



AÏLLAMENT I CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL
DELS ELEMENTS *PAX6* I *SINEOCULIS* COM A COMPONENTS DE LA
XARXA GÈNICA IMPLICADA EN LA REGENERACIÓ DELS ULLS A PLANÀRIES

Memòria presentada per **David Pineda i Tomàs** per optar al grau de **Doctor en Biologia**.

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció del Doctor Emili Saló i Boix al Departament de Genètica, UB, dins del Programa de Genètica, bienni 1997-1999.

El director,

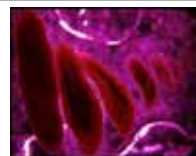
L'autor,

Dr. Emili Saló i Boix

David Pineda i Tomàs

Als meus pares, avis i a
tots els que d'una o altra manera
m'heu ajudat a dur a terme aquest treball

ÍNDEX

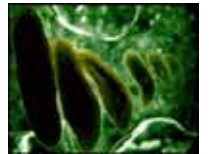


A. INTRODUCCIÓ	1
1. INTRODUCCIÓ GENERAL	1
2. LA PLANÀRIA COM A ORGANISME MODEL	5
2.1 INTRODUCCIÓ	5
2.2 FILOGÈNIA I TAXONOMIA	5
2.3 MORFOLOGIA I ANATOMIA	6
2.4 ELS ULLS A PLATIHELMINTS	9
3. LA REGENERACIÓ A PLANÀRIES	12
3.1 HISTÒRIA	12
3.2 EL MECANISME DE REGENERACIÓ	14
3.2.1 Tancament de la ferida, cicatrització i formació del blastema	14
3.2.2 Progressió de la regeneració	15
3.2.3 Determinació del patró durant la regeneració	16
3.2.4 L'últim pas; la diferenciació cel·lular	17
3.2.5 Molècules inductores de la regeneració	18
3.2.6 Els marcadors moleculars, noves perspectives per a l'estudi de la regeneració	18
3.3 RECANVI CEL·LULAR I LA CAPACITAT DE CREIXEMENT I DECREIXEMENT	20
3.4 LA REGENERACIÓ DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL I ELS ULLS	21
3.4.1 El Sistema Nerviós Central	21
3.4.2 Els Ulls	23
4. ELS GENS PAX. PAX6 I LA MORFOGÈNESI DE L'ULL	24
4.1 INTRODUCCIÓ	24
4.2 LA FAMÍLIA PAX	24
4.3 PAX6. ESTRUCTURA MOLECULAR	25
4.4 PAX6 A DROSOPHILA	26
4.4.1 Aïllament	26
4.4.2 L'ull compost de <i>Drosophila</i>	28
4.4.3 Expressió i funció dels gens <i>Pax6</i> a l'ull de <i>Drosophila</i>	28
4.5 PAX6 A VERTEBRATS	30
4.5.1 L'ull de vertebrats	30
4.5.2 Expressió i funció	31
4.6 PAX6 A ALTRES ORGANISMES MODEL	33
4.6.1 <i>Cnidaris</i>	33
4.6.2 <i>Nemertins</i>	34
4.6.3 <i>Ascídies</i>	34
4.6.4 <i>Annèlids</i>	34
4.6.5 <i>Amfiox</i>	35
5. GENS SIX/SO	36
5.1 INTRODUCCIÓ	36
5.2 ESTRUCTURA MOLECULAR I ANÀLISI FILOGENÈTICA	36
5.3 ELS GENS SIX A INVERTEBRATS	37
5.4 ELS GENS SIX A VERTEBRATS	38

6.	UNA XARXA GÈNICA IMPLICADA EN LA MORFOGÈNESI DELS ULLS	40
6.1	UNA XARXA GÈNICA PER A LA MORFOGÈNESI DE L'ULL COMPOST DE <i>DROSOPHILA</i>	40
6.2	CONSERVACIÓ DE LA XARXA GÈNICA A VERTEBRATS	41
7.	LES OPSINES	44
7.1	INTRODUCCIÓ	44
7.2	L'ORGANITZACIÓ DELS SISTEMES VISUALS	44
7.3	OPSINES. ESTRUCTURA MOLECULAR	45
7.4	CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓ DE LES OPSINES A <i>DROSOPHILA</i>	47
7.5	OPSINES A ALTRES ORGANISMES	48
B.	OBJECTIUS	49
C.	RESULTATS	51
1.	EL GEN <i>GTSO (GTSIX1)</i> ÉS ESSENCIAL PER A LA REGENERACIÓ DE L'ULL A PLANÀRIES	51
1.1	RESUM	51
1.2	ARTICLE 1 : Pineda, D., González, J., Callaerts, P., Ikeo, K., Gehring, W.J. and Saló, E. (2000). Searching for the prototypic eye genetic network: Sineoculis is essential for eye regeneration in planarians. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 25;97(9):4525-9	53
2.	CONSERVACIÓ DE LA XARXA GENÈTICA INICIAL DE L'ULL A PLANÀRIES .	59
2.1	RESUM	59
2.2	ARTICLE 2 : Pineda, D., González, J., Marsal, M. And Saló, E. (2001) Evolutionary conservation of the initial eye genetic pathway in planarians. Belg. J. Zool., 131 (Suplement 1): 77-82	61
3.	LA XARXA GENÈTICA INVOLUCRADA EN LA REGENERACIÓ DELS ULLS A PLANÀRIES ÉS INDEPENDENT DE <i>PAX6</i>	67
3.1	RESUM	67
3.2	ARTICLE 3 : Pineda, D., Rossi, L., Batistoni, R., Salvetti, A., Marsal, M., Gremigni, V., Falleni, A., González, J., Deri, P., Saló, E. (2002). The genetic network of prototypic planarian eyes regeneration is Pax6 independent. Development. 2002 Mar;129(6):1423-34	69
4.	EL GEN <i>GTSIX3</i> S'EXPRESSA A LES BRANQUES CEFÀLIQUES I NO A LES CÈL·LULES DELS ULLS	81
4.1	RESUM	81
4.2	ARTICLE 4 : Pineda, D., Saló, E. (2002). Planarian Gtsix3, a member of the Six/so gene family, is expressed in brain branches but not in eye cells. Mech Dev. 2002 Dec; 119 Suppl 1:S167-71.....	83

D.	DISCUSSIÓ _____	89
1.	ORIGEN I EVOLUCIÓ DELS ULLS	89
2.	GENS IMPLICATS EN LA REGENERACIÓ DELS ULLS A PLANÀRIES	92
2.1	ESTRUCTURA	92
2.1.1	<i>Els gens Pax6 de planàries</i>	92
2.1.2	<i>La família Six/sineoculis</i>	93
2.1.3	<i>Les opsines</i>	93
2.2	EXPRESSIÓ	94
2.2.1	<i>Expressió dels gens Pax6</i>	94
2.2.2	<i>Expressió del gen Gtsix1</i>	95
2.2.3	<i>Expressió del gen Gtsix3</i>	95
2.2.4	<i>Expressió del gen de l'opsina</i>	96
2.2.5	<i>Expressió coordinada en la regeneració del SNC i els Ulls a planàries</i>	96
2.3	FUNCIÓ	97
2.3.1	<i>Pax6</i>	97
2.3.2	<i>Gtsix1</i>	98
2.3.3	<i>Opsina</i>	100
3.	REFLEXIONS SOBRE PAX6 I LA XARXA GÈNICA INVOLUCRADA EN LA MORFOGÈNESI DELS ULLS	101
3.1	EL PARADIGMA DE PAX6 COM A GEN MAJOR DEL DESENVOLUPAMENT DE L'ULL	101
3.2	CONSERVACIÓ DE LA XARXA GÈNICA INICIAL ENTRE VERTEBRATS I INVERTEBRATS	103
3.3	UNA XARXA GÈNICA PLEIOTRÒPICA QUE PARTICIPA EN LA MORFOGÈNESI D'ALTRES ÒRGANS	105
3.4	UPSTREAM DE LA XARXA	107
4.	ÚLTIMS TREBALLS I NOVES PERSPECTIVES.....	109
E.	CONCLUSIONS _____	111
F.	BIBLIOGRAFIA _____	113

A. INTRODUCCIÓ



1. INTRODUCCIÓ GENERAL

L'evolució dels ulls és una qüestió de debat des de "L'origen de les espècies" de Darwin del 1859 on hi dedica un capítol sencer amb l'encapçalament "Dificultats de la teoria". Darwin considerava que un òrgan tant sofisticat com l'ull, capaç d'enfocar a diferents distàncies, regular la intensitat de llum que rep i d'ajustar les aberracions cromàtiques, no podria haver evolucionat per selecció natural moltes vegades de forma independent. Si bé, Darwin, no tenia dificultats per suposar l'evolució dels ulls a partir d'un ull prototípic simple, format per una cèl·lula fotoreceptora i una altra de pigmentada i localitzat a sota d'una epidermis transparent (ull molt similar als observats en alguns platihelminths), sí que tenia dificultats alhora d'explicar la generació d'aquest tipus d'estructures: Com es genera un ull que inicialment no hi veu?

En base a criteris morfològics i atenent als diferents models de desenvolupament dels diversos tipus d'ulls que trobem en l'actualitat, els neodarwinistes van postular que els ulls s'haurien originat, en el curs de l'evolució, múltiples vegades i que tindrien, per tant, un origen polifilètic. Posteriorment, aquests diversos tipus d'ulls inicials haurien evolucionat de manera independent en els diferents *phyla* animals. Tres dels grans *phyla* que apareixen a partir del càmbric; mol·luscs, artròpodes i cordats, han resultat de formes molt diferents el mecanisme de captació de la llum i la seva interpretació en imatges.



Figura 1.1 Alguns exemples que mostren la gran varietat de tipus d'ulls que trobem en el regne animal.

Existeixen ulls sense pupil·les i fins i tot ulls sense lents (Nautilus) però per definició tot ull requereix de cèl·lules especialitzades en el mecanisme de fototransducció. La unitat bàsica d'aquest mecanisme és la **cèl·lula fotoreceptora**, que conté a les seves membranes un fotopigment sensible als fotons. El segon element fonamental de l'ull és la **cèl·lula pigmentària**, que protegeix a la cèl·lula fotoreceptora d'un excés de llum i permet, a la vegada, establir una direccionalitat de la radiació de la llum.

S'han caracteritzat dos tipus de cèl·lules fotoreceptores segons la seva especialització en acumular fotopigment a les seves membranes: **les cèl·lules ciliades** i **les cèl·lules amb microvilli** (que s'agrupen formant els rabdòmers). Tot i

INTRODUCCIÓ

que el tipus ciliat s'associa als Deuteròstoms i el tipus rabdomèric als Protòstoms, hi ha múltiples excepcions i no es pot fer una correlació dins els llinatges filogenètics. A tall d'exemple, dins els plathielmints trobem les planàries marines o Políclads on algunes de les espècies amb desenvolupament indirecte, presenten ulls ciliats en la fase larvària i ulls rabdomèrics en la fase adulta.

Ambdós tipus cel·lulars tenen però en comú el proveir a la cèl·lula fotoreceptora d'una gran superfície on acumular i exposar les molècules fototransductores o fotopigments: les opsines.

Cada fotopigment està constituït per un **grup cromòfor**, el retinol, que s'encarrega de l'absorció de la llum i de l'**opsina** com a component proteic del pigment visual. L'opsina és una proteïna de la família de receptors transmembrana associats a proteïnes G.

L'acoblament de les cèl·lules fotoreceptores amb les cèl·lules pigmentàries ha donat lloc a molts patrons diferents, entre els quals els més comuns són (Figura 1.2):

- **Ulls en càmera**; Les cèl·lules fotoreceptores s'agrupen protegides per les cèl·lules pigmentàries en una cambra comuna. Característics de vertebrats.
- **Ulls compostos**; La unitat bàsica s'anomena omatidi i està format per un nombre reduït d'ambdós tipus cel·lulars. L'agregació de diversos omatidis forma l'ull compost. Característics de molts invertebrats.

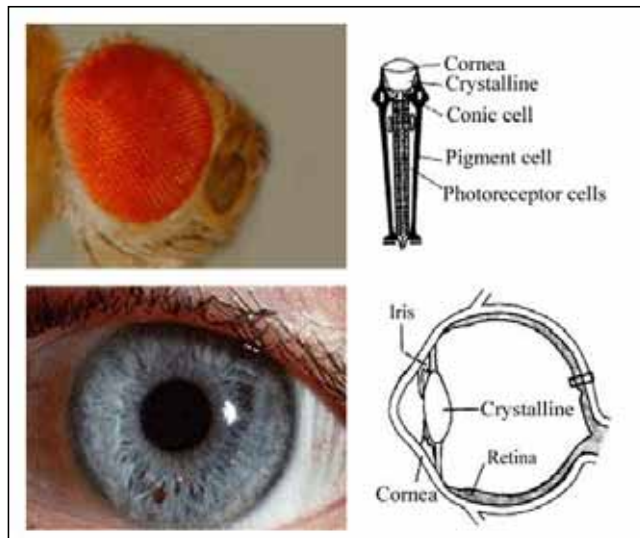


Figura 1.2 Ull compost de *Drosophila* (a dalt, esquerra) que consta de 800 omatidis. Cada omatidi (a dalt, dreta) consta d'una cèl·lula cònica amb la funció de l'iris humà i unes cèl·lules pigmentàries externes que protegeixen d'un excés de llum les cèl·lules fotoreceptores de l'interior. Ull en càmera humà (a baix, esquerra), amb la còrnia, l'iris que protegeix de l'excés de llum, el cristal·lí, encarregat d'enfocar les imatges, i la retina amb els fotoreceptors. Modificat de Saló, 2004.

El mecanisme de fototransducció del senyal lluminós és, també, diferent, i mentre que en vertebrats utilitza el GMP cíclic com a segon missatger, en invertebrats utilitza

l'inositol trifosfat. Fins i tot la resposta fisiològica produïda pel receptor és diferent, ja que provoca una hiperpolarització (tancament de canals de sodi) de la membrana de les cèl·lules ciliades dels vertebrats quan les cèl·lules rabdomèriques dels invertebrats es despolaritzen (obertura dels canals de sodi) en resposta a la llum.

En analitzar l'embriologia i el desenvolupament també veiem clares diferències entre vertebrats i invertebrats, i fins i tot entre els dos tipus d'ull de càmera. Mentre que els ulls dels vertebrats tenen un origen nerviós i epidèrmic amb les cèl·lules fotoreceptores invertides vers la direcció de la llum, els ulls de cefalòpodes i atròpodes tenen un origen exclusivament epidèrmic amb les cèl·lules fotoreceptores evertides vers la llum (Figura 1.3).

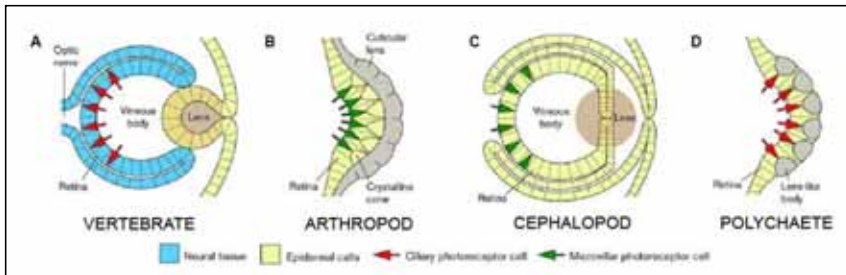


Figura 1.3 Il·lustració simplificada de quatre tipus d'ulls on es representen els diferents orígens embriològics (epidèrmic i nerviós) i els dos tipus de cèl·lules fotoreceptores (ciliats i rabdomèriques). Modificat de Nilsson 1996.

Independentment, la recerca en l'anàlisi genètica del desenvolupament de l'ull a *Drosophila*, vertebrats i altres organismes model ha donat una nova visió a la teoria polifilètica de l'origen dels ulls.

La conservació molecular de la xarxa específica del gen *Pax6* indica el contrari, i ha portat a pensar en un origen monofilètic dels diferents tipus d'ull originats a partir d'un precursor simple i comú a tots els animals; **el proto-ull** (Figura 1.4).

Actualment, l'evolució dels diferents tipus de cèl·lules fotoreceptores s'està dirigint a l'anàlisi comparativa de les múltiples combinatòries dels codis moleculars implicats en la seva morfogènesi. Per altra banda, l'estudi embriològic y genètico-molecular comparatiu de la formació de les estructures oculars ha mostrat l'existència d'una xarxa conservada inicial de la determinació dels ulls. Aquesta nova aproximació Evo-Devo està ajudant a descobrir l'evolució de les cèl·lules fotoreceptores i a la vegada mostra que en la formació dels ulls tot i iniciar-se des d'un ull prototípic, cada *phyla* ha anat incorporant diferents elements en aquesta bastida molecular inicial, fet que ha arribat, en alguns casos, a convergir en solucions similars com és el cas de l'ull en càmera de vertebrats i cefalòpodes. Un altre exemple el trobem entre els ulls compostos d'insectes i crustacis; l'ull compost del bivalb *Arca* està format per una sola cèl·lula fotoreceptora per omatidi mentre que els insectes en presenten entre vuit i nou. Finalment, un darrer exemple és la diversitat de molècules que componen el cristal·lí de les diferents lents. Tots aquest exemples il·lustren l'existència d'una gran diversitat en l'evolució de les diferents formes oculars actuals.

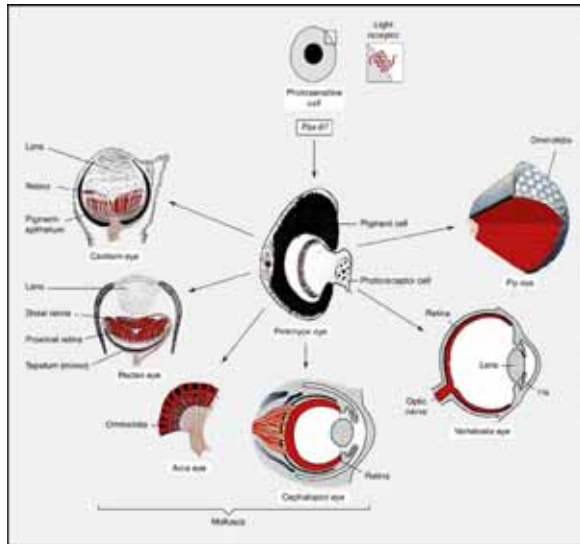


Figura 1.4 Esquema de la hipotètica evolució de les cèl·lules fotosensitives que contenen la rodopsina com a receptor de la llum i que postula un origen monofilètic dels diferents tipus d'ull. L'ull prototípic estaria format per una cèl·lula fotoreceptora i una cèl·lula pigmentada acoblades sota el control de Pax6. Tret de Gehring i Ikeo, 1999.

L'ull prototípic inicial proposat per Darwin estaria format per una cèl·lula fotoreceptora protegida per una altra cèl·lula pigmentària i es localitzaria proper a l'epidermis transparent. Aquestes característiques són molt similars a les taques oculars que presenten els platihelminths. En el següent treball s'estudiaran alguns dels gens claus de la xarxa molecular implicada en la regeneració dels ulls a platihelminths (*Girardia tigrina*), s'analitzaran aquests nous gens i les seves relacions epistàsiques entre ells, i es farà un estudi comparatiu amb les xarxes gèniques conegudes en altres organismes model.

2. LA PLANÀRIA COM A ORGANISME MODEL

2.1 INTRODUCCIÓ

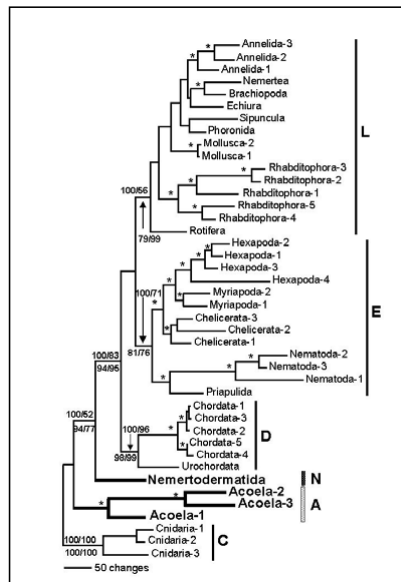
Les planàries d'aigua dolça han estat des de fa anys un model experimental per a l'estudi dels processos de Desenvolupament i Regeneració. En la majoria d'organismes el procés de formació del patró que precedeix a la subdivisió primària de l'organisme es dona una única vegada i en un període de temps molt curt; l'embriologia. A més, un gran problema és el grau d'accessibilitat de l'embrió que en dificulta les manipulacions experimentals. A tall d'exemple, tenim el desenvolupament dels amniotes dins de l'úter de la mare, o dins d'un ou amb les seves cobertes de protecció dures i toves. Les planàries tenen una gran capacitat de regeneració i per tant, petits fragments de planària poden regenerar el patró bàsic corporal i donar lloc a un organisme sencer. Així, la reorganització del patró durant la regeneració seria comparable als processos d'organització del patró que es produeixen durant el desenvolupament.

En aquests treballs s'ha utilitzat una raça asexual de l'espècie *Girardia tigrina*, que tot i tenir origen americà està distribuïda de forma ubiqua per Catalunya (Ribas, 90). El mecanisme de reproducció d'aquesta raça en concret és la fissió transversal de l'organisme que dona lloc a dos nous individus que restituiran cadascun les parts que els manquen.

2.2 FILOGÈNIA I TAXONOMIA

Les planàries d'aigua dolça pertanyen al *filum* dels *Platyhelminthes*, actualment considerat com un grup polifilètic dins del clade *Lophotrochozoa* (veure figura 2.1), i a la classe *Turbelaria* per ser organismes de vida lliure. Finalment, s'agrupen dins de l'ordre *Seriata*, al subordre *Tricladida* per la presència d'un sistema intestinal dividit en tres branques, i a l'infraordre *Paludicola*, fent referència a l'hàbitat que solen ocupar.

Figura 2.1 Arbre filogenètic dels organismes Bilaterals utilitzant com a outgroup els cnidaris (Radiata)(C). Aquest arbre està construït a partir de l'estudi molecular del DNA ribosomal 18S més la cadena pesada de la miosina. A la base dels bilaterals trobem els Nemertodermàtids (N) i Acels (A). Els organismes bilaterals queden dividits en tres grups en els que els *Platyhelminthes* s'agrupen dins els *Lophotrochozoa* (L). La seva posició dintre d'aquest grup no està encara ben resolta. Tret de Ruiz-Trillo, 2002.



INTRODUCCIÓ

2.3 MORFOLOGIA I ANATOMIA

Els platihelminths són animals amb simetria bilateral, aplanats dorsoventralment i és per això que s'anomenen cucs plans. Presenten un definit eix antero-posterior polaritzat per un sistema nerviós organitzat amb estructures cefàliques a la part anterior i dos cordons nerviosos ventrals connectats per commissures transversals. Els cucs plans són cossos sòlids, és a dir, acelomats. Això és interpretat a vegades com a un caràcter primitiu. Alguns zoòlegs ho interpreten, però, com a un caràcter secundari i creuen que els platihelminths serien descendents d'animals que tenien celoma i l'han perdut.

Els platihelminths es distingeixen de la resta d'organismes bilaterals més per tot el que els manca que no pas per característiques especials. Són animals triblàstics, acelomats, no segmentats, amb un tub digestiu cec i no tenen ni sistema circulatori, ni respiratori ni esquelètic. Aquestes mancances han portat a aquests cucs a una resposta adaptativa; l'aplanament del cos per permetre la difusió de l'oxigen i l'extrema ramificació del sistema digestiu per tal que s'extengui per tot l'organisme.

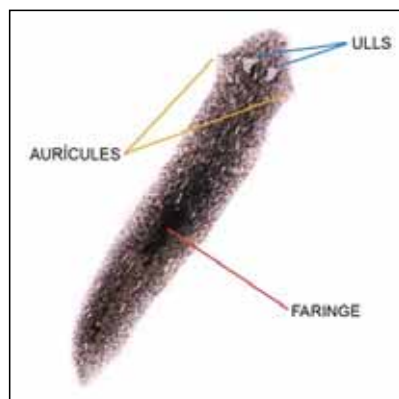


Figura 2.2 Fotografia de *Girardi tigrina* on s'aprecien els dos ulls dorsals i anteriors, les aurícules i la faringe.

Podem desglossar morfològicament i anatòmica als plathelminths en les següents parts (Figura 2.3,A):

- La paret corporal: Està constituïda per una epidermis monoestratificada ciliada ventralment, dins la que s'intercalen cèl·lules rabdítiques especialitzades en la secreció de moc, que l'animal utilitza per moure's, protegir-se, adherir-se al substrat i per capturar les preses. L'epidermis queda separada del sistema muscular subjacent per una làmina basal formada per laminina, fibronectina i colàgena. Aquesta làmina actua com a punt d'ancoratge de les fibres musculars.

- Sistema muscular i locomotor: Sota la làmina basal hi ha fins a quatre capes musculars. La més externa està formada per fibres de musculatura circular i la més interna per fibres longitudinals (respecte l'eix antero-posterior). Entre aquestes dues capes perpendiculars hi ha dues capes de fibres musculars obliqües. A més, en el seu interior presenta fibres musculars orientades en totes les direccions, la qual cosa li permet una plasticitat excepcional.

- L'aparell digestiu: Està format per un intestí cec amb tres branques, una anterior i dues posteriors, molt ramificades i connectades entre si. Les tres branques estan molt diverticulades, fet que produeix anastomosi entre els diverticles contigus.

Aquest tracte cec s'obre a l'exterior per la faringe; òrgan evaginable, allotjat a la cavitat faringia i especialitzat en la captura i prèvia digestió de l'aliment.

L'epiteli gastrodèrmic està format per fagocits i cèl·lules glandulars secretores que intervenen en la digestió intracel·lular i extracel·lular.

- El sistema excretor i osmoregulator: És de tipus protonefridial i està compost per cèl·lules flamígeres amb capacitat filtradora. Es troba distribuït al llarg de les dues vores laterals de l'organisme.

- El sistema reproductor: Les planàries d'aigua dolça tenen modalitats de reproducció sexual, asexual i mixta. La reproducció asexual es dona per fissió transversal i posterior regeneració de la part que els manca. El sistema reproductor està format per un parell d'ovaris ventrals darrera els ganglis cefàlics i nombrosos testicles situats dorsolateralment (Rieger i col., 1991), (Figura 2.3,B).

- El parènquima: Omplint tots els espais entre la paret corporal i la gastoderms, i fet de suport als òrgans interns, trobem una massa de teixit poc organitzat que anomenem parènquima. El parènquima està format per un sistema altament interdigitat i complex de cèl·lules creuat per feixos musculars. Hi trobem fins a set tipus cel·lulars diferents: cèl·lules parenquimàtiques, secretores de tipus cianòfil i acidòfil, rabdítiques, pigmentàries, flamígeres i els neoblasts (cèl·lules totipotents i amb capacitat proliferativa).

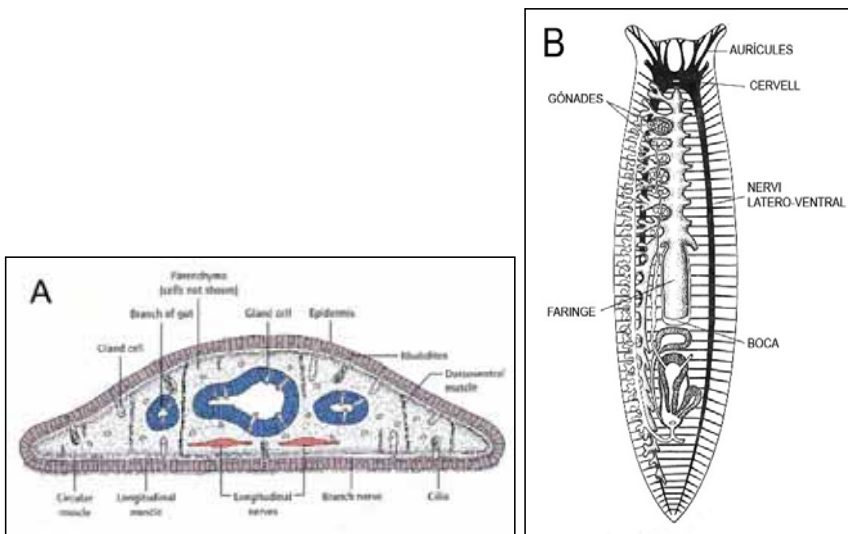


Figura 2.3 A) Tall transversal d'un triclad d'aigua dolça. B) Tall longitudinal d'un triclad marí on observem les estructures principals de l'organisme.

INTRODUCCIÓ

- El Sistema Nerviós:

A nivell morfològic, el sistema nerviós de *Girardia tigrina* ha estat estudiat per immunocitoquímica en crioseccions utilitzant dos marcadors: El neuropèptid F (NPF) propi dels cucs plans i la serotonina (5-HT). Aquesta tècnica ha permès fer una descripció molt precisa del sistema nerviós d'aquest organisme. I els resultats d'aquest treball ens mostren que el sistema nerviós central té forma de ferradura.

El **cervell** està compost per dos lòbuls laterals en posició antero-dorsal (Figura 2.4), connectats per tres comissures, una antero-dorsal davant els ulls i dues de ventrals darrere els ulls. Del cervell en surten en direcció anterior i principalment dorsal, un gran nombre de nervis sensorials que es projecten cap a les zones més anteriors de l'animal i que anomenem branques cefàliques. El nombre de branques cefàliques varia entre 8 i 9 segons l'espècie, i en el cas de *G. tigrina* se n'han descrit 8.

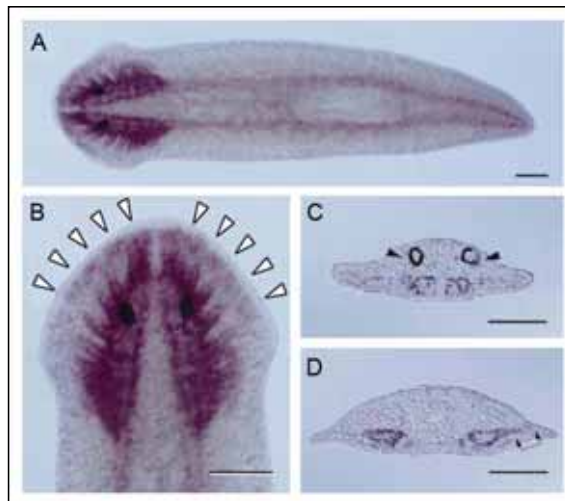


Figura 2.4 Hibridació *in situ* whole-mount de *D. japonica* amb el marcador neural sinaptotagmina. **A)** Vista general on detectem els dos ganglis cefàlics anteriors i els cordons nerviosos al llarg de tot l'organisme. **B)** Amplificació de la regió anterior on visualitzem les branques cefàliques i els òrgans sensorials més distals (fletxes). **C)** Secció a nivell dels ulls: Les fletxes marquen els ulls. **D)** Secció de la regió posterior dels ganglis cefàlics. Esc. barres 0,5 mm. Tret de Tazaki i col, 1999.

La parella de **cordons nerviosos** principals s'extenen des dels lòbuls laterals del cervell fins a la cua del cuc. Les seccions al criostat ens mostren com ambdós cordons nerviosos presenten de forma iterativa acúmuls de cèl·lules nervioses en forma de petits ganglis (Figura 2.5). D'aquests ganglis en surten les branques laterals que connecten els dos cordons nerviosos principals amb el plexe submuscular i també les comissures transversals que connecten els dos cordons centrals. A nivell dorsal no s'observen cordons nerviosos.

Per altra banda, la faringe presenta el seu **plexe nerviós faríngic i intestinal** autònom. Aquest plexe, connectat directament amb el cervell, envia les seves fibres al tub faríngic on formen dos anells concèntrics, un d'intern i un d'extern a la paret del tub.



Figura 2.5 Immunotinció contra el neuropèptid FMRFamida de *G. tigrina*. Es destaquen els ganglis cefàlics, els dos cordons nerviosos principals, els ganglis iteratius al llarg d'ambdós cordons nerviosos, la connexió posterior dels cordons i fins i tot el plexe nerviós faringic al centre de l'organisme. Tret de Marsal, 2005.

Finalment trobem els tres **plexes perifèrics**;

- l'infraepitelial, per sota de les cèl·lules epidèrmiques que forma una xarxa nerviosa difusa.
- el subepitelial, entre la musculatura i l'epidermis.
- l'el submuscular, entre el plexe muscular.

Cal, també, parlar en aquest apartat dels òrgans sensorials que comprenen quimiorreceptors i mecanorreceptors escampats per tot el cos però amb zones on clarament es concentren. És el cas dels receptors ciliats dels solcs auriculars, que formen les aurícules amb una funció quimiotàctica.

Un últim tipus de receptors són els fotoreceptors, que seran àmpliament descrits en el següent apartat.

2.4 ELS ULLS A PLATHELMINTS

És comuna, dins dels platihelminths, la capacitat de percebre variacions d'intensitat de la llum gràcies a la presència de cèl·lules fotosensibles. Evidències de la capacitat fotoreceptiva d'aquests organismes són:

- el comportament fototàctic.
- els canvis estructurals per adaptació a la llum.
- les similituds amb els fotoreceptors d'altres invertebrats.

La majoria dels ulls de platihelminths estan formats per d'un a molts parells d'ocells pigmentats en forma de copa, i clarament associats amb el cervell (ulls cerebrals). El nombre i mida dels ulls és molt variable, fins i tot entre individus de la mateixa espècie. També és variable el tipus d'ulls, i dins de platihelminths trobem ulls invertits però també en algun cas ulls evertits (Figura 2.6).

INTRODUCCIÓ

Tots aquests ulls estan formats per dos tipus cel·lulars:

- **El fotoreceptor:** Una o poques cèl·lules nervioses bipolars, que projecta/en les seves dendrites dins una estructura en forma de copa.
- **La cèl·lula pigmentària:** Aquesta estructura en forma de copa està constituïda per una o poques cèl·lules normalment pigmentades que engloben les dendrites dels fotoreceptors.

Les cèl·lules fotoreceptores acostumen a tenir membranes del tipus rabdòmic tot i que també en trobem del tipus ciliat.

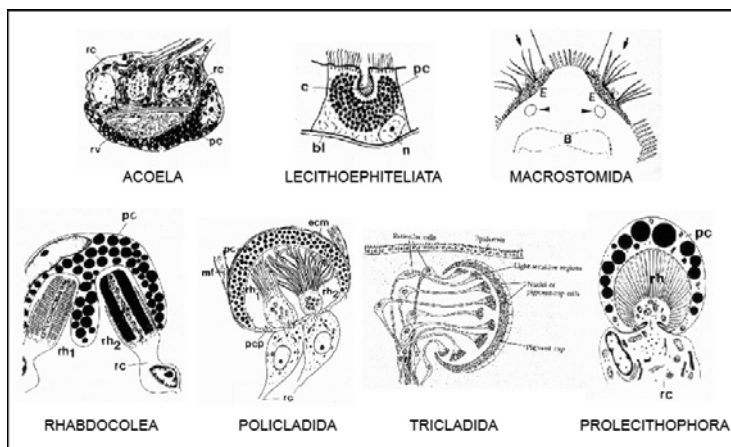


Figura 2.6 Gran diversitat d'ulls a platelmints on trobem ulls de tipus ciliat i de tipus rabdòmic. Tret de Rieger i col., 1991.

En el cas dels **Triclad**s trobem un únic parell d'ulls invertits, amb múltiples fotoreceptors i amb membranes de tipus rabdòmic (microvillis). Aquests microvillis es troben a les parts més distals de les dendrites, en forma de plomall. Els microvillis estan empaquetats dins la copa i són rics en microfilaments. La part de la dendrita més pròxima als microvillis es caracteritza per ser rica en mitocondris, partícules de glicogen i a vegades microtúbuls associats a vesícules pinocítiques. El nucli de les cèl·lules fotoreceptores sempre té una posició externa a la copa. Les cèl·lules que formen la copa són cèl·lules que acostumen a contenir grànuls de pigment i projecten extensions cel·lulars per sobre de l'entrada de la copa. (Figura 2.7).

L'espai intern de la copa queda com una zona tancada per una capa epitelial més o menys endreçada de cèl·lules sensorials amb una cobertura de cèl·lules pigmentades. Així, aquests dos tipus cel·lulars formen una unitat funcional.

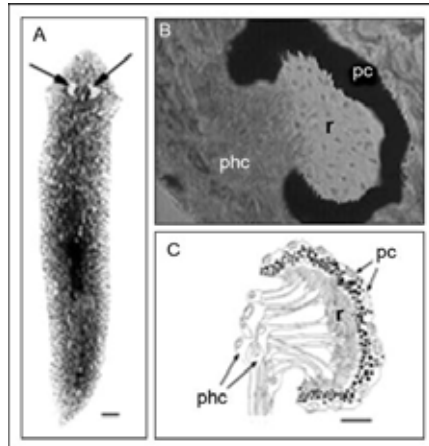


Figura 2.7 Estructura de l'ull de planàries. **A)** Vista dorsal d'una planària *G. tigrina* amb les dues fletxes marcant els dos ulls en posició dorsal. **B)** Tall sagital que mostra la copa de cèl·lules pigmentades (pc), l'interior de la copa amb els rabdòmers (r) i a l'exterior els cossos de les cèl·lules fotoreceptores (phc). **C)** Esquema il·lustrat de la figura B. Esc. barres 0.5mm a A i 0.05mm a C. Tret de González-Estévez i col., 2003.

Els ulls de les planàries estan connectats directament amb el cervell a través dels axons que surten dels cossos neuronals de les cèl·lules fotoreceptores. Aquests axons són els que formen les fibres dels nervis òptics, que es projecten cap al cervell. Algunes d'aquestes fibres formen un quiasma òptic que permet que cada gangli cefàlic pugui integrar tant els senyals que arriben dels fotoreceptors localitzats a l'esquerra com dels de la dreta (veure model de la figura 2.8).

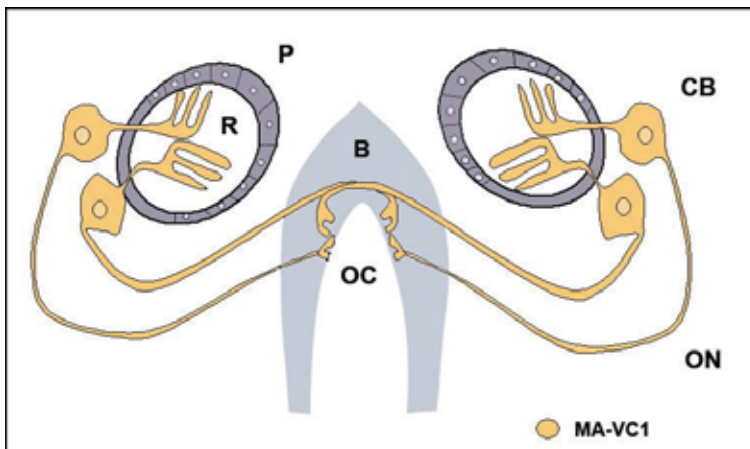


FIGURA 2.8 Esquema de la xarxa de connexions entre els ulls i el cervell de planàries, sense tenir en compte la ramificació dels nervis òptics. B; cervell. CB; cossos cel·lulars de les cèl·lules fotoreceptores. OC; quiasma òptic. ON; nervi òptic. P; copa de cèl·lules pigmentades. R; rabdòmers. Modificat de Sakai i col., 2000.

INTRODUCCIÓ

3. LA REGENERACIÓ A PLANÀRIES

Una singular i remarcable característica de les planàries dins els metazous és la gran plasticitat morfològica, que els permet poder modular en tot moment la seva mida i patró d'organització corporal. Mentre que la majoria d'organismes presenten formes adultes fixes i determinades, les planàries d'aigua dolça presenten dues propietats molt característiques: La regeneració i la remodelació contínua del patró per creixement i decreixement.

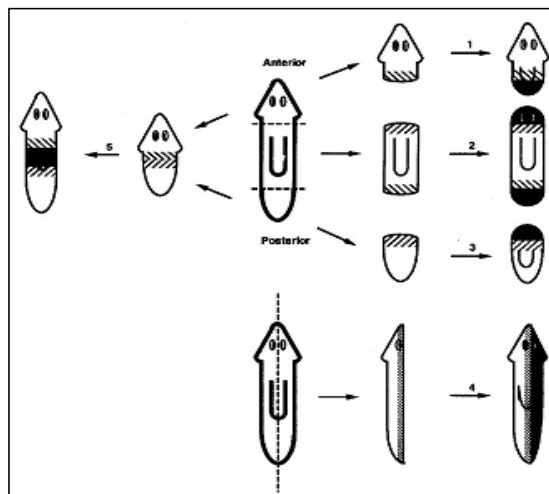


Figura 3.1 Esquema dels diferents tipus de regeneració a planàries. 1) posterior, 2) bidireccional, 3) anterior, 4) lateral i 5) intercalar. Tret de Bayascas i col., 1997.

3.1 HISTÒRIA

L'habilitat de regeneració de les planàries es coneix des de fa més de 200 anys. Fou Peter Simon Pallas al 1766, el primer en descriure com una petita porció disseccionada d'un cap d'una planària era capaç de regenerar un organisme sencer. Shaw i posteriorment Draparnaud van reconfirmar-ho pocs anys més tard en observar la propietat de propagació asexual per fissió que tenien aquests animals (veure Brøndsted, 1969).

L'anàlisi experimental de la regeneració de les planàries comença, però, la primera meitat del segle XIX amb els treballs de Dalyell i Johnson. Aquests investigadors, per estudiar el potencial regeneratiu d'aquests animals, van començar a fer incisions tant parcials com completes al llarg dels eixos longitudinal i transversal, i van arribar a la conclusió que eren organismes amb una gran capacitat regenerativa. Això portà a la necessitat de fer estudis descriptius d'aquests organismes a nivell morfològic, fisiològic i fins i tot etològic. Fou el treball de Dugés al 1828 el que portà la nova sistemàtica de les planàries fins al punt que personatges del segle XIX com M. Faraday, C. Darwin i W.H. Harvey es van sentir atrets per aquests organismes i van treballar amb les planàries tot i que majoritàriament a nivell descriptiu.

Va ser a l'última dècada del segle XIX, amb les noves teories vitalistes vers les reduccionistes i amb l'emergència dels estudis embriològics, que científics com H. Randolph, J. Loeb i H. Driesch van veure el procés de regeneració com un procés

equiparable a l'embriogènesi. Aquest nou concepte fou el que va promoure a T.H. Morgan i C.M. Child a estudiar el procés de regeneració a principis del segle XX.

Els nombrosos treballs de Morgan, tant teòrics com pràctics, el portaren a classificar els processos regeneratius en dos grups segons els nous conceptes de:

- **Morfalaxi:** Així és com T.H. Morgan ho va definir el 1898: "*Thus the relative proportions of the planaria are attained by a remodelling of the old tissue. I would suggest that this process of transformation is called a process of morfallaxis*". Actualment es defineix com el procés de **remodelació** mitjançant apoptosi i producció de nous tipus cel·lulars per proliferació que pateix un fragment regenerant per adaptar-se a les noves proporcions de l'organisme. Un exemple és la regeneració de l'hidra (Cnidaris) on l'organisme amputat pateix una remodelació del teixit antic per canvis en el patró de determinació i proliferació cel·lular. Aquests organismes poden fins i tot regenerar-se sense activar el procés proliferatiu.
- **Epimorfosi:** En aquest cas la **producció dels nous teixits** es dona per la proliferació de cèl·lules indiferenciades que posteriorment es diferenciaran i formaran de nou les estructures que li manquen. N'és un exemple el cas de la regeneració de les extremitats dels amfibis, on les cèl·lules encarregades de la regeneració de l'extremitat són cèl·lules que primer es desdiferencien i posteriorment s'encarreguen de la proliferació i creació dels nous teixits (veure Figura 3.2).

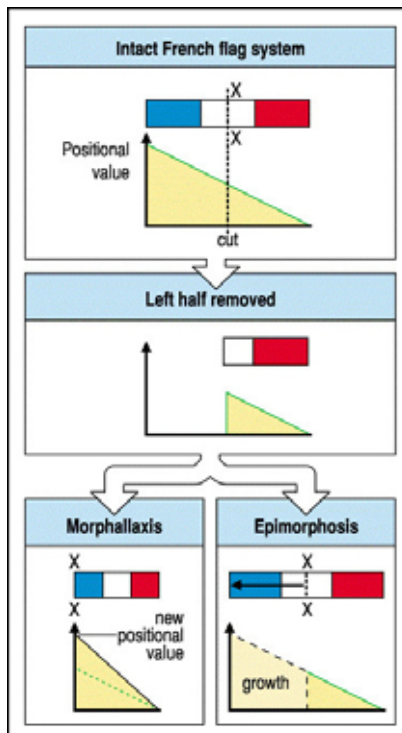


Figura 3.2 Model de la bandera francesa que esquematitza els dos tipus de processos de regeneració. Si la bandera es talla per la meitat pot generar-se de nou de dues maneres; per morfalaxi, que estableix una nova frontera a nivell del tall, i els valors posicionals es distribueixen de nou en la porció de bandera tallada. O per epimorfosi, on els valors posicionals s'adquireixen per creixement de la porció de bandera que creix a partir del lloc de tall fins a assolir la seva mida original. Tret de Wolpert 2002.

INTRODUCCIÓ

3.2 EL MECANISME DE REGENERACIÓ

3.2.1 Tancament de la ferida, cicatrització i formació del blastema

Després del tall d'una planària, hi ha una forta contracció muscular que facilita el contacte entre l'epiteli dorsal i ventral de la regió del tall, la qual cosa permet que la ferida es tanqui ràpidament (en minuts), (Saló i Baguñá, 1984). La cicatrització és imprescindible per iniciar el procés regeneratiu. Així, la inhibició de la cicatrització amb una solució rica amb clorur de magnesi n'impedeix la regeneració.

Darrera l'epiteli de la ferida es comencen a acumular cèl·lules indiferenciades que formen una zona no pigmentada que anomenem **blastema** de regeneració. Aquestes cèl·lules indiferenciades que s'acumulen al blastema de regeneració s'anomenen **neoblasts** i són fàcilment identificables citològicament per ser cèl·lules relativament petites (unes 10 µm de diàmetre) amb una proporció nucli/citoplasma alta. Es pot observar per mètodes histoquímics i de microscòpia electrònica que el citoplasma dels neoblasts és ric en RNA i ribosomes. En una planària intacta els neoblasts es distribueixen per tot el mesènquima i són les úniques cèl·lules mitòtiques que serveixen com a font de recanvi per a la renovació tissular de l'organisme. Els neoblasts representen entre un 20-30% del nombre total de cèl·lules de l'organisme intacte. Quan s'inicia el mecanisme de regeneració, no és que aquest procés de recanvi cel·lular s'activi, sinó que s'accelera (Baguñá, 2002). Els neoblasts són, doncs, cèl·lules mare per a tots els tipus cel·lulars de la planària. (Figura 3.3)

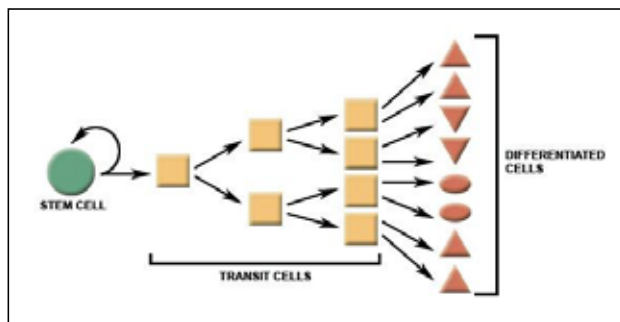


Figura 3.3: Model de compartimentació i amplificació de les poblacions de neoblasts.

L'origen dels neoblasts ha estat un dels principals treballs d'investigació encara vigent. Hi ha hagut dues hipòtesis per explicar l'origen dels neoblasts: La primera postula que els neoblasts adquiririen una capacitat de totipotència per **mecanismes de desdiferenciació**, i ha estat promoguda per Gremigni i col·laboradors (1980a i b). Utilitzaven mosaics naturals de *Dugesia lugubris* en els que les cèl·lules somàtiques eren triploides mentre que les cèl·lules germinals pre-meiotiques eren hexaploides en femelles i diploides en mascles. En fer una anàlisi cariològica i citofotomètrica de les cèl·lules dels blastemes d'aquests organismes van trobar que un 5% dels nuclis eren diploides. Això, suggeria que les cèl·lules germinals pre-meiotiques també contribuïen a la formació del blastema, i així, qualsevol cèl·lula de l'organisme podria desdiferenciar-se i actuar com a cèl·lula totipotent.

La segona hipòtesi es basa en la condició de **cèl·lules totipotents** dels neoblasts, que proliferen en resposta a una lesió. Molts més experiments donen suport a aquesta teoria, començant pels treballs de Wolf, Dubois i Lender, que defensaven que els

neoblasts són les úniques cèl·lules proliferatives i particularment susceptibles a radiacions. Aquests treballs es basen en la irradiació dels organismes i la pèrdua de la capacitat regenerativa d'aquests, i fins i tot la seva mort unes setmanes després de ser irradiats. Per altra banda, la injecció de fraccions enriquides amb neoblasts en organismes irradiats restablí l'activitat mitòtica i en un tant per cent dels casos la supervivència dels organismes (Baguñá i col., 1989). En injectar animals irradiats amb fraccions enriquides amb cèl·lules diferenciades no rescatava els efectes produïts per la irradiació.

Els recents marcatges de neoblasts i de cèl·lules del blastema amb bromodeoxiuridina (BrdU), un anàleg de la timidina que s'incorpora a les cèl·lules en fase S, mostren molt convincentment que els neoblasts són les cèl·lules que formen el blastema (Newmark i col., 2000; Ladurner i col., 2000).

Finalment la utilització de marcadors moleculars específics dels neoblasts, que ha permès avançar molt en la localització i moviment d'aquestes cèl·lules, dona molta força a aquesta teoria; l'antigen nuclear de cèl·lules proliferatives (PCNA) que ha permès millorar molt la detecció de neoblasts en proliferació (Orii i col., 2005) (Figura 3.4), el gen *DjvlgA* relacionat amb els gens *vasa* (*vas*) (Shibata et al., 1999), un gen de la família dels factors de replicació MCM2-7 (*DjMCM2*) que detecta neoblasts en proliferació (Salveti i col., 2000), un gen de la família Y-box (*DjY1*) que codifica per una proteïna reguladora de la transcripció (Salveti i col., 1998) i el recent clonatge de *piwi* (gen que codifica per una proteïna necessària pel manteniment dels neoblasts) per membres del Departament de Genètica (Handberg-Thorsagher, comunicació personal).



Figura 3.4 Marcatge amb l'antigen PCNA de la planària *D. japonica*. Secció sagital que mostra el marcatge dels neoblasts amb PCNA (en blau). S'observa que no hi ha proliferació cel·lular a la regió anterior, ni als fotoreceptors ni a la regió central de la faringe. e; ull. br; cervell. Esc. barra 0.2 mm. Tret de Orii i col., 2005.

3.2.2 Progressió de la regeneració

A mesura que el procés de regeneració avança més, les cèl·lules indiferenciades es van acumulant al blastema i fan que aquest creixi exponencialment. Els neoblasts han de poder migrar des de qualsevol part de l'organisme i acumular-se a la zona del blastema.

Els estudis de Saló i Baguñá (1985, 1989), utilitzant marcadors cromosòmics nuclears i citoplasmàtics en hostes irradiats, ens revelen que en absència de neoblasts locals, aquests poden reclutar-se per moviments lents, més que per migracions dirigides, des de zones allunyades de la ferida. Tot i això, en condicions normals, els neoblasts propers a la ferida serien els que intervindrien en la formació del blastema. Aquesta zona rica en neoblasts i localitzada darrere del blastema s'anomena **postblastema**, i tindria unes 500 µm de llargada. L'increment de l'índex mitòtic que es produeix en tot l'organisme durant el procés de regeneració encara és més elevat a la regió del post-blastema.

Els recents experiments de marcatge amb BrdU que han permès seguir els moviments dels neoblasts, han demostrat la capacitat activa de migració que tenen (Newmark i Sánchez-Alvarado, 2000). Els neoblasts arriben al postblastema i allí

INTRODUCCIÓ

proliferen activament i, posteriorment, migren cap al blastema on deixaran de dividir-se (Saló i Baguñá, 1984).

3.2.3 Determinació del patró durant la regeneració

La determinació dels territoris en l'organisme regenerant és molt primerenca segons els experiments d'empelts (Saló i Baguñá, 1984). Aquest mètode ens mostra com la determinació del patró al munyó és molt ràpida i, fins i tot, anterior a la formació del blastema. Això suggereix un model mixt entre morfolaxi i epimorfosi, on els processos d'epimorfosi anirien precedits per una primera fase morfolàctica en la que es determinaria i reordenaria el nou patró de l'organisme.

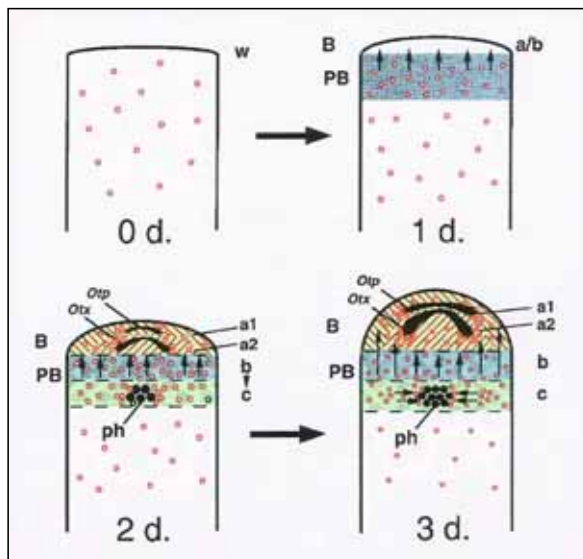


Figura 3.5 Model epimòrfic-morfolàctic de la regeneració anterior de planàries. Després de l'amputació (0d.) la ferida és recoberta per l'epiteli antic. Al 1r dia de regeneració (1d.) les estructures més distals (cap i prefaringe, a/b) queden prefixades a la zona que toca a la ferida quan el blastema (B, groc) és encara escassament visible. Mentrestant comença a observar-se un augment de la proliferació dels neoblasts (cercles vermells) al postblastema (PB, blau). També comença la migració de neoblasts del PB al B (fletxes). A partir d'aquest moment, als 2 dies de regeneració (2d.) augmenta la proliferació de neoblasts al PB i la migració d'aquests cap al B, que segueix creixent. A més, es determinen les estructures més proximals (regió faringea, c, verd) i els primordis dels nous òrgans (primordi de la faringe, ph). També s'observa l'expressió de gens marcadors del cap (*otd/Otx* i *otp*, Umesono i col., 1999) que defineix noves regions anteriors (a1 i a2). A partir del 3r dia (3d.) ja s'ha establert el patró antero-posterior bàsic de l'organisme, i les migracions locals de neoblasts s'encarregaran del creixement dels primordis dels òrgans principals. Modificat de Saló i Baguñá, 2002.

S'ha pogut realitzar el seguiment de marcadors regionals, com l'anticòs TCEN49 (Bueno et al., 1997) que marca el terç central de l'organisme i l'epítom del gen *GtPou-1* (Muñoz-Màrmol i col., 1998) que marca el terç anterior, durant la regeneració. En ambdós casos s'observa com desapareix ràpidament el seu marcatge després de l'amputació i reapareix d'una forma posició dependent compatible amb una determinació ràpida i seqüencial.

Una altra aproximació a l'estudi molecular de la regeneració ha estat l'aïllament de gens amb homeobox que, gràcies a la seva conservació de seqüència i funció, ha permès l'aïllament de gens homòlegs candidats. En són un cas els gens de la classe *NK*, *Dth1* i *Dth2* (García-Fernández i col., 1991; 1993) que semblen estar implicats en processos de determinació i/o diferenciació tardans.

Els gens *Hox* també són uns bons marcadors per al seguiment de la determinació del patró (Bayascas et al., 1997; Orii et al., 1999). Els gens amb homeobox del tipus *Hox* estan organitzats en complexos gènics funcionals encarregats d'especificar la identitat territorial al llarg de l'eix antero-posterior en un gran nombre d'organismes. En el cas de planàries s'ha vist com els gens *Plhox5Gt* (*Dthox-D*) i *Plhox6Gt* (*Dthox-C*) (Bayascas et al., 1997) i els homòlegs *Plhox5Dj* i *Plhox6Dj* (Orii i col. 1999) s'expressen de forma colineal en el temps i en l'espai i de manera pròximo-distal en la regeneració posterior, d'acord amb el model d'activació dels gens *Hox* (Duboule, 1994). Posteriorment, el mateix grup va presentar resultats de l'expressió del gen *Plhox9Dj* amb una expressió més anterior que els *Plhox5Dj* i *Plhox6Dj*, i que trenca, doncs, el model colineal (Nogi i Watanabe 2001).

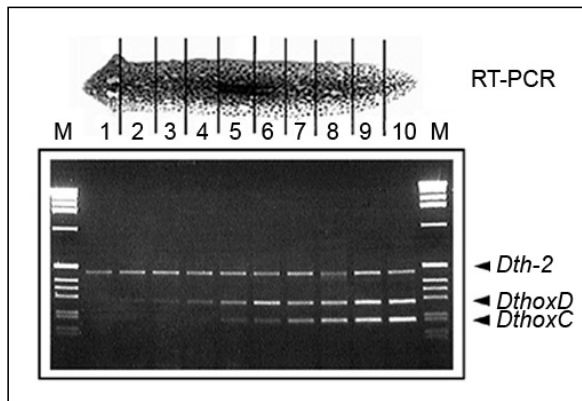


Figura 3.6 Expressió dels gens *Hox* a planàries en diferents regions (1-10) antero-posteriors deduïdes per RT-PCR. S'utilitza el gen *Dth2* com a control. Observem l'expressió solapant de *Dthox-D* i *Dthox-C*. Modificat de Bayascas, 1997.

3.2.4 L'últim pas; la diferenciació cel·lular

Són moltes les preguntes encara sense resposta quan parlem de la proliferació dels neoblasts, però és encara més complex parlar del procés de diferenciació d'aquestes cèl·lules per donar lloc a tota la resta de tipus cel·lulars. Els estudis amb timidina tritiada de Palmberg i col. (1990) ens proposen que en analitzar la població de neoblasts ens trobem davant d'una població heterogènia on tenim cèl·lules totipotents i cèl·lules multipotents ja direccionades a donar uns certs tipus de cèl·lules somàtiques. S'han de barrejar, doncs, moltes hipòtesis sobre la jerarquització del procés de diferenciació. L'ordre en què les cèl·lules es van determinant i diferenciant és encara desconegut, i no se sap quins són els mecanismes moleculars implicats ni quin ordre segueixen. Així, les cèl·lules mare es podrien diferenciar segons el seu llinatge (ectodèrmic, endodèrmic o mesodèrmic), segons el tipus cel·lular (nerviós, digestiu, parenquimàtic ...) o, fins i tot, segons la seva posició (cap, centre o cua). El que sembla clar és que els primers signes de diferenciació cel·lular es detecten entre els

INTRODUCCIÓ

dos i quatre dies de la regeneració. Cap als tres dies comencen a aparèixer cèl·lules precursors musculars i nervioses a la zona perifèrica del blastema. Cèl·lules rabdítiques parenquimàtiques que procedeixen de neoblasts en primeres fases de diferenciació creuen la membrana basal i s'integren en l'epidermis antiga, i restitueixen les estructures epidèrmiques (veure Baguñá i col., 1994 per referències).

La utilització d'anticossos monoclonals específics ha permès monitoritzar l'aparició i desenvolupament de la faringe (Bueno i col., 1997, Cebriá i col. 1996; 1999). I finalment, una descripció detallada tant de l'anatomia com de la regeneració del sistema nerviós central i dels ulls, utilitzant com a marcadors gens específics d'ambdós òrgans, serà també un dels elements que desenvoluparem en aquest treball.

3.2.5 Molècules inductores de la regeneració

Ha d'existir un sistema de senyalització i transducció de senyals que activi la migració, divisió i diferenciació cel·lular en situacions de regeneració. Hi ha diversos factors de creixement, especialment els relacionats amb el teixit nerviós, com neuropèptids, factors de creixement de fibroblasts (FGF), factors de creixement epidèrmic (EGF), etc., que estimulen la proliferació dels neoblasts. També hi ha altres proteïnes, conegudes per estimular la proliferació cel·lular en altres sistemes de regeneració, com són *decapentaplegic (dpp)*, *distalless (dll)*, que deuen tenir un paper similar a planària. Després de seccionar o després del procés de fissió transversal d'una planària, hi ha factors de creixement que són alliberats pel propi sistema nerviós danyat i per altres teixits, i que estimulen la proliferació dels neoblasts a les proximitats de la ferida. La secreció d'enzims proteolítics com les metaloproteases ajuden els moviments i migracions dels neoblasts cap a la ferida. Això, porta a un acúmul de neoblasts prop de la ferida que formaran el blastema, que posteriorment creixerà per proliferació i migració dels neoblasts.

3.2.6 Els marcadors moleculars, noves perspectives per a l'estudi de la regeneració

Actualment es disposa de més de 50 marcadors moleculars diferents publicats i, a la vegada, una col·lecció d'anticossos monoclonals (veure revisió de Saló i Baguñá, 2002 per referències). Tots aquests marcadors s'estan utilitzant tant per estudiar la determinació dels eixos axials com per fer el seguiment dels canvis i/o alteracions de la seva expressió en els experiments clàssics d'empelts.

Aquest gran increment de marcadors genètics es deu principalment a l'ús de les metodologies d'amplificació per PCR amb oligonucleòtids degenerats que cobreixen les regions conservades del gens implicats en el desenvolupament i de la seqüenciació automàtica. Per altra banda, s'estan produint col·leccions d'*expressed sequenced tags (ESTs)* de planàries intactes (Sanchez-Alvarado i col., 2003) que permeten produir *microarrays*. Posteriorment es podran hibridar amb cDNAs de diferents estadis de regeneració i permetran definir quins gens pateixen canvis d'expressió durant la regeneració i que, per tant, són bons candidats per ser estudiats. Finalment a principis del 2003 es va iniciar la seqüenciació completa del genoma de planària en el *Genome Sequencing Center* (Universitat de Washington) i en aquests moments hi ha 13 milions de seqüències genòmiques aïllades a l'atzar (*shotgun*) accessibles al banc de dades (*NCBI Trace Archives*). S'espera que en aproximadament un any tot el genoma de planària estigui ordenat. Finalment, en el grup del professor E. Saló s'ha iniciat un projecte de proteòmica de neoblasts. Totes aquestes metodologies juntament amb la capacitat de producció de fenotips de pèrdua de funció per RNAi i guany de funció per transgènesi, pot portar a les planàries a esdevenir un dels organismes model dins del clade *Lophotrochozoa*.

Figura 3.7 Taula de marcadors moleculars de diferents espècies de planàries utilitzats com a gens marcadors posicionals, d'òrgans, teixits o cèl·lules, en els estudis de regeneració. Tret de Saló 2002 .

Marker	Species	Gene	Expression features	Reference
<i>TABLE 1. Gene markers from different species of freshwater planarians (Order Tricladida) employed as axial positional markers, or as organ-, tissue-, and cell-specific markers in regenerative studies¹</i>				
Axial genes				
Hox genes				
	Gt	<i>Gthox</i>	AP axis	Tarabykin et al., '95; Saló et al., '95; Bayasas et al., '97, '98
	Dj	<i>Djhoax</i>	AP axis	Orii et al., '95, '99; Nogi and Watanabe 2001
	Pw	<i>PWox</i>	AP axis	Bartels et al., '93
	Pn	<i>Pnox</i>	"id"	Balavoine and Telford, '95
	Pf	<i>Pfox</i>	"id"	"id"
	Dl	<i>Dlox</i>	"id"	"id"
Cephalic genes				
Orthodonticle				
	Gt	<i>DtOtx</i>	Anterior blastema	Stornaiuolo et al., '98
	Dj	<i>Djotx-A</i>	Cephalic ganglia	Umesono et al., '99
		<i>Djotx-B</i>	"id"	"id"
	Dj	<i>Djotp</i>	Cephalic ganglia	Umesono et al., '97
Orthopedia				
DV genes				
Bone morphogenetic proteins (BMPs)				
	Dj	<i>DjBMP</i>	Dorsal midline	Orii et al., '98
Neoblast markers				
Vasa related gene				
	Dj	<i>DjvlgA</i>	Neoblasts and germ cells	Shibata et al., '99
Minichromosome maintenance proteins				
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)				
	Dj	<i>DjY1</i>	Neoblasts	Ito et al., 2001
Y-box gene				
	Dj	<i>DjY1</i>	Blastema neoblasts	Salveti et al., '98
Germ cell marker				
Vasa related gene				
	Dj	<i>DjvlgB</i>	Germ cells	Shibata et al., '99
Receptor tyrosine kinase				
	Dj	<i>DjPTK1</i>	Germ cell determination and differentiation	Ogawa et al., '98
Nerve cell markers				
Pro-hormone convertase 2 (PC2)				
	Dj	<i>PH04</i>	Central nervous system	Agata et al., '98
Heart shock protein 40 (hsp40)				
	Dj	<i>PH117</i>	Axon bundles	Agata et al., '98
POU domain protein				
	Gt	<i>GtPOU-1</i>	Anterior nerve cells	Muñoz-Mármol et al., '98
Sinaptotagmin				
	Dj	<i>DjSYT</i>	Central nervous system	Tazaki et al., '99
Eye markers				
Pax-6 homolog				
	Gt	<i>DtPax-6</i>	Eye cells	Callaerts et al., '99; Pineda et al., 2002
	Dj	<i>DjPax-6</i>	"id"	"id"
Sine oculis homolog				
	Gt	<i>Gtso</i>	Photoreceptors	Pineda et al., 2000
Opsin homolog				
	Gt	<i>Gtops</i>	Photoreceptors	Pineda et al., 2000
	Sm	<i>Smops</i>	"id"	Sánchez and Newmark., '99
Cell specific markers				
Myosin heavy chain gene				
	Gt	<i>TMUS-13</i>	Differentiated myocytes of the body-wall	Cebrià et al., '97
	Sm		"id"	Sánchez and Newmark., '99
	Dj	<i>DjMHC-B</i>	"id"	Kobayashi et al., '98
	Dj	<i>DjMHC-A</i>	Differentiated myocytes of the pharynx	Kobayashi et al., '98, '99a
Pharynx-muscle-specific gene				
Paired-like gene				
	Gt	<i>Dtprd-1</i>	Secretory gland cells	Muñoz-Mármol et al., '97
NK-type homeobox genes				
	Gt	<i>Dt-1</i>	Gastrodermal cells	García-Fernández et al., '91, '93b
	Gt	<i>Dt-2</i>	Parenchyma cells	"id"
XNP/ATRX proteins				
	Dj	<i>DjXNP</i>	Parenchyma cells	Rossi et al., 2001
Alpha-tubuline				
	Sm		Cilia of epidermal cells	Sánchez and Newmark., '99
Regional markers				
Secreted protein				
	Gt	<i>tcn49</i>	Parenchyma central cells	Bueno et al., 2001
C-type lectin				
	Gt	<i>Scarf</i>	Parenchyma prepharyngeal region	Bogdanova et al., '98
Mucous core protein gene				
	Dj	<i>PN8</i>	Prepharyngeal region	Kato et al., '99
Intermediate filament				
	Dj	<i>I/fb</i>	Margin of the body	Kato et al., '99
Mucous component gene				
	Dj	<i>PN5</i>	Margin of the body	Kato et al., '99
Forkhead box A				
	Dj	<i>DjFoxA</i>	Pharynx-forming region	Koinuma et al., 2000
General Markers				
Planarian retrotransposon				
	Dj	<i>PH20</i>	All cells	Kato et al., '99
Planarian mariner transposon				
	Gt	<i>Pmar-1</i>	All cells	García-Fernández et al., '93a

¹Monoclonal antibodies are not included. Species abbreviations: Dj, *Dugesia japonica*; Dl, *Dendrocoelum lacteum*; Gt, *Girardia tigrina*; Pf, *Polycelis felina*; Pn, *Polycelis nigra*; Pw, *Phagocata woodworthi*; Sm, *Schmidtea mediterranea*.

INTRODUCCIÓ

3.3 EL RECANVI CEL·LULAR I LA CAPACITAT DE CREIXEMENT I DECREIXEMENT

La capacitat de creixement i decreixement de les planàries es deu al propi recanvi cel·lular i tissular diari d'aquests organismes. Les planàries poden suportar llargs períodes de dejuni, gràcies a la capacitat de reduir molt la seva massa corporal. Quan se les torna a alimentar tornen a recuperar la seva talla adulta. A nivell cel·lular, els processos de creixement i decreixement estan molt estretament lligats amb les taxes de proliferació i mort cel·lular depenent de la disponibilitat d'aliment, temperatura, o característiques de l'espècie o població (Baguñá i Romero, 1981; Baguñá i col, 1990).

És d'esperar que els processos de remodelació del cos durant la regeneració i durant els processos de creixement-decreixement utilitzin mecanismes cel·lulars i moleculars semblants, com són l'increment de la taxa de mort cel·lular per tal de reduir la mida de l'organisme o redistribuir tot l'organisme en una mida més petita i l'increment de la proliferació cel·lular per augmentar la mida de l'individu.

Es pot assumir, doncs, que aquests organismes estan sotmesos a un procés de recanvi cel·lular continuat, que seria assumit per la presència de neoblasts a l'organisme adult i que estaria sotmès a variacions segons les diferències entre les taxes de proliferació i de mort cel·lular de l'organisme. Aquestes taxes depenen de diversos factors, com són la pròpia mida de cada espècie, les condicions mediambientals a les que estigui sotmès l'organisme i l'estratègia reproductora sexuada o asexuada. Aquesta gran plasticitat morfològica deguda a la presència d'aquests neoblasts totipotents és una característica única (sinapomorfia) del *filum* dels platihelminths.

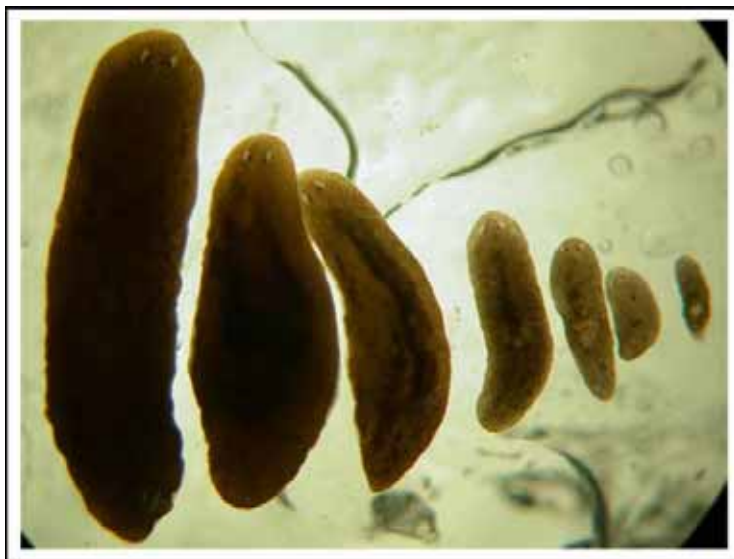


Figura 3.8 Fotografia que mostra la capacitat de creixement i decreixement segons les condicions ambientals a les que estan sotmesos aquests organismes. Fotografia realitzada per E. Saló.

3.4 LA REGENERACIÓ DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL I ELS ULLS

3.4.1 Regeneració del Sistema Nerviós Central

El desenvolupament del sistema nerviós central (SNC) és un tòpic que segueix despertant un gran interès dins el camp de la biologia del desenvolupament. Tot i les grans diferències entre el SNC de vertebrats i el d'invertebrats, trobem un conjunt de mecanismes i programes genètics molt conservats en els processos de morfogènesi del cervell.

Les planàries són un sistema biològic molt útil per estudiar la formació del SNC durant el procés de regeneració.

Els treballs de Reuter i col. (1995,1996), utilitzant immunohistoquímica amb antisèrum contra els neuropèptids NPF i FMRFamida i contra l'amina 5-HT (5-hidroxitriptamina), mostren dues fases durant la regeneració dels ganglis cefàlics. La primera fase; dies 1 i 2, es caracteritza per l'observació de prolongacions neurals que emergeixen des de les protuberàncies dels antics cordons nerviosos i envien fibres cap a la banda contralateral i s'aproximen centralment i pròxima al marge del blastema. En la segona fase que aniria del 3r al 5è dia apareixen neoblasts immunoreactius a 5-HT davant la comissura anterior en desenvolupament. Aquestes cèl·lules fasciculen amb la comissura cerebral anterior i també apareixen fibres de les comissures posteriors del cervell i fibres cap a les aurícules (Figura 3.9).

Van observar que es tractava de cèl·lules indiferenciades que migraven cap als cordons nerviosos i que posteriorment es diferenciaven en cèl·lules nervioses que renovaven la població de cèl·lules neuronals. Així, l'origen del nou sistema nerviós provindria de cèl·lules indiferenciades; dels neoblasts.

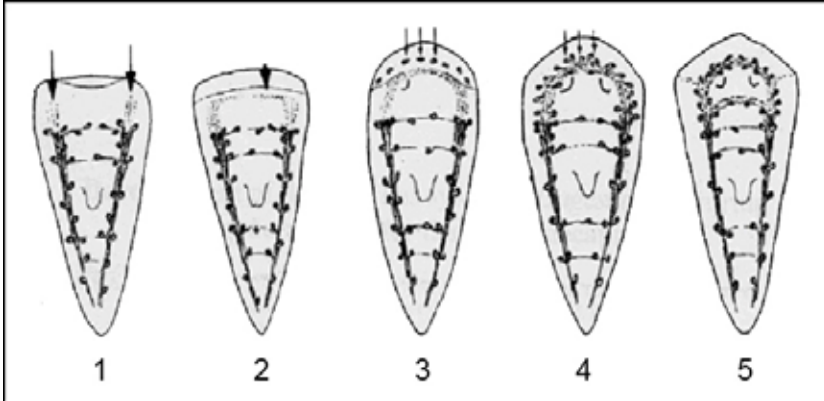


Figura 3.9 Esquema representatiu dels dos processos de regeneració implicats en la regeneració del cervell de planàries. Primer procés; dies 1-2, les fibres nervioses emergents dels cordons nerviosos antics (fletxes) creixen transversalment cap al centre al límit entre blastema i postblastema, i construeix una bastida on es generarà el futur cervell. Segon procés; dies 3-5, acúmulo de nous neoblasts davant la comissura anterior en creixement (fletxes petites). Posteriorment les fibres nervioses fasciculen a l'interior d'aquesta comissura, i més tard apareixen les fibres de les comissures posteriors, i les fibres que van cap a les aurícules. Modificat de Reuter i col., 1996.

Posteriorment, Cebrià i col. (2002), analitzen el procés de regeneració del SNC combinant la immunotinció amb un homòleg de la Sinaptotagmina (SYT) (Tazaki et al, 1999) i la hibridació *in situ* de 12 gens neurals que s'expressen a l'organisme adult

INTRODUCCIÓ

(Figura 3.10). Aquest gens han estat aïllats en projectes de *microarrays* de DNA de la planària *D. japonica*.

Alguns d'aquest gens presenten homologia amb gens coneguts d'altres organismes (N-CAM, receptor de la tirosina fosfatasa, subunitat alfa de proteïnes G, receptor de LDLs, etc.). Segons el moment d'activació durant la regeneració es van classificar en gens d'expressió primerenca, mitjana i tardana.

La combinació d'immunotinció contra DjSYT amb les *in situ* dels diferents gens neurals els fan afirmar que el cervell de la planària no és només una unió dels cordons nerviosos a la part anterior, sinó que els ganglis cefàlics són dues estructures diferenciades amb el cervell en posició més dorsal. També proposen que un homòleg de la família de les netrines s'expressaria a la regió solapant del cervell i els cordons nerviosos ventrals.

Durant el procés de regeneració, el primordi del cervell apareix al blastema al primer dia. En aquest estadi els cordons nerviosos ventrals segueixen trencats a la regió del postblastema. A partir d'aquest punt es defineixen tres estadis:

- Estadi 1: S'observen dos *clusters* bilaterals de cèl·lules al blastema, que possiblement procedeixen de la proliferació de neoblasts del postblastema, i que migren cap al blastema (Saló i Baguñá, 84, Baguñá, 89, Newmark, 2000). Gens candidats responsables de diferenciar aquests neoblasts a cèl·lules del cervell serien els homòlegs dels gens *otd/Otx*.

- Estadi 2: El primordi del cervell esdevé un petit cervell amb les seves dues meitats connectades a la part més anterior i amb poques branques que s'extenen cap a les vores del cap. En aquest estadi observen com els antics cordons nerviosos que romanien al postblastema creixen cap al blastema i es reassocien amb el nou cervell. S'està estudiant el paper de les netrines en aquestes connexions.

- Estadi 3: El SNC ja està reestablert almenys a nivell estructural (cervell esponjós i cordons nerviosos ventrals connectats a través de commissures transversals), però no a nivell funcional, ja que el patró normal de gens neurals d'expressió tardana no està encara restaurat.

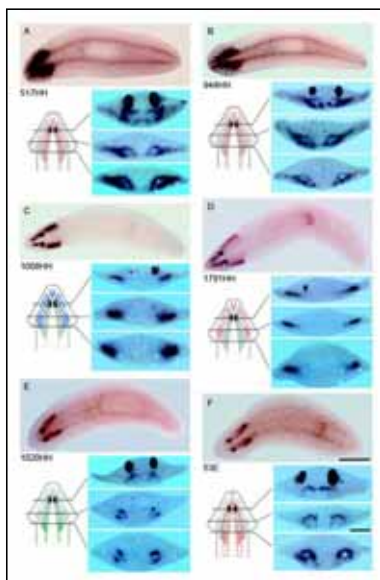


Figura 3.10 Diferents marcadors neurals. Modificat de Cebrià i col., 2002a.

3.4.2 Els Ulls

Per entendre el procés de regeneració dels ulls a planàries s'han realitzat diferents experiments, mitjançant l'ús d'un anticòs monoclonal (anticòs antiarrestina) que reconeix les cèl·lules fotorreptores, i s'ha pogut realitzar un seguiment de les cèl·lules precursors dels ulls. Aquests experiments han permès suggerir un model que postula que els dos tipus cel·lulars de l'ull provindrien d'una primera **cèl·lula precursora**.

Aquestes primeres cèl·lules provindrien de cèl·lules precursors nervioses que emergirien dels ganglis cefàlics a la part anterior del cervell i que migrarien dorsalment fins a arribar a l'anomenat **territori presumptiu de l'ull**. En aquesta zona les cèl·lules proliferarien donant lloc a una cèl·lula fotorreptora i a una cèl·lula pigmentada. Ambdues cèl·lules s'agreguarien formant una unitat bàsica bicel·lular.

Posteriorment, aquestes unitats bàsiques s'aguparien i fusionarien, i anirien formant una unitat més complexa d'unes 30-35 unitats bàsiques que donaria lloc a les taques oculars.

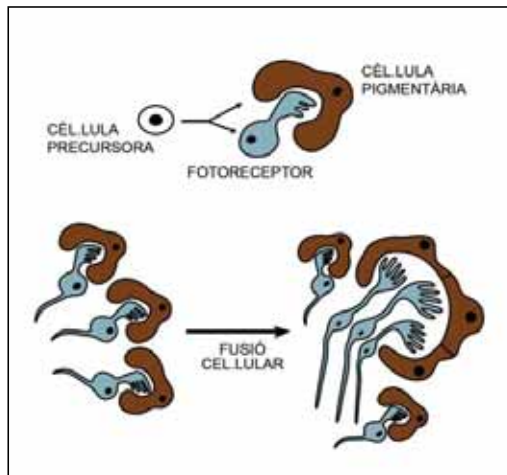


Figura 3.11 Model gràfic que representa com d'una primera cèl·lula precursora se'n generen els dos tipus cel·lulars de l'ull: la cèl·lula fotorreptora i la cèl·lula pigmentària. Posteriorment, i per l'agregació de les cèl·lules pigmentàries i l'agrupament dels rabdòmers de les cèl·lules fotorreptores en l'espai intern de la copa es formen les taques oculars més complexes.

4. ELS GENS PAX. PAX6 I LA MORFOGÈNESI DE L'ULL

4.1 INTRODUCCIÓ

L'anàlisi genètica i molecular del desenvolupament tant de vertebrats com de *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* i molts d'altres organismes ha aportat una gran i rica acumulació d'informació per entendre els mecanismes de desenvolupament. S'han pogut extrapolar nous conceptes de tots aquests estudis, i en especial el fet que, en els processos de desenvolupament d'animals amb una arquitectura i embriogènesi clarament diferent, hi intervenen proteïnes reguladores molt conservades entre elles. És el cas dels gens *Hox*, presents a tots els animals, que són un grup de gens que pertanyen a la família de gens amb homeobox, estan organitzats en *clusters* i diversifiquen l'eix antero-posterior (Gehring i col., 1994).

Molts altres gens amb homeobox també tenen el seu representant homòleg a moltes espècies i semblen tenir funcions conservades (Manak i Scott, 1994). La caracterització molecular i l'estudi funcional en el desenvolupament dels ulls i el sistema nerviós central del gen *Pax6* a vertebrats i *Drosophila*, ens suggereix que els homòlegs d'aquest gen comparteixen una funció conservada (Halder, 1995b). Així, l'estudi dels gens homòlegs de *Pax6* a altres *fila* ens permetrà hipotetitzar que els mecanismes dependents de *Pax6* podrien ser un punt en comú en el desenvolupament dels ulls i el sistema nerviós en el regne animal.

4.2 LA FAMÍLIA PAX

L'estudi de les bases genètiques i els mecanismes moleculars del desenvolupament dels vertebrats i dels invertebrats ha resultat en la identificació de diferents famílies de gens reguladors de la transcripció; una d'aquestes famílies és la dels gens *PAX* (veure revisió. Noll, 1993).

La característica principal a nivell d'estructura molecular dels gens *Pax* és la presència de la **caixa Paired**. Aquesta caixa, d'uns 384 parells de bases (pb) està formada per dos dominis independents; el domini PAI en posició N-terminal i el domini RED en posició C-terminal. Cada domini conté un motiu hèlix-volta-hèlix, ambdós units per una regió *linker*, i que formen un domini d'unió al DNA de 128 aminoàcids. El domini paired va ser identificat per primera vegada a *Drosophila* en els gens de segmentació *paired*, *gooseberry* i *gooseberry neuro*. Posteriorment, es van detectar gens amb caixa paired a molts d'altres organismes.

La importància d'aquests gens en el desenvolupament queda palesa en analitzar els diversos mutants d'alguns d'ells tant a vertebrats com a invertebrats. Així, a *Drosophila*, mutacions dels gens *paired*, *goseberry*, *goseberry-neuro*, *Pox meso*, *Pox neuro* i *eyeless* donen defectes del desenvolupament en les fases de segmentació, neurogènesi i desenvolupament de l'ull (Noll, 1993; Quiring, 1994). Mutacions del gen *Pax1* de ratolí interfereixen en el desenvolupament normal de l'esquelet axial i donen el fenotip conegut com *undulated*. El mutant de ratolí *Small eye* té severament afectat el desenvolupament dels ulls, del nas i del sistema nerviós central, i correspon a mutacions en el gen *Pax6*. En humans, mutacions en gens *Pax* s'han associat a tres desordres congènits i, en concret, mutacions de *Pax6* estan associades a l'Anirídia (Ton, 1991).

Atenent als homòlegs dels gens *Pax* aïllats a vertebrats s'ha agrupat a aquests gens en quatre grups paràlegs diferents segons la presència o absència d'un domini homeòtic sencer o parcial i d'un octapèptid conservat (Dahl i col., 1997). També hi ha aminoàcids específics de cada classe. A la Figura 4.1 veiem una representació esquemàtica d'aquests quatre grups .

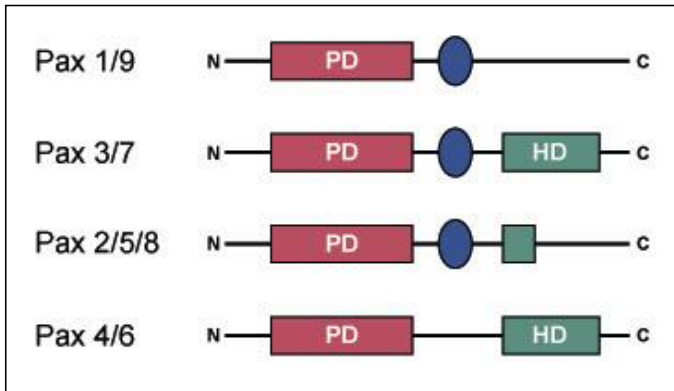


Figura 4.1 Classificació dels gens *Pax* de vertebrats en quatre grups, segons la presència o absència dels dominis estructurals: domini paired, domini homeòtic de tipus paired i octapèptid. Grup format per *Pax1* i *Pax9*, que no presenten el domini homeòtic de tipus paired. Grup *Pax3* i *Pax7*, que presenten els tres dominis. Grup *Pax2*, *Pax5* i *Pax8*, que presenten un homeodomini parcial que només conté la primera hèlix α . I grup *Pax4* i *Pax6* que no contenen l'octapèptid.

4.3 PAX6: ESTRUCTURA MOLECULAR

Els gens *Pax6* van ser aïllats inicialment a vertebrats, en concret a humans, ratolí i peix zebra. Posteriorment s'han aïllat els homòlegs de *Pax6* a guatlla, pollastre, rata, peix medaka i axolot (veure Callaerts i col., 1997 per referències).

El primer gen *Pax6* trobat a invertebrats va ser a *Drosophila melanogaster* i corresponia al locus *eyeless* (*ey*) (Quiring, 1994). La identificació d'*eyeless* a *Drosophila* va estimular l'interès en trobar els homòlegs de *Pax6* a altres invertebrats i actualment s'han aïllat els homòlegs a platihelminths; *DtPax6* (Callaerts, 1999), a ascídies (Glaridon, 1997), a *Lineus sanguineus* (Loosli, 1996), al calamar *Loligo opalescens* (Tomarev 1997), al nemàtode *C. elegans* (Chisholm & Horvitz, 1995), i a altres organismes com a l'equinoderm *Paracentrotus lividus* (Czerny & Busslinger, 1995) i al cefalocordat amfiox (Glaridon, 1998). Fins i tot a Cnidaris, no s'ha aïllat un gen *Pax6* però sí un possible gen ancestral anomenat *PaxB* (Kozmik i col. 2003).

Tots els gens *Pax6* aïllats, fins ara, codifiquen per unes proteïnes que tenen en comú (Figura 4.2):

- La caixa Paired de 128 aminoàcids a N-terminal
- Una regió *linker* de mida variable
- Un domini homeòtic de 60 aminoàcids
- Una regió rica en prolins, serines i treonines (PST) a l'extrem C-terminal

El domini paired està altament conservat en tots els organismes. Entre vertebrats la seqüència aminoacídica és idèntica i entre invertebrats la identitat de seqüència està per sobre del 90%. En comparar la seqüència del domini paired dels gens homòlegs de *Pax6* amb altres gens *Pax*, veiem que hi ha 8 aminoàcids que es podrien considerar com a específics de *Pax6*, i que els identifica com a homòlegs reals; serina 21, alanina 34, isoleucina 42, glutamina 44, arginina 66, cisteïna 91, isoleucina 114 i alanina 128 (Loosli, 1995). Aquests aminoàcids estan conservats en tots els

INTRODUCCIÓ

organismes excepte a *P. mamillata* que té una única substitució i a *C. elegans* i *G. tigrina* (*Dtpax6*) que en tenen quatre.

El domini homeòtic dels gens *Pax6* també està altament conservat i mentre que els homeodominis dels gens *Pax6* de vertebrats són idèntics, els d'invertebrats tenen un tant per cent d'identitat superior al 90%. És el gen *Dtpax6*, que en aquest treball passarem a anomenar *Gtpax6B* de *G. tigrina*, el més divergent, amb un 73% d'identitat. Una característica comuna és també una **serina en posició 50** compartida per tots ells, i és conegut que aquest aminoàcid en aquesta posició és un fort determinant per a l'especificitat d'unió al DNA de l'homeodomini tant *in-vitro* com *in-vivo* (veure revisió Callaerts, 1997 per més detalls). També trobem altres similituds de seqüència en les zones flanquejants de l'homeodomini tant a un costat com a l'altre.



Figura 4.2 Estructura en tres dimensions d'una proteïna Pax on localitzem: el domini Paired (PD) amb els subdominis PAI (N-terminal) i RED (C-terminal) compost cadascun per tres hèlix α . La tercera hèlix de cada subdomini (en vermell) es mostra en contacte amb el solc major del DNA. L'octapeptid (verd) no és present a la classe Pax4/Pax6. L'homeodomini (HD) presenta una estructura hèlix-volta-hèlix. I finalment trobem el domini de transactivació carboxi-terminal (TD). Modificat de Chi i Epstein, 2002.

Finalment, i a la zona *linker* entre els dos dominis, trobem una seqüència d'11 aminoàcids molt conservada i que correspon als aminoàcids MYDKLRMNGQx, tot i que no és present en alguns organismes com *P. mamillata* i al gen *Dtpax6* de *G. tigrina*. Es creu que aquest undecapeptid no és necessari per a la funció final de *Pax6*, segons els experiments de Glardon i col·laboradors (1997).

A nivell de l'organització genòmica, i tenint en compte que la pèrdua o adquisició d'introns és un fenomen rar en l'evolució, la conservació de llocs d'*splicing*, tant en el domini paired com en el domini homeòtic, donen clar suport a pensar que tots els gens *Pax6* aïllats de totes aquestes espècies són homòlegs.

4.4 PAX6 A DROSOPHILA

4.4.1 Aïllament

Una mutació *eyeless* ja fou descrita el 1915 amb els treballs de M. A. Hoge, que es basaven en les característiques fenotípiques d'absència parcial o total dels ulls

compostos de *Drosophila*. Però aquest mutant va adquirir especial interès quan es va aïllar un gen de *Drosophila* que contenia una caixa paired i una caixa homeòtica que tenien una alta homologia amb el gen *Pax6* de ratolí i que mapava al cromosoma IV en una regió pròxima al locus *eyeless*. Els treballs de Quiring i col. al 1994 van definir dues mutacions espontànies; *ey2* i *eyr* que contenien un transposó inserat en el gen clonat i que n'afectaven la seva expressió, particularment en el primordi de l'ull. Així, el gen *ey* de *Drosophila*, el gen *Small eye* de ratolí i el gen causant de l'Anirídia humana codificaven per proteïnes homòlogues i, més important encara, tots ells estaven involucrats en la morfogènesi de l'ull (Figura 4.3). Això, els portà a proposar que els processos de morfogènesi de l'ull estaven sota un control genètic similar tant a vertebrats com a insectes, tot i les grans diferències morfològiques i de tipus de desenvolupament embrionari d'ambdós tipus d'ulls.

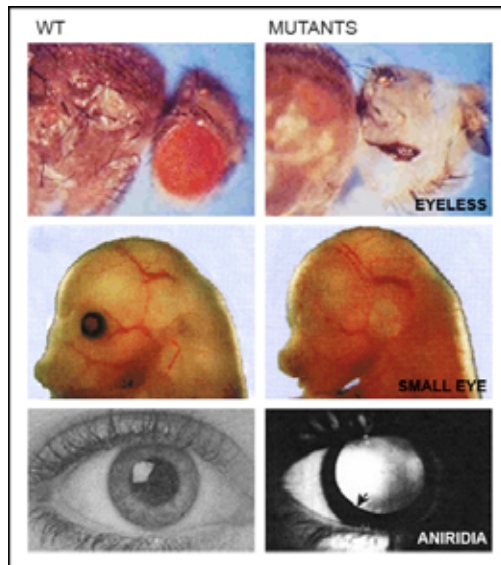


Figura 4.3 Fenotips mutants i normals dels gens *Pax6*. **A l'esquerra**, ulls compostos de *Drosophila* adulta, embrió de ratolí i ull humà. **A la dreta**, mutant *eyeless* amb una reducció considerable d'omatidis, manca d'ulls en el mutant *Small eye* d'embrió de ratolí i manca d'iris en el síndrome mutant d'anirídia humana. Modificat de Saló, 2004.

El primer gen *Pax6* aïllat a *D. melanogaster*, com hem comentat, corresponia al locus *eyeless* (*ey*) (Quiring, 1994) i, per això, actualment se'l continua anomenant *eyeless* (*ey*). Posteriorment es va aïllar un segon gen *Pax6* a *D. melanogaster* que anomenaren *twin of eyeless* (*toy*) (Czerny, 1999). I més endavant s'han aïllat dos gens més relacionats amb *Pax6*, el gen *eyegone* (*eyg*) i el gen *twin of eyegone* (*toe*) (Jun i col, 1998).

Mentre que les proteïnes codificades pels gens *ey* i *toy* són estructuralment molt semblants, els gens *eyg* i *toe* també codifiquen per proteïnes Pax-like però amb el domini paired truncat (només contenen el domini anomenat RED) i un domini homeòtic de la classe paired complet (Jun i col., 1998). Els gens *eyg* i *toe* conserven la serina en posició 50 del seu domini homeòtic paired-like, però el fet que els manqui gran part del domini PAI els fa classificar com un nou grup dins de la família Pax (Jun i col., 1998).

INTRODUCCIÓ

4.4.2 L'ull compost de *Drosophila*

L'ull de *Drosophila* és una estructura altament organitzada que està formada pel voltant de 800 unitats repetides (òrgans fotoreceptors) anomenades omatidis, disposats de manera hexagonal. Cada omatidi està estructurat, a la vegada, per 8 cèl·lules fotoreceptores (R1-R8) acompanyades de 12 altres cèl·lules de suport, no neuronals, i que formen una estructura molt precisa (revisat a Wolf & Ready, 1993).

El desenvolupament del l'ull compost s'inicia en un petit grup de cèl·lules epitelials de l'embrió que proliferen durant l'estadi larvari i que formen la part del disc imaginal d'ull-antena que donarà lloc a l'ull.

La diferenciació i organització d'aquestes cèl·lules en un patró comença a l'estadi de larva III. A mesura que es forma el solc morfogenètic (*MF*) a la part posterior del disc imaginal s'activa l'ona d'expressió de gens, iniciada per la proteïna senyalitzadora Hedgehog (*Hh*) i que provoca la diferenciació, en forma de columna, de les cèl·lules que formaran els omatidis. La primera cèl·lula diferenciada de l'omatidi és la cèl·lula fotoreceptora R8 i aquesta serà l'encarregada d'induir les cèl·lules veïnes a formar la resta de l'omatidi (Figura 4.4). Ja en estadi de pupa, l'estructura final de l'ull adult es refina eliminant, per apoptosi, les cèl·lules sobrants que hagin quedat entre els omatidis (Freeman, 1996).

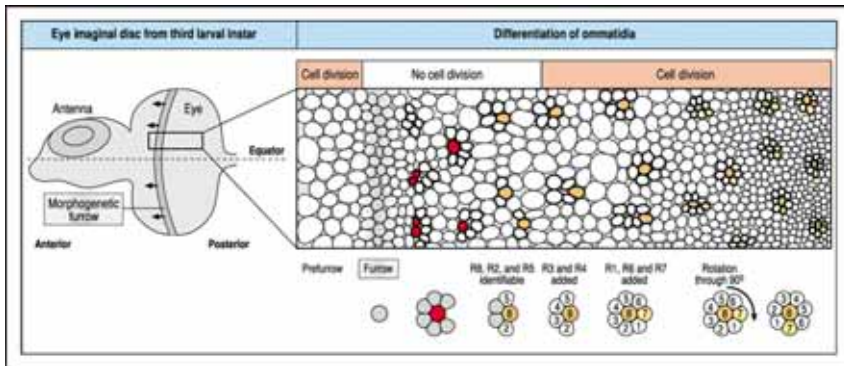


Figura 4.4 Desenvolupament dels omatidis a l'ull compost de *Drosophila*. Durant la tercera fase larvària el solc morfogenètic (*MF*) es mou com una ona des de la zona posterior a la part anterior. Els omatidis es desenvolupen darrere del *MF*, i les neurones fotoreceptores es diferencien segons l'esquema. És la cèl·lula R8 la primera en diferenciar-se i la R7 la darrera. Tret de L. Wolpert 2a Edició.

4.4.3 Expressió i funció dels gens *Pax6* a l'ull de *Drosophila*

Durant l'embriogènesi *ey* s'expressa al primordi de disc imaginal d'ull, als lòbuls òptics i en altres regions discretes del cervell i al cordó nerviós ventral. Durant el desenvolupament larvari *ey* segueix expressant-se al llarg de la zona indiferenciada del disc imaginal d'ull. Aquesta expressió es manté fins al seu desplaçament amb l'avanç del *MF* a la tercera fase larvària. Més tard, s'associa de nou l'expressió d'*ey* en la diferenciació terminal dels fotoreceptors i serà necessària per a l'expressió dels gens de les opsines (Halder i col, 1998).

L'expressió d'*ey* i *toy* és molt similar, si no idèntica, en el desenvolupament del sistema visual de *Drosophila* amb l'excepció que durant l'embriogènesi *toy* ja s'expressa (abans que ho faci *ey*) a la regió procefàlica posterior d'on s'originaran els primordis de l'ull. Després, *ey* i *toy* es coexpressen al lòbul òptic i al primordi de l'ull a l'embrió tardà a l'igual que ho fan a la zona indiferenciada del disc imaginal d'ull de la tercera fase larvària (Czerny i col., 1999).

Els estudis funcionals mostren que els mutants de pèrdua de funció d'ey afecten principalment els ulls compostos, mentre que mantenen els ocells intactes. En canvi, mutants *toy* mostren una reducció important del cap, perden la càpsula del cap amb els ocells i les antenes, però mantenen la proboscis. La dissecció de la pupa amb el cap reduït per la mutació de *toy* mostra dues esferes d'ulls compostos en el tòrax. Aquests resultats indiquen que *ey* i *toy* han divergit funcionalment, però encara són capaços de complementar-se parcialment; l'al·lel normal per *ey* pot rescatar parcialment la formació de l'ull compost en un fons mutant de *toy*, mentre que l'al·lel normal de *toy* rescata l'ocel, la càpsula del cap i l'antena en un fons mutant *ey* (Punzo i col. 2002; Kronhamn i col. 2002).

Per tal d'estudiar-ne la funció, Halder i col. (1995) van construir organismes transgènics capaços d'expressar el gen *eyeless* de manera ectòpica (amb la tècnica de *dpp-Gal4:UAS-ey*) en altres discs imaginals a part del disc d'ull-antena. Així, van aconseguir obtenir organismes que generaven ulls compostos ectòpics a d'altres regions del cos, com a l'ala, a les antenes i a les potes (Halder i col., 1995), (Figura 4.5a i 4.5b). Aquests experiments van portar al grup de W. Gehring a suggerir que *ey* seria un gen major del desenvolupament. Aquest concepte està actualment encara en fase de debat.

Posteriorment, amb l'aïllament del gen *toy*, es va comprovar que amb l'expressió ectòpica de *toy* també s'indueïa l'expressió d'*ey* i, així, també a la formació d'ulls ectòpics (Czerny i col., 1999) (Figura 4.5b).

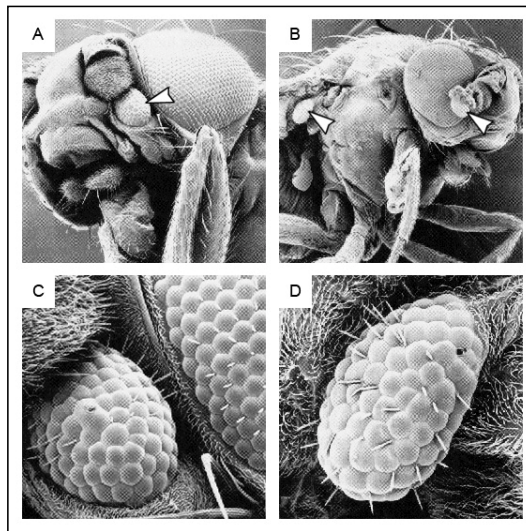


Figura 4.5a Microscòpia electrònica d'*scanner* dels ulls ectòpics de *Drosophila* formats a **A)** antenes, **B)** ales i antenes. **C)** Ampliació de la fotografia A on s'observa que l'ull ectòpic (esquerra) presenta un patró d'organització molt semblant a l'ull normal. Algunes de les facetes estan, però, fusionades o presenten petites irregularitats. **D)** Amplificació de la fotografia B on també observem un patró d'organització de l'ull ectòpic igual al de la fotografia C. Tret de Halder i col., 1995.

Els gens *eyg* i *toe* també s'expressen al primordi del disc imaginal d'ull-antena a l'embrió de *Drosophila*. La seva expressió s'atura al primer estadi larvari i es reactiva de nou a finals de la segona fase larvària on *eyg* tindrà un paper funcional crític.

INTRODUCCIÓ

Eyg és necessari per al desenvolupament de l'ull, ja que els mutants de pèrdua de funció presenten un fenotip de reducció i, fins i tot, pèrdua dels ulls. I també van obtenir fenotips amb ulls ectòpics utilitzant la tècnica d'expressió ectòpica d'*eyg* induït per *dpp-Gal4*. Aquests ulls, però, es generaven només a partir del disc imaginal d'ull-antena (Jang i col., 2003).

En estudiar la possible relació entre *eyg* i *ey* s'ha vist que no s'autoregulen entre ells, però que actuen de manera sinèrgica en el desenvolupament de l'ull. Així els dobles mutants hipomòrfics mostren un fenotip de manca d'ulls més acusat i la coexpressió d'ambdós gens causa un sinergisme positiu en la formació d'ulls ectòpics (Jan i col., 2003).

Els resultats obtinguts per M. Domínguez i col·laboradors (2004) conclouen que *ey* i *eyg* estan regulats de manera independent i mentre que *ey* participa en la determinació de l'ull, *eyg* està implicat en el creixement. Això ens indica que la determinació i el creixement de l'ull de *Drosophila* es regeixen per dos processos independents.



Figura 4.5b Inducció d'ulls ectòpics a *Drosophila* per mitjà de l'expressió dirigida dels gens *eyeless* i *twin of eyeless*. En ambdós casos s'aprecien ulls ectòpics a cadascuna de les tres potes i a les ales, a part de l'ull compost normal. Modificat de Saïó 2004.

4.5 PAX6 A VERTEBRATS

4.5.1 L'ull de vertebrats

El desenvolupament morfològic de l'ull de vertebrats comença amb un embossament del diencéfal anomenat vesícula òptica. Aquesta vesícula contacta posteriorment amb la paret de l'ectoderm del cap i aquest contacte provoca la inducció d'un engrossiment pseudoestratificat de l'ectoderm anomenat placa de la lent. La placa de la lent s'invagina i separa de l'ectoderm que l'envolta per formar la vesícula de la lent. Finalment les cèl·lules de la vesícula de la lent es diferencien en les cèl·lules fibroses característiques de la lent adulta. I a la vegada, la vesícula òptica es doblega cap endins seu i envolta la vesícula de la lent i formant la copa òptica. La copa òptica acabarà començant les capes neural i pigmentada de la retina adulta (Pei, 1970) (Figura 4.6).

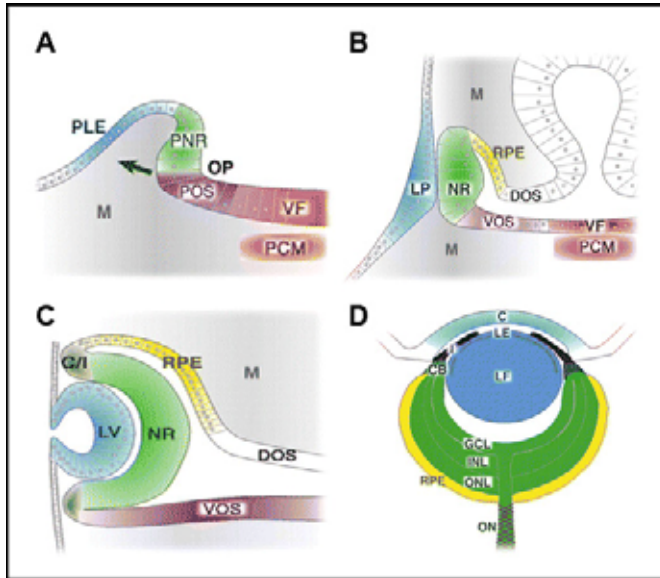


Figura 4.6 Esquema del desenvolupament de l'ull a vertebrats. **A)** La formació de la vesícula òptica s'inicia amb l'evaginació (indicat amb una sageta) de la presumptiva regió del cervell anterior formant l'òptic pit. La regió de la vesícula òptica es divideix en una regió dorsal-distal (verd), que conté la presumptiva retina neural (PNR) i l'epiteli retinal pigmentat (RPE), i una regió proximal-ventral, que dona lloc al presumptiu peduncle òptic ventral (POS). PLE; presumptiu ectoderm de la lent; MF mesènquima; VF cervell anterior ventral; PCM, mesoderm precordial. **B)** El creixement continuat de la vesícula òptica es culmina durant el període d'estret contacte entre la placa de la lent (LP) i la presumptiva retina neural (NR), on es produeix un important intercanvi de senyals inductius. RPE, presumptiu epiteli retinal pigmentat; VOS, peduncle òptic ventral; DOS, peduncle òptic dorsal. **C)** Formació de la vesícula de la lent (LV) i de la retina neural (NR) per invaginació de la vesícula òptica. Així queda ja establert el conjunt d'estructures que formaran l'ull. En el punt d'unió entre la retina neural i l'RPE s'originen els components dels cos ciliar i de l'iris (C/I). **D)** Ull madur; C, còrnia; LE, epiteli de la lent; LF, cèl·lules de la lent; I, iris; CB, cos ciliar; GCL, capa de cèl·lules ganglionars; INL, capa nuclear interna; ONL, capa nuclear externa; ON, nervi òptic. Colors: blau, lent/còrnia; verd, retina neural; groc, RPE; lila; peduncle òptic; vermell, cervell anterior ventral; gris, mesènquima. Tret de Chow i Lang, 2001.

4.5.2 Expressió i Funció

L'expressió de *Pax6* durant els estadis primerencs del desenvolupament dels vertebrats comença cap al final de la gastrulació a placa neural anterior (Del Rio-Tsonis, 1995), i a mesura que avança la neurulació l'expressió es concentra a la regió dorsodistal del territori òptic on es forma la vesícula òptica i també a l'ectoderm presumptiu de la lent. *Pax6* s'expressa per tot en el desenvolupament de la copa òptica (Grindley, 1995) i en la retina diferenciada presenta una expressió molt intensa a les cèl·lules ganglionars i amacrines.

Abans de la inducció de la lent, *Pax6* s'expressa en un ampli domini de l'ectoderm cefàlic i a la vesícula òptica, posteriorment, l'expressió queda restringida a la placa de la lent, vesícula de la lent i vesícula òptica (Figura 4.7). La restricció de *Pax6* a l'ectoderm de la placa de la lent és anterior a l'enguiximent de l'ectoderm, i suggereix que l'expressió de *Pax6* a l'ectoderm ve regulada en resposta a senyals inductors de la vesícula òptica.

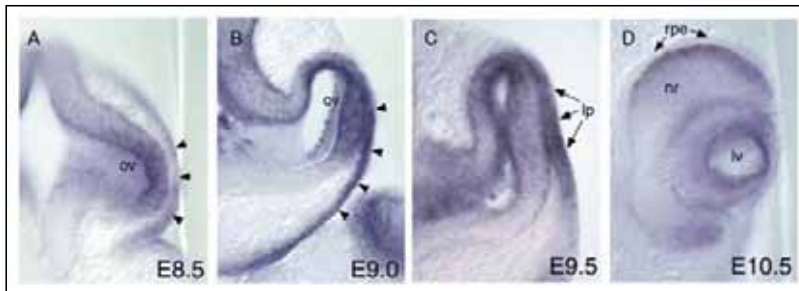


Figura 4.7 Hibridació *in situ whole-mount* (seccions) que mostra l'expressió de *Pax6* en el desenvolupament de l'ull de ratolí. **A)** A E8.5, *Pax6* s'expressa a la vesícula òptica (ov) i a l'ectoderm que la recobreix (sagetes). **B)** A E9.0, la vesícula òptica contacta amb la superfície de l'ectoderm i *Pax6* s'expressa en un ampli domini de l'ectoderm cefàlic i a la vesícula òptica. **C)** A l'estadi E9.5, abans de l'engrossiment de l'ectoderm cefàlic l'expressió de *Pax6* queda restringida a la placoda presumptiva (lp). **D)** A l'estadi E10.5 es detecta *Pax6* a la vesícula de la lent i a la copa òptica. Rpe, epitelí retinal pigmentat; nr, neuroretina. Tret de S. Wawersik i R.L. Maas, 2000.

A més d'aquesta expressió en els ulls, *Pax6* també és essencial per al desenvolupament d'altres regions i òrgans com l'epiteli nasal (Hogan, 1986), el cervell (Grindley, 1997), el pàncreas (St-Onge, 1997) i les glàndules lacrimals (Makarenkova, 2000).

Els mutants de pèrdua de funció de *Pax6* són semidominants i en heterozigosi donen lloc al fenotip *Small eye* (*Sey*) a ratolí (Hill, 1991, Hogan 1986), que es caracteritza per cataractogènesi, hipoplàsia de l'iris i microftàlmia. En humans, mutacions similars causen la síndrome d'Anirídia (Glaser, 1992).

Una única còpia del locus *Pax6* podia rescatar el fenotip *Sey*. Però els estudis de Schedl i col. (1996), en els que s'introduïen còpies addicionals del locus *Pax6* en ratolins transgènics i observaven defectes en el desenvolupament dels ulls, els van portar a la idea que un dosatge gènic de *Pax6* era important per al desenvolupament normal de l'ull.

Ratolins amb una mutació *Sey* en homozigosi són anoftàlmics i moren al néixer. Aquests mutants presenten vesícula òptica però no es constricciona proximalment, fet que produeix un espai peduncular luminal.

La capacitat de *Pax6* d'induir ulls ectòpics dona suport a la idea que aquest gen té un paper crític en els estadis primerencs del desenvolupament dels ulls. Estudis d'expressió ectòpica dels gens *Pax6* de ratolí (Halder, 1995), calamar (Tomarev, 1997) o ascídies (Gardon, 1997) en els discs imaginals no d'ull de *Drosophila* donaven lloc a la formació d'ulls ectòpics en aquests discs. També, s'aconseguia la inducció d'ulls ectòpics a *Xenopus*, per expressió ectòpica del gen *Pax6* i, fins i tot, s'induïa a l'expressió ectòpica de gens primerencs del desenvolupament d'ull com *Otx2*, *Rx*, *Six3* i el mateix *Pax6* endògen (Chow, 1999). Aquest ulls ectòpics només es formaven quan s'injectava el mRNA de *Pax6* als blastòmers del pol animal dorsal (zona que dona lloc als teixits ectodèrmic i neural) i això indicava que es requereixen altres factors, a més de *Pax6*, per a la inducció ectòpica dels ulls. I també en els experiments recíprocs, amb la injecció de mRNA dels gens *ey* i *toy* s'ha pogut induir la formació de retines, d'epiteli retinal pigmentat i de lents a *Xenopus* (Onuma i col., 2002) (Figura 4.8).



Figura 4.8 Expressió ectòpica d'*ey* i *toy* a *Xenopus*. **A)** Organismes control. **B)** Inducció d'epiteli pigmentat per injecció d'RNA d'*ey*. **C)** Duplicació dels ulls per injecció de RNA de *toy*. Esc barres 1mm. Modificat de Gehring 2004.

Per a l'estudi d'estadis més tardans en el desenvolupament dels ulls van construir ratolins quimera derivats de ratolins *Sey/Sey* i cèl·lules salvatges. Aquests estudis van revelar que hi havia un requeriment autònom cel·lular de *Pax6* a les lents, a la vesícula òptica, i a la retina. I finalment la utilització d'un al·lel condicional *Pax6* nul, activat per l'expressió d'un *enhancer*-dirigit *Cre* de retina mostrava que *Pax6* té un paper essencial en el manteniment de l'estat multipotent de les cèl·lules progenitores de la retina (Marquardt, 2001).

4.6 PAX6 A ALTRES ORGANISMES MODEL

4.6.1 *Cnidaris*

Els cnidaris són el *filum* més basal amb un sistema visual ben desenvolupat i localitzat en una estructura sensorial especialitzada anomenada *rhopalial* (Figura 4.9 A i B), amb un ull gran, un ull petit i un estatocist. La medusa *Tripedalia cystophora* té un ull en forma de càmera amb lent i, fins i tot, tres tipus de cristal·lins. *Tripedalia* té un únic gen *Pax*, *paxB*, que codifica per un híbrid estructural i funcional de *Pax6* y *Pax2-5-8* (Kozmik i col., 2003). La proteïna *PaxB* té un domini *paired-like* tipus *Pax2-5-8*, té un octapeptid i també té un homeodomini tipus *Pax6* (Figura 4.9 C).

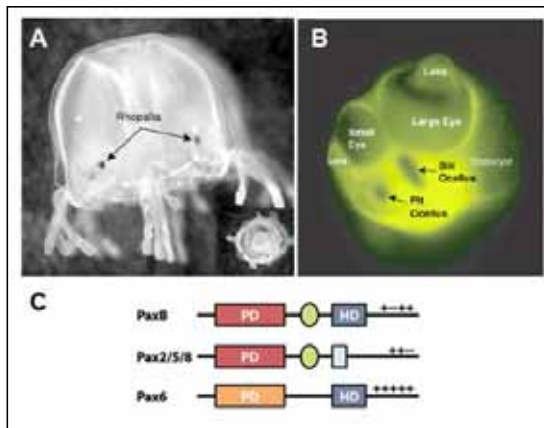


Figura 4.9 A) Imatge d'una medusa adulta de *T. cystophora* on observem els sensors *rhopalial* (fletxes). Vista des de la part inferior, en el recuadre. **B)** *Rhopalium* ampliat i tenyit amb dye fluorescent i pseudopintat en groc. **C)** Dibuix esquemàtic de les estructures de les proteïnes *PaxB*, *Pax2/5/8* i *Pax6*. Modificat de Piatigorsky i Kozmik, 2004.

INTRODUCCIÓ

Funcionalment, el domini paired de *paxB* conserva la propietat d'unió al DNA com els gens *Pax2-5-8* i també els dominis d'activació i inhibició. A l'igual que *Pax6*, *paxB* activa el gen que activa l'expressió dels cristal·lins de la medusa i també activa els promotors de la rodopsina rh6 de *Drosophila* i, fins i tot, indueix petits ulls ectòpics a *Drosophila*. Finalment, també reverteix la pèrdua de funció del gen *pax2* de *Drosophila*.

Per hibridació *in situ*, van observar expressió de *paxB* tant a les lents com a la retina i l'estatocist (KozmiK i col., 2003). Veiem, doncs, que *paxB* es podria considerar el gen ancestral a partir del qual als Bilaterals es formaren els gens *Pax6* i *Pax2*.

4.6.2 Nemertins

S'ha aïllat un únic gen *Pax6* al nemertí *Linneus sanguineus* (Loosli i col., 1996). A nivell estructural aquest gen comparteix una gran homologia de seqüència i diversos llocs d'*splicing* amb els gens de mamífers i *Drosophila*.

L. sanguineus no es reproduïx sexualment al laboratori però atenent a la seva gran capacitat de regeneració, s'ha estudiat l'expressió de *Lspax6* durant la regeneració del cap després de ser decapitat.

La seva expressió es detecta als òrgans cerebrals regenerants, localitzats bilateralment i amb una funció olfactiva, com també passa al peix zebra (Krauss i col., 1991) i al ratolí (Whalter i col., 1991). En estadis més tardans de regeneració, i de manera anterior als òrgans cerebrals, apareixen dos dominis nous d'expressió que estan correlacionats tant temporalment com espacial amb l'aparició dels ulls.

4.6.3 Ascídies

L'ascídia *Phallusia mamilata* és un urocordat que presenta una fase larvària. La larva és la que presenta una notocorda primitiva, el cervell, un cordó nerviós dorsal, un estatocist (òrgan sensorial gravitatori) i un ocel. L'ocel està compost d'unes poques cèl·lules pigmentades, cèl·lules sensorials i cèl·lules que formen la lent.

El gen *Pax6* de *P. mamilata* (Glardon, 1997) ja s'expressa des dels estadis tardans de la gàstrula en diverses regions de la placa neural en desenvolupament. A l'estadi de *tailbud* s'expressa al cordó espinal i a les vesícules del cervell on es formaran els òrgans sensorials (ocel i estatocist), fet que suggereix una funció important en el desenvolupament dels òrgans sensorials.

En introduir el gen *Pax6* de *P. mamilata* a *Drosophila* i activar-ne la seva expressió ectòpica s'indueix la formació d'ulls ectòpics a *Drosophila*.

4.6.4 Annèlids

L'annèlid *Platynereis dumerilii* (poliquet) desenvolupa dos tipus d'ulls, un parell d'ulls larvaris i dos parells d'ulls en forma de copa a l'adult. Els ulls larvaris estan formats només per una única cèl·lula pigmentada i una de fotoreceptora i serien també molt semblants al proto-ull proposat per Darwin.

Els estudis d'expressió del gen *Platynereis pax6* mostren que aquest gen s'expressa en les cèl·lules precursors dels ulls larvaris i en els ulls larvaris diferenciats, però no sembla que s'expressi durant el desenvolupament dels ulls de l'adult (Arendt i col., 2002) (Figura 4.10). En aquest cas *Platynereis pax6* no estaria implicat en el control transcripcional de la diferenciació de l'ull adult.

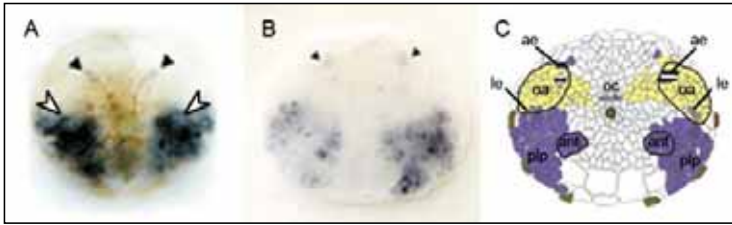


Figura 4.10 **A)** Expressió del gen *Pdpax6* durant el desenvolupament de l'ull de la larva a 36h. Les fletxes blanques indiquen la regió dels ulls. **B)** Expressió del gen *Pdpax6* durant el desenvolupament dels ulls adults de la larva metatrocòfora de 2 dies. **C)** Esquema de l'expressió del gen *Pdpax6* en lila. ae; ulls adults, le; ulls larvaris. oa; territori presumptiu de l'ull. oc; comissura òptica. ant; antenes. plp; palps. Modificat de Arendt i col., 2002.

4.6.5 *Amfiox*

S'ha aïllat un únic gen *Pax6* (*AmphiPax6*) al cefalocordat *B. Floridae* amb una alta homologia amb el gen *Pax6* de vertebrats (92% d'homologia amb el domini paired de vertebrats i 100% d'homologia amb el domini homeòtic) (Gardron et al., 1998).

El gen *AmphiPax6* s'expressa des de l'estadi d'embrió a l'epidermis anterior i aquesta expressió estaria relacionada amb el desenvolupament de l'epiteli olfatori. També es detecta expressió al diverticle de Hatschek que donarà lloc a l'homòleg de l'hipòfisi. Hi ha una zona d'expressió a la placa neural anterior que es restringirà finalment dins de la vesícula cerebral. Aquesta zona inclou les cèl·lules que es diferenciarien per formar els cossos lamelars, que serien els homòlegs de l'ull pineal de vertebrats.

A l'estadi de nèurula, *AmphiPax6* també s'expressa a les cèl·lules ventrals a la zona anterior del cordó nerviós. Aquestes cèl·lules són les precursors dels fotoreceptors de l'ull frontal, que seria l'homòleg dels ulls de vertebrats (Figura 4.11).

Per contra del que s'esperaria, *AmphiPax6* no s'expressa en els altres dos tipus de fotoreceptors de l'animal, ni a les Joseph cells ni a l'òrgan de Hesse.

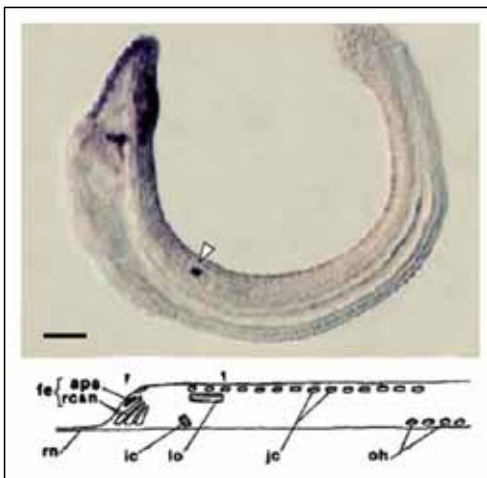


Figura 4.11 **A** dalt, hibridació *in-situ* de la larva d'amfiox on s'observa marcatge d'*AmphiPax6* a l'ectoderm anterior, vesícula cerebral i al diverticle de Hatschek. La fletxa indica la taca primària pigmentada. **A** baix, Esquema de les diferents parts d'un amfiox on localitzem els quatre grups de cèl·lules fotoreceptors; ull frontal (fe), òrgan lamelar (lo), Joseph cells (jc) i òrgans de Hesse (oh). Esc. barra 50 µm. Modificat de Gardron i col., 1998.

INTRODUCCIÓ

5. GENS SIX/SO

5.1 INTRODUCCIÓ

La família de gens *Six/so* va ser identificada per homologia amb el gen *sineoculis* i degut al seu paper essencial en la morfogènesi de l'ull a *Drosophila*. A grans trets, aquesta família es caracteritza a nivell estructural per presentar dos dominis proteics; un domini Six i un domini homeòtic, ambdós especialitzats en la funció d'unió específica al DNA i la unió a les proteïnes Eya. En mamífers s'han trobat fins a sis gens *Six*, i també s'han identificat desordres genètics en humans en els que hi ha implicats els gens *Six*.

La caracterització dels gens *Six* dels molts *fila* animals ens fa entreveure l'antiguitat d'aquesta família gènica i l'important paper que juguen en diferents contextos del desenvolupament. Alguns dels membres d'aquesta família mantenen un rol conservat com a components d'una xarxa reguladora Pax-Six-Eya-Dach, que ja deuria haver estat establerta, en un ancestre comú als animals bilaterals, com una caixa gènica que controlaria processos de proliferació i moviment cel·lular durant l'embriogènesi. Una d'aquestes caixes està implicada en la morfogènesi de l'ull, i els seus candidats a formar-ne part són el gen *sineoculis/Six1-2* i el gen *optix/Six3*.

5.2 ESTRUCTURA MOLECULAR

Els gens de la família *Six* han estat identificats a moltes espècies; humans, ratolí, pollastre, *Xenopus*, ascídies, peixos, *C. elegans* i *Drosophila* entre d'altres (veure Kawakami i col., 2000 per referències). Tots ells presenten semblances estructurals (Figura 5.1A) que els caracteritzen:

- Una caixa Six; en posició anterior al domini homeòtic i d'una llargada que oscil·la entre 110 i 115 aminoàcids. Aquesta caixa té com a funció unir-se al DNA però també se n'ha descrit la unió proteïna-proteïna, ja que aquest domini Six interactua amb el domini Eya (ED) de les proteïnes Eya (Pignoni, 1997). Excepte en el cas de la proteïna Six3, s'ha identificat la interacció específica dels dominis homòlegs conservats entre les proteïnes Eya i Six a ratolí (Heanue, 1999; Ohto, 1999) i a planària (Mannini i col., 2004).
- Un homeodomini de tipus Six; domini de 60 aminoàcids i característic d'aquesta família per la manca de dos aminoàcids altament conservats a la majoria de proteïnes amb homeodomini; una arginina en posició 5 i una glutamina en posició 12 de l'hèlix 1.

Les proteïnes Six/so s'han classificat en base a la seqüència tant de la caixa Six com de l'homeodomini en tres subfamílies; Six1-2, Six3-6 i Six4-5 (Figura 5.1B). La conservació de les seqüències és més alta entre els gens membres de cada una de les subfamílies. Seo i col·laboradors (1999) van detectar un tetrapèptid en posició N-terminal del domini homeòtic que permet, juntament amb altres característiques, classificar cada proteïna Six dins de la seva subfamília. Així, les proteïnes del grup Six1-2 mantenen el tetrapèptid ETSY, les de grup Six3-6 mantenen la seqüència QKTH i les del grup Six4-5 la seqüència ETVY (Figura 5.1B).

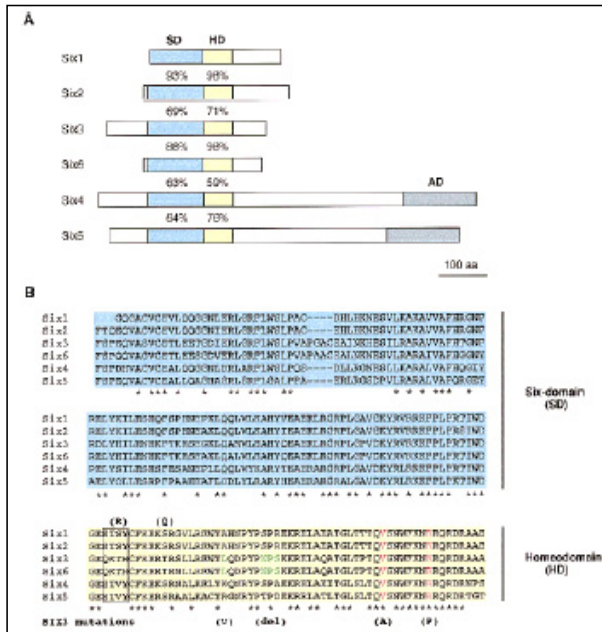


Figura 5.1 Estructura de la família de proteïnes Six. **A)** Representació de les proteïnes Six de ratolí; domini Six (blau cel) i homeodomini de tipus Six (groc) amb els percentatges d'identitat de seqüència. Els dominis d'activació (AD) del les proteïnes Six4 i Six5 estan marcats en gris. **B)** Alineament de les seqüències dels dominis Six i homeòtic. Els asteriscs indiquen els aminoàcids conservats en totes les proteïnes Six. S'ha requadrat el tetrapèptid que permet classificar les diferents proteïnes Six en tres subgrups Six1-2, Six3-6 i Six 4-5. Tret de Kawakami i col., 2000.

5.3 ELS GENS SIX A INVERTEBRATS

Per entendre la funció dels gens *Six* és indispensable analitzar-ne la seva expressió. *Drosophila*, com a organisme model més conegut, ha estat clau per aquesta finalitat. Actualment s'han aïllat tres gens de la família *Six* a *Drosophila*, cadascun dels quals pertany a un dels tres subgrups. Així tenim a *sineoculis* com a representant del grup *Six1-2*, *optix (Dsix3)* del grup *Six3-6* i *Dsix4* del grup *Six4-5*.

El primer gen aïllat fou *sineoculis (so)* i es va constatar que jugava un paper essencial en el control de la morfogènesi de l'ull (Cheyette, 1994). L'estudi del primer mutant obtingut (*so1*), que conté una deleció intrònica, afectava tant l'estructura dels ulls compostos com la dels ocells de l'adult i produïa un fenotip de manca d'ulls (Heitzler i col., 1993).

Més tard, una nova mutació (*somda*) obtinguda per transposició d'un element P també provocava múltiples aberracions ja a nivell embrionari i larvari (Serikaku, 1994). En aquest mutant la reducció de l'expressió de *so* es produeix en el desenvolupament embrionari i això provoca un desenvolupament aberrant del lòbul òptic embrionari i dels fotoreceptors larvaris (òrgan de Bolwig). Posteriorment, l'adult no és capaç de projectar els axons provinents dels fotoreceptors cap al gangli òptic i aquesta manca de connexió axonal porta a una degeneració dels fotoreceptors per apoptosi.

Així, doncs, el gen *so* és necessari per al desenvolupament de tot el sistema visual de *Drosophila*, incloent els ulls compostos adults, els ocells, el lòbul òptic i, fins i tot, l'òrgan fotoreceptor larvari o òrgan de Bolwig.

Posteriorment, s'han descrit dos nous gens *Six* a *Drosophila*, el gen *optix (Dsix3)* i el gen *DSix4* i la seva anàlisi d'expressió (Seo, 1999) revela que ambdós gens

INTRODUCCIÓ

s'expressen molt aviat i també en àrees molt restringides de la regió del cap (cervell i apèndix) de l'embrió i de la larva, fet que suggereix que els gens *Six* a *Drosophila* tenen un paper important en el desenvolupament dels òrgans cefàlics.

Dsix4 però, no s'expressa a l'ull de *Drosophila* mentre que *optix* sí que ho fa. El gen *optix* té un patró d'expressió similar a *ey* al primordi de l'ull i també té una expressió anterior al MF en el disc imaginal d'ull-antena.

L'expressió ectòpica d'*optix* en el disc d'antena provoca la inducció d'ulls ectòpics a les antenes, donant a *optix* un paper essencial per al desenvolupament de l'ull però, al igual que *eyg*, no estaria involucrat en la xarxa morfogenètica de l'ull. Així, l'expressió d'*optix* és completament independent de l'expressió d'*ey*, ja que els ulls induïts per l'expressió ectòpica d'*optix* no expressen *ey* i, a més, *optix* pot induir ulls ectòpics en mosques deficientes d'*ey* (Seimiya i Gehring, 2000).

A *C. elegans* s'han descrit 4 membres de la família *Six*: *ceh-32*, *ceh-33*, *ceh-34* i *ceh-35*. Els estudis realitzats per Dozier i col.laboradors (2001) demostren que *ceh-32* té un paper important en la morfogènesi del cap i també suggereixen que aquest gen actuaria *downstream* i directament regulat per *vab-3* (l'ortòleg de *Pax6* a *C. elegans*). De moment, i respecte als altres tres gens, només es coneix que *ceh-33* i *ceh-35* no estarien implicats en la morfogènesi del cap.

En el cas d'annèlids, els treballs d'Arendt i col. (2002) amb el poliquet *Platynereis dumerilii*, s'ha descrit un gen *Six1/2* (*Pdsix1-2*) i se'n detecta l'expressió tant en les dues cèl·lules que formen l'ull larvari com al parell d'ulls de l'adult (Figura 5.2). A l'igual que *Drosophila*, aquest gen estaria implicat en el desenvolupament de tot el sistema visual de *P. dumerilii*. Aquest grup suggereix, a partir d'aquests resultats, un paper evolutivament antic dels gens *Six1/2* en l'especificació primerenca dels sistemes visuals dels Protòstoms.

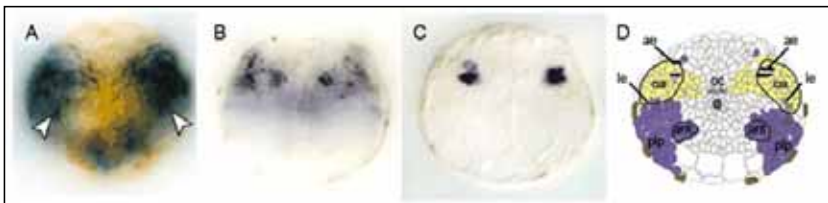


Figura 5.2 A) Expressió del gen *Pdsix1-2* durant el desenvolupament de l'ull de la larva a 36h. Les fletxes blanques indiquen la regió dels ulls. B) Expressió del gen *Pdsix1-2* durant el desenvolupament dels ulls adults de la larva metatrocòfora de 2 dies. C) Expressió del gen de la opsina en el mateix estadi que B. D) Esquema de l'expressió del gen *Pdsix1-2* en groc: ae; ulls adults, le; ulls larvaris. oa; territori presumptiu de l'ull. oc; comissura òptica. ant; antenes. plp; palps. Modificat de Arendt i col., 2002.

5.4 ELS GENS SIX A VERTEBRATS

Homòlegs dels gens *so* i *optix* han estat identificats a humans (Boucher, 1996), pollastre (Bovolenta, 1996), ratolí (Oliver, 1995), peix zebra (Seo, 1998; Kobayashi, 1998) i al peix medaka (Loosli, 1998). Es fa difícil, però, parlar de quins d'aquests gens són ortòlegs o paràlegs entre vertebrats i invertebrats, degut al nombre de gens, als seus patrons d'expressió i al que es coneix de la seva funció.

Basant-se en els patrons d'expressió en vertebrats i en resultats de sobreexpressió, el grup *Six3-6* està clarament implicat en el desenvolupament del cervell anterior i estructures relacionades amb els ulls. Han estat identificades mutacions del gen *Six3* humà, en heterozigosi, en sis casos d'holoprosencefàlia (Wallis, 1999). La presència

de defectes severes en el cervell i de microftàlmia en aquest casos, donen suport al paper de *Six3* en el desenvolupament de la placa neural anterior i els ulls.

La sobreexpressió de *Six3* al peix medaka indueix a la formació d'una retina ectòpica (Loosli, 1999) i també l'expressió ectòpica de *Six3* de ratolí al peix medaka pot induir la formació ectòpica de lents (Oliver, 1996). L'expressió ectòpica de *Six6* (també anomenat *Optix2*) a pollastre indueix a la transdiferenciació de les cèl·lules de l'epiteli pigmentat de la retina a una forma de cèl·lula neuronal i/o fotoreceptora (Toy, 1998). L'expressió ectòpica de *Six3* a peix zebra també resulta en un engrandiment de la zona rostral del cervell anterior i del peduncle òptic (Kobayashi i col., 1998).

La sobreexpressió de *Six6* a *Xenopus*, en canvi, porta a un increment de la mida de l'ull, i es creu que està associat al paper d'aquest gen en l'increment de la proliferació cel·lular (Zuber, 1999).

Finalment, els gens de les subfamílies *Six1-2* i *Six4-5* semblen estar implicats en el control de la miogènesi. Només s'ha descrit l'expressió dèbil del gen *Six5* durant el desenvolupament de la retina de ratolí i a la neuroretina adulta i ratolins tant amb una deleció heterozigòtica com homozigòtica de *Six5* desenvolupen cataractes. Sembla, doncs, que *Six5* tindria una funció en el manteniment de les lents adultes de vertebrats (veure Kawakami, 2000 per referències).

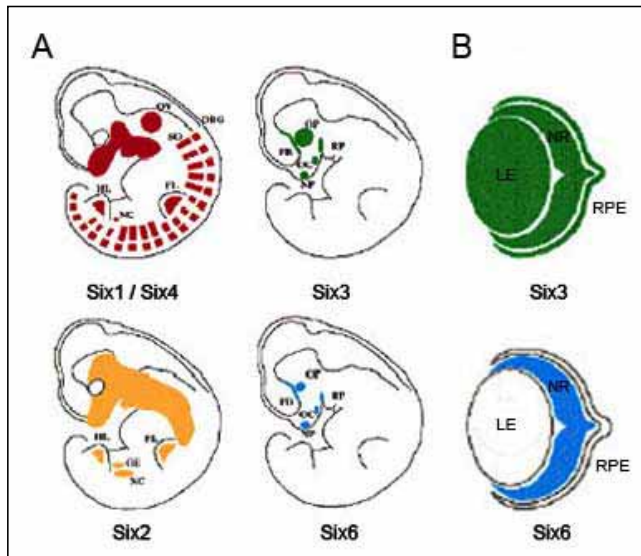


Figura 5.4 Patrons d'expressió i localització cromosòmica dels gens de la família *Six* a ratolí. **A)** Representació esquemàtica de l'expressió dels gens *Six* a l'embrió on observem que els gens *Six3* i *Six6* s'expressen a la placa del nas (NP), al quiasma òptic (OC), a la vesícula òptica (OV), a la bossa de Rathke (RP) i al cervell anterior (FB). **B)** Expressió dels gens *Six3* i *Six6* durant el desenvolupament de l'ull (E 13.5). Lent (LE), neuroretina (NR) i epiteli retinià pigmentat (RPE). Modificat de Kawakami i col., 2002.

6. UNA XARXA GÈNICA IMPLICADA EN LA MORFOGÈNESI DELS ULLS

6.1 UNA XARXA GÈNICA PER A LA MORFOGÈNESI DELS SISTEMES VISUALS DE *DROSOPHILA*

El desenvolupament dels ulls de *Drosophila* no només està sota el control de *ey*, *toy*, i *eyg*, ja que mutacions en altres gens també es tradueixen en defectes en el desenvolupament dels ulls, com són: *sineoculis* (*so*) (ja descrit a l'apartat 5.3), *eyes absent* (*eya*) i *dachshund* (*dac*) que ambdós codifiquen per proteïnes nuclears (Bonini, 1993; Mardon, 1994, respectivament).

L'anàlisi dels patrons d'expressió i l'aproximació genètica de tots aquests gens ha permès interrelacionar-los de forma seqüencial i jeràrquica durant els processos del desenvolupament del sistema visual de *Drosophila*. *Toy* és el primer d'ells en expressar-se durant l'embriogènesi i activa a *ey* al primordi de l'ull, on ja també s'expressa *eyg* (Czerny, 1999). Recordem que *so* és necessari per al desenvolupament de tots els sistemes visuals ja que és requerit per la formació dels ulls compostos, dels ocells, del lòbul òptic del cervell i dels fotoreceptors larvaris o òrgans de Bolwig. *Eya* s'expressa més tard en la morfogènesi dels ulls compostos i a la regió on s'especificaran els ocells als discs imaginals d'ull, al final de la 2a fase larvària i durant la 3a fase larvària (Punzo, 2002 per referències).

El gen *so* té una funció *downstream* d'*ey* (Halder i col., 1998) i s'han identificat 5 llocs d'unió d'*ey* i *toy* a l'*enhancer* de *so* (*ey* en reconeix 2 mentre que *toy* reconeix els 5 llocs d'unió) (Punzo i col., 2002). Per altra banda, la proteïna *So* interactua físicament amb *Eya* amb la que formen un complex proteic que reactiva l'expressió d'*ey*. Aquest complex *So-Eya* és capaç d'induir ulls ectòpics a *Drosophila* (Bonini, 1997; Pignoni, 1997). *So* i *eya* són induïts per *ey* i es requereix l'expressió d'ambdós gens de forma independent per a la inducció d'ulls ectòpics per sobreexpressió d'*ey*, però no a la inversa.

La proteïna *Eya* presenta un domini C-terminal anomenat domini *Eya* (ED). Com ja hem comentat, és el domini que interactua amb la proteïna *So* i té una funció de coactivació transcripcional. Recentment, s'ha descrit una segona funció d'aquest domini ED com a motiu catalític de la família d'enzims haloàcid dehalogenasa amb una activitat fosfatasa. Aquesta activitat és imprescindible pel desenvolupament de l'ull de *Drosophila* (Rayapureddi i col., 2003).

El gen *dac* codifica per una nova proteïna nuclear amb dos dominis conservats, el domini *DachBox-N* i el domini *DachBox-C* (Kozmik i col., 1999). En aquest últim domini se li prediu la funció d'interacció proteïna-proteïna amb el domini ED de la proteïna *Eya* (Chen i col., 1997).

Els gens *eya* i *dac* també són capaços d'imposar una morfologia d'ull a teixits no oculars (Bonini, 1997; Shen, 1997), però quan s'expressa ectòpicament a la vegada *eya* amb *dac* o *eya* amb *so* la inducció d'ull ectòpic és més acusada, suposadament per les interaccions proteïna-proteïna entre *eya* i *dac* o *so* (Chen, 1997; Pignoni, 1997).

La inducció d'ulls ectòpics produïda tant per l'expressió ectòpica d'*ey*, com *eya* i *dac* o *eya* i *so* només té lloc en regions on també s'hi coexpressa *decapentaplegic* (*dpp*), un gen membre de la família de factors de creixement dels *TGF-β* (Chen, 1999). Sembla doncs, que *ey* i *dpp* actuen sinèrgicament en aquesta inducció però no s'ha intuït cap mecanisme de regulació entre els dos.

Les anàlisis d'epistàssia d'aquests gens ens indiquen, doncs, que *toy*, *ey* i *dpp* actuen *upstream* de *so*, *eya* i *dac* (Halder, 1998; Niimi, 1999; Chen, 1999 i Zimmerman, 2000). En el cas de *so* ja hem comentat que s'han trobat *enhancers* específics d'ull que regulen la seva expressió on s'hi uneixen les proteïnes *Ey* en el desenvolupament de l'ull compost (Niimi, 1999) o bé *Toy* en el desenvolupament dels ocells (Punzo, 2002). *Dac*, però, actuaria més *downstream* que *eya* i *so*, que a la vegada estarien regulats entre ells.

So, *eya* i *dac*, a més, formen un complex que regula en *feed-back* l'expressió d'*ey*. En els experiments en que s'indueixen ulls ectòpics per l'expressió ectòpica d'aquests tres gens també s'indueix l'expressió d'*ey* i es requereix la funció d'*ey*, mentre que no hi ha inducció de l'expressió de *toy* (Wawersik, 2000 per referències).

Un cas a part és, com hem esmentat, *eyegone* (*eyg*) que no estaria implicat en l'especificació d'ulls sinó que, regulat per *notch* interviendria en el control de la proliferació de les cèl·lules precursors oculars i així regularia el creixement de l'ull de manera independent a *ey* i a la resta de gens implicats en la determinació i diferenciació de l'ull (Domínguez i col. 2004).

I també ens resta pendent introduir un altre cas a part, el gen *optix*, amb un paper essencial també en el desenvolupament de l'ull però que no participa en aquesta xarxa gènica.

Tots aquest treballs han permès proposar alguns models que intenten globalitzar la complexitat de la xarxa gènica que coordinaria, inicialment, la inducció de la formació del primordi de l'ull a l'embrió (Figura. 6.1: Embrió), després, al final de la 2a fase larvària, es reactivaria per tal d'iniciar la determinació de l'ull (Figura 6.1: Disc imaginal d'ull, anterior al MF) i es mantindria a la tercera fase larvària fins la diferenciació dels ulls compostos (Figura. 6.1: Disc imaginal d'ull, MF), i els ocells (Figura 6.1: Ocell) de *Drosophila*.

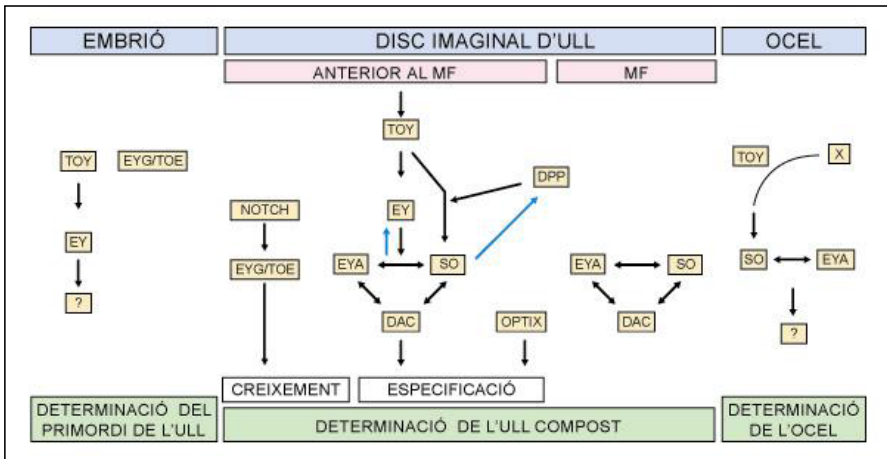


Figura 6.1 Models proposats de les interaccions entre els diferents gens que formen la xarxa gènica implicada en la morfogènesi dels ulls i ocells a *Drosophila*. Les fletxes negres indiquen les relacions epistàtiques d'inducció entre els diferents gens i les fletxes blaves indiquen retroregulació (*feedback*) positiva.

6.2 CONSERVACIÓ DE LA XARXA GÈNICA A VERTEBRATS

Des del descobriment de la xarxa gènica implicada en el desenvolupament de l'ull a *Drosophila* i de la identificació de gens molt semblants a vertebrats ha estat de gran interès analitzar la possible conservació d'aquesta xarxa durant la morfogènesi dels ulls de vertebrats. La comparació dels gens implicats en la xarxa d'ulls a invertebrats i vertebrats és difícil degut a l'existència dels múltiples membres que trobem a cada família gènica.

En aquest apartat presentem algunes de les semblances i diferències que donarien consistència a la conservació evolutiva de la xarxa entre vertebrats i invertebrats per famílies gèniques.

INTRODUCCIÓ

A) Família Pax6; El gen *Pax6* de vertebrats està clarament més relacionat amb *ey* i *toy* que amb *eyg* (Gehring i Ikeo, 1999), i sembla que hauria adoptat el paper funcional dels dos gens de *Drosophila*. Per altra banda, la isoforma *Pax6(5a)*, produïda per un *splicing* alternatiu de *Pax6*, comparteix una alta homologia de seqüència i funció amb el que seria el seu ortòleg, *eyg* (Domínguez i col., 2004). Ja hem comentat que l'expressió de *Pax6* ja es detecta des de que es pot identificar la zona presumptiva d'ull. I a l'igual que a *Drosophila*, les disrupcions d'aquest gen afecten la formació de l'ull de vertebrats. Finalment, ja hem comentat també que l'expressió ectòpica de *Pax6* a *Xenopus* produeix fenotips amb ulls ectòpics.

Queda clar, doncs, que el gen *Pax6* de vertebrats ha mantingut unes notables similituds funcionals amb *ey*.

B) Família Six; Com s'ha comentat a l'apartat 5.4, es coneixen sis gens (*Six1-6*) homòlegs a *so* (*Six1*), *optix* (*Dsix3*) i *Dsix4*. En aquest cas, es fa molt més difícil reconèixer els ortòlegs de *Drosophila*, ja que els ortòlegs estructurals del gen *so* serien els gens *Six1* i *Six2* i no sembla que cap d'aquests dos gens tingui un paper essencial en la morfogènesi dels ulls de vertebrats. Per altra banda, els ortòlegs estructurals del gen *optix* serien els gens *Six3* i *Six6*, gens necessaris per a la morfogènesi de l'ull de vertebrats.

Mentre que a *Drosophila* els mecanismes d'acció d'*optix* són independents als d'*ey*, sembla que a vertebrats sí que hi ha dependència de *Six3* i *Six6* amb *Pax6* tot i que depèn de les espècies estudiades i dels diferents compartiments de l'ull en desenvolupament.

Per altra banda, recordem l'actuació sinèrgica de *so* amb *eya*, per un mecanisme d'unió proteïna-proteïna, a *Drosophila*. *optix* per contra, no forma aquest complex (Ohto i col., 1999). I a vertebrats no s'ha descrit cap interacció forta entre *Six3* o *Six6* i algun dels gens de la família *Eya*. En canvi sí que s'ha descrit una interacció entre *Six6* i les proteïnes *Dach* (Li i col., 2002), característica que seria única de vertebrats.

Així, doncs, tot i que *Six3* i *Six6* tenen característiques funcionals dels dos gens ortòlegs de *Drosophila*, es fa difícil discernir si tenen més semblances amb *optix* o amb *so* (Donner i Maas, 2004).

C) Família Eya; S'han descrit quatre homòlegs del gen *eya* (*Eya1-4*) a vertebrats. Els gens *Eya1*, *Eya2* i *Eya3* s'expressen durant el desenvolupament de l'ull, mentre que no s'hi expressa el gen *Eya4*. Segons els patrons d'expressió d'aquests tres gens sembla que han adoptat cadascun una funció d'*eya* diferent. Tot i això, mutacions dels gens *Eya1* i *Eya2* no afecten la morfogènesi de l'ull (Xu i col., 1999; Purcell, 2002), ni cap dels tres gens sembla tenir un paper essencial com a mitjancers de la funció de *Pax6*. L'única homologia funcional coneguda és la capacitat d'*Eya1*, *Eya2* i *Eya3* de rescatar la formació de l'ull a *Drosophila* en un fons mutant d'*eya* (Bonini i col., 1997; Bui i col., 2000), però sembla que seria una capacitat deguda a l'homologia de l'estructura d'aquestes proteïnes i no a un paper específic dels gens *Eya* en el desenvolupament de l'ull a vertebrats.

D) Família Dach; Dels dos homòlegs coneguts de *dac* (*Dach1-2*) es coneix que el gen *Dach1* s'expressa a la lent i a la perifèria de la retina (Purcell, 2002) amb un patró molt semblant al d'*Eya1* (Xu i col., 1997) i *Pax6* (Heanue, 2002), però retardat temporalment respecte a *Pax6*. No es coneix funció de *Dach2* a l'ull.

L'expressió de *Dach1* però no és *Pax6* dependent, ni se n'ha pogut conèixer cap relació amb l'expressió d'*Eya1* (Purcell, 2002).

Sorprenentment, l'expressió de *Dach2* pot rescatar el fenotip d'ull del mutant *dac* a *Drosophila* (Heanue, 1999). Aquesta capacitat reflexa la conservació de la xarxa

gènica en l'organogènesi de vertebrats més que en una conservació específica de la funció dels gens *Dach* a l'ull de vertebrats.

Figura 6.2 Taula que mostra, comparativament, els diferents fenotips dels gens implicats en la xarxa morfogenètica de l'ull de *Drosophila* i de vertebrats. Tret de Silver i Rebay 2005.

<i>Drosophila</i> gene	Mutant phenotype	Mammalian gene (human/mouse)	Mutant phenotype	References
<i>eyeless (ey)</i>	Loss of head structures; embryonic lethal; eye-specific alleles cause loss of eyes; essential for adult brain function.	<i>PAX6/Pax6</i>	In humans, dominant aniridia and Peters anomaly; recessive severe CNS defects. Similar phenotypes observed in <i>Pax6</i> knockout mice.	Callaerts et al., 2001; Czerny et al., 1999; Hanson et al., 1994; Kronhamn et al., 2002; Quiring et al., 1994
<i>twin of eyeless (toy)</i>	Loss of head structures; embryonic lethal.			
<i>eyes absent (eya)</i>	Embryonic lethal with anterior defects; hypomorphs can have loss of eye tissue, as well as male and female sterility.	<i>EYA1/Eya1</i> <i>EYA2/Eya2</i> <i>EYA3/Eya3</i> <i>EYA4/Eya4</i>	Mutations in <i>EYA1</i> linked to Branchiooto-renal (BOR) syndrome, which is characterized by lung, kidney and ear defects; similar defects seen in <i>Eya1</i> knockout mice. Mutations in human <i>EYA4</i> linked to deafness.	Abdelhak et al., 1997; Bonini et al., 1993; Bonini et al., 1998; Wayne et al., 2001; Xu et al., 1999; Xu et al., 2002; Zimmerman et al., 1997
<i>sine ocellis (so)</i>	Defects in eye, brain and gonad development; embryonic lethal; eye-specific alleles cause loss of eye tissue.	<i>SIX1/Six1</i> <i>SIX2/Six2</i>	Mutations in <i>SIX1</i> also associated with BOR syndrome. <i>Six1</i> mutant mice display defects in ear, kidney, thymus, skeletal muscle and nose.	Cheyette et al., 1994; Fabrizio et al., 2003; Laclef et al., 2003; Ozaki et al., 2004; Ruf et al., 2004; Xu et al., 2003; Zheng et al., 2003
<i>six4</i>	Defects in muscle and gonad development.	<i>SIX4/Six4</i> <i>SIX5/Six5</i>	<i>SIX5</i> mutations associated with myotonic dystrophy (DM1); <i>Six5</i> knockout mice develop cataracts similar to individuals with DM1. Mouse knockouts of <i>Six4</i> are viable and have no gross defects.	Kirby et al., 2001; Klesert et al., 2000; Ozaki et al., 2001; Wansink and Wieringa, 2003
<i>optix</i>	No reported mutants.	<i>SIX3/Six3</i> <i>SIX6/Six6</i>	<i>SIX3</i> mutations are associated with holoprosencephaly; loss of <i>SIX6</i> is associated with bilateral anophthalmia and pituitary defects. Similar to the human phenotype, <i>Six6</i> -null mice survive but have retinal and pituitary hypoplasia.	Carl et al., 2002; Gallardo et al., 1999; Li et al., 2002; Pasquier et al., 2000; Seimiya and Gehring, 2000; Wallis et al., 1999
<i>dachshund (dac)</i>	Lack eye tissue; leg defects; those that survive to adulthood die within days.	<i>DACH1/Dach1</i> <i>DACH2/Dach2</i>	<i>Dach1</i> knockout mice die soon after birth with no obvious defects; may reflect partial redundancy of <i>Dach1</i> and <i>Dach2</i> , which have overlapping expression.	Backman et al., 2003; Davis et al., 2001a; Davis et al., 2001b; Mardon et al., 1994

INTRODUCCIÓ

7. LES OPSINES

7.1 INTRODUCCIÓ

L'expressió de les opsines és un dels últims esdeveniments en la diferenciació de les cèl·lules fotoreceptores, i la presència d'una opsina específica en aquestes cèl·lules és el primer marcador molecular per distingir els fotoreceptors diferenciats de moltes altres poblacions cel·lulars. D'aquí la necessitat, per a la realització d'aquest treball, d'obtenir el gen de l'opsina de la planària *Girardia tigrina*. Aquest gen ens ha servit en tot aquest treball com a marcador indiscutible de les cèl·lules fotoreceptores un cop diferenciades i així hem pogut fer el seguiment de la morfogènesi de l'ull a planàries.

7.2 L'ORGANITZACIÓ DELS SISTEMES VISUALS

La visió és el resultat de dos processos:

- La recepció de la llum per mitjà de cèl·lules fotoreceptores
- La transducció i processament d'un senyal neural a la retina

Aquest senyal que arriba a la retina és transmès al cervell on serà integrat en una imatge.

A vertebrats, s'han desenvolupat dos sistemes per dur a terme aquestes tasques visuals (Figura 7.1). La formació de la imatge, en llum tènue, implica les cèl·lules fotoreceptores anomenades bastons. Els bastons són cèl·lules altament sensibles i responen a un ampli espectre de longitud d'ona, però no responen en condicions de llum intensa.

En el cas de llum intensa són les cèl·lules anomenades cons les encarregades de les funcions visuals. Els cons es poden dividir en varis grups atenent a les molècules d'opsina que expressen. Per discriminar entre longituds d'ona de llum diferents, la família gènica de les opsines s'ha expandit per mitjà de diverses duplicacions gèniques que formen un ampli grup de proteïnes amb unes mateixes i úniques propietats de resposta a la llum. Per exemple, a humans hi ha tres tipus de poblacions de cons, els L, els S i els M, amb opsines diferents que absorbeixen des de longituds d'ona curta (< 500 nm, blau) i mitja (~530 nm, verd) fins a longituds d'ona llargues (~ 560 nm, vermell) i que donen lloc al conegut sistema visual tricromàtic.

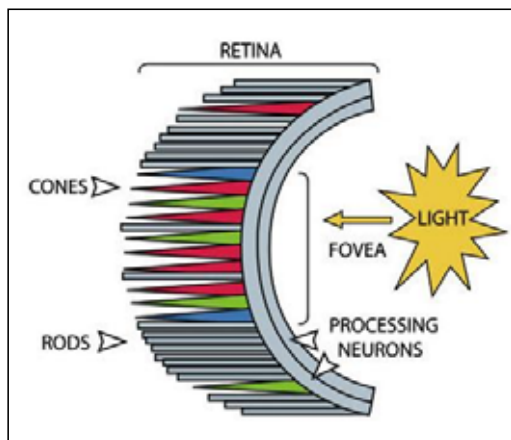


Figura 7.1: Tipus de cèl·lules fotoreceptores dels ulls de vertebrats. BASTONS: Localitzats principalment al perímetre extern de la retina i tots expressen la rodopsina. Encarregats de la visió en condicions de llum tènue. CONS: de tipus M (verd) i L (vermell) concentrats al centre de la retina i rodejats pels S (blau) a la fovea. Encarregats de la formació d'imatges d'alta resolució i de la percepció del color. Modificat de T. Cook i C. Desplan, 2001.

El sistema d'ull compost de *Drosophila* comparteix mecanismes similars per a la percepció de la llum. Cadascun dels ~750 omatidis que formen l'ull compost conté 8 fotoreceptors, 6 d'externs (R1-R6) i dos d'interns (R7 i R8) i cada receptor expressa un dels 5 gens de rodopsina (*rh*).

Com a vertebrats, també trobem dos sistemes visuals especialitzats en tasques diferents (Figura 7.2). Els receptors externs tenen rabdòmers llargs i contenen Rh1 (rodopsina amb un ampli espectre d'absorció, involucrada en la formació de l'imatge i actua en llum tènue. En contrast, els receptors interns R7 i R8 estan més involucrats en la discriminació de colors (com els cons de vertebrats), tenen rabdòmers més petits i expressen un patró de rodopsines molt més complex.

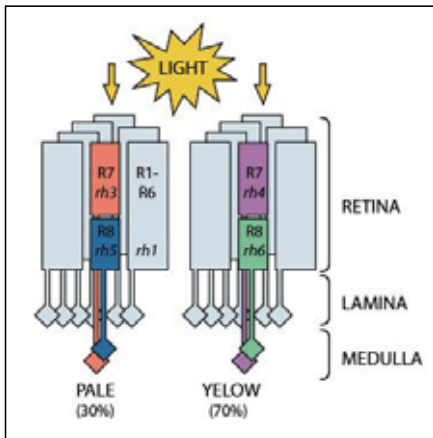


Figura 7.2: Tipus de cèl·lules fotoreceptores a *Drosophila*. Els sis receptors externs contenen una única rodopsina, Rh1, mentre que els interns expressen un patró de rodopsines molt complex i divideixen l'omatidi en 2 subgrups; pale (p) i yellow (y). A més, els receptors interns i externs difereixen en la mida dels seus rabdòmers i la regió del lòbul òptic on projecten els seus axons. Modificat de T. Cook i C. Desplan, 2001.

7.3 OPSINES: ESTRUCTURA MOLECULAR

Les opsines són els pigments visuals col·lectors de llum. Estan densament distribuïdes a la membrana externa apical de les cèl·lules fotoreceptores. Són les molècules receptores de la llum i estan formades per un heterodímer:

- L'opsina: Grup proteic, que forma el receptor de 7 hèlix transmembrana associat a proteïnes G.
- El 3-hidroxi-11-cis-retinal: Grup cromòfor.

Ambdós grups estan units covalentment. Després de l'absorció d'un fotó de llum, el grup cromòfor s'isomeritza de la forma 11-cis a la configuració all-trans. Aquest canvi en la conformació del grup cromòfor dóna lloc a un canvi de la conformació del grup proteic i a la activació de les seves propietats catalítiques (Figura 7.3).

INTRODUCCIÓ

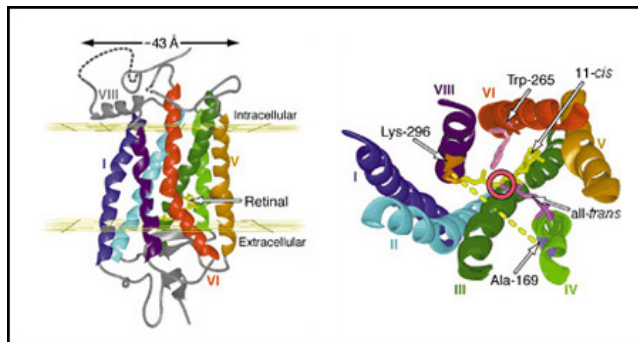


Figura 7.3 Dues imatges de l'estructura d'una rodopsina. **Esquerra**; Les set hèlix α del receptor acoblat a proteïnes G s'intercalen entre la membrana lipídica (en groc) posicionant els seus extrems tant a l'interior de la cèl·lula com a l'espai extracel·lular. **Dreta**; El grup cromòfor, retinal, es col·loca entre les hèlix transmembrana. Es mostra el retinal en la seva forma *cis* inactiva (groc) i forma *trans* activa (rosa). Els nombres romans indiquen la numeració de les hèlix i el cercle vermell indica la posició on es produeix la isomerització del retinal. Tret de Bourne and Meng, 2000.

A *Drosophila*, la rodopsina, un cop activada (moment en què rep el nom de metarodopsina), catalitza l'activació d'una proteïna G heterotrimerica de la família Gq que activa a la vegada la Fosfolipasa C i aquesta activa la via del Fosfatidil inositol que porta a l'obertura de canals de sodi i calci, procés que produeix una resposta de despolarització de la membrana.

A vertebrats, en canvi, l'acció de la llum sobre els fotoreceptors activa els sistemes de transducció de senyal via la cGMP-Fosfodiesterasa que es resol en una resposta hiperpolaritzant de les cèl·lules neuronals (Figura 7.4).

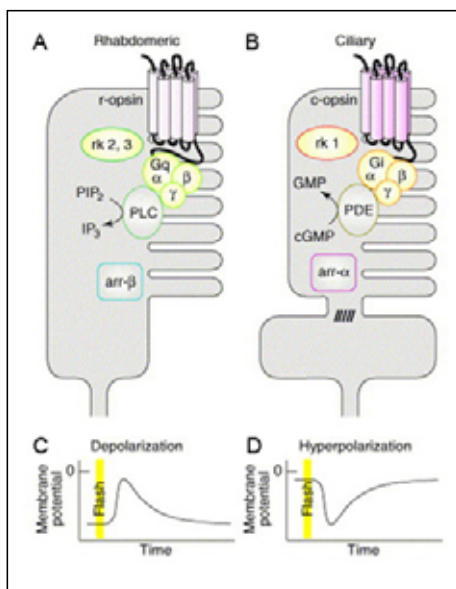


Figura 7.4 Mecanisme de transducció del senyal de les opsines. **A)** Cèl·lula rabdòmica i **B)** cèl·lula ciliada. Podem veure com totes les proteïnes implicades en la transducció del senyal són proteïnes paràlogues en els dos tipus de receptors. La resposta final del receptor és **(C)** una despolarització del receptor en el tipus rabdòmic i **(D)** una hiperpolarització en el tipus ciliat. Tret de Nilsson, 2004.

7.4 CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓ DE LES OPSINES A *DROSOPHILA*

Hi ha evidències que suggereixen que la distribució d'opsines ve regulada a nivell transcripcional. Un exemple és la regulació de l'expressió dels subtipus específics dels diferents gens *rh* per les seqüències promotores de menys de 600 parells de bases.

Tant els estudis de genètica molecular com els de filogènia revelen que aquests promotors tenen una organització bipartida relativament simple;

- L'RCSI: *Rhodopsin conserved sequence*. Seqüència que confereix identitat al fotoreceptor.
- Seqüència RUS: *Rhodopsin upstream sequence*. Confereix especificitat de subtipus.

Els treballs de Cook i Desplan (2001) mostren que el factor de transcripció *Pax6* actua unint-se a la seqüència RCSI (Figura 7.5). Aquest paper de *Pax6* sobre l'expressió de gens *rh* va ser suggerit en observar que el lloc RCSI és un lloc d'unió palindròmic per dímers de factors de transcripció amb homeodomini de classe paired.

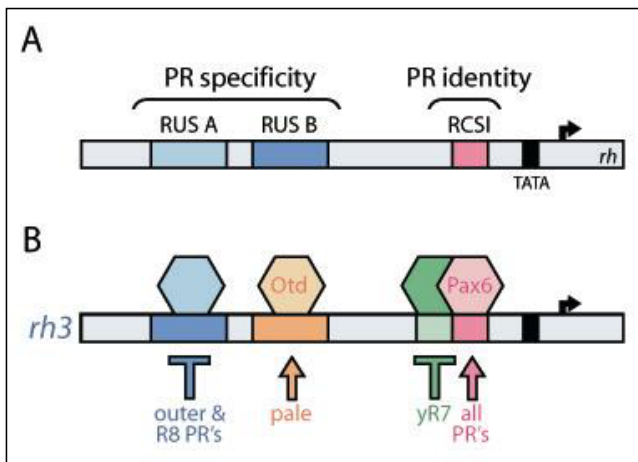


Figura 7.5 Organització molecular dels promotors de les rodopsines a *Drosophila*. **A)** Els promotors de les rodopsines presenten una organització bipolar, amb elements proximals reguladors específics de l'expressió (RCSI) i elements distals que proveeixen d'especificitat de subtipus (RUS). **B)** Un exemple de les potencials regions reguladores de la rodopsina *rh3* de les cèl·lules fotoreceptores R7. Modificat de Cook i Desplan, 2001.

L'anàlisi bioquímica i genètica ha demostrat que *Pax6* s'uneix al lloc RCSI pel seu homeodomini i és un dels responsables de la regulació de cada gen *rh*.

Aprofundint més en els llocs RCSI (variables segons el subtipus de *rh*), s'han observat nous llocs d'unió per altres factors de transcripció com el de la proteïna Ortodenticle (*Otd*). Això, suggereix que *Pax6* interactua directament i juntament amb altres factors per dirigir l'expressió dels diferents subtipus específics dels gens *rh* (Cook & Desplan, 2001).

7.5 OPSINES A ALTRES ORGANISMES

S'han aïllat gens que codifiquen per opsines en tot el regne animal, tant a eucariotes com a procariotes. Alguns exemples d'opsines a procariotes són:

- a) Grup Archaea: Les rodopsines del grup archaea tenen com a particularitat que el grup cromòfor és el trans-retinal i funciona activant un bombeig iònic per activació de la llum i fototaxi (Spudich, J.L., 1998).
Les rodopsines visuals, comparades amb les d'archaea, mostren poca identitat de seqüència però comparteixen una estructura secundària similar (set dominis d'hèlix α transmembrana i un residu de lisina a l'hèlix 7, que és la que forma una unió de base de Schiff amb el grup cromòfor). S'han identificat fins a quatre rodopsines diferents a *Halobacterium salinarum*.
- b) Fongs: En el fong filamentós *Neurospora crassa*, la llum blava és clau per a la regulació del creixement i diferenciació cel·lular (Linden et al, 1997). I s'ha identificat un gen potencialment receptor de llum a *N. Crassa*; *nop-1* (Bieszke et al. 1999).
- c) Protistes: Les respostes fototàctica i fotofòbica de *Clamydomonas* vénen mitjançades per les rodopsines i un grup cromòfor de tipus all-trans. Recentment s'ha aïllat dues rodopsines més en aquests organismes amb funcions de canal de protons i de canal de membrana de cations, ambdós associats a la llum (Nagel i col., 2002,2003).

BBCIS



L'estudi de la xarxa gènica implicada en el desenvolupament del sistema visual de *Drosophila* i vertebrats ha resultat en la identificació de diversos factors de transcripció i altres proteïnes nuclears requerides per a l'especificació de la morfogènesi dels ulls.

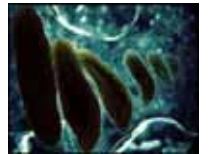
Tenint en compte la gran conservació dels elements genètics implicats en la morfogènesi dels ulls entre els diferents organismes tant invertebrats com vertebrats ens vam plantejar quins serien els elements d'aquesta xarxa en els plathielmints, ja que aquests organismes tenen uns ulls molt simples semblants als ulls ancestrals prototípics proposats per Darwin. A més, una altra propietat que fa de les planàries uns organismes especialment interessants és la seva plasticitat morfològica i la gran capacitat de regenerar les parts del cos que els manquen.

L'objectiu general d'aquesta tesi és, doncs, caracteritzar els diferents elements de la xarxa gènica que regularia la morfogènesi dels ulls de planàries durant el procés de regeneració.

Els objectius concrets són:

- Identificar els gens ortòlegs candidats a participar en la xarxa morfogenètica implicada en la regeneració dels ulls a planàries i confirmar-ne la seva ortologia mitjançant comparació de seqüències amb altres organismes.
- Analitzar el patró d'expressió d'aquests gens tant en organismes intactes com regenerants, per tal de confirmar-ne el seu possible paper en la morfogènesi dels ulls.
- Realitzar estudis funcionals dels gens prèviament aïllats mitjançant la tècnica d'RNAi.
- Estudiar les possibles relacions epistàsiques d'aquests gens tot comparant-les amb les relacions dels components de les xarxes gèniques, implicades en el desenvolupament del sistema visual, descrites en altres organismes model.

C. RESULTATS



1. EL GEN *GTSO* (*GTSIX1*) ÉS ESSENCIAL PER A LA REGENERACIÓ DE L'ULL A PLANÀRIES.

Article 1:

Pineda, D., González, J., Callaerts, P., Ikeo, K., Gehring, W.J. and Saló, E. (2000). Searching for the prototypic eye genetic network: *Sineoculis* is essential for eye regeneration in planarians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 25;97(9):4525-9.

RESUM:

Atenent a la conservació evolutiva de la xarxa gènica implicada en la morfogènesi dels ulls i amb el previ aïllament d'un gen de la família *Pax6* a *Girardia tigrina* (*GtPax6*) del que se n'havia localitzat la seva expressió als ulls de les planàries (Callaerts i col., 1999) es va orientar aquest treball en la recerca de nous gens d'aquesta xarxa per tal d'ampliar els coneixements sobre la morfogènesi dels ulls a planària.

Uns bons candidats eren els gens de la família *sineoculis* i el gen que codifica per la opsina, tots en una posició més *downstream* que el gen *Pax6* i col·locats estratègicament a dos nivells diferents de la xarxa, com prèviament ha estat estudiat a *Drosophila* i vertebrats.

Es va aïllar el cDNA de l'ortòleg del gen *sineoculis* (*Gtso*), que posteriorment anomenarem (*Gtsix1*) mitjançant oligonucleòtids degenerats dissenyats a partir de la conservació de la seqüència dels diferents gens *Six* identificats en altres espècies. Comparant les zones més conservades de la seqüència del gen aïllat (caixa *sineoculis* i caixa homeòtica) quedava palès que es tractava d'un gen de la família *Six/so*. Per tal de confirmar-ho, es van realitzar estudis filogenètics amb l'homeodomini dels gens de la família *Six/so* i quedava classificat dins de la subfamília *so/Six1-2*.

Es va detectar un únic transcrit del gen *Gtso*, i l'anàlisi de la seva expressió per hibridació *in situ whole-mount* revelà que *Gtso* s'expressa d'una forma continuada i uniforme als cossos neuronals de les cèl·lules fotoreceptores dels ulls de planàries. En individus regenerants s'observà l'aparició de l'expressió de *Gtso* en un grup de cèl·lules pròximes a l'epidermis dorsal, que constitueixen el primer signe de la regeneració dels ulls. Aquesta expressió es mantenia durant tot el procés de regeneració.

A partir de la seqüència parcial del gen de la opsina de la espècie de planària *Schmidtea mediterranea*, amablement cedida per A. Sánchez-Alvarado i P. Newmark vam aïllar el gen que codifica per la opsina en la nostra espècie *G. tigrina* (*Gtops*) i es va caracteritzar la seva expressió a les cèl·lules fotoreceptores dels ulls.

Amb la nova tècnica d'RNA d'interferència (RNAi) i per tal d'obtenir la fenocòpia dels mutants *Gtso* i *Gtops*, vam injectar organismes amb fragments de RNA de doble cadena (dsRNA) de diferents zones del mRNA del gen *Gtops*. A les 24 hores post-injecció ja no es detectava mRNA de *Gtops* per hibridació *in situ whole-mount* i comprovàvem que la tècnica d'RNAi era aplicable a *Girardia tigrina*.

El següent pas era analitzar la funció del gen *Gtso* utilitzant la mateixa tècnica d'RNAi. En injectar organismes adults amb RNAi de *Gtso*, ja no es detectava expressió de *Gtso* a les 24 hores postinjecció per hibridació *in situ whole-mount*. Tampoc s'observava expressió de *Gtops* en aquests organismes injectats. Així, confirmàvem

RESULTATS

que *Gtso* és necessari per al manteniment de l'estat diferenciat de les cèl·lules fotoreceptores.

En injectar, amb RNAi de *Gtso*, organismes decapitats i seguir la regeneració dels caps, vam observar que aquests organismes no regeneraven els ulls. Aquest fenotip sense ulls produït per la pèrdua de funció de *Gtso* indicava clarament un paper de *Gtso* en la determinació i diferenciació de les cèl·lules fotoreceptores. Per altra banda, no s'observaven canvis morfològics en altres estructures neuronals com els ganglis cefàlics i s'assumí així una funció de *Gtso* restringida a la morfogènesi dels ulls.

Col·laboracions:

El treball d'aïllament de la seqüència completa del gen *Gtso* es va iniciar a partir d'una seqüència parcial de la caixa homeòtica d'aquest gen obtinguda anteriorment per P. Callaerts al Departament de Biologia Cel·lular del Prof. Walter Gehring (Biozentrum, Univ. de Basilea, Suïssa) i posteriorment seqüenciada per E. Castillo durant la seva tesi doctoral en el nostre grup de recerca. L'anàlisi d'expressió de *Gtsix1* per *Northern blot* va ser realitzat per E. Castillo també durant la seva tesi doctoral.

L'arbre filogenètic de la família *Six/so* fou elaborat pel Dr. K. Ikeo del Centre per Informació Biològica de l'Institut Nacional de Genètica de Mishima, Japó.

Finalment, les crioseccions sagitals dels organismes injectats amb *Gtso* van ser realitzades per Javier González, estudiant de doctorat del nostre grup de recerca.

Searching for the prototypic eye genetic network: *Sine oculis* is essential for eye regeneration in planarians

D. Pineda*, J. Gonzalez*, P. Callaerts[†], K. Ikeo[‡], W. J. Gehring[§], and E. Salo*^{¶1}

*Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08071 Barcelona, Spain; [†]Department of Biology and Biochemistry, University of Houston, Houston, TX 77204-5513; [‡]Center for Information Biology, National Institute of Genetics, Mishima, Yata 411, Japan; and [§]Department of Cell Biology, Biozentrum, University of Basel, Klingelbergstrasse 70, CH-4056 Basel, Switzerland

Contributed by W. J. Gehring, December 23, 1999

We have identified a *sine oculis* gene in the planarian *Girardia tigrina* (Platyhelminthes; Turbellaria; Tricladida). The planarian *sine oculis* gene (*Gtso*) encodes a protein with a sine oculis (*Six*) domain and a homeodomain that shares significant sequence similarity with *so* proteins assigned to the *Six-2* gene family. *Gtso* is expressed as a single transcript in both regenerating and fully developed eyes. Whole-mount *in situ* hybridization studies show exclusive expression in photoreceptor cells. Loss of function of *Gtso* by RNA interference during planarian regeneration inhibits eye regeneration completely. *Gtso* is also essential for maintenance of the differentiated state of photoreceptor cells. These results, combined with the previously demonstrated expression of *Pax-6* in planarian eyes, suggest that the same basic gene regulatory circuit required for eye development in *Drosophila* and mouse is used in the prototypic eye spots of platyhelminthes and, therefore, is truly conserved during evolution.

homeobox | eye morphogenesis | platyhelminth | eye evolution

The study of the genetic network that regulates the development of the *Drosophila* visual system has resulted in the identification of several transcription factors and other nuclear proteins that are required for the specification of early eye morphogenesis (1–4). These factors seem to act in a hierarchy in which *sine oculis* (*so*) is regulated directly by *Pax-6* (5, 6), the master control function. In turn, *so* requires *eyes absent* (*eya*), encoding a nuclear protein (7), to induce ectopic eyes (4). This genetic pathway has been established in *Drosophila* (8), but homologous proteins also regulate eye development in vertebrates, suggesting that this regulatory network is old, is conserved in evolution, and has been adapted to the control of development of different visual systems found in both clades (9). Both the identification and functional characterization of homologous genes in more primitive organisms, such as the platyhelminthes, will help to clarify the age and extent of conservation of this genetic cascade.

Sine oculis is a homeobox-containing gene that is required for the development of the visual system in *Drosophila* (10, 11). A murine homologue, *Six3*, is expressed in the developing eye (12). In both of these model systems, *so* and *Six* are expressed early in eye development as well as in other structures. Combined overexpression of *so* and *eya* in *Drosophila* induces ectopic eyes (4), whereas, in vertebrates, *Six3* overexpression results in ectopic lens formation (13, 14). Planarians (Platyhelminthes; Turbellaria; Tricladida) are located at the base of the Lophotrochozoa Protostomia clade (15, 16). The eye spots of planarians are one of the most ancestral and simple types of visual systems, close to the prototypic eye proposed by Charles Darwin (see ref. 8). The planarian eye spots consist of two cell types: a bipolar nerve cell with a rhabdomere as a photoreceptive structure and a cup-shaped structure composed of pigment cells (17). During head regeneration, new eye spots are formed from precursor cells that differentiate into both cell types in a restricted area of

the newly regenerated tissue or blastema. Previous studies of this regenerative process show a clear expression of planarian *Pax-6* (*GtPax-6*) in both visual cell types (18).

In the current study, we address the hypothesis that a *Pax-6*-regulated network is conserved in evolution, and as a consequence, *Girardia tigrina* eye development requires a *sine oculis* homologue. We report the identification of an *so* gene from the planarian *G. tigrina* (*Gtso*). The high degree of amino acid sequence identity in the sine oculis domain and in the homeodomain suggests that *Gtso* is orthologous to known invertebrate *so* genes and belongs to the *Six2* gene family. The expression of *Gtso* in intact and regenerating planarians suggests a putative role in development and maintenance of the eye. RNA interference (RNAi) experiments provide functional evidence that *Gtso* is essential for maintenance of the differentiated state of photoreceptor cells and for eye regeneration. These findings suggest that the basic elements of the genetic pathway are conserved in these prototypic eyes.

Materials and Methods

Species. The planarians used in this study belong to an asexual race (class A; ref. 19) of the species *G. tigrina*. Specimens were collected near Barcelona. They were maintained in spring water. Organisms starved for 2 weeks were used in all experiments. Planarians 9- to 10-mm-long were cut prepharyngeally according to the method described in ref. 20 and were left regenerating in Petri dishes with spring water in the dark at 17°C.

Isolation of the *Gtso* Gene. An *so* fragment was amplified by PCR from planarian genomic DNA with a pair of degenerate primers corresponding to amino acids conserved between *Six1*, *Six2*, *Six3*, and *so*. The sense primer (*so1*), consisting of a degenerate sequence corresponding to amino acid sequence WDGEET with 5' clamp sequences and an *XhoI* site [gta ctc gag tgg ga(t,c)gg(a,c,g,t) ga(a,g) ga(a,g) ac], was used. The antisense primer (*so2*) used consisted of a degenerate sequence corresponding to amino acid sequence QRDRAA with 5' clamp sequences and an *XbaI* site [ccg tct aga c(a,c,g,t)g ctc (g,t)(a,g)t ctc (g,t)(t,c)tg]. PCRs were performed in 100- μ l volumes in the presence of 0.5 μ g of genomic DNA. The cycling program consisted of 5 cycles (94°C for 1 min, 46°C for 2 min, and 72°C for 3 min with ramping times of 1 min to 94°C, 1 min to 46°C, and 2 min 30 s to 72°C) and 30 cycles (94°C for 1 min, 65°C for 1 min, and 72°C for 1 min). The identity of the *Gtso* fragment was confirmed by sequencing. Based on this sequence, *Gtso*-specific nested primers were designed for the amplification of the full-length *Gtso* by

Abbreviations: dsRNA, double-strand RNA; RNAi, RNA interference.

Data deposition: The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database (accession nos. AJ251660 and AJ251661).

[¶]To whom reprint requests should be addressed. E-mail: esalo@porthos.bio.ub.es.

	α1	α2	α3/4	%ID	%S
so (<i>Drosophila</i>)	GE ETS YCFKFKRSVLRDWSYHNHPYSPREKRDLEAETGLTTTQVSNWFKNRRQRDRAAE			100	100
Six2 (mouse)E.A.....E.....			95	100
Six1 (mouse)G.E.A.....E.....			93	100
Gtso (planarian)A.Q.L.....K.....M.SF.....			88	96.5
Ceh-33 (<i>C.elegans</i>)RD...VL...CR.S.....E.K.H.V.....GV			81	95
Ceh-34 (<i>C.elegans</i>)S...N...A.KKQ...VED.R.QQ.E.SII.....K...E...G			70	80
Six4 (mouse)V.....NA.KEL.KQ.R.....A...H...KI...SL.....NPS			70	88
Six4 (<i>Drosophila</i>)V.....NA.K.C.LT.R.T.D.KT.KK...L.....TFQ			70	88
Six3 (mouse) QKTH ...RT...L...E...LQD...N.SK...E...Q...P...G.....A			70	95
optix/Six3 (<i>Drosophila</i>) QKTH ...RT...L...E...LQD...N.TK...E...K...NP...G.....A			68	95
Ceh-32 (<i>C.elegans</i>) QKTH ...RT...L...E...LKD...N.PK.KE...N...QM...G.....A			66	88

Fig. 1. Alignment of so/Six homologues homeodomain amino acid sequences of mouse used to represent vertebrates and of *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* used to represent invertebrates. The secondary structure of the domains is shown at the top of the figure. Amino acid identities for representative genes of the so/Six family are compared with the *Drosophila* so homeodomain (10). Sequences used in this comparison include: mouse Six1, Six2, and Six3 (12); Six4 (26); *Drosophila* optix/Six3 and Six4 (27, 28); and the nematode *C. elegans* Ceh-32, Ceh-33, and Ceh-34 (EMBL database). The tetrapeptides used to classify the sine oculis homeodomains in three families are indicated in bold and boxed. Percentages of sequence identity (%ID) and similarity (%S) were determined by comparison to *Drosophila* so and are indicated to the right of the sequences.

rapid amplification of cDNA ends by PCR with the Marathon kit (CLONTECH). Total RNA from head- and tail-regenerating animals was isolated as described in ref. 21. Poly(A)⁺ RNA was isolated with the Oligotex mRNA Microkit (Qiagen, Chatsworth, CA) following the manufacturer's instructions. Amplified fragments were cloned in the TA cloning vector pCR2.1 (Invitrogen). Both strands of the cDNA were sequenced twice in their entirety by dideoxy sequencing and primer walking with the ABI PRISM kit (Perkin-Elmer) and with the Sequenase 2 kit (United States Biochemical).

Phylogenetic Analysis of the Gtso Sine Oculis Homeodomains. The phylogenetic trees of sine oculis homeodomain sequences were inferred by using the CLUSTALX package. Sequences were aligned with the software CLUSTALX, and refined alignment was done manually. The Kimura's equation was used for the evolutionary distances (22), and the neighbor-joining method was used for the tree construction. Sequences were obtained from the EMBL GenBank and the DNA Data Bank of Japan.

Northern Blotting and Whole-Mount *in Situ* Hybridization. Northern blot analyses were performed by standard procedures (23). Whole-mount *in situ* hybridizations were carried out with intact planarians and at different regenerative stages according to the method described in ref. 24. Fixed and bleached planarians were treated with proteinase K (20 μg/ml) for different times (between 8 to 15 min) depending on their size and regenerative stage. Hybridizations were carried out at 55°C for 60 h. After color development, the samples were postfixed in 4% (vol/vol) paraformaldehyde/PBS, cryoprotected in sucrose solutions, embedded in Tissue Freezing Medium (Jung, Leica, Nussloch, Germany), and sectioned with a cryomicrotome.

Synthesis and Microinjection of Double-Strand RNA (dsRNA). dsRNA was synthesized as described in ref. 25. The *opsin* clone op-250 (GenBank accession no. AJ251660) was digested with *Xho*I or *Bam*HI to synthesize antisense (T3) or sense (T7) RNAs. *Gtso* clones so-5' and so-3'-2 (GenBank accession no. AJ251661) were digested with *Hind*III or *Xba*I to synthesize antisense (T3) or sense (T7) RNAs. Planarians were injected with 10¹⁰ molecules of dsRNA or water with a Drummond Scientific (Broomall, PA) Nanojector. All of the injected planarians were kept at 17°C. Adult planarians were injected into the parenchyma close to the eye region, and 3-day head-regenerating pieces were

injected into the postblastema tissue, the old tissue close to the wound. The volumes of injection were 23 nl each. At different stages of regeneration, the injected fragments were photo-

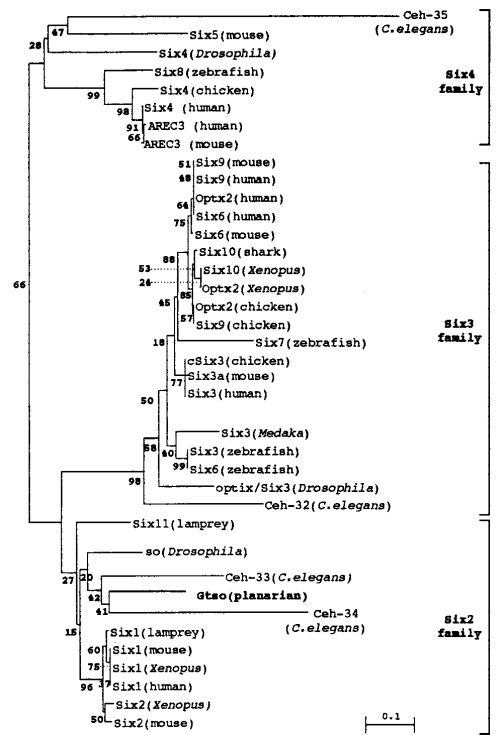


Fig. 2. Phylogenetic unrooted tree of sine oculis homeodomains. Bootstrap values of 1,000 runs are indicated as percentages at the nodes. The planarian *Gtso* homeodomain clearly clusters with the other sine oculis genes from the so/Six2 family. Scale bar, genetic distance.

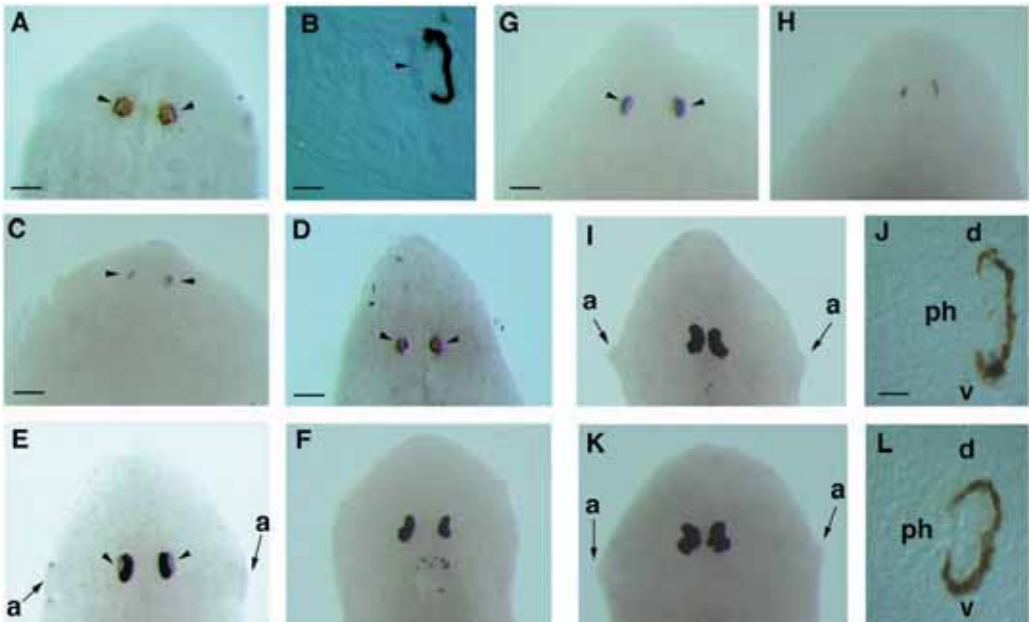


Fig. 3. (A–D) Dorsal view of *Gtso* expression by whole-mount *in situ* hybridization. Intact head (A) and cryosection (B) of the same head, as well as head-regenerating planarian adults at 7 days (C) and 14 days (D). Arrowheads indicate the localization of *Gtso* mRNA indicated by blue signal in the photoreceptor cells. Close to these, it can be observed that the brown pigmented cells are located more centrally. After 7 days of regeneration, when the first pigmented cells appear, a clear blue signal of *Gtso* expression can be observed. This signal is maintained throughout the whole regenerative process. (E–H) Opsin mRNA inhibition in photoreceptors by *G. tigrina* opsin dsRNA injection: this control organism shows the opsin mRNA distribution in the photoreceptor cells (arrowheads) (E); this adult organism, 24 h after injection, does not show any accumulation of endogenous opsin mRNA (F); control planarians after 7 days of head regenerating express opsin strongly (G); and opsin dsRNA-injected organisms in the same regenerative stage express no opsin (H). (I–L) Adult heads injected with *Gtso* dsRNA. (I and J) Whole-mount *in situ* hybridization and cryosections with *Gtso* riboprobes of organisms injected 24 h previously; no expression of *Gtso* can be observed. (K and L) Whole-mount *in situ* hybridization and cryosections with opsin riboprobes of organisms injected 7 days previously; no expression of opsin can be observed in the remaining photoreceptor cells. a, auricle; d, dorsal; ph, photoreceptor cells; v, ventral. [Bars = 300 μ m (A, G, and H), 200 μ m (A, E, F, I, and K), 150 μ m (C, G, and H), 40 μ m (B), and 20 μ m (I and L).]

graphed and fixed, and whole-mount *in situ* hybridizations for *Gtso* or *opsin* were performed.

Results

Isolation and Sequence Comparison of *Gtso*. Initial isolation and partial characterization of a planarian *so* homologue was achieved by PCR amplification of genomic DNA with a pair of degenerate primers. A complete cDNA of 1,522 bp was identified by nested rapid amplification of both cDNA ends by PCR. The ORF encodes 435 amino acids with two regions of high sequence conservation in the deduced protein: the sine oculis domain and the homeodomain. Comparison with *so* homeodomain sequences of other species (Fig. 1) shows the highest sequence identity to the *so/Six-2* family proteins, which share the consensus tetrapeptide (ETSY; ref. 28) and other residues scattered through the homeodomain. The sequence conservation is not only restricted to the homeodomain but also includes approximately 117 amino acids of the 5' flanking region (the sine oculis domain). This domain is less conserved than the homeodomain, but its comparative amino acid analysis can group *Gtso* into the *so/Six-2* family.

The C-terminal region comprises 229 amino acids rich in serine (14%), asparagine (13.5%), proline (7%), and threonine (8%), suggesting the presence of transactivating functions (29), and 30% of these serines, and other less frequent residues

scattered throughout the sequence, are also present in the same position of the different so homologous proteins. Another feature of this protein is the presence of several amino acid doublets and some repeats of tetrapeptides and pentapeptides, for which the significance is not known.

Phylogenetic trees were constructed for sine oculis homeodomain sequences. The distances were computed with Kimura's equation (22). We can observe the clustering of *Six* genes in three main groups or families where the *Gtso* is grouped with members of the *so/Six-2* gene family (Fig. 2).

***Gtso* Expression in Intact and Regenerating Adults.** *Gtso* expression in intact and regenerating planarians was analyzed by Northern blotting and *in situ* hybridization. Northern blot analysis shows a unique transcript of around 1.5 kilobases in adults and in regenerative stages without any evidence for differential splicing (results not shown). The *Gtso* spatial expression was determined by whole-mount *in situ* hybridization and by posterior transversal cryosectioning of the same intact adults and regenerating planarians after hybridization. In adults, *Gtso* was expressed continuously and uniformly in the photoreceptor cell bodies, whereas the rhabdomeric region of the photoreceptor cells was negative. No signal was observed in the pigment cells (Fig. 3 A and B). During the early stages of head regeneration, *Gtso* expression was detected in a group of photoreceptor cells close

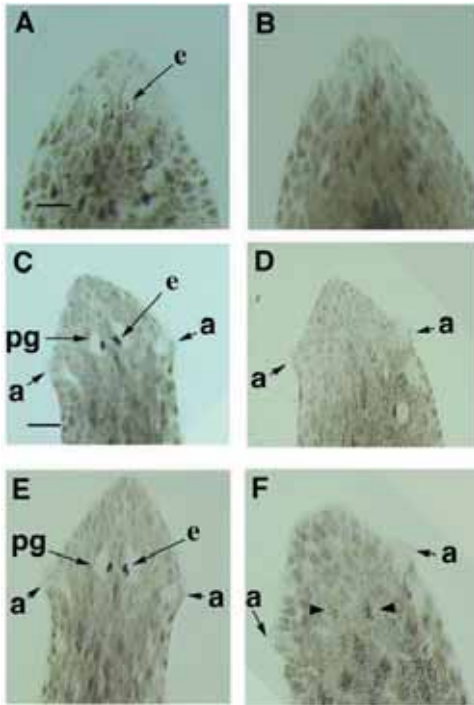


Fig. 4. Inhibition of eye-regenerative capacity by *Gtso* dsRNA injection into the regenerative postblastemas. All of the organisms are in dorsal view. (A, C, and E) Control organisms at the same regenerative stage as those injected (B, D, and F). Bright-field images showing the eye differentiation stages with the formation of a periglobular unpigmented area completely absent in the injected organisms: after 7 days of regeneration (A and B); after 14 days of regeneration (C and D); and after 28 days of regeneration (E and F). (B and D) No eye or periglobular unpigmented area can be observed in the injected organisms. (F) Heads injected 28 days earlier started to differentiate the eyes (arrowheads). a, auricle; e, eye spot; pg, periglobular unpigmented area. [Bars = 400 μm (C, D, and E) and 200 μm (A, B, and F)].

to the dorsal epidermis (Fig. 3C), which constitutes the earliest visible sign of eye regeneration. This early expression in the eye primordia was maintained throughout regeneration (Fig. 3D).

RNAi Disrupts Endogenous Gene Expression in Intact Adult and Regenerating *G. tigrina* Tissues. To test the efficacy of RNAi in planarian *G. tigrina*, we injected heads of intact animals and regenerating pieces with approximately 10^{10} copies of 250-bp opsin dsRNA synthesized from a *G. tigrina opsin* cDNA clone. As described for *Schmidtea mediterranea* (25), 24 h after injection, no opsin mRNA was observed by whole-mount *in situ* hybridization in the adult differentiated photoreceptor cells. This inhibitory effect lasts for up to 3 weeks, whereas the controls maintain a continuous and specific expression (Fig. 3E and F). Water-injected controls start to differentiate eyes after 7 days at 17°C, but the opsin dsRNA-injected specimen did not show any sign of opsin expression (Fig. 3G and H). This result shows that the dsRNA injected into the parenchymal cavity of *G. tigrina* quickly leads to the absence of the mRNA of a gene highly expressed in differentiated photoreceptor cells.

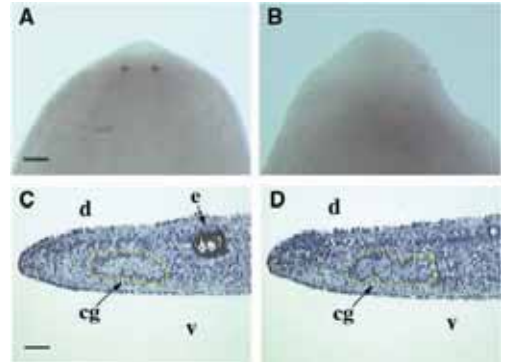


Fig. 5. *Gtso* dsRNA injection in the regenerative postblastemas inhibits photoreceptor and pigment eye cells but does not affect regeneration of cephalic ganglia. Control (A) and injected (B) organisms. Whole-mount *in situ* hybridization with opsin riboprobes was performed to visualize the early inhibitory effect of *Gtso* dsRNA in the photoreceptor cell differentiation after 7 days of regeneration. Control (C) and injected (D) organisms. Sagittal cryosections of differentiated head blastemas after 14 days, stained with toluidine blue, show the same type of cephalic ganglia differentiation, encircled in yellow. cg, cephalic ganglia; d, dorsal; e, eye spot; v, ventral. [Bars = 150 μm (A and B) and 100 μm (C and D)].

Loss of Function of *Gtso* by RNAi Injection Produces a No-Eye Phenotype. Because *Gtso* is expressed specifically in the photoreceptor cells, we tried to determine whether the introduction of dsRNA into head-regenerating planarians could reduce endogenous expression levels of *Gtso* and alter the formation of the eye structures. To observe the effects exerted by the *Gtso* dsRNA injections, nonregenerating and regenerating adult organisms were analyzed at different times and compared with the water-injected controls. Injection of *Gtso* dsRNA molecules into the adult differentiated eye did not cause any detectable change in the pigment cells, whereas the photoreceptor cells also remained intact but lost *Gtso* expression 24 h after injection (Fig. 3I and J). A second effect observed in the injected organisms was the loss of *opsin* expression (Fig. 3K and L), indicating that *Gtso* is required for the maintenance of the differentiated state of the photoreceptor cells. The control organisms maintained *Gtso* and *opsin* expression, which is indicative of the presence of intact and functional photoreceptor cells (not shown).

Distinct eye structures can be observed after 7 days in the regenerating controls. Pigment cells are detected by bright field microscopy (Fig. 4A), and differentiated photoreceptor cells are identified by whole-mount *in situ* hybridization with the *opsin* riboprobe (Fig. 5A). *Gtso* dsRNA-injected regenerating planarians had the same size and differentiation level of the blastema as the controls, with well differentiated auricles on the either side of the head. However, the eyes did not differentiate even after 3 weeks of regeneration after a single injection (Fig. 4B and D). In the injected animals, neither pigment cells nor photoreceptors form (Fig. 5B), whereas the 7- and 14-day regenerating controls show completely regenerated eyes with their periglobular nonpigmented area in the dorsal epidermis above the eyes (Fig. 4A and C). All of the 30 *Gtso* dsRNA-injected regenerating planarians in three independent experiments differentiated their dorsal blastema without any type of periglobular nonpigmented area, thus indicating that this structure may be induced by the differentiated eyes (Fig. 4B, D, and F). The inhibition of eye regeneration is very consistent. All of the 30 head-regenerating fragments had a no-eye phenotype, even 3 weeks after injection. The continued maintenance of such eye inhibition in the head

blastemas required a reinjection treatment every 3 weeks, because, after 4 or 5 weeks without injection, new eyes start to regenerate in the already differentiated heads of some organisms (Fig. 4F). Therefore, the inhibition is transient. To exclude any indirect effect on eye formation caused by the loss of the *Gtso* function by inhibiting the differentiation of the cephalic nervous system, the regenerated cephalic ganglia in the *Gtso* dsRNA-injected organisms were analyzed histologically and compared with the controls. No differences in morphology and size of the cephalic ganglia were detected (Fig. 5 C and D).

Discussion

The planarian *G. tigrina* has a bona fide *so/Six-2* gene. The phylogenetic analysis shows clustering of *Gtso* with the other *so/Six2* genes at a very high probability. This notion is corroborated further by the conservation of specific residues in the homeodomain, allowing us to consider it as an orthologue of the *so/Six-2* family. The sequence identity is essentially confined to both the homeodomain, in which most of the *so/Six-2* specific residues are conserved, and to the N-terminally located sine oculis domain. In the C-terminal region, several series of amino acid-rich regions related to transactivation domains are also found. The recent isolation of a planarian gene orthologous to the *Six-3* family (D.P., J.G., and E.S., unpublished work) indicates the presence of at least two families of sine oculis proteins in the Lophotrochozoa group.

The second question addressed in this study deals with the role of *sine oculis* in eye development. In planarians, the *sine oculis* gene *Gtso* is continuously expressed in adult eyes. Initial expression also coincides with the first signs of eye differentiation during cephalic regeneration. Similar observations have been described for the planarian *Pax-6* gene *DtPax-6* (18). The expression of developmental regulatory genes in adults is usual, because planarians show great morphological plasticity in the continuous growth and regression or regeneration processes. The same role can be observed for *DtPax-6* and *Gtso*, which are important regulators in eye development and regeneration.

Because heads that fail to regenerate eyes after *Gtso* dsRNA injection contain normal differentiated cephalic ganglia and auricles, we can assume that this loss of function has an effect

exclusively on the process of eye formation. The maintenance of such eye inhibition in the head blastemas requires dsRNA reinjection at 3-week intervals, thus indicating that the head is always competent for eye regeneration. *Gtso* is expressed in the photoreceptors of the prototypic differentiated eyes of *G. tigrina*. Furthermore, RNAi induced loss of function indicates a crucial function of *Gtso* in early eye determination. These two observations provide further support for a dual role of *so/Six* genes in eye development, namely in early determination and in neuronal differentiation according to the *Drosophila* model (4). The fact that the adult differentiated eye of *G. tigrina* shows no morphological defects induced by RNAi may be caused by a slow turnover of the eye cells. The loss of *opsin* expression in the photoreceptor cells can be interpreted in several ways. According to the model proposed in refs. 3 and 4 in which early eye development in *Drosophila* is regulated by a network of interacting genes, including *sine oculis*, it is conceivable that the loss of *Gtso* by RNAi results in a disruption of this network and indirectly to the loss of *opsin* expression. Alternatively, because *sine oculis* is also expressed in the differentiated photoreceptors of *Drosophila*, it is possible that the *sine oculis* genes of both *Drosophila* and *Girardia* directly regulate the *opsin* expression, and as a consequence, the loss of *Gtso* leads to the loss of *opsin*.

The coexpression of *DtPax-6* and *Gtso* at the same regeneration stages in the same precursor visual cells and in the differentiated photoreceptor cells, in addition to the essential and specific function of *Gtso* during eye regeneration, provides additional support for the evolutionary conservation of the initial genetic pathway in eye determination of triploblastic metazoans.

We thank K. Agata for teaching us the whole-mount *in situ* hybridization method, A. Sánchez and P. Newmark for providing the *S. mediterranea* *opsin* partial sequence, and M. Marsal and C. Gonzalez for helping with the whole-mount *in situ* hybridization. This work was supported by grants from the Swiss National Science Foundation and the Kantons of Basel (to W.J.G.), by grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (to E.S.) (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, PB95-0579 and PB98-1261-C02-01), and by a Formación de Personal Investigador fellowship (to D.P.) from Universitat de Barcelona.

1. Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. & Gehring, W. J. (1994) *Science* **265**, 785–789.
2. Halder, G., Callaerts, P. & Gehring, W. J. (1995) *Science* **267**, 1788–1792.
3. Shen, W. & Mardon, G. (1997) *Development (Cambridge, U.K.)* **124**, 45–52.
4. Pignoni, F., Hu, B., Zavitz, K. H., Xiao, J., Garrity, P. A. & Zipursky, S. L. (1997) *Cell* **91**, 881–891.
5. Halder, G., Callaerts, P., Flister, S., Walldorf, U., Kloter, U. & Gehring, W. J. (1998) *Development (Cambridge, U.K.)* **125**, 2181–2191.
6. Niimi, T., Seimiya, M., Kloter, U., Flister, S. & Gehring, W. J. (1999) *Development (Cambridge, U.K.)* **126**, 2253–2260.
7. Bonini, N. M., Leiserson, W. M. & Benzer, S. (1993) *Cell* **72**, 379–395.
8. Gehring, W. J. & Ikeo, K. (1999) *Trends Genet.* **15**, 371–377.
9. Treisman, J. E. (1999) *BioEssays* **21**, 843–850.
10. Cheyette, B. (1994) *Neuron* **12**, 977–996.
11. Serikaku, M. A. & O'Tousa, J. E. (1994) *Genetics* **138**, 1137–1150.
12. Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Gruss, P. (1995) *Development (Cambridge, U.K.)* **121**, 4045–4055.
13. Oliver, G., Loosli, F., Köster, R., Wittbrodt, J. & Gruss, P. (1996) *Mech. Dev.* **60**, 233–239.
14. Loosli, F., Köster, R. W., Carl, M., Krone, A. & Wittbrodt, J. (1998) *Mech. Dev.* **74**, 159–164.
15. Carranza, S., Bagaña, J. & Riutort, M. (1997) *Mol. Biol. Evol.* **14**, 485–497.
16. Bayascas, J. R., Castillo, E. & Saló, E. (1998) *Dev. Genes Evol.* **208**, 467–473.
17. Kishida, Y. (1967) *Sci. Rep. Kanazawa Univ.* **12**, 75–110.
18. Callaerts, P., Muñoz-Marmol, A. M., Glandon, S., Castillo, E., Sun, H., Li, W. H., Gehring, W. J. & Saló, E. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 558–563.
19. Ribas, M., Riutort, M. & Bagaña, J. (1989) *J. Zool.* **218**, 609–626.
20. Saló, E. & Bagaña, J. (1984) *J. Embryol. Exp. Morphol.* **83**, 63–80.
21. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
22. Nei, M. & Koehn, R. (1983) in *The Neutral Theory of Molecular Evolution*, eds. Nei, M. & Koehn, R. (Sinauer, Sunderland, MA), pp. 208–233.
23. Garcia-Fernández, J., Bagaña, J. & Saló, E. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7338–7342.
24. Umeson, Y., Watanabe, K. & Agata, K. (1997) *Dev. Growth Differ.* **39**, 723–727.
25. Sanchez, A. & Newmark, P. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5049–5054.
26. Kawakami, K., Ohto, H., Ikeda, K. & Roeder, R. G. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 303–310.
27. Toy, J., Yang, J. M., Leppert, G. S. & Sundin, O. H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10643–10648.
28. Seo, H., Curtiss, J., Mlodzik, M. & Fjose, A. (1999) *Mech. Dev.* **83**, 127–139.
29. Ptashne, M. (1998) *Nature (London)* **335**, 683–689.

2. CONSERVACIÓ DE LA XARXA GENÈTICA INICIAL DE LA REGENERACIÓ DE L'ULL A PLANÀRIES.

Article 2:

Pineda, D., González, J., Marsal, M. And Saló, E. (2001) Evolutionary conservation of the initial eye genetic pathway in planarians. Belg. J. Zool., 131 (Suplement 1): 77-82.

En aquest article es fa un resum de tots els experiments realitzats fins aquell moment per tal de redirigir el treball de la tesi. A la vegada s'amplia l'aïllament de nous gens candidats a participar en la xarxa gènica de la morfogènesi dels ulls de planàries. I finalment, es detallen els últims experiments realitzats amb els gens *Gtso* i *Gtops*.

RESUM:

2.1 Gens *Gtpax6A* i *Gtpax6B*.

Segons els experiments d'hibridació *in situ* amb or col·loïdal en seccions analitzades per microscopi electrònic, el primer gen *Pax6* aïllat a planàries (*Dtpax6*) per Muñoz-Mármol s'expressava tant a les cèl·lules pigmentàries com a les cèl·lules fotoreceptores dels ulls. Per tal d'analitzar la seva funció vam injectar organismes prèviament decapitats amb l'RNAi d'un fragment del cDNA de *DtPax6*. Els organismes regeneraven el cap i les estructures oculars. No s'observà cap fenotip alterat, ni dels ulls ni del sistema nerviós central dels organismes injectats.

Va ser de crucial interès l'aïllament d'un segon homòleg del gen *Pax6* a planària, el gen *Gtpax6A*. Aquest gen presentava una major homologia de seqüència que el gen *Dtpax6* a nivell del l'homeodomini al comparar-los amb els gens de la família *Pax6*. És per això que el gen *Dtpax6* va passar a anomenar-se *Gtpax6B*.

Organismes com *Drosophila* també tenen dos gens *Pax6* (*eyeless* i *twin of eyeless*) amb un patró d'expressió similar en el desenvolupament del sistema visual de *Drosophila* però amb una funció no redundant. Això ens indica que cadascun d'aquests gens ha estat reclutat amb una funció diferent a la xarxa gènica dels ulls.

Era, doncs, de gran interès realitzar un estudi funcional d'aquest nou gen *Gtpax6B* i a la vegada ens va fer preveure un possible efecte redundant amb el gen *Gtpax6B* atenent a la manca de fenotip alterat amb la injecció d'RNAi de *Gtpax6B*.

Aquests treballs seran ampliat a l'apartat 3 de resultats amb un aprofundiment de l'estudi d'ambdós gens.

2.2 *Gtsix1* (*Gtso*)

Es va anomenar *Gtso* al primer gen de la família *Six/so* aïllat a planària. Posteriorment l'anàlisi filogenètica molecular i comparativa ens va permetre incloure aquest gen dins la subfamília *so/Six1-2* i se'n va canviar el nom per *Gtsix1*.

En aquest article es van ampliar els coneixements de la funció de *Gtsix1* en organismes adults. En injectar amb RNAi de *Gtsix1* organismes adults, s'observava una pèrdua gradual de l'estat diferenciat de les cèl·lules fotoreceptores. Al cap d'una setmana de ser injectats, aquests individus presentaven un fenotip cec, ja que els animals injectats perdien el seu fototropisme.

Aquesta pèrdua de funció de les cèl·lules fotoreceptores va ser seguit analitzant l'expressió del gen *Gtops* per hibridació *in situ*. Així, observàvem que l'expressió de *Gtops* en organismes injectats adults decreixia progressivament fins a desaparèixer al cap d'una setmana. Quedava pendent analitzar si l'efecte d'aquesta disminució

RESULTATS

d'expressió de *Gtops* en organismes injectats es deu a un efecte directe o indirecte de *Gtsix-1* sobre *Gtops*.

Finalment també s'observà que els organismes injectats amb RNAi de *Gtsix1* presentaven una densitat més baixa de cèl·lules fotoreceptores diferenciades.

2.3 *Gtops*

El gen de l'opsina codifica per la proteïna responsable de la fotorrecció i és present a la majoria dels sistemes vius.

Les rodopsines aïllades tant a vertebrats com a invertebrats mostren un alt grau de conservació de la seva seqüència i es classifiquen així en una única família gènica.

En aquest treball es van comparar les seqüències del gen *Gtops* i del gen *Smops* (fragment del cDNA del gen de l'opsina de *Schmidtea mediterranea*) cedit pel grup de A. Sánchez-Alvarado i P. Newmark) amb altres gens de la mateixa família per tal de construir-ne un arbre filogenètic. Els dos gens *Gtops* i *Smops* s'agrupaven conjuntament amb les seqüències de les opsines de mol·luscs; resultat coherent amb la seva agrupació dins del clade *Lophotrochozoa*.

També es va aprofundir en el seu patró d'expressió en organismes adults. *Gtops* s'expressava de forma continuada i uniforme als cossos cel·lulars de les cèl·lules fotoreceptores mentre que no ho fa a la regió dels rabdòmers.

2.4 *Gtsix3*

Es va aïllar un segon gen de la família *Six/so*. L'anàlisi comparativa de la seva seqüència el classificà com a un ortòleg de la subfamília *Six3/6* i se l'anomenà *Gtsix3*.

L'estudi de la seva expressió es troba detallat a l'apartat 4 de resultats.

(Els treballs realitzats fins al moment donaven suport a la hipòtesi de l'existència d'una xarxa gènica implicada en la morfogènesi dels ulls a planàries, atenent a la conservació i universalitat d'aquesta xarxa als Metazous. Calia, doncs, analitzar tant l'expressió com la funció dels dos nous gens aïllats a planària; *Gtpax6A* i *Gtsix3*).

Col·laboracions:

Tant Javier González com Maria Marsal van col·laborar en el plantejament dels experiments realitzats, en la discussió dels resultats obtinguts i en el disseny i recollida de dades que es mostren a la Taula 1.

Evolutionary conservation of the initial eye genetic pathway in planarians

David Pineda, Javier Gonzalez, Maria Marsal and Emili Saló*

*Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona
Diagonal 645, ES-08071 Barcelona, Spain

ABSTRACT. Eyes of all organisms share a common function, visual perception. In addition, the different types of eyes (camera-, mirror-, and compound) are present in different phyla and share the same visual pigment, rhodopsin, and the same initial genetic pathway triggered by the master control gene Pax-6. Although the developmental mechanisms are quite diverse, all data suggest that the different eye types found in metazoans derive from a common prototype and evolved in the different phyla by parallelism, intercalating new genes independently. In this manuscript, we describe the isolation and characterization of several genes that constitute the eye gene regulatory network in the planarian *Girardia tigrina* (Platyhelminthes; Turbellaria; Tricladida). Two Pax-6 genes, *GtPax6A* and *GtPax6B*, do not show an obvious correspondence to the two Pax-6 of *Drosophila ey* and *toy*. Two sine oculis genes *Gtsix-1* and *Gtsix-3* are closely related to the Six 1-2 and Six-3 families respectively. Furthermore, we demonstrate that the opsin gene *Gtops* shows greater similarity to mollusc opsins. *GtPax-6B* is expressed in both cell types of the planarian eye spots: the photoreceptor cells and the pigmented cells. In addition, *Gtsix-1* and the opsin gene *Gtops* are expressed in the photoreceptor cells. This expression pattern is present throughout the whole eye regeneration process and maintained in adults. *Gtops* double strand RNA injection does not inhibit eye regeneration but produces light insensitive eyes due to the absence of photopigment. The loss of function of *Gtsix-1* by dsRNA injection produces a non-eye phenotype in head regenerating blastemas, while the injected intact adult heads show a loss of the differentiated state of the photoreceptor cells through inhibition of opsin expression and the production of a blind phenotype. Our results on the prototypic eye spots of Platyhelminthes provide further important support for the idea of a universally conserved early eye genetic cascade in the Metazoa.

KEY WORDS: Platyhelminthes, planarian, homeobox, opsin, eye evolution, regeneration.

INTRODUCTION

Several studies indicate that the genetic program regulating eye development has been conserved in evolution. The gene regulatory network that controls the development of the *Drosophila* visual system is composed of several transcription factors and other nuclear proteins required for the specification of early eye morphogenesis (QUIRING et al., 1994; HALDER et al., 1995; SHEN & MARDON, 1997; PIGNONI et al., 1997). Pax-6 genes encode transcription factors that contain a paired domain and a homeodomain. Two duplicated Pax-6 genes have been described in *Drosophila*, *eyeless (ey)* and *twin of eyeless (toy)*. Both genes and their homologs from other metazoans are capable of inducing ectopic eye development in *Drosophila*. Mutations in *eyeless* lead to defects in eye

formation, suggesting that Pax-6 is the universal master control gene for eye morphogenesis (QUIRING et al., 1994). The study of other genes in the genetic cascade and their genetic interactions resulted in the identification of three genes in *Drosophila*, *sine oculis (so)*, *eyes absent (eya)*, and *dachshund (dac)* that act downstream of *ey* (QUIRING et al., 1994; SHEN & MARDON, 1997). The *so* homologs, called *Six* genes, share a diverged homeodomain and N-terminal to the homeodomain, and another conserved region, the Six domain, which contributes to DNA-binding specificity (SERIAKU & O'TOUSA, 1994; CHEYETTE et al., 1994; OLIVER et al., 1995a; 1995b; KAWAKAMI et al., 1996). The Six genes are subdivided in three different families: Six1-2, Six3 and Six4. *eya* encodes a novel nuclear protein (BONINI et al., 1993) and shares a region of homology with the Eya vertebrate proteins, the Eya domain (XU et al., 1997; ZIMMERMAN et al., 1997). Eya and Six proteins are expressed in overlapping patterns including the eye primordia of vertebrates,

whereas *eya* and *so* do so in *Drosophila* (OLIVER et al., 1995b; XU et al., 1997; SEIMIYA & GEHRING, 2000). These factors appear to act in a hierarchy in which *so* is directly regulated by *eyeless* (HALDER et al., 1998; NIIMI et al., 1999), the master control function. In turn, *so* requires *eyes absent* (*eya*) to induce ectopic eyes (PIGNONI et al., 1997). This genetic pathway has been established in *Drosophila* (reviewed in GEHRING & IKEO, 1999). Homologous proteins also regulate eye development in vertebrates, suggesting that this regulatory network is old, conserved in evolution, and has been adapted to the control of development of different visual systems found in both Protostomia and Deuterostomia clades (TREISSMAN, 1999).

Charles Darwin in "The Origin of species" discussed the question of eye evolution, and reasoned that such complex and perfect organs should have evolved from a simple prototypic eye; those primitive eyes can be found in planarians. The planarian eye spots consist of two cell types: a bipolar nerve cell with a rhabdomere as a photoreceptive structure and a cup-shaped structure composed of pigment cells (KISHIDA, 1967). During head regeneration, new eye spots are formed from precursor cells that probably differentiate into both cell types in a restricted area of the newly regenerated tissue or blastema.

Here we address the hypothesis that the eye genetic network is conserved in evolution, and, as a consequence, that *Girardia tigrina* eye development requires *Pax-6* and *sine oculis* homologs. We report the identification of two *Pax-6* genes not closely related to *Drosophila ey* and *toy*; two *so* genes closely related to the *Drosophila so* and *optix* genes, which belong to *six 1-2* and *six 3* families respectively; and an *opsin* gene with high identity to that found in the Lophotrochozoa clade. Some of these genes are expressed in the eye primordia during regeneration and in the differentiated adult eyes. RNA interference (RNAi) experiments provide functional evidence that *Gtsix-1* is essential for maintenance of the differentiated state of photoreceptor cells, for opsin expression and for eye regeneration. Such results support the conservation of the early genetic pathway in the different eyes of metazoans.

MATERIAL AND METHODS

Gene isolation

A *GtPax6A* fragment was amplified by PCR from planarian cDNA (Smart PCR cDNA synthesis Kit, Clontech). The sense primer used (Px9), consisting of a degenerate sequence corresponding to amino acid sequence LEKEFER and the antisense primer used (Px10) consisting of a degenerated sequence corresponding to amino acid sequence QVWFSNR. The cycling program consisted of 35 cycles (94°C, 30 sec; 45°C, 30 sec; 72°C, 30 sec). The identity of *GtPax6A* fragment was confirmed by

sequencing. A lambda gt10 amplified cDNA library was screened with the 110 bp amplified fragment of *GtPax6A* according to GARCIA-FERNANDEZ et al., 1993. One phage was isolated containing an insert of 645 bp that spans from the homeodomain to the 3' end of the *GtPax6A* cDNA. This fragment was cloned in pBluescript (Stratagene) and the sequence was determined with Thermosequenase II dye terminator cycle sequencing Kit (Amersham). A partial fragment of 380 bp of *Gtops* was amplified using two specific primers based on *Schmidtea mediterranea* opsin partial fragment kindly provided by A. Sanchez and P. Newmark (Carnegie Institution, Baltimore). The amino acid sequence of the upstream primer used (op1) and the downstream primer used (op2), GFIGGLG and ELEMLK respectively.

Phylogenetic analysis of the *Gtops* opsin gene

The phylogenetic trees of opsin genes using the sequence between the 3rd and the 5th transmembrane domains were inferred by using the CLUSTALX package. Sequences were aligned with the software CLUSTALX, and refined alignment was done manually. The neighbor-joining method was used for phylogenetic tree construction. Sequences were obtained from the Swissprot and EMBL GenBank.

Whole-mount *in situ* hybridization

Intact animals and animals at different regenerative stages were used for whole-mount *in situ* hybridization according to UMESONO et al., 1997. The opsin clone op-170 corresponding to the last 170 bp of the *Gtops* fragment (GenBank accession no. AJ251660) was used to synthesize the DIG-labelled antisense probes (Boehringer Mannheim).

Double-strand RNA (dsRNA) synthesis and micro-injection

The *Gtsix-1* clones so-5' and so-3'-2 (GenBank accession number AJ251661O), were used for dsRNA synthesis as described in SANCHEZ & NEWMARK 1999. Planarians were injected as described in PINEDA et al., 2000. At different stages of regeneration the injected animals were photographed, fixed and whole-mount *in situ* hybridizations for *Gtops* were performed.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of eye developmental genes in *Girardia tigrina*

A large number of eye developmental genes have been isolated in *Girardia tigrina*. Initially, CALLAERTS et al., 1999 isolated the first *Pax-6* homolog, which we now refer to as *GtPax-6B* since it shows the lowest similarity to the *Pax-6* genes described in other Metazoa (Table 1).

TABLE 1

The number of different planarian eye network genes, together with the type of clones isolated and the level of amino acid identity to the most similar homeodomain and proteins. All sequences for comparison are taken from the EMBL and Swiss Prot databases. The function of some genes is also shown.

Class	Planarian eye genes				
	Pax-6		sine oculis	opsin	
	<i>DtPax-6</i>	<i>GtPax-6</i>	<i>Gtso</i>	<i>Gtsix-3</i>	<i>Gtops</i>
New proposed name	<i>GtPax-6B</i>	<i>GtPax-6A</i>	<i>Gtsix-1</i>	<i>Gtsix-3</i>	<i>Gtops</i>
Type of clone isolated	-PCR -cDNA -genomic	-PCR -cDNA	-PCR -cDNA -genomic	-PCR -cDNA	-PCR -cDNA
Identity	72% and 78% to <i>Drosophila toy</i> and eye homeodomains	92% and 90% to <i>Drosophila toy</i> and eye homeodomains	93% and 95% to mouse six1 and six-2 homeodomains	88% and 92% to <i>Drosophila optix</i> and mouse six3 homeodomains	66% to mollusc opsin protein
Expression and Function	photoreceptor and pigmented eye spot cells	Central Nervous System	Photoreceptor cells. It is essential for eye determination and differentiation	?	Photoreceptor cells. It is essential for eye light sensitivity

Studies by *in situ* hybridization on paraffin sections and electron microscopy of ultrathin sections revealed expression in the perinuclear area of both eye spot cell types, the photoreceptor cell and the pigmented cells. dsRNA injection of *GtPax6B* does not produce any clear eye phenotype. One explanation for these unexpected results could be the occurrence of gene redundancy. It was therefore of interest that more recently we were able to isolate a second Pax-6 homolog, which we name *GtPax-6A* as it shows a higher similarity to the Pax-6 family homeodomain (Table 1). No expression pattern nor functional data are yet available, but preliminary whole-mount *in situ* hybridization showed expression in the central nervous system. We anticipate that *GtPax6A* and *GtPax6B* are at least partially redundant in the determination of both eye cell types, and that, as a consequence, the production of any phenotype when the *GtPax6B* function has been disrupted, is prevented. Injection of dsRNA of both *GtPax-6* in head regenerating organisms will clarify this point (work in progress).

A second type of eye genetic network genes isolated in planarians was the *sine oculis* genes. The first *so* planarian gene isolated was originally named *Gtso*. However, molecular comparative phylogenetic analysis places it in the Six-1, -2 family. Therefore, we changed the name from *Gtso* to *Gtsix-1* (Table 1). *Gtsix-1* is closely related to *Drosophila sine oculis* and *C. elegans Ceh-33* and *Ceh-34* and clusters in the family group with another branch in which the vertebrate representatives of Six-1 and Six-2 are situated. Sequence comparison of a second *sine oculis* gene from *Girardia tigrina* supports its orthology to the Six-3 family and for that reason we call it *Gtsix-3*. It is closely related to *Drosophila optix* and *C. elegans Ceh-32*. So far, no other Lophotrochozoa *sine oculis* genes

have been isolated. *Gtsix-1* whole-mount *in situ* hybridization shows that it is expressed continuously in the rhabdomic photoreceptor cells of the adult differentiated eye spots and during the different stages of eye regeneration (PINEDA et al. 2000). Loss of function experiments by RNA double strand injections in regenerating animals completely inhibit eye regeneration, producing a non-eye phenotype (Fig. 1). RNA interference in adult heads leads to the gradual loss of the photoreceptor differentiated state, producing a blind phenotype at one week post-injection. These injected planarians do not show any phototropism, while the non-injected controls have a negative phototropism. The change in the differentiated state can be observed by analyzing the alterations in opsin

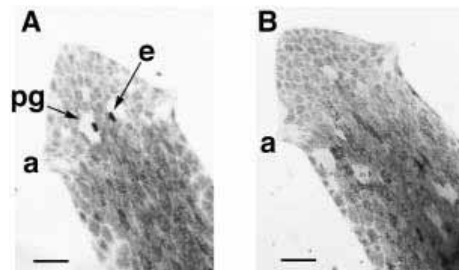


Fig. 1. – Inhibition of eye regenerative capacity by *Gtsix-1* dsRNA. Three weeks head regenerating organisms viewed dorsally. (A) Bright field image shows the differentiated eyes in the regenerated head of a control organism. (B) Bright field image shows the absence of eye differentiation and periglobular unpigmented area in dsRNA *Gtsix-1* injected at postblastema level after 3 weeks of regeneration. a, auricle; e, eye spot; pg, periglobular unpigmented area. (Bars = 400 μ m).

expression by whole-mount *in situ* hybridization at different times post-injection and by studying eye morphology. Opsin expression decreases gradually during the first seven days post-injection (Fig. 2). A decrease of expression to zero can be explained as the result of a disruption of the eye gene regulatory network where, according to SHEN et al., 1997 and PIGNONI et al., 1997, *sine oculis* is located in the early eye genetic cascade. The gradual loss of opsin expression by *Gtsix-1* RNAi could thus be due to an indirect effect. However, since *Gtsix-1* is also expressed in the differentiated photoreceptor cells, it may also directly control opsin gene expression. Further analysis of the cis-regulatory region of the opsin gene will confirm if it is recognized by *sine oculis*, or by Pax-6 proteins, or both. We also checked *Gtsix-1* function in photoreceptor cell maintenance by the histological analysis of *Gtsix-1* dsRNA injected organisms in comparison with controls. While the control eyes show a high density of photoreceptor cells with their rhabdomeric structures inside the eye cavity, the injected ones at 7d and 14d post-injection have a lower density of differentiated photoreceptor cells (work in progress).

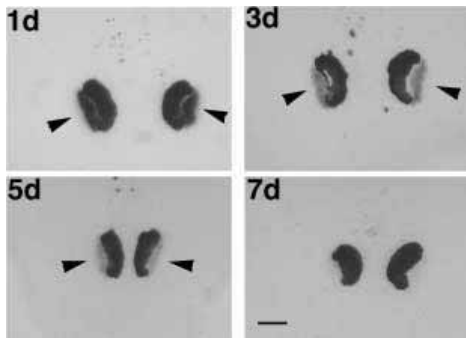


Fig. 2. – Dorsal view of *Gtops* gradually declining expression by whole mount *in situ* hybridization at different days post-injection of dsRNA of *Gtsix-1*. Internal black dots correspond to the pigmented cup shape of the eyes, while the external weak signal (arrow heads) corresponds to the blue signal from the whole mount *in situ* hybridization of opsin gene. Anterior at the top and upper left edge, the days after injection are indicated. (Bars: 200 μ m).

Another key gene shared by photoreceptors of Metazoa is the opsin gene, encoding the photoreceptor pigment present in all visual systems. Rhodopsin sequences analysed so far in vertebrates and invertebrates show a high degree of conservation, and all belong to the same family (for review see GEHRING & IKEO, 1999). Opsins are also present in bacteria, and have sensory functions. Despite a low overall sequence conservation, they show conserved structural functions like the seven transmembrane domains. The unicellular green algae *Chlamydomonas* develop at the base of the flagella a light sensitive organelle that contains a type of photopigment

with limited sequence homology to invertebrate rhodopsins (DEININGER et al., 1995). The similarities observed in the photopigments have been used as another indication for the common origin of the visual system through a prototypic eye. We have isolated a *Girardia tigrina* opsin gene *Gtops*. Its amino acid sequence was compared and phylogenetic trees were constructed with opsin protein sequences of bacteria, algae, yeast and Metazoa. The neighbor-joining method was used for tree construction. We can observe the clustering of the two planarian opsin genes with the mollusc sequences, one of their Lophotrochozoa counterparts (Fig. 3). Such phylogenetic results are in agreement with other studies using different molecules such as ribosomal 18S and Hox genes

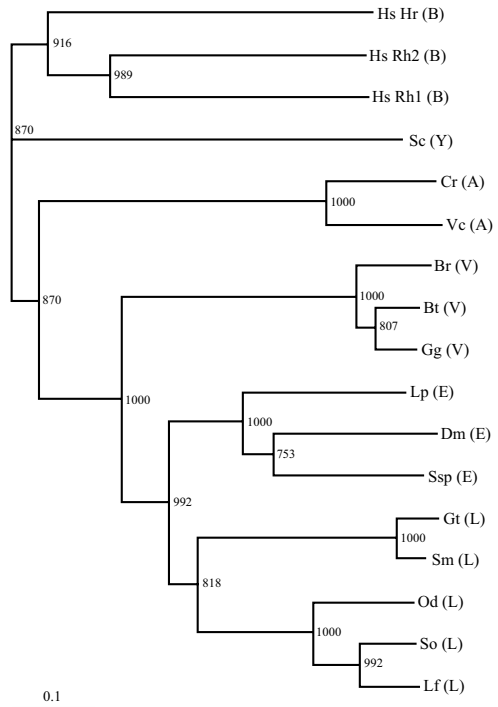


Fig. 3. – Phylogenetic unrooted tree of opsin proteins. Bootstrap values of 1000 runs are indicated as percentages at the nodes. The planarian *Gtops* protein clearly clusters with the other opsin proteins from the Lophotrochozoa clade. (B): Bacteria. Hs: *Halobacterium salinarium*. Hr: halorhodopsin. Rh1 and Rh2: sensory rhodopsin I and II. (Y): Yeast. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*. (A): Algae. Cr: *Chlamydomonas reinhardtii* chlamyopsin. Vc: *Volvox carteri* volvoxopsin. (V): Vertebrate. Br: *Brachydario rerio* rhodopsin. Bt: *Bos taurus* rhodopsin. Gg: *Gallus gallus* rhodopsin. (E): Ecdysozoa. Dm: *Drosophila melanogaster* opsin1. Lp: *Limulus polyphemus* ocellar opsin2. Ssp: *Sphodromantis sp.* rhodopsin. (L): Lophotrochozoa. Gt: *Girardia tigrina* opsin. Lf: *Loligo forbesi* rhodopsin. Od: *Octopus dofleini* rhodopsin. Sm: *Schmidtea mediterranea* opsin. So: *Sepia officinalis*. Scale bar, genetic distance.

(CARRANZA et al., 1997; BAYASCAS et al., 1998). *Gtops* spatial expression was determined by whole-mount *in situ* hybridization of intact adults and regenerating pieces. In adults, *Gtops* was expressed continuously and uniformly in the photoreceptor cell bodies, whereas the rhabdomeric region of the photoreceptor cells was negative. A similar pattern of expression can be observed with *Gsix-1*, but with a lower expression level. During the early stages of head regeneration, *Gtops* expression was detected in a group of differentiated photoreceptor cells close to the dorsal epidermis. This expression was maintained throughout regeneration (PINEDA et al., 2000). Opsin dsRNA injection induces a fast depletion of endogenous gene expression in the photoreceptor cells 24 hours post-injection, which eventually leads to the loss of phototactic behavior in the animal (SANCHEZ & NEWMARK, 1999; PINEDA et al., 2000).

Eye evolution: a common origin from a prototypic eye and an independent evolution by parallelism

The comparative embryological and morphological studies of metazoan eyes show different developing mechanisms and different morphologies suggesting an independent evolution of the different types of eyes (SALVINI-PLAWEN & MAYR 1961). However, molecular studies in the last decade have revealed the universality of rhodopsin as the visual pigment and the conservation in all studied Metazoa, including Platyhelminthes, of the early genetic cascade initiated by the gene Pax-6. Such molecular results suggest that all different eye types observed in Metazoa derive from a common prototypic eye and as a consequence have a monophyletic origin. Such prototypic eye can be found in some Platyhelminthes. The current work suggests that the development of the prototypic eye is controlled by a similar early genetic cascade. In molluscs we can observe a great variety of eyes in the mantle edge of Bivalvia (compound eyes, closed lens eyes with inverted retinal cells, reflecting mirror eye). Another eye type, the cephalopod eye, is similar in design to the vertebrate eye camera, but large embryological differences can be observed between the two (GEHRING 1996; HARRIS, 1997). The similarities in eye design in molluscs compared with the other metazoan eyes can be interpreted as evidence for a phenomenon of parallelism in the mechanisms by which the different Metazoa evolved their eyes from a common prototypic eye, using initially the same genetic network. The recruitment of different genes by intercalary evolution (GEHRING & IKEO, 1999) in the eye gene networks of the various evolutionary lines can lead to eyes with dramatically similar designs as a consequence of comparable developmental constraints, or, of course, to radically different final structures.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the DGICYT to E.S. (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, PB98-

1261-C02-01) and Formación de Personal Investigador fellowship to D.P. and M.M. from Universitat de Barcelona and from Ministerio de Educación y Ciencia respectively.

REFERENCES

- BAYASCAS, J.R., E. CASTILLO & E. SALÓ (1998). Platyhelminthes have a Hox code differentially activated during regeneration, with genes closely related to those of spiralian protostomes. *Dev. Genes Evol.*, 208: 467-473.
- BONINI, N.M., W.M. LEISERSON & S. BENZER. (1993). The eyes absent gene: Genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell*, 72: 379-395.
- CALLAERTS, P., A.M. MUÑOZ-MARMOL, S. GLARDON, E. CASTILLO, H. SUN, W.H. LI, W.J. GEHRING & E. SALÓ (1999). Isolation and expression of a Pax-6 gene in the regenerating and intact Planarian *Dugesia(G)tigrina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 558-563.
- CARRANZA, S., J. BAGUÑA & M. RIUTORT (1997). Is the Platyhelminthes a Monophyletic Primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 14: 485-497.
- DEININGER, W.K.P., U. HEGEMANN, F. LOTTSPEICH, P. HEGEMANN. (1995). Chlamyrodopsin represents a new type of sensory photoreceptor. *EMBO J.*, 14: 5849-5858.
- CHEYETTE, B. (1994). The *Drosophila sine oculis* locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron*, 12: 977-996.
- GARCIA-FERNÁNDEZ, J., BAGUÑA, J., SALÓ, E. (1993). Genomic organization and expression of the planarian homeobox genes *Dth-1* and *Dth-2*. *Development*, 118: 241-253.
- GEHRING, W.J. (1996). The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes To Cells*, 1: 11-15.
- GEHRING, W.J. & K. IKEO. (1999). Pax 6 mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.*, 15: 371-377.
- HALDER, G., P. CALLAERTS, S. FLISTER, U. WALLDORF, U. KLOTER & W.J. GEHRING (1998). Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during *Drosophila* compound eye development. *Development*, 125: 2181-2191.
- HALDER, G., P. CALLAERTS & W.J. GEHRING. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science*, 267: 1788-1792.
- HARRIS, W.A. (1997). Where to be conserved is not conservative. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 2098-2100.
- KAWAKAMI, K., H. OHTO, K. IKEDA & R.G. ROEDER. (1996). Structure, function and expression of a murine homeobox protein AREC3, a homologue of *Drosophila* gene product, and implication in Development. *Nucleic Acids Res.*, 24: 303-310.
- KISHIDA, Y. (1967). Electron Microscopic Studies on the Planarian Eye. Fine structures of the normal eye. *Sci. rep. Kanazawa Univ.*, 12: 75-110.
- NIIMI, T., M. SEIMIYA, U. KLOTER, S. FLISTER & W.J. GEHRING. (1999). Direct regulatory interaction of the *eyeless* protein with an eye-specific enhancer in the sine oculis gene during eye induction in *Drosophila*. *Development*, 126: 2253-2260.

- OLIVER, G., A. MAILHOS, R. WEHR, N.G. COPELAND, N.A. JENKINS & P. GRUSS. (1995A). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development*, 121: 4045-4055.
- OLIVER, G., R. WEHR, N.A. JENKINS, N.G. COPELAND, B. CHEYETTE, V. HARTENSTEIN, L. ZIPURSKY & P. GRUSS. (1995B). Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development*, 121: 693-705.
- PIGNONI, F., B. HU & S.L. ZIPURSKY (1997). Identification of genes required for *Drosophila* eye development using a phenotypic enhancer-trap. *Proc. Natl. Soc. USA*, 94: 9220-9225.
- PINEDA, D., J. GONZALEZ, P. CALLAERTS, K. IKEO, W.J. GEHRING & E. SALÓ. (2000). Searching for the prototypic eye genetic network: *sine oculis* is essential for eye regeneration in planarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4525-4529.
- QUIRING, R., U. WALLDORF, U. KLOTTER & W.J. GEHRING (1994). Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to *small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science*, 265: 785-789.
- SALVINI-PLAWEN, L.V. & E. MAYR (1961). *Evolutionary Biology*. In: HECHT, M.K., STEERE, W.C., WALLACE, B. (eds), Plenum Press, Vol. 10: 207-263.
- SANCHEZ, A. & P.A. NEWMARK (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 5049-5054.
- SEIMIYA, M. & W.J. GEHRING (2000). The *Drosophila* homeobox gene *optix* is capable of inducing ectopic eyes by an *eyeless*-independent mechanism. *Development*, 127: 1879-1886.
- SERIKAKU, M.A. & J.E. O'TOUSA (1994). *Sine oculis* is a homeobox gene required for *Drosophila* visual system development. *Genetics*, 138: 1137-1150.
- SHEN, W. & G. MARDON (1997). Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed dachshund expression. *Development*, 124: 45-52.
- TREISMAN, J.E. (1999). A conserved blueprint for the eye? *BioEssays*, 21: 843-850.
- UMESONO, Y., K. WATANABE & K. AGATA (1997). A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev. Growth Differ.*, 39: 723-727.
- XU, P.X., I. WOO, H. HER, D.R. BEIER & R.L. MAAS (1997). Mouse Eya homologues of the *Drosophila* eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode. *Development*, 124: 219-231.
- ZIMMERMAN, J.E., Q.T. BUI, E. STEINGRIMSSON, D.L. NAGLE, W. FU, A. GENIN, N.B. SPINNER, N.G. COPELAND, N.A. JENKINS, M. BUCAN & N.M. BONINI (1997). Cloning and characterization of two vertebrate homologs of the *Drosophila* eyes absent gene. *Genome Res.*, 7: 128-141.

3. LA XARXA GENÈTICA INVOLUCRADA EN LA REGENERACIÓ DELS ULLS A PLANÀRIES ÉS INDEPENDENT DE PAX6.

Article 3:

Pineda, D., Rossi, L., Batistoni, R., Salvetti, A., Marsal, M., Gremigni, V., Falleni, A., González, J., Deri, P., Saló, E. (2002). The genetic network of prototypic planarian eyes regeneration is Pax6 independent. *Development*. 2002 Mar;129(6):1423-34.

RESUM:

L'estudi del paper dels gens *Pax6* durant la regeneració dels ulls i el sistema nerviós a plathelminths resulta de gran interès per entendre les diferents formes en què la xarxa genètica implicada en la morfogènesi dels ulls ha evolucionat dins del regne animal.

En aquest treball es caracteritzen els gens *Pax6* aïllats en dues espècies de planàries en paral·lel:

- *Girardia tigrina*: treball realitzat pel nostre grup de recerca.
- *Dugesia japonica*: treball realitzat pel grup de recerca de la Dra. Batistoni de la Universitat de Pisa.

Les seqüències aïllades dels gens *Gtpax6A*, *Gtpax6B*, *Djpax6A* i *Djpax6B* presentaven una gran similitud de seqüència. Es va comprovar que els dos gens B eren els gens més divergents trobats respecte a la resta de gens *Pax6* aïllats tant a vertebrats com a invertebrats.

Tant els dos gens A com els dos B s'expressaven al Sistema Nerviós (ganglis cefàlics i cordons nerviosos) dels organismes adults i regenerants, tot i que els nivells d'expressió dels gens B eren molt més baixos.

Per investigar en detall l'extensió de l'expressió dels gens A i gens B a les cèl·lules fotoreceptores es van realitzar hibridacions *in situ* que es van visualitzar per microscòpia electrònica. Es va observar expressió dels gens *Djpax6A* i *Djpax6B* al pericàrión, a les dentrites i a la regió rabdomèrica de les cèl·lules fotoreceptores.

Durant la regeneració anterior i per hibridació *in situ whole-mount* vam observar que l'expressió de *Gtpax6A* i *Djpax6A* apareixia al 1r-2n dia de regeneració en dos punts que coincidien amb els extrems dels antics cordons nerviosos amputats. Posteriorment, el senyal d'expressió s'anava expandint en una estructura d'arc dins el blastema que s'acabava organitzant formant els dos nous ganglis cefàlics. Finalment, els nivells d'expressió es reduïen fins als nivells basals observats en els organismes adults.

També es va detectar un increment dels nivells d'expressió de *Gtpax6A* i *Djpax6A* tant en la regeneració posterior (a la zona terminal dels cordons nerviosos amputats) com en la regeneració lateral (a la zona on es forma el nou cordó lateral amputat).

Quedava palès que els 4 gens s'expressaven al Sistema Nerviós i als ulls de planàries, però quina n'és la seva funció?

Els experiment d'injecció d'RNAi tant dels gens *Gtpax6A*, *Djpax6A*, *Gtpax6B* i *Djpax6B* com de la combinació d'ambdós gens A i B a cada una de les espècies, no va permetre observar un fenotip alterat dels organismes adults injectats. Tampoc es va obtenir cap resultat conclouent amb la injecció d'RNAi en organismes prèviament decapitats i seguir-ne la regeneració del nou cap. Així mateix, tampoc vam observar

RESULTATS

cap alteració de l'expressió dels gens *Gtops* i *Gtsix1* en organismes regenerants injectats prèviament amb RNAi de *Gtpax6A*, RNAi de *Gtpax6B* i una mescla d'RNAi d'ambdós gens.

Tot i això, sí que vam poder observar amb experiments de RT-PCR que la injecció de l'RNAi tant dels gens A com dels gens B feia decreïxer considerablement els nivells d'mRNA endògens d'aquest gens respectivament.

Queda oberta, doncs, la qüestió de quina és la funció dels gens *Pax6A* i *Pax6B* a planàries. Els resultats obtinguts ens suggereixen que els gens *Pax6A* i *Pax6B*, tot i expressar-se en els ulls de planària, no serien imprescindibles per a la morfogènesi dels ulls, i podrien ser substituïts funcionalment per altres gens.

Col·laboracions:

Els grups de la Dra. Batistoni i del Dr. Gremigni de la Universitat de Pisa van realitzar els experiments d'hibridació *in situ* per a l'anàlisi de l'expressió dels gens *Djpax6A* i *Djpax6B* per microscòpia electrònica. Igualment, l'estudi de funció realitzat mitjançant la injecció d'RNAi i l'anàlisi de la reducció dels nivells d'expressió dels gens endògens per RT-PCR fou també realitzat en *Dugesia japònica*. En aquesta espècie es van obtenir els mateixos resultats que van donar consistència als treballs realitzats pel nostre grup amb *Girardia tigrina*.

The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax6 independent

David Pineda^{1,*}, Leonardo Rossi^{3,*}, Renata Batistoni², Alessandra Salvetti³, Maria Marsal¹, Vittorio Gremigni³, Alessandra Falleni³, Javier Gonzalez-Linares¹, Paolo Deri² and Emili Saló^{1,†}

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

²Laboratorio di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Dipartimento di Fisiologia e Biochimica, Università di Pisa, Via Carducci 13, 56010 Ghezzano, Pisa, Italy

³Dipartimento di Morfologia Umana e Biologia Applicata, Università di Pisa, Via A. Volta 4, Pisa, Italy

*These authors contributed equally to this work

†Author for correspondence (e-mail: esalo@porthos.bio.ub.es)

Accepted 26 December 2001

SUMMARY

We report the presence of two Pax6-related genes, *Pax6A* and *Pax6B*, which are highly conserved in two planarian species *Dugesia japonica* and *Girardia tigrina* (Platyhelminthes, Tricladida). *Pax6A* is more similar to other Pax6 proteins than *Pax6B*, which is the most divergent Pax6 described so far. The planarian Pax6 homologs do not show any clear orthology to the *Drosophila* duplicated Pax6 genes, *eyeless* and *twin of eyeless*, which suggests an independent Pax6 duplication in a triclad or platyhelminth ancestor. *Pax6A* is expressed in the central nervous system of intact planarians, labeling a subset of cells of both cephalic ganglia and nerve cords, and is

activated during cephalic regeneration. *Pax6B* follows a similar pattern, but shows a lower level of expression. *Pax6A* and *Pax6B* transcripts are detected in visual cells only at the ultrastructural level, probably because a limited amount of transcripts is present in these cells. Inactivation of both *Pax6A* and *Pax6B* by RNA-mediated gene interference (RNAi) inhibits neither eye regeneration nor eye maintenance, suggesting that the genetic network that controls this process is not triggered by Pax6 in planarians.

Key words: Planarians, Regeneration, Eye, Central nervous system, Paired domain, Pax6, RNAi, Ultrastructure, In situ hybridization

INTRODUCTION

An evolutionary conserved complex network of different signaling pathways and nuclear factors regulates brain and eye specification (Kurata et al., 2000; Callaerts et al., 2001; Kumar and Moses, 2001). One striking illustration of such genetic conservation is the Pax6 gene, which is structurally and functionally characterized in a large number of triploblastic metazoans from planarians to humans (Quiring et al., 1994; Chisholm and Horvitz, 1995; Czerny and Busslinger, 1995; Zhang and Emmons, 1995; Loosli et al., 1996; Glardon et al., 1997; Tomarev et al., 1997; Glardon et al., 1998; Callaerts et al., 1999). Pax6 represents one of the nine members of the Pax class, characterized by the presence of two conserved DNA-binding domains, the paired domain and the homeodomain (Callaerts et al., 1997). The comparative molecular characterization of Pax6 in different animal phyla supports the hypothesis that this protein has a conserved function in a variety of developmental processes, ranging from regionalization to cell type specification, in eye and central nervous system development (Quiring et al., 1994; Kurusu et al., 2000; Pratt et al., 2000). In some vertebrates, Pax6 is also related to the development of head sensory organs or other structures such as pituitary or pancreas (Walther and Gruss, 1991; Turque et al.,

1994). Pax6 genes from various animal phyla are capable of inducing formation of ectopic eyes in *Drosophila* (Gehring and Ikeo, 1999). In frogs, Pax6 misexpression can also induce ectopic eyes (Chow et al., 1999). This finding indicates that Pax6 is a master control gene for eye development, and also suggests a common genetic program for making eyes, despite the great variety of visual structures found in the animal kingdom. Two Pax6 genes involved in eye development have been found in zebrafish (Nornes et al., 1998). The presence of a second Pax6 gene arisen by gene duplication during insect evolution is also described in holometabolous insects, the two *Drosophila* genes *eyeless* (*ey*) and *twin of eyeless* (*toy*) being the best-studied examples. *ey* and *toy* share a similar pattern of expression in the developing visual system, and have non-redundant functions, indicating that they have been recruited with different roles into the eye genetic pathway (Czerny et al., 1999).

Planarians are flatworms well known for their exceptional regenerative capabilities. They are free-living members of the Platyhelminthes, considered a basal phylum of the Lophotrochozoa clade (Aguinaldo et al., 1997; Carranza et al., 1997; Bayascas et al., 1998). The study of the role of Pax6 genes during eye and central nervous system (CNS) regeneration and maintenance will be of interest for

understanding the different ways that this genetic network evolved in the animal kingdom. Planarians are one of the simplest organisms with cephalization, defined by the presence of two dominant cephalic ganglia connected by commissural connections and followed by two ventral nerve cords. The nerve cords run the entire length of the body and are regularly connected by commissures producing a small concentration of neurons at the crossing points (Baguñá and Ballester, 1978; Rieger et al., 1991). Light perception by special photosensitive cells occurs in planarians. Photoreceptor structures, which are capable of detecting light and shadow, are grouped into eyespots defining a simple ancestral visual system that consists of bipolar retinal neurons whose dendrites project into a cup-shaped structure composed of pigment cells (Kishida, 1967; Sakai et al., 2000). Although the planarian eyes cannot focus the light pattern into images, as they have no focusing lens, they serve essentially the same function, receiving and transducing light into neuronal signals, as eyes do in all metazoans.

We report an extensive search for *Pax6* genes in Platyhelminthes that has led to the characterization of two related *Pax6* genes in the planarian species *Dugesia japonica* (*DjPax6A* and *DjPax6B*) and *Girardia tigrina* [*GtPax6A* and *GtPax6B*, the latter previously named *DtPax6* (Callaerts et al., 1999)]. The *Pax6A* and *Pax6B* sequences share high similarity and comparable expression patterns in both species, suggesting that they originated by duplication in a triclad or, possibly, in a plathyhelminth ancestor. Both genes are detected in the adult CNS – a pattern of expression shared with all *Pax6* genes described so far – and are activated during regeneration, *Pax6A* being more expressed than *Pax6B*. Although no specific transcripts were detectable in the photoreceptors by whole-mount in situ hybridization, the presence of low levels of *Pax6A* and *Pax6B* mRNA could be demonstrated in the eye cells by electron microscope in situ hybridization. Inactivation of both *Pax6* genes by RNAi neither prevents eye formation during regeneration nor inhibits the eye expression pattern of the planarian genes *Gstix-1* or *Giops*, supporting the hypothesis that the function of *Pax6A* and *Pax6B* is not essential in planarian eye regeneration.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Planarians used in this work belong to the species *Dugesia japonica*, clonal strain GI (Orii et al., 1993), and to an asexual race of *Girardia tigrina*, formerly classified as *Dugesia(G) tigrina*, collected in the Caldés River (Barcelona, Spain). Animals were cultured as described previously (Salveti et al., 1998; Saló and Baguñá, 1984) and starved for 2 weeks before being used in the experiments. Regenerating fragments were obtained by transverse amputation at the pre-pharyngeal or post-pharyngeal level. Anterior regeneration corresponds to a tail regenerating a head, while posterior regeneration corresponds to a head regenerating a tail. Finally, lateral regeneration was obtained by sagittal amputation.

Isolation and characterization of planarian genes related to *Pax6*

A *GtPax6A* PCR fragment of 111 bp was amplified with two degenerate primers. The primers correspond to the amino acid sequences LEKEFER (sense strand) and QVWFNSNR (antisense strand) of the homeodomain. A λ Gt10 cDNA library from

regenerating *G. tigrina* was screened according to Garcia-Fernandez et al. (Garcia-Fernandez et al., 1991), with the 111 bp PCR fragment as a probe. One positive clone was found corresponding to the 3' *Pax6A* gene end (*Pax6A3'*). A 5' RACE strategy was used to elongate the sequence at the 5' end, obtaining a second clone (*GtPax6A790*) that contained 790 bp from the paired box to the homeobox of the *Pax6A* sequence. The *GtPax6A* sequence has been deposited to the EMBL/GenBank with the Accession Number AY028904. *DjPax6A* was directly amplified from the sequence deposited in the EMBL/Genbank (Accession Number, AB017632), as described by Rossi et al. (Rossi et al., 2001). A fragment (clone *DjPax6B-520* bp) of the second *Pax6* gene, *DjPax6B*, was amplified in *D. japonica* (Rossi et al., 2001). A sense-strand degenerate primer was designed, taking advantage of the high sequence similarity in the paired domain between *DjPax6A* and the *Pax6* gene, here referred to as *GtPax6B*, previously characterized in *G. tigrina* (Callaerts et al., 1999). The antisense primer corresponded to the *GtPax6B* amino acid region TLFQYN. A 5'/3'RACE strategy was used to further characterize the *DjPax6B* sequence, deposited at the EMBL/Genbank with the Accession Number AJ311310. The sequence-specific antisense primer, corresponding to the amino acid region SKPRVATN was used to amplify selectively the 5' region. The *DjPax6B* 3' region was obtained with the sequence-specific sense primer, corresponding to INTWPPTS. The PCR products were TA-cloned using the pGEM-T easy vector (Promega). All clones were sequenced by automated fluorescent cycle sequencing (ABI).

Phylogenetic analysis of the Pax family homeodomains

The phylogenetic tree of the homeodomains and their flanking regions sequences was inferred using the CLUSTALX package. Sequences were aligned with CLUSTALX software. Evolutionary distances were calculated using Kimura's equation (Nei and Koehn, 1983), and used for phylogenetic tree construction by the Neighbor-joining method. Sequences were obtained from the EMBL/ GenBank.

In situ hybridization experiments

All sense and antisense digoxigenin-labeled RNA probes used for in situ hybridization experiments were made using the RNA in vitro labeling kit (Roche). Whole-mount in situ hybridization was carried out on intact and regenerating planarians according to Agata et al. (Agata et al., 1998). Cryosections after whole-mount in situ hybridization were performed as described by Pineda et al. (Pineda et al., 2000). In situ hybridization on sections was carried out as described by Kobayashi et al. (Kobayashi et al., 1998). Hybridization took place at 55°C for 24–60 hours. The final probe concentration was 0.1 ng/ μ l. In some hybridized sections, 20 μ g/ml DAPI was added to detect nuclei. Transmission electron microscope (TEM) in situ hybridization was performed on specimens of *D. japonica*, fixed with 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 1 hour at 4°C. After dehydration in a graded series of methanol (each step for 30 minutes at –20°C) specimens were embedded in Unicryl resin and polymerized for 72 hours at 4°C under u.v. light. Ultrathin sections, obtained with a diamond knife on Ultracut Reichert-Jung microtome, were placed on Formvar-carbon coated nickel grids and were incubated face down on a drop containing the hybridization buffer (50% formamide, 10% dextran sulphate, 4x saline sodium citrate, 400 μ g/ml salmon testis DNA and 8 ng/ μ l of antisense or sense probes) for 4 hours at 37°C. After hybridization, ultrathin sections were washed in phosphate buffer, pre-incubated in 1% bovine serum albumin and then incubated in anti-digoxigenin antibody (1:40 in phosphate buffer) conjugated to gold particles of 10 nm in diameter, for 30 minutes. Grids were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Jeol 100 SX transmission electron microscope. Controls were performed using both sense probes and RNase treatment (100 μ g/ml of RNase A for 90 minutes at 37°C) (Le Guellec et al., 1991) before the hybridization step.

The following clones were used as probes for in situ hybridization experiments.

D. japonica: *DjPax6A*, *DjPax6B* 520 bp, *Dj18S* (central region of 18S rDNA, about 1.1 kb) *Djops* 480 bp (Accession number, AJ421264) and *Djsyt* (Tazaki et al., 1999).

G. tigrina: *GtPax6A3'* and *GtPax6A790* were used in non-injected animals, *GtPax6A790*, *Gtsix-1 so-5'* and *so-3'2* (Accession number, AJ251661), and *Gtops p-250* (accession no. AJ251660) were used in dsRNA-injected animals.

Microinjection of double-strand RNA (dsRNA) and analysis of endogenous transcripts

Double-stranded RNA was synthesized as described by Sanchéz-Alvarado and Newmark (Sanchéz-Alvarado and Newmark, 1999). In *G. tigrina Pax6A3'* clone and a *Clal-HindIII* fragment of 400 bp (*GtPax6B3'clone*) of *GtPax6B* were used for dsRNA synthesis. In *D. japonica* dsRNA was synthesized from *DjPax6A* 1600 bp and *DjPax6B* 520 bp clones. Planarians were injected with 10^{10} - 10^{11} molecules of each dsRNA preparation or with an equimolar mixture of both *Pax6A* and *Pax6B* dsRNA. After the first injection, performed just after amputation, further injections were performed every 1 or 3 days, using a Drummond Scientific (Broomall, PA) Nanoject injector. Control injections were performed with water or β -Gal dsRNA. Injected planarians were kept at 17°C. Injected *G. tigrina* specimens were fixed at different regeneration times and processed for whole-mount in situ hybridization.

Total RNA was isolated from injected planarians after 1 to 3 days of regeneration and semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was performed according to Bayasacas et al. (Bayasacas et al., 1998). Control reactions were performed identically in the absence of reverse transcriptase. Specific oligonucleotides from *Pax6A* and *Pax6B* were used to ascertain the reduction of *Pax6A* and *Pax6B* endogenous transcripts. Each couple of primers was designed from two regions, one internal and the other external to the sequence used for dsRNA synthesis. As an internal control, the ubiquitous transcripts of the homeobox gene *Dth2* (García-Fernández et al., 1993) and the eye-specific *Gtsix1* and *Gtops* transcripts (Pineda et al., 2000; Pineda et al., 2001), were amplified in *G. tigrina*. Two specific primers for the constitutively transcribed elongation factor gene *DjEF2* were used for control amplifications in *D. japonica*.

Primer sequences used for PCR were as follows:

GtPax6A reverse, 5'-GAAGCTTCTGTTCGTTTCTAGAG-3';
GtPax6A forward, 5'-CGTACTTCGTTTTTCGACAGATCAA-3';
GtPax6B reverse, 5'-TCGCTTCTTTTGTGTACAGTTTG-3';
GtPax6B forward, 5'-CGGACTTCATTTACAAATGATCAG-3';
Dth-2 reverse, 5'-TGGGAGACCGTTCTTTATCGTCAAC-3';
Dth-2 forward, 5'-CCAATGCTAGTAATGATCCGCGTAT-3';
Gtops reverse, 5'-GGACAGATACTTTGTTATCGCTCA-3';
Gtops forward, 5'-TAACAAAATCCCGATGTACATTC-3';
Gtsix-1 reverse, 5'-AACGGCTCGGGATTTTTCTTTAAA-3';
Gtsix-1 forward, 5'-ATATGGTCTCTCCACCTTGCCAA-3';
DjPax6A forward, 5'-CCAAATCTTTCGCAATCTTC-3';
DjPax6A reverse, 5'-CAATAAGTATCAAATACGTTTACA-3';
DjPax6B forward, 5'-CATCAATACATGCGCCCTACAA-3';
DjPax6B reverse, 5'-CGTCTCCATTTGTCTCTGCGATT-3';
DjEF2 forward, 5'-TTAATGATGGGAAGATATGTTG-3'; and
DjEF2 reverse 5'-GTACCATAGGATCTGATTTTGC-3'

For each PCR reaction the concentration of cDNA, primers and the number of cycles used were optimized with the aim of observing a quantifiable signal within the linear range of the amplification, according to both the putative abundance of each mRNA amplified and to the size of the corresponding PCR product.

Immunohistochemistry

Whole-mount immunohistochemistry of regenerating *G. tigrina* was carried out as described by Cebrià et al. (Cebrià et al., 1997). Rabbit

anti-FMRamide (Diasorin) was used as a primary antibody at a 1:100 dilution, and a fluorescein-conjugated goat anti-rabbit (IgG; Sigma) was used as a secondary antibody at a 1:50 dilution. The samples were examined with an epifluorescence microscope (Axiophot, Zeiss) and with a confocal laser scanning microscope (Leica Lasertechnik, Heidelberg).

RESULTS

Cloning of planarian *Pax6A* and *Pax6B* genes

Using a PCR approach and first strand cDNA derived from planarian heads, two *Pax6* genes, *Pax6A* and *Pax6B*, were isolated in *G. tigrina* and *D. japonica*. Three types of sequences, which corresponded to three of the four families of *Pax* genes, *Pax2-5-8*, *Pax1-9* and *Pax4-6*, were found in *G. tigrina* using two different sets of degenerate primers directed against two regions of the paired box (GRPLP and WEIRD) and of the homeobox (LEKEFER and QVWFNSR). The subsequent screening of a cDNA library using *Pax4-6* fragment as a probe, allowed us to isolate a second *Pax6* gene, *GtPax6A*, in addition to the previously described *Pax6* gene (*DtPax6*) (Callaerts et al., 1999), here renamed *GtPax6B*. Two degenerate primers were selected on the basis of a comparative sequence analysis of *DtPax6* and *DjPax6A*, a *Pax6* clone previously isolated in *D. japonica* (Accession Number, AB017632). These primers allowed us to identify a second *Pax6* gene in *D. japonica*, *DjPax6B*. *DjPax6A* and *GtPax6A*, as well as *DjPax6B* and *GtPax6B* deduced proteins, show extensive sequence identity even outside the conserved DNA-binding boxes (Fig. 1A).

Characterization and phylogenetic relationships of *Pax6A* and *Pax6B* proteins

Both *Pax6A* and *Pax6B* show a significant similarity in the paired domain and homeodomain with vertebrate and invertebrate *Pax6* proteins. Comparison of the paired domain of *Pax6A* with those of published *Pax6* proteins shows that it is 88% identical, and maintains most (six out of eight) of the residues that typify the *Pax6* family. In *Pax6B* paired domain the degree of sequence conservation is lower, 77-78%, and only four out of eight *Pax6*-specific amino acids are conserved (Fig. 1B). The homeodomain in *Pax6A* has a higher sequence identity to the corresponding region of vertebrate *Pax6* (85%), maintaining nine out of 10 specific amino acids, while in *Pax6B* it shows a lower value (74%), where only five out of 10 conserved amino acids are present. Moreover, four conserved residues preceding the homeodomain, as well as five out of seven distinctive amino acids following the homeodomain, are conserved in *Pax6A*, but not in *Pax6B* (Fig. 1C). The length of the linker region between the paired domain and homeodomain is highly variable in different invertebrate as well as vertebrate *Pax6* proteins. It spans 224 amino acids in *Drosophila ey* and 108 amino acids in *toy* (Quiring et al., 1994; Czerny et al., 1999), whereas it is only 72 amino acids in length in sea urchin *Pax6* (Czerny and Busslinger, 1995). Planarian *Pax6* proteins contain a long linker region. In fact, the linker sequence consists of 138 amino acids in *Pax6A* and it is 171 amino acids long in *Pax6B*. Moreover, as commonly found in *Pax6* proteins of other organisms (Loosli et al., 1996), *Pax6A* linker sequence is typified by the presence of some conserved amino acids

A

```

Dj Pax6A      MTESN-ED EIKNNKKVKRHS1GSINQLGGFVNGRPLDPSTRQRIVELAHSGARPCDISRILQVSNCGVSKILCRYYETGSI2RPKAIIGGSKPRVATSSVVKSI3AA4YKRECP5SIF6SWEIRD
Gt Pax6A      .....GCVSKILCRYYETGSI2RPKAIIGGSKPRVATSSVVKSI3AA4YKRECP5SIF6SWEIRD
Dj Pax6B      MVFSCNCEENMKINRKL1RKHS1GSINQLGGFVNGRPLDPSTRQRI2IELSQSGARPCDISRILQVSNCGVSKILCRYYETGSI3KPKAIGGSKPRVATNTVVRKVTI4YKQES5PSMFAWEIRD
Gt Pax6B      MVFSCNCEENMKINRKL1RKHS1GSINQLGGFVNGRPLDPSTRQRI2IELSQSGARPCDISRILQVSNCGVSKILCRYYETGSI3KPKAIGGSKPRVATNTVVRKVTI4YKQES5PSMFAWEIRD

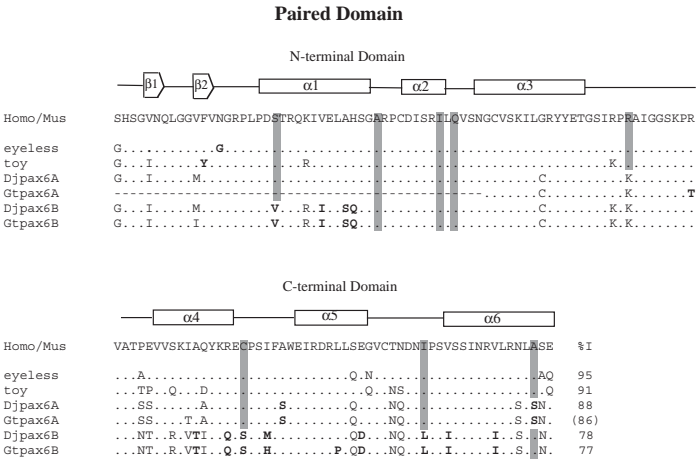
Dj Pax6A      RLLQEGVCNQDNIP1SVSSINRVLRSLSNEN2---QRHLVAATG3MYDKLSLLSG4FWSTAA5AAHA6AWYS7AAAA8AHG9-----YASSTFPNCGAYGGLTGIG10--IINGMSTA
Gt Pax6A      RLLQEGVCNQDNIP1SVSSINRVLRSLSNEN2---QRHLVAATG3MYDKLSLLSG4FWSTAA5AAHA6AWYS7AAAA8AHG9-----YASSTFPNCGAYGGLTGIG10--IINGMSTA
Dj Pax6B      RLLQDGV1CNQDNIP2SVSSINRILRS3LANE4SPSSNQ5TFK6SLNSHQ7LSLVS8-QNGASSCLPQYDS9FNTTANNPNLLNTPSN10FN11INTW12PTAPPV13FPN14WYSQ15TSI16SSLCHSTLFGYNT17P
Gt Pax6B      RPLQDGV1CNQDNIP2SVSSINRILRS3LANE4SPSSNQ5TFK6SLNSHQ7LSLVS8-QNGTNSCLPQYEP9FNSTNNPNLLHTPST10FN11IN12W13PSNAP14V15FPN16WYSQ17TSI18SSLCHSTLFGYNT19P

Dj Pax6A      HAVASINQ1SN2---GVNNYHQ3ST4DD5SSDKL6SEK7YSE8IAHSE9-----NASSEPGNE10YMS11GVK12SEND13---DMR14I15KL16KL17QRN18RT19SP20TD21Q22LD23SE24KE25F26ERT27HY28PD29VFA30REK31LD
Gt Pax6A      HAVASINQ1TNS2---GVNNYHQ3ST4AD5SSG6KH7SEK8YSE9IAHSE10-----NASSEPGNE11YMS12GVK13SEND14---DMR15I16KL17KL18QRN19RT20SP21TD22Q23LD24SE25KE26F27ERT28HY29PD30VFA31REK32LD
Dj Pax6B      NYYSAH1FD2YSS3Q4IF5EDSKARLIANSN6HES7IRD8TM9KS10L11FP12ESGIVNSLKMNDKIS13DFNS14DRE15SET16ERRYSN17PE18SKINK19QRS20RT21SP22ND23IN24LLE25KE26F27ERT28HY29PD30VFS31REK32LSQ
Gt Pax6B      NYYSAH1FP2YSS3Q4IF5EDSKARLIANSN6HES7IRD8TM9KS10L11Q12SE13TGL14PNL15GL16VK17NS18SKIS19DFNS20DRE21SE22ND23RRYSN24TES25KL26SK27QRS28RT29SP30ND31Q32IN33LLE34KE35F36ERT37HY38PD39VFS40REK41LSQ

Dj Pax6A      KISLPEARIQWF1SNRRAK2WRREK3-LRRQRQNLMLGSSG4TSS5TAE6TN7VT8TNG9TQ10CLST11-TQ12QNSM13GF14SG15-----IADIR16---NQ17FD18VGM19Q20TP21SL22SA23VAA24AG25MY26HS27AVAS28AAD29Q30VAKS
Gt Pax6A      KISLPEARIQWF1SNRRAK2WRREK3-LRRQRQNLMLGSSG4TSS5TAE6TN7VT8TNG9TQ10CLST11-TQ12QNSM13GF14SG15-----INDIR16---NQ17FD18VGM19Q20TP21SL22SA23VAA24AG25MY26HS27AVAS28AAD29Q30VAKS
Dj Pax6B      NLKVAETR1QWF2SNRRAK3WRREK4SEEN5NL6PN7M8TH9SD10IS11NI12PG13GS14AT15SN16DS17I18NT19N20TF21SD22CF23RGN24FP25MT26ED27LR28NR29NS30FG31SS32LP33QP34-----IG35W36Y37NT38ES39FK40LM41PF42QDS
Gt Pax6B      NLKVAETR1QWF2SNRRAK3WRREK4SEEN5NM6NM7VAR8SE9MS10NM11PF12SG13VSA14NS15DL16NT17N18TF19SD20CF21RGN22FP23MT24DD25LR26SS27WN28TF29SL30LP31QP32-----IG33W34Y35NS36DF37GL38LM39PF40QDS

Dj Pax6A      AGLPNLSQSSIN1PSYMAN2LQ3SRSSG4QID5LP6NV7TS8NS9FN10Y11PG12SV13Y14PP15LP16Q17GV18MR19GY20DT21IG22Y23K24Y25PT26AMP27---GSLE28-SNS29NINA30AG31FLAN32MS33TN34-----
Gt Pax6A      AGLPNLSQSSIN1PSYMAN2LQ3SRSSG4QID5LP6NV7TS8NS9FN10Y11PG12SV13Y14PP15LP16Q17GV18MR19GY20DT21IG22Y23K24Y25PT26AMP27---GSLE28-TN29NNIT30AG31FLAN32MS33TN34-----
Dj Pax6B      YKLNLP1-CCK2PF3SR4PN5FP6Y7TP8DP9NI10SH11NK12DK13HS14RE15NS16PN17EF18NQ19SY20TN21FF22Q23NLD24Q25TS26LS27T28IQ29Q30EF31QR32K33SP34VD35SS36FP37Q38W39NS40NS41M42N43DH44YEQ45VPA
Gt Pax6B      YKLSLP1-CCK2PF3TR4PL5NL6Y7TP8DAN9PH10-K11IE12GL13KREN14SN15PN16EF17NQ18SY19TN20FF21Y22Q23NLD24Q25TS26LS27V28Q29EF30QR31K32SP33VD34SS35FP36Q37W38NS39NS40PN41-DH42YEQ43VPA
    
```

B



C

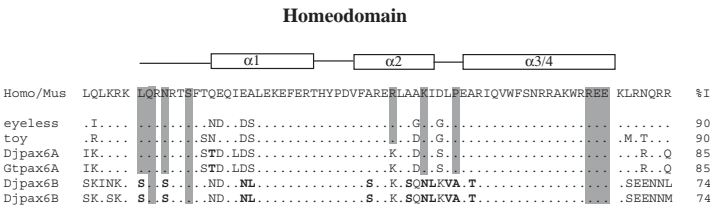


Fig. 1. Amino acid sequence comparison of Pax6A and Pax6B from *D. japonica* and *G. tigrina*. (A) Multiple alignment of DjPax6A, GtPax6A, and DjPax6B, GtPax6B sequences. Amino acids that are identical both in Pax6A and Pax6B are shown in blue; amino acids conserved between DjPax6A and GtPax6A are indicated in green; amino acids conserved between DjPax6B and GtPax6B are indicated in red; differing amino acids are shown in black. The paired domain, the conserved motif found in the linker region, and the homeodomain are boxed. The missing sequence in the 5' end of GtPax6A is indicated by dots; the introduced gaps are indicated by dashes. (B,C) Sequence comparison of the paired domain (B), and the homeodomain (C) of the planarian Pax6 proteins to the Pax6 paired domain and homeodomain of different species. Only *Homo sapiens* and *Mus musculus* Pax6 are shown for vertebrates. *Drosophila* eyeless and toy are included as invertebrate Pax6. The shaded bars indicate Pax6-specific amino acids. Percentages of sequence identity (%I), determined by comparison with *Homo sapiens* and *Mus musculus* Pax6, are indicated at the end of each line. The structure of paired domain and homeodomain are shown on the top in B and C, respectively. Identical amino acids are indicated by dots. The incomplete sequence of GtPax6A is indicated by a dashed line. Non conserved amino acid residues are indicated in bold. The homeodomain flanking regions are shown in C.

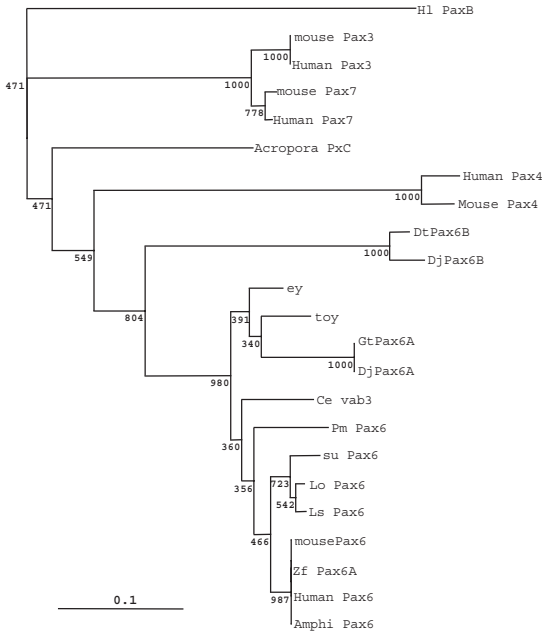


Fig. 2. Phylogenetic tree of Pax genes. The tree was derived from the homeodomain and flanking regions of representatives from different Pax classes (indicated on the right), using the Neighbor-joining method. Sequences reported in this paper are in bold. Bootstrap percentage values (1000 replicates) are shown over the corresponding nodes. All branch lengths are proportional to the distances between sequences. The tree was rooted using *Hydra PaxB* as an outgroup. The analysis includes: human Pax 3, 4, 6 (Aniridia) and 7; mouse Pax3, 4, 6 and 7; zebrafish Pax6; sea urchin suPax6; chordate PmPax6 and Amphi-Pax6; mollusc Lo-Pax6; *Drosophila ey* and *toy*; *C. elegans* Cevab-3; nemertine LsPax6; planarian GtPax6A and GtPax6B, DjPax6A and DjPax6B; and cnidarian PaxC and Hl PaxB.

(MYDKLSLLSQG). A similar arrangement of amino acids has not been found in Pax6B.

The evolutionary relationships between the planarian Pax6A and Pax6B and Pax proteins of other organisms were inferred from the homeodomain and their flanking regions (Fig. 2). We can observe the closest similarity to Pax6 protostome representatives, clustering the planarian Pax6A with *Drosophila ey* and *toy*, although with low bootstrap values. Pax6B shows the lowest similarity and is at the base of the Pax6 cluster. Such results indicate that Pax6A and Pax6B are *bona fide* Pax6 members.

Expression pattern of Pax6A and Pax6B in intact planarians

The expression pattern of Pax6A and Pax6B was analyzed by whole-mount in situ hybridization in intact adult specimens of both species. The presence of Pax6A transcripts was observed in the cephalic ganglia and in the nerve cords that cross the entire organism ventrally. (Fig. 3A-G). Pax6B showed a similar

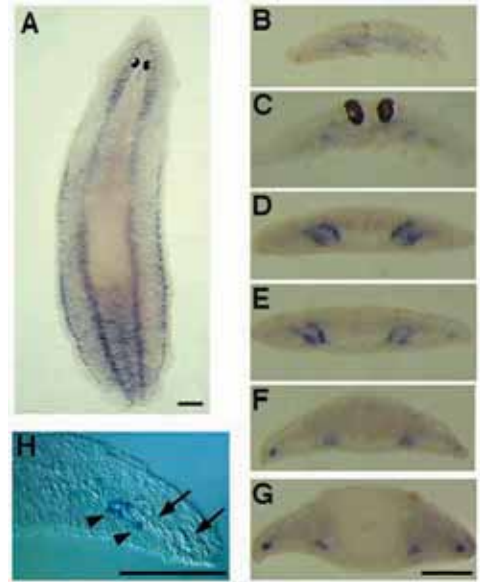


Fig. 3. Expression of Pax6A mRNA in an intact planarian, as detected by whole-mount in situ hybridization. (A) Dorsal view of *GtPax6A* expression in *G. tigrina*. (B-G) Anteroposterior sequence of some representative transverse cryosections of whole-mount depicted in A. *GtPax6A* is expressed in the cephalic ganglia and the nerve cords. Presence of *GtPax6A* transcripts can also be observed in the lateroventral region, close to the dorsoventral border. (H) Nomarski view of a higher magnification of a transverse cryosection of the whole-mount in A, showing the localization of *GtPax6A*-labelled cells (arrowheads) in the lateroventral marginal region, close to the eosinophilic secretory cells (arrows). Scale bars: 0.5 mm.

pattern, albeit with a lower level of expression (data not shown). In *G. tigrina*, the presence of additional *GtPax6A* transcripts was also detected in a non-cephalic parenchyma region close to the eosinophilic secretory cells, which give rise to the ventral marginal adhesive zone (Fig. 3A,F-H). This latter expression pattern suggests that *GtPax6A* has a derived role in the formation of this zone, an observation that deserves further investigation.

To investigate in detail the distribution of Pax6-expressing cells in the planarian CNS, we performed in situ hybridization directly on paraffin wax-embedded sections of intact *D. japonica* specimens (Fig. 4). The complete set of nerve cells at corresponding section levels was identified by the expression of the planarian neural marker synaptotagmin, *Djsyt* (Fig. 4C-H). Expression of *DjPax6A* was detected in a subset of cells of the CNS, but Pax6 transcripts were not detected in the eye cells using this procedure (Fig. 4I-P). Conversely, electron microscope in situ hybridization showed expression of both *DjPax6A* and *DjPax6B* in the perikaryon, the dendrites and the

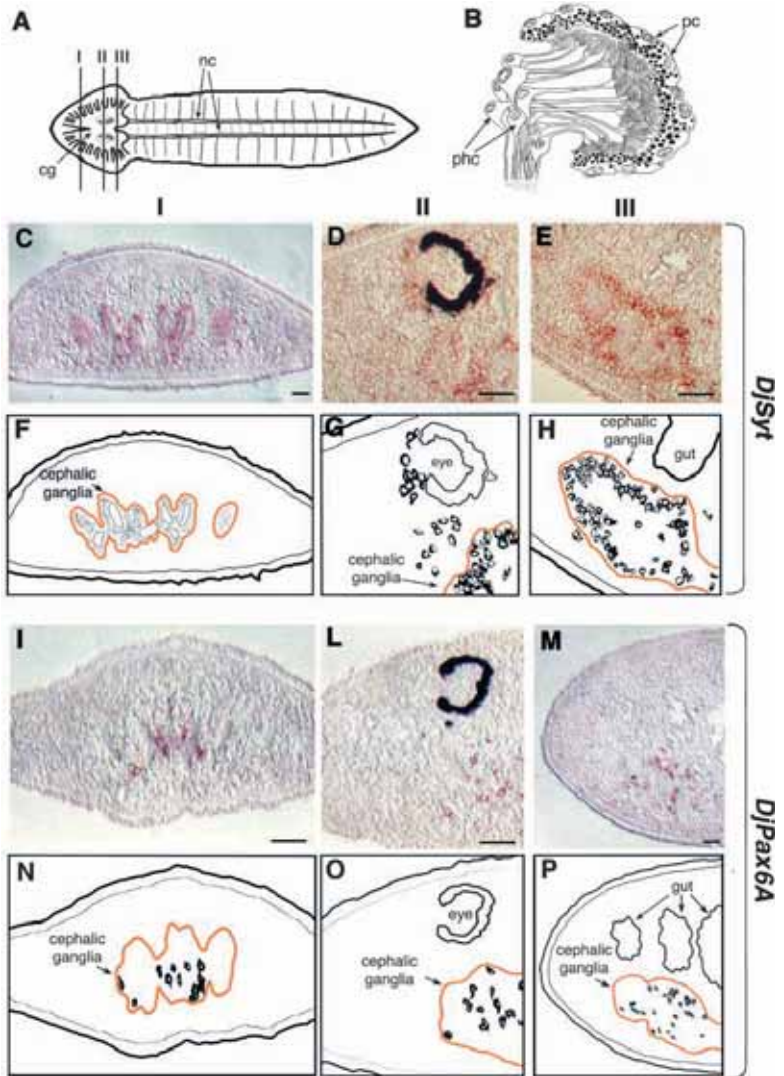


Fig. 4. In situ hybridization and camera lucida drawings of transverse paraffin sections from the cephalic region of *D. japonica*. (A) The CNS in an intact planarian, which is composed of a mass of nerve cells, the cephalic ganglia (cg) and a pair of ventral nerve cords (nc). I, II and III indicate paraffin section levels. (B) The planarian eye. pc, pigment cell; phc, photoreceptor cell. (C-E) Anteroposterior sequence of transverse paraffin sections, visualized after in situ hybridization with *Djsyt*. (F-H) Camera lucida drawings of sections in C-E, illustrating the various morphological structures. (I-M) Anteroposterior sequence of transverse paraffin sections, visualized after in situ hybridization with *DjPax6A*. (N-P) Camera lucida drawings of sections in I-M, illustrating the various morphological structures. The nerve cell marker *Djsyt* labels all nerve cells, including the photoreceptors, while *DjPax6A* is expressed only in a subset of nerve cells. No detectable *DjPax6A* expression is observed in visual cells. Scale bars: 0.05 mm.

rhabdomeric region of the photoreceptor cells (Fig. 5A-C). We also observed expression in the perinuclear cytoplasm of pigment cells (Fig. 5D). Positive controls with the ribosomal 18S riboprobe *Dj18S* showed that both the nucleolus and the endoplasmic reticulum of the cells were labeled (Fig. 5E). In addition, the *Dj18S* hybridization signal was seen in the rhabdomeric projections of photoreceptor cells, thus supporting the possibility of translational activity in this region (Fig. 5G). Transcripts from the planarian synaptotagmin, *Djsyt*, were specifically detected in the perikaryon of nerve cells (Fig. 5H). No signal was observed with *DjPax6A* or

DjPax6B sense-strand probes (Fig. 5F), or with RNase treatment followed by hybridization using *DjPax6A* and *DjPax6B* antisense-strand probes.

Expression pattern of Pax6A and Pax6B during regeneration

Planarians have a great regenerative plasticity. After experimental decapitation, a complete head including brain and eyespots is formed during anterior or cephalic regeneration. We examined the expression pattern of the planarian Pax6-related genes during regeneration by whole-mount in situ

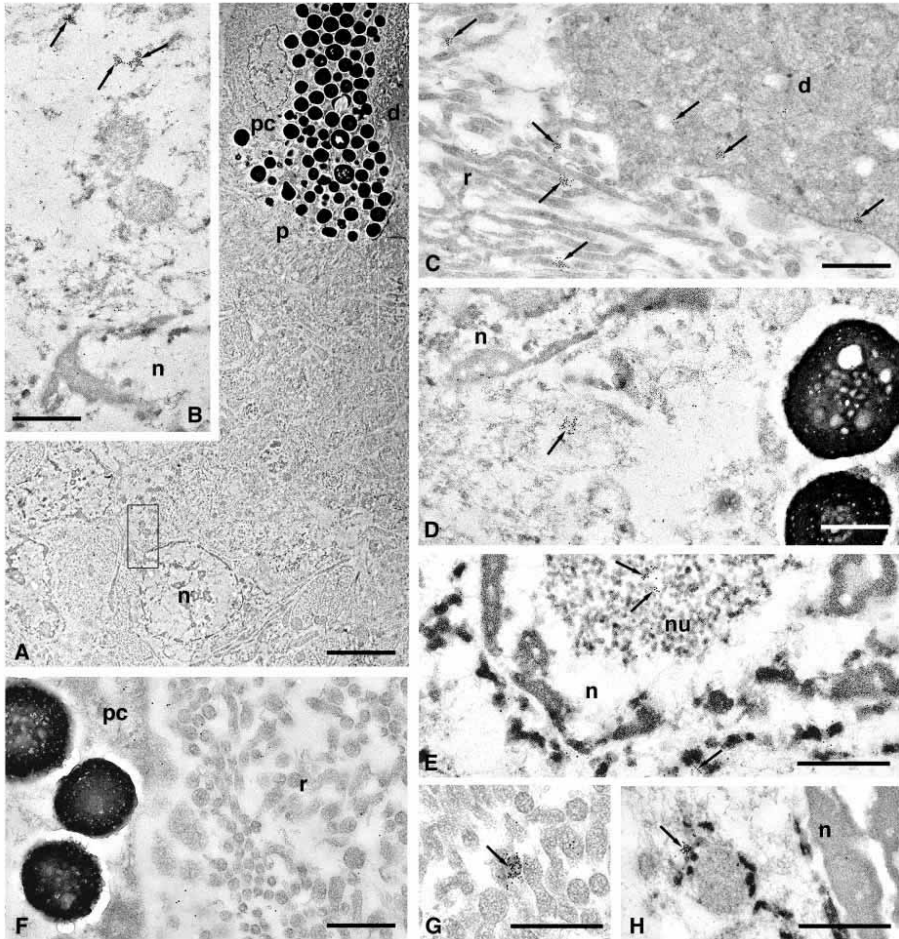


Fig. 5. TEM in situ hybridization on *D. japonica*. (A-D) *DjPax6A* antisense-strand RNA; (F) *DjPax6A* sense-strand RNA; (E,G) *Dj18S* antisense-strand RNA; (H) *DjSyt* antisense-strand RNA. (A) Low magnification of the pigment cup ocellus showing some nuclei of photosensitive cells. The box indicates the figure shown in B. (B) Enlargement of A with clusters of gold particles (arrows) on the cytoplasm. (C) Clusters of gold particles (arrows) on the dendrite and the rhabdomeric region of a photosensitive cell. (D) A cluster of gold particles on the perinuclear cytoplasm of a pigment cell. (E) Clusters of gold particles (arrows) on the nucleolus and the endoplasmic reticulum of a cell. (F) No cluster of gold particles is visible on the cytoplasm of a pigment cell or in the rhabdomeric region of a photoreceptor cell. (G) A large cluster of gold particles (arrows) on the rhabdomeric region of a photoreceptor cell. (H) A cluster of gold particles (arrow) on the perikaryon of a photoreceptor cell. d, dendritic region of the photosensitive cell; n, nucleus; nu, nucleolus; p, pigment cup; pc, pigment cell; r, rhabdomeres. Scale bars: 5 μm in A; 0.5 μm in B-H).

hybridization. After 1-2 days, regenerating animals showed two intense spots of *Pax6A* expression near the region where new fibers emerge from the amputated old nerve cords (Fig. 6A). After 3-6 days of regeneration, the hybridization signal was localized in an arch-shaped structure of the blastema, where neoblasts fated to become nerve cells intermingle with the bent fibers to regenerate the cephalic ganglia (Fig. 6B,C). The arch-shaped expression pattern was particularly clear in *G.*

tigrina, probably owing to morphological differences in the ganglia of the two species. At later stages of regeneration – from 3 to 15 days – we observed a gradual spreading of the *Pax6A*-positive tissue consequent to the growth of the cephalic ganglia (Fig. 6D-F). After that, the expression decreased to the basal level observed in the adult CNS (Fig. 3). In posterior regeneration a slight increase of *Pax6A* transcripts was observed in the region where the new nerve cords would

differentiate from the edge of the old-sectioned nerve cords (Fig. 6G). Finally, after sagittal amputation, we observed *Pax6A* expression during lateral regeneration of the missing cephalic ganglion and nerve cord. Increased *Pax6A* expression was detected in the regenerating CNS area (Fig. 6H). This differential expression gradually decreased to the basal level as regeneration proceeded in a similar way to that observed during anterior regeneration (Fig. 6I). Owing to the weak *Pax6B* expression, almost undetectable under the experimental conditions used, there was no perceptible difference with *Pax6A* transcript distribution during regeneration.

Reduction of the levels of endogenous *Pax6A* and *Pax6B* by RNA interference (RNAi)

As both planarian *Pax6* genes are expressed in the CNS and eye cells, we aimed to determine the function of *Pax6* in the maintenance or the regeneration pattern of CNS and eye. Consequently, we injected *Pax6A* and *Pax6B* dsRNA into the postblastema region in regenerating *D. japonica* and *G. tigrina*, as well as in the head region of intact animals. An equimolar mixture of dsRNA of *Pax6A/Pax6B* was also injected in another experiment, in order to prevent a possible gene redundancy effect. Injected adults did not reveal any gross morphological or behavioral abnormalities in any condition, and regeneration of the eyespots was also observed during cephalic blastema formation. Inspection of the photoreceptor cells by TEM showed a normal rhabdomeric organization of these structures. We also compared the number of photoreceptors in the eye of dsRNA-injected animals and water-injected controls of both species, after 15 days of regeneration. We counted about 15-20 cells in transverse adjacent sections at the eye level, hybridized with the photoreceptor-specific molecular marker opsin (*Djops* and *Gtops* clones), and also stained with DAPI to facilitate the quantification of photoreceptor cells. Although the number of photoreceptors depends on the species, planarian size and light exposition average, we did not detect any significant difference in the number of these cells between dsRNA-injected planarians and controls (Fig. 7A,B).

To assay for the reduction effects of dsRNA on the cognate mRNA, the level of *Pax6A* and *Pax6B* transcripts in injected animals was analyzed by comparative RT-PCR and whole-mount in situ hybridization. Total RNA was extracted from planarians injected with *Pax6A* and *Pax6B* dsRNA, as well as from animals injected with dsRNA *Pax6A/Pax6B* mixture. In both species, RT-PCR analysis showed a strong reduction in the level of expression of the corresponding endogenous mRNA, when compared with β -Gal- or water-injected controls (Fig. 8A). A similar strong reduction of endogenous RNA was observed after RNAi experiments with *Gtops* (Fig. 8A) and *Gsix-1* genes (data not shown), which produce a loss-of-function phenotype (Pineda et al., 2000; Pineda et al., 2001).

Whole-mount in situ hybridization did not reveal *GtPax6A* mRNA in animals injected with dsRNA *Pax6A* or *Pax6A/Pax6B* mixture (Fig. 8D,E). By contrast, water- or β -Gal-injected head-regenerating fragments showed the typical pattern of *GtPax6A* mRNA expression (Fig. 6; Fig. 8B,C).

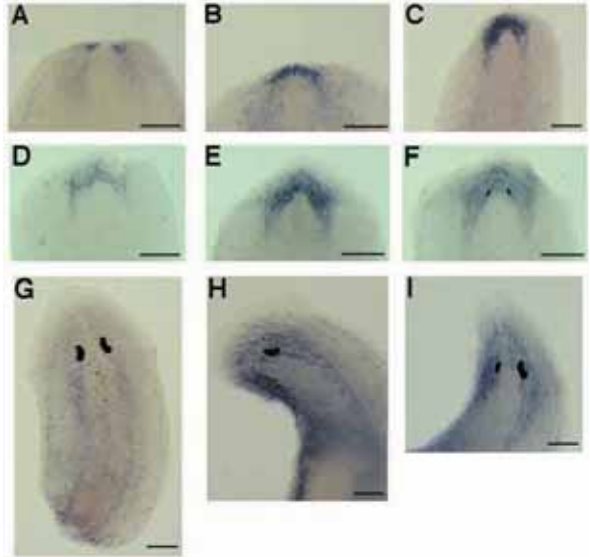


Fig. 6. Expression of *GtPax6A* mRNA in regenerating *G. tigrina*, as detected by whole-mount in situ hybridization. (A-F) Dorsal view of fragments regenerating a head. Anterior is towards the top. (A) Activation of *GtPax6A* after 2 days of regeneration is detected as two hybridization spots located in the region close to the sectioned old nerve cords, where new cephalic ganglia are forming. (B) After 3 days of regeneration, *GtPax6A*-positive spots merge and follow the fibers emerging from the old nerve cords. (C-F) After 6, 8, 11 and 15 days of regeneration, *GtPax6A* expression becomes broader and follows the regenerating cephalic ganglia. (G) Dorsal view of a posterior regeneration. Six days after cutting, two labeling spots in the area corresponding to the regenerating nerve cords are observed. (H,I) Dorsal view of a lateral regeneration. An increased level of *GtPax6A* expression is observed where a cephalic ganglion is regenerating. A basal expression is detected in the corresponding non-regenerating ganglion. Scale bars: 0.5 mm.

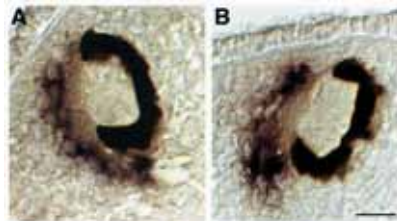


Fig. 7. Expression of *Djops* in regenerating *D. japonica* after injection with *Pax6A/Pax6B* dsRNA mixture, visualized by in situ hybridization on transverse paraffin sections at the eye level. (A,B) Nomarski images of *Djops*-expressing photoreceptors in a dsRNA-injected animal (A) and in a water-injected control (B), after 15 days of regeneration. Scale bar: 0.015 mm.

These results demonstrate that RNAi interferes with the normal accumulation of endogenous transcripts of both *Pax6* genes in planarians. However, this elimination does not produce

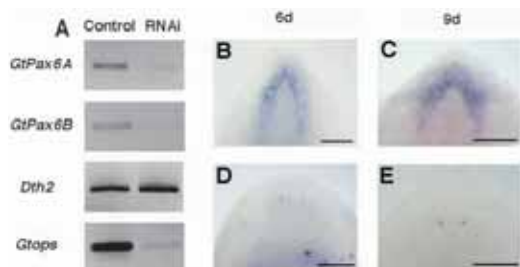


Fig. 8. Effects of *GtPax6A* and *GtPax6B* dsRNA injection in regenerating *G. tigrina*. (A) Visualization of comparative RT-PCR experiments. Relative levels of endogenous transcripts in water-injected controls and in *GtPax6A*, *GtPax6B* dsRNA-injected animals are shown. Reduction of the *Gtops* mRNA level after *Gtops* dsRNA injection is shown as a comparison. Expression of the homeobox gene *Dth2* is unaffected by *GtPax6A* and *GtPax6B* RNAi experiments. (B-E) Dorsal view of regenerating heads visualized by *GtPax6A* whole-mount in situ hybridization. (B-C) Control animals injected with water. The typical arch-shaped *GtPax6A* expression is observed in cephalic regeneration after 6 (B) or 9 (C) days from cutting. (D,E) After injection with *GtPax6A/GtPax6B* dsRNA mixture, no *GtPax6A* hybridization signal is detected in regenerating animals after 6 (D) and 9 (E) days from cutting. Regenerating eyespots can be observed both in the controls and in planarians injected with *GtPax6A/GtPax6B* dsRNA mixture. Scale bars: 0.5 mm.

morphological defects in the planarian eye phenotype. No gross neuroanatomical alterations were observed during cephalic ganglia regeneration by immunohistochemical staining with a general nerve cell marker, the anti-FMRFamide neuropeptide (Fig. 9A-F). However, the lack of specific neuronal cell markers prevented us from detecting neuronal cell fate changes due to the Pax6 loss of function.

To determine the possible effects of exogenous *Pax6A* and *Pax6B* dsRNA on the activation of other genes expressed in the planarian eye, we performed whole-mount in situ hybridization on injected animals using *Gtsix-1* and *Gtops* (Pineda et al., 2000; Pineda et al., 2001) as probes. No appreciable delay or reduction in the level of *Gtsix-1* mRNA expression was observed in the cephalic blastema during eye determination or differentiation, with respect to water-injected animals (Fig. 10A-F). Similar experiments performed with the planarian opsin gene *Gtops* again did not reveal any spatio-temporal change of the expression level during eye regeneration (Fig. 10G-I).

DISCUSSION

Planarians have two *Pax6* genes

We report that the genome of two planarian species belonging to different genera (*D. japonica* and *G. tigrina*) has two genes, *Pax6A* and *Pax6B*, that encode distinct paired domain- and homeodomain-containing proteins. The DNA-binding domain sequence analysis of both *Pax6A* and *Pax6B* unambiguously identifies them as members of the Pax6 family. While *Pax6A* appears more closely related to Pax6 proteins of other organisms, *Pax6B* can be considered the most diverged Pax6

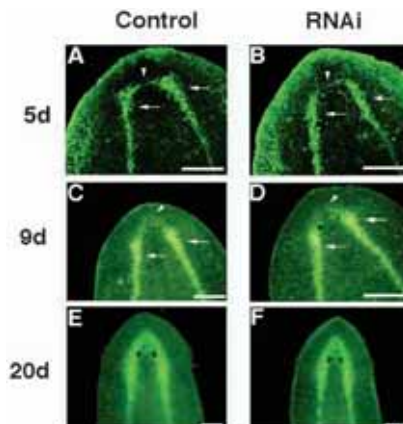


Fig. 9. Dorsal view of cephalic ganglia regeneration in *G. tigrina* after injection of *GtPax6A/GtPax6B* dsRNA mixture, visualized by whole-mount neuropeptide FMRFamide immunoreactivity pattern at different regenerative stages. (A,C) After 5 (A) and 9 days (C) of regeneration, new transversal commissures produced from the amputated old nerve cords and differentiating the proximal cephalic ganglia (arrows) can be observed in water-injected controls. The distal part of the new cephalic ganglia is organizing an arch-shaped structure that connects the nerve cords (arrowhead). (B,D) No abnormal cephalic ganglia regeneration is apparent in corresponding head-regenerating fragments subsequent to injection of *GtPax6A/GtPax6B* dsRNA mixture. Regenerating eyes appear as small black spots of similar size in both C and D. (E,F) After 20 days from cutting, a complete regeneration of the cephalic ganglia can be observed. No differences in the CNS pattern can be seen between a water-injected control (E) and an dsRNA-injected planarian (F). Scale bars: 0.5 mm.

characterized so far (Callaerts et al., 1997; Callaerts et al., 1999). In fact it shares only 77-78% identity in the paired domain and 74% identity in the homeodomain of the vertebrate/mammalian Pax6 sequence, while in *Pax6A* the identities are 88% and 85%, respectively. *Pax6A* also possesses a conserved Pax6-specific motif of eleven amino acids (Loosli et al., 1996) in the linker region that is not present in *Pax6B*. With the exception of the *Pax6* homologs *ey* and *toy*, which are found in *Drosophila* and other holometabolous insects (Czerny et al., 1999), and a *Pax6* duplication reported in zebrafish by Nornes et al. (Nornes et al., 1998), no duplicated *pax6* genes have been described in other organisms so far. The phylogenetic analysis of the homeodomain and flanking regions with representative *Pax* genes supports a weak but closer clustering of planarian *Pax6A* to the duplicated *Drosophila ey* and *toy*, compared with the Lophotrochozoa clade representatives such as the nemertine *LsPax6* or the mollusc *LoPax6*. Such weak clustering could be produced by a long branch attraction effect between *Drosophila* and planarians. According to its structural divergence, *Pax6B* is located outside the main Pax6 clustering in the tree. Although the amino acids that determine DNA-binding specificity are well conserved in *Pax6B*, half (nine out of 18) of the invariant residues present in the paired and homeodomain are not

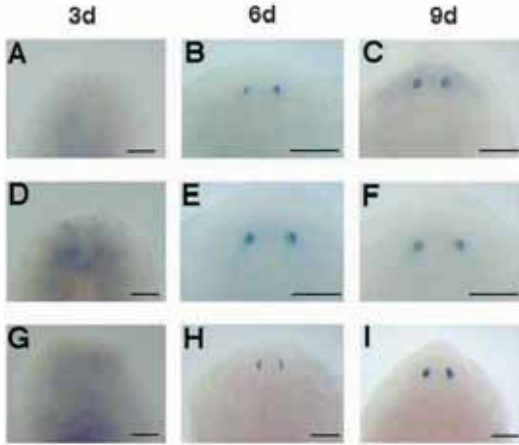


Fig. 10. Expression of *GtSix-1* and *GtOps* in regenerating *G. tigrina* after injection with *Pax6A/Pax6B* dsRNA mixture, visualized by whole-mount in situ hybridization. Dorsal view of head regenerating fragments after 3, 6 and 9 days from cutting. (A-C) Water-injected controls hybridized with *GtSix-1*. (D-F) *GtPax6A/GtPax6B* dsRNA mixture-injected organisms hybridized with *GtSix-1*. (G-I) *GtPax6A/GtPax6B* dsRNA mixture-injected organisms hybridized with *GtOps*. (A,D) A faint *GtSix-1* hybridization signal is visible after 3 days of regeneration both in the controls and in injected animals. Later on, *GtSix-1* mRNA is clearly visualized at the eye level. No differences are detected between controls (B,C) and injected animals (E,F). (G-I) A normal expression pattern of *GtOps* mRNA can also be detected in animals injected with *GtPax6A/GtPax6B* dsRNA. Scale bars: 0.5 mm.

conserved, thus representing a notable exception to the notion that Pax6 is a highly conserved transcription factor. Ectopic expression of this gene in *Drosophila* fails to produce eyes (Callaerts et al., 1999). From an evolutionary point of view, we can hypothesize that gene duplication produced two *Pax6* paralogs in a triclad or platyhelminth ancestor. After that, the two genes evolved with different selective pressures, probably resulting from different functional constraints. Nowadays Pax6A would conserve most of the structural characteristics of the ancestral Pax6, and consequently, higher similarity to Pax6 proteins of other organisms. In evolutionary times, mutations accumulating in the duplicated gene generated the structural differences present in Pax6B.

***Pax6A* and *Pax6B* are expressed in intact planarians and activated during regeneration**

Both *Pax6* planarian genes are expressed in the CNS of adult organisms, *Pax6A* being more strongly expressed than *Pax6B*. The presence of *Pax6B* transcripts along the anteroposterior planarian axis, which was barely detected by in situ hybridization, was confirmed by RT-PCR experiments (Callaerts et al., 1999). Both genes are expressed in a subset of cells located along the entire CNS. The time course of *Pax6A* expression in cephalic regeneration clearly demonstrated activation of this gene during cephalic ganglia formation. Similarly, increased production of *Pax6B* transcripts during

regeneration was demonstrated in *G. tigrina* (Callaerts et al., 1999). Regeneration of the new cephalic ganglia requires the presence of the old nerve cords. This process has been followed by immunoreactivity to the molluscan cardioactive peptide (FMRFamide). New neural fibers emerge very early from the sectioned old nerve cords and reach the blastema, then bend transversally and fuse, producing a commissure, where cephalic ganglia will differentiate (Reuter et al., 1996) (Fig. 9A). Early activation of *Pax6* at the level of cells located near the old nerve cords that reach the blastema suggests pivotal functions of these genes in the formation of neural structures in these organisms. A role for *Drosophila ey* in axon pathway selection during embryogenesis has recently been proposed by Noveen et al. (Noveen et al., 2000). In addition, it has been reported that severe defects in adult brain structures that are essential for vision, olfaction and the coordination of locomotion, are detectable in *eyeless* mutant *Drosophila* (Callaerts et al., 2001). As planarians are considered to be close relatives of primitive animals that acquired the CNS, further study of the role of *Pax6* genes during CNS regeneration will be of interest for understanding the evolution of the genetic program which triggers brain formation in higher organisms.

Owing to the low expression level, *Pax6A* and *Pax6B* transcripts were not detected in the eye cells in either intact or regenerating planarians by conventional in situ hybridization on paraffin sections with digoxigenin-labeled riboprobes. However, *DtPax6B* expression in the eye cells was detected with a more sensitive in situ hybridization method using radioactive riboprobes (Callaerts et al., 1999). TEM in situ hybridization also revealed *Pax6A* and *Pax6B* mRNA in eye cells (Fig. 5) (Callaerts et al., 1999). These transcripts were distributed both in pigment eye cells and in different subcellular compartments of photoreceptors, i.e. throughout the perikaryon, and in the rhabdomeres. The presence of Pax6 transcripts has recently been monitored by competitive RT-PCR in adult human lens epithelium, cornea and monkey retina (Zhang et al., 2001). Moreover, Pax6 expression persists in amacrine and ganglion cells of the mature retina (Ashery-Padan and Gruss 2001; Marquardt et al., 2001). On the whole, these results support a role of Pax6 in the maintenance of eye cells.

Reduction of *Pax6A* and *Pax6B* endogenous transcripts by RNAi indicates that both genes are functionally dispensable in eye regeneration

In many organisms, the *Pax6* transcription factor is critical for eye formation, as well as in patterning the CNS (Quiring et al., 1994; Kurusu et al., 2000; Pratt et al., 2000). As the basic functioning of the eyes in capturing photons and transmitting the information to the brain is similar in all animals, the presence of *Pax6* transcripts in light-sensitive cells and pigment cells of planarian eye strongly suggested a conserved role of both *Pax6* genes in this structure. *Pax6* is considered very ancient and it has been indicated that the ancestral role of this gene was to construct a light-sensitive unit by direct regulation of opsin expression (Sheng et al., 1997; Pichaud et al., 2001). The primitive eye of basal metazoans such as planarians is the most suitable model system for studying *Pax6* ancient function(s) in visual structures (Gehring and Ikeo, 1999).

The use of dsRNA to disrupt gene expression is a powerful method of achieving RNA interference in planarians (Sanchéz-

Alvarado and Newmark, 1999). Thus, complete loss of eye has been obtained after *Gtsix-1* dsRNA injection in planarians regenerating a head (Pineda et al., 2000). Moreover RNAi-mediated depletion of opsin mRNA also leads to the loss of phototactic behavior in these animals (Pineda et al., 2001).

Our experiments using dsRNA synthesized by *Pax6A* and *Pax6B* provide strong evidence that RNAi acts by decreasing endogenous cognate mRNA levels. The reduction of these gene products was comparable with that obtained for the corresponding RNAs in *Gtsix-1* or *Gtops* RNAi experiments, which give rise to abnormal eye phenotypes. Despite the drastic RNAi-induced reduction in *Pax6A* and *Pax6B* transcripts, we did not observe any gross morphological alterations of the CNS in intact planarians or during regeneration. Moreover, eyes formed without any sign of defects during head regeneration and contained several photoreceptors comparable with those found in the eye of water-injected controls. A simple interpretation of these results is that the genetic network that controls eye formation in planarians is not triggered by *Pax6* genes. The low level of Pax6 expression in the eye cells opens an alternative hypothesis, that both planarian *Pax6* genes control eye cell fate decisions by a dose-independent mechanism, insensitive to the RNAi-induced transcript reduction. We favor the former possibility, as gene dose appears to be a fundamental requirement for the activity of Pax transcription factors. *Pax6* being one of the best documented examples (Schedl et al., 1996; Van Raamsdonk and Tilghman, 2000). An exhaustive search for other *Pax6* did not yield any additional *Pax6* gene in either planarian species, making an eye-specific Pax6 highly improbable. If *Pax6A* and *Pax6B* genes are not crucial for eye induction during regeneration in planarians, we can speculate that other genes play a related role and substitute or compensate *Pax6* action in the regulatory eye network. In this respect, the planarian *Gtsix-1* gene, which is essential for eye regeneration (Pineda et al., 2000), could represent a putative candidate. The finding that *Pax6* is not expressed during ganglionic photoreceptors (Joseph cells and organs of Hesse) development in *Amphioxus* (Glaridon et al., 1998), the demonstration that Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice (Zhang et al., 2000), and our data on a Pax6-independent eye regeneration process in two species of planarians support the hypothesis that more than one molecular pathway can generate functional visual cells. Moreover, the recent hypothesis that other factors acting in parallel to Pax6 during retinal development can compensate Pax6 function (Ashery-Padan and Gruss, 2001) supports the possibility that several alternative combinations could give rise to the same phenotypic structure. The selection of an alternative combination could be promoted by a peculiar developmental scenario, i.e. blastemal regeneration. In this context, the Pax6-independent eye regeneration can be considered a remarkable example of such flexibility. Further analysis of the role of Pax6 during planarian eye development could contribute to establishing similarities between the processes of eye development and eye regeneration.

We are grateful to M. Domínguez and F. Casares for helpful comments on the manuscript. We thank anonymous referees for their comments, which helped to improve the manuscript. We thank Dr Hidefumi Orii for providing us with *D. japonica* G1 clonal strain, and

with *Dj18S* and *DjEF2* clones, and also Robin Crycroft for checking the English. This work was supported by a grant from the DGICYT to E. S. (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, PB98-1261-C02-01), from MURST-Italy (Cofinanziamento Programmi di Ricerca di Interesse Nazionale) to R. B. D. P. and M. M. are the recipients of two 'Formación de Personal Investigador' fellowships from Universitat de Barcelona and from Ministerio de Educación y Ciencia, respectively.

REFERENCES

- Agata, K., Soejima, Y., Kato, K., Kobayashi, C., Umesono, Y. and Watanabe, K. (1998). Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. *Zool. Sci.* **15**, 433-440.
- Aguinaldo, A., Turbeville, J., Linford, L., Rivera, M., Garey, J., Raff, R. and Lake, J. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* **387**, 489-493.
- Ashery-Padan, R. and Gruss, P. (2001). Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 706-714.
- Baguñá, J. and Ballester, R. (1978). The nervous system in planarians: peripheral and gastroduodenal plexuses, pharynx innervation, and the relationship between central nervous system structure and the acelomate organization. *J. Morphol.* **155**, 237-252.
- Bayascas, J. R., Castillo, E. and Saló, E. (1998). Platyhelminthes have a Hox code differentially activated during regeneration, with genes closely related to those of spiralian protostomes. *Dev. Genes Evol.* **208**, 467-473.
- Callaerts, P., Halder, G. and Gehring, W. J. (1997). *Pax6* in development and evolution. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 483-532.
- Callaerts, P., Muñoz-Marmol, A. M., Gardon, S., Castillo, E., Sun, H., Li, W. H., Gehring, W. J. and Saló, E. (1999). Isolation and expression of a *Pax-6* gene in the regenerating and intact Planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 558-563.
- Callaerts, P., Leng, S., Clements, J., Benassayag, C., Cribbs, D., Kang, Y. Y., Walldorf, U., Fischbach, K. F. and Strauss, R. (2001). *Drosophila Pax-6/eyeless* is essential for normal adult brain structure and function. *J. Neurobiol.* **46**, 73-88.
- Carranza, S., Baguñá, J. and Riutort, M. (1997). Are the Platyhelminthes a Monophyletic Primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 485-497.
- Cebriá, F., Vispo, M., Newmark, P., Bueno, D. and Romero R. (1997). Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian *Girardia tigrina*. *Dev. Genes Evol.* **207**, 306-316.
- Chisholm, A. D. and Horvitz, H. R. (1995). Patterning of the *Caenorhabditis elegans* head region by the *Pax-6* family member *vab-3*. *Nature* **377**, 52-55.
- Chow, R. L., Altmann, C. R., Lang, R. A. and Hemmati-brivanlou, A. (1999). *Pax6* induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* **126**, 4213-4222.
- Czerny, T. and Busslinger, M. (1995). DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2858-2871.
- Czerny, T., Halder, G., Kloter, U., Souabni, A., Gehring, W. J., Busslinger, M. (1999). *twin of eyeless*, a second Pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of *eyeless* in the control of eye development. *Mol. Cell* **3**, 297-307.
- García-Fernández, J., Baguñá, J. and Saló, E. (1991). Planarian homeobox genes: cloning, sequence analysis and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7338-7342.
- García-Fernández, J., Baguñá, J. and Saló, E. (1993). Genomic organization and expression of the planarian homeobox genes *Dth-1* and *Dth-2*. *Development* **118**, 241-253.
- Gehring, W. J. and Ikeo, K. (1999). *Pax-6* mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* **15**, 371-377.
- Gardon, S., Callaerts, P., Halder, G. and Gehring, W. J. (1997). Conservation of *Pax-6* in a lower chordate, the ascidian *Phallusia mamillata*. *Development* **124**, 817-825.
- Gardon, S., Holland, L. Z., Gehring, W. J. and Holland, N. D. (1998). Isolation and developmental expression of the amphioxus *Pax-6* gene (*AmphiPax-6*): insights into eye and photoreceptor evolution. *Development* **125**, 2701-2710.
- Kishida, Y. (1967). Electron microscopic studies on the planarian eye. Fine structures of the normal eye. *Sci. Rep. Kanazawa Univ.* **12**, 75-110.

- Kobayashi, C., Watanabe, K. and Agata, K. (1998). The process of pharynx regeneration in planarians. *Dev. Biol.* **211**, 27-38.
- Kumar, J. P. and Moses, K. (2001). EGF receptor and Notch signaling act upstream of *Eyeless/Pax6* to control eye specification. *Cell* **104**, 687-697.
- Kurata, S., Go, M. J., Artavanis-Tsakonas, S. and Gehring, W. J. (2000). Notch signaling and the determination of appendage identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2117-2122.
- Kurusu, M., Nagao, T., Walldorf, U., Flister, S., Gehring, W. J. and Furukubo-Tokunaga, K. (2000). Genetic control of development of the mushroom bodies, the associative learning centers in the *Drosophila* brain, by the *eyeless*, *twins of eyeless*, and *dachshund* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2140-2144.
- Le Guellec, D., Frappart, L. and Desprez, P. Y. (1991). Ultrastructural localization of mRNA encoding for the receptor in human breast cell cancer line BT20 by in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 1-6.
- Loosli, F., Kmita-Cunisse, M. and Gehring, W. J. (1996). Isolation of a *Pax-6* homolog from the ribbonworm *Lineus sanguineus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2658-2663.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. and Gruss, P. (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **105**, 43-55.
- Nei, M. and Koehn, R. (1983). Evolution of genes and proteins. In *The Neutral Theory of Molecular Evolution* (ed. M. Nei and R. Koehn), pp. 208-233. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Normes, S., Clarkson, M., Mikkola, I., Pedersen, M., Bardsley, A., Martínez, J. T., Krauss, S. and Johansen, T. (1998). Zebrafish contains two *pax6* genes involved in eye development. *Mech. Dev.* **77**, 185-196.
- Noveen, A., Daniel, A. and Hartenstein, V. (2000). Early development of the *Drosophila* mushroom body: the roles of *eyeless* and *dachshund*. *Development* **127**, 3475-3488.
- Orii, H., Agata, K. and Watanabe, K. (1993). POU-domain genes in planarian *Dugesia japonica*: the structure and expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 1395-1402.
- Pichaud, F., Treisman, J. and Desplan, C. (2001). Reinventing a common strategy for patterning the eye. *Cell* **105**, 9-12.
- Pineda, D., Gonzalez, J., Callaerts, P., Ikeo, K., Gehring, W. J. and Saló, E. (2000). Searching for the prototypic eye genetic network: *sine oculis* is essential for eye regeneration in planarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4525-4529.
- Pineda, D., Gonzalez, J., Marsal, M. and Saló, E. (2001). Evolutionary conservation of the initial eye genetic pathway in planarians. *Belg. J. Zool.* **131**, 85-90.
- Pratt, T., Vitalis, T., Warren, N., Edgar, J. M., Mason, J. O. and Price, D. J. (2000). A role of *Pax6* in the normal development of dorsal thalamus and its cortical connections. *Development* **127**, 5167-5178.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. and Gehring, W. J. (1994). Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science* **265**, 785-789.
- Reuter, M., Sheiman, I. M., Gustafsson, M. K. S., Halton, D. W., Maule, A. G. and Shaw, C. (1996). Development of the nervous system in *Dugesia tigrina* during regeneration after fission and decapitation. *Invert. Reprod. Dev.* **29**, 199-211.
- Rieger, R., Tyler, M. S., Smith III, J. P. S. and Rieger, G. R. (1991). Platyhelminthes: Turbellaria. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (ed. F. W. Harrison and B. J. Bogitsch), pp. 7-140. New York: Wiley-Liss.
- Rossi, L., Batistoni, R., Salvetti, A., Deri, P., Bernini, F., Andreoli, I., Falleni, A. and Gremigni, V. (2001). Molecular aspects of cell proliferation and neurogenesis in planarians. *Belg. J. Zool.* **131**, 5-9.
- Sakai, F., Agata, K., Orii, H. and Watanabe, K. (2000). Organization and regeneration ability of spontaneous supernumerary eyes in planarians - eye regeneration field and pathway selection by optic nerves. *Zool. Sci.* **17**, 375-381.
- Saló, E. and Baguña, J. (1984). Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **83**, 63-80.
- Salvetti, A., Batistoni, R., Deri, P., Rossi, L. and Sommerville, J. (1998). Expression of DjY1, a protein containing a cold shock domain and RG repeat motifs, is targeted to sites of regeneration in planarians. *Dev. Biol.* **201**, 217-229.
- Sánchez-Alvarado, A. and Newmark, P. A. (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5049-5054.
- Schedl, A., Ross, A., Lee, M., Engelkamp, D., Rashbass, P., Van Heyningen, V. and Hastie, N. (1996). Influence of *Pax6* gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* **86**, 71-82.
- Sheng, G., Thouvenot, E., Schmucker, D., Wilson, D. S. and Desplan, C. (1997). Direct regulation of *rhodopsin 1* by *Pax6/eyeless* in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes Dev.* **11**, 1122-1131.
- Tazaki, A., Gaudieri, S., Ikeo, K., Gojobori, T., Watanabe, K. and Agata, K. (1999). Neural network in planarian revealed by an antibody against planarian synaptotagmin homologue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 426-432.
- Tomarev, S. I., Callaerts, P., Kos, L., Zinovieva, R., Halder, G., Gehring, W. J. and Piatigorsky, J. (1997). Squid *Pax-6* and eye development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2421-2426.
- Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carriere, C. and Saule, S. (1994). *Pax-QNR/Pax6*, a paired box and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol. Endocrinol.* **8**, 929-938.
- Van Raamsdonk, C. D. and Tilghman, S. M. (2000). Dosage requirement and allelic expression of *Pax6* during lens placode formation. *Development* **127**, 5439-5448.
- Walther, P. and Gruss, P. (1991). *Pax6*, a murine *paired-box* gene is expressed in the developing CNS. *Development* **113**, 1435-1449.
- Zhang, Y. and Emmons, S. W. (1995). Specification of sense-organ identity by a *Caenorhabditis elegans Pax-6* homologue. *Nature* **377**, 55-59.
- Zhang, L., Mathers, P. H. and Jamrich, M. (2000). Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genesis* **28**, 135-142.
- Zhang, W., Cveklova, K., Oppermann, B., Kantorow, M. and Cvekl, A. (2001). Quantitation of Pax6 and Pax6(5a) transcript levels in adult human lens, cornea, and monkey retina. *Mol. Vis.* **7**, 1-5.

4. EL GEN *GTSIX3* S'EXPRESSA A LES BRANQUES CEFÀLIQUES I NO A LES CÈL·LULES DELS ULLS.

Article 4:

Pineda, D., Saló, E. (2002). Planarian *Gtsix3*, a member of the *Six/so* gene family, is expressed in brain branches but not in eye cells. *Mech Dev.* 2002 Dec;119 Suppl 1:S167-71.

En aquest últim treball es presenta la identificació i caracterització d'un segon gen de la família *Six/sineoculis*, el gen *Gtsix3*. Aquest gen pertany a la subfamília *Six 3/6*.

Els gens de la subfamília *Six3/6* tenen un important paper en la morfogènesi dels ulls a vertebrats. I l'homòleg del gen *Six3* de *Drosophila*, el gen *Dsix3/optix*, té la capacitat de generar ulls ectòpics a *Drosophila* quan s'expressa ectòpicament i a través d'un mecanisme independent a *Pax6* (Seimiya, 2000).

RESUM:

Per tal d'esbrinar quin es el paper del gen *Gtsix3* a platihelminths vam estudiar-ne la seva expressió. Es va començar analitzant l'expressió del gen *Gtsix3* en organismes adults per hibridació *in situ whole-mount*. *Gtsix3* s'expressava a les branques neuronals que surten dels ganglis cefàlics i que es dirigeixen a les parts més distals del cap.

El següent pas fou analitzar l'expressió de *Gtsix3* en organismes decapitats i fer-ne el seguiment durant la regeneració anterior. Es començà a detectar l'expressió del gen *Gtsix3* a partir del 4t dia de regeneració en forma de dues taques, a la zona del blastema, prop d'on s'estaven generant els nous ganglis cefàlics. A partir dels 6 dies de regeneració aquesta expressió s'expandia continuadament en la regió anterior als nous ganglis cefàlics i s'anava separant lateralment cap a cada costat del cap. Als 15 dies s'assolia el patró d'expressió observat en els organismes intactes.

Era, així, un gen amb una expressió més tardana que l'observada en els gens *Gtpax6A* i *GtPax6B*. Tenint en compte els experiments d'Umesono i col·laboradors (1999) a *Dugesia japonica*, *Gtsix3* també s'expressava més tardanament que els gens *DjotxA* i *DjotxB*. I al comparar l'expressió de *Djotp* i *Gtsix3*, s'observà que ambdós compartien la localització de la seva expressió però *Gtsix3* s'expressava també més tard.

Finalment, en aquest treball es proposa un model que agrupa els diferents estadis de regeneració del cap amb una descripció espacial i temporal de l'expressió dels diferents gens coneguts (fins al moment d'aquest treball) i implicats en la morfogènesi del sistema nerviós central i dels ulls de planàries.

Planarian *Gtsix3*, a member of the Six/so gene family, is expressed in brain branches but not in eye cells

David Pineda, Emili Saló*

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, E-08071 Barcelona, Spain

Received 2 July 2002; received in revised form 23 August 2002; accepted 27 August 2002

Abstract

Six/sine oculis (Six/so) class genes, with representatives in vertebrates and invertebrates, include members with key developmental roles in the anterior part of the central nervous system (CNS) and eye. Having characterized the role of the first planarian gene of the Six/so family in eye development, we attempted to identify novel genes of this family related to the platyhelminth eye genetic network. We isolated a new Six/so gene in the planarian *Girardia tigrina*, *Gtsix-3*, which belongs to the Six3/6 class. Whole mount in situ hybridization revealed *Gtsix3* expression in a stripe surrounding the cephalic ganglia in adults. This spatial pattern corresponds to the cephalic branches, the nerve cells that connect the CNS with the marginal sensory organs located continuously at the edge of the head. During head regeneration, *Gtsix-3* shows delayed activation compared to other head genes, with an initial two spot pattern that later evolves to a continuous lateral expression in the new regenerated cephalic ganglia with a final reduction to the adult pattern. However, *Gtsix-3* is not activated in tail regeneration and no eye expression is observed at any regenerative stage. These findings provide a new marker for the developing anterior nervous system and evidence the complexity of planarian brain. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Platyhelminth; Regeneration; Six/so class; Homeobox gene; Nervous system

1. Results and discussion

The Six/so gene family was identified by homology to the *Drosophila sine oculis* gene, which is essential for compound eye formation (Cheyette, 1994; Serikaku and O'Tousa, 1994). The Six/so proteins are transcription factors characterized by the presence of two conserved regions, a Six domain (SD) (Oliver et al., 1995) and a Six-type homeodomain (HD), both of which are required for specific DNA binding (Kawakami et al., 1996). The SD of sine oculis shows cooperative interaction with Eya proteins (Pignoni et al., 1997). Three Six/so genes have been isolated in *Drosophila*, *so*, *D-six3 (optix)* and *D-six4*, each of which belongs to a distinct class of the Six/so gene family: Six 1/2, Six 3/6 and Six 4/5, respectively (Seo et al., 1999). These genes are expressed in restricted areas in the head, *Drosophila* mutants provide evidence for the key roles in the development of cephalic organs, and ectopic expression of *Dsix-3 (optix)* produces ectopic eyes independently of *eyeless* gene function in the *Drosophila* antenna disc (Seimiya and Gehring, 2000). *Caenorhabditis elegans* contains four genes of the Six/so class and *Ceh-32*, the Six3/

6 orthologue, is required for head morphogenesis (Dozier et al., 2001). In vertebrates, a large number of so-related genes have been identified that are also subdivided into the three Six/so classes like in invertebrates. The Six3/6 genes in vertebrates are also involved in development of the fore-brain and eye-related structures (Oliver et al., 1995; Bovolenta et al., 1998; Seo et al., 1998; Kawakami et al., 2000) and overexpression of Six-3 can induce ectopic lens and retina (Oliver et al., 1996; Loosli et al., 1999). In the planarian *Girardia tigrina* (Platyhelminthes, Tricladida), we previously identified the first Six/so gene, *Gtsix-1* (also *Gtso*). This gene belongs to the Six 1/2 class and is required for eye development during regeneration and maintenance in the adult (Pineda et al., 2000; Saló et al., 2002). Here, we isolated the planarian Six-3 homologous gene and characterized its expression pattern in intact and regenerating organisms.

1.1. A comparison of the planarian *Gtsix-3* sequence

A partial cDNA was obtained by a combination of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification using degenerate primers, and 5' RACE polymerase chain reaction (PCR). The resulting cDNA was 3' incomplete and encoded 264 amino acids with two regions of high

* Corresponding author. Tel.: +34-93-4021497; fax: +34-93-4110969.
E-mail address: esalo@bio.ub.es (E. Saló).

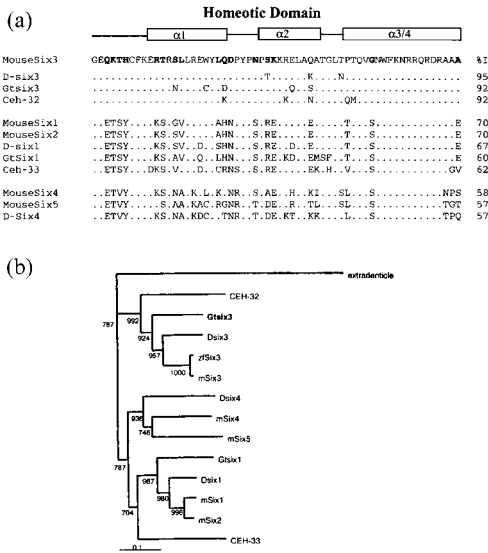


Fig. 1. HD amino acid comparison and phylogenetic relationship between representatives of the Six/so family genes. (A) Sequence alignment of HDs from the planarian Gtsix-3 and Gtsix-1 with several representatives of the three classes of the Six/so family genes. The Six-3 specific residues are shown in bold. Percentages of sequence identity (%I), measured by comparison with mouse Six-3, are indicated at the end of each line. (B) The 150 aa from the SD and HD were used as a basis for the phylogenetic analysis. *Drosophila* extradenticle, which have the closest sequence to Six class, was used as outgroup (Rauskolb et al., 1993). This tree was constructed using a neighbour joining tree, a distance matrix approach through the Clustal-X alignment interface, and displayed using neighbour joining Plot. Bootstrap values for 1000 runs are indicated at the nodes. Species: m, mouse; zf, zebrafish; (D) *Drosophila*; CEH, *C. elegans*; Gt, *Girardia tigrina*. Planarian Gtsix-1 and Gtsix-3 proteins are located at the class 1/2 and 3, respectively. Scale bar, genetic distance.

sequence conservation, the SD and the Six-type HD. Compared with the Six/so HD sequences of other species (Fig. 1A), Gtsix-3 showed the highest sequence identity to the Six 3/6 subgroup, and shared the consensus tetrapeptide (QKTH, Seo et al., 1999) and other residues scattered through the HD. The ascription of planarian Gtsix-3 to the Six3/6 branch of the family was confirmed by phylogenetic tree analysis using the sequences of the SD and HD domains of representative vertebrate and invertebrate genes (Fig. 1B).

1.2. Whole mount *in situ* hybridization

1.2.1. Intact adults

Gtsix3 expression in the adult planarian head is localized in a stripe surrounding the cephalic ganglia, from the auricles to the tip of the head (Fig. 2A). This localization corresponds to the distal part of the brain branches that connect the cephalic ganglia to the distinct sensors distributed along

the head margin: a sensory fossae, the sensory pits and the auricles (Rieger et al., 1991). Transverse cryosections confirmed expression in the lateral brain branches (Fig. 2B–E). Cryosections of adult heads labelled with the central nervous system (CNS) marker *PHO4* showed an expression pattern complementary to *Gtsix-3*. While *PHO4* labels the whole cephalic ganglia and the proximal part of the brain branches (Fig. 2F) (Agata et al., 1998), Gtsix-3 is clearly expressed in the distal brain branches. No expression was observed in eye cells.

1.2.2. Regenerating planarians

Planarians regenerate a complete and proportionate head with brain, auricles and eye spots in 2 weeks. We analyzed the expression pattern of *Gtsix-3* during head and tail regeneration by whole mount *in situ* hybridization. At 4 days of regeneration, when the brain is forming, two spots of Gtsix-3 appeared in the blastema close to the new regenerated cephalic ganglia (Fig. 3A–C). At 6–10 days of regeneration, *Gtsix-3* expression spreads more laterally on each side (Fig. 3D–F). At 15 days, this expression was reduced and showed the normal pattern of a fully regenerated adult head (Fig. 3G). In tail regeneration, *Gtsix-3* was not activated in the blastema, whereas expression of this gene was maintained in the old head (Fig.4A–D). The activation of *Gtsix-3* in head regeneration is delayed compared to other brain genes like *DjotxA*, *DjotxB/Gtotx*, *Djotp* and *GtPax6* (Umesono et al., 1999; Pineda et al., 2002). While these genes are activated at 2 days of regeneration, the first signs of *Gtsix-3* expression appeared at 4 days. Early expression is very similar among *DjotxA*, *DjotxB/Gtotx* and *GtPax6* genes: two spots were labelled at the edge of the blastema and in front of the two old sectioned ventral nerve cords, while the *Djotp* spots are located more laterally (Fig. 5A). This activation is consistent with the hypothesis that the new brain is regenerated by elongation of neural fibers of the sectioned old nerve cells to the blastema (Reuter et al., 1996). The two spots for GtPax6A locate in these elongation points (Pineda et al., 2002). Later on, the two elongated fibers bend transversally and fuse, producing the first new transversal commissure, from where new neoblasts, produced by active proliferation in the postblastema region and determined as brain cells, fasciculate into this commissure, initiating brain formation (Reuter et al., 1996; see yellow encircling in Fig. 3C) with differential expression of Otx related genes and activation of *Gtsix3* in the presumptive branch region (Umesono et al., 1999; Fig. 5B). At 8 days of regeneration, this pattern grows and the eyes are induced with the expression of *DjotxA*, *GtPax6* and *Gtsix1* (Fig. 5C). The final pattern is established at 15 days of regeneration with the complete differentiation of the brain and its branches in the blastema and the postblastema regions (Fig. 5D).

A comparative spatial and temporal pattern of expression between *Gtsix-3* and a regulatory planarian gene orthopedia, *Djotp* (Umesono et al., 1997, 1999), indicates that these

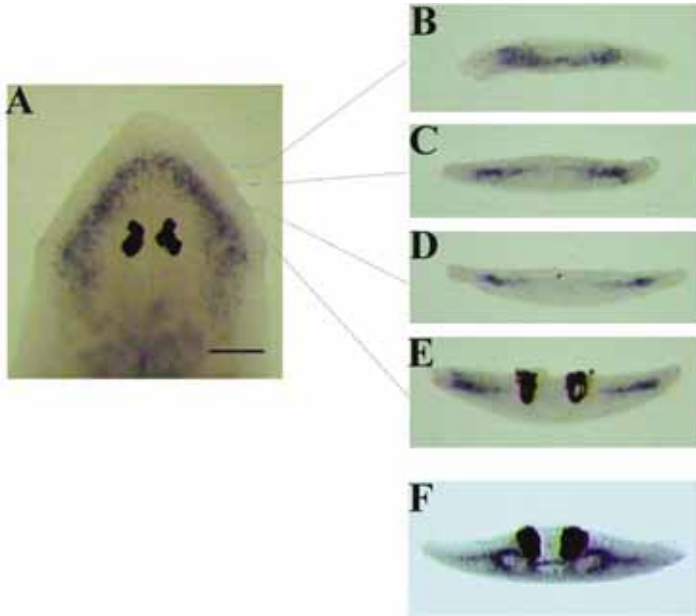


Fig. 2. Expression pattern of *Gtsix-3* in intact adult heads. Whole mount in situ hybridization of an adult head is viewed dorsally (A) and shows expression around the cephalic ganglia. In a series of transverse sections (B–E) from the tip of the head (B) until the eye and auricle level (E) we can observe the lateral location of the signal. As a reference we performed an eye transverse section from whole mount in situ hybridization of a CNS marker *PH04*. (F). No spatial overlapping was observed between the two riboprobes. Scale bar: 0.5 mm.

genes are expressed in brain branches. However, though both follow a similar spatial pattern during head regeneration, *Djotp* is activated much earlier. Finally, though *Gtsix-1* and *Gtsix3* belong to the same family and are evolutionarily

related to brain and eye formation (Kawakami et al., 2000), their roles have split in planarians, being: *Gtsix-1*, exclusively functional in eye, and *Gtsix-3* expressed only in the brain branches.

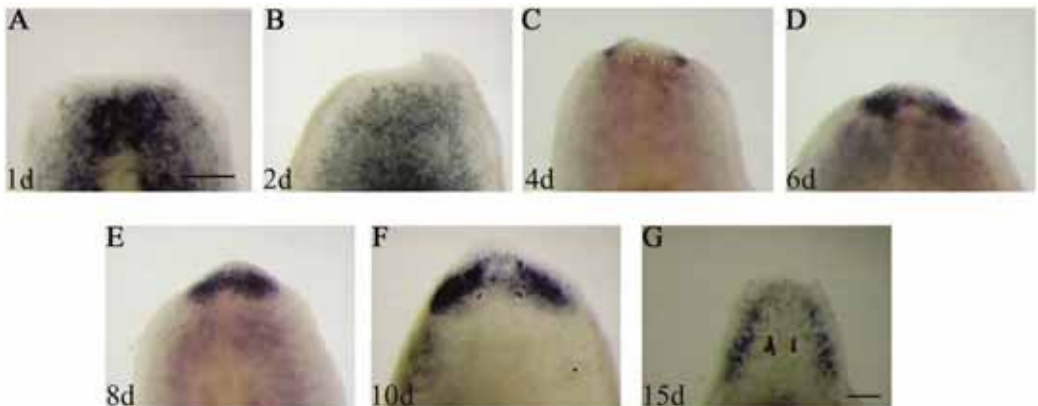


Fig. 3. Expression pattern of *Gtsix-3* during planarian head regeneration. Whole mount in situ hybridization of distinct stages of head regeneration from 1(A), 2(B), 4(C), 6(D), 8(E) 10 (F) and 15 days (G) at 17°C. *Gtsix3* was activated very late at 4 days of regeneration with two spots located at each side of the new regenerating cephalic ganglia, encircled in yellow. At 6 days, the signal spread continuously until 10 days when it split into two, at 15 days it reached the pattern of fully regenerated adult heads. The regenerated eye spots were observed at 6 days of regeneration. Scale bars: 0.5 mm.

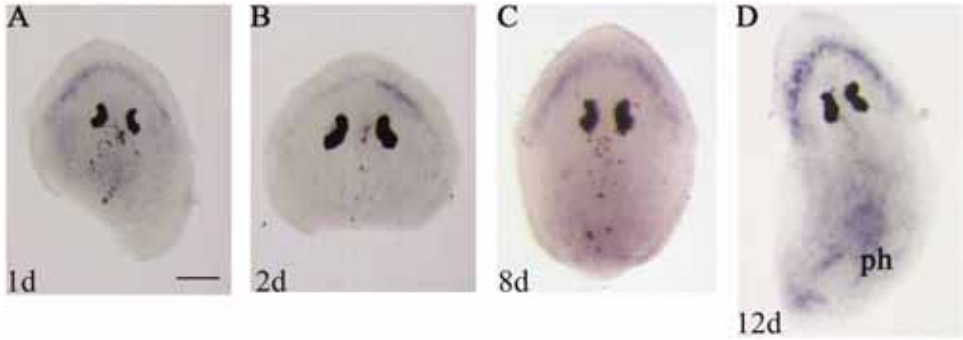


Fig. 4. Expression pattern of *Gtsix-3* during planarian tail regeneration, at 1(A), 2(B), 8(C), and 12 days (D) at 17°C. No activation of *Gtsix-3* was observed in the blastema tail, while the head pattern was unmodified. ph: new regenerated pharynx. Scale bar: 0.5 mm.

2. Experimental procedures

2.1. Species

The planarian used belongs to an asexual race (class A; Ribas et al., 1989) of *Girardia tigrina*. Specimens were collected near Barcelona and maintained in spring water. Organisms were starved for 2 weeks and kept at 17°C before the experiments.

2.2. *Gtsix3* cDNA cloning

Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify *Gtsix3-3'* fragment of 387 bp from planarian cDNA

prepared for 3' RACE PCR with the Marathon Kit (Clontech). We used a forward degenerated primer corresponding to the aminoacid sequence RTIWDGE and the Na21 primer of the kit as reverse primer. The identity of the *Gtsix3-3'* fragment was confirmed by sequencing. Using this sequence, a specific primer corresponding to the same RTIWDGE sequence was designed as reverse primer for the amplification of the 5' end by RACE. We obtained the *Gtsix3-5'* clone of 424 bp that contained the initial ATG.

2.3. In situ hybridizations

Whole mount in situ hybridizations were carried out with intact planarians at distinct regenerative stages, following

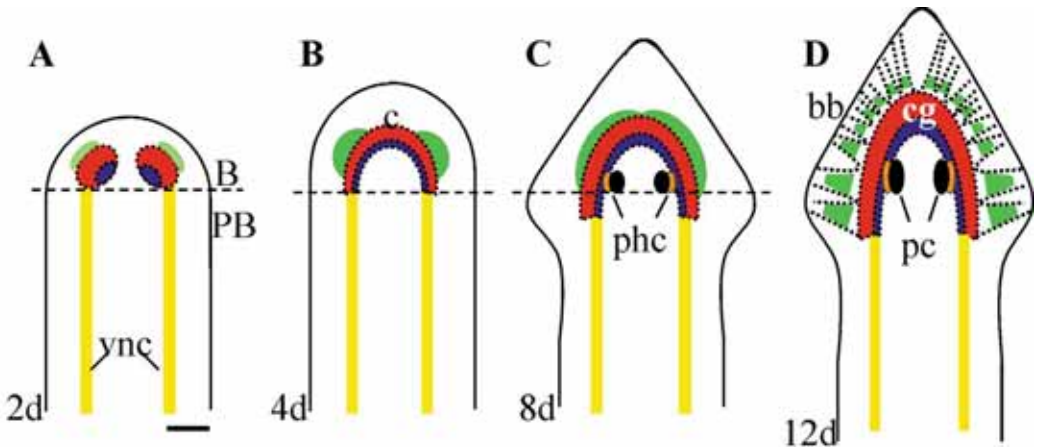


Fig. 5. Diagram summarizing the crucial stages of head regeneration with temporal and spatial description of developmental regulatory genes analysed in planarian. The pattern of each gene expression domain is indicated in the following colour code: yellow, *GtPax6*; red, *DjotxB* and *GtPax6*; blue, *DjotxA* and *GtPax6*; light green, *Djotp* and *Gtsix3*; orange, *GtPax6*, *DjotxA* and *Gtsix1*. The border between the blastema (or new regenerative tissue) and postblastema (or old region close to the wound) is indicated by dotted lines. B, blastema; bb, brain branches; c, commissure; cg, cephalic ganglia; PB, postblastema; pc, pigment cells; phc, photoreceptor cells; vnc, ventral nerve cords. Scale bar: 0.5 mm.

Agata et al. (1998). Sense and antisense digoxigenin-labeled RNA probes were made using the RNA in vitro labelling kit (Roche). Hybridizations were carried out at 55°C for 60 h. The clones Gtsix3-3' and Gtsix3-5' were used for in situ hybridization experiments (Genebank Acc. no. AF521300).

Acknowledgements

We thank Dr P. Bovolenta for helpful comments on the manuscript, Dr K. Agata for generously providing us with the *PHO4* in situ probe, R. Rycroft for revising the English, and M. Marsal and J. González-Linares for invaluable help. This work was supported by funds from the *Ministerio de Educación y Ciencia*, Spain, PB98-1261-C02-01. D.P. was funded by a fellowship from the *Universitat de Barcelona*.

References

- Agata, K., Soejima, Y., Kato, K., Kobayashi, C., Umesono, Y., Watanabe, K., 1998. Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. *Zool. Sci.* 15, 433–440.
- Bovolenta, P., Mallamaci, A., Puelles, L., Boncinelli, E., 1998. Expression pattern of cSix3, a member of the Six/sine oculis family of transcription factors. *Mech. Dev.* 70, 201–203.
- Cheyette, B., 1994. The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* 12, 977–996.
- Dozier, C., Kagoshima, H., Nklaus, G., Cassata, G., Bürglin, T.R., 2001. The *Caenorhabditis elegans* Six/sine oculis class homeobox gene *ceh-32* is required for head morphogenesis. *Dev. Biol.* 236, 289–303.
- Kawakami, K., Ohto, H., Ikeda, K., Roeder, R.G., 1996. Structure, function and expression of a murine homeobox protein AREC3, a homologue of *Drosophila* gene product, and implication in development. *Nucleic Acids Res.* 24, 303–310.
- Kawakami, K., Sato, S., Ozaki, H., Ikeda, K., 2000. Six families genes – structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays* 22, 616–626.
- Loosli, F., Winkler, S., Wittbrodt, J., 1999. Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* 13, 649–654.
- Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Gruss, P., 1995. Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121, 4045–4055.
- Oliver, G., Loosli, F., Köster, R., Wittbrodt, J., Gruss, P., 1996. Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3. *Mech. Dev.* 60, 233–239.
- Pignoni, F., Hu, B., Zavitz, K.H., Xiao, J., Garrity, P.A., Zipursky, S.L., 1997. The eye-specification proteins so and eya form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell* 91, 881–891.
- Pineda, D., Gonzalez, J., Callaerts, P., Ikeo, K., Gehring, W.J., Saló, E., 2000. Searching for the prototypic eye genetic network: sine oculis is essential for eye regeneration in planarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4525–4529.
- Pineda, D., Rossi, L., Batistoni, R., Salvetti, A., Marsal, M., Gremigni, V., Falleni, A., Gonzalez-Linares, J., Deri, P., Saló, E., 2002. The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax-6 independent. *Development* 129, 1423–1434.
- Rauskolb, C., Peifer, M., Wieschaus, E., 1993. *extradenticle*, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene *pbx1*. *Cell* 74, 1101–1112.
- Reuter, M., Sheiman, I.M., Gustafsson, M.K.S., Halton, D.W., Maule, A.G., Shaw, C., 1996. Development of the nervous system in *Dugesia tigrina* during regeneration after fission and decapitation. *Invert. Reprod. Dev.* 29, 199–211.
- Ribas, M., Riutort, M., Baguña, J., 1989. Morphological and biochemical variation in populations of *Dugesia (G) tigrina* (Turbellaria, Tricladida, Paludicola) from the western Mediterranean: biogeographical and taxonomical implications. *J. Zool. Lond.* 218, 609–626.
- Rieger, R.M., Tyler, S., Smith III, J.P.S., Rieger, G.R., 1991. Platyhelminthes: Turbellaria. In: Harrison, F.W., Bogitsch, B.J. (Eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates: Platyhelminthes and Nemertinea*, Wiley-Liss, New York, NY, pp. 7–140.
- Saló, E., Pineda, D., Marsal, M., Gonzalez, J., Gremigni, V., Batistoni, R., 2002. Eye genetic network in Platyhelminthes: expression and functional analysis of some players during planarian regeneration. *Gene* 287, 67–74.
- Seimiya, M., Gehring, W.J., 2000. The *Drosophila* homeobox gene *optix* is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism. *Development* 127, 1879–1886.
- Seo, H.C., Drivenes, O., Ellingsen, S., Fjose, A., 1998. Expression of two zebrafish homologs of the murine Six3 gene demarcates the initial eye primordia. *Mech. Dev.* 73, 45–57.
- Seo, H., Curtiss, J., Mlodzik, M., Fjose, A., 1999. Six class homeobox genes in *Drosophila* belong to three distinct families and are involved in head development. *Mech. Dev.* 83, 127–139.
- Serikaku, M.A., O'Tousa, J.E., 1994. Sine oculis is a homeobox gene required for *Drosophila* visual system development. *Genetics* 138, 1137–1150.
- Umesono, Y., Watanabe, K., Agata, K., 1997. A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev. Growth Differ.* 39, 723–727.
- Umesono, Y., Watanabe, K., Agata, K., 1999. Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionary conserved homeobox genes. *Dev. Genes Evol.* 209, 31–39.

D. DISCUSSIÓ



1. ORIGEN I EVOLUCIÓ DELS ULLS

Amb l'explosió de nous descobriments, gràcies als estudis de genètica del desenvolupament, pocs temes han generat tant de debat com l'origen i l'evolució dels ulls. És sorprenent com gens evolutivament conservats estan implicats en el desenvolupament d'estructures morfològicament tant divergents. En són un exemple les semblances en els patrons d'expressió dels gens involucrats en la segmentació dels artròpodes i els cordats, i també el desenvolupament de les extremitats i els apèndix d'insectes, equinoderms i vertebrats. Aquesta generalització de vies o xarxes implicades en el desenvolupament dels éssers vius també es veu reflectida en l'estudi molecular del desenvolupament dels ulls. En aquest cas, la controvèrsia principal es troba en quin seria l'origen de tots els tipus d'ulls que trobem actualment dins el regne animal. Hi ha un debat molt polaritzat sobre aquest possible origen i cal destacar-ne dues vessants principals. Els partidaris d'un origen monofilètic dels ulls, a partir d'un ull inicial prototípic, basen la seva teoria atenent a les característiques de conservació genètica que s'han descobert. Oposadament, i tenint en compte la gran diversitat d'ulls actuals, altres científics postulen un origen polifilètic dels ulls, i argumenten que partint de diferents tipus d'ulls, alguns haurien reclutat els mateixos gens a *posteriori*.

El primer grup, format pel Dr. W. Gehring i col·laboradors (2005), proposen dues teories per explicar l'origen dels ulls. La primera es basa en la diferenciació cel·lular: Les cèl·lules fotoreceptores s'haurien originat a partir de colònies de protistes. Aquests organismes presenten un orgànel fotoreceptor que per processos de diferenciació cel·lular podrien donar lloc a fotoreceptors unicel·lulars. Tenim un exemple d'aquesta teoria al cnidari *Tripedalia*. La larva conté unes cèl·lules fotoreceptores amb microvillis (on emmagatzema el pigment visual), grànuls de pigment (melanina) i fins i tot un cilí motor (Figura D1). El següent pas implicaria que a partir d'aquest fotoreceptor unicel·lular es generessin, per diferenciació, les dues noves cèl·lules (pigmentada i fotoreceptora) que posteriorment s'acoblarien per formar l'òrgan fotoreceptor.

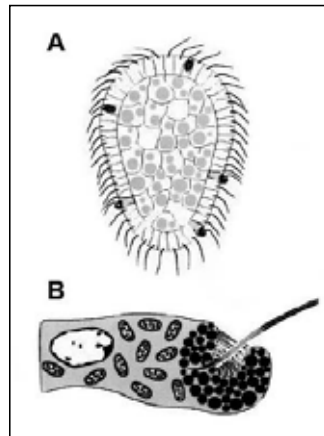


Figura D1 A) Larva plànula del cnidari *Tripedalia*. B) Fotoreceptor unicel·lular amb grànuls de pigment, microvilli i un flagel. Tret de Gehring, 2005.

DISCUSSIÓ

La segona teoria, es basa en el procés d'endosimbiosi per explicar l'origen de la fotorecepció. La fotorecepció podria iniciar-se a les cianobacteries, que generarien els primers fotopigments. Posteriorment aquests serien incorporats per endosimbiosi als eucariotes (algues) i donen lloc als cloroplasts. Posteriorment, aquestes algues van ser incorporades pels dinoflagelats com a cloroplasts secundaris, que en alguns casos van evolucionar i van donar lloc als primers òrgans oculars. Aquesta teoria es basa en l'observació que els orgànuls visuals en alguns dinoflagelats (*Volvox* o *Clamydomonas*) es localitzen als cloroplasts, i suggereixen que les cianobacteries foren integrades pels eucariotes com a cloroplasts. També és habitual la presència d'endosimbionts de dinoflagelats a l'interior dels cnidaris, i porta a postular a W. Gehring i col·laboradors que alguns dels gens necessaris per al desenvolupament de la fotorecepció puguin haver estat adquirits dels dinoflagelats pels cnidaris. Aquesta simbiosi hauria permès que el genoma dels cnidaris hagués incorporat els gens responsables de la fotorecepció per transmissió horitzontal.

Greuet i col·laboradors (1965) proposen una hipòtesi alternativa, i suggereixen que els orgànuls oculars podrien derivar dels cloroplasts. El dinoflagelat unicel·lular *Erythropsis pavillardii* (Figura D2) no té cloroplasts, i en canvi, té un orgànu ocular amb còrnia, cristal·lí, copa pigmentada i un tipus d'organització semblant a la retina, amb membranes similars als rabdòmers.

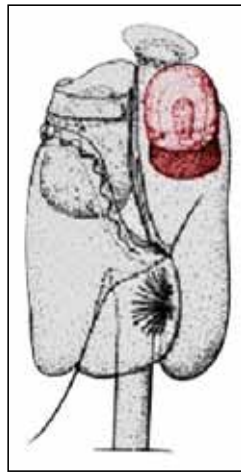


Figura D2 Orgànu ocular (en vermell) del dinoflagelat unicel·lular *Erythropsis pavillardii*. Tret de Saló, 2004.

El grup d'investigadors del Dr. W. Gehring també proposa un mecanisme d'evolució intercalar de la xarxa gènica implicada en la morfogènesi dels ulls. L'ull prototípic que proposen estaria format inicialment per un mínim de dos gens, que formarien una unitat fotosensible: El gen *Pax6* que regularia directament al gen de l'opsina. A partir d'aquí hi hauria dos mecanismes de reclutament de gens que poden intercalar-se a aquest primer duet de gens; la duplicació gènica (com és el cas dels gens *ey* o *toy* a *Drosophila*) i la fusió d'*enhancers* (quan a la regió promotora d'un gen se li integra un *enhancer* que li pot conferir una nova funció específica).

Arendt i col·laboradors (2003) proposen, amb un estudi molecular comparatiu dels diferents tipus de cèl·lules fotoreceptores, que l'aparició dels dos grans tipus de cèl·lules fotoreceptores; les ciliades i les rabdòmèriques, tindrien també un origen comú i s'haurien diversificat per processos de diferenciació cel·lular a partir de cèl·lules inicialment rabdòmèriques.

Altres investigadors, però, difereixen d'aquestes teories. El grup del Dr. Nilsson (2004) proposa un origen polifilètic dels diferents tipus d'ulls, tot i que postula que la diversitat d'ulls actuals s'hauria originat a partir d'uns pocs tipus ancestrals de cèl·lules fotoreceptores.

Aquests investigadors basen aquesta hipòtesi atenent a: les diferències ontogèniques dels ulls actuals, les diferències entre els ulls de tipus rabdomèric i ciliat i les diferències anatòmiques dels diversos tipus d'ulls. Posen en dubte el paper ancestral dels fotosensors de cnidaris, ja que és l'estat de pòlip el que es creu que és l'estat ancestral dels cnidaris i no s'han descrit ulls en l'estat de pòlip. També adverteixen del problema d'identificar homologies entre els tipus de fotoreceptors a partir dels patrons d'expressió gènica. I postulen un grau elevat de promiscuïtat genètica entre aquests tipus cel·lulars, que donaria lloc a una gran variabilitat evolutiva.

Altres diferències, que també avalen una evolució independent de les estructures oculars són els tipus de proteïnes que componen la lent (cristal·lins) i les diferències entre els ulls en càmera de vertebrats i cefalòpodes.

La composició proteica de les lents (cristal·lins) és molt diversa dins el regne animal, mentre que la construcció de les lents utilitzant proteïnes que tinguin una capacitat refractària ha estat una estratègia molt comuna. Ens trobaríem davant d'un cas d'oportunitat molecular tan eficaç, que la majoria d'organismes l'han utilitzat.

I finalment, la comparació del l'ull en càmera de vertebrats i cefalòpodes ens mostra un clar exemple de convergència funcional, es a dir, que tot i que són dos òrgans amb un desenvolupament molt diferent han arribat a solucions molt semblants a partir de camins evolutius molt divergents.

Els platihelminths, amb unes taques oculars molt simples, similars als ulls prototípics proposats per Darwin, són un esglaó més en l'intent d'esbrinar l'origen i l'evolució de la visió en el regne animal. El nostre estudi dels elements reguladors de la determinació inicial dels ulls durant la regeneració a planàries ha intentat, doncs, aportar noves dades per tal de complementar els estudis comparatius de les diferents estratègies genètiques i moleculars en què els organismes han solucionat la determinació i diferenciació dels òrgans de la visió.

2. GENS IMPLICATS EN LA REGENERACIÓ DELS ULLS A PLANÀRIES

En aquest apartat es discutiran en més detall els resultats obtinguts dels experiments realitzats amb gens dels que hem identificat l'ortòleg a planàries i que presumptament estan implicats en la regeneració dels ulls a planàries. S'ha dividit l'apartat en tres subapartats, on es discutirà comparativament l'estructura de les seqüències, els estudis de l'expressió i els experiments enfocats a l'anàlisi de la funció dels gens aïllats a planàries.

2.1 ESTRUCTURA

Per introduir l'anàlisi de l'estructura dels gens aïllats a planària i que presumptament participen en la regeneració de l'ull d'aquests organismes, farem primer un breu repàs de les estructures dels gens implicats en la xarxa genètica de la formació dels ulls coneguts a vertebrats i invertebrats. A la Figura D3 trobem representats de forma esquemàtica els dominis de les diferents proteïnes que codifiquen aquests gens amb els seus dominis d'interacció amb el DNA i altres factors de transcripció.

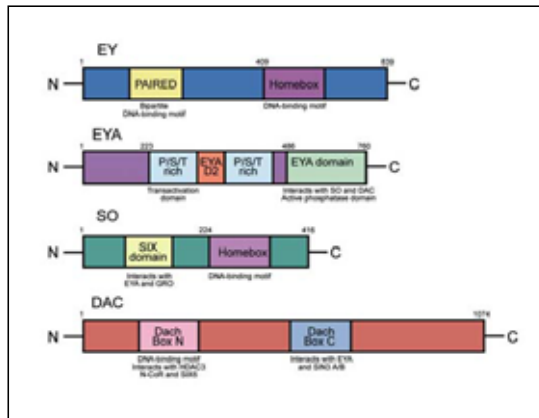


Figura D3. Estructura en dominis dels gens *ey*, *eya*, *so* i *dac* de *Drosophila* com a representants de cada família gènica. Els números indiquen el número d'aminoàcids. Els asterisks indiquen el lloc conservat de fosforilació per MAPK al gen *eya*. GRO; *groucho*. HDAC3; Histona deacetilasa 3. N-CoR; Correpresor nuclear. P/S/T; regió rica en serines, prolines i treonines. Tret de Silver i Rebay, 2005.

2.1.1 Els gens *Pax6* de planàries

A planàries hem pogut aïllar dos gens *pax6*; *Gtpax6A* i *Gtpax6B*. Ambdós gens codifiquen per dues proteïnes diferents, que en estudiar-ne els dominis d'unió al DNA hem pogut comprovar que es tractava clarament de dos membres de la família Pax6.

S'ha analitzat la similitud de seqüència d'ambdós gens a partir dels seus dominis conservats (domini paired i homeodomini) i hem pogut confirmar la seva similitud de seqüència amb altres proteïnes Pax6 tant de vertebrats com d'invertebrats. Hem comparat amb més detall les seqüències de les proteïnes GtPax6A i GtPax6B i hem constatat clarament que la proteïna GtPax6A té una similitud de seqüència més alta

tant del domini paired com de l'homeodomini en comparar-les amb altres proteïnes Pax6 conegudes. La proteïna GtPax6A, a més, presenta diversos aminoàcids conservats a les regions flanquejants de l'homeodomini, mentre que GtPax6B presenta unes regions flanquejants molt menys conservades. També en analitzar la regió linker entre el domini paired i l'homeodomini hem comprovat que GtPax6A, com la majoria de proteïnes Pax6, conserva una seqüència d'onze aminoàcids. Aquesta mateixa seqüència no s'ha pogut localitzar a GtPax6B.

Per tant, queda clar que la proteïna GtPax6A de planàries conserva una similitud de seqüència molt més alta respecte a altres organismes que GtPax6B, i és *GtPax6B* el gen *Pax6* més divergent conegut fins al moment.

Tot i que la majoria d'organismes presenten un únic gen *Pax6*, la presència de dos gens *pax6* a planàries no és un cas únic, ja que coneixem altres organismes dels que s'han aïllat també dos gens *pax6*. És el cas, ja introduït, de *Drosophila* i altres insectes holometàbols, dels que s'han aïllat els gens *ey* i *toy*; ambdós gens també de la família Pax6. I també és el cas de la duplicació del gen *Pax6* descrita a peix zebra per Nornes i col. (1998).

L'anàlisi filogenètica de l'homeodomini i les regions flanquejants de *Gtpax6A* de planàries el col·loca pròxim als gens duplicats *ey* i *toy* de *Drosophila*, i no pròxim als gens *pax6* dels *Lophotrochozoa* com seria d'esperar. Aquest fet podria ser degut a un efecte d'atracció entre planàries i *Drosophila* en presentar unes branques molt llargues. *Gtpax6B* queda col·locat fora del grup Pax6, ja que tot i que els aminoàcids que determinen l'especificitat d'unió al DNA estan conservats, la meitat dels residus invariants de l'homeodomini no estan conservats.

A nivell evolutiu, podríem hipotetitzar que es va produir una duplicació del gen *pax6* en un ancestre dels plathelminths, i que posteriorment aquests dos gens han evolucionat degut a una pressió selectiva diferent, probablement com a resultat de constriccions funcionals també diferents. N'és una prova el fet d'haver trobat la mateixa duplicació d'aquest gen tant a *G. tigrina* com a *D. japonica*. Actualment *Gtpax6A* ha conservat una estructura més pròxima al gen *Pax6* ancestral i per això presenta una major similitud amb les proteïnes Pax6 d'altres organismes. En canvi, el gen *Gtpax6B* hauria anat acumulant més mutacions que li confereixen una estructura més divergent.

2.1.2 La família Six/sineoculis

L'aïllament dels gens *Gtsix1* i *Gtsix3* amb els experiments d'aquest treball de recerca ens confirma la presència d'almenys dues famílies de proteïnes six/sineoculis al grup dels *Lophotrochozoa*. D'altra banda, també dona suport a la hipòtesi d'un *cluster* Six arquetípic en algun ancestre comú de tots els organismes bilaterals (Kawakami i col., 2000).

Pel que fa a l'estructura del gen *Gtsix1*, l'homologia de seqüència tant de l'homeodomini (en el que la majoria de residus específics estan conservats) com del domini sineoculis ens confirma que el gen *Gtsix1* pertany a la subfamília *six1/2*.

Igualment, en comparar la seqüència del gen *Gtsix3* amb diverses seqüències de l'homeodomini de diferents gens de la família six/sineoculis, *Gtsix3* mostra una major identitat de seqüència amb els gens de la subfamília *Six3/6*. L'anàlisi filogenètica de les seqüències de l'homeodomini i del domini sineoculis comparades amb les mateixes seqüències de gens aïllats tant a vertebrats com invertebrats també ens confirma que *Gtsix3* pertany a la subfamília de gens *Six3/6*.

DISCUSSIÓ

2.1.3 Les opsines

Les seqüències de rodopsines analitzades fins al moment (tant a vertebrats com invertebrats) presenten un alt nivell de conservació i s'agrupen totes dins la gran família de receptors acoblats a proteïnes G.

La seqüència aminoacídica del gen *Gtops* i del gen *Smops* (Newmark i col. 1999) aïllades a planàries han estat utilitzades per establir la relació filogenètica amb les opsines d'altres organismes. Les opsines de planàries queden agrupades en un arbre filogenètic amb les opsines de mol·luscs; *filum* que també pertany al clade dels *Lophotrocozoa*. Aquests resultats conjuntament amb altres estudis filogenètics realitzats amb molècules com el RNA ribosomal 18S més la cadena pesada de la miosina (Ruiz-Trillo., 2002) i els gens Hox (Bayascas i col., 1997) confirmen la posició dels platihelminths dins el clade dels *Lophotrocozoa*.

2.2 EXPRESSIÓ

2.2.1 Expressió dels gens Pax6

A planàries, ambdós gens *Gtpax6A* i *Gtpax6B* s'expressen al SNC dels organismes adults, tot i que l'expressió de *Gtpax6A* és més forta que la de *Gtpax6B*. Ambdós gens s'expressen en cèl·lules localitzades al llarg de tot el sistema nerviós central (ganglis cefàlics i cordons nerviosos).

Durant la regeneració anterior d'una planària decapitada, l'expressió de *Gtpax6A* i *Gtpax6B* s'activa amb l'inici de la regeneració dels ganglis cefàlics. Els nous ganglis cefàlics es regeneren a partir dels cordons nerviosos antics de l'organisme. Les fibres nervioses que formaran els nous ganglis cefàlics emergeixen ràpidament dels extrems dels cordons nerviosos seccionats i s'allarguen cap al blastema, posteriorment s'uneixen transversalment i es fusionen formant una comissura on s'intedigiten els nous neoblasts del blastema, ja determinats a cèl·lules nervioses, i que donaran lloc als nous ganglis cefàlics. Ja s'observa expressió d'ambdós gens *pax6* a les cèl·lules nervioses properes al lloc de secció dels cordons nerviosos antics i que es dirigeixen cap al blastema. Això ens suggereix que els gens *Gtpax6A* i *Gtpax6B* tenen una funció molt primerenca en la formació de les estructures neuronals d'aquests organismes.

Troben una expressió similar a *Drosophila*, durant l'embriogènesi. Noveen i col. (2000) suggereixen que l'expressió d'*eyeless* està implicada en la selecció de les interaccions entre axons. També és conegut que els mutants *severs* d'*ey* i *toy* de *Drosophila* presenten defectes severes en les estructures cefàliques que són essencials per la visió, l'olfacte i la coordinació motora (Callaerts i col., 2001).

És de gran interès, doncs, seguir estudiant quin és el paper dels gens *pax6* a planàries durant el procés de regeneració anterior per tal de conèixer més profundament l'evolució del programa genètic encarregat de la regeneració dels ganglis cefàlics de planàries i de la formació del cervell a organismes superiors.

Pel que fa a l'expressió dels gens *pax6* a les cèl·lules que formen l'ull de planàries, no s'ha detectat expressió de *Gtpax6A* ni *Gtpax6B* per hibridació *in situ whole-mount*, ni per hibridació *in situ* en talls de parafina hibridats amb ribosondes marcades amb digoxigenina. Va caler utilitzar tècniques d'hibridació *in situ* amb sondes radioactives per localitzar expressió de *Gtpax6B* a les cèl·lules fotoreceptores (Callaerts i col., 1999). I s'ha detectat expressió de *Gtpax6A* i *Gtpax6B* amb el mètode d'hibridació *in situ* analitzat per microscòpia electrònica (TEM). Aquesta tècnica va permetre observar mRNA d'ambdós gens a les cèl·lules pigmentàries i a les cèl·lules fotoreceptores d'organismes adults (on vam observar mRNAs tant al pericàrion com als rabdòmers). (Treballs realitzats per Callaerts i col·laboradors (1999) i pel grup de la Dra. Batistoni a la Universitat de Pisa, Itàlia).

La detecció d'expressió del gen *pax6* en l'ull adult no és un cas rar, ja que s'ha localitzat expressió de *Pax6* a l'epiteli de la lent i a la còrnia d'humans en edat adulta i a la retina de mico (Zhang i col., 2001), i també s'ha trobat expressió de *Pax6* a les cèl·lules amacrines i ganglionars de la retina adulta (Ashery-Padam i Gruss, 2001).

Tots aquests casos juntament amb planàries donen suport a un paper de *Pax6* en el manteniment de les cèl·lules de l'ull.

2.2.2 Expressió del gen *Gtsix1*

A planàries el gen *Gtsix1* s'expressa de manera continuada a les cèl·lules fotoreceptores dels ulls dels organismes adults. En concret la seva expressió es localitza en els cossos d'aquestes cèl·lules.

Com s'explicaria, però, que gens reguladors del desenvolupament estiguin constantment activats en organismes adults? Cal recordar que estem analitzant l'expressió de gens del desenvolupament en uns organismes amb una gran plasticitat morfològica, amb processos de creixement i decreixement continus i amb capacitat de regenerar. Aquestes característiques particulars de les planàries ens permeten explicar que observem l'expressió de *Gtsix1* a l'igual que l'expressió de *Gtpax6A* i *Gtpax6B* en organismes adults.

Durant el procés de regeneració anterior, l'expressió de *Gtsix1* es comença a detectar en un estadi on es determinaria el territori presumptiu d'ulls. Per tant *Gtsix1* ja s'expressaria en neoblasts determinats a formar els ulls i es mantindria durant tot el procés de diferenciació fins a la completa regeneració dels ulls i posteriorment seguiria expressant-se en l'ull regenerat.

Recordem en aquest punt els resultats obtinguts per Arendt i col·laboradors (2002) a l'annèlid *P. dumerilii*. Mentre que el gen *Pdpax6* només s'expressa en les cèl·lules que formaran l'ull larvari, el gen *Pdsix1-2* s'expressa als ulls de la larva i als ulls adults. En aquest cas, igual que a *G. tigrina* els gen *Gtsix1/Pdsix1-2* s'expressen en tot el sistema visual de l'organisme, com també ho fa el gen *so* a *Drosophila*. Aquests resultats indiquen que el paper dels gens ortòlegs *six1-2* en l'especificació primerenca dels sistemes visuals seria ancestral i característic del grup dels Protostoms. En el cas dels Deuterostoms els gens *Six1* i *Six2* no estan involucrats en el desenvolupament primerenc de l'ull, però se'n detecta l'expressió durant la diferenciació tardana de la retina (Kawakami, 1996).

2.2.3 Expressió del gen *Gtsix3*

No s'ha localitzat expressió del gen *Gtsix3* ni a les cèl·lules fotoreceptores ni a les cèl·lules pigmentàries dels ulls de planàries adultes. Només s'ha detectat expressió de *Gtsix3* per hibridació *in situ whole-mount* en una franja de cèl·lules envoltant els ganglis cefàlics. La franja s'inicia a l'alçada de les aurícules fins a la part frontal del cap, en forma de U invertida. Aquesta localització correspondria a la part distal de les branques del cervell que connecten els ganglis cefàlics amb els diferents sensors distribuïts al llarg dels marges del cap (fosses sensorials i aurícules).

Durant el procés de regeneració anterior, l'expressió de *Gtsix3* és més tardana que la resta de gens implicats en la morfogènesi del sistema nerviós central i dels ulls (fins als 4 dies de regeneració a 17°C). La seva expressió es localitza en el blastema, a ambdós costats de la zona de regeneració dels nous ganglis cefàlics. Aquesta expressió s'extén durant els 6-10 dies de regeneració fins a adquirir el patró d'expressió trobat en els organismes adults als 15 dies de regeneració. Aquest patró d'expressió és comparable espacialment amb el patró d'expressió de l'ortòleg del gen *ortopedia* de *Drosophila*, *Djotp*, que també s'expressa a les branques del cervell de

DISCUSSIÓ

planàries. *Djotp* és, però, un gen amb una expressió més primerenca que *Gtsix3* i atenent a la colocalització d'ambdós gens es podria suggerir un paper de *Djotp* en l'activació del gen *Gtsix3*.

La manca d'expressió de *Gtsix3* a les cèl·lules fotoreceptores, sembla ser una particularitat dels platihelminths, ja que el gen otròleg de *Drosophila*; *optix*, sí que s'expressa durant el procés de determinació dels ulls compostos, i la seva sobreexpressió indueix la formació d'ulls ectòpics en aquest organisme.

2.2.4 Expressió del gen de l'opsina

L'expressió de *Gtops* a planàries queda restringida als cossos neuronals de les cèl·lules fotoreceptores, on s'expressa de forma uniforme i continuada. No s'ha trobat expressió de *Gtops* a la regió dels rabdòmers. Aquest patró d'expressió és molt similar al patró d'expressió de *Gtsix1* amb la diferència que *Gtsix1* presenta uns nivells d'expressió més baixos.

Durant el procés de regeneració, l'expressió de *Gtops* és la més tardana en aparèixer, respecte a la resta de gens estudiats implicats en la regeneració de l'ull de planària. Es comença a detectar expressió de *Gtops* en un grup de cèl·lules pròximes a l'epidermis dorsal, que corresponen a les futures cèl·lules fotoreceptores. Aquesta expressió es manté durant tot el procés de regeneració.

Tenint en compte que el gen *Gtops* és un gen terminal de la xarxa gènica, és obvi pensar que les primeres cèl·lules on en detectem l'expressió són cèl·lules fotoreceptores que ja s'han començat a diferenciar.

2.2.5 Expressió coordinada en la regeneració del SNC i els Ulls a planàries

Les planàries són capaces de regenerar completament i proporcional la regió anterior (cap) amb totes les seves estructures; el cervell o ganglis cefàlics, les aurícules i els ulls, en només dues setmanes (a 17°C). Durant aquest procés de regeneració anterior, i atenent al conjunt de gens que s'han pogut aïllar fins al moment, els primers gens en expressar-se són els ortòlegs dels gens *otx* (*DjotxA*, *DjotxB* o el seu ortòleg a *G. tigrina*; *GtotxB*), *otp* (*Djotp* (Umesono i col., 1999)) i els gens *GtPax6A* i *GtPax6B*. Aquests gens s'expressen ja a les 48 hores de regeneració. L'expressió primerenca d'aquests gens és molt similar i en el cas de *DjotxA*, *DjotxB/GtotxB* i els *GtPax6* comença amb una expressió en dos taques al marge del blastema i davant dels dos antics cordons nerviosos ventrals. El gen *Gtotp* presenta una expressió més lateral a la resta de gens. Aquesta activació és consistent amb la hipòtesi de la regeneració del nou cervell per l'elongació de les fibres neurals, que provenen del lloc de secció del cordó nerviós antic, cap al blastema. Seguidament, les dues fibres nervioses elongades s'uneixen transversalment i es fusionen, i produeixen les primeres noves commissures transversals. Aquí, nous neoblasts, produïts per l'activa proliferació que es dona a la regió del postblastema i ja determinats a cèl·lules nervioses, s'interdigiten entre les noves commissures transversals i inicien la formació del cervell (Reuter i col., 1996).

Entre els 3 i 4 dies és quan apareix l'expressió de *Gtsix1*, en uns grups de cèl·lules davant del nou cervell i en posició més dorsal. Encara no s'observen cèl·lules pigmentades, i això és el que ens fa pensar que *Gtsix1* iniciaria la seva expressió en cèl·lules precursoras de les cèl·lules que posteriorment formaran l'ull.

Als 4 dies de regeneració apareix l'expressió de *Gtsix3*, que igual que *Djotp* s'expressa més lateralment i queda posteriorment restringit a les branques anteriors que surten del cervell, com també és el cas de *Dtotp*.

Ja als 6-7 dies de regeneració apareix l'expressió del gen de l'opsina i a la vegada es confirma la diferenciació de les cèl·lules fotoreceptores amb l'aparició també de les

cèl·lules pigmentàries. L'inici de l'expressió de *Gtops* és coetani amb l'aparició de la pigmentació dels ulls, fet que indica que la diferenciació de les cèl·lules fotoreceptores (opsina positiva) i de les cèl·lules pigmentàries (pigment positiu) es dona de manera coordinada en l'espai i el temps. Ambdós senyals de diferenciació de les cèl·lules de l'ull apareixen a la mateixa zona; al territori presumptiu de l'ull, amb una posició més externa del pigment i una posició interna del marcatge de l'opsina. Aquests resultats donen suport al model de diferenciació gradual de les cèl·lules dels ulls en duets proposat per Sakai i col·laboradors (2000).

2.3 FUNCIO

2.3.1 Pax6

Per tal d'estudiar quina és la funció dels gens *Gtpax6A* i *Gtpax6B* a planàries, hem utilitzat de nou la tècnica d'RNAi per tal de disruptonar l'expressió de cada un dels gens *pax6* de planàries i observar si es produïa alguna alteració morfològica especialment dirigida al sistema nerviós central i als ulls dels organismes injectats amb dsRNA.

A l'igual que en els experiments realitzats amb *Gtsix1*, hem comprovat que, mitjançant el mètode d'RT-PCR semiquantitativa, els nivells de mRNA endògens de *Gtpax6A* i *Gtpax6B* queden reduïts en injectar dsRNA de cada gen respectivament. La reducció de mRNA d'ambdós gens és comparable a l'obtinguda en els experiments realitzats amb *Gtsix1* i *Gtops*.

Tot i la dràstica reducció dels nivells de mRNA de *Gtpax6A* en uns organismes i *Gtpax6B* en altres, no hem pogut observar cap alteració morfològica macroscòpica del sistema nerviós central o dels ulls de les planàries intactes injectades. Tampoc s'ha observat cap alteració en organismes regenerants injectats (organismes decapitats prèviament a la injecció). Finalment hem reproduït el mateix experiment injectant a la vegada dsRNA de *Gtpax6A* i *Gtpax6B* i tampoc s'ha obtingut cap fenotip anormal. Fins i tot decapitant dues vegades consecutives els organismes i deixant un temps intermedi de regeneració, per induir dues vegades el procés de regeneració no s'ha pogut obtenir cap fenotip de pèrdua de funció (comunicació personal de la Dra. Batistoni. Universitat de Pisa).

Molt possiblement, la manca de bons anticossos, com a marcadors moleculars per al seguiment de les possibles alteracions del sistema nerviós, ens ha impedit definir cap fenotip alterat amb la injecció d'RNAi dels gens *Gtpax6A* i *Gtpax6B*.

Finalment, s'ha analitzat el possible efecte de la inhibició de *Gtpax6A* i *Gtpax6B* sobre els altres gens que s'expressen als ulls de planàries. No hem detectat cap retard ni reducció dels nivells d'expressió dels gens *Gtsix1* i *Gtops* en els organismes injectats amb dsRNA de *Gtpax6A* i *Gtpax6B*.

Aquest resultat ens porten a pensar que els gens *Gtpax6A* i *Gtpax6B* no estan implicats en la xarxa genètica de la regeneració dels ulls de planàries.

Podríem pensar que els nivells residuals d'mRNA dels gens *Gtpax6A* i *Gtpax6B* queden en els organismes injectats amb dsRNA siguin suficients per realitzar la seva funció, en el control de la regeneració dels ulls a planàries, mitjançant un mecanisme dosi-independent. Aquesta funció de *pax6* seria insensible a la reducció dels mRNAs dels gens *pax6* induïda pels dsRNAs injectats. Quedaria, així, oberta la possibilitat que els gens *pax6* estiguessin implicats en la regeneració dels ulls de planària. Se'ns fa difícil, però, hipotetitzar un mecanisme dosi-independent dels gens *pax6* a planàries si tenim en compte la importància del dosatge genètic com a requeriment fonamental per a l'activitat dels factors de transcripció de tipus Pax, en que *Pax6* n'és un dels exemples més documentats (Schedl i col., 1996; Van Raamsdonk i Tilghman, 2000).

Així, atenent-nos als resultats obtinguts, els gens *Gtpax6A* i *Gtpax6B* de planàries no semblen tenir un paper clau en la inducció de la regeneració dels ulls a planàries i

DISCUSSIÓ

podríem pensar, també, que hi hagués altres gens que poguessin compensar o substituir l'acció d'aquests gens en la xarxa gènica implicada en la regeneració de l'ull a planària. Si hem d'especular sobre quins podrien ser aquests gens, creiem improbable que es pugui tractar d'un tercer gen *pax6* amb una funció específica a ulls, ja que s'ha realitzat una cerca exhaustiva dels gens *pax6* a les dues espècies de planària. Un candidat podria ser el mateix gen *Gtsix1*, gen clarament essencial per a la regeneració dels ulls en aquests organismes.

Els treballs d'Ashery-Padam i Gruss (2001) hipotetitzen que hi ha altres factors actuant en paral·lel amb *Pax6* durant el desenvolupament de la retina i que poden compensar la funció de *Pax6*. Aquesta hipòtesi porta a pensar que possiblement puguin ser induïdes diferents combinacions alternatives de gens per donar lloc a una mateixa estructura o òrgan. La selecció d'una o altra alternativa gènica podria ser diferent segons el procés de desenvolupament o si es tracta d'un procés de desenvolupament particular, com seria el cas de la regeneració del blastema de planàries. Es podria considerar la regeneració dels ulls de planària independent de *pax6* com un exemple d'aquesta flexibilitat. Serà clau, doncs, estudiar el paper dels gens *Gtpax6A* i *Gtpax6B* en el desenvolupament embrionari de les planàries per tal de conèixer quines son les similituds entre els processos de morfogènesi dels ulls durant l'embriogènesi i durant la regeneració.

Igualment, recordar que hi ha altres organismes en els quals també es coneix que *Pax6* no està implicat en la morfogènesi dels sensors visuals. Un exemple el trobem a Amfiox, on les cèl·lules de Joseph i l'òrgan de Hesse no expressen ni requereixen *Pax6* per al seu desenvolupament (Glarion i col., 1998). També és el cas del desenvolupament *Pax6*-independent dels ulls adults de l'annèlid *P. dumerilii* (Arendt i col., 2002). I fins i tot a vertebrats, Marquardt i col·laboradors (2001) van inactivar el gen *Pax6* a l'inici de la retinogènesi i que provoca que totes les cèl·lules progenitores de la retina es diferenciïn en un únic tipus cel·lular; les cèl·lules amacrines (Figura D4). Així van demostrar un mecanisme independent de *Pax6* en el procés de diferenciació de les interneurons amacrines de la retina.

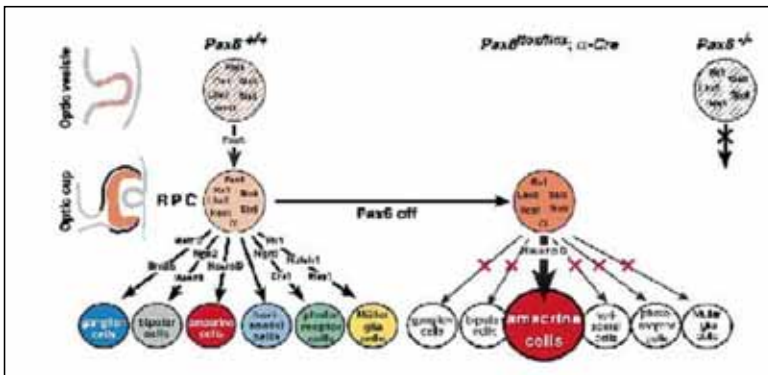


Figura D4 Esquema que il·lustra els dos nivells de requeriment de *Pax6* durant el procés de determinació de la retina. Tret de Marquardt, 2001.

2.3.2 *Gtsix1*

Per realitzar un estudi acurat de la possible funció del gen *Gtsix1* en la regeneració dels ulls, vam començar intentant inhibir l'expressió d'aquest gen en organismes adults per mitjà de la tècnica d'RNA d'interferència (RNAi). L'expressió de *Gtsix1* als cossos

neuronal de les cèl·lules fotoreceptores desapareixia a les 24h després de la injecció del dsRNA del mateix *Gtsix1*.

Per analitzar quin es l'efecte de la pèrdua de funció del gen *Gtsix1* en organismes adults, s'han realitzat dos experiments. En el primer, hem fet una anàlisi histològica dels ulls d'organismes adults injectats amb RNAi de *Gtsix1*. Mentre que els organismes control (injectats amb aigua) presenten una alta densitat de cèl·lules fotoreceptores amb les seves estructures rabdòmiques dins de la cavitat de l'ull, els organismes injectats i analitzats a 7 i 14 dies postinjecció presenten una densitat de cèl·lules fotoreceptores molt més baixa.

En el segon experiment hem realitzat el seguiment de l'expressió del gen *Gtops* en organismes adults injectats amb *Gtsix1*, l'expressió de *Gtops* davalla progressivament des del primer dia postinjecció fins a desaparèixer als volts de 7 dies de l'inici de l'experiment. A més, aquestes planàries no mostren cap fototropisme en posar-les en contacte amb una font de llum, mentre que les planàries control (no injectades) presenten el típic fototropisme negatiu descrit en aquests organismes. Així, doncs, s'ha aconseguit obtenir organismes fenotípicament cecs.

Però com s'explicaria la pèrdua gradual d'expressió de *Gtops* en organismes injectats amb dsRNA de *Gtsix1*? Ambdós gens s'expressen a les mateixes cèl·lules en els organismes adults, i ens podria fer pensar en un efecte directe sobre el control de l'expressió de l'opsina. Caldria estudiar, però, les regions cis-reguladores del gen de l'opsina per confirmar algun lloc de reconeixement del gen *Gtsix1*. Per altra banda, es podria hipotetitzar un efecte més indirecte. Tenint en compte que els gens *six/so* tenen una posició molt *upstream* en la xarxa genètica reguladora de la morfogènesi de l'ull podríem explicar la pèrdua gradual d'expressió de *Gtops* com a resultat de la disrupció d'aquesta xarxa gènica. En aquest cas no caldria que l'acció inhibidora de *Gtsix1* tingués un efecte directe sobre la regulació de l'expressió de *Gtops*, sinó que aquest efecte fos causat per la inhibició d'altres gens intermedis que posteriorment han de regular positivament l'expressió de *Gtops*.

Amb aquests primers resultats ja hem pogut hipotetitzar que *Gtsix1* té un paper clau en el manteniment de l'estat diferenciat de les cèl·lules fotoreceptores, ja que unes cèl·lules fotoreceptores sense fotopigments perden la seva fotosensibilitat i, per tant, la seva funció.

El següent pas, era veure si *Gtsix1* a més de tenir una funció de manteniment de l'estat diferenciat dels fotoreceptors, tenia també alguna funció en el procés de regeneració dels ulls. Per analitzar aquesta possible funció s'han utilitzat organismes prèviament decapitats, se'ls ha injectat dsRNA de *Gtsix1* i s'ha seguit el seu procés de regeneració anterior. Aquests organismes van regenerar el cap, les aurícules i els ganglis cefàlics, però no van poder regenerar cap de les cèl·lules ni estructures associades als ulls. Aquesta pèrdua de funció té, doncs, un efecte exclusiu en la morfogènesi dels ulls.

L'efecte d'aquesta pèrdua de funció s'allarga fins a 3 setmanes. Després reapareixen els ulls, i ens indica de nou que, tot i la injecció de dsRNA, la gran plasticitat d'aquests organismes els permet no perdre la competència per poder regenerar els ulls un cop inhibit l'efecte del RNAi. Aquest efecte desapareix sense haver de decapitar de nou els organismes, en canvi, quan es tracta les planàries amb la droga alsterpaulona (inhibidora de la funció de la proteïna Gsk-3) els organismes tractats no regeneren el cap. Al aturar el tractament amb aquesta droga els organismes no són capaços de regenerar el cap i cal decapitar-los de nou després del tractament amb la droga per induir una altra vegada el procés de regeneració cefàlica (Marsal, 2005).

Queda així demostrada una segona i important funció del gen *Gtsix1* en la determinació primerenca de l'ull durant la regeneració de les planàries.

Aquesta dualitat de funcions de *Gtsix1* (tant de determinació primerenca de l'ull com de manteniment de l'estat diferenciat de les cèl·lules fotoreceptores de planàries) també ha estat descrita en el model de desenvolupament de l'ull de *Drosophila* on els

DISCUSSIÓ

gens *six/so* també intervenen en la determinació inicial dels ulls compostos i, posteriorment, en els processos de diferenciació neuronal.

Finalment, els estudis preliminars d'injecció de dsRNA de *Gtsix3* tant en organismes adults com regenerants no han donat fins al moment cap fenotip que mostri alteracions en el sistema nerviós dels organismes injectats.

2.3.3 Opsina

Les opsines tenen un paper fonamental en tots els sistemes visuals coneguts. La seva funció és convertir els fotons en un senyal elèctric capaç de ser intel·ligible per l'organisme. Tenen, doncs, una funció sensorial.

El gen de la opsina de planàries va ser aïllat per la seva utilitat com a marcador molecular de les cèl·lules fotoreceptores. I és per això que l'estudi de la funció d'aquest gen s'ha restringit a l'avaluació de la pèrdua o no de fototropisme en organismes injectats amb els dsRNAs dels gens presumptament implicats en la morfogènesi de l'ull de planàries.

La injecció de dsRNA del gen *Gtops* en organismes adults induïx una ràpida davallada de l'expressió endògena del gen de l'opsina. Ja només en 24 hores post-injecció no s'observa expressió de *Gtops*. Aquests organismes perden el seu comportament fototàctic en front de l'exposició a la llum.

Com s'ha comentat anteriorment, amb la injecció de *Gtsix1* en organismes adults, l'expressió de *Gtops* decreix paulatinament fins a desaparèixer completament als 7 dies post-injecció i ens trobem de nou davant d'organismes sense capacitat fototròpica.

Finalment, no hem pogut observar cap canvi en l'expressió d'opsina en els organismes injectats amb dsRNA de *Gtpax6A*, *Gtpax6B*, d'ambdós alhora i de *Gtsix3*.

En el cas d'organismes regenerants injectats amb dsRNA de *Gtsix1*, no apareixen les estructures oculars i òbviament no s'ha localitzat expressió de *Gtops*. En injectar dsRNA de *Gtops*, els organismes regeneren els ulls però no expressen el gen de l'opsina. Aquest efecte es manté durant 3 setmanes. Com en el cas de la injecció de dsRNA de *Gtsix1*, i atenent a la plasticitat genètica d'aquests organismes, hipotetitzem que l'efecte del dsRNA desapareix. A partir d'aquest moment els organismes tornen a restablir els nivells normals d'expressió del gen de l'opsina.

En la resta de casos en què no es va inhibir la regeneració dels ulls amb la injecció d'RNAi, els ulls que es regeneraven contenien sempre totes les seves estructures i es detectava expressió de *Gtops* a les corresponents cèl·lules fotoreceptores.

Quedaria pendent analitzar en detall quins serien els gens encarregats de regular l'expressió de l'opsina a planàries. Com ja hem comentat, els candidats més propers a regular-ne l'expressió a planàries poden ser el mateix gen *Gtsix1*, o altres gens més *downstream* de la xarxa. Recordem que els treballs de Cook i Desplan (2001) demostraven que el promotor de l'opsina era reconegut pel gen *Pax6*, i sembla clar que la regulació de l'expressió de l'opsina vindria dirigida per una combinatòria de diversos factors de transcripció.

3. REFLEXIONS SOBRE PAX6 I LA XARXA GÈNICA INVOLUCRADA EN LA MORFOGÈNESI DELS ULLS

3.1 EL PARADIGMA DE PAX6 COM A GEN MAJOR DEL DESENVOLUPAMENT DE L'ULL

El concepte de *Master Regulatory Gene* com a interruptor d'un procés de desenvolupament apareix en analitzar els fenotips mutants dels gens homeòtics. Les mutacions homeòtiques van descriure els gens majors del desenvolupament que especificaven el patró del cos de *Drosophila* al llarg de l'eix antero-posterior. Aquests gens, caracteritzats per tenir un domini homeòtic, es troben formant els *clusters* Antenapedia i Bitorax a *Drosophila* i els *clusters* Hox a ratolí (McGinnis i Krumlauf, 1992). Els mutants de pèrdua i guany de funció donaven lloc a les transformacions homeòtiques. Un exemple és el cas d'Antenapedia (veure Gehring i col., 1987).

Ens caldria remuntar-nos a l'aïllament dels primers gens *Pax6* i com s'ha anat evolucionant en els coneixements de la morfogènesi dels ulls per tal d'entendre perquè s'ha donat tanta rellevança al gen *Pax6* com un gen major del desenvolupament.

Breument, recordem que el primer gen *Pax6* fou clonat a ratolí per Walther i Gruss l'any 1991. De seguida es va confirmar que aquest gen *Pax6* corresponia al gen afectat per la mutació *Small eye* de ratolí. Dos anys després, C.C. Ton va aïllar el gen causant de l'Aniridia humana. Aquest gen codificava per una proteïna molt similar a la de ratolí. En aquest punt ja es va inferir una forta pressió selectiva sobre aquesta proteïna.

Els treballs de Quiring i col·laboradors al 1994 van permetre clonar el gen *pax6* de *Drosophila* i, inesperadament, la mutació d'aquest gen determinava el fenotip *eyeless*.

Finalment, la comparació de seqüències aminoàcídiques de les caixes paired i homeòtica de les proteïnes codificades pel gen *ey* de *Drosophila*, el gen *Small eye* de ratolí i el gen causant de l'Aniridia humana mostrava que les tres proteïnes eren ortòlogues i, més important encara, totes tres estaven involucrades en la morfogènesi de l'ull.

Tot apuntava que ens trobàvem davant d'un gen major del desenvolupament dels ulls. Aquesta idea pren més pes amb la caracterització de gens ortòlegs de *Pax6* a altres vertebrats, tunicats, equinoderms, artòpodes, mol·luscs, nemàtodes, anèl·lids, nemertins i platihelminths.

El grup del Professor Walter Gehring (Biozentrum, Universitat de Basel) van construir organismes transgènics capaços d'expressar el gen *eyeless* de manera ectòpica en altres discs imaginals a part del d'ull-antena. Així van aconseguir obtenir organismes que generaven ulls compostos ectòpics a altres regions del cos (a l'ala, a les antenes i a les potes).

A partir d'aquest moment es va considerar el gen *Pax6* paradigma de gen major del desenvolupament. La seva expressió en determinats teixits desencadenava l'activació dels gens necessaris per a la formació de l'ull.

Ja més tard, es va analitzar si aquests gens podien substituir-se funcionalment entre espècies. Es van sobreexpressar els gens *Pax6* de ratolí i mol·lusc a *Drosophila* i es van obtenir també organismes transgènics que generaven ulls ectòpics. Només en el cas de *Xenopus* s'ha aconseguit parcialment obtenir l'experiment recíproc; s'ha sobreexpressat el gen *eyeless* a *Xenopus* i s'han obtingut cristal·lins oculars ectòpics. En aquests experiments, però, cal tenir en compte que *Pax6*, com a factor de transcripció que és, té segurament capacitat d'autoactivació i no es pot descartar que l'efecte observat es degui a una transactivació dels gens *Pax6* endògens dels organismes transgènics.

Posteriorment s'aïlla a *Drosophila* un segon gen *Pax6* (*toy*) que tot i que divergeix funcionalment d'*ey*, ambdós són capaços de complementar-se parcialment. *Toy* actua *upstream* d'*ey*, induint directament l'expressió d'*ey* en el disc imaginal d'ull i és

DISCUSSIÓ

depenent d'*ey* per poder realitzar la seva funció. També hem comentat que *toy* no està regulat per cap dels altres gens de la xarxa (*ey*, *so*, *eya* i *dac*).

Més tard s'aïlla un tercer gen relacionat amb *Pax6*, el gen *eyegone* (*eyg*), que intervé en la morfogènesi de l'ull però per una via independent d'*ey*, i que té un paper completament diferent en el desenvolupament de l'ull. Ja hem comentat que *eyg* ve regulat per *notch* i és promotor de la proliferació de les cèl·lules del disc imaginal d'ull-antena. El gen *Pax6* de vertebrats està més relacionat amb *toy* i *ey*, que amb *eyg*, i sembla que hauria adoptat el paper funcional d'ambdós, *ey* i *toy*, en l'especificació dels ulls de vertebrats. *Eyg*, per altra banda, comparteix una alta homologia de seqüència i de funció amb la isoforma *Pax6(5a)* del gen *Pax6* de vertebrats.

No hi ha dubte, doncs, de la potencial conservació del paradigma de *Pax6* a vertebrats recolzat pel paral·lelisme genètic entre *ey* i el gen *Pax6* de vertebrats. Per altra banda, però, amb els coneixements actuals del desenvolupament de l'ull de vertebrats és evident que no s'ha conservat de manera completa la jerarquització de la xarxa genètica de la morfogènesi de l'ull de *Drosophila* a vertebrats.

També s'ha comprovat que hi ha vies alternatives de *Pax6* (en condicions crítiques) implicades en la morfogènesi dels ulls de *Drosophila*, com és la via d'*optix*. Mitjançant la sobreexpressió del gen *optix* també es pot induir la formació d'ulls ectòpics a *Drosophila*.

S'han obtingut alguns resultats que plantegen la hipòtesi que hi hauria més d'una única via molecular per a la generació de cèl·lules visuals funcionals. La manca d'expressió de *Pax6* durant el desenvolupament dels fotoreceptors ganglionars (cèl·lules de Joseph i òrgan de Hesse) d'Amfiox (Gardon i col., 1998), la no essencialitat de *Pax6*, sinó del gen *Rx* en la formació de les cèl·lules progenitores de la retina de ratolí (Zahng i col., 2000), i els nostres resultats d'una via molecular independent de *Pax6* en el procés de regeneració dels ulls de planàries en són un exemple.

Amb tots aquests últims resultats, d'aïllament de nous gens i de les seves interaccions en la xarxa genètica de l'ull, el concepte de gen major del desenvolupament va començar a perdre força.

No hi ha dubte sobre el paper central de *Pax6* en el desenvolupament de l'ull de *Drosophila*, i tot i que la seva expressió és condició necessària, no és però suficient ni exclusiva per a la morfogènesi de l'ull.

A més, *Pax6* ha d'actuar en coordinació amb altres gens per poder especificar el desenvolupament dels ulls. Recordem que la formació d'ulls ectòpics per sobreexpressió d'*ey* a *Drosophila* només es donava en els discs imaginals que també expressaven el gen *dpp*. I si tenim en compte que *ey* i *dpp* no es regulen entre si, se suposa que actuen de manera sinèrgica en la inducció d'ulls. Així, l'expressió ectòpica d'*ey* no seria el factor exclusiu que provoca el desenvolupament de l'ull sinó que li caldria un entorn genèticament compatible per poder activar la morfogènesi dels ulls.

Creiem, per tant, que el concepte de Gen Major del Desenvolupament comportaria que *ey* imposés la identitat d'ull a qualsevol cèl·lula on s'expressés i, en canvi, només ho fa en les cèl·lules dels discs imaginals que coexpressen el gen *dpp*. En el cas de *Pax6*, queda clar que calen altres factors genètics associats, i un entorn adequat perquè aquest gen sigui capaç d'especificar un territori d'ull.

Finalment, hem de fer esment a les últimes i innovadores hipòtesis de Niwa i col·laboradors (2004). Aquests investigadors han realitzat múltiples estudis dirigits a estudiar la relació dels gens *atonal*, *wg*, *dpp* i *ey* en els processos inicials del desenvolupament d'alguns òrgans segment-específics com l'ull, els òrgans auditius (òrgan de Johnston) i els òrgans cordotonsals de les potes de *Drosophila*.

Segons els seus resultats, postulen un origen comú d'aquests tres òrgans sensitius, i que possiblement provenen tots d'un òrgan sensorial ancestral *atonal*-depenent. Proposen que *ey* modificaria el programa genètic preexistent per a la formació dels

òrgans sensorials per generar un òrgan sensorial específic: l'ull. Suggereixen una funció d'*ey* paral·lela o *downstream* de l'expressió d'*atonal* en la formació dels òrgans sensorials, i no una funció tan *upstream* de gen major del desenvolupament.

Les modificacions d'aquest òrgan sensorial ancestral probablement es poden explicar amb els canvis morfològics dels segments inicialment homogenis en un artòpode ancestral, que donarien lloc a una diversificació dels segments. Aquest procés de diversificació estaria dirigit pels gens *Hox* o gens homeòtics. El desenvolupament de la part posterior del cap depèn de l'activitat homeòtica dels gens del complex *Antenapedia*, però no es coneix cap gen homeòtic específic del segment d'ulls.

Aquests investigadors conclouen que *ey* podria ser el candidat a tenir una funció *Hox-like* en l'especificació del segment dels ulls.

Així, *Pax6* tindria una funció, més de marcar la identitat de segment cefàlic on es generarà l'ull que no pas una funció d'especificació només de l'ull.

3.2 CONSERVACIÓ DE LA XARXA GÈNICA INICIAL ENTRE VERTEBRATS I INVERTEBRATS

L'especificació del territori presumptiu de l'ull de la majoria d'organismes estudiats requereix l'expressió de gens ortòlegs de l'anomenada xarxa gènica de la morfogènesi de l'ull. També se la coneix com a xarxa gènica de la determinació de la retina (*retinal determination gene network*, o RDGN) on aquest conjunt de gens rep el nom de gens primerencs de la retina (*early retinal genes*) degut al seu important paper en l'inici de la retinogènesi de l'ull a vertebrats. Són, en conjunt, un grup de factors de transcripció i cofactors que col·lectivament dirigeixen la formació dels ulls i altres teixits.

Atenent només a la seva implicació en els ulls i com ja s'ha explicat en l'apartat de la introducció, aquests gens actuen de forma jeràrquica en el cas de la morfogènesi de l'ull compost de *Drosophila* i s'han descrit diversos exemples de la seva possible conservació evolutiva en els vertebrats. La caracterització dels homòlegs dels gens *ey*, *toy*, *eya*, *dach*, *optix* i *so* a vertebrats i el corresponent anàlisi d'expressió i funció ha anat donant consistència a la teoria de conservació d'aquesta xarxa gènica de la determinació d'ulls tant de vertebrats com d'invertebrats.

Els principals paral·lelismes es basen en les semblances de l'activitat de *Pax6* de vertebrats i *ey* de *Drosophila* i les característiques similars del gen *so* i els gens *Six3* i *Six6* de vertebrats.

Hi ha també, però, moltes excepcions i variacions entre les xarxes gèniques d'especificació d'ull de vertebrats i invertebrats. Les relacions epistàsiques conegudes entre *ey*, *so*, *eya* i *dac* de *Drosophila* no semblen reproduir-se en el model de vertebrats (Donner i Maas, 2004). També el cas del gen *Rax* de vertebrats, imprescindible per al desenvolupament de l'ull mentre que a l'ortòleg de *Drosophila* (*Drx*) no se li ha descrit funció en la morfogènesi de l'ull.

Pel que fa a planàries, és encara molt agosarat parlar d'una xarxa gènica implicada en la regeneració dels ulls. És clar el paper de *Gtsix1* en el procés de regeneració dels ulls des dels estadis primerencs de determinació de les cèl·lules nervioses a cèl·lules que formaran l'ull en el territori presumptiu de l'ull. No s'ha determinat, però, cap interacció entre aquest gen i els gens *GtPax6*, i la interacció de *Gtsix1* amb el gen de l'opsina sembla més indirecte que directe.

Per altra banda el gen *Gtsix3* no sembla estar involucrat en la morfogènesi de l'ull, i ho podríem confirmar atenent al fet que no hem pogut detectar cap interacció d'aquest gen amb cap altre dels gens estudiats.

Durant aquest treball també es va aïllar una seqüència parcial del gen ortòleg de *rx* a *G. tigrina* (*Gtrx*). No es va observar expressió d'aquest gen a les cèl·lules fotoreceptores de planàries adultes. *Gtrx* s'expressava a la regió més anterior dels

DISCUSSIÓ

ganglis cefàlics (resultats preliminars no presentats en aquest treball). A *Drosophila*, el gen *Drx* també s'expressa al Sistema Nerviós Central però no se'n detecta expressió ni al primordi de l'ull de l'embrió ni al disc imaginal d'ull-antena larvari (Eggert i col., 1998), i així suggereix que a Protostoms els gens *rx* estarien involucrats en la formació del Sistema Nerviós mentre que a Deuterostoms haurien adoptat un paper més específic en el desenvolupament de l'ull (Mathers i col., 1997). A la Figura D5 trobeu una taula amb els gens dels quals s'ha aïllat l'ortòleg a planàries i que estarien implicats en la regeneració dels ulls.

PLANARIAN GENE	VERTEBRATE HOMOLOG	DROSOPHILA HOMOLOG	EXPRESSION IN VERTEBRATE EYE	EXPRESSION IN DROSOPHILA EYE	EXPRESSION IN PLANARIAN EYE
DjotxA	Crx	otd	Neural retina	Photoreceptor cells	Photoreceptor cells
Dt/otxB					No expression
Dj/Gt pax6A	Pax6	eyeless twin of eyeless	Lens placode Optic vesicle	Eye imaginal discs	Low expression in photoreceptor and pigmented eye cells
Dj/Gt pax6B					
Dj/Gt six1	Six1-2	sineoculis	No expression	Eye disc epithelium, photoreceptor cells and optic lobes	Eye precursor cells and photoreceptor cells
Gtsix3	Six3	optix	Optic vesicle Neural retina Retinal pigmented epithelium and lens	Eye imaginal discs	No expression
Dj/Gt rx	Rax/Rx	Drx	Initial specifications of retinal cells	No expression	No expression
Sm/Gt ops	Opsin	opsin	Photoreceptor cells	Photoreceptor cells	Photoreceptor cells

Figura D5. Taula amb un llistat dels gens de planària otròlegs dels gens implicats en el desenvolupament dels ulls de *Drosophila* i vertebrats, i els seus patrons d'expressió als ulls. Modificat de Saló, 2002.

Podem avançar que el grup de la Dra. Batistoni de la Universitat de Pisa, i en col·laboració amb el nostre grup de recerca, ha pogut aïllar l'ortòleg del gen *eya* (*Djeya*) a la planària *Dugesia japonica* (Manini i col., 2004). *Djeya* s'expressa a les cèl·lules fotoreceptores dels ulls de planàries com ho feia *Gtsix1*, però també a les regions medial i lateral dels ganglis cefàlics i al parènquima (Figura D6, A). La injecció d'RNAi del gen *Djeya* en organismes regenerants produeix el mateix fenotip de manca d'ulls aconseguit amb l'RNAi de *Gtsix1* (Figura D6,B).

Per tal d'investigar les possibles interaccions entre *Djeya* i l'ortòleg del gen *Gtsix1*, han aïllat també el gen *Djsix1* (que està altament conservat respecte a *Gtsix1*). Primer han observat que la injecció simultània d'RNAi de *Djsix1* i *Djeya* incrementa molt el nombre d'organismes que no regeneren els ulls després de ser decapitats (Figura D6, C). Aquest experiment ja els han fet suggerir que ambdós gens actuen com un complex en la regeneració dels ulls de les planàries i han comprovat que ambdues proteïnes interactuen *in-vitro* a través dels seus dominis conservats.

Aquests experiments ens confirmen que ambdós gens són necessaris per a la correcta especificació de les cèl·lules de l'ull i són una nova evidència d'interacció entre dos gens del cassette regulador encarregat de la regeneració dels ulls a planàries. Aquests resultats ens confirmen de nou que existeix un circuit inicial molt conservat en el regne animal, tot i la diversitat de formes oculars i de les situacions de desenvolupament particulars de cada espècie.

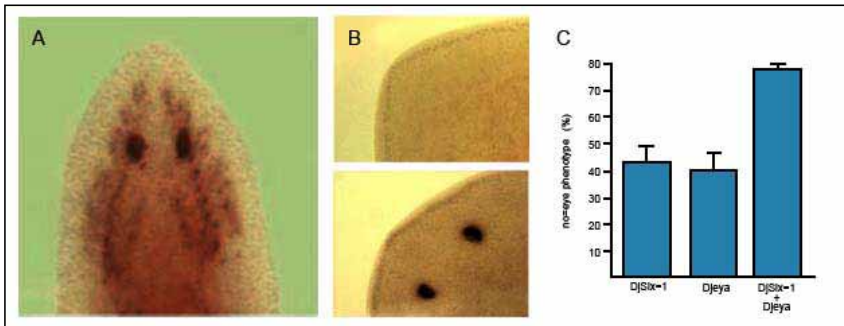


Figura D6 A) Expressió de *Djeya* a les cèl·lules fotoreceptores i als ganglis cefàlics. B) Fenotip de manca d'ulls degut a la injecció d'RNAi de *Djeya* (a dalt organisme injectat amb RNAi i a baix organisme injectat amb aigua). C) Histograma que compara el percentatge d'organismes que presenten un fenotip de manca d'ulls després de la injecció d'RNAi de *Djsix1*, *Djeya* i ambdós alhora. Modificat de Mannini i col., 2004.

3.3 UNA XARXA GÈNICA PLEIOTRÒPICA QUE PARTICIPA EN LA MORFOGÈNESI D'ALTRES ÒRGANS

Amb l'estudi comparatiu dels gens implicats en l'especificació d'altres òrgans i teixits a part de l'ull, s'ha observat que alguns dels gens que componen la xarxa gènica encarregada del desenvolupament de l'ull també participen en els processos de morfogènesi d'òrgans com les gònades de *Drosophila*, les orelles i els ronyons dels vertebrats, i el teixit muscular esquelètic de ratolí.

En aquests casos, els gens encarregats de la determinació de l'òrgan o teixit són altres gens de les famílies PAX, SIX, EYA i DAC els que hi participen i ho fan formant també una xarxa d'interaccions entre ells similar a la xarxa implicada en la morfogènesi de l'ull.

En el desenvolupament de les orelles dels vertebrats hi trobem implicats els gens *Pax8* i *Pax2* com a primers marcadors del territori presumptiu de la placoda òtica (veure Silver i Rebay, 2005, per referències). Més tard, *Six1* i *Eya1* es coexpressen ventralment a la placoda òtica i els ratolins mutants per aquests gens presenten defectes en el desenvolupament de les orelles. Similarment, les mutacions dels gens *Eya1* i *Six1* a humans estan implicades en la síndrome braquio-oto-renal, que és un desordre autosòmic que es caracteritza, entre d'altres, per un desenvolupament anormal de les orelles. Durant el desenvolupament de les orelles hi intervenen també els gens *Dach1* i *Dach2*, però sembla que l'expressió i regulació d'aquests gens seria independent de *Pax2* o *Eya1*. (Figura D7, A)

En el cas del desenvolupament dels ronyons de vertebrats es coneix que hi participen també els mateixos gens *Pax2*, *Eya 1* i *Six1* (Bouchard i col., 2002).

En el desenvolupament primerenc del múscul esquelètic de ratolí (Figura D7,B), es solapen l'expressió del gen *Pax3* i la del gen *Dach2*, ambdós, a més, s'autoregulen positivament a l'igual que *ey* i *dach* en el desenvolupament de l'ull de *Drosophila*. *Pax3* és necessari per a la miogènesi del múscul esquelètic de ratolí i la seva sobreexpressió induïx l'expressió d'*Eya2* i *Six1*. A més, el mutant de *Six1* presenta defectes en la miogènesi, i quan s'expressen ectòpicament les combinacions *Eya2-Six1* o *Eya2-Dac2*, es sinergitza l'expressió de marcadors musculars (indicatius de diferenciació miogènica) tals com *Pax3*. Aquest efecte sinèrgic és similar a l'observat en la inducció d'ulls ectòpics per expressió ectòpica d'*eya-so* o *eya-dach* a *Drosophila*. (veure Silver i Rebay, 2005, per referències).

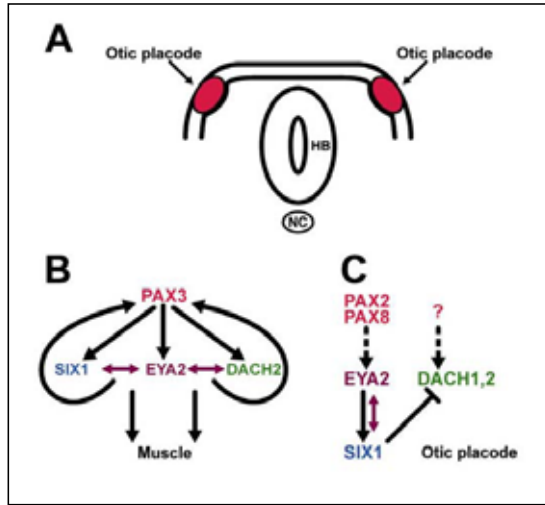


Figura D7 A) Esquema de la placoda òtica de ratolí a l'estadi de 4-13 somites. HB: cervell posterior. NC; notocorda. La placoda s'invagina per formar la vesícula òtica que s'acabarà tancant i formant l'otocist. B) Xarxa gènica involucrada en el desenvolupament dels músculs a vertebrats. C) Xarxa gènica implicada en el desenvolupament de la placoda òtica de vertebrats. Les fletxes roses indiquen les interaccions sinèrgiques que reflexen una possible associació directa proteïna-proteïna. Modificat de Silver i Rebay, 2005

Aquests experiments ens indiquen que els patrons d'interacció d'aquests gens mantenen funcions conservades en el desenvolupament de múltiples teixits i òrgans tant d'invertebrats com de vertebrats.

Així doncs, el fet que aquesta xarxa gènica dirigida per la família Pax estigui conservada en la majoria d'organismes i que gens de la mateixa família estiguin implicats en la morfogènesi d'altres òrgans a part de l'ull ens fa pensar que els gens Pax són uns gens molt antics, i que probablement ja existien abans de la generació dels ulls als éssers vius. Podem hipotetitzar que el gen *Pax6* ha estat implicat en el desenvolupament de la regió cefàlica i que posteriorment ha adquirit, entre d'altres, un paper en la determinació d'alguns dels sensons ancestrals (visió i olfacte) i ha estat reclutat, així, per construir una unitat fotosensible primitiva, amb la funció inicial de regular l'expressió d'alguna opsina. L'adquisició dels nous gens intercalats en aquesta primera interacció permetria que la xarxa genètica s'anés ampliant i, a la vegada, ho faria la complexitat de la regulació dels mecanismes de fotorecepció, que permetria generar cada vegada ulls més complexos. Amb les conseqüents duplicacions del genoma, i atenent a la seva gran capacitat d'interacció entre ells, aquests mateixos gens haurien adoptat altres funcions morfogenètiques com les comentades en aquest punt.

3.4 UPSTREAM DE LA XARXA

Com ja hem comentat a l'apartat 3.1 de la discussió, la xarxa gènica encarregada de la morfogènesi de l'ull no és una xarxa tancada, que no permeti la interacció amb altres gens d'altres vies de senyalització, sinó que necessita d'uns processos d'activació anteriors a l'expressió de *Pax6* i d'un entorn genètic favorable per tal de

generar una resposta transcripcional específica i necessària per a un desenvolupament apropiat.

Trobem alguns exemples d'aquestes interaccions en el desenvolupament de l'ull compost de *Drosophila* (Figura D8). Les vies de senyalització de *dpp* i *hedgehog* (*hh*), necessàries per a la iniciació i progressió del solc morfogenètic (*MF*), influeixen l'especificació de l'ull regulant l'expressió dels gens de la xarxa morfogenètica d'ull. Hi ha evidències que *dpp* actuaria *downstream* o en paral·lel d'*ey* i que activa els gens *eya*, *dac* i *so* abans de l'inici del *MF*. El cas de *hh* és més complex, ja que *hh* directament no activa a *ey* sinó que ho fa eliminant un bloquejador de la transcripció d'*ey*.

I la via de senyalització de *wingless* (*wg*) també té un paper important en la regulació del territori que donarà lloc a l'ull diferenciat. *Wg* és un inhibidor de la formació dels ulls, però no es coneix clarament quin és el mecanisme pel qual *wg* actua com a repressor de la formació de l'ull (veure Silver i Rebay, 2005 per referències).

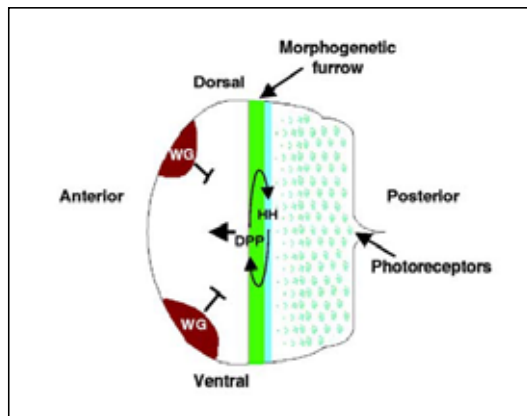


Figura D8 Esquema del disc imaginal d'ull de *Drosophila* que mostra la progressió del *MF* conduïda per l'acció cooperativa de les vies de senyalització de *hh* (blau cel) i *dpp* (verd). Les cèl·lules més posteriors del disc ja s'han diferenciades en cèl·lules fotoreceptores, mentre que les anteriors al *MF* encara estan proliferant. L'expressió de *wg* (vermell) es localitza a la regió més anterior del disc bloquejant la formació de teixit ocular en aquesta regió i permet, així, la diferenciació d'aquesta regió en cutícula del cap. Tret de Silver i Rebay, 2005.

Trobem també altres factors implicats, com *homotora* i *teashirt*, amb una funció de bloqueig temporal de la diferenciació de l'ull a favor de mantenir la proliferació cel·lular (veure revisió Domínguez i Casares, 2005).

També és conegut que la via de senyalització de *EGFR* té una funció de prevenció d'apoptosi a l'ull de *Drosophila* i també té una funció d'especificació de molts dels tipus cel·lulars de l'ull.

Un últim exemple de la interacció de la xarxa gènica amb altres vies de senyalització, queda reflectit en l'especificació d'ull o d'antena en el disc imaginal d'ull-antena. Mentre que el factor *EGFR* induïx la formació de l'antena reprimint *ey*, *notch* induïx la formació d'ull per repressió de *distal-less* (implicat en la formació d'antena) i l'activació indirecta d'*eya*. (veure revisió de S. Silver i I. Rebay, 2005)

Queda clar doncs, que és difícil definir un únic gen, com *Pax6*, o una única xarxa hermètica, com a xarxa de morfogènesi de l'ull. Cada vegada hi ha més evidències que el control genètic del desenvolupament de l'ull depèn de la interacció de diverses

DISCUSSIÓ

vies de senyalització combinades i amb unes restriccions d'espai i temps molt concretes. Això ens porta a hipotetitzar que els diferents tipus d'ulls actuals haurien evolucionat de manera independent a partir d'una xarxa gènica comuna i molt bàsica. Amb la pèrdua o guany de nous components, la seva divergència evolutiva i les combinacions alternatives d'aquests components s'hauria arribat a estructures fenotípiques molt semblants.

La regeneració dels ulls de platihelminths seria un exemple d'aquesta flexibilitat evolutiva. Tot i la presència d'expressió dels gens *pax6* a les cèl·lules fotoreceptores, segons els nostres experiments de pèrdua d'expressió mitjançant RNAi la regeneració dels ulls no és depenent de *pax6*. En els nostres organismes sembla, doncs, que *Gtsix1* o altres factors poden substituir o integrar la funció de *pax6*.

Quedaria pendent poder esbrinar si el fet d'haver estudiat la morfogènesi dels ulls de planàries durant el procés de regeneració no ens ha permès caracteritzar una funció de *pax6* en el desenvolupament embrionari dels ulls dels platihelminths.

4. ÚLTIMS TREBALLS I NOVES PERSPECTIVES

Seguit als experiments realitzats i presentats en aquest treball, el nostre grup de recerca ha continuat amb la investigació del procés de regeneració dels ulls a planàries.

Actualment ja s'ha aconseguit desenvolupar un eficient protocol per generar línies de planàries transgèniques estables (una raça sexuada de l'espècie *G. tigrina*, González-Estévez i col., 2003). La utilització d'animals adults per transformar els neoblasts ha resultat en una alta freqüència de transformació dels neoblasts i un alt nivell de supervivència de les planàries electroporades.

Per a la generació de planàries transgèniques s'han utilitzat diversos vectors versàtils dels que en destaquem els vectors que contenen les seqüències flanquejants dels transposons Hermes i piggyBac. Aquests vectors són portadors d'un marcador específic d'ull i potencialment universal, el 3xP3-EGFP, que es basa en un promotor artificial format per 3 repeticions en tàndem de la regió P3 del promotor de l'opsina, associat a un gen *reporter*, la *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). Aquest promotor és activat pel factor de transcripció Pax6 de molts organismes.

En transformar les planàries amb aquests vectors s'ha aconseguit obtenir planàries transgèniques que expressen EGFP a les cèl·lules fotoreceptores (Figura D9). I confirmen, així, la presència de l'activitat de Pax6 a les cèl·lules fotoreceptores de planàries.

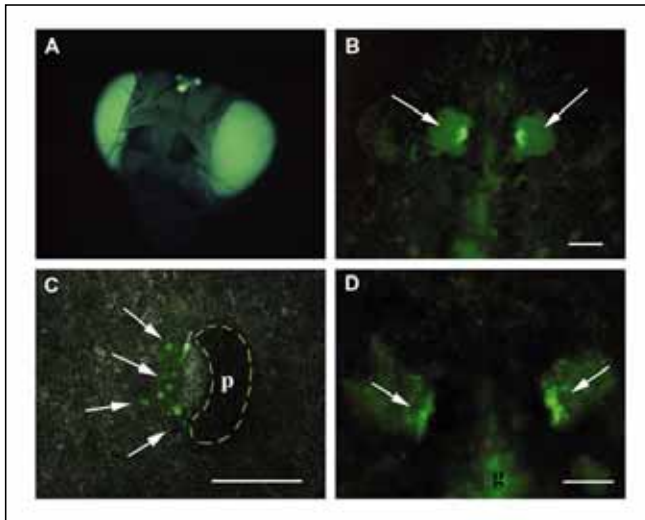


Figura D9 Planàries transformades per electroporació d'una construcció de GFP amb el promotor P3 de l'opsina en el vector transposable Hermes. **A)** *Drosophila* transgènica utilitzada com a control. **B)** Línia de planària transgènica amb els ulls verds 12 mesos després d'haver estat electroporada. **C)** Cossos de les cèl·lules fotoreceptores de l'ull que es tornen verds en entrar en el territori de l'ull. Ulls en mosaic amb cèl·lules antigues no transformades i cèl·lules noves generades a partir de neoblasts transformats. Esc. barres, 0,25 mm. Tret de Gehring, 2005.

En el nostre treball hem pogut aconseguir crear fenocòpies dels mutants dels gens aïllats (estudis de pèrdua de funció) i amb aquesta nova tècnica de guany de funció realitzada a planàries s'obre una nova gran porta a la investigació dels processos no

DISCUSSIÓ

tan sols de morfogènesi de l'ull, sinó també dels processos de regeneració d'aquests organismes. Així, les tècniques d'RNAi i la generació de transgènics ofereixen un gran potencial per a l'estudi del desenvolupament i la regeneració a nivell funcional.

Actualment, hem de recordar que s'està seqüenciant el genoma sencer de *Schmidtea mediterranea* (una espècie sexuada de planàries) al *Genome Sequencing Center (Washington University)*. Amb la seqüenciació del genoma de *S. mediterranea* és possible buscar nous gens *in silico*. Els diferents fragments del DNA genòmic d'aquest organisme s'estan ordenant en còntigs. A partir de les seqüències dels òrtolegs de qualsevol gen ja aïllat en una altra espècie serà relativament fàcil trobar les seqüències d'aquests gens a *S. mediterranea*. Aquesta nova recerca de gens *in silico* ja ha donat els seus primers resultats, i la Dra. Adell en el nostre grup de recerca ja ha pogut caracteritzar una seqüència genòmica que correspon a l'òrtoleg del gen *dacshund*.

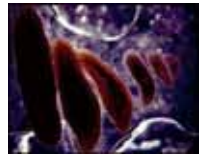
Aquests nous procediments obren una gran porta per l'aïllament dels gens que segons altres organismes model es troben *upstream* i *downstream* dels gens que s'han estudiat en aquest treball. És imprescindible clonar i analitzar els gens òrtolegs de *dpp*, *hh*, *notch* i *wg* a planàries per tal d'estudiar la seva funció i interacció en la determinació dels ulls de planària durant la regeneració.

Queda també oberta la possibilitat que les planàries continguin un òrtoleg del gen *eyg* i que fins i tot aquest pogués substituir els dos gens *Gtpax6* aïllats en aquest treball i/o intervenir en la proliferació de les cèl·lules que formen l'ull.

Un cop aïllats els gens que falten de la xarxa es podran fer nous experiments tant de pèrdua de funció utilitzant la tècnica d'RNAi, com de guany i pèrdua de funció amb la recent possibilitat de generar organismes transgènics a planàries i fins i tot combinar ambdues tècniques en els mateixos organismes.

Finalment, serà clau estudiar el paper dels gens *Gtpax6A*, *Gtpax6B*, *Gtsix1* i la resta de gens implicats en la regeneració dels ulls durant el procés del desenvolupament embrionari de les planàries (actualment es disposa d'una descripció detallada dels diferents estadis embriològics de la planària *Schmidtea polychroa* (Cardona i col., 2005), per tal de conèixer quines són les similituds entre els processos de morfogènesi dels ulls durant l'embriogènesi i durant la regeneració.

E. COCLUS



Les conclusions d'aquests treball són:

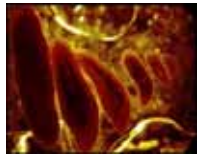
S'han identificat alguns dels presumptes components de la xarxa gènica implicada en la regeneració dels ulls a planària:

- S'han identificat 2 gens de la família *Six/sineoculis* a planària: *Gtsix1* i *Gtsix3*.
- S'ha aïllat un fragment del gen de la opsina; *Gtops*. Aquest gen s'expressa als cossos neuronals de les cèl·lules fotoreceptores diferenciades.
- El gen *Gtsix1* s'expressa com un únic transcrit als cossos neuronals de les cèl·lules fotoreceptores dels ulls adults de planària.
- El gen *Gtsix1* és necessari per al manteniment de l'estat diferenciat de les cèl·lules fotoreceptores. La inhibició d'aquest gen amb la tècnica d'RNAi causa la pèrdua del fototropisme negatiu característic d'aquests organismes i també s'ha comprovat la pèrdua gradual de l'expressió de *Gtops* en els organismes injectats amb dsRNA de *Gtsix1* que genera un fenotip cec. Suggerim un efecte inhibidor indirecte de *Gtsix1* sobre *Gtops*.
- Durant el procés de regeneració anterior, el gen *Gtsix1* s'expressa als 3 dies de regeneració en un grup de cèl·lules pròximes a l'epidermis dorsal. En aquest estadi es determinaria el territori presumptiu dels ulls, i aquestes cèl·lules serien el primer signe visible del procés de diferenciació de les cèl·lules que formaran els ulls.
- El gen *Gtsix1* té un paper clau en la determinació primerenca dels ulls a planàries. Els estudis de pèrdua de funció amb RNAi mostren una inhibició completa de la regeneració dels ulls. Aquests resultats estan d'acord amb un paper ancestral dels gens del grup *Six1-2* en la morfogènesi de l'ull a Protòstoms.
- S'ha detectat l'expressió de *Gtsix3* en una franja de cèl·lules envoltant els ganglis cefàlics que correspondria a la part distal de les branques del cervell que connecten els ganglis cefàlics amb els diferents sensors distribuïts al llarg dels marges del cap.
- Durant el procés de regeneració anterior, l'expressió de *Gtsix3* es localitza en el blastema, a ambdós costats de la zona de regeneració dels nous ganglis cefàlics. Aquesta expressió s'extén entre els 6-10 dies de regeneració fins a adquirir el patró d'expressió trobat en els organismes adults.
- S'ha identificat un nou gen *Pax6* a planàries: *Gtpax6A*. El genoma de les planàries *G. tigrina* i *D. japonica* presenta, així, dos gens *Pax6* (*Gtpax6A/Djpax6A* i *Gtpax6B/Djpax6B*).
- El gen *Gtpax6A* és més similar estructuralment a altres gens *Pax6* que el gen *Gtpax6B*, i és aquest últim el gen *Pax6* més divergent descrit fins al moment.

CONCLUSIONS

- Els dos gens *Pax6* de planàries s'haurien generat per una duplicació en un triclada o plathelminth ancestral ja que no presenten cap ortologia clara amb els gens *ey* i *toy* de *Drosophila*.
- *Gtpax6A* i *Gtpax6B* s'expressen al Sistema Nerviós Central de les planàries adultes, marcant els ganglis cefàlics i els cordons nerviosos. *Gtpax6B* presenta, però, uns nivells d'expressió més baixos.
- S'ha detectat mRNA dels gens *Gtpax6A* i *Gtpax6B* tant a les cèl·lules fotoreceptores com a les cèl·lules pigmentàries dels ulls de planàries per *in situ* analitzades en TEM.
- Suggestim un paper important dels gens *Pax6* de planàries en la formació de les estructures neurals. Durant el procés de regeneració, l'expressió d'ambdós gens *Pax6* s'activa ràpidament en forma de dues taques intenses a la zona d'amputació dels cordons nerviosos antics. A mesura que avança el procés de regeneració el senyal d'expressió de *Gtpax6A* ens ha permès fer un seguiment del procés de regeneració dels ganglis cefàlics. Al final del procés de regeneració l'expressió de *Gtpax6A* torna als seus nivells basals.
- La inactivació dels gens *Gtpax6A*, *Gtpax6B* i una combinació d'ambdós gens mitjançant la tècnica d'RNAi a les dues espècies estudiades no provoca la inhibició de la regeneració dels ulls. Tampoc s'inhibeix o es modifica el patró d'expressió dels gens *Gtsix1* i *Gtops*, ni hem pogut detectar cap alteració en el sistema nerviós central amb aquesta tècnica.
- Hem comprovat que la tècnica d'RNAi provoca un forta reducció dels nivells de mRNA dels gens *Pax6* de planària, però no la inhibició completa i es podria hipotetitzar un mecanisme dosi-independent de l'activitat dels gens *Pax6* a planàries.
- Els gens *Gtpax6A/Djpax6A* i *Gtpax6B/Djpax6B* no serien components essencials en la xarxa gènica que controla la determinació i diferenciació dels ulls de planàries durant el procés de regeneració. Suggestim que altres gens poden compensar o substituir l'activitat d'aquests durant el procés de regeneració dels ulls a planàries.

F. BIBLIOGRAFIA



A

Aretz D. (2003). Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol* **7** , 563-71.

Aretz D., Tenk C, Pata MI., Doretsij A. and Witt J (2002). Development of pigment-cup eyes in the polychaete *Platynereis dumerilii* and evolutionary conservation of larval eyes in Bilateria. *Development* **9** , 1143-54.

Abram R. and Grö P. (2001). Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr Opin Cell Biol* **3** , 706-14.

B

B (2002). Talking about regeneration. *Nature*. **3**, 13.

B R and R. (1981). Quantitative análisis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planaria *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia* **8** , 181-194.

B et al (1990) Growth, degrowth and regeneration as developmental phenomena in adult freshwater planarians. In: Marthy H-J ed. *Experimental Embriology in Aquatic Plants and Animals*, 129-162. New York: Plenum Press.

B St E. and All C. (1989). Regeneration and pattern formation III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development* **9** , 77-86

B St E., R and R., Gaci and Z B and A. M (1994). Regeneration and pattern formation in planarians: cells, molecules and genes. *Zool. Sci.* **1** , 781-795.

B J R., Cillip E., M A. and St E. (1997). Planarian Hox genes: novel patterns of expression during regeneration. *Development* **2** , 141-8.

B h, J A., B E. L., B l. E., S., Nüg D. O. and B h K A. (1999). The nop-1 gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **9** , 8034-9.

B N. M B O T., G r G. L. and M i c k J M (1997). The *Drosophila* eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development* **2** , 4819-26.

B N. M Leier and M Bar, S. (1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **2** , 379-95.

B N S h A., M r, M Near, A. and M (2002). Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev* **6** , 2958-70.

B ar, C. A., C r e y N., E n g y H Sicilia M J and K J (1996). Cloning of the human SIX1 gene and its assignment to chromosome 14. *Genomics* **33**, 140-2.

B a, H R. and M J E. C. (2000). Structure. Rhodopsin sees the light. *Science* **9** , 733-4.

B t p., M bi, A. and Bielli, E. (1996). Cloning and characterisation of two chick homeobox genes, members of the six/sine oculis family, expressed during eye development. *Int J Dev Biol* **Sp1** , 73S-74S.

B ed V. (1969). Planarian regeneration, Pergamon Press, Oxford.

BIOGRAFIA

B.D., B.R.R.R.R. (1997). Cell-, tissue-, and position-specific monoclonal antibodies against the planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*. *Histochem Cell Biol* **10** , 139-49.

B.Q.T., Z.R.P.E., L.H.H.D.B. N. M (2000). Molecular analysis of *Drosophila* eyes absent mutants reveals features of the conserved Eya domain. *Genetics* **5** , 709-20.

C

C.HartsP., M.R., G. d.Gelg/WU (1997). PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci* **2** , 483-532.

C.HartsP., LegS., CleatsJ.Bg , **C., Cried., B.Wfu**
IsbH.F. Strp.R. (2001) *Drosophila* Pax-6/eyeless is essential for normal adult brain structure and function. *J Neurobiol* **5**, 73-88.

C.HartsP., M.A. M.GlaS., C **silC., SpLi, W.GelgW**
J.SbE. (1999). Isolation and expression of a Pax-6 gene in the regenerating and intact Planarian *Dugesia (G)tigrina*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **9** , 558-63.

C.A., HeteinV. d.RorR. (2005). The embryonic development of the triclad *Schmidtea polychroa*. *Dev Genes Evol* **3** , 109-31.

CebJ.F.B.D., ReigS. d.RorR. (1999). Intercalary muscle cell renewal in planarian pharynx. *Dev Genes Evol* **2** , 249-53.

CebJ.F.N.M.T.A.LedK.Hi, T. dAgK (2002). Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev Growth Differ* **4** , 135-46.

CebJ.F.VipB.D., CarS., NeupP. d.RorR. (1996). Myosin heavy chain gene in *Dugesia (G.) tigrina*: a tool for studying muscle regeneration in planarians. *Int J Dev Biol* **Sp1** , 177S-178S.

ChJ.R., A.M.Z.M.G. (1997). Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* **9** , 893-903.

ChJ.R., M.R., G. Z.M.G. (1999). Signaling by the TGF-beta homolog decapentaplegic functions reiteratively within the network of genes controlling retinal cell fate determination in *Drosophila*. *Development* **3** , 935-43.

Chytte, BN., GreerP. J.MirK.Gare **r.HeteinV. d.S. L.**
(1994). The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* **2** , 977-96.

ChN. d.EipJ.A. (2002). Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* **8** , 41-7.

ChA. D. d.HzHR. (1995). Patterning of the *Caenorhabditis elegans* head region by the Pax-6 family member vab-3. *Nature* **37** , 52-5.

ChR. L., AltC. R., LgR. A. d.HB.A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* **3** , 4213-22.

ChR. L. d.LgR. A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* **7** , 255-96.

Chit. delpC. (2001). Photoreceptor subtype specification: from flies to humans. *Semin Cell Dev Biol* **2** , 509-18.

Ceryt. abgr, M (1995). DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol Cell Biol* **5** , 2858-71.

Ceryt., hr, G., Ker, U., Sb i, A., GehigW abgr, M (1999). twin of eyeless, a second Pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of eyeless in the control of eye development. *Mol Cell* **3**, 297-307.

D

DhE., Gh, H abgr. (1997). Pax genes and organogenesis. *BioEssays* **9** , 755-765

Dm C. (1859). "On the Origin of Species by Means of Natural Selection: or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life." John Murray, London.

Del Rio, G. H abgr. P. A. (1995). Expression of pax-6 during urodele eye development and lens regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** , 5092-6.

DignMcas-F (2005). Organ specification-growth control connection: new insights from the *Drosophila* eye-antennal disc. *Dev Dyn* **22** , 673-84.

DignMcas-F, Güire A, F J Spicar, S. A. abgr, M (2004). Growth and specification of the eye are controlled independently by Eyegone and Eyeless in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* **36**, 31-9.

Dm, A. L. abgr. L. (2004). Conservation and non-conservation of genetic pathways in eye specification. *Int J Dev Biol* **8** , 743-53.

Dm, C., Gh, N abgr, G., C abgr, G. abgr, T. R. (2001). The *Caenorhabditis elegans* Six/sine oculis class homeobox gene *ceh-32* is required for head morphogenesis. *Dev Biol* **26** , 289-303.

Dm, D. abgr, G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* **0** , 358-64.

E

Egrt, T., Gh, H abgr, N., GehigW abgr, M. (1998). Isolation of a *Drosophila* homolog of the vertebrate homeobox gene Rx and its possible role in brain and eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** , 2343-8.

F

Fern M (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* **8** , 651-60.

G

Gaciráz, J, Gh, abgr, E. (1991). Planarian homeobox genes: cloning, sequence analysis, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **8** , 7338-42.

BIOGRAFIA

Gaciráz J, Gruber E. (1993). Genomic organization and expression of the planarian homeobox genes Dth-1 and Dth-2. *Development* **3** , 241-53.

Gehrig W (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science* **26** , 1245-52.

Gehrig W (2004) Historical perspective on the development and evolution of eyes and photoreceptors.). *Int J Dev Biol* **3** , 707-717.

Gehrig W (2005). New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *J Hered* **9** , 171-84.

Gehrig W, After, M, Bigl T. (1994). Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* **6** , 487-526.

Gehrig W, Kerk (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* **5** , 371-7.

Glas S., Cherts P., Mr, G. dGehrig W (1997). Conservation of Pax-6 in a lower chordate, the ascidian Phallusia mammillata. *Development* **2** , 817-25.

Glas S., H.L. Z Gehrig W dH.N. D. (1998). Isolation and developmental expression of the amphioxus Pax-6 gene (AmphiPax-6): insights into eye and photoreceptor evolution. *Development* **3** , 2701-10.

Gler, T., W.D. S. dMR. L. (1992). Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat Genet* **2**, 232-9.

Gleeson C., M.T., Gehrig W dGr E. (2003). Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye-specific GFP marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* **0** , 14046-51.

Greig V., Meli, C., Pocialli, I. (1980a). On the role of germ cells in planarian regeneration. I. A karyological investigation. *J Embryol Exp Morphol.* **5** , 53-63

Greig V., Meli, C., Picot E. (1980b). On the role of germ cells in planarian regeneration. II. Cytophotometric analysis of the nuclear Feulgen-DNA content in cells of regenerated somatic tissues.. *J Embryol Exp Morphol.* **5** , 65-76

Gritsky C., Die D. R. dH, R. E. (1995). The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* **2** , 1433-42.

Gritsky C., Hgtt, L. KH ill, R. E., RPA. dBL. (1997). Disruption of PAX6 function in mice homozygous for the Pax6^{Sey-1}Neu mutation produces abnormalities in the early development and regionalization of the diencephalon. *Mech Dev* **6** , 111-26.

H

Mr, G., Cherts P., Fter, S., W of U., Ker, U. dGehrig W (1998). Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during Drosophila compound eye development. *Development* **3** , 2181-91.

Mr, G., Cherts P. dGehrig W (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. *Science* **2** , 1788-92.

Ha, T. A., Die R. J Ruc D. H , Kort, A., MA. P., MG. d Tyc. J (2002). Dach1, a vertebrate homologue of Drosophila dachshund, is expressed in the developing eye and ear of both chick and mouse and is regulated independently of Pax and Eya genes. *Mech Dev* **1** , 75-87.

Chen, T. A., Rebay, D., Janssens, J.M.G., Oliver, G., Treier, M., Li, A. B., and Cohen, J. (1999). Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. *Genes Dev* **3** , 3231-43.

Hiringer, P., Chih, D., Saiz, S.M., and Cohen, J. (1993). Genetic and cytogenetic analysis of the 43A-E region containing the segment polarity gene *costa* and the cellular polarity genes *prickle* and *spiny-legs* in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **35** , 105-15.

Hir, R. E., Jiang, J., and Cohen, J. (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* **35** , 522-5.

Jiang, J., Jiang, C., and Cohen, J. (1986). Small eyes (*Sey*): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* **9** , 95-110.

J

Jiang, C., Jiang, L., and Cohen, J. (2003). Two Pax genes, *eye gone* and *eyeless*, act cooperatively in promoting Drosophila eye development. *Development* **30** , 2939-51.

Jiang, M., and Cohen, J. (1998). *Lune/eye gone*, a Pax-like protein, uses a partial paired domain and a homeodomain for DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **9** , 13720-5.

K

Kawaguchi, T., and Cohen, J. (1996). Identification and expression of six family genes in mouse retina. *FEBS Lett* **39** , 259-63.

Kawaguchi, T., and Cohen, J. (2000). Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays* **2** , 616-26.

Kawaguchi, T., and Cohen, J. (1998). Overexpression of the forebrain-specific homeobox gene *six3* induces rostral forebrain enlargement in zebrafish. *Development* **12** , 2973-82.

Kawaguchi, T., and Cohen, J. (2003). Role of Pax genes in eye evolution: a cnidarian PaxB gene uniting Pax2 and Pax6 functions. *Dev Cell* **5** , 773-85.

Kawaguchi, T., and Cohen, J. (1999). Molecular cloning and expression of the human and mouse homologues of the Drosophila *dachshund* gene. *Dev Genes Evol* **9** , 537-45.

Kawaguchi, T., and Cohen, J. (1991). Expression pattern of zebrafish *pax* genes suggests a role in early brain regionalization. *Nature* **35** , 267-70.

Kawaguchi, T., and Cohen, J. (2002). Headless flies produced by mutations in the paralogous Pax6 genes *eyeless* and *twin of eyeless*. *Development* **12** , 1015-26.

BIOGRAFIA

L

Läär, P., Riegr, P., Bj (2000). Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth *macrostomum* sp.: a bromodeoxyuridine analysis. *Dev Biol.* **5** , 231-41.

Li, X., Peris, V., Li, F., Re, D., W. Reib, M. G. (2002). Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science* **2** , 1180-3.

Lidri, B., P., M. G. (1997) Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* **2** , 141-50.

Lö, F. (1995) Cloning of *Lineus sanguineus* gene homologous to Pax6. Tesi doctoral. Biozentrum. Basel Universität.

Lö, F., K. G. M., M. G. H. G. V. (1996). Isolation of a Pax-6 homolog from the ribbonworm *Lineus sanguineus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **9** , 2658-63.

Lö, F., M. R., W. C. M., H. A., M. H. J. (1998). Six3, a medaka homologue of the *Drosophila* homeobox gene *sine oculis* is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye. *Mech Dev* **7** , 159-64.

Lö, F., M. R., S., M. H. J. (1999) Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* **5** , 649-654.

M

M. H. P., I. M. G. G. V., M. R., S. C., S. P. L., M. G., O. R. B. P. A. d. R. A. (2000). FGF10 is an inducer and Pax6 a competence factor for lacrimal gland development. *Development* **7** , 2563-72.

M. R. d. S. C. T. M. P. (1994). A class act: conservation of homeodomain protein functions. *Dev Suppl.* 61-77.

M. L., R. L., D. R. P., G. R. V., S. M. T. T. A., S. E. B. S. R. (2004). Djeyes absent (*Djeya*) controls prototypic planarian eye regeneration by cooperating with the transcription factor *Djsix-1*. *Dev Biol* **9** , 346-59.

M. G., S. H. M. R. G. M. (1994). *dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* **9** , 3473-86.

M. J. T., A. R. P. d. R., A. B. P. N., S. C. T. J., R., G. L. E. F. d. G. R. P. (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **6** , 43-55.

M. M. (2005) Caracterització funcional d'elements conservats de la via Wnt en la regeneració cefàlica de planàries. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona

M. R. P., H. G. R. i. B. A., M. A. d. i. C. J. M. (1997). The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* **38** , 603-7.

M. G. i. P. W. R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **6** , 283-302.

M. J. H. (1898). Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. *Archiv für Entwicklungsmechanik der organismen* **7** , 364-397.

M. A., M. C. i. A., M. i. e. S. A., B. e. P. d., P. R., R. e. R. R. d. S. E. (1998). Characterization of platyhelminth POU domain genes: ubiquitous and specific anterior nerve cell expression of different epitopes of GtPOU-1. *Mech Dev* **6** , 127-40.

N

- Nagl, G., Ollig, D., Wierig, S., Adimi, N., Brühl, P., Ollig, D., Berg, E. (2002). Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* **295**, 2395-8.
- Nagl, G., Sella, T., Wierig, S., Adimi, N., Brühl, P., Ollig, D., Berg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13940-5.
- Nave, A., Sánchez-Alcaraz, G. (2000). Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol* **221**, 142-53.
- Niimi, T., Seiring, U., Fister, S., Gehrig, A. (1999). Direct regulatory interaction of the eyeless protein with an eye-specific enhancer in the sine oculis gene during eye induction in Drosophila. *Development* **126**, 2253-60.
- Nielsen, E. (1996). Eye ancestry: old genes for new eyes. *Curr Biol* **6**, 39-42.
- Nielsen, E. (2004). Eye evolution: a question of genetic promiscuity. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 407-14.
- Nip, N., Heng, D., M. (2004). A conserved developmental program for sensory organ formation in Drosophila melanogaster. *Nat Genet* **36**, 293-7.
- Nigam, T., K. (2001). Position-specific and non-colinear expression of the planarian posterior (Abdominal-B-like) gene. *Dev Growth Differ* **12**, 177-84.
- Nielsen, E. (1993). Evolution and role of Pax genes. *Curr Opin Genet Dev* **3**, 595-605.
- Nosé, S., Claret, M., Pedraza, M., Izpisua-Belmonte, J., Izpisua-Belmonte, J. (1998). Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mech Dev* **7**, 185-96.
- Nosé, S., Driessens, A., Belmonte, J. (2000). Early development of the Drosophila mushroom body: the roles of eyeless and dachshund. *Development* **127**, 3475-88.
- O
- Othman, S., Tsiganos, S., Othman, S., Tsiganos, S. (1999). Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya. *Mol Cell Biol* **19**, 6815-24.
- Ollig, D., Berg, E., Fister, R., Wierig, S., Gehrig, A. (1996). Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3. *Mech Dev* **6**, 233-9.
- Ollig, D., Berg, E., Fister, R., Wierig, S., Gehrig, A. (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* **121**, 4045-55.
- Othman, S., Tsiganos, S., Gehrig, A. (2002). Conservation of Pax 6 function and upstream activation by Notch signaling in eye development of frogs and flies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2020-5.
- Othman, S., Tsiganos, S., Gehrig, A. (1999). The planarian HOM/HOX homeobox genes (Plox) expressed along the anteroposterior axis. *Dev Biol* **208**, 456-68.

BIOGRAFIA

Orii, H, Shio T., Wu K (2005) Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Genes Evol.* **215**, 143-57

P

Pbergl. (1990) Stem cells in microturbellarians. An autoradiographic and immunocytochemical study. *Protoplasma* **105**, 109-120.

Pei, Y, F, R, H, J, A. (1970). The prenatal development of the mouse eye. *Anat Rec* **68**, 105-25.

Pigg, M, Z. (2004). Cubozoan jellyfish: an Evo/Devo model for eyes and other sensory systems. *Int J Dev Biol* **38**, 719-29.

Pig, F, H, Z, K, Xia, G, R, P. A. and S. L. (1997). The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell* **90**, 881-91.

P, C., Seig, M, F, ter, S., Gehrig, W, J, and P, S. (2002). Differential interactions of eyeless and twin of eyeless with the sine oculis enhancer. *Development* **129**, 625-34.

P, cell. (2002). Genes involved in early development of the mouse sensory placodes. Thesis, Harvard University.

Q

Q, R., Wu, J., K. ter, U., Gehrig, W. (1994). Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* **264**, 785-9.

R

R, eid, P., Kan, C., Steintz, D., F, B, E, O, Str, E., J, M, G., H, J, R, S. (2003). Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature* **424**, 295-298

Reter, M, G, G, M. (1996). Neuronal signal substances in asexual multiplication and development in flatworms. *Cell Mol Neurobiol* **6**, 591-616.

Reter, M, G, G, M, Shih, M, Fe rein, N., H, D., Wu, A. G. and S, C. (1995). The nervous system of Tricladida. II. Neuroanatomy of *Dugesia tigrina* (Paludicola, Dugesidae): an immunocytochemical study. *Invert Neurosci* **1**, 133-43.

Ri, B, M. (1990). Cariologia, sistemática i biogeografia de les planàries d'aigües dolces als Països Catalans. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.

Riegr. R., Tjer, S., Little, J, H, rip, E., G, J. (1991) Platyhelminthes: Turbellaria. In *Microscopic anatomy of invertebrates*, Vol. 3: Plathelminthe and Nemertinea (ed. F.W. Harrison and B.J. Bogitsch), pp. 7-140. New York: Wiley-Liss

Ri, r, ill, d., Pa, j, L, M, Ribra, C., di, l, i, J., G, J, Rit, d., M. (2002). A phylogenetic analysis of myosin heavy chain type II sequences corroborates that Acoela and Nemertodermatida are basal bilaterians. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11246-51.

S

- Schmitt, O., Orii, H., & Krieger, M.** (2000). Organization and reorganization ability of spontaneous supernumerary eyes in planarians-eye regeneration field and pathway selection by optic nerves. *Zool. Sci.* **17** , 375-381.
- Schmitt, O.** (2004). Control genético del desarrollo del ojo. *Investigación y Ciencia*. Octubre 2004, 54-66.
- Schmitt, O. & Jäger, H.** (1984). Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia* (*G.*) *tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *J Embryol Exp Morphol* **8** , 63-80.
- Schmitt, O. & Jäger, H.** (1985). Cell movement in intact and regenerating planarians. Quantitation using chromosomal, nuclear and cytoplasmic markers. *J Embryol Exp Morphol* **9** , 57-70.
- Schmitt, O. & Jäger, H.** (1989). Regeneration and pattern formation in planarians. II. Local origin and role of cell movements in blastema formation. *Development* **101** , 69-76.
- Schmitt, O. & Jäger, H.** (2002). Regeneration in planarians and other worms: New findings, new tools, and new perspectives. *J Exp Zool* **291** , 528-39.
- Schmitt, O., Piesch, D., Mäkelä, M., & Greig, V. & Rötter, R.** (2002). Genetic network of the eye in Platyhelminthes: expression and functional analysis of some players during planarian regeneration. *Gene* **291** , 67-74.
- Setti, A., Rötter, R., Deri, P., & Rötter, R. & Serile, J.** (1998). Expression of DjY1, a protein containing a cold shock domain and RG repeat motifs, is targeted to sites of regeneration in planarians. *Dev Biol* **198** , 217-29.
- Setti, A., Rötter, R., Deri, P. & Rötter, R.** (2000). An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians. *Dev Dyn* **218** , 603-14.
- Süß, P., Plan, L. V., & Egelhaaf, M.** (1977). "On the evolution of photoreceptors and eyes." Plenum, New York.
- Sáiz, A. & Plan, L. V.** (2003). The freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*: embryogenesis, stem cells and regeneration. *Curr Opin Genet Dev* **13** , 438-44.
- Schmitt, O., Rötter, R., Lee, M., Egelhaaf, M., & Rötter, R. & Greig, V. & Rötter, R.** (1996). Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* **86** , 71-82.
- Schmitt, O. & Greig, V.** (2000). The *Drosophila* homeobox gene *optix* is capable of inducing ectopic eyes by an *eyeless*-independent mechanism. *Development* **127** , 1879-86.
- Sehgal, H. C., Curtis, J. R., & Mahajan, S. A.** (1999). Six class homeobox genes in *Drosophila* belong to three distinct families and are involved in head development. *Mech Dev* **8** , 127-39.
- Sehgal, H. C., Drivas, E., & Mahajan, S. A.** (1998). Expression of two zebrafish homologues of the murine *Six3* gene demarcates the initial eye primordia. *Mech Dev* **7** , 45-57.
- Sereno, M. A. & O'Keefe, J. E.** (1994). *sine oculis* is a homeobox gene required for *Drosophila* visual system development. *Genetics* **146** , 1137-50.
- Sereno, M. A. & O'Keefe, J. E.** (1997). Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed *dachshund* expression. *Development* **123** , 45-52.

Wrt, R. D. F. (1993) Pattern formation in the Drosophila retina. In *The development of Drosophila melanogaster*, ed. M. Bate, A. Martínez-Arias. Cold Spring Harbor, 1277-1325.

Wrt, L. (2002) *Principles of Development*. 2nd edition Oxford Univ. Press.

X

Xu, P. X., and Peters, H. B. **Wang, M. C., and S. C. R.** (1999). Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet* **2** , 113-7.

Xu, P. X., Wang, H. B., and R. L. (1997). Mouse Eya homologues of the Drosophila eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode. *Development* **124** , 219-31.

Z

Zhang, M. P., and H. M. (2000). Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genesis* **28** , 135-42.

Zhang, M. J. (2001). Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development* **128** , 943-57.

Zhang, E., and Li, H. N. M. (2000). Molecular genetic analysis of Drosophila eyes absent mutants reveals an eye enhancer element. *Genetics* **155** , 237-46.

Zhang, M. E., and A. S. W. (1999). Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of XOptx2. *Cell* **98** , 341-52.

