93-103
- Taylor JS, Van de Peer Y, Braasch I, Meyer A. 2001. Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356: 1661-79
- Thomas-Chollier M, Ledent V. 2008. Comparative phylogenomic analyses of teleost fish *Hox* gene clusters: lessons from the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*: comment. *BMC Genomics* 9: 35



- Trainor PA, Krumlauf R. 2000. Patterning the cranial neural crest: hindbrain segmentation and *Hox* gene plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 1: 116-24
- Tronche F, Ringeisen F, Blumenfeld M, Yaniv M, Pontoglio M. 1997. Analysis of the distribution of binding sites for a tissue-specific transcription factor in the vertebrate genome. *J. Mol. Biol.* 266: 231-45
- Tümpel S, Wiedemann LM, Krumlauf R. 2009. *Hox* genes and segmentation of the vertebrate hindbrain. *Curr. Top. Dev. Biol.* 88: 103-37
- Urata M, Tsuchimoto J, Yasui K, Yamaguchi M. 2009. The *Hox8* of the hemichordate *Balanoglossus misakiensis*. *Dev. Genes Evol.* 219: 377-82
- Wada H, Escriva H, Zhang S, Laudet V. 2006. Conserved RARE localization in amphioxus *Hox* clusters and implications for *Hox* code evolution in the vertebrate neural crest. *Dev. Dyn.* 235: 1522-31
- Wada H, Garcia-Fernández J, Holland PWH. 1999. Colinear and segmental expression of amphioxus *Hox* genes. *Dev. Biol.* 213: 131-41
- Wang WC, Anand S, Powell DR, Pawashe AB, Amemiya CT, Shashikant CS. 2004. Comparative *cis*-regulatory analyses identify new elements of the mouse *Hoxc8* early enhancer. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 302: 436-45
- Wasserman WW, Palumbo M, Thompson W, Fickett JW, Lawrence CE. 2000. Human-mouse genome comparisons to locate regulatory sites. *Nat. Genet.* 26: 225-8
- Wasserman WW, Sandelin A. 2004. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat. Rev. Genet.* 5: 276-87
- Wellik DM. 2009. *Hox* genes and vertebrate axial pattern. *Curr. Top. Dev. Biol.* 88: 257-78
- Wheeler BM, Heimberg AM, Moy VN, Sperling EA, Holstein TW, et al. 2009. The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evol. Dev.* 11: 50-68
- Whittaker JR. 1997. Cephalochordates, the Lancelets. In "Embryology: constructing the organism" (S. F. Gilbert and A. M. Raunio, Eds.) pp. 365-381. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland
- Wicht H, Lacalli TC. 2005. The nervous system of amphioxus: structure, development, and evolutionary significance. *Can. J. Zool.* 83: 122-50
- Wilkinson DG, Bhatt S, Cook M, Boncinelli E, Krumlauf R. 1989. Segmental expression of *Hox-2* homeobox-containing genes in the developing mouse hindbrain. *Nature* 341: 405-9
- Wingate RJ, Lumsden A. 1996. Persistence of rhombomeric organisation in the postsegmental hindbrain. *Development* 122: 2143-52
- Wolfe KH. 2001. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat. Rev. Genet.* 2: 333-41
- Woltering JM, Durston AJ. 2006. The zebrafish *hoxDb* cluster has been reduced to a single microRNA. *Nat. Genet.* 38: 601-2
- Yagi K, Makabe KW. 2002. Retinoic acid differently affects the formation of palps and surrounding neurons in the ascidian tadpole. *Dev. Genes Evol.* 212: 288-92
- Yarrell W. 1836. A history of British fishes. London: J Van Voorst.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP. 2004. MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science* 304: 594-6
- Yokouchi Y, Sakiyama J, Kuroiwa A. 1995. Coordinated expression of *Abd-B* subfamily genes of the *HoxA* cluster in the developing digestive tract of chick embryo. *Dev. Biol.* 169: 76-89
- Zakany J, Duboule D. 2007. The role of *Hox* genes during vertebrate limb development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17: 359-66
- Zhang J, Nei M. 1996. Evolution of *Antennapedia*-class homeobox genes. *Genetics* 142: 295-303
- Zhang Q-J, Sun Y, Zhong J, Li G, Lü X-M, Wang YQ. 2007. Continuous culture of two lancelets and production of the second filial generations in the laboratory. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 308: 464-72
- Zou SM, Jiang XY, He ZZ, Yuan J, Yuan XN, Li SF. 2007. *Hox* gene clusters in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* and comparison with those of zebrafish, fugu and medaka genomes. *Gene* 400: 60-70



# OBJETIVOS



Juan Pascual Anaya

LOS COMPLEJOS *Hox* COMO MODELOS DE EVOLUCIÓN GENÓMICA EN CORDADOS: CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CLÚSTER *Hox* EN EL ANFIOXO EUROPEO



# OBJETIVOS

---

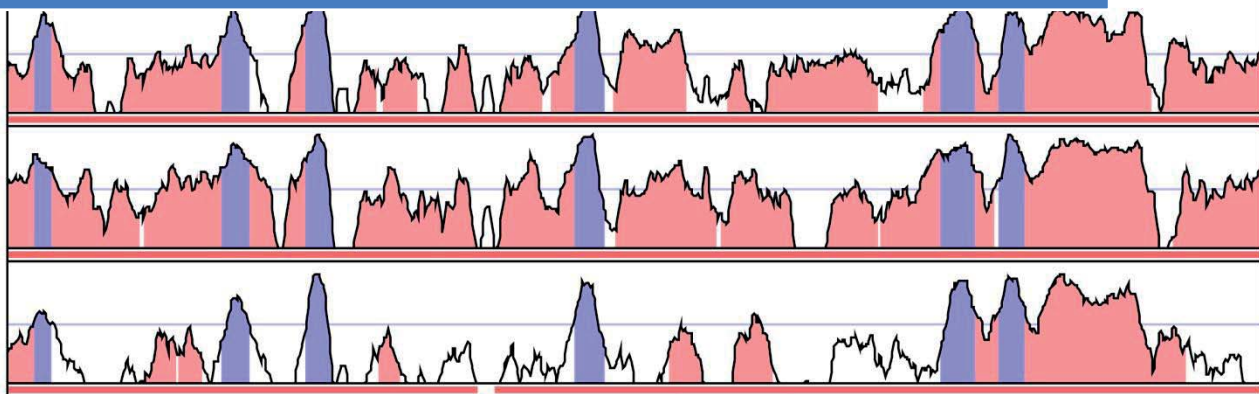
Como se ha discutido en la introducción, los genes *Hox* son muy importantes a la hora de determinar la identidad de las diferentes estructuras del eje antero-posterior en casi todos los animales estudiados hasta la fecha. Además, el estudio genómico comparativo de los complejos Hox en diferentes animales, ha posibilitado el análisis del impacto que han podido tener las pérdidas diferenciales tanto de clústeres como de genes en diferentes linajes sobre la morfología de estos grupos. El grupo de los vertebrados es el más llamativo, ya que éstos durante su evolución han sufrido dos rondas de duplicación genómica, originando hasta cuatro clústeres en el caso de los mamíferos, o los siete que presentan la mayoría de teleósteos. El estudio de la regulación de los genes Hox en los vertebrados ha sido ampliamente estudiado, sobre todo en lo que refiere al desarrollo del rombencéfalo y la somitogénesis, donde factores de transcripción como *kreisler* o *Krox20* y el ácido retinóico como morfógeno llevan a cabo papeles fundamentales. Recientemente, otro tipo de estrategia ha sido muy utilizada, el '*phylogenetic footprinting*', que ha permitido la identificación de elementos putativamente reguladores mediante la identificación de las secuencias intergénicas conservadas. Fuera de los vertebrados, el conocimiento no es muy amplio, y es en este punto donde el estudio del anfioxo se hace clave, único animal con un único clúster Hox, con un complemento intacto, no en un proceso de desintegración y con todos los genes orientados en el mismo sentido. Al comenzar esta tesis, poco se sabía sobre la expresión de los genes del clúster Hox de anfioxo y su regulación. Algunos datos sobre los genes anteriores habían sido descritos, como su expresión en el sistema nervioso central o su regulación por ácido retinóico, regulación al parecer muy conservada con los vertebrados. Pero sin embargo, nada había sido descrito sobre los genes centrales o posteriores, o las características genómicas generales del clúster.

Así pues, los objetivos que se plantearon fueron:

- ✚ Una vez establecida la especie europea *Branchiostoma lanceolatum* como modelo de nuestro laboratorio, búsqueda y caracterización genómica del clúster *Hox* en ésta.
- ✚ Analizar los patrones de expresión tanto temporal como espacial de todos los genes del complejo, su comparación con sus homólogos de vertebrados, y realizar análisis comparados
- ✚ Búsqueda *in silico* de secuencias no-codificantes conservadas tanto entre diferentes especies de anfioxo como entre éstos y vertebrados, y que por tanto pudiesen tener un papel regulador, mediante la estrategia del '*phylogenetic footprinting*'.
- ✚ Comprobación *in vivo* de los elementos conservados encontrados mediante el uso de vectores *reporter* en líneas transgénicas de peces cebrá.
- ✚ Evaluación de la regulación por ácido retinóico de los de los grupos centrales y posteriores de genes *Hox* de anfioxo



# RESULTADOS



Juan Pascual Anaya

LOS COMPLEJOS *Hox* COMO MODELOS DE EVOLUCIÓN GENÓMICA EN CORDADOS: CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CLÚSTER *Hox* EN EL ANFIOXO EUROPEO



## INFORME DEL DIRECTOR SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES

Directores: Dr. Jordi Garcia Fernàndez y Dr. Salvatore D'Aniello

La memoria de la tesis doctoral presentada por Juan Pascual Anaya titulada "LOS COMPLEJOS Hox COMO MODELOS DE EVOLUCIÓN GENÓMICA EN CORDADOS: CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CLÚSTER Hox EN EL ANFIOXO EUROPEO", de la que somos co-directores, incluye 9 artículos: 4 en el apartado de resultados, de los cuales 3 de ellos publicados y uno por enviar en próximas fechas; y 5 en el apartado de apéndices.

Todos los artículos publicados lo han sido en revistas internacionales que constan en PubMed, la base de datos más importante de ciencias biomédicas. También están incluidas en la *ISI Web of Science* y en todos los casos se trata de publicaciones que han pasado por el filtro de evaluadores anónimos designados por los editores. A continuación se detallan los índices de impacto y la posición en el listado ordenado de especialidades correspondientes (datos del *ISI Web of Science*, edición 2008). El artículo que aún no está publicado se enviará a una revista internacional del área de la biología del desarrollo y/o evolución

### Apartado resultados:

Artículo RI: J. Exp. Zool B: Mol Dev Evol (*Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*)

Factor de impacto: **3,364**  
Posición en el área: 10/38 (Área *Developmental Biology*)  
15/39 (Área *Evolutionary Biology*)  
4/125 (Área *Zoology*)

Artículo RII: Dev. Genes Evol. (*Development Genes and Evolution*).

Factor de impacto: **2,171**  
Posición en el área: 107/157 (Área *Cell Biology*)  
26/38 (Área *Developmental Biology*)  
22/39 (Área *Evolutionary Biology*)

Artículo RIII: **por enviar**

Artículo RIV: Dev. Biol. (*Developmental Biology*)

Factor de impacto: **4,416**  
Posición en el área: 7/38 (Área *Developmental Biology*)

### Apartado apéndices:

Artículo AI: Int. J. Biol. Sci. (*International Journal of Biological Sciences*)

Factor de impacto: **aún no disponible en ISI (3.40 según datos de la revista)**

Artículo AII: M. B. E. (*Molecular Biology and Evolution*)

Factor de impacto: **7,280**  
Posición en el área: 4/39 (Área *Evolutionary Biology*)  
12/138 (Área *Genetics and Heredity*)  
27/275 (Área *Biochemistry and Molecular Biology*)

Artículo AIII: Int. J. Dev. Biol. (*International Journal of Developmental Biology*)

Factor de impacto: **2,359**

Posición en el área: 21/38 (Área *Developmental Biology*)

Artículo AIV: J. Exp. Zool B: Mol Dev Evol (*Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*)

Factor de impacto: **3,364**

Posició en el área: 10/38 (Área *Developmental Biology*)

15/39 (Área *Evolutionary Biology*)

4/125 (Área *Zoology*)

Artículo AV: Brief. Funct. Genomic. Proteomic. (*Briefings in Functional Genomics and Proteomics*)

Factor de impacto: **aún no disponible en ISI**

Los directores,

Signat: Dr. Jordi Garcia Fernàndez  
Barcelona, 10 de MARZO de 2010

Dr. Salvatore D'Aniello

# RESULTADOS

---

## ARTÍCULO RI

---

### RESUMEN

El clúster Hox del anfióxico es normalmente considerado como “arquetípico” del linaje de los cordados. En este trabajo se han caracterizado las 448 Kb de la región cromosómica que contienen los genes Hox1 a Hox14 del clúster Hox de *Branchiostoma floridae*.

Se han anotado las regiones codificantes de todos ellos y se ha llevado a cabo un detallado análisis de los elementos no-codificantes conservados. De este trabajo se extrae que la parte posterior del clúster Hox es tan divergente que incluso las secuencias genómicas completas son insuficientes para decidir si los genes posteriores se generaron por duplicaciones independientes o si son ortólogos reales de los grupos de paralogía de gnatostomados. Por el contrario, la parte anterior está mucho mejor conservada.

A excepción de dos pequeñas zonas en la parte posterior, el clúster Hox de anfióxico es fuertemente reticente a la presencia de secuencias repetitivas, lo cual es un fenómeno que se ha observado también en los clústeres de gnatostomados pero no en los de protóstomos.

Los clústeres Hox en vertebrados son mucho más pequeños que el de anfióxico (alrededor de 100 Kb), y en este trabajo se hipotetiza que esta diferencia podría deberse a una extensiva resolución de la redundancia de las regiones reguladoras tras las duplicaciones genómicas y no ser consecuencia de una presión de selección que elimine las secuencias no funcionales del clúster Hox.

**INFORME DE LOS DIRECTORES SOBRE CONTRIBUCIÓN DEL CANDIDATO EN PUBLICACIONES CON MÁS FIRMANTES**

El trabajo publicado es resultado de una colaboración con un potente grupo americano que secuenció el complejo Hox de *Branchiostoma floridae*. El doctorando se encargó de la anotación de los genes Hox posteriores y, en el caso de *Hox14*, del clonaje del ortólogo en *B.lanceolatum*, necesario para la correcta anotación del gen en *B. floridae*.

Los directores,

Dr. Jordi Garcia Fernández

Dr. Salvatore D'Aniello

Barcelona, a 10 de MARZO de 2010

ARTÍCULO R.I

- **Pascual-Anaya, J.**, D'Aniello, S., Garcia-Fernández, J. (2008) Unexpectedly large number of conserved noncoding regions within the ancestral chordate Hox cluster. *Dev Genes Evol*, **218**(11-12):591-7.

# RESULTADOS

---

## ARTÍCULO RII

---

### RESUMEN

El cefalocordado anfióxico presenta un único clúster Hox que contiene 15 genes, y se cree que refleja la condición del clúster Hox ancestral de los cordados. En este trabajo se ha secuenciado las regiones cromosómicas que contienen los 15 genes de la especie europea del anfióxico, *Branchiostoma lanceolatum*, y hemos realizado un análisis comparativo con los de la especie americana de Florida, *Branchiostoma floridae*, mediante *phylogenetic footprinting* con el objetivo de comprender mejor la evolución de la regulación de los genes Hox en cordados.

Tras los análisis, se observó que las regiones intergénicas del clúster Hox están extremadamente conservadas entre las dos especies de anfióxico, especialmente en el caso de los genes localizados en la parte anterior del clúster, una tendencia que previamente se había observado al comparar diferentes clústeres de diferentes vertebrados.

Además, comparamos el clúster de sendos anfióxos con los complejos HoxA, B, C y D de humano, e identificamos varias secuencias no codificantes conservadas, tanto en las regiones intergénicas como en intrónicas. Todo ello sugiere que la regulación de los genes Hox está altamente conservada entre los cordados, algo que es consistente con los patrones de expresión similares que se han encontrado en vertebrados y anfióxico.

**INFORME DE LOS DIRECTORES SOBRE CONTRIBUCIÓN DEL CANDIDATO EN PUBLICACIONES CON MÁS FIRMANTES**

El artículo está firmado exclusivamente por el doctorando y sus dos directores de tesis, que dirigieron el proyecto, por tanto la contribución material del doctorando fue el 100%.

Los directores,

Dr. Jordi Garcia Fernández

Dr. Salvatore D'Aniello

Barcelona, a 10 de MARZO de 2010



## ARTÍCULO R.II

- Amemiya, C.T., Prohaska, S.J., Hill-Force, A., Cook, A., Wasserscheid, J., Ferrier, D.E., **Pascual-Anaya, J.**, Garcia-Fernàndez, J., Dewar, K., Stadler, P.F. (2008) The amphioxus Hox cluster: characterization, comparative genomics, and evolution. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, **310**(5):465-77.

# RESULTADOS

---

## ARTÍCULO RIII

---

### RESUMEN

Los genes Hox son genes clave en el patrón el eje antero-posterior de la mayoría de metazoos estudiados hasta ahora. Generalmente se encuentran ligados en regiones cromosómicas o clústeres y se expresan con una colinearidad temporal y espacial en anfibios y vertebrados. Esto es, los genes más cercanos a la parte 3' se expresan antes y en las zonas más anteriores del embrión que los genes a 5'. No obstante, esto es totalmente cierto exclusivamente para todos los genes sólo en vertebrados, ya que la expresión de casi ningún gen Hox de los grupos centrales y de ninguno posterior ha sido estudiada en anfibio, el cual representa el pariente vivo más cercano al ancestro de los cordados. En hemicordados, equinodermos y urocordados la expresión no es siempre colinear. En este trabajo se presentan los patrones de expresión de casi todos los genes Hox de anfibio e identificamos una rotura de tanto la colinearidad espacial como temporal por algunos genes Hox de los grupos centrales y posteriores. Los genes posteriores se expresan en estructuras tales como la notocorda y la región posterior del tracto digestivo. El gen *BIHox14* es el que presenta el patrón más diferente, siendo incluso detectado en estructuras anteriores como la vesícula cerebral o el endodermo faríngeo. Esto supone la primera vez que se identifica un gen Hox en una región tan anterior de un sistema nervioso central. Además, mostramos que parte de la expresión del gen *BIHox14* (en notocorda y digestivo), al igual que los genes Hox anteriores, está regulada por ácido retinóico, mientras que la expresión en la vesícula cerebral y la farínge, no lo están. La falta de restricciones en la parte posterior de los clústeres de vertebrados y anfibio podría ser la causa de sus expansiones independientes y de haber sido co-optados para el desarrollo de diferentes estructuras, permitiendo una rotura de la colinearidad en deuteróstomos.

**INFORME DE LOS DIRECTORES SOBRE CONTRIBUCIÓN DEL CANDIDATO EN PUBLICACIONES CON MÁS FIRMANTES**

El artículo está firmado exclusivamente por el doctorando y sus dos directores de tesis, que dirigieron el proyecto, por tanto la contribución material del doctorando fue el 100%.

Los directores,

Dr. Jordi Garcia Fernández

Dr. Salvatore D'Aniello

Barcelona, a 10 de MARZO de 2010

## **Breaking of Hox colinearity in amphioxus**

Juan Pascual-Anaya, Salvatore D'Aniello and Jordi Garcia-Fernández\*

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,  
08028 Barcelona, Spain.

\*Corresponding authors:

Jordi Garcia-Fernández,

e-mail: [jordigarcia@ub.edu](mailto:jordigarcia@ub.edu)

phone: +34 934034437

fax: +34 934034420

## **ABSTRACT**

Hox genes are key developmental genes involved in patterning the antero-posterior axis of most metazoans studied so far. They generally are linked in genomic cluster and expressed with spatial and temporal colinearity in amphioxus and vertebrates. The closer to the 3' extreme, the earlier and more anteriorly the gene is expressed. Nonetheless, this is fully true for all genes only in vertebrate clusters, since the expression of almost all central and all posterior Hox genes of amphioxus, which represents the closest relative to the chordate ancestor, are not known, and expression in hemichordates and tunicates is not always colinear. Here, we present a complete expression profile of amphioxus Hox genes and report the breaking of both spatial and temporal colinearity of some central and posterior Hox genes. Posterior Hox genes are expressed in distinct structures like the notochord and posterior parts of the gut. Hox14 had the most different pattern, being also expressed in the anterior cerebral vesicle and pharyngeal endoderm. This is the first report of Hox expression in the most anterior part of a central nervous system. We also show that a subset of Hox14 expression is regulated by retinoic acid (in notochord and hindgut), like more anterior genes are, whereas its expression in the cerebral vesicle and pharynx are not. Lack of constriction in the posterior part of vertebrate and cephalochorate clusters may be the cause of their independent expansion and their co-option for patterning different structures, allowing the breaking of colinearity in deuterostomes.

**Key words:** amphioxus, Hox14, Hox15, colinearity

## INTRODUCTION

HOX genes are involved in the establishment of the animal body plan by specifying the positional identity of different structures along the antero-posterior (A-P) axis (reviewed in McGinnis and Krumlauf, 1992; Krumlauf, 1994). It is also believed that they contribute to the morphological diversity throughout the animal kingdom. During evolution, *Hox* genes have conserved both their organization in clusters and the ordered correlation between the position of the genes in the cluster and their expression pattern along the body axis (spatial colinearity) (Lewis, 1978; Graham et al., 1989; Duboule and Dollè, 1989). From an evolutionary perspective, the development of a more complex body organization seems to correlate with the formation and amplification of Hox clusters, probably achieved through successive tandem duplications of an ancestral homeobox-containing gene and subsequent cluster duplications.

In agreement with this hypothesis, a single cluster with a variable number of Hox genes has been found in most metazoans (reviewed by Holland, 1992; Burglin and Ruvkun, 1993). In chordates (Fig. 1), only one cluster is present in the genome of the cephalochordate amphioxus (Holland et al., 2008) while the urochordate *Ciona intestinalis* has a disintegrated Hox cluster (Di Gregorio et al., 1995). Vertebrates, generally, have four clusters that originated after two rounds of whole genome duplication during early vertebrate evolution. They are organized in 14 paralogous groups (PGs), whose numbering reflects their position within the cluster. The cephalochordate amphioxus has a single continuous array of 15 Hox genes (Ferrier et al. 2000; Garcia-Fernández and Holland 1994; Holland et al. 2008), the richest (in terms of gene content) Hox cluster isolated to date, with the same transcriptional orientation for

all genes. Each amphioxus Hox gene from the anterior and central groups (Hox1 to Hox8) represents a vertebrate PG, whereas the relationships between posterior genes (from Hox9) is difficult to establish due to their high evolutionary divergence, a phenomenon named “deuterostome posterior flexibility” by Ferrier et al. (2000). Amphioxus is the one of the few extant lineages among metazoans with a single Hox cluster that has neither been broken nor is in the process of disintegration, a critical step in the evolution of the small and highly meta-regulated mammalian clusters (Duboule 2007). Due to these features, the amphioxus Hox cluster is probably the best available model with which to study and understand the origin and evolution of the regulation of vertebrate Hox gene clusters.

Genetic analysis of vertebrate Hox genes has revealed important functional roles for the overlapping and ordered expression patterns of Hox genes in many different tissues of the embryo, such as the CNS, axial skeleton, limbs and gut (reviewed by McGinnis and Krumlauf, 1992; Maconochie et al., 1996; Duboule, 1993). There are distinct individual roles for most Hox genes, but there is also evidence for synergistic interactions and functional redundancy between members, that are most likely due to overlapping expression patterns and structural conservation between paralogous genes. The use of a simpler model system than the multi-cluster higher vertebrates might contribute to the study of expression pattern of Hox genes and of their role in the evolution of chordates.

Several lines of evidence indicates that Hox gene function has been modified in evolution, and the study of their expression patterns helps to distinguish between ancestral and derived roles, since they may reveal the extent to which particular roles are shared between gene clusters from different clades. Thus, taking into account its key phyletic position, analysis of Hox genes in the cephalochordate amphioxus can give clues to ancestral patterns when considered in a phylogenetic context (Fig. 1).



Here, we report a complete collection of expression pattern of Hox genes from the European species *Branchiostoma lanceolatum* and, in line with classical interference experiments, we follow the changes in expression after treatments with retinoic acid (RA) in order to depict the regulatory scenario for posterior Hox genes. Evolutionary implications of novel described Hox territories/roles in the ancestors of vertebrates are discussed in a modern view that could shed light on most ancient vertebrate Hox gene functions.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Embryonic culture and treatment with RA and RA-antagonist (BMS009)**

Ripe amphioxus adults (*Branchiostoma lanceolatum*) were collected in Banyuls-sur-Mer (France) and Blanes (Spain) during the summer 2009. Spawning was induced in laboratory by heat shock (Fuentes et al, 2004). After fertilization, embryos were reared in filtered seawater at 17°C. Treatments with RA (in DMSO), the RA-antagonist BMS009 (in DMSO) or DMSO (as control) were carried out at the late blastula stage at a final concentration of  $1 \times 10^{-6}$  M as previously described (Holland and Holland, 1996; Escriva et al., 2002). At the early neurula stage, embryos were transferred to untreated filtered seawater. The DMSO treatments did not affect amphioxus development. Embryos and larvae were fixed for in situ hybridization at frequent intervals. Fixation was at 4°C overnight with 4% paraformaldehyde in a buffer containing 0.1 M MOPS, 0.5 M NaCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA, pH 7.4 (Holland et al., 1996).

## **cDNA cloning**

A mix of embryos from (i) gastrula to 2-days larvae stages, (ii) juveniles and (iii) adults animals of *B. lanceolatum* species were fixed in RNAlater (Sigma Aldrich) and total RNA were extracted using a Rneasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN). cDNA strand was synthesized using Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) (1h, 56° C) and an embryo cDNA library was constructed using the CloneMiner<sup>™</sup> Kit (pDNR222 vector; Invitrogen). RT-PCRs were carried out using a forward primer in the first exon and a reverse primer in the second exon (or third: *BlHox12* and *BlHox14*) of the gene of interest, designed using previous annotation (Pascual-Anaya et al., 2008). (i), (ii) or (iii) were used as a template to distinguish temporal expression patterns. Each BlHox gene was cloned in pCRII vector (Invitrogen), sequenced on both strands and used as templates for transcription of labeled riboprobes.

## **In situ hybridization, microscopy and photography**

In situ hybridizations were performed as previously described (Holland et al., 1996). 3'UTR- probes were used in the cases of *BlHox3*, *BlHox4*, *BlHox6*, *BlHox12*, *BlHox14* and *BlHox15*, using primers designed close to the stop codon. After in situ hybridization, the embryos were photographed as whole mounts. Several dorso-ventral planes of the head in the case of *BlHox14 in situ* hybridization were merged using *Helicon Focus* software (d-Studio) for a more accurate comparison of expression territories.

## **RESULTS**

### ***BIHox1, BIHox3, BIHox4 and BIHox5* expression**

The expression of *BIHox1*, *BIHox3* and *BIHox4* was very similar to the reported expression of the orthologous genes in *B. floridae* (Wada et al., 1999; Schubert et al., 2006). Nonetheless, subtle differences have been found regarding the tissues of expression. *BIHox1* was expressed with the most anterior limit in epidermis and central nervous system (Fig.2), but none epidermal expression was found for *BIHox3* and *BIHox4*. These two genes were expressed exclusively in the central nervous system with a clear spatial and temporal colinearity. In these two cases, the probe used was prepared from the 3'UTR of the gene, and as we discuss below, this can be a cause for such difference. In the case of *BIHox5*, we were unable to observe any expression by in situ hybridization in any embryonic stage, although the gene is expressed during development by RT-PCR (data not shown).

### **Expression of *BIHox6* in CNS**

Strikingly, *BIHox6* was found to be expressed in a very specific part of the neural plate at mid-neurula stage of the *B. lanceolatum* embryo, with a very clear anterior and posterior limits (Fig. 2, 3), in contrast to that described for *B. floridae* (Schubert et al., 2006), and it was not present in epidermis, again an expression territory that was described for the American species (Schubert et al., 2004). The anterior limit was in concordance with the spatial colinearity described in Schubert et al. (2006), but the posterior limit was unreported. *BIHox6* is expressed first in mid-neurula stage, before *BIHox4*, a more anterior gene, what supposes a breaking of the temporal colinearity. Surprisingly, this gene has not been found to be expressed at other developmental

stages, and mRNA has been found by RT-PCR neither in juveniles nor in adult specimens (data not shown).

### **Expression of *BIHox7***

Apart from *BIHox6*, none central group Hox gene expression has been reported in cephalochordates. PG7 orthologue of the *B. lanceolatum* Hox cluster is expressed with a no clear anterior limit, weakly in central nervous system, notochord and tail bud, but it is expressed more rostrally than *BIHox4* and *BIHox6*, clearly breaking the spatial colinearity (Fig. 2). However, it begins to be expressed after anterior genes, from the late neurula stage, in agreement with temporal colinearity.

### ***BIHox8* and *BIHox9***

We were unable to find any expression pattern for both *BIHox8* and *BIHox9* using probes designed in the complete coding sequence, the first exon or the second exon. Nevertheless, we detected expression of *BIHox8* during the embryonic development and in the adult stage by RT-PCR. *BIHox9* was not found to be expressed during development or in adult, but it is present in the juvenile (data not shown).

### **Expresion of *BIHox10***

No expression of Hox genes from posterior groups has been characterized in cephalocordates so far. In *B. lanceolatum* embryos, *BIHox10* is expressed with the same

pattern than *BIHox7* but it is also expressed in the mid-hindgut. It also has a very diffuse anterior limit, what seems to be more rostral than that of *BIHox7*, breaking spatial colinearity (Fig. 2).

### **Expression of *BIHox12* and *BIHox15***

For these genes we used 300 pb probes based on the sequence close to the stop codon, cloned from genomic DNA. *BIHox12* and *BIHox15* are both expressed in a very tiny region of the most posterior tip of the animal, including tail bud and tail epidermis at the pre-mouth larva stage. *BIHox15* is expressed more posteriorly than *BIHox12*, so these two genes seem to be the only two posterior Hox that respect spatial colinearity. Their expression starts at a very similar stage, but since *B. lanceolatum* start to be asynchronous at that stage of development, it is difficult to assess temporal colinearity, if any.

### **Expression of *BIHox14* in wild type and RA or RA-antagonist BMS009 treated embryos**

*BIHox14* is expressed from pre-mouth larvae developmental stage and it was detected by RT-PCR also in juvenile animals (data not shown). *BIHox14* is expressed in the mid-hindgut, the posterior part of the notochord and in the tail bud (Fig. 2 and 4A, B). Strikingly, *BIHox14* was also detected in anterior structures like the cerebral vesicle and left side of the pharyngeal endoderm (Fig. 4C).

The RA-Hox system controls A-P axis pattern during development of chordates (for a review see Alexander et al., 2009), and such control has been demonstrated several

times in amphioxus for anterior Hox genes (Holland and Holland, 1996; Escriva et al., 2002; Schubert et al., 2004, Schubert et al., 2005, Schubert et al., 2006; Koop et al., 2009). In order to unravel if the non-canonical expression of *BlHox14* is also controlled by RA, we performed *in situ* hybridizations on embryos treated either with RA or with a RA-antagonist (BMS009). In RA treated embryos, the anterior limit of expression in gut and notochord is shifted anteriorly in a significant manner compared to the control, as it is located more rostrally than the mid pigment spot of the CNS (Fig 4, compare left panels with central ones). On the contrary, when treated with BMS009, the expression in notochord and gut is strongly shifted posteriorly (Fig 4, compare right panels with central ones). However, the expression in pharyngeal endoderm is not affected and *BlHox14* is expressed, also in the case of RA treatment, where the pharynx is strongly reduced (Fig. 4 top, left panel). Interestingly, the expression in the cerebral vesicle disappears in either RA or BMS009 treatment (Fig 4, left and right panels).

## **DISCUSSION**

### **Different expression found in *B. floridae* and *B. lanceolatum*: no epidermal Hox code**

Previous expression of *BfHox1*, -3, -4 and -6 was reported in *B. floridae* (Schubert et al., 2004; Schubert et al., 2006). In the cases of *BlHox3*, -4 and -6 a different expression patterns has been found in our work when compared with the American species. For the three *B. floridae* Hox genes an epidermal expression was found and a role of a Hox code in the epidermal sensory neurons development was suggested, even associated

with a remnant sign of an epidermal nervous system, similar to the epidermal diffuse nervous system of the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii* (Lowe et al. 2003; Aronowicz and Lowe 2006). However, the collar cord of other hemichordate, *Ptychodera flava*, has been found to be a homologue of chordates CNS, and the diffuse neural net in the epidermis would be thus the homologue of the peripheral nervous system (Nomakhtinsky et al., 2009). The lack of expression of these Hox genes in amphioxus epidermis in *B. lanceolatum* let to suppose there is not a Hox code in this tissue, related with an ancient “skin brain” (Holland, 2003; Schubert et al., 2004). Our data also makes sense with the fact, demonstrated recently, that the last common ancestor of protostomes and deuterostomes had a CNS, and that a D-V inversion occurred during deuterostome evolution (Nübler-Jung and Arendt, 1996; Benito-Gutiérrez and Arendt, 2009).

In the case of *BIHox6*, the expression in the CNS clearly has a posterior limit before it reaches de tail bud. It seems then that BIHox6 is involved in the specification of a very concrete part of the neural plate. Since most of markers analyzed so far in the two amphioxus species have the same expression pattern (Somorjai et al., 2008), we believe that the difference of the expression is due to the different probes used in both each cases. Schubert et al. (2006) used a probe comprising the whole coding sequence, including the homeobox, whereas we have used a 3'UTR probe, in order to avoid crosshybridization with other Hox genes. The nucleotide sequence of the homeobox of all central Hox genes is extremely similar so using a probe that contains such sequence may conduct to some cross-hybridization and missassignments of expression.

### **Central and posterior Hox genes break spatial and temporal colinearity**



Only the anterior groups and one central group Hox gene (*BfHox6*, whose expression may be artefactual, see above) has been reported so far in amphioxus (Schubert et al., 2006). The expression of posterior Hox genes has been widely studied in vertebrates, where they have important roles in vertebrate exclusive structures like the limbs or genital system (REFERENCIAS DE LA INTRO). They also have a key role in the pattern of the A-P axis in the posterior parts of the animal. Posterior Hox genes of amphioxus, urochordates, equinoderms or hemichordates have not clear orthologous relationships to the posterior paralogy groups (PGs) of vertebrates, and this is supposed to be due to a higher evolutionary rate of this class of genes, a phenomenon named Posterior Deuterostome Flexibility (Ferrier et al., 2000). In Ambulacraria (equinoderms plus hemichordates), the basal group of deuterostomes, three copies of a Hox11/13 genes have resulted by tandem duplication specific to the phylum. A phylogenetic analysis of deuterostome posterior Hox genes, including the recently reported *BfHox15* and members of vertebrate PG14 led to the hypothesis that posterior Hox genes of amphioxus and vertebrates likely come from independent duplications (Holland et al., 2008). In line with posterior flexibility, the intergenic regions of the posterior part of the Hox clusters are less conserved than the ones on the anterior parts in both amphioxus (Amemiya et al., 2008; Pascual-Anaya et al., 2008) and gnathostomes (Santini et al., 2003) in accordance with the specific expansions of the posterior part of Hox cluster to a total number of 14 genes in vertebrates, and 15 in amphioxus.

In the tunicate *Ciona intestinalis*, posterior Hox genes *CiHox10*, *CiHox12* and *CiHox13* are differentially expressed in either the CNS, the endoderm or in the case of *CiHox12*, the ectoderm. This latter gene, has also temporal differences of expression in these tissues (Ikuta et al., 2004). The hemichordate *S. kowalevskii* posterior Hox genes are expressed in the most posterior parts of the embryo ectoderm and endoderm except for

*Hox11/13a*. Its expression is unusual in first being detected exclusively in the ciliated epithelium of the developing ciliated band from early gastrula onwards. And as said above, Hox genes of the 5' parts of vertebrate Hox clusters are involved with the appearance of new vertebrate structures and also related to changes in the bauplan evolution of vertebrates as the type of vertebrae (Burke et al., 1995) or morphological variability within squamates (Di-Poi et al., 2010). In lamprey and shark, Hox14 has a non-canonical expression, and is expressed only in the posterior part of the endoderme and notochord in lamprey and in a very specific postero-ventral part of shark (Kuraku et al., 2008).

In amphioxus, posterior Hox genes are breaking colinearity, both spatial and temporal. The most striking case is that of *BIHox14*. This gene is expressed in anterior structures, like the cerebral vesicle. This is the first Hox gene detected in such important organ. In vertebrates, any Hox gene is expressed in mid or forebrain, and are excluded from Otx and Pax expression territories, but in amphioxus, what was thought the rule is broken. Likewise, the expression of *BIHox14* in pharyngeal endoderm is an exceptional case, since no Hox gene was detected earlier in the pharynx. The expression of *BIHox14* in notochord and mid-posterior gut is regulated by RA in the same manner as anterior genes, but the expression in pharynx does not respond to RA (Fig. 5) (Escriva et al., 2002; Schubert et al., 2004; Schubert et al., 2006). Thus, the regulatory regions of *BIHox14* are modular, with elements controlling the expression in cerebral vesicle in a RA dependent manner but not involving RAREs (RA response elements, where RA receptors bind), RA-independent elements, and RAREs. A control by RA in this posterior gene suggests an earlier global regulation with the same system of RA-anterior Hox genes. Therefore, a RA-Hox system should be present in the first cluster of Hox genes that contained anterior and posterior Hox gene, and by extension, the first Hox

gene, ProtoHox (Garcia-Fernández, 2005) was also regulated by RA. That is congruent with the fact that also ParaHox genes are controlled by RA (Osborne et al., 2009).

Therefore, posterior Hox genes do not follow the same trend that anterior and central ones do, although they are regulated in part by the same mechanisms. They are more variable, and this is reflected in the fact that their intergenic regions (where the regulatory sequences are) are much less conserved. This implies a lack of constraints for posterior genes that would allow them to evolve faster and be recruited in secondary structures from the pattern of the main A-P axis of the body, and allowing the decoupling of some of them from the classical Hox code well followed by anterior and central groups.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr. Ina Arnone and Rossella Annunziata of the Stazione Zoologica Dohrn of Napoli (Italy) for sharing RA-antagonist (BMS009). This work was supported by the *Ministerio de Educación y Ciencia* BMC2008-03776 to JGF. JPA holds a “FI” PhD fellowship of the *Generalitat de Catalunya* (Spain) and SDA a “Juan de la Cierva” postdoctoral contract of the *Ministerio de Educación y Ciencia* (Spain).

## **FIGURE LEGENDS**

### **Figure 1.**

Phylogenetic relationship of deuterostomes. Amphioxus are the most basal chordates, after the phylogenetic work of Delsuc *et al.*, 2006.

## Figure 2

Amphioxus Hox genes expression patterns in *B. lanceolatum*. Embryos stages analyzed from gastrula to two days larvae are indicated on the top of the panel and corresponding Hox genes are indicated on the right of the panel. Triple bar represent no expression. Always anterior is to the left and dorsal is up

## Figure 3

*B. lanceolatum Hox6* expression pattern. A, lateral view and B, dorsal view at middle-late neurula stage. Arrowhead indicates *BlHox6* most anterior expression limit. anterior is to the left, and dorsal is up in A,

## Figure 4

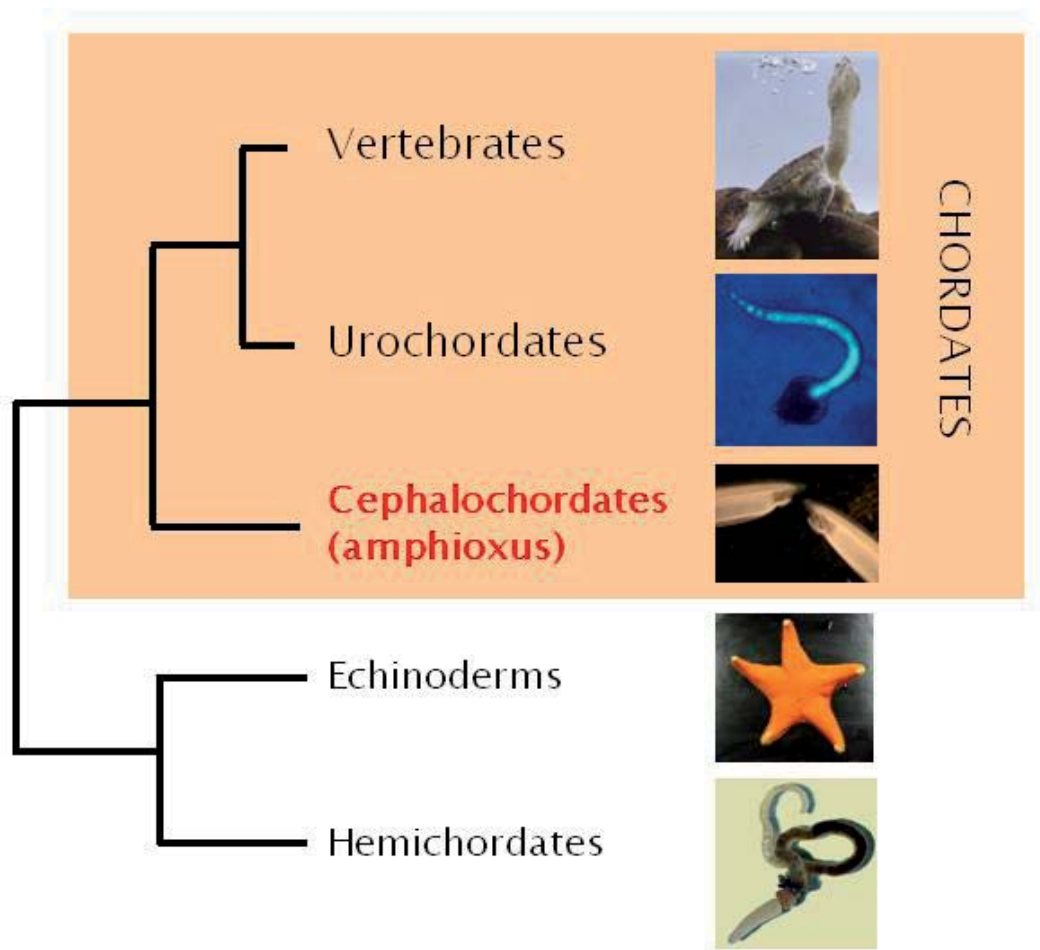
*B. lanceolatum Hox14* expression after treatment with RA and RA-antagonist (BMS009). Two embryo's stages were analyzed, pre-mouth and two days larvae. In the middle of the panel the *BlHox14* expression in normal condition is shown, left side after treatment with RA and right side after treatment with the RA-antagonist. Red arrowheads indicate the position of the pigment spot of the CNS, as a fix reference point. Blue arrowheads indicate the shift of *BlHox14* most anterior expression in the gut and notochord.

## Figure 5

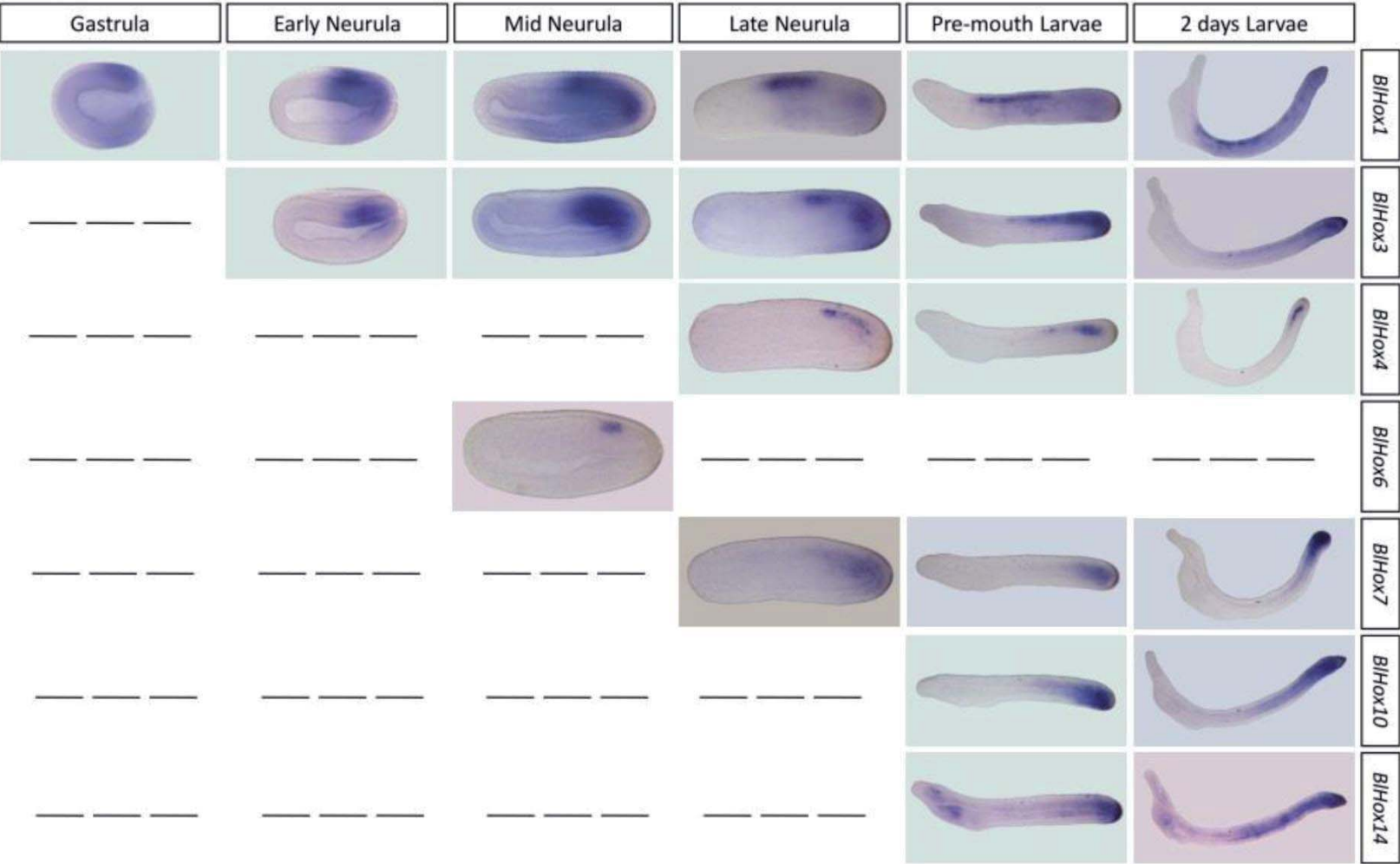
Model for the positioning of the posterior limit of the pharynx. In a previous model (Schubert et al., 2005) the positioning of the pharynx was established through the inhibition of the expression of *Otx* and *Pax1/9* (grey) in the midgut by *Hox1*, that at the same time is regulated by RA. We complete this model with the RA-independent

expression of *BlHox14* in part of the pharyngeal endoderm and its RA-dependent expression in the hindgut (red).

FIGURE 1

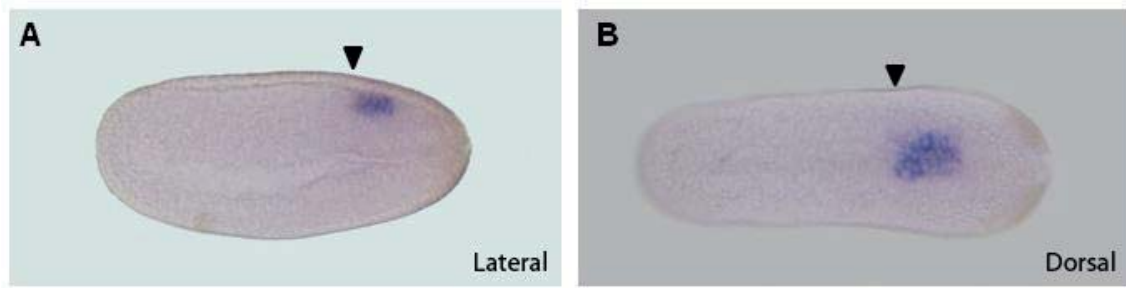


**FIGURA 2**





**FIGURE 3**



**FIGURE 4**

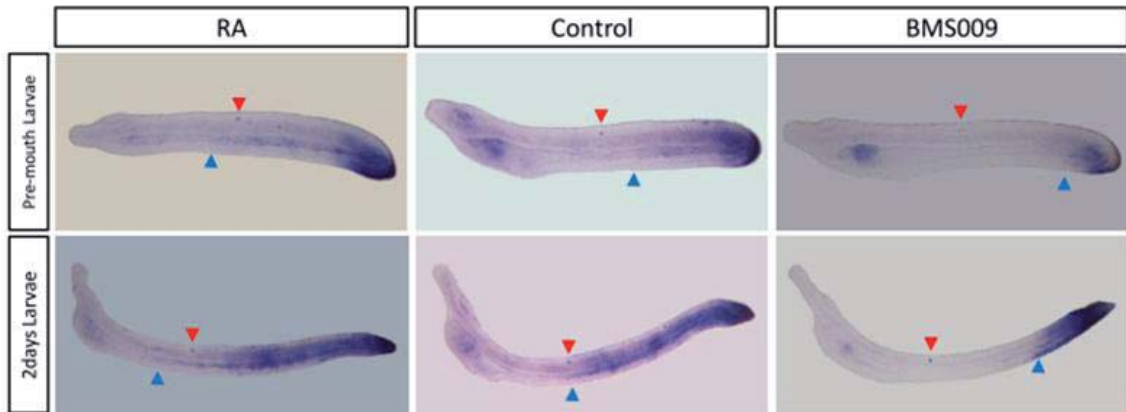
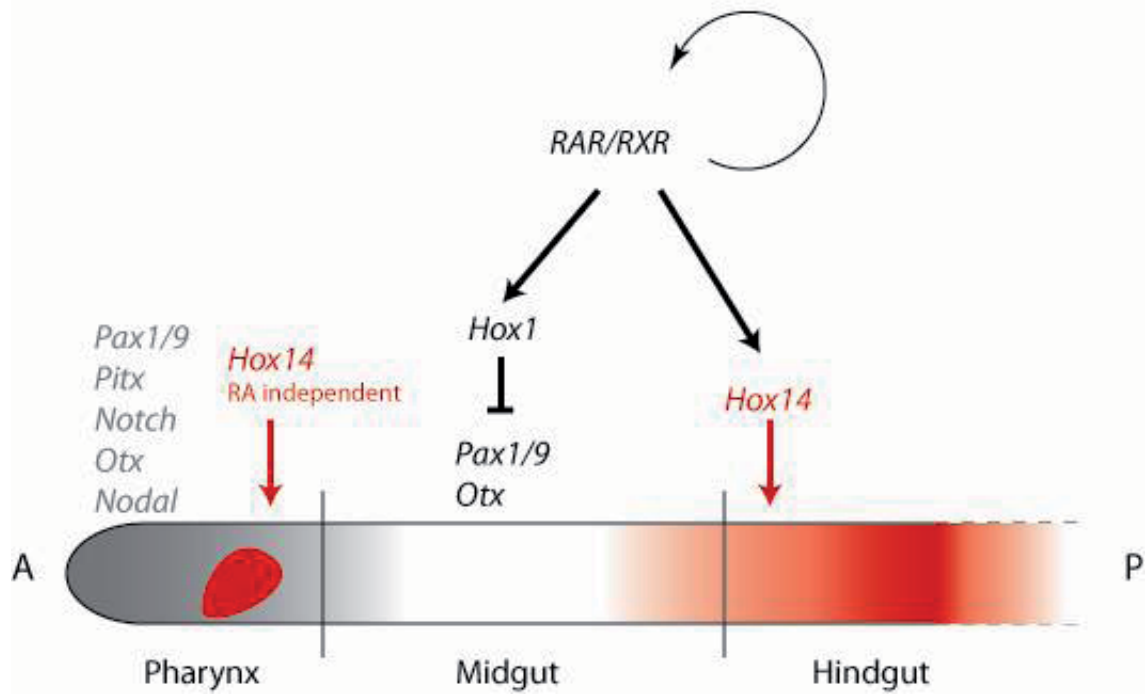


FIGURE 5





# RESULTADOS

---

## ARTÍCULO RIV

---

### RESUMEN

Los genes Hox son reguladores clave del patrón del eje antero-posterior y tienen un papel fundamental en el desarrollo del cerebro posterior. Los parálogos de Hox4 del pez cebra tienen actividades solapantes en los rombómeros 7 y 8, en la espina dorsal y en los arcos faríngeos. Con el objetivo de predecir *enhancers* que actúen sobre los genes *hoxa4a*, *hoxb4a*, *hoxc4a* y *hoxd4a*, se ha realizado un análisis de conservación de secuencia alrededor de los genes Hox4 para buscar secuencias conservadas entre pez y humano y analizarlas mediante transgénesis en embriones de peces zebra. Se testaron funcionalmente 34 elementos con vectores *reporter* de GFP y se analizó la generación F1 de más de 100 líneas para establecer una correlación entre la conservación de secuencia y la función reguladora en *cis*, construyéndose un catálogo de secuencias conservadas no-codificantes de los genes Hox4. Se pudieron identificar 16 elementos específicos de tejido. Los alineamientos de secuencia muestran relaciones de paralogía entre las secuencias reguladoras en *cis*, pero, sin embargo la similitud entre las secuencias de los elementos conservados no ha sido correlacionada con la especificidad de tejido. Para identificar *enhancers* ancestrales que dirijan la expresión del gen Hox4, se realizaron comparaciones de secuencias de mamíferos, teleósteos, tiburón y el cefalocordado anfioxo, que es el cordado vivo más basal, y posee un único clúster Hox. Se identificaron 3 elementos de los cuales 2 exhibían actividad reguladora mediante transgénesis en pez cebra, pero sin embargo, sin especificidad. Los datos de este trabajo muestran que la estrategia para identificar secuencias reguladoras en *cis* mediante alineamientos de secuencias genómicas y la posterior transgénesis en pez cebra puede ser usada para definir *enhancers* dentro de los clúster Hox y ver si estos han divergido funcionalmente de un modo significativo durante su evolución.

**INFORME DE LOS DIRECTORES SOBRE CONTRIBUCIÓN DEL CANDIDATO EN PUBLICACIONES CON MÁS FIRMANTES**

El artículo es el resultado de una colaboración con el grupo de Silke Rinkwitz y Thomas S. Becker. El doctorando se encargó de la comparación de las secuencias genómicas entre *Hox* de anfibio y de pez cebra. Clonó los elementos identificados en los vectores adecuados, inyectó huevos de pez cebra con ellos, y analizó las F0 y F1 resultantes.

Los directores,

Dr. Jordi Garcia Fernàndez

Dr. Salvatore D'Aniello

Barcelona, a 10 de MARZO de 2010

#### ARTÍCULO R.IV

- Punnamoottil B, Herrmann C, Pascual-Anaya J, D'Aniello S, Garcia-Fernández J, Akalin A, Becker TS, Rinkwitz S. (2010) *Cis*-regulatory characterization of sequence conservation surrounding the *Hox4* genes. *Dev Biol.* 340(2):269-82.



# DISCUSIÓN



Juan Pascual Anaya

LOS COMPLEJOS *Hox* COMO MODELOS DE EVOLUCIÓN GENÓMICA EN CORDADOS: CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CLÚSTER *Hox* EN EL ANFIOXO EUROPEO



# DISCUSIÓN

---

Entender cómo era el ancestro común a todos los cordados requiere del conocimiento de los animales modernos que han derivado de él durante la evolución y por tanto pensar en animales inferiores o superiores no tiene sentido. Todos los animales vivos actuales son igual de modernos que el hombre, y por tanto a priori ninguno aporta *per sé* características más primitivas ni son el fiel reflejo de lo que fue el ancestro. Consecuentemente, para entender la condición ancestral es necesario basarse en comparaciones entre diferentes grupos modernos, y aquellas características compartidas serán inferidas a la condición ancestral. Por este motivo, es de vital importancia establecer claramente las relaciones filogenéticas entre los animales modernos. La figura I.1 muestra las relaciones filogenéticas de diferentes animales, entre los que se encuentran los vertebrados, incluyendo el hombre. Vertebrados, cefalocordados y urocordados forman el grupo de los cordados y comparten un ancestro común. Conocer por tanto a todas las especies representantes de estos grupos sería esencial para entender nuestra propia evolución. Una de estas especies es el anfibio, perteneciente al grupo más basal de cordados, y que presenta una de las características más importantes en el contexto de lo que se discute aquí: posiblemente ha evolucionado más lento, lo que puede ser de gran ayuda para inferir las características ancestrales. Este ancestro común a todos los cordados vivió hace aproximadamente 570 millones de años, y desde entonces, el anfibio parece que ha evolucionado a una tasa más lenta (Putnam *et al.*, 2008). Un reflejo de esta lenta evolución es el clúster Hox. En la especie americana *B. floridae* se han caracterizado hasta 15 genes (Holland *et al.*, 2008), con representantes de todos los grupos parálogos de vertebrados, aunque como se verá más adelante, las relaciones de ortología entre éstos no son del todo claras. Los genes Hox son un paradigma para el estudio de la evolución genómica (ver Introducción; Hoegg y Meyer 2005; Holland y Garcia-Fernández 1996; Kuraku y Meyer 2009). Permiten estudiar desde un punto de vista local lo que ha podido ocurrir después de las duplicaciones genómicas globales o a gran escala. La gran variabilidad de diferentes complementos Hox, con pérdidas convergentes o específicas de cada linaje, está relacionada con la gran variabilidad morfológica de los metazoos (ver figura I.7; Swalla 2006). En este sentido, la caracterización genómica del clúster Hox de anfibio, un clúster completo y único que no ha sufrido las duplicaciones que han ocurrido durante la evolución de los vertebrados (Holland y Garcia-Fernández, 1996), y el análisis de su regulación nos ayudaría a diferenciar los elementos reguladores ancestrales de aquellos que son innovaciones de vertebrados y que habrían permitido la generación de novedades morfológicas tales como la aparición de las extremidades pares y su transición de aletas a patas, o los diferentes destinos de las células de la cresta neural hacia una variedad de estructuras craneofaciales (Shimeld y Holland 2000).

## UN ÚNICO CLÚSTER Hox DE 15 GENES EN CEFALOCORDADOS

---

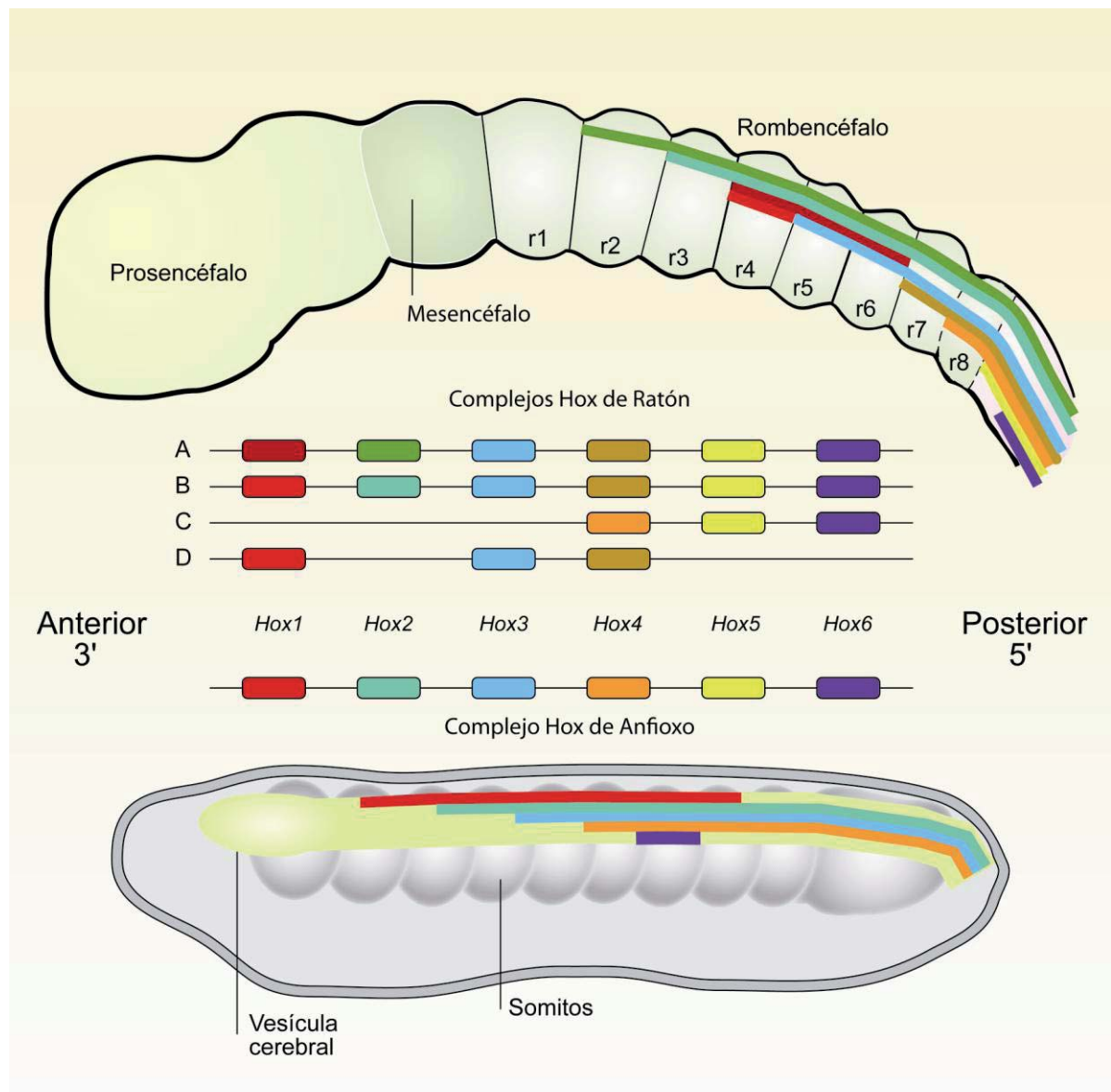
En el trabajo de esta tesis doctoral se han caracterizado unas 200 Kb del putativo clúster Hox de la especie europea del anfióxico, *B. lanceolatum*, en las que se incluyen homólogos de los 15 genes encontrados en *B. floridae*. Aunque en este trabajo no se han encontrado grupos de ligamiento para todos los genes, muy probablemente *B. lanceolatum* tenga también un clúster intacto debido a (i) los ligamientos existentes entre los genes *BlHox1-3*, *BlHox5-6*, *BlHox7-9* y *BlHox11-13*, (ii) a que las distancias intergénicas entre ellas sean equivalentes entre las dos especies y (iii) a la alta conservación de las secuencias tanto codificantes como no codificantes. Los datos de las dos especies sugieren que el ancestro de los cefalocordados poseía un único clúster con un total de 15 genes Hox, y es el único grupo animal con un clúster intacto que retiene tantos genes Hox. Sin embargo, sería necesario establecer los complementos Hox de otros grupos de cefalocordados, como especies de los géneros *Asymmetron* y *Epigonichtys*, para entender bien el origen de este clúster, ya que como se discute más adelante, probablemente durante la evolución de los cefalocordados ocurrió una gran expansión de los genes posteriores, y los datos de estos dos géneros nos darían evidencias de si este clúster completo estaba presente en su ancestro común o es específico del género *Branchiostoma*.

## LA EXPRESIÓN DE LOS GENES Hox ANTERIORES Y CENTRALES

---

Antes de centrar el objetivo en la regulación del clúster en anfióxico, es necesario determinar si el sistema es comparable al de otros cordados, y una vez establecido un sistema común, se puede analizar cómo este sistema es regulado y cómo esta regulación ha evolucionado.

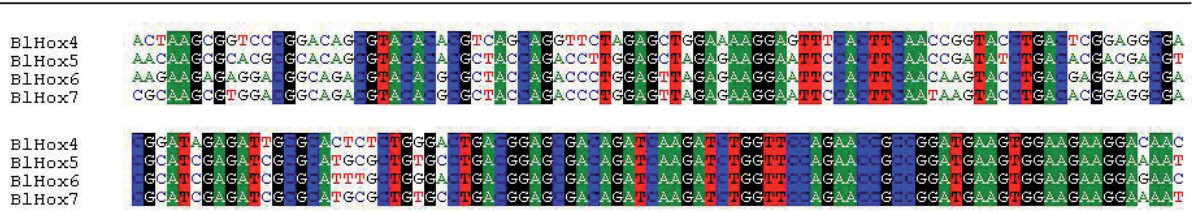
Como se vió en el apartado de la introducción, el SNC es uno de los tejidos más importantes regulados por el sistema *Hox*. A lo largo del tubo nervioso, desde el rombencéfalo hacia la parte posterior de la espina dorsal, se establecen diferentes campos de expresión para cada gen de forma colinear y espacialmente solapante (Figura D.1), de modo que el límite anterior de los genes más a 5' (grupos posteriores) son cada vez más caudales con respecto a los genes 3' (grupos anteriores). De este modo, se definen segmentos moleculares caracterizados por una combinación de genes *Hox*, que en el caso del rombencéfalo de vertebrados, coinciden con los rombómeros (Figura D.1). El SNC del anfióxico no está segmentado desde un punto de vista morfológico, y aunque de forma seriada salen pares de nervios de la parte dorsal de ambos lados del tubo nervioso, estos ni siquiera lo hacen de forma simétrica (ver Introducción), por lo que una relación entre los genes *Hox* y la formación de patrón de los nervios dorsales está fuera de lugar. Sólo la expresión de los genes *BfHox1, 2, 3, 4* y *6*, han sido descritos en la especie americana, y se expresan además de en el SNC, en el ectodermo, dónde podrían tener una función en la



**Figura D.1.** Expresión de los genes *Hox* anteriores en el cerebro posterior de vertebrados (arriba) y en el sistema nervioso central de anfiexo (abajo). Los genes *Hox* se expresan de una forma colinear en el rombencéfalo de vertebrados, generando un 'código *Hox*' (Kessel y Gruss, 1991) que dirige el destino de las células de la cresta neural. En anfiexo, Los genes *Hox1* a *6* presentan colinearidad espacial, pero el gen *Hox6* se expresa antes que *Hox4*, y su expresión no se extiende posteriormente hasta el *tail bud*.

diferenciación de las células sensoriales de la epidermis (Schubert *et al.*, 2004; Schubert *et al.*, 2006; Wada *et al.*, 1999). El gen *BfHox1* parece además estar expresado en el tercio medio del endodermo, donde mediado por ácido retinóico (RA) establece el límite posterior de la faringe mediante la inhibición de la expresión de genes de endodermo faríngeo como *BfPax1/9* y *BfOtx* (Schubert *et al.*, 2006). Los genes ortólogos de la especie europea, *BlHox1*, *3*, y *4* se expresan del mismo modo que en la especie americana en el SNC. Los embriones de *B. lanceolatum* se desarrollan más lentamente debido a la

temperatura a la que se desarrollan (unos 15-17° C en comparación con los 30° C de los embriones de *B. floridae*; (Fuentes *et al.*, 2007) y de este modo la colinearidad temporal es más obvia. Sin embargo, la identificada para *BfHox6*: en la primera, sólo un pequeño grupo de células de tejido neuroectodérmico está expresando *BIHox6*, con unos límites anterior y posterior muy bien definidos y además sólo en el estadio de neurula media, rompiendo claramente la colinearidad temporal, mientras que en la americana mantiene la colinearidad con los genes *Hox1* a *4*. No es el único patrón de expresión publicado para este gen, ya que también ha sido descrito en el endodermo faríngeo (Cohn 2002). La mayoría de marcadores estudiados hasta ahora en ambas especies tienen el mismo patrón de expresión (Somorjai *et al.*, 2008), y por este motivo es poco probable que se expresen de un modo tan diferente. Una explicación podría ser la sonda usada en ambos experimentos. Si observamos la conservación a nivel nucleotídico del homeobox de los genes *BfHox4* a *BfHox7* (Figura D.2), ésta es extremadamente alta, lo que hace que al utilizar sondas con el homeobox podría estar produciéndose hibridación cruzada inespecífica con otros *Hox*. Por este motivo, es más probable que la expresión encontrada en *B. lanceolatum* sea la correcta, y que en *B. floridae* se exprese del mismo modo, sin embargo, sería necesario volver a analizar la expresión de este gen en la especie americana con otra sonda para comprobar si la diferencia encontrada es real. Hasta ahora la expresión del gen *Hox5* no ha sido descrita, y en el trabajo realizado en esta tesis se ha conseguido establecer que se expresa durante el desarrollo, aunque se desconoce si mantiene la colinearidad espacial y temporal, ya que sus niveles de expresión son presumiblemente muy bajos, y su detección por hibridación *in situ* ha sido imposible.



**Figura D.2.** Alineamiento nucleotídico de las secuencias del homeobox de los genes *BIHox4*, *BIHox5*, *BIHox6* y *BIHox7* que muestra el alta identidad de estas secuencias.

La expresión colinear de los genes *BfHox1*, *-3*, *-4* y *-6* en la epidermis de los embriones de *B. floridae* recuerdan al patrón observado en la epidermis de *Saccoglossus kowalevskii* (Aronowicz y Lowe 2006; Lowe *et al.*, 2003), que hasta hace poco se pensaba que era el centro nervioso de hemicordados, representativo de la condición ancestral en deuteróstomos. Esto llevó a pensar que la centralización del sistema nervioso en un cordón dorsal en deuteróstomos y uno ventral en protóstomos podrían ser eventos independientes, y el ancestro de bilaterales haber poseído lo que se denominaría una “epidermis cerebro” (Schubert *et al.*, 2004; revisado en Holland 2003). Además, en anfióxos, los tratamientos con RA o antagonista de RA conllevan cambios en la localización de las



neuronas sensoriales epidérmicas, relacionándolo con un control de los genes *Hox* ya que éstos ven alteradas consecuentemente su expresión en los tratamientos con agonista o antagonista.

Este sistema RA-*Hox* controla también el patrón del sistema nervioso central de cordados (Schubert *et al.*, 2006; revisado por Alexander *et al.*, 2009, y Tümpel *et al.*, 2009) lo que implicaría según la teoría de la “epidermis cerebro” que el control del patrón nervioso por un sistema RA-*Hox* fue co-optado junto con la centralización del sistema nervioso. Sin embargo, recientemente ha sido identificado mediante una serie de marcadores moleculares neuronales una estructura homóloga a un SNC en el hemicordado *Ptychodera flava* (Nomaksteinsky *et al.*, 2009), el cordón del cuello y el cordón nervioso ventral, mientras que el sistema difuso neuronal de la epidermis expresa marcadores típicos de un sistema nervioso periférico. Esto llevó a retomar la teoría de que el último ancestro común de bilaterales poseía un SNC, y lo que habría ocurrido sería una inversión del patrón dorso-ventral en el ancestro de los deuteróstomos (Benito-Gutierrez y Arendt 2009; Nübler-Jung y Arendt 1996). En este trabajo no se ha detectado ningún tipo de expresión epidérmica para los genes *BIHox3*, *-4* y *6*, probablemente debido al uso de sondas no específicas en el caso de la especie americana, como se ha explicado anteriormente. El hecho de que estos genes no se expresen en epidermis es congruente con que las neuronas sensoriales no tienen nada que ver con el desarrollo de un sistema nervioso ni es el remanente de una “epidermis cerebro”. No se han realizado estudios hasta la fecha de un posible papel de los genes Hox en el control de neuronas sensoriales epidérmicas en vertebrados, pero sería un dato necesario para saber si es una rareza del anfioxo, o una característica que adquirió el ancestro de los cordados. El hecho de que la expresión epidérmica de *CiHox1* en *C. intestinalis* se vea alterada también por tratamientos con RA aboga más por lo segundo (Kanda *et al.*, 2009).

### **DESACOPLE DEL CÓDIGO Hox EN CORDADOS Y ROTURA DE LA COLINEARIDAD**

---

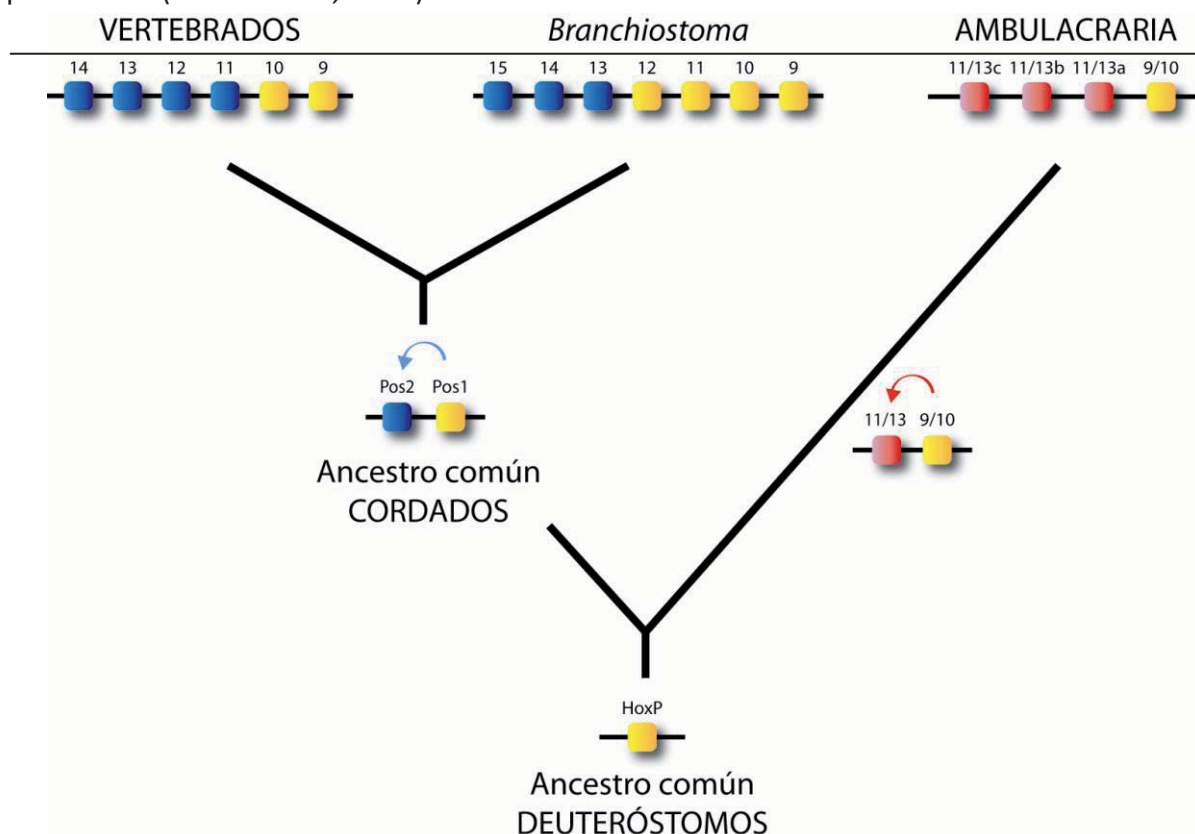
La evolución genómica de los PG posteriores (9-14) es un poco más compleja que la que presentan los genes de los PG anteriores y centrales. Son genes con una tasa de evolución mayor (Ferrier *et al.*, 2000), y la asociación por ortología a los diferentes PG en deuteróstomos no es posible debido a los bajos valores de *bootstrap* que apoyan los análisis, lo que se ha denominado “Flexibilidad Posterior en Deuteróstomos” (Ferrier *et al.*, 2000). Realizar unos análisis filogenéticos más robustos es casi imposible ya que la única región informativa es el homeodominio, de tan sólo 60 aminoácidos.

Sin embargo, la inclusión de nuevos genes como Hox del PG14 de lamprea y tiburón y el Hox15 de anfioxo parece no dar lugar a dudas sobre un origen independiente de los genes posteriores habiéndose originado los diferentes complementos por duplicaciones

específicas (Holland *et al.*, 2008; Kuraku *et al.*, 2008). El clúster ancestral de los vertebrados, anterior a las 2R de duplicación genómica, habría extendido ya los posteriores hasta 14 genes (Kuraku y Meyer 2009). No obstante, si atendemos a los análisis filogenéticos realizados hasta la fecha que incluyen los genes *Hox* de especies representativas de los diferentes grupos de deuteróstomos, se puede observar una tendencia que se repite en cuanto a la forma de agruparse que tienen los genes posteriores (Aronowicz y Lowe 2006; Holland *et al.*, 2008; Kuraku *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2004). En el caso de anfióxico, estos tienden a formar dos agrupaciones, por un lado los genes *Hox9*, -10, -11 y -12 (grupo *amphiHox9/12*) y por otro lado *Hox13*, -14 y -15 (grupo *amphiHox13/15*). Además, estos dos grupos se relacionan filogenéticamente con los posteriores de vertebrados del siguiente modo: *amphiHox9/12* con los genes de los PG9 y PG10 (en amarillo en la Figura D.3), y *amphiHox13/15* con los PG11 a PG14 (en azul en la Figura D.3). Los genes de urocordados se asocian de una forma más dispersa en los árboles filogenéticos, reflejo de la alta divergencia de sus secuencias. Fuera de los cordados, los genes *Hox* posteriores de hemicordados y equinodermos tienen una historia evolutiva un poco más clara dentro de ambulacraria: había dos genes posteriores, un *Hox9/10* y un *Hox11/13*, y este último dio lugar por duplicaciones independientes a los genes *Hox11/13a*, -*b* y -*c* (Figura D.3). De los posteriores de ambulacraria, los genes *Hox9/10* tienden a agruparse con los del grupo *amphiHox9/12* y PG11-14 de vertebrados. Dados estos datos, podemos pensar que la historia evolutiva de los genes posteriores ocurrió del siguiente modo (ver Figura D.3): el ancestro de deuteróstomos tendría un único gen posterior, *HoxP*, originado directamente del gen posterior del clúster ancestral de urbilateria. Este gen se habría duplicado de forma independiente en el ancestro de ambulacraria y en cordados. En cordados, cada uno de estos dos genes posteriores, *Pos1* y *Pos2*, se duplicaron independientemente para dar lugar a los genes de los grupos *amphiHox9/12* y PG9-10 de vertebrados por un lado, y *amphiHox13/15* y PG11-14 por otro, respectivamente. Tanto los genes *Hox11/13* de ambulacraria como los derivados de *Pos2* en cordados son genes que han divergido a una mayor tasa evolutiva, lo que explicaría que los análisis filogenéticos no sitúen a los genes de ambos linajes en el mismo grupo. Esta mayor divergencia probablemente está asociada a una falta de presión de selección que habrían llevado a la liberación de las constricciones en los posteriores que sí estarían presionando a los genes de grupos anteriores y centrales, y habría permitido una mayor expansión, hasta el *Hox15* genes en anfióxico ó 3 copias de *Hox11/13* en ambulacraria. La expansión del clúster hasta 15 genes dentro de los cefalocordados ha debido darse al menos en el ancestro común del género *Branchiostoma*, y sería necesario estudiar otros géneros para saber si es un carácter del *filum*. Por otro lado, esta falta de presión habría permitido la co-opción hacia una serie de estructuras que supusieron novedades evolutivas, como las extremidades o el sistema genital de los vertebrados, donde la expresión de los genes más posteriores es muy importante; o incluso permitir que se disociasen de un patrón clásico de expresión *Hox*, como el gen *Hox14* de lamprea y tiburón, que ya no se expresan en el sistema nervioso



central o en las aletas mediales o pares, donde sí se expresan el resto de genes Hox posteriores (Kuraku *et al.*, 2008).



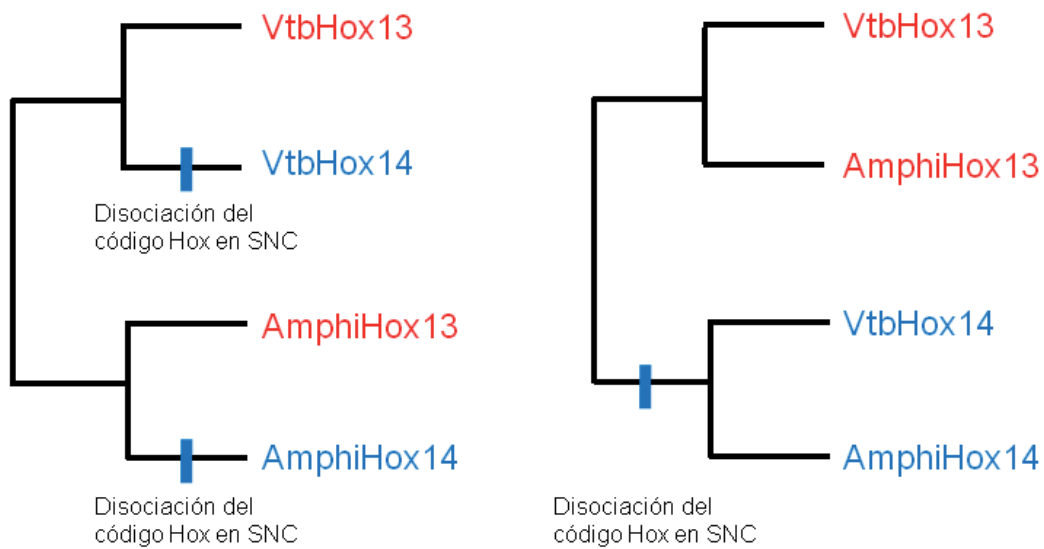
**Figura D.3.** Expansiones de los genes *Hox* posteriores en deuteróstomos. A partir de un único gen *Hox* posterior ancestral se habrían originado todos los genes posteriores en los diferentes grupos de deuteróstomos mediante duplicaciones específicas de cada linaje. En el ancestro de cordados éste se duplicaría para dar un gen *Pos1* (amarillo) y un gen *Pos2* (azul): cada uno de ellos se habría duplicado independientemente en cefalocordados y vertebrados. Los genes originados de las duplicaciones de *Pos1* están en amarillo, y las de *Pos2* en azul. En ambulacraria, otra duplicación habría ocurrido para dar origen al gen *Hox11/13* (rojo) que posteriormente se duplicó dando lugar a las tres copias actuales. Los genes *Hox9/10* de ambulacraria y los derivados de *Pos1* en cordados habrían evolucionado a una tasa más lenta y en los árboles filogenéticos tienden a agruparse.

Como se ha descrito en el apartado de Resultados, la expresión del gen *BIHox14* también se da en una serie de tejidos atípicos a lo que un sistema *Hox* se refiere. En el caso del anfibio, este gen llega a estar expresado en estructuras anteriores, como la vesícula cerebral o el endodermo faríngeo. Esto no hace más que apoyar que una relación de ortología entre los genes posteriores de vertebrados y cefalocordados sea más que dudosa. Si esta relación de ortología fuese real, el escenario evolutivo que explicaría la ausencia de expresión canónica tipo Hox para los genes Hox14 sería más parsimonioso que si no son ortólogos (ver Figura D.4A), pero sin embargo es muy probable que este desacople de algunos genes posteriores haya ocurrido de forma independiente en ambos linajes asociado a la expansión de éstos (ver Figura D.4B). Un tercer escenario sería posible, aquel en el que el gen HoxP ancestral estuviera ya fuera del sistema Hox. Sin embargo, las

expresiones canónicas de la mayoría de los genes posteriores de vertebrados y los genes *Hox12* y *-15* de anfióxos hacen descartar esta hipótesis, y el gen *Hox* posterior ancestral debió expresarse canónicamente de forma colinear, tanto espacial como temporalmente, con los otros genes del clúster. El hecho de que las expresiones de los genes posteriores no

A. DUPLICACIÓN INDEPENDIENTE

B. ORTÓLOGOS



sean colineares y que no se puedan establecer regiones molecularmente homólogas apoya el origen independiente de los genes posteriores en deuteróstomos.

**Figura D.4.** Posibles escenarios evolutivos para el desacople de los genes *Hox14* del código *Hox*. (A) Si como se discute en esta tesis doctoral, los genes *Hox14* se crearon por duplicaciones independientes, entonces la disociación del código *Hox* ha tenido que ocurrir dos veces en la evolución, mientras que (B) si son ortólogos, esta habría ocurrido en el ancestro de los cordados.

**LA REGULACIÓN DE LOS GENES HOX POR ÁCIDO RETINÓICO ES ANCESTRAL A TODOS LOS GRUPOS**

El ácido retinóico es un morfógeno de vital importancia en el desarrollo de cordados, y probablemente de todos los organismos bilaterales (Albalat 2009). Durante el desarrollo de los vertebrados es muy importante para la correcta formación tanto del cerebro posterior (rombencéfalo) como para el control del proceso de somitogénesis, que en último término dará estructuras tan importantes de los vertebrados como las vértebras o la musculatura de las extremidades pares (revisado por Alexander *et al.*, 2009). En el caso del anfióxos, el papel del RA en el desarrollo ha sido ampliamente estudiado, y se ha demostrado que controla directamente algunos de los genes *Hox*, como *B1Hox1*, con un rol fundamental en la correcta localización de las neuronas sensoriales en la epidermis (Schubert *et al.*, 2004) o en el establecimiento del límite posterior de la epidermis (Schubert *et al.*, 2005), o también

el resto de genes anteriores en el desarrollo del sistema nervioso central (Schubert *et al.*, 2006).

Sin embargo, la regulación por RA no es exclusiva de los genes Hox de los grupos anteriores. Un exceso de concentración de *all-trans*-RA durante la gastrulación del anfibio también afecta a la expresión de genes de los grupos posteriores, como el *BfHox14*. Sin embargo, la regulación se da exclusivamente en la notocorda y la parte media-posterior del intestino. Esto indica que los elementos reguladores que controlan la expresión en la faringe son independientes de los que controlan la expresión en las estructuras anteriores, demostrando la modularidad regulativa de estos genes. Sin embargo, es llamativo que cualquier tipo de variación en la concentración de RA implique la pérdida de expresión en la vesícula cerebral. Obviamente esta expresión está regulada por RA, pero no parece involucrar a los elementos de respuesta a RA de los que se habló en el apartado de Introducción, por lo que podría implicar un sistema muy sensible a la concentración de RA y que no implicase al heterodímero RAR/RXR.

El hecho de que tanto la expresión de los genes Hox de los grupos anteriores como posteriores esté regulada por RA-RAR/RXR implica que dicha regulación es muy ancestral, hasta tal punto de que tuvo que estar presente en el gen Hox ancestral que dio origen al clúster (ProtoHox; Garcia-Fernández 2005). Recientemente, se ha comprobado que los genes ParaHox de anfibio también se encuentran regulados por RA mediante elementos de respuesta a RA (Osborne *et al.*, 2009), lo que demuestra por tanto que esta regulación estuvo presente en el clúster ProtoHox sugerido por (Garcia-Fernández 2005) que dio origen tanto al clúster Hox como ParaHox. Por tanto podría pensarse que el sistema RA-Hox habría desaparecido durante la evolución de los protóstomos posteriormente, pero esto parece algo cada vez menos claro, puesto que se han identificado recientemente elementos de la ruta de biosíntesis del RA en este grupo, que podría tener algún papel en la formación del eje A-P, dejando de ser una exclusividad de cordados como se pensaba hasta ahora (revisado por Albalat 2009).

### **SUBFUNCIONALIZACIÓN DE LOS GENES HOX DURANTE LA EVOLUCIÓN DE LOS VERTEBRADOS**

---

Los análisis de “phylogenetic footprinting” permiten estrechar el marco de elementos reguladores funcionales en las secuencias intergénicas mediante la identificación de secuencias conservadas no-codificantes (SCNCs; revisado por Wasserman y Sandelin 2004). Mediante esta estrategia, en esta tesis se ha llevado a cabo un análisis comparativo genómico entre dos especies hermanas de anfibio. Se han alineado las regiones intergénicas *upstream* y *downstream* de los genes *BfHox* con las de los genes *BfHox*

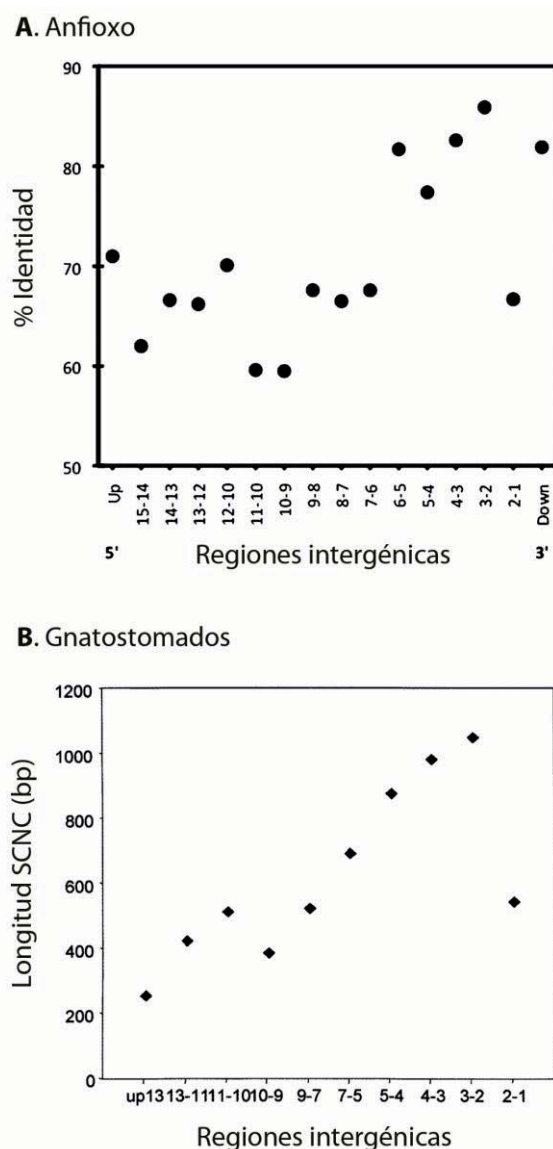
(aproximadamente 15Kb de secuencia genómica por cada gen, incluyendo el marco abierto de lectura) usando el paquete de software mVISTA.

Sorprendentemente, las regiones intergénicas están extremadamente conservadas entre las dos especies de anfibio a pesar de haber divergido hace aproximadamente 70 millones de años (Kon *et al.*, 2007; Nohara *et al.*, 2005). El porcentaje de identidad entre las regiones intergénicas es de una media del 70%, con algunas regiones que pueden alcanzar más del 80%, como un fragmento de ~5 Kb entre los genes *BIHox2* y *BIHox3*, lo que sugiere que estas regiones deben estar bajo restricciones funcionales. El análisis realizado en esta tesis comprende el primer análisis genómico comparativo entre dos especies de anfibio realizado hasta la fecha.

Una tendencia llamativa es la de que las regiones intergénicas que hay entre los genes situados en el extremo 3' están mejor conservadas que las que están en el extremo 5' (ver Figura D.5). En el caso de los clústeres de vertebrados, se ha observado una tendencia similar entre los extremos 3' y 5' (Santini *et al.*, 2003). Estos investigadores sugirieron que esta conservación diferencial entre las partes anterior y posterior del clúster podría deberse al hecho de que los genes *Hox* anteriores y centrales están involucrados en el desarrollo del cerebro posterior, mientras que los genes posteriores lo están en el desarrollo de estructuras quizá con menores restricciones, como las extremidades pares. En el anfibio ocurre lo mismo, los genes anteriores se encargan del patrón del SNC (Schubert *et al.*, 2006; Wada *et al.*, 1999; resultados propios de esta tesis). Este tipo de tendencia es congruente con lo discutido en el apartado anterior. Esto es un claro reflejo de la tendencia evolutiva de los genes del extremo 5' de los clústeres, con una mayor tasa evolutiva y sin restricciones selectivas para ser co-optados junto con la aparición de nuevas estructuras, ya que las mutaciones en las regiones reguladoras que controlan la expresión de los genes anteriores deben estar bajo presiones de selección positivas muy fuertes en comparación con las de genes posteriores.

También se ha realizado la comparación de las secuencias de las dos especies de anfibio con las de humano usando mVISTA. En este caso identificamos hasta 75 elementos conservados entre ambas especies de anfibio y al menos un clúster de humano, aunque en algunos casos encontramos conservación con más de un clúster, usando condiciones no restrictivas. Sin embargo, varias de estas regiones conservadas están localizadas muy próximas al inicio del gen, por lo que probablemente representan elementos de los promotores o regiones UTR (no traducidas).

El hecho de que algunos de estos elementos estén conservados con más de un clúster sugiere una conservación funcional del papel de éstos. De este modo, podemos suponer que las regiones reguladoras presentes diferencialmente en los clústeres de vertebrados son el resultado de una eliminación diferencial de éstos, lo que dio lugar a un proceso de



**Figura D.5.** Grado de conservación a lo largo del clúster entre las dos especies de anfibio (A) medida por el porcentaje de identidad de las regiones intergénicas, y entre diferentes especies de gnatostomados (B), medida por la longitud de las secuencias conservadas no codificantes. En ambos casos puede observarse como a hacia la parte 5' del clúster, la conservación decrece. Datos de B extraídos de Santini *et al.*, 2003.

subfuncionalización según el modelo de duplicación-degeneración-complementación (Force et al., 1999).

Si pudiéramos reunir todas las regiones reguladoras de todos los genes de un PG seguramente obtendríamos una región reguladora muy similar a la del gen ortólogo de anfibio. En este sentido, el trabajo de (Tvrdik y Capecchi 2006) demuestran que cualquiera de las proteínas HOXA1 o HOXB1 son capaces de rescatar los fenotipos de cualquiera de los *knock-outs* de estos genes, ya que una secuencia que comprenda ambas regiones reguladoras es suficiente para dirigir la expresión de un gen en los territorios de ambos. Esto demuestra claramente que durante la evolución de los vertebrados, y después de las duplicaciones genómicas, un fuerte proceso de subfuncionalización ha ocurrido. En este sentido las regiones conservadas entre anfibio y pez cebra que se han encontrado en esta tesis que dirigen la expresión de un gen *reporter* en territorios típicos del gen endógeno, demuestra que el clúster de anfibio posee elementos reguladores aún presentes y distribuidos entre los parálogos de vertebrados. Todo esto demuestra que estos elementos reguladores estaban ya presentes en

el ancestro común de cordados. El estudio de la regulación en animales más basales como hemicordados nos ayudará a saber cuáles de estos elementos estaban ya presentes en un clúster ancestral de deuterostomos o incluso en urbilateria, y cuáles son novedades que adquirieron los cordados durante su evolución.

En definitiva, los resultados de esta tesis doctoral ponen de manifiesto la importancia del clúster Hox de anfioxo para desenredar el complemento regulador del clúster ancestral de cordados, y poder entender mejor nuestro propio origen.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Albalat R. 2009. The retinoic acid machinery in invertebrates: ancestral elements and vertebrate innovations. *Mol. Cell Endocrinol.* 313:23-35
- Alexander T, Nolte C, Krumlauf R. 2009. *Hox* genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 25:431-56
- Aronowicz J, Lowe CJ. 2006. Hox gene expression in the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii* and the evolution of deuterostome nervous systems. *Integr. Comp. Biol.* 46:890-901
- Benito-Gutierrez E, Arendt D. 2009. CNS evolution: new insight from the mud. *Curr. Biol.* 19:R640-2
- Cohn MJ. 2002. Evolutionary biology: lamprey Hox genes and the origin of jaws. *Nature* 416:386-7
- Ferrier DEK, Minguillon C, Holland PWH, Garcia-Fernandez J. 2000. The amphioxus Hox cluster: deuterostome posterior flexibility and Hox14. *Evol Dev* 2:284-93
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J. 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151:1531-45
- Fuentes M, Benito È, Bertrand S, Paris M, Mignardot A, *et al.*,. 2007. Insights into spawning behavior and development of the european amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *J Exp Zoolog B Mol Dev Evol* 308B:484-93
- Garcia-Fernàndez J. 2005. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat. Rev. Genet.* 6:881-92
- Hoegg S, Meyer A. 2005. *Hox* clusters as models for vertebrate genome evolution. *Trends Genet.* 21:421-4
- Holland LZ, Albalat R, Azumi K, Benito-Gutiérrez E, Blow MJ, *et al.*,. 2008. The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res.* 18:1100-11
- Holland ND. 2003. Early central nervous system evolution: an era of skin brains? *Nat. Rev. Neurosci.* 4:617-27
- Holland PWH, Garcia-Fernàndez J. 1996. Hox genes and chordate evolution. *Dev. Biol.* 173:382-95
- Kanda M, Wada H, Fujiwara S. 2009. Epidermal expression of Hox1 is directly activated by retinoic acid in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev. Biol.* 335:454-63
- Kessel M, Gruss P. 1991. Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of *Hox* codes induced by retinoic acid. *Cell* 67: 89-104
- Kon T, Nohara M, Yamanoue Y, Fujiwara Y, Nishida M, Nishikawa T. 2007. Phylogenetic position of a whale-fall lancelet (Cephalochordata) inferred from whole mitochondrial genome sequences. *BMC Evolutionary Biology* 7:127
- Kuraku S, Meyer A. 2009. The evolution and maintenance of *Hox* gene clusters in vertebrates and the teleost-specific genome duplication. *Int. J. Dev. Biol.* 53:765-73
- Kuraku S, Takio Y, Tamura K, Aono H, Meyer A, Kuratani S. 2008. Noncanonical role of Hox14 revealed by its expression patterns in lamprey and shark. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*:0710947105

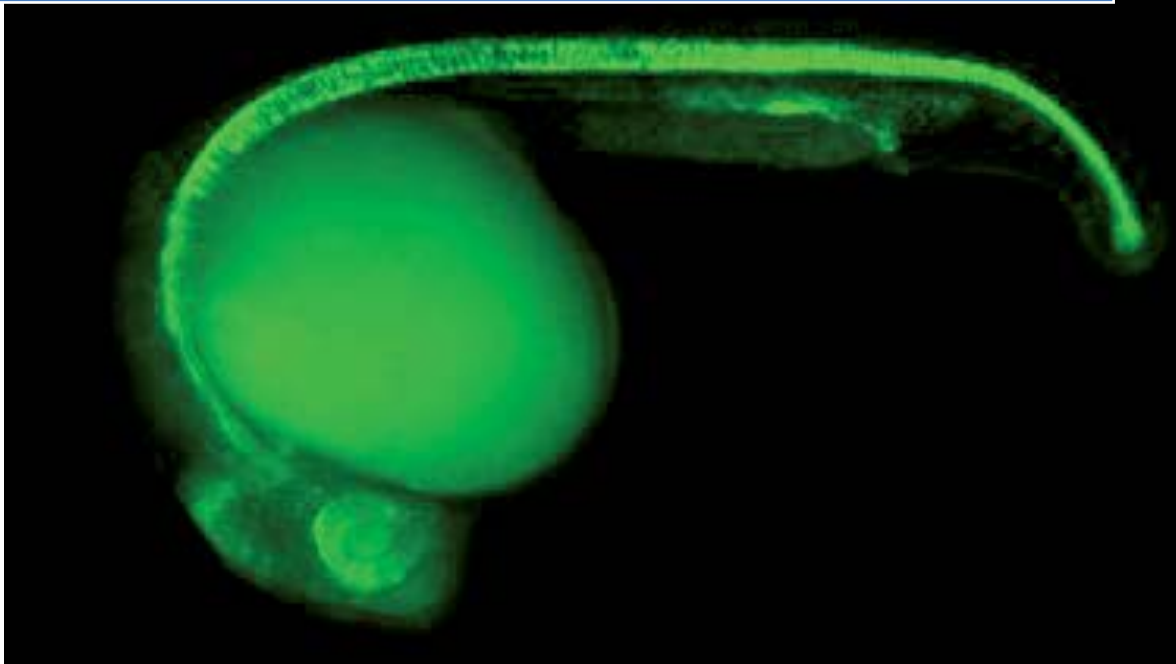


- Lowe CJ, Wu M, Salic A, Evans L, Lander E, *et al.*,. 2003. Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* 113:853-65
- Nohara M, Nishida M, Miya M, Nishikawa T. 2005. Evolution of the mitochondrial genome in cephalochordata as inferred from complete nucleotide sequences from two epigonichthys species. *J. Mol. Evol.* 60:526-37
- Nomaksteinsky M, Rottinger E, Dufour HD, Chettouh Z, Lowe CJ, *et al.*,. 2009. Centralization of the deuterostome nervous system predates chordates. *Curr. Biol.* 19:1264-9
- Nübler-Jung K, Arendt D. 1996. Enteropneusts and chordate evolution. *Curr. Biol.* 6:352-3
- Osborne PW, Benoit G, Laudet V, Schubert M, Ferrier DE. 2009. Differential regulation of *ParaHox* genes by retinoic acid in the invertebrate chordate amphioxus (*Branchiostoma floridae*). *Dev. Biol.* 327:252-62
- Putnam NH, Butts T, Ferrier DE, Furlong RF, Hellsten U, *et al.*,. 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453:1064-71
- Santini S, Boore JL, Meyer A. 2003. Evolutionary conservation of regulatory elements in vertebrate *Hox* gene clusters. *Genome Res.* 13:1111-22
- Schubert M, Holland ND, Escriva H, Holland LZ, Laudet V. 2004. Retinoic acid influences anteroposterior positioning of epidermal sensory neurons and their gene expression in a developing chordate (amphioxus). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:10320-5
- Schubert M, Holland ND, Laudet V, Holland LZ. 2006. A retinoic acid-*Hox* hierarchy controls both anterior/posterior patterning and neuronal specification in the developing central nervous system of the cephalochordate amphioxus. *Dev. Biol.* 296:190-202
- Schubert M, Yu JK, Holland ND, Escriva H, Laudet V, Holland LZ. 2005. Retinoic acid signaling acts via *Hox1* to establish the posterior limit of the pharynx in the chordate amphioxus. *Development* 132:61-73
- Seo H-C, Edvardsen RB, Maeland AD, Bjordal M, Jensen MF, *et al.*,. 2004. Hox cluster disintegration with persistent anteroposterior order of expression in *Oikopleura dioica*. *Nature* 431:67-71
- Shimeld SM, Holland PWH. 2000. Vertebrate innovations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:4449-52
- Somorjai I, Bertrand S, Camasses A, Haguenaer A, Escriva H. 2008. Evidence for stasis and not genetic piracy in developmental expression patterns of *Branchiostoma lanceolatum* and *Branchiostoma floridae*, two amphioxus species that have evolved independently over the course of 200 Myr. *Dev. Genes Evol.* 218:703-13
- Swalla BJ. 2006. Building divergent body plans with similar genetic pathways. *Heredity* 97:235-43
- Tümpel S, Wiedemann LM, Krumlauf R. 2009. *Hox* genes and segmentation of the vertebrate hindbrain. *Curr. Top. Dev. Biol.* 88:103-37
- Tvrđik P, Capecchi MR. 2006. Reversal of *Hox1* gene subfunctionalization in the mouse. *Dev. Cell* 11:239-50
- Wada H, Garcia-Fernández J, Holland PWH. 1999. Colinear and segmental expression of amphioxus *Hox* genes. *Dev. Biol.* 213:131-41
- Wasserman WW, Sandelin A. 2004. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat. Rev. Genet.* 5:276-87





# CONCLUSIONES



Juan Pascual Anaya

LOS COMPLEJOS *Hox* COMO MODELOS DE EVOLUCIÓN GENÓMICA EN CORDADOS: CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CLÚSTER *Hox* EN EL ANFIOXO EUROPEO



# CONCLUSIONES

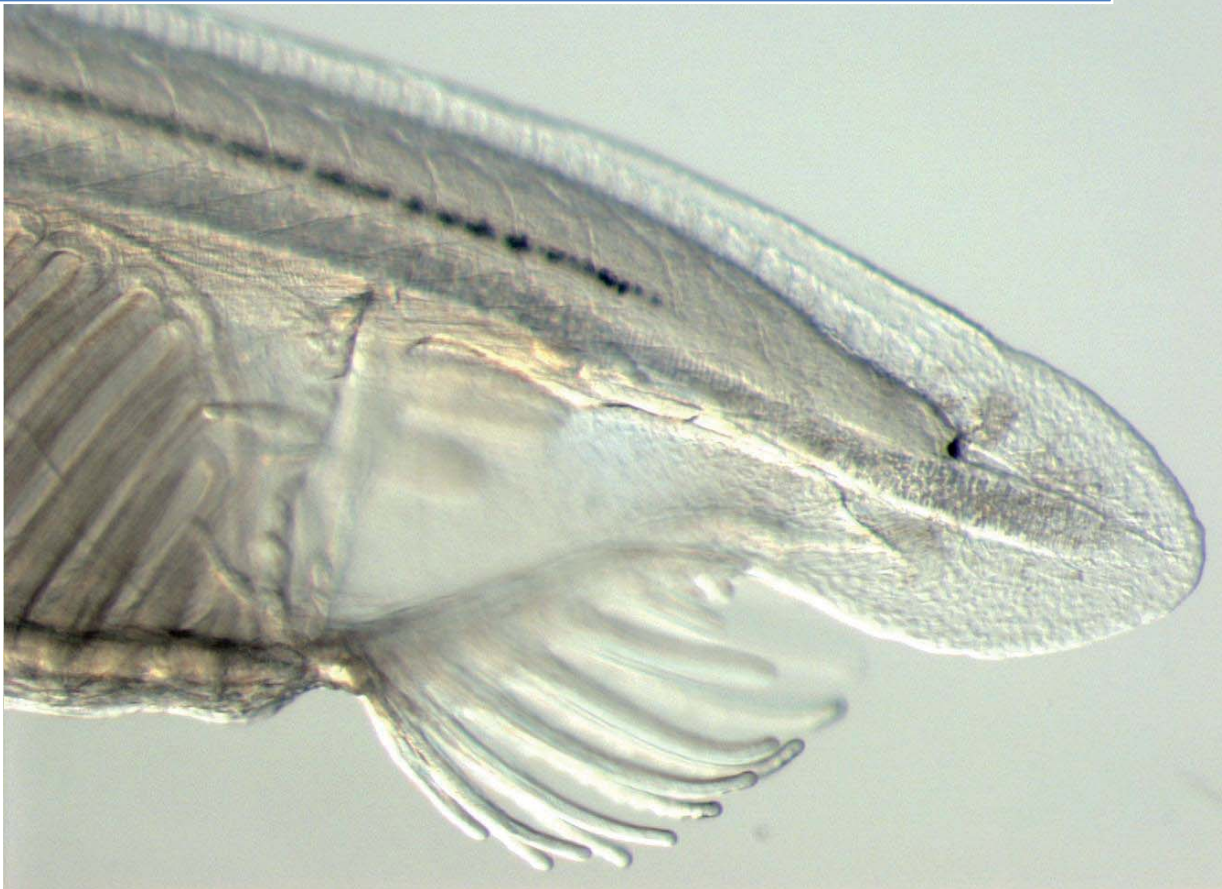
---

El análisis global de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral conduce a las siguientes conclusiones:

- ✚ La especie europea de anfiexo, *Branchiostoma lanceolatum*, posee 15 genes Hox, al igual que su especie hermana *Branchiostoma floridae*, muy probablemente ligados en un único clúster genómico, que al menos el ancestro de *Branchiostoma*, poseyera un único complejo de tales características.
- ✚ El clúster *Hox* de anfiexo, al igual que el de la mayoría de vertebrados exceptuando los reptiles, es restrictivo a la presencia de elementos repetitivos.
- ✚ Las regiones intergénicas situadas hacia la parte 3' del complejo están en general más conservadas que aquellas situadas en el extremo 5' en anfiexo. Esta tendencia es del mismo tipo en gnatostomados, por lo que prueba que la parte posterior del clúster del ancestro de cordados era más flexible que la parte anterior.
- ✚ Se han identificado hasta 75 elementos conservados entre ambas especies de anfiexo y al menos un clúster Hox de humano. Algunos de ellos están conservados en más de un clúster. Seguramente el patrón de los elementos conservados en los clúster de humano son el resultado de un proceso de subfuncionalización de los diferentes genes según un modelo de duplicación-degeneración-complementación.
- ✚ Además, para algunos de estos elementos conservados se ha demostrado en esta tesis una conservación funcional, ya que algunos de las regiones alrededor del gen *Hox4* de anfiexo son capaces de dirigir la expresión de GFP en embriones de pez cebra en regiones donde se expresan los parálogos endógenos.
- ✚ Probablemente los genes Hox posteriores se han originado por duplicaciones independientes en tándem en ambulacraria, cefalocordados y vertebrados.
- ✚ El gen *BIHox6* tiene un patrón de expresión diferente al encontrado en su ortólogo *BfHox6*. Probablemente esta diferencia se deba a la sonda utilizada en *B. floridae*, ya que la inclusión de la secuencia del homeobox en ésta puede llevar a un error en la hibridación *in situ*.
- ✚ Los patrones de expresión para los genes Hox de los grupos centrales y posteriores rompen claramente la colinearidad espacial y temporal descrita en vertebrados.
- ✚ El gen *BIHox14* se expresa de manera muy diferente a la esperada para un gen de la subfamilia Hox: se ha detectado en estructuras muy anteriores, como la vesícula cerebral y el endodermo faríngeo, pero no en la parte posterior del sistema nervioso central.

- ✚ La expresión de *BlHox14* en tubo digestivo y notocorda se encuentra regulada por ácido retinóico a través de receptores de retinoides, RAR y RXR. La expresión en endodermo faríngeo no depende de ácido retinóico, mientras que en la vesícula cerebral sus concentraciones deben estar finamente reguladas y es independiente de RAR.

# APÉNDICES



Juan Pascual Anaya

LOS COMPLEJOS *Hox* COMO MODELOS DE  
EVOLUCIÓN GENÓMICA EN CORDADOS:  
CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LA  
EXPRESIÓN DEL CLÚSTER *Hox* EN EL  
ANFIOXO EUROPEO



# APÉNDICES

---

## ARTÍCULO AI

---

### RESUMEN

Los cordados están formados por vertebrados, urocordados y cefalocordados. Estos últimos, o anfioxos, representan el grupo más basal. En este estudio, usando técnicas de HPLC, se han detectado L- aminoácidos libres y ácido D-aspártico en el sistema nervioso del anfioxo *Branchiostoma lanceolatum*. Entre otros aminoácidos, glutamato, aspartato, glicina, alanina y serina son los aminoácidos encontrados a mayores concentraciones. Como ocurre en el sistema nervioso de otros animales, el glutamato (L-Glu) y el aspartato (L-Asp) están presentes a muy altas concentraciones en el sistema nervioso del anfioxo comparado con otros aminoácidos, mientras que las concentraciones de taurina y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) son muy bajas. Es de reseñar, que como en vertebrados, el ácido D-aspártico está presente como componente endógeno en el anfioxo. En este trabajo se discute el papel fisiológico de los aminoácidos excitadores, y del ácido D-aspártico en particular, en términos de la evolución del sistema nervioso.

## **INFORME DE LOS DIRECTORES SOBRE CONTRIBUCIÓN DEL CANDIDATO EN PUBLICACIONES CON MÁS FIRMANTES**

El artículo está firmado exclusivamente por el doctorando y uno de sus dos directores de tesis, que dirigió el proyecto, por tanto la contribución material del doctorando fue el 100%

Los directores,

Dr. Jordi Garcia Fernández

Dr. Salvatore D’Aniello

Barcelona, a 10 de MARZO de 2010



ARTÍCULO A.I

- **Pascual-Anaya, J.**, D'Aniello, S. (2006) Free amino acids in the nervous system of the amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. A comparative study. *Int J Biol Sci*, **2**(2):87-92.

# APÉNDICES

---

## ARTÍCULO AII

---

### RESUMEN

Las proteínas tirosina quinasas (TKs) desempeñan un papel fundamental en el comportamiento celular y el desarrollo de los animales. La expansión de esta superfamilia se considera un evento clave en la evolución de las complejas vías de señalización y las redes génicas en metazoos y es un ejemplo de cómo el barajado de módulos protéicos puede generar novedades moleculares. Usando la estructura intrón/exón del dominio TK (código intrónico de TK) como herramienta complementaria para la asignación de ortología y paralogía, se han identificado y estudiado 118 proteínas TK del genoma del anfibio *Branchiostoma floridae* para elucidar la evolución de la familia de genes TK en los metazoos, y los cordados en particular. A diferencia de todos los metazoos analizados hasta la fecha, el anfibio posee miembros de todas las familias de TK, sin ninguna pérdida. En un contexto evolutivo, junto con los datos del cnidario *Nematostella vectensis*, el equinodermo *Strongylocentrotus purpuratus*, y la ascidia *Ciona intestinalis*, se sugieren nuevas historias evolutivas para las diferentes familias de TK y se esboza un nuevo marco global de pérdidas y ganancias de genes en diferentes *filas*. Sorprendentemente, este estudio detecta también expansiones sin precedentes de un grupo de familias de TK estrechamente relacionadas, incluyendo TIE, FGFR, PDGFR, y RET, debido probablemente a duplicaciones génicas masivas y barajado de exones. Basado en una estructura intrón/exón muy similar dentro del dominio TK, se sugiere que este grupo de familias de TK constituye una súperfamilia que se ha denominado EXpanding TK, por su peculiar propensión a la duplicación génica y el barajado de exones, no sólo en anfibio si no en todos los grupos de metazoos. Debido a esta extrema tendencia tanto a la retención como a la expansión de genes TK, el anfibio posee el repertorio de TKs más diverso entre los metazoos estudiados hasta ahora, reteniendo la mayoría de los genes del complemento de sus ancestros, pero habiendo evolucionado su propio repertorio de novedades genéticas.

## **INFORME DE LOS DIRECTORES SOBRE CONTRIBUCIÓN DEL CANDIDATO EN PUBLICACIONES CON MÁS FIRMANTES**

Este trabajo consiste en el análisis detallado de una gran superfamilia génica en el genoma de anfibio, imposible para un solo autor. El doctorando clasificó, depuró, anotó, y realizó análisis filogenéticos de diversas familias, la mayor de ellas la representada por el grupo TIE. El artículo se incluyó en la tesis doctoral de Senda Jiménez, otro miembro del equipo que se ocupó de otras familias de TyrK.

Los directores,

Dr. Jordi Garcia Fernàndez

Dr. Salvatore D'Aniello

Barcelona, a 10 de MARZO de 2010

## ARTÍCULO A.II

- D'Aniello, S. \*, Irimia, M. \*, Maeso, I. \*, **Pascual-Anaya, J.**, Jiménez-Delgado, S., Bertrand, S., Garcia-Fernández, J. (2008) Gene expansion and retention leads to a diverse tyrosine kinase superfamily in amphioxus. *Mol Biol Evol*, **25**(9):1841-54.

# APÉNDICES

---

## *ARTÍCULO AIII*

---

### **RESUMEN**

El cefalocordado anfioxo ha sido históricamente considerado el organismo vivo más cercano que mejor representa la condición ancestral de los vertebrados. Recientemente, su posición filogenética ha cambiado, siendo representante del grupo más basal de cordados. Los análisis preliminares de su genoma, recientemente publicado, y nos empiezan a ayudar a entender la evolución genómica de los deuteróstomos. El desarrollo embrionario del anfioxo y su plan corporal parece haber quedado en una especie de estasis evolutivo desde que el linaje de cefalocordados divergió del ancestro de cordados hace aproximadamente 500 millones de años. Por el contrario, la investigación con anfioxo avanza rápidamente; en Europa, gracias a la cooperación y a la estación oceanográfica de Banyuls-sus-mer (Francia), se pueden obtener embriones de anfioxo bajo demanda en las temporadas de freza. En esta revisión se resume el progreso del laboratorio de Barcelona sobre la manipulación experimental de los embriones de anfioxo, con el objetivo de adentrarse en la era de la Evo-Devo experimental.

## **INFORME DE LOS DIRECTORES SOBRE CONTRIBUCIÓN DEL CANDIDATO EN PUBLICACIONES CON MÁS FIRMANTES**

En este trabajo el doctorando realizó en exclusiva los trabajos sobre el complejo *Hox* que se incluyen, así como colaboró en el desarrollo del cultivo y manipulación de anfibio en el laboratorio. Este artículo se incluye en la tesis doctoral de Senda Jiménez-Delgado, que realizó los experimentos con el gen *hairy* que aparecen en él.

Los directores,

Dr. Jordi Garcia Fernàndez

Dr. Salvatore D'Aniello

Barcelona, a 10 de MARZO de 2010

### ARTÍCULO A.III

- Garcia-Fernàndez, J., Jiménez-Delgado, S., **Pascual-Anaya, J.**, Maeso, I., Irimia, M., Minguillon, C., Benito-Gutiérrez, E., Gardenyes, J., Bertrand, S., D'Aniello, S. (2008) From the American to the European amphioxus: towards experimental Evo-Devo at the origin of chordates. *Int J Dev Biol.* 53(8-10):1359-66.

# APÉNDICES

---

## ARTÍCULO AIV

---

### RESUMEN

El cefalocordado anfióxico (*Branchiostoma* sp.) es un importante modelo animal para el estudio de los mecanismos de desarrollo de cordados. La obtención de embriones es un paso clave para estos estudios. Se ha demostrado que un incremento de 3-4° C en la temperatura del agua provoca la freza de los gametos de la especie europea de anfióxico (*Branchiostoma lanceolatum*) en cautividad, pero sin embargo, se conoce muy poco sobre la freza en la naturaleza. En este trabajo, se ha seguido el comportamiento de freza del anfióxico europeo durante dos temporadas (2004 y 2005), ambos en el campo y en cautividad. Se demuestra que la freza de los animales en el campo se produce aproximadamente desde mediados de mayo hasta principios de julio, pero dependiendo del año, los animales muestran diferentes patrones. Así pues, incluso aunque la temperatura es un factor importante en la naturaleza, no es la fuerza mayor. Además, describimos mejoras en la metodología utilizada para la inducción de freza en el laboratorio (e. g.: mantenimiento, control por ciclo circadiano e inducción en el laboratorio sin necesidad de tener un sistema corriente de agua marina). Estos estudios tienen importantes implicaciones para el cultivo del anfióxico y para mejorar las técnicas de laboratorio para desarrollar al anfióxico como modelo animal de experimentación.



## **INFORME DE LOS DIRECTORES SOBRE CONTRIBUCIÓN DEL CANDIDATO EN PUBLICACIONES CON MÁS FIRMANTES**

El trabajo publicado es el resultado de una colaboración entre los laboratorios europeos, liderados por Jordi Garcia-Fernàndez, Ricard Albalat, Vincent Laudet, Philippe Vernier y Héctor Escriva, que constó en que, durante tres años, en la primavera-verano, miembros de los diferentes laboratorios se desplazaban a Banyuls-sur-mer (Francia) para estudiar el comportamiento reproductivo del anfioxo, e intentar su reproducción en cautividad. En concreto, el candidato estuvo un mes cada año, instalando, siguiendo, y optimizando la reproducción en cautividad. El artículo publicado, compendio de los resultados obtenidos por todos los equipos en dos años, no puede dividirse en partes aportadas por cada participante, pues todos ellos participaron conjuntamente. Asimismo, el doctorando optimizó el cultivo, el cambio de ciclo noche/día, y la reproducción del anfioxo en el laboratorio de Barcelona, datos que aparecen en el artículo. El artículo se incluyó en la tesis doctoral de Senda Jiménez Delgado, otro miembro del equipo que colaboró en igual medida en los trabajos que dieron lugar al artículo.

Los directores,

Dr. Jordi Garcia Fernàndez

Dr. Salvatore D'Aniello

Barcelona, a 10 de MARZO de 2010

#### ARTÍCULO A.IV

- Fuentes, M., Benito, E., Bertrand, S., Paris, M., Mignardot, A., Godoy, L., Jimenez-Delgado, S., Oliveri, D., Candiani, S., Hirsinger, E., D'Aniello, S., **Pascual-Anaya, J.**, Maeso, I., Pestarino, M., Vernier, P., Nicolas, J.F., Schubert, M., Laudet, V., Genevieve, A.M., Albalat, R., Garcia-Fernández, J., Holland, N.D., Escriva, H. (2007) Insights into spawning behavior and development of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, **308**(4):484-93.

# APÉNDICES

---

## ARTÍCULO AV

---

### RESUMEN

El descubrimiento de que la mayoría de los genes reguladores estaban conservados entre animales de *fila* puso en duda la idea de que la duplicación génica y la posterior divergencia de las secuencias codificantes homólogas fueran la base para los mayores cambios morfológicos en la evolución de los metazoos. Recientemente, sin embargo, ha crecido el interés por los papeles, la conservación y los cambios de las regiones no-codificantes en paralelo con la publicación creciente de los diferentes proyectos genomas.

Hasta la fecha, muchos estudios están resaltando la importancia que los cambios en en las regiones reguladoras en *cis* tienen en la evolución de la morfología a lo largo del reino animal. En este trabajo mostramos y discutimos algunos de estos estudios, y subrayamos el futuro de la investigación en *cis*-Evo-Devo.

Sin embargo, también exploramos cómo la duplicación genómica, que incluye la duplicación de las regiones reguladoras, pueden haber sido críticas para la co-opción espacial o temporal de nuevas redes reguladoras, causando el despliegue de nuevos escenarios transcriptómicos, y como estos pueden inducir cambios morfológicos que fueron cruciales para la evolución de nuevas formas. Cuarenta años después de la famosa frase de Susumu Ohno 'la selección natural simplemente modifica, mientras que la redundancia crea', se sugiere la alternativa 'la selección natural simplemente modifica, mientras que la redundancia de las regiones reguladoras en *cis* innovan', y se propone el modelo de Duplicación-Degeneración-Innovación para explicar el incremento de evolvabilidad de las regiones reguladoras en *cis*. Paradójicamente, hacer la regulación más simple mediante la subfuncionalización abre el camino para la vía de una futura complejidad, en otras palabras: hacerlo simple, para hacerlo complejo.

## **INFORME DE LOS DIRECTORES SOBRE CONTRIBUCIÓN DEL CANDIDATO EN PUBLICACIONES CON MÁS FIRMANTES**

En este artículo se plantea un nuevo modelo de evolución de regiones reguladoras. El candidato participó activamente en el planteamiento, elaboración, y discusión del modelo. El artículo no ha sido incluido en ninguna otra tesis doctoral.

Los directores,

Dr. Jordi Garcia Fernàndez

Dr. Salvatore D’Aniello

Barcelona, a 10 de MARZO de 2010

ARTÍCULO A.V

Jiménez-Delgado, S., Pascual-Anaya, J., Garcia-Fernández, J. (2009) Implications of duplicated *cis*-regulatory elements in the evolution of metazoans: the DDI model or how simplicity begets novelty. *Brief Funct Genomic Proteomic*, **8**(4):266-75.