



Facultat de Biologia
Departament de Genètica

Factores y receptores neurotróficos en el pre-vertebrado arquetípico anfioxo

Èlia Benito Gutiérrez

Barcelona, 2005

Factores y receptores neurotróficos en el pre-vertebrado arquetípico anfioxo

Memoria presentada por Èlia Benito Gutiérrez para optar al grado de Doctor en Biología por la Universitat de Barcelona. El presente trabajo se ha realizado en el Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, bajo la dirección del Dr. Jordi Garcia Fernàndez. Programa de Doctorado de Genètica, Bienio 1999-2001

El director

La autora

Dr. Jordi Garcia Fernàndez

Èlia Benito Gutiérrez

*A mis padres y
a mi hermana*

Índice

Introducción

Capítulo I

El anfioxo como modelo	3
Datos paleontológicos	6
Datos embriológicos	8
Datos moleculares	14
El sistema nervioso del anfioxo	18
Factores y receptores neurotróficos	29
Las neurotrofinas	31
Receptores de neurotrofinas	33
Bibliografía	45

Objetivos

Capítulo II	49
-------------	----

Resultados

Capítulo III

Resumen	57
Fuentes M, Schubert M, Dalfo D, Candiani S, Benito E, Gardenyes J, Godoy L, Moret F, Illas M, Patten I, Permanyer J, Oliveri D, Boeuf G, Falcon J, Pestarino M, Garcia-Fernandez J, Albalat R, Laudet V, Vernier P, Escriva H. Preliminary observations on the spawning conditions of the European amphioxus (<i>Branchiostoma lanceolatum</i>) in captivity. <i>J Exp Zool Part B Mol Dev Evol</i> 302, 384-391 (2004)	

Capítulo IV

Resumen	69
Bayascas, J. R., Yuste, V.J., Benito, E, Garcia-Fernández, J & Comella, J.X Isolation of AmphiCASP-3/7, an ancestral caspase from amphioxus (<i>Branchiostoma floridae</i>). Evolutionary considerations for vertebrate caspases. <i>Cell Death and Differentiation</i> 9, 1078-1089 (2002)	

Capítulo V

Resumen	85
Benito-Gutiérrez, E., Nake, C., Ilovera, M., Comella, J.X. & Garcia-Fernández, J. The single AmphiTrk receptor highlights increased complexity of neurotrophin signalling in vertebrates and suggests an early role in developing sensory neuroepidermal cells. <i>Development</i> 132, 2191-2202 (2005)	

Capítulo VI	
Resumen	101
Benito-Gutiérrez, E., Illas, M., Comella, J.X. & Garcia-Fernández, J.	
Outlining the nascent nervous system of <i>Branchiostoma floridae</i> (amphioxus) by the pan-neural marker AmphiElav.	
<i>Brain Res. Bull</i> 66, 518-521 (2005)	
Capítulo VII	
Resumen	109
Benito-Gutiérrez, E., Garcia-Fernández, J., Comella, J.X.	
Origin and Evolution of the Trk family of neurotrophic receptors	
<i>Mol. Cell. Neurosc.</i> , en prensa (2006)	
Discusión general	
Capítulo VIII	
El anfioxo en Evo-Devo experimental	127
AmphiTrk: el único receptor Trk invertebrado	133
Reflexión final y perspectivas	155
Bibliografía	159
Conclusiones	
Capítulo IX	167

CAPÍTULO I

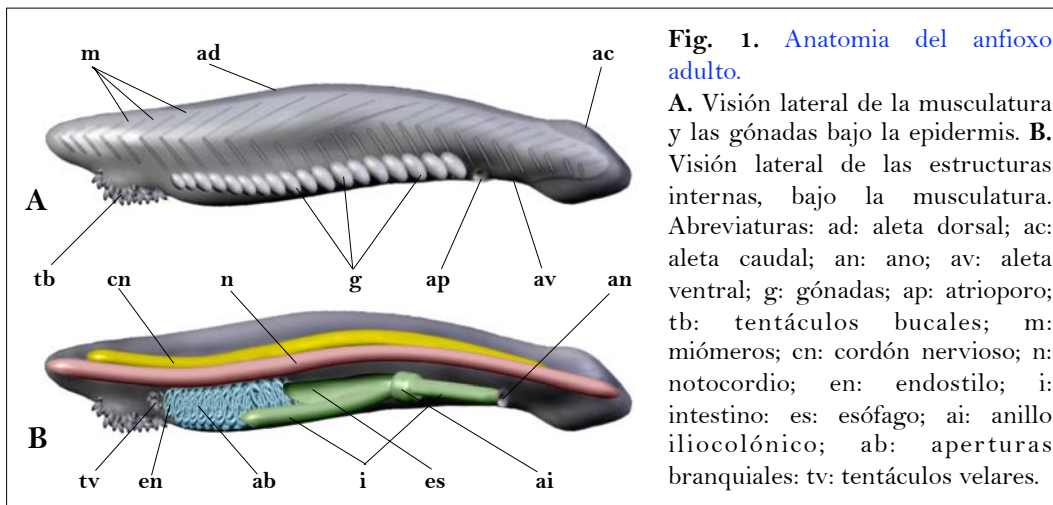


Introducción

El anfioxo como modelo

El anfioxo, comúnmente llamado lanceta debido a la forma de su cuerpo, es un invertebrado marino, que a pesar de su apariencia de pez, se encuentra comprendido dentro del subphylum Cephalochordata (Acrania). Las principales características que lo definen como tal son la presencia de un notocordio, que se extiende a lo largo de todo su eje longitudinal, desde el extremo anterior al extremo posterior; de un tubo neural situado dorsalmente; de una faringe perforada con aperturas branquiales; de miómeros o bloques musculares segmentados (en forma de V); de una cola post-anal; y la ausencia de estructuras craneales (**Fig. 1**). Además, otros rasgos morfológicos a destacar en este organismo son su sistema circulatorio cerrado, representado por extensos vasos sanguíneos contráctiles, no sustentados por un corazón; y su relativamente simple sistema digestivo, formado por una boca, un endostilo responsable de la filtración del alimento, y una glándula digestiva capaz de secretar enzimas a un intestino escasamente regionalizado, que se abre al exterior mediante un ano localizado en la parte postero-ventral del animal (Harris, 1996).

El anfioxo presenta numerosas peculiaridades anatómicas. La estructura de su notocorda no tiene igual en el resto de cordados, incluyendo una de sus principales rarezas que le ha hecho merecedor del nombre cefalocordado, su extensión hasta el extremo más rostral, que incluso sobrepasa la longitud del cordón nervioso en su parte anterior (**Fig. 1B**). Las formas larvarias son notoriamente asimétricas en el eje derecha-izquierda, afectando, por ejemplo, al emplazamiento de la boca, situada en el lado izquierdo, y a la distribución de los

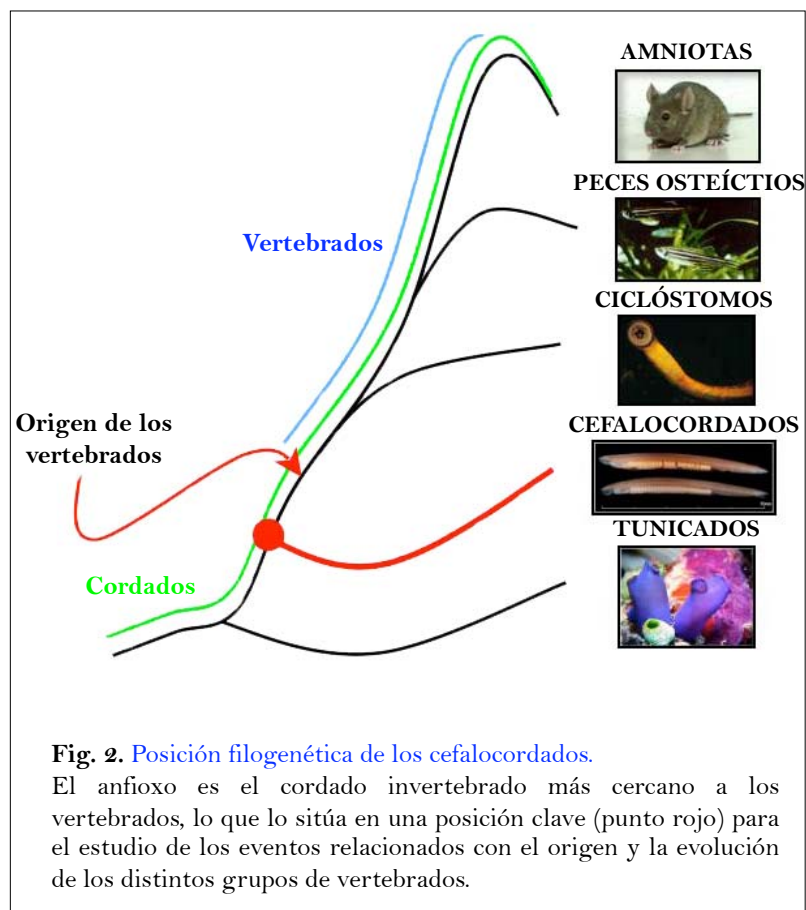


segmentos musculares y nervios. Cabe señalar, no obstante, que la mayor parte de estas estructuras son redistribuidas después de la metamorfosis, que resulta, como ejemplo más representativo, en el reposicionamiento de la boca, ubicada en el adulto medio-ventralmente. La singularidad de su sistema excretor lo aproxima a los invertebrados, ya que está formado por unos 90 pares de nefridios localizados dorsalmente en la región faríngea y conectados a sus dos aortas dorsales. Así como su sistema reproductor, más cercano al de invertebrados, por estar compuesto de gónadas segmentadas, dispuestas a lo largo de los flancos latero-ventrales (**Fig 1A**).

Sin embargo, muchos otros de sus atributos reflejan su semblante con los vertebrados, razón por la cual hace más de doscientos años que es exhaustivamente utilizado en estudios de anatomía y embriología comparada con el objetivo de poder recapitular la historia evolutiva de los vertebrados. Aunque dichas disciplinas constituyeron la herramienta esencial para la clasificación de los diferentes organismos, no sin librar una batalla continua de la predominancia de una sobre la otra, la llegada de la biología molecular marcó un antes y un después abanderando la idea de que el genoma de un organismo también incluye el legado de su historia evolutiva. De modo ilustrativo, datos aportados por el análisis de secuencias de ADN y ARN, y su aplicación en análisis filogenéticos, han sido de inestimable ayuda para resolver la posición del anfibio en el contexto de la evolución en cordados (Holland, 1996). Son numerosas las publicaciones en que el análisis comparativo de diferentes genes sitúa al anfibio en la base evolutiva de los vertebrados (**Fig. 2**). Desde un punto de vista molecular, ello ha

estrechado aún más el vínculo entre el anfibio y el origen de los vertebrados, situando al anfibio en una posición clave para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la evolución hacia los vertebrados, posición que sólo en algunos casos parece ser disputada con los urocordados (Tunicados) (Phillipe *et al.*, 2005). Así, el descubrimiento de los genes del desarrollo y su conservación en diferentes organismos, aportó nuevas interpretaciones sobre las antecedentes teorías lanzadas por Darwin (La Teoría Evolutiva, 1859) o Haeckel (La Recapitulación Haeckeliana, 1866), atribuyendo a los genes un papel clave en el diseño de las diferentes formas de vida existentes. Bajo estas premisas nace, al final del siglo XX, una nueva disciplina, la actualmente llamada “Evo-Devo”, cuya lógica subyacente es muy simple: si la evolución es cambio en morfología, y la morfología depende del desarrollo embrionario, dado que el desarrollo embrionario depende de los genes y redes génicas del desarrollo, entender cómo evolucionan los

genes del desarrollo es clave para entender la evolución (García-Fernández, 2005). Desde este nuevo punto de vista para comprender los procesos evolutivos, la Evo-Devo se nutre e integra de disciplinas tan diversas como la morfología y anatomía, la paleontología, la biología y



genética del desarrollo embrionario, la biología evolutiva, la genética de poblaciones, y en los albores de la era post-genómica, la proteómica y bioquímica de las cascadas de señalización. Aunque no se escapa de cierta polémica en algunos aspectos, la integración de datos, procedentes de fuentes diversas, conduce habitualmente a conclusiones e inferencias más robustas que las resultantes al utilizar dichas aproximaciones de manera independiente.

DATOS PALEONTOLÓGICOS

Actualmente, la explosión Cámbrica (aprox. 550 MA) es considerada una etapa clave en la historia evolutiva de los metazoos. El registro estratigráfico sitúa en este período geológico un masivo incremento de la diversidad animal (Conway-Morris, 2000a). La aparición de diferentes patrones corporales, ya sea en animales de cuerpo blando o en los que adquirieron estructuras duras, e indicios de actividad locomotora compleja (huellas fosilizadas), son algunas de las evidencias desveladas por el yacimiento de Burgess Shale en Canadá (Conway-Morris, 1998). En este contexto, la depredación macroscópica podría haber surgido como resultado de una extrema competencia ecológica, donde aquellos que desarrollaran estructuras duras para defenderse tendrían más posibilidades de sobrevivir. Asimismo, la optimización de órganos filtradores para la captación de alimentos podría haber sido uno de los recursos de los animales bentónicos, que de manera pasiva escaparían a sus depredadores, por su capacidad de mimetizarse u ocultarse en el fondo marino sin tener que renunciar a sus funciones vitales (Conway-Morris, 2000b). Éste último podría haber sido el caso del extinto *Pikaia*, cuyos fósiles muestran gran parecido con el actual anfibio. Su cuerpo, en forma de pez, presenta rastros de aperturas branquiales, miótomos en forma de V, distribuidos de forma seriada a lo largo de su eje antero-posterior, un notocordio dorsal, ligeramente desplazado hacia la parte posterior (sin llegar al extremo rostral), y estructuras rostrales que recuerdan a los cirros bucales del anfibio (Jefferies, 1986). En base a dichas características morfológicas, *Pikaia* es considerado un ancestro de los vertebrados, y se hipotetiza que sus hábitos y comportamiento podrían haber sido similares a los del actual anfibio, nadador facultativo aunque principalmente bentónico, semi-enterrado en el fondo marino (Holland y Chen, 2001).

Algunos de los fósiles descubiertos en el yacimiento de Chengjiang, en China, relatan una historia similar a la de Burgess Shale. En este sentido, el único fósil hallado de *Cathaymyrus* ha sido aclamado como el *Pikaia* chino, pero 10 MA más antiguo (Shu *et al.*, 2001). Particularmente interesante es la mezcla de caracteres observados en los fósiles de *Yunnanzoon*, *Haikouella* y *Haikouichthys*, a caballo entre cefalocordados y vertebrados. Aunque *Yunnanzoon* y *Haikouella* parecen ser más primitivos (argumento basado en su parecido al anfibio) que *Haikouichthys*, todos ellos han sido propuestos como craniados basales, a pesar de la ausencia de estructuras craneales aparentes (Mallatt y Chen, 2003). En el caso de *Haikouichthys*, su parentesco directo con el anfibio de su época se ha señalado en base a la posición frontal (no lateral) de sus ojos, que podría ser derivado del ojo frontal del anfibio, y en la retención de metamerismo gonadal, obvio en el anfibio actual, defendiéndolo como rasgo primitivo de pre-vertebrado (Shu *et al.*, 2003).

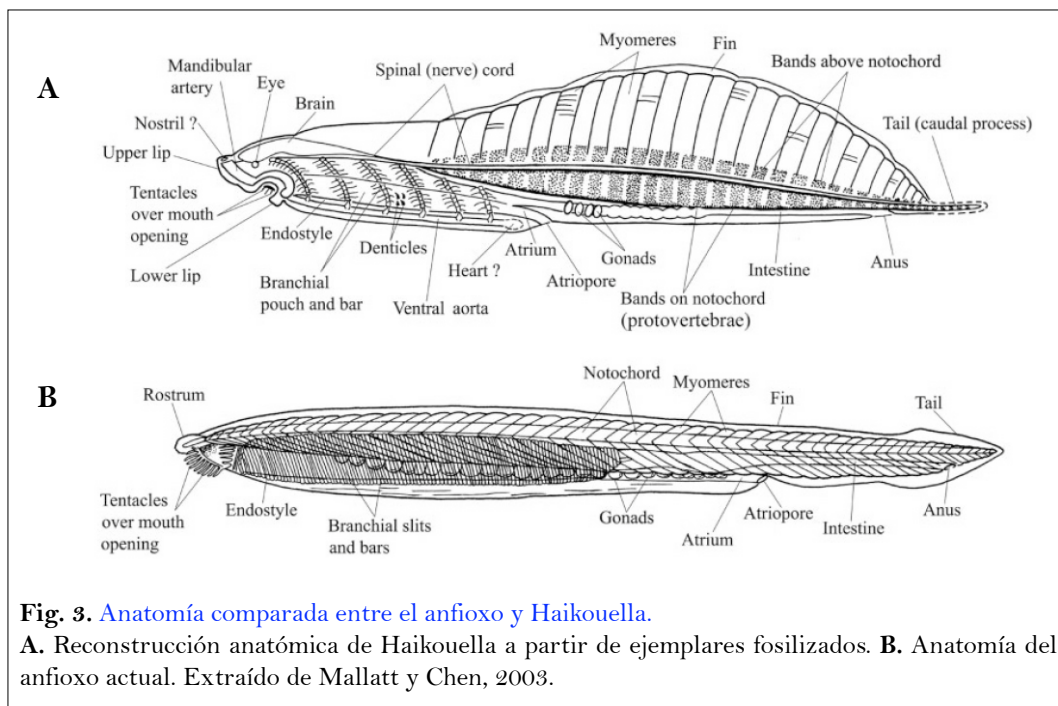


Fig. 3. Anatomía comparada entre el anfibio y *Haikouella*.

A. Reconstrucción anatómica de *Haikouella* a partir de ejemplares fosilizados. **B.** Anatomía del anfibio actual. Extraído de Mallatt y Chen, 2003.

El registro fósil es aún insuficiente para fechar con exactitud el origen de los vertebrados. La parcialidad de los fósiles hallados, la escasez de especies intermedias y las discrepancias en la estima temporal proporcionada por relojes moleculares, son todavía objeto de controversia. Sin embargo, el consenso

paleontológico indica que el ancestro de los vertebrados fue un organismo de características muy similares a las de la forma adulta del anfioxo actual.

DATOS EMBRIOLÓGICOS¹

Aunque hace ya más de doscientos años de la primera descripción de un espécimen de anfioxo, equívocamente catalogado como molusco (Pallas, 1774), no fue hasta el año 1867 cuando se describió su desarrollo embrionario. El tratado escrito por el embriólogo Kowalesky, además de sentar precedente, atrajo la atención de otros embriólogos, cuya contribución al respecto fue de inestimable valía. Tanto es así, que los tratados de Hatscheck (1881-1893), de Cerfontaine (1906) y del mismo Kowalesky (1867) son todavía referencia obligada para cualquier estudio relacionado con este organismo. No obstante, aunque detalladas, dichas descripciones son aún incompletas y son numerosas las discrepancias entre los diferentes autores.

DESARROLLO TEMPRANO

Como en la mayoría de mamíferos, anfibios y peces, un oocito de anfioxo es susceptible de ser fecundado cuando su núcleo todavía es diploide, antes de completar el ciclo de divisiones meióticas. Durante la segunda metafase, el oocito alcanza la madurez para ser penetrado por el espermatozoide, justo cuando un único corpúsculo polar es visible en el exterior de la membrana. Como en la mayoría de organismos con fecundación externa, el riesgo de poliespermia, es decir, la fecundación de un oocito por más de un espermatozoide, es muy elevado. Por este motivo, existe un gran porcentaje de embriones anormales que difícilmente llegan a eclosionar. Un efecto que es a su vez compensado por la ingente cantidad de huevos y espermatozoides que estos animales arrojan en el mar, durante su época reproductiva. La fusión entre el espermatozoide y el oocito provoca una elevación de la membrana externa del último (llamada membrana de fertilización o membrana vitelina), indicativo de la correcta formación inicial del cigoto, que como norma general mide unos 100-120 μm , y es isolecítico (vitelo homogéneamente distribuido).

¹ En este apartado, excepto cuando se indica la referencia, la información procede de: Hatscheck, 1893; Stokes y Holland, 1995; Presley *et al.*, 1996; Whittaker, 1997; y observaciones propias.

Una vez formado el cigoto, una serie de rápidas divisiones fragmentan el total de su volumen, de manera holoblástica, en células de menor tamaño (blastómeros). Como en los equinodermos, estas primeras divisiones son radiales y sincrónicas, hasta superar el estadio de 128 células (séptima división), en que el embrión inicia la blastulación (octava división). Durante esta etapa del desarrollo, la cavidad central (blastocelo) que dejan las células al dividirse se expande progresivamente, y de esta manera empuja el grueso celular hacia la periferia (**Fig. 4C**). En este punto el cigoto es una esfera vacía, cuya capa externa es de tipo monoepitelial (**Fig. 4D**). Justo antes de entrar en gastrulación, la blástula pierde su forma totalmente esférica, por achatamiento de uno de sus polos. El polo aplanado (vegetal) se invagina progresivamente, dando lugar a la gástrula, que presenta aspecto de “cazuelita” (o *cup-shape gastrula*, en inglés) (**Fig. 4G**). La capa invaginada crece hacia el interior, en dirección al polo opuesto, generando un surco. A medida que el surco profundiza hacia el interior, en detrimento del tamaño del blastocelo, la capa externa adyacente se cierra poco a poco sobre el mismo (**Fig. 4E-J**). Al final de la gastrulación, el embrión posee dos capas de células, y su cavidad interior (arquenteron) se comunica con el exterior a través del pequeño espacio dejado por el surco inicial, el blastoporo, que determina la parte posterior del embrión (**Fig. 4J**).

Así como en equinodermos y tunicados existen mapas detallados del destino celular durante las primeras etapas del desarrollo temprano, en el anfibio no se tiene una idea más o menos clara hasta alcanzar la etapa de blástula tardía (**Fig. 4D**). Las observaciones de Conklin (1933) describen un mapa muy similar al de las ascidias, incluso en lo que se refiere a la especificación autónoma de sus blastómeros. Siguiendo sus pasos, Tung (1958) realizó experimentos similares, complementándolos con el trasplante de blastómeros entre diferentes embriones, en estadios de blástula o gástrula temprana. Una de sus principales conclusiones rebatía la autonomía de los blastómeros, propuesta por Conklin. Los resultados de Tung mostraban que el cigoto de anfibio tiene una capacidad regulativa mucho mayor que el de ascidias (**Fig. 4A**). Señales inductivas, de procedencia desconocida, coordinan el desarrollo de los hemisferios animal y vegetal, de un modo similar al de los vertebrados, así como el labio dorsal del blastoporo, que es capaz de inducir la formación de un tubo nervioso tras la diferenciación de células precursoras del notocordio (Yan, 1999).

NEURULACIÓN

Hasta alcanzar el estadio de gástrula, el desarrollo embrionario del anfioxo es, en términos generales, típico de un deuteróstomo invertebrado, muy similar al de equinodermos o tunicados. Sin embargo, a partir de la neurulación es marcadamente similar al de los vertebrados.

La formación de la néurula se inicia con un aplastamiento de la parte dorsal de la gástrula tardía. En este estadio, la capa ectodérmica que recubre al embrión ya ha desarrollado cilios que permiten el movimiento rotacional de éste, cuando aún se encuentra dentro del corion, y la natación después de la eclosión, que ocurre durante la neurulación. Durante el aplastamiento dorsal de la gástrula tardía, la invaginación prosigue, en dirección posterior-anterior, y la capa interna de células (hipoblasto) aumenta de tamaño (**Fig. 4J**). La elongación del embrión ocurre simultáneamente con el hundimiento de la línea media dorsal, momento en el que el embrión entra en neurulación. El surco generado se extiende a lo largo del eje antero-posterior del embrión, finalizando en el pequeño blastoporo, que aún permanece abierto (**Fig. 4K-L**). Como en los vertebrados, la base del surco, que en este estadio tiene forma de V, será la superficie ventral del tubo nervioso (placa neural). A medida que el desarrollo de la néurula avanza, los bordes del surco se separan de éste mismo y, por sobre-crecimiento y fusión de ambos lados, forman un arco de tejido ectodérmico sobre la placa neural. Al mismo tiempo, la placa neural en crecimiento se extiende hacia arriba, reuniendo sus dos extremos para formar un tubo nervioso cerrado. El revestimiento del tubo nervioso por el ectodermo se inicia desde la parte posterior y transcurre hasta la parte anterior, en el extremo de la cual permanece abierto a través del neuroporo (**Fig. 4M-N**). El blastoporo, ahora ya cubierto externamente por el ectodermo, permanece como una vía de comunicación con el arquéteron, formando el canal neuroentérico (**Fig. 4N,P**).

En paralelo a estos acontecimientos, el interior de la néurula también sufre muchos cambios. Durante la formación y cierre del tubo nervioso, el notocordio y el mesodermo se desarrollan a partir del epitelio subyacente (placa cordomesodérmica), que forma el techo del arquéteron (**Fig. 4N**). La placa cordomesodérmica se evagina formando tres interdigitaciones: una central, que dará lugar al primordio del notocordio, y dos laterales que representan el primordio de los primeros somitos (futuros bloques musculares o miótomos) (**Fig. 4O**). Es posible que ya en este punto la capacidad inductiva que Tung le

atribuía al primordio del notocordio esté incidiendo sobre la formación del tubo nervioso (Tung *et al.*, 1958). El rudimento del notocordio consta de dos líneas longitudinales de células, todavía separadas por el epitelio de la placa cordomesodérmica, que alberga en su interior una porción de arquéteron. Este canal es progresivamente reducido por el crecimiento de las células precursoras del notocordio, hasta finalmente desaparecer, cuando las células de ambos lados entran en contacto. Cuando aún no se ha formado la parte anterior del notocordio, los primeros somitos (mandibulares) se forman, en los laterales, por enterocelia (**Fig. 4P**). Sin embargo, los somitos posteriores se forman por esquizocelia, a partir del *tail bud*, un mecanismo más característico de vertebrados. Por su parte, el epitelio ventral del arquéteron se dobla sobre sí mismo para formar el tubo digestivo, incluyendo la faringe, y otros derivados endodérmicos (**Fig. 4Q**).

DESARROLLO LARVARIO

Al final de la neurulación y principio del desarrollo larvario, el anfioxo ya satisface, de manera casi perfecta, las características morfológicas que definen la forma primitiva común a todos los embriones de vertebrado, que según Nelsen (1953) posee:

- una estructura elongada, de forma cilíndrica y ligeramente comprimida lateralmente
- cuatro tubos epiteliales formadores de órganos (epidérmico, neural, endodérmico y mesodérmico) dispuestos alrededor de un eje primitivo: el notocordio
- un cuerpo regionalizado: cabeza, área faríngea, tronco y cola

A lo largo del desarrollo larvario el notocordio, el tubo nervioso y los somitos siguen desarrollándose, a medida que el cuerpo del embrión aumenta de longitud, en dirección antero-posterior. Cabe señalar que la parte del notocordio situada en el extremo rostral del animal no se desarrolla hasta alcanzar el estadio de larva temprana. En vertebrados, el desarrollo del notocordio no supera esta fase de crecimiento en dirección postero-anterior, hasta alcanzar el extremo rostral, ésta es otra de las peculiaridades del anfioxo. Mientras tanto, la parte anterior del tubo neural se hincha progresivamente para formar la vesícula cerebral (**Fig. 5**).

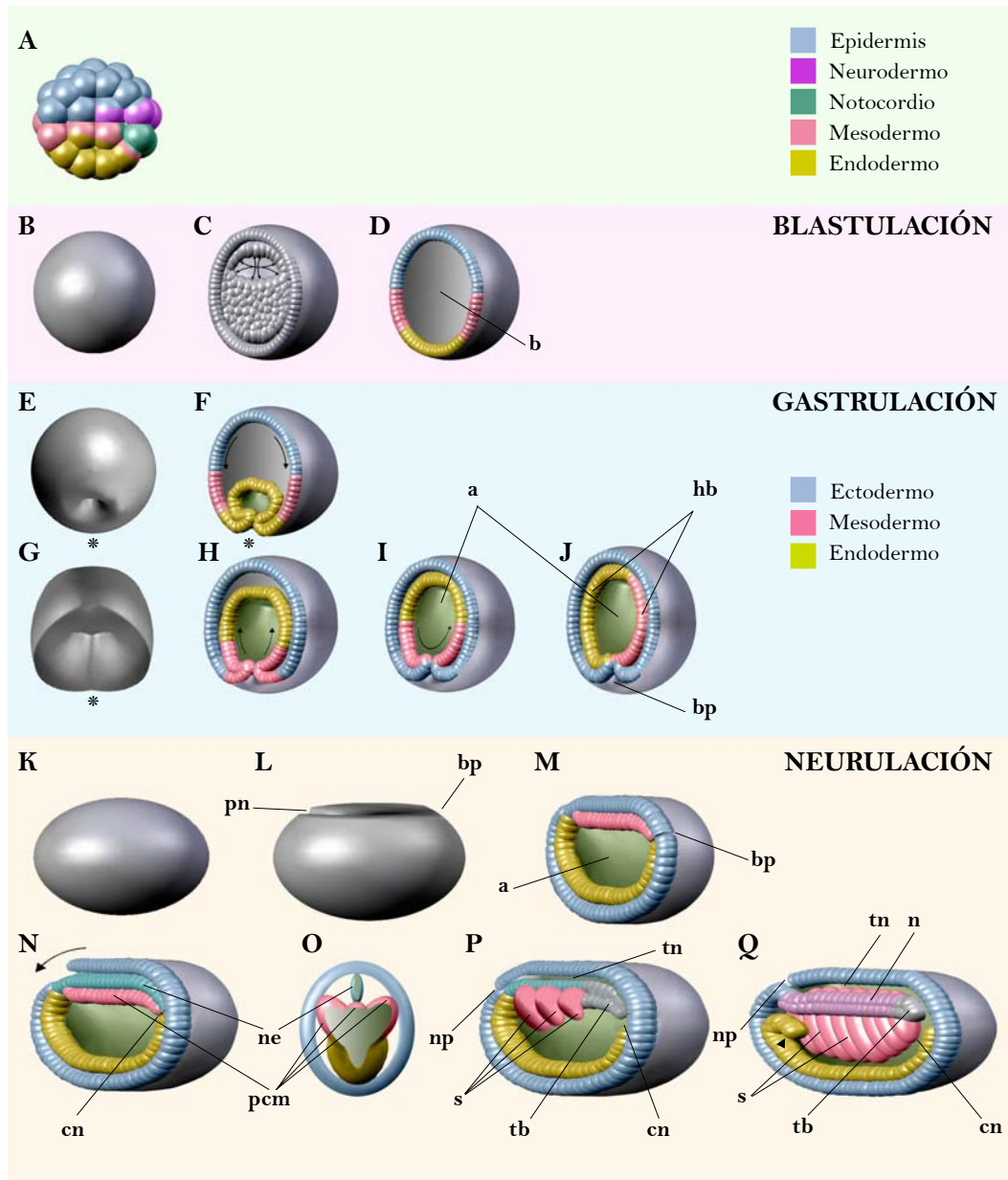


Fig. 4. Desarrollo temprano del anfibio.

A. Mapa de destino celular, propuesto por Tung, en el embrión de 32 células. Basado en Yan, 1999. B. Aspecto externo del embrión en estadio de blástula. C. Sección transversal de la blástula, cuando el blastocelo se empieza a desarrollar. D. Sección transversal de la blástula tardía, cuando el embrión es una esfera vacía, donde el lumen está plenamente ocupado por el blastocelo (b). E. Aspecto externo de la gástrula temprana, cuando se inicia la invaginación en su polo vegetal (*). F. Sección transversal de la gástrula temprana. G. Aspecto externo de la *cup-shape gastrula*. H-J. Secciones transversales de la gástrula, hasta alcanzar su etapa tardía. (Continúa pág. siguiente)

Los cambios más acusados durante estas etapas del desarrollo se observan principalmente en la parte anterior de la larva, donde parte del epitelio del tubo digestivo se evagina para formar dos divertículos (ver inicio del proceso en **Fig. 4Q**). El divertículo derecho genera el celoma anterior de la larva, mientras que el izquierdo forma una cavidad que se abre al exterior por una pequeña abertura. Dicha abertura, denominada fosa pre-oral (*pre-oral pit*, en inglés), antecede la formación de la boca larvaria, justamente localizada detrás de la fosa, en el mismo lado izquierdo. El extremo opuesto del divertículo izquierdo, subyacente al notocordio, forma por su parte los primordios de la fosa de Hatscheck (*Hatscheck's pit*, en inglés) y del *wheel organ*, que en el adulto se encuentra localizado en el interior del espacio bucal. La boca se forma por engrosamiento del endodermo y fusión con el ectodermo adyacente. De la misma manera, pero en el lado opuesto, el endodermo de la derecha crece hasta alcanzar el lado izquierdo, donde se fusiona con el ectodermo para comunicar con el exterior la glándula recién formada, que se caracteriza por tener aspecto de “bastoncillo” (*club-shaped gland*, en inglés). El sobrecrecimiento de la parte anterior de la región faríngea genera el endostilo, localizado justo delante de la *club-shaped gland*.

(Continuación pie de **Fig. 4. Desarrollo temprano del anfiexo**)

La capa invaginada crece hacia dentro ampliando el arquéteron (a) en su interior. **K.** Aspecto externo elipsoidal de la néurula temprana. **L.** Aspecto externo que muestra la néurula una vez generado el surco de la línea media dorsal que da lugar a la placa neural (pn). **M.** Sección longitudinal de la néurula en L. **N.** Sección longitudinal de la néurula en el estadio en que el ectodermo se cierra sobre la placa neural. **O.** Sección transversal de la néurula que muestra el desarrollo de las estructuras internas: formación del tubo nervioso y del notocordio y somitos a partir de la placa cordomesodérmica (pcm). **P.** Sección longitudinal de una néurula más avanzada, en la que el tubo nervioso está cerrado y ya se han formado los primeros somitos (el notocordio está escondido detrás de los somitos). **Q.** Sección longitudinal de la néurula tardía. Por simplicidad se representan solo los somitos de un lado, así dejándose ver el notocordio. En este estadio el epitelio ventral del arquéteron se dobla sobre sí mismo para formar el tubo digestivo y otros derivados endodérmicos. Abreviaciones: a: arquéteron; b: blastocelo; bp: blastoporo; cn: canal neuroentérico; n: notocordio; ne: neuroectodermo; np: neuroporo; pn: placa neural; pcm: placa cordomesodérmica; s: somitos; tb: *tail bud*; tn: tubo nervioso. En los estadios de blástula y gástrula el polo animal se encuentra arriba y el polo vegetal (*) abajo. En los estadios de néurula anterior está a la izquierda y posterior a la derecha. Las flechas en la figura indican la dirección del movimiento de las diferentes capas embrionarias. Excepto cuando se indica, el código de colores es el mismo para los estadios de blástula, gástrula y néurula, y en el embrión de 32 células está indicado en la leyenda propia.

Una de las características diferenciales de la larva de anfibio es su marcada asimetría. Durante la metamorfosis, gran parte de sus órganos y estructuras son redistribuidas con el objetivo de desarrollar un adulto prácticamente simétrico. Las primeras hendiduras branquiales (primarias) se forman de la misma manera que lo hace la boca. Se generan en la línea media ventral, pero sólo las primeras migran hacia el lado derecho, donde se fusionan con el ectodermo para abrirse al exterior. De las restantes, aproximadamente la mitad degeneran durante la metamorfosis y la otra mitad migra hacia el lado izquierdo, donde se abren al exterior de la misma manera que las primeras. En el transcurso de la metamorfosis las hendiduras branquiales secundarias se generan y abren en el lado derecho. Ya en el adulto se forman las hendiduras branquiales terciarias, que se desarrollan a ambos lados, manteniendo la simetría lograda durante la metamorfosis. Las reorganizaciones durante este período del desarrollo también incluyen el reposicionamiento medio-ventral de la boca y desaparición de la fosa pre-oral, así como la migración del ano desde el lado derecho al lado izquierdo, junto a la línea media ventral. En un plano sagital, la larva post-metamórfica es totalmente simétrica (**Fig. 5F**), sin embargo los miótomos de la izquierda siguen avanzados, aproximadamente medio miómero, respecto a los miómeros del lado derecho, un rasgo que aún es más evidente en el adulto. La asimetría de la larva ha sido esgrimida como carácter únicamente invertebrado. No obstante, el anfibio, presenta en general una simetría bilateral muy similar a la de los vertebrados.

DATOS MOLECULARES

TAMAÑO Y COMPLEJIDAD DEL GENOMA

Hasta que fue posible la aplicación rutinaria de técnicas para el análisis de ácidos nucleicos, en los años 80, los estudios genómicos se limitaban al cariotipado y estimación del contenido en ácidos nucleico por fraccionamiento celular. Por entonces, ya se sabía que el genoma del anfibio era mucho menor que el de los vertebrados, pero tres veces mayor que el de los urocordados (Atkin y Ohno, 1967). Aunque actualmente se sabe que la complejidad de un genoma no siempre es proporcional a su tamaño, la visión pionera de Susumu Ohno anticipaba, ya en 1970, con su libro "*Evolution by Gene Duplication*", que el mayor contenido en ADN de los vertebrados podría correlacionarse con un mayor

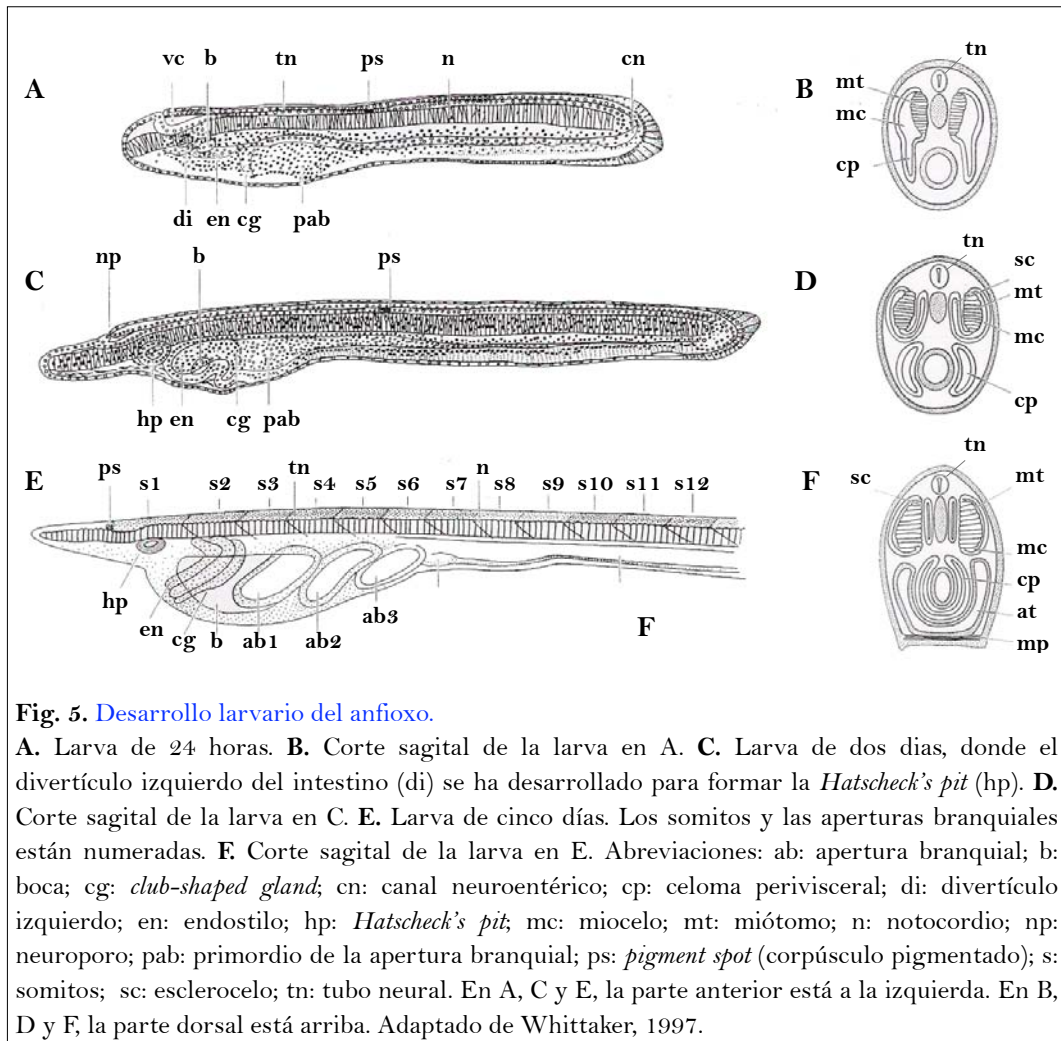


Fig. 5. Desarrollo larvario del anfioxo.

A. Larva de 24 horas. **B.** Corte sagital de la larva en **A.** **C.** Larva de dos días, donde el divertículo izquierdo del intestino (di) se ha desarrollado para formar la *Hatscheck's pit* (hp). **D.** Corte sagital de la larva en **C.** **E.** Larva de cinco días. Los somitos y las aperturas branquiales están numeradas. **F.** Corte sagital de la larva en **E.** Abreviaciones: ab: apertura branquial; b: boca; cg: club-shaped gland; cn: canal neuroentérico; cp: celoma perivisceral; di: divertículo izquierdo; en: endostilo; hp: *Hatscheck's pit*; mc: miocelo; mt: miótomo; n: notocordio; np: neuroporo; pab: primordio de la apertura branquial; ps: pigment spot (corpúsculo pigmentado); s: somitos; sc: esclerocelo; tn: tubo neural. En **A**, **C** y **E**, la parte anterior está a la izquierda. En **B**, **D** y **F**, la parte dorsal está arriba. Adaptado de Whittaker, 1997.

número de genes. Un incremento probablemente resultante de duplicaciones génicas producidas a lo largo de su evolución, confiriendo de esta manera una mayor complejidad a los vertebrados, a nivel de organismo (Ohno, 1999). Según sus propias premisas el anfioxo sería entonces el invertebrado más cercano a los vertebrados, representando el último escalafón evolutivo antes de la aparición de los primeros craniados.

Si bien a mediados del siglo XIX el anfioxo era modelo para estudios de embriología y anatomía comparada, a finales del siglo XX resurgió como una prometedora fuente de información para testar, a nivel molecular, las hipótesis de Ohno entorno al origen de los vertebrados. En la actualidad, la mayoría de

análisis filogenéticos destacan el genoma del anfibio como arquetípico de vertebrado. Sin duda alguna, uno de los hallazgos más determinantes al respecto fue el descubrimiento de un único complejo de genes Hox en el anfibio, en contraposición a los cuatro presentes en los mamíferos hasta la fecha analizados (García-Fernández y Holland, 1994). Los genes de dicho complejo no sólo mostraban similitudes entre los respectivos de las diferentes especies analizadas, sino que también mantenían un paralelismo en sus correspondientes organizaciones cromosómicas. Este paralelismo, además de reavivar el interés por la duplicación génica en un contexto evolutivo, añadía detalles al cuadro esbozado por Ohno. Los análisis del complejo Hox, junto al complejo ParaHox, descrito posteriormente (Brooke *et al.*, 1998), establecían una relación 1:4 o 1:2 al comparar los complejos de anfibio con los correspondientes de mamíferos o vertebrados no mandibulados (lamprea, pez brujo), respectivamente. Este patrón diseminó la idea de que la poliploidización tuvo un papel clave durante la evolución de los vertebrados, que podría dividirse en dos fases de duplicación génica a gran escala: un primer duplicado del genoma, después de la separación entre cefalocordados y vertebrados basales (craniados), y un segundo duplicado del genoma, después de la separación entre vertebrados no mandibulados y mandibulados (agnatos y gnatostomados). El análisis comparativo de otras familias génicas ha conducido a conclusiones similares, no obstante, la relación 1:4 no siempre es claramente discernible. Ello es debido a que la tetraploidización lleva implícita la pérdida de genes en el transcurso de la evolución (Holland, 2003). El destino de un gen duplicado es diverso, podría ser funcionalmente redundante o adquirir nuevas funciones, o en el caso de ser silenciado, podría devenir un pseudogen o incluso degenerar hasta pasar totalmente desapercibido entre el llamado “ADN basura”. La identificación de un gen es asimismo dificultada por la dinámica del propio genoma que lo contiene. Es decir, mutaciones, deleciones, inserciones, o reorganizaciones cromosómicas, tales como inversiones, fisiones o translocaciones, o la existencia de elementos móviles, son algunos de los fenómenos observables en diferentes genomas de mamífero. Sin embargo, la identificación de algunas regiones de paralogía cromosómica es aún posible y, en combinación o no con la duplicación independiente de genes (pe: duplicaciones en tándem) a lo largo de la evolución, respalda la octaploidización de un genoma ancestral, similar al del actual anfibio (Lundin *et al.*, 2003).

GENES Y EVOLUCIÓN MORFOLÓGICA

La llegada de la biología molecular marcó un antes y un después en la manera de entender los procesos evolutivos. El descifrado de ácidos nucleicos revolucionó la filogenia de los metazoos, hasta el momento basada en caracteres morfológicos, y desveló posibles explicaciones para los saltos evolutivos observados en el registro fósil. Es decir, la ausencia de una gradación morfológica o la escasez de especies intermediarias, podría ser debida a mutaciones en genes clave para el desarrollo embrionario, que pudieran dar lugar a nuevas estructuras o alteraciones en el plano corporal, en generaciones inmediatas (Schwartz, 1999). Buen ejemplo de ello son los genes Hox (**Fig. 6**), cuya importancia en la diversificación de estructuras a lo largo del eje antero-posterior, ha sido documentada en la mayoría de organismos en los que se han

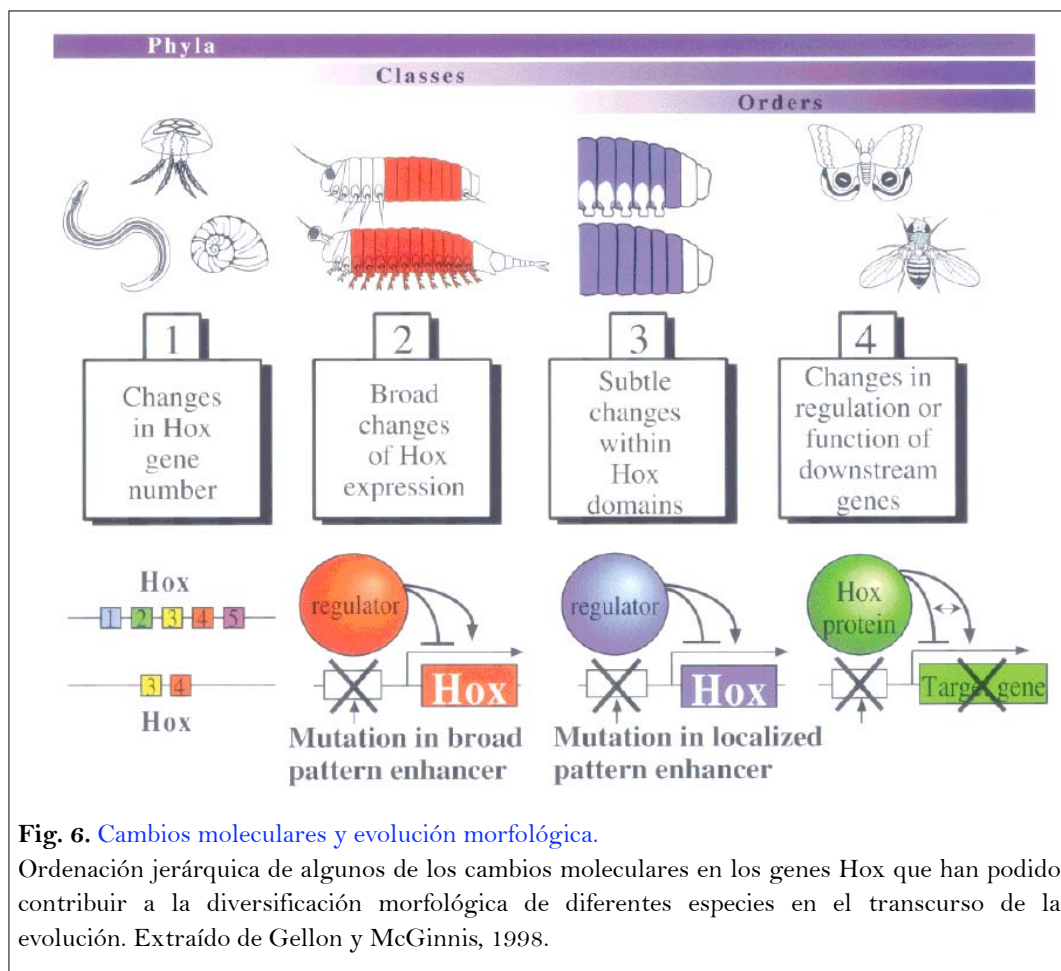


Fig. 6. Cambios moleculares y evolución morfológica.

Ordenación jerárquica de algunos de los cambios moleculares en los genes Hox que han podido contribuir a la diversificación morfológica de diferentes especies en el transcurso de la evolución. Extraído de Gellon y McGinnis, 1998.

estudiado (Gellon y McGinnis, 1998). Así, mutaciones en el gen *Ultrabithorax* de *Drosophila melanogaster* resultan en la generación de moscas con cuatro alas (Fernandes et al., 1994). Esto demuestra que la variabilidad de un gen, de su expresión, de su regulación o de su número en el organismo que lo contiene juega un papel clave en las características morfológicas propias de éste, aunque no siempre la relación sea tan obvia como en el caso de los mutantes homeóticos.

La expansión de familias génicas, en vertebrados, podría haber jugado un papel esencial en la adquisición de algunas de las características de este *subphylum*. Todos los cordados presentan en algún estadio de su ciclo biológico un cordón nervioso dorsal, un notocordio y bloques musculares laterales. Estos caracteres unifican en un *phylum* a protocordados (tunicados y cefalocordados) y vertebrados. Pero existen claras diferencias entre ellos, que se podrían correlacionar con los procesos de duplicación génica a gran escala. La primera duplicación génica podría ser causa de la adquisición de órganos sensoriales pares, crestas neurales y placodas, observables ya en lampreas, mientras que la segunda parece asociada al desarrollo de mandíbulas y extremidades pares (Holland *et al.*, 1994). Con el desarrollo de tecnologías para modificar genéticamente modelos animales de laboratorio, ha sido posible vislumbrar algunas de las funciones que determinados genes llevan a cabo de manera casi exclusiva.

EL SISTEMA NERVIOSO DEL ANFIBIO²

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso central del anfibio está básicamente formado por un cordón nervioso tubular, localizado en la parte dorsal del animal, justo por encima del notocordio. Si bien discurre a lo largo de la mayor parte del eje antero-posterior del individuo, su extremo anterior no acompaña al notocordio, que se extiende hasta el extremo más rostral (**Fig. 1B**). El cordón nervioso se inicia a continuación de las cavidades celómicas rostrales, a unas pocas micras por delante del primer miómero. A diferencia de los vertebrados, el cordón nervioso del anfibio está escasamente regionalizado y en absoluto vascularizado.

² En este apartado la información procede de: Bone, 1960; Demski *et al.*, 1996; Lacalli, 2002; Lacalli y Kelly, 2003; Wicht y Lacalli, 2005.

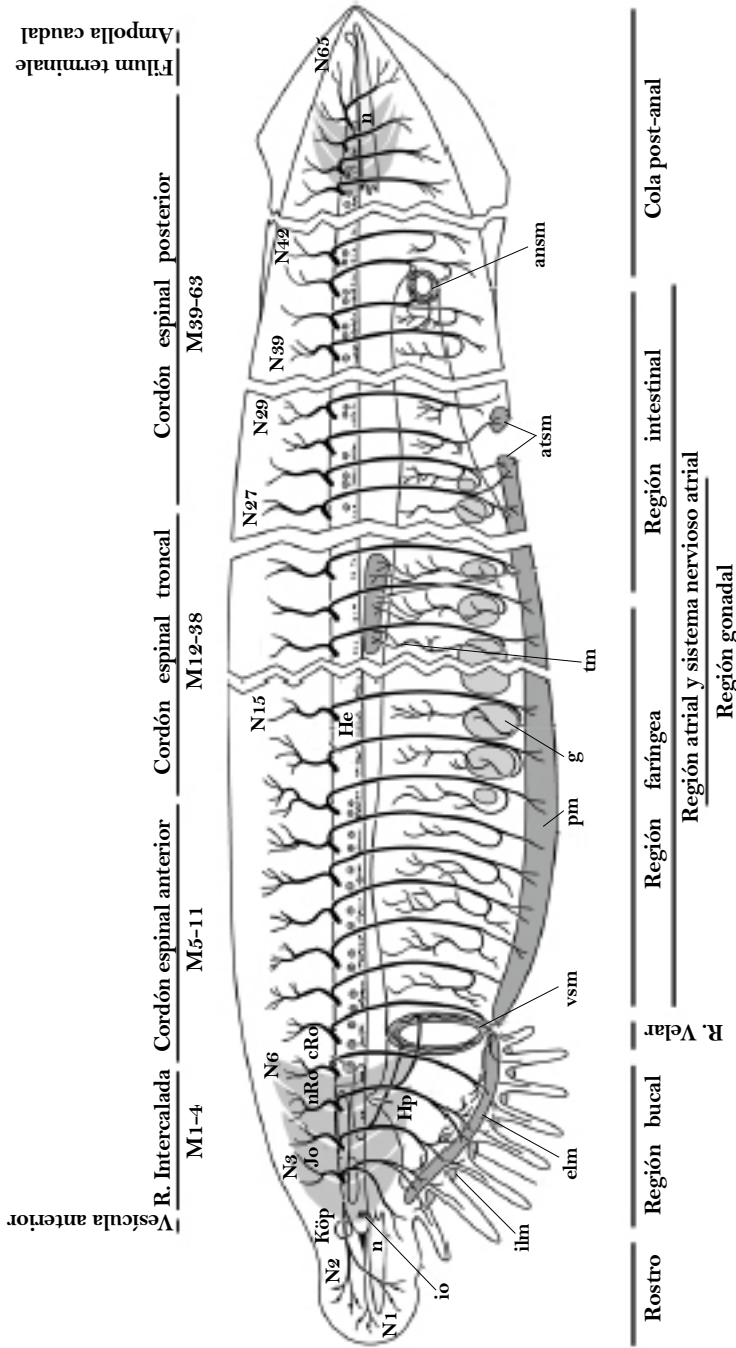


Fig. 7. El sistema nervioso del anfioxo.

Visión lateral de un anfioxo adulto con 63 miómeros (M), mostrando la organización general del sistema nervioso central y periférico, en relación a la localización de otras estructuras anatómicas. Los primeros cuatro miómeros y los tres últimos aparecen sombreados en gris para clarificar la posición relativa de los nervios respecto a los bloques musculares. Los músculos no mioméricos están resaltados en gris oscuro. Para mayor simplicidad ciertas partes del cuerpo han sido recortadas como muestra la discontinuidad de las rayas. Abreviaturas: ansm: esfínter del músculo anal; atsm: esfínter del músculo del atrio; io: órgano infundibular; jo: células de Joseph; Köp: fosilla de Kölliker; M: músculos mioméricos; N: nervios; n: notocordio; nRo: núcleo de Rodhe; pm: músculo pterigial; tm: músculo trapecoide de los canales atriocelómicos; vsm: músculo del esfínter anal. Adaptado de Wicht y Lacalli, 2005.

Externamente, sólo la dilatación de su extremo posterior, que forma la ampolla caudal, es prominente en el adulto, ya que el ensanchamiento anterior, que corresponde a la vesícula cerebral, se estrecha progresivamente a lo largo del desarrollo larvario tardío, hasta adquirir un diámetro ligeramente superior al del resto del cordón nervioso (**Fig. 7**). No existe rastro de rombómeros o neurómeros morfológicamente distinguibles, siendo el único indicio de segmentación la disposición seriada de los nervios, salientes y entrantes por sus astas dorsales, que guiados por los mioseptos (depresión fronteriza entre miómeros adyacentes) alcanzan sus correspondientes dianas de inervación (**Fig. 7**). No obstante, bajo esa aparente simplicidad, el cordón nervioso guarda en su interior un complejo entramado de agregados celulares y procesos axonales, cuya cuidadosa organización hace de guía respecto a la posición relativa en su eje horizontal.

La vesícula anterior, que corresponde a la parte anterior de la prominente vesícula cerebral de la larva temprana, presenta toda una serie de características diferenciales con respecto al resto del cordón nervioso (**Fig. 8**). Su parte más rostral se abre al exterior a través de los vestigios del neuroporo, generado durante la neurulación. En el adulto este estrecho canal, situado dorsalmente, está repleto de cilios y células especializadas, que pertenecen a la fosa de Kölliker. Aunque se le ha atribuido una función olfatoria, no hay prueba experimental de ello. En el extremo rostral medio, las células pigmentarias del ojo frontal se agolpan contra la pared del cordón nervioso. Justo por debajo, ocupando la superficie ventral, las células de la zona pre-infundibular descubren sus procesos apicales en el interior del ventrículo, seguidas por el órgano infundibular, productor de la fibra de Reissner. A este nivel, el primer par de nervios dorsales se adentran y ramifican en el cordón nervioso, contribuyendo a la sustancia blanca ventrolateral. En sentido opuesto, los nervios rostrales (**Fig. 8** (n1 y n2)) salen del cordón nervioso, para ramificarse bajo la epidermis que cubre el extremo rostral del animal. La región intercalada ocupa la mayor parte de la fracción anterior del cordón nervioso y a su término marca el inicio del cordón espinal. Esta región se divide en tres partes (**Fig. 8**):

- *Región intercalada anterior*: Se inicia a nivel del primer miómero y, seguramente se corresponde con la parte posterior de la vesícula cerebral larvaria. Su pared dorsal está tapizada por las células de Joseph. Por debajo de éstas, vestigios del cuerpo lamelar de la vesícula cerebral larvaria son aún visibles. Las partes ventral y lateral se caracterizan por estar cubiertas de una

gruesa capa de materia blanca. En general, la mayoría de células se agrupan en la zona periventricular y se caracterizan por ser de pequeño tamaño. Estudios inmunohistológicos muestran una gran variedad de tipos celulares, aún por determinar. Sin embargo, algunas destacables, por ser más grandes, son morfológicamente similares a motoneuronas o interneuronas. Cabe señalar que grupos reducidos de neuronas parecen delaminar de la capa ependimal y migrar hacia la sustancia blanca. En un corte histológico estos grupos de neuronas (grupos migratorios) se encuentran localizados en la línea media ventral (**Fig. 8** (avm)), y bilateralmente en los laterales y parte dorsal (**Fig. 8** (alm)).

- *Región intercalada media:* Se inicia a nivel del segundo miómero y se caracteriza por el aspecto de su canal central, en forma de cerradura invertida. En esta región las células de Joseph son más numerosas y se disponen en capas, en la misma posición que en la región intercalada anterior. Justo por debajo, un único grupo migratorio (**Fig. 8** (pdm)) es visible. Presenta grandes neuronas transluminales, cuyos axones se proyectan hacia el cordón espinal. Las visceromotoneuronas que inervan el músculo labial y estructuras bucales también están comprendidas dentro de esta región, así como el primer grupo de neuronas bipolares de Retzius. En base a estudios realizados en la región equivalente en larvas, el centro motor primario debería residir en esta zona.

- *Región intercalada posterior:* Se inicia entre los miómeros 3 y 4. Una de sus estructuras más destacables es el núcleo de Rhode (nada tiene que ver con las células de Rhode), compuesto por una aglomeración de enormes células localizada en la región periventricular ventral. Éste coincide, en el mismo plano meridional, con el *Wheel organ* y la fosa de Hatscheck. Esta región carece prácticamente de grupos migratorios y las células de Joseph desaparecen gradualmente en sentido antero-posterior. La región intercalada posterior finaliza con el primer órgano de Hesse.

Exceptuando la zona de la vesícula cerebral y la ampolla caudal, el canal central, que discurre a lo largo del cordón nervioso, presenta aspecto de rendija sensiblemente expandida en sus extremos ventral y dorsal. La pequeña expansión ventral se inicia en la parte caudal de las células infundibulares, y alberga en su interior la fibra de Reissner. La expansión dorsal, en cambio, es mucho más variable en tamaño, llegando incluso a desaparecer dependiendo de su posición en el interior del cordón, y puede albergar tanto fluido cerebrospinal como procesos celulares. La mayoría de cuerpos neuronales se encuentran en la periferia del canal central (zona periventricular), de manera que sus procesos

apicales contactan directamente el fluido cerebroespinal, alojado en la zona ventricular. En otros casos, los cuerpos neuronales atraviesan la parte intermedia del canal (células transluminales) comunicando ambos lados del cordón nervioso.

TIPOS CELULARES

CÉLULAS DE ROHDE: Son neuronas transluminales de gran tamaño. La primera de ellas marca el inicio rostral del cordón espinal (caudal a la vesícula cerebral). Comparado con el resto de células de Rhode, ésta primera es especialmente grande y su gigantesco axón, que se prolonga caudalmente, constituye la estructura más prominente de la parte ventral media del cordón espinal. Las células de Rohde restantes forman dos grupos. El grupo anterior, adyacente a la primera célula, se localiza entre los miómeros 5 y 11, mientras que el grupo posterior aparece ya a nivel del miómero 38. En ambos casos sus gruesos axones recorren la parte ventro-lateral del cordón nervioso, alternando entre el lado izquierdo y el lado derecho, y sus dendritas se expanden dentro de la materia blanca.

CÉLULAS DE JOSEPH: Son fotorreceptores de tipo rabdomérico. Se inician en la región intercalada anterior e incrementan en número, en dirección rostrocaudal. Ya en la región intercalada posterior desaparecen progresivamente.

ÓRGANOS DE HESSE: Cada órgano de Hesse consiste en un único fotorreceptor, de tipo rabdomérico, cuyos microvilli aparecen envueltos por una célula pigmentaria, que característicamente tiene forma de copa. Tienen tendencia a agregarse, pero están distribuidos a lo largo del cordón nervioso, desde la parte posterior de la región intercalada hasta el extremo caudal del cordón nervioso, con un decremento de su densidad a nivel troncal. Albergados en la parte ventral periventricular, cada uno de los fotorreceptores proyecta un proceso axonal hacia la parte ventro-lateral del cordón espinal. La orientación de sus copas pigmentarias depende de la posición del órgano en el eje antero-posterior.

MOTONEURONAS: La inervación de los músculos mioméricos en el anfibio es insólita. Cada una de las células musculares se prolonga hacia el cordón nervioso, donde contacta directamente con su superficie lateral. En estas zonas de contacto (zonas sinápticas), cada fibra muscular recibe sinapsis procedentes de motoneuronas, que de hecho no salen en ningún momento del cordón nervioso. En base a las zonas sinápticas, las motoneuronas, pertenecientes a lo que se

denominaría sistema nervioso somático en vertebrados, son clasificadas en dos grupos (**Fig. 9**):

- *Motoneuronas del compartimiento dorsal*: Se caracterizan por su organización pareada, a ambos lados del cordón espinal, y sincronizada con el desfase izquierda-derecha de los miómeros. Sus largos axones no parecen recibir sinapsis de otras neuronas, sin embargo el íntimo contacto con interneuronas, a través de proyecciones ipsilaterales, parece transmitir información de una forma inusual. Están asociadas a las fibras musculares lentas. Aunque han sido descritas en la larva, todavía no han sido identificadas en el adulto.

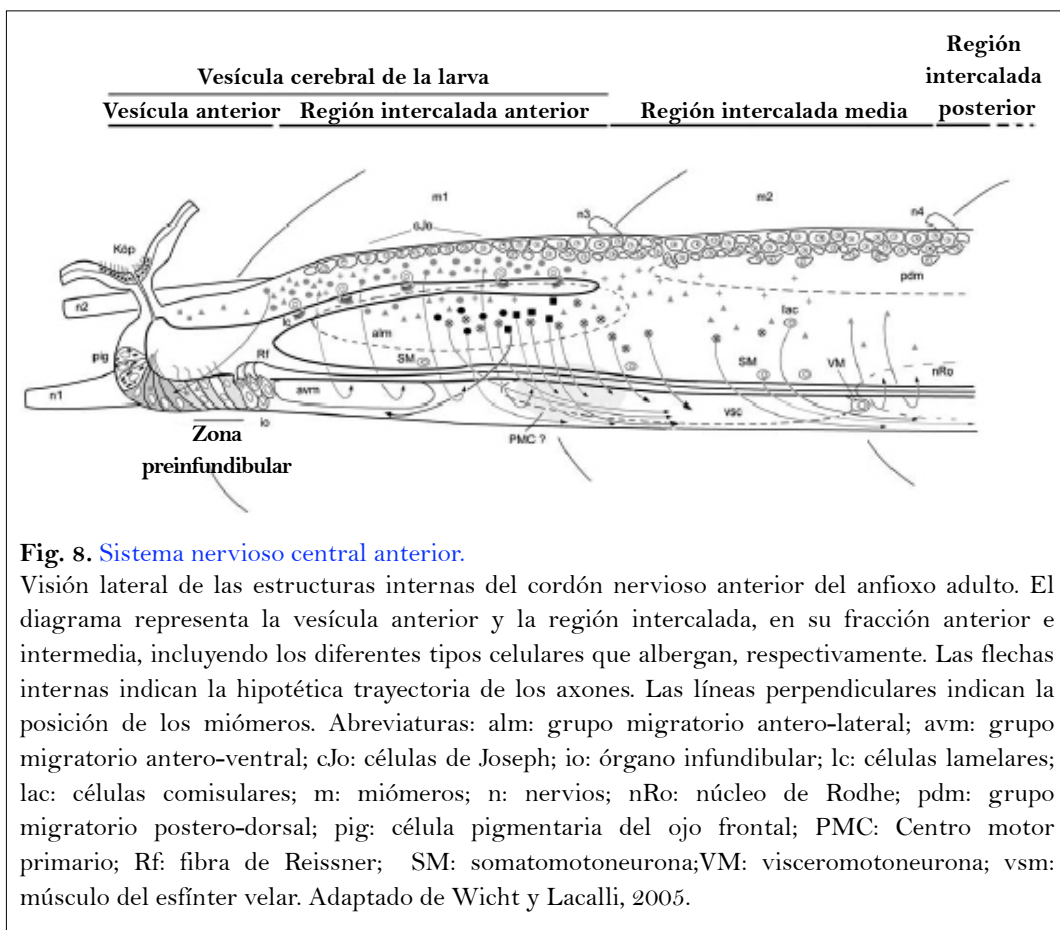


Fig. 8. Sistema nervioso central anterior.

Visión lateral de las estructuras internas del cordón nervioso anterior del anfibio adulto. El diagrama representa la vesícula anterior y la región intercalada, en su fracción anterior e intermedia, incluyendo los diferentes tipos celulares que albergan, respectivamente. Las flechas internas indican la hipotética trayectoria de los axones. Las líneas perpendiculares indican la posición de los miómeros. Abreviaturas: alm: grupo migratorio antero-lateral; avm: grupo migratorio antero-ventral; cJo: células de Joseph; io: órgano infundibular; lc: células lamelares; lac: células comisurales; m: miómeros; n: nervios; nRo: núcleo de Rodhe; pdm: grupo migratorio postero-dorsal; pig: célula pigmentaria del ojo frontal; PMC: Centro motor primario; Rf: fibra de Reissner; SM: somatomotoneurona; VM: visceromotoneurona; vsm: músculo del esfínter velar. Adaptado de Wicht y Lacalli, 2005.

- *Motoneuronas del compartimiento ventral*: A diferencia de las motoneuronas del compartimiento dorsal, se distribuyen de manera irregular a lo largo del cordón espinal, con tendencia a formar agregados en la zona ventral periventricular, donde sus procesos apicales se abren al canal central. Sus axones presentan

numerosas dendritas, que reciben innumerables sinapsis procedentes de diversos tipos neuronales. Están asociadas a las fibras musculares rápidas.

A diferencia de cualquier otro cordado, el notocordio del anfibio está formado por fibras musculares estriadas especializadas. De la misma manera que los miómeros, las fibras musculares del notocordio se adentran ventralmente en el tejido conectivo que rodea el cordón nervioso, formando las astas notocordales (**Fig. 9**). A través de las astas, cada fibra muscular recibe sinapsis procedentes de distintas motoneuronas. Los restantes músculos del cuerpo son inervados por visceromotoneuronas. Todas ellas son multipolares y sus axones salen del cordón nervioso, a través de las raíces dorsales, para hacer sinapsis con los respectivos tejidos diana (p.e. músculos pterigiales de la cavidad atrial). En contraste con los vertebrados, las visceromotoneuronas del anfibio se encuentran sólo en la parte ventral del cordón nervioso, justo por debajo de las motoneuronas del compartimiento ventral. Se podría decir que el sistema visceromotor del anfibio equivale al sistema nervioso autónomo de vertebrados.

NEURONAS SENSORIALES INTRAMEDULARES: Este tipo de neuronas han sido equiparadas a las células de Rohon-Beard, presentes en vertebrados anamnióticos y agnatos. Principalmente se distinguen dos clases: las células bipolares de Retzius y las células de la raíz dorsal. Las primeras son más numerosas, pero ambas clases se localizan en la materia gris de la parte dorsal periventricular y, en determinadas ocasiones sus somas neuronales son transluminales. En todos los casos, sus axones salen del cordón espinal a través de las raíces dorsales. Se les atribuyen funciones mecanorreceptoras, quizás semejantes a las de los ganglios de la raíz dorsal de vertebrados.

INTERNEURONAS: Son numerosas y muy variadas. Esencialmente ocupan la zona media periventricular, pero también han sido observadas en la parte ventral y ventricular. Sus axones contribuyen a las raíces dorsales, además de recibir y transmitir información a través de contactos sinápticos con innumerables neuronas del cordón nervioso.

CÉLULAS GLIALES: Las dendritas y procesos axonales de las neuronas carecen de recubrimiento (no mielinizados) o revestimiento por células gliales. Sin embargo, existen varios tipos de células gliales en el cordón nervioso del anfibio (**Fig. 9**):

- Glia de Müller: Localizada en la vecindad de los nervios dorsales y de características similares a las células de Schwann de vertebrados.

- Glia de Schneider: Localizada en la zona periventricular de la expansión dorsal.
- Glia radial (o ependimal): Sus cuerpos celulares se encuentra en la paredes ventriculares, pero sus largos procesos atraviesan la materia gris y, a través de la materia blanca subyacente, alcanzan el tejido conectivo que envuelve el cordón nervioso. De esta manera refuerzan sus paredes externas y contribuyen al mantenimiento de su forma.

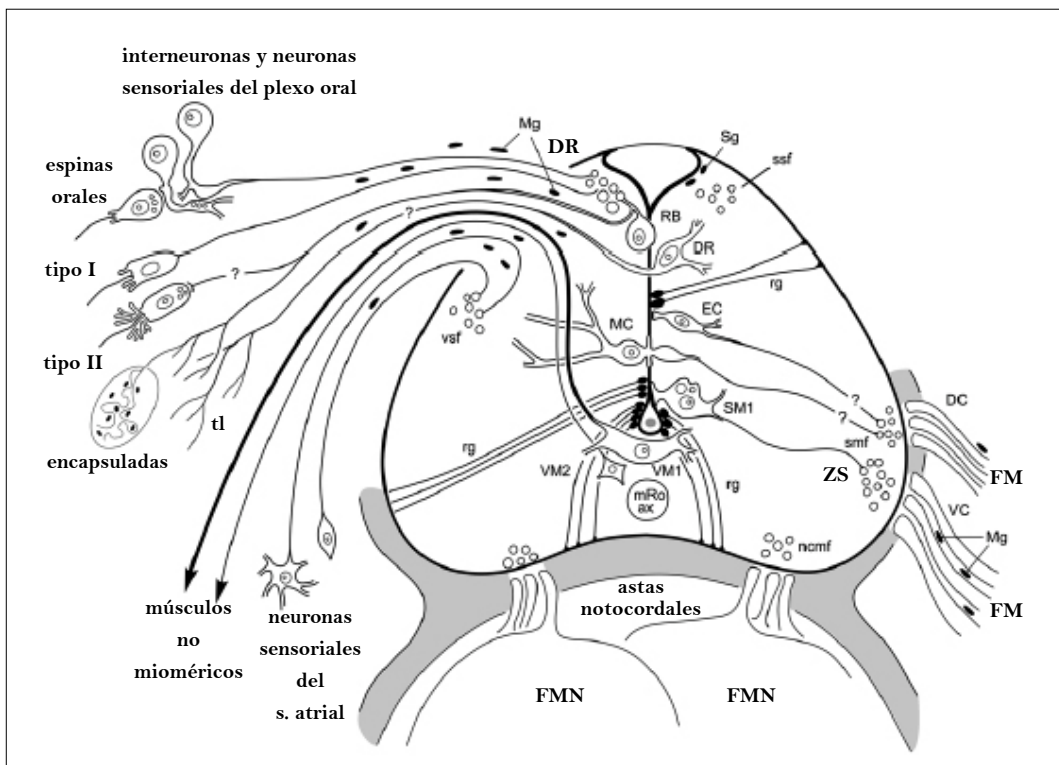


Fig. 9. Conectividad del sistema nervioso central y periférico.

Representación esquemática de un corte transversal del cordón nervioso del anfibio y parte del notocordio subyacente. Se muestran diversos tipos celulares de motoneuronas y neuronas sensoriales y la contribución de las astas dorsales al sistema nervioso periférico. El punto de color gris en la expansión ventral representa la fibra de Reissner alojada en el canal central. Abreviaturas: DC: compartimento dorsal; DR: raíz dorsal y células de la raíz dorsal; DV: compartimento ventral; EC: célula de Edinger; FM: fibras musculares; FMN: fibras musculares notocordales; MC: célula medial comisural; Mg: glia de Müller; mRoax: axón posterior ascendente de una célula de Rhode; ncmf: fibras motoras notocordales; RB: célula bipolar de retzius; rg: glia radial; SM: somatomotoneurona; smf: fibras somatomotoras; ssf: fibras somatosensoriales; tl: terminales nerviosas libres; VC: compartimento ventral; VM: visceromotoneurona; vsf: fibras viscerosensoriales; ZS: zona sináptica. Adaptado de Wicht y Lacalli, 2005.

SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO

La mayor parte del sistema nervioso periférico de vertebrados deriva de las crestas neurales y placodas. En contraposición, el anfibio carece de estas estructuras, lo que envuelve de cierto misterio la formación de su sistema nervioso periférico. Éste consta, básicamente, de numerosos nervios dorsales y un complejo entramado de plexos nerviosos, que dan cobijo a numerosas neuronas periféricas.

Al menos 65 nervios dorsales abandonan el cordón nervioso, a través de las raíces dorsales, de manera seriada, para inervar las diferentes regiones del organismo. Su recorrido es guiado por los septos intermioméricos, donde cada uno de los haces nerviosos se bifurca para dar lugar a una rama dorsal y a una rama ventral (**Fig. 7**). Ambas ramas, dorsal y ventral, discurren lateralmente en paralelo a los bloques musculares, contribuyendo a los plexos nerviosos subcutáneos que se extienden por todo el cuerpo. Las ramas dorsales inervan la aleta dorsal, mientras que las ventrales participan en la inervación cutánea de los flancos metapleurales (rama ventral cutánea) y en el sistema nervioso atrial (rama ventral visceral). Una de las constantes de los plexos nerviosos subcutáneos es la incidencia de terminales nerviosas libres, procedentes de la raíces dorsales (**Fig. 9**), que se abren al exterior atravesando la epidermis. Aunque es difícil discernir con claridad la procedencia de las fibras nerviosas acomodadas en los plexos, dichas terminales nerviosas libres parecen estar relacionadas con los procesos axonales salientes de neuronas sensoriales intramedulares (células de la raíz dorsal y bipolares de Retzius) (**Fig. 9**).

El sistema nervioso atrial abastece a la gran mayoría de órganos, siendo por tanto el más prominente del sistema nervioso periférico (**Fig. 7**). Consta de diversos plexos nerviosos, la mayoría de los cuales subyacen al epitelio que reviste la cavidad atrial y órganos circunscritos. Aunque forma un continuo desorganizado de fibras nerviosas y cuerpos neuronales, está morfológicamente regionalizado en base a su densidad, tejidos de inervación y tipos celulares que alberga. Los elementos motores que participan en el sistema nervioso atrial proceden de la rama ventral visceral de los nervios dorsales (**Fig. 7**). Éstos se ramifican en el interior de los plexos para inervar las gónadas, los músculos pterigiales, las paredes laterales del atrio, el intestino y su divertículo, el esfínter anal, la farínge, las hendiduras branquiales y el endostilo. Como componentes sensoriales, abarca un gran número de neuronas periféricas dispersas, como por

ejemplo las neuronas entéricas, o bien agregadas, como es el caso de la papila atrial de Müller, las terminales encapsuladas de Fusari o los canales atriocelómicos.

Los plexos bucales, al igual que los del sistema atrial, combinan elementos motores y sensoriales, aunque difieren significativamente en su organización. Comprenden el plexo velar y dos plexos bucales, uno interno y otro externo, que se disponen asimétricamente en la parte anterior del animal, afectando al trazado de los nervios que los conectan con el sistema nervioso central. Así, de manera excepcional, los nervios dorsales, que inervan los músculos labiales y el esfínter velar, cruzan al lado opuesto de su origen para alcanzar sus correspondientes dianas de inervación. En consonancia con el resto de plexos nerviosos, los plexos bucales contienen gran número de neuronas sensoriales periféricas, con incremento de su densidad en los cirros bucales y tentáculos velares. De modo diferencial, la parte más rostral del individuo alberga un agregado de células sensoriales sin igual en el resto del cuerpo, los Corpúsculos de Quatrefages. Aunque sus somas neuronales no forman parte del plexo, sus axones se adentran en éste para penetrar en el sistema nervioso central, a través de los dos primeros nervios dorsales o también llamados nervios rostrales.

TIPOS CELULARES

CANALES ATRIOCELÓMICOS: Cavidades pareadas de forma cónica que se alojan en la superficie dorsal de la cavidad atrial. En su interior guardan neuronas unipolares y multipolares, cuyos axones ascienden por las ramas ventrales viscerales, para entrar en el cordón nervioso. Están recubiertos por músculo estriado trapezoidal, inervado tanto por la propias neuronas de los canales, como por los nervios dorsales de la zona.

PAPILA ATRIAL DE MÜLLER: Neuronas sensoriales primarias localizadas en el suelo de la cavidad atrial. Mayoritariamente se concentran alrededor del atrioporo.

TERMINALES ENCAPSULADAS DE FUSARI: Se encuentran en las paredes laterales de los flancos metapleurales. Como su propio nombre indica, son terminales nerviosas cuyos extremos están protegidos por cápsulas de tejido conectivo. Están rodeadas por agregados celulares y se les atribuye una función mecanorreceptora.

CORPÚSCULOS DE QUATREFAGES: Neuronas periféricas alojadas en el tejido conectivo del rostro. Sus axones penetran en el plexo nervioso subcutáneo y se abren camino a través de los nervios rostrales para hacer sinapsis en el sistema nervioso central. Son biciliadas y están encapsuladas por tejido conectivo, alrededor del cual se disponen sus células de soporte. Se les atribuye una función mecanorreceptora, probablemente como respuesta a deformaciones del rostro.

NEURONAS SENSORIALES INDIVIDUALES: Están ampliamente distribuidas por toda la epidermis. Normalmente aparecen dispersas, aunque tienen cierta tendencia a acumularse en el rostro, en los cirros bucales y en la cola. Principalmente se diferencian dos tipos:

- *Tipo I:* Son neuronas sensoriales primarias. Su extremo apical se abre al exterior, a través de la epidermis, y muestra un único cilio rodeado por una corona de microvilli. Sus axones basales son proyectados al sistema nervioso central, donde a través de las raíces dorsales se incorporan a los tractos dorsal y subdorsal, correspondientes a los sistemas somatosensorial y viscerosensorial. Se les atribuye una función principalmente mecanorreceptora.

- *Tipo II:* Son neuronas sensoriales secundarias. Al igual que las neuronas de Tipo I, son uniciliadas, pero su corona de microvilli es mucho más espesa. Presentan varios procesos basales, de longitud muy limitada, a través de los cuales hacen sinapsis con fibras nerviosas del plexo. Su morfología sugiere una función quimiorreceptora.

Factores y Receptores Neurotróficos

El tupido tejido que alimenta nuestras acciones, pensamientos, sentimientos e inquietudes, no es más que un sinfín de células nerviosas interrelacionadas entre sí de manera cuidadosa y precisa. Como en muchos otros tejidos, el nivel de organización es esencial para la funcionalidad del órgano en sí. En el caso del sistema nervioso esta organización estructural llega a alcanzar niveles de complejidad tales como el del cerebro humano, donde 85 billones de células nerviosas conforman el tejido más diverso en cuanto a tipos celulares se refiere. No obstante, la funcionalidad del cerebro de los vertebrados no solo depende del número, tipo y posición de las neuronas que lo constituyen, sino también de las conexiones específicas que las interrelacionan entre sí y con sus dianas periféricas. Sin evidencias experimentales de ello, ya Santiago Ramón y Cajal aclamaba la idea de que sustancias difusibles podrían estar guiando a las neuronas en su camino para establecer contactos (Ramón y Cajal, 1972). A raíz de sus estudios en regeneración nerviosa, Ramón y Cajal impulsó el término “neurotrofismo”, adoptado de sus contemporáneos (Hamburger, 1980), matizando que la sustancia neurotrófica era probablemente segregada por los tejidos diana y no por los nervios en regeneración. Anticipándose a los conceptos de competición (por una diana de inervación o agente neurotrófico) y muerte neuronal natural, observó que el exceso de conexiones imperfectas era corregido mediante la atrofia de las últimas y su consiguiente desaparición (Ramón y Cajal, 1968).

Las ideas de Ramón y Cajal permanecieron en estado latente hasta que Rita Levi-Montalcini descubrió el factor de crecimiento nervioso NGF (Levi-

Montalcini y Hamburger, 1951; Cohen y Levi-Montalcini, 1957). Inicialmente identificado en un tipo de sarcoma murino (rico en NGF), Levi-Montalcini fue la primera en observar el efecto del NGF sobre explantes de ganglios sensoriales y simpáticos, los cuales extendían sus axones en presencia del sarcoma (**Fig. 10**). Los sucesivos ensayos, en que utilizó ya la proteína purificada, no solo confirmaron los resultados anteriores, sino que iniciaron la creciente lista de acciones que, hoy en día, se le atribuyen al NGF. Además de promover el crecimiento y regeneración axonal, el NGF era indispensable para la supervivencia y diferenciación de ciertas poblaciones neuronales. En todos los casos era necesario un aporte exógeno de NGF, lo que condujo a investigar la fuente productora del factor. La eliminación física o farmacológica de las dianas de inervación desvelaron en éstas el lugar de síntesis y secreción del NGF (Levi-Montalcini, 1987).

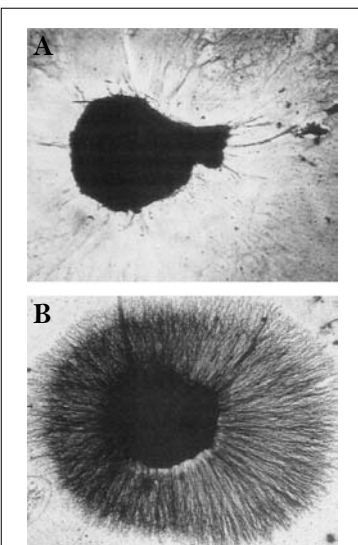


Fig. 10. Efecto neurotrófico del NGF sobre neuronas simpáticas en cultivo.

A. Neurona cultivada en ausencia de NGF. **B.** Neurona cultivada en presencia de fragmentos del sarcoma murino 180, rico en NGF. La difusión de NGF en el medio de cultivo estimula el crecimiento dendrítico-axonal de la neurona, además de potenciar su supervivencia. Adaptado de <http://starklab.slu.edu>.

Este modo paracrino de acción es comúnmente utilizado por un gran número de factores de crecimiento. En este sentido, el NGF comparte el privilegio de ser el primer factor de crecimiento jamás aislado, junto con el EGF, descubierto en el mismo laboratorio por Stanley Cohen (Cohen, 1983). Dichos hallazgos impulsaron la búsqueda y estudio de factores de crecimiento, todavía en expansión. Si bien actualmente se sabe que muchos factores de crecimiento presentan propiedades tróficas, no todos ellos tienen cabida dentro del marco conceptual conocido como Teoría Neurotrófica. Ésta establece que los agentes neurotróficos deben ser suministrados por los tejidos diana de inervación, en cantidades limitadas y limitantes, siendo éstos imprescindibles para la supervivencia y diferenciación de las neuronas que inervan dichos tejidos (Oppenheim, 1989). En base a estos criterios, el NGF se convirtió en miembro fundador y prototipo de la familia de factores neurotróficos colectivamente denominada Neurotrofinas.

LAS NEUROTROFINAS

Actualmente, la familia de las Neurotrofinas está constituida por seis miembros. Por orden cronológico, en base a su aislamiento: NGF (Nerve Growth Factor), BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), Nt-3, Nt-4/5, Nt-6 y Nt-7 (Barde *et al.*, 1982; Leibrock *et al.*, 1989; Hohn *et al.*, 1990; Hallböök *et al.*, 1991; Berkemeier *et al.*, 1991; Gotz *et al.*, 1994; Nilsson *et al.*, 1998). Por sus características solubles, NGF y BDNF fueron inicialmente purificadas de extractos proteicos (**Tabla 1**). A pesar de que la solubilidad es un carácter constante en esta familia de factores neurotróficos, la metodología para el aislamiento de neurotrofinas adquirió un nuevo rumbo con la secuenciación nucleotídica del NGF (Scott *et al.*, 1983). A partir de entonces, el clonaje molecular se convirtió en la principal herramienta para el aislamiento de neurotrofinas, resultando en la caracterización del resto de miembros de la familia. La explosión de nuevas secuencias procedentes de diferentes organismos llevó a confusiones tales como la que dio nombre a la Nt4/5. En este caso, dos publicaciones consecutivas (Berkermeier *et al.*, 1991; Hallböök *et al.*, 1991) relataban la identificación de dos neurotrofinas, Nt-4 en anfibios, y Nt-5 en mamíferos, cuyo posterior análisis resolvió su equivalencia. Así inicialmente aisladas en diferentes organismos (**Tabla 1**), hoy en día se sabe de su existencia en todos los vertebrados superiores hasta la fecha analizados. Sus respectivas secuencias primarias comparten algunas regiones conservadas, básicamente concentradas en la región

que codifica para la proteína madura, lo que ha permitido establecer ciertas relaciones de ortología o paralogía entre ellas. La mayoría presenta ortólogos en diferentes especies, siendo excepciones la NT-6 y la Nt-7, que únicamente se han identificado en peces, y la Nt-4/5, sólo identificada en tetrápodos.

NGF	¹ Sarcoma murino 180	² Cohen y Levi-Montalcini, 1957
	Glándulas salivales de	Levi-Montalcini y Cohen, 1960
	ratón macho	
BDNF	Cerebro de cerdo	Barde <i>et al.</i> , 1982
Nt3	Ratón	Hohn <i>et al.</i> , 1990
Nt4/5	Xenopus (Nt4)	Hallböök <i>et al.</i> , 1991
	Rata (Nt5)	Berkemeier <i>et al.</i> , 1991
Nt6	Xiphophorus	Gotz <i>et al.</i> , 1994
Nt7	Danio rerio	Nilsson <i>et al.</i> , 1998

Tabla 1. Miembros de la familia de las neurotrofinas en vertebrados superiores.

Primeros organismos en que fueron aislados (¹) y trabajo original (²). Sólo en el caso de NGF y BDNF se indica el tejido de aislamiento, dado que el resto de neurotrofinas fueron aisladas mediante clonaje molecular.

Asimismo, Nt-6 y Nt-7 muestran una marcada similitud entre ellas y con el NGF propio de los peces, lo que sugiere paralogías dentro del mismo linaje.

En términos generales, los péptidos maduros constan de unos 120 aminoácidos, de los cuales sólo alrededor de 28 son compartidos (McDonald y Chao, 1995). Esto refleja una estructura primaria esencial, donde existen cinco regiones de variabilidad, además de extremos amino- y carboxi- terminal también muy variables (**Fig. 11**). Las regiones variables e invariables de las neurotrofinas moldean a éstas moléculas de manera decisiva en cuanto a las propiedades individuales de cada una de ellas. Aunque tienen un amplio espectro de acción, sus efectos biológicos sobre el sistema nervioso son muy específicos. Dicha especificidad concierne principalmente al tipo de receptor a través del cual ejercen sus efectos neurotróficos. Por esta razón las regiones variables parecen ser de extrema importancia para establecer una relación receptor-ligando productiva, mientras que las regiones invariables juegan un rol estructural esencial en el diseño tridimensional de cada una de las moléculas.

A pesar de la elevada variabilidad observada en sus respectivas secuencias primarias, sus estructuras terciarias son muy semejantes. Una vez sintetizadas en forma de precursores, éstos son procesados para dar lugar a monómeros con capacidad de formar dímeros, adoptando así su forma activa. Cada uno de los protómeros está dominado por dos pares de láminas κ anti-paralelas. En uno de los extremos las láminas κ quedan unidas por tres pequeños bucles, que concentran la mayor parte de las regiones variables (Ibáñez, 1994). Estos pequeños bucles aportan flexibilidad al monómero, facilitando así su adaptación al medio en el que se encuentra. En el extremo opuesto yace uno de los motivos más característicos de las neurotrofinas, el llamado “cystein knot” (**Fig. 11**). Éste consta de tres puentes disulfuro que se pliegan sobre sí mismos formando un nudo. La peculiar conformación del *cystein knot* permite la aproximación de las láminas κ de protómeros independientes, formando una interfaz hidrofóbica, que contrasta con la naturaleza eminentemente soluble del dímero activo (McDonald y Chao, 1995). De esta manera el dímero queda estabilizado mediante uniones no covalentes. Esta interfaz de unión entre monómeros corresponde a una de las regiones invariables, de composición aminoacídica conservada entre las diferentes neurotrofinas. Ello sugiere que la formación de heterodímeros es posible aunque infrecuente, ya que la forma dominante de una neurotrofina activa es homodimérica (Ibáñez, 1995).

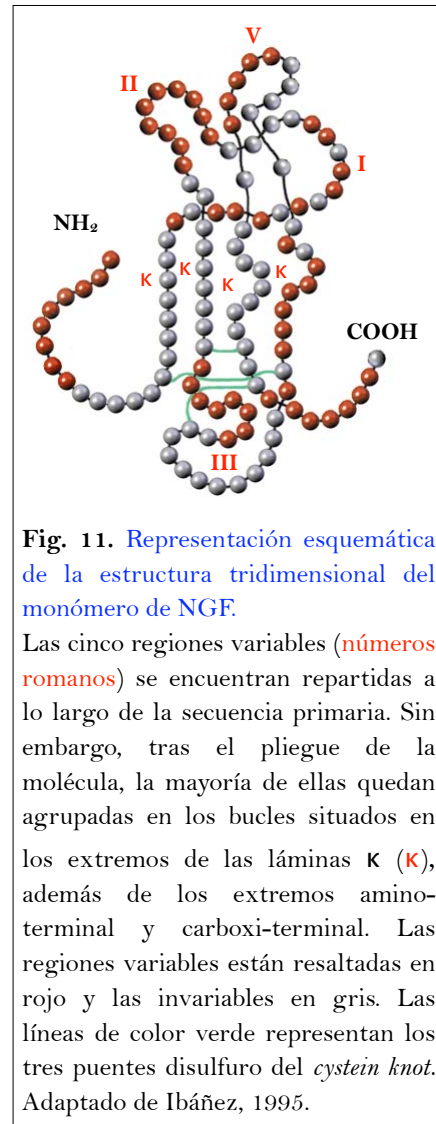
RECEPTORES DE NEUROTROFINAS

RECEPTORES TRK

Más de 30 años después del descubrimiento del NGF, el cáncer volvió a dar otro de sus resultados inesperados. El oncogen que Martin-Zanca y colaboradores aislaron, de un carcinoma de colon humano, resultó ser portador de un insospechado hallazgo (Martin-Zanca *et al.*, 1986). Como resultado de reorganizaciones cromosómicas, habituales en procesos oncogénicos, este oncogen era producto de la fusión entre el gen de la tropomiosina y un dominio tirosina quinasa de origen desconocido (Martin-Zanca *et al.*, 1986). Este dominio era claramente identificable como tirosina quinasa, pero no asignable a ninguna de las familias de proteínas tirosina quinasa hasta la fecha conocidas. Tres años más tarde, el aislamiento del alelo normal supuso el nacimiento de una nueva familia de proteínas tirosina quinasa, que aún actualmente conserva las iniciales, *trk*, del apelativo “*tropomyosin related kinase*”, aplicado al oncogen originalmente descrito (Martin-Zanca *et al.*, 1989). La identificación del proto-oncogen humano, hoy conocido como

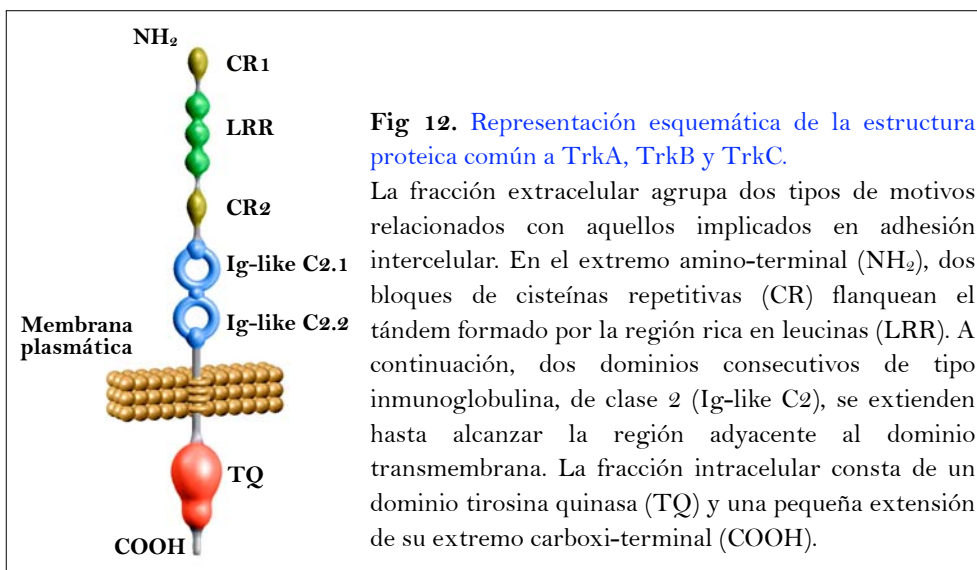
TrkA, pronto vino seguida del aislamiento de los otros dos miembros de la familia, TrkB y TrkC (Klein *et al.*, 1989; Lamballe *et al.*, 1991). Todos ellos son receptores transmembrana de superficie celular, con actividad catalítica intrínseca inducida por la unión a sus ligandos, las neurotrofinas.

Los tres miembros de la familia Trk de receptores neurotróficos comparten una misma estructura proteica. El esqueleto básico de estas moléculas no difiere significativamente de otros receptores de membrana plasmática. Su



parte extracelular permanece anclada a la membrana a través de un único dominio transmembrana, el cual sostiene, en su cara interna, la parte intracelular del receptor. Como proteína inmadura, recién sintetizada, el péptido señal que encabeza el extremo amino-terminal dirige el péptido hacia el retículo endoplasmático. Una vez allí, la proteína es translocada al lumen, donde es procesada hasta alcanzar el grado de maduración necesario para ser insertada en la membrana plasmática de la misma célula. La proteína madura, de aproximadamente 140 KDa de peso molecular, muestra en la superficie celular una arquitectura única. Encabezando su extremo amino-terminal, una región rica en leucinas y subdividida en bloques, es acotada a ambos lados por series de cisteínas, que a su vez vienen seguidas de dos dominios de tipo inmunoglobulina, dispuestos de manera consecutiva, hasta alcanzar el dominio colindante a la región transmembrana. Su fracción intracelular está básicamente formada por un dominio tirosina quinasa, que seguido por una corta y peculiar extensión, completa el extremo carboxi-terminal de la proteína (**Fig. 12**). Si bien la organización en dominios proteicos de los receptores Trk es idéntica, su composición aminoacídica es variable, sin superar el 47% de similitud a nivel extracelular, pero compartiendo hasta un 88% de los residuos localizados en el dominio tirosina quinasa.

En general los receptores tirosina quinasa son proteínas modulares que comparten ciertas características, concentradas básicamente en el dominio al que deben su nombre. No obstante, en base a particularidades de dicho dominio,



pueden ser clasificados en diferentes clases. Los receptores Trk pertenecen a la clase II de receptores tirosina quinasa, definida por la secuencia consenso [DN]-[LIV]-X (3)-Y-Y-R (Prosite PDOC00212). Dicha secuencia incluye el bucle de autofosforilación, lo que refleja un modo de activación común a todos ellos, mediante oligomerización y fosforilación recíproca de los mismos residuos en cada uno de los monómeros. En el caso de los receptores Trk, la forma activa predominante es dimérica e inducida por la unión de neurotrofinas a su dominio extracelular (**Fig. 13**). Cada uno de los receptores Trk muestra una especificidad determinada hacia cada una de las neurotrofinas. Dicha especificidad radica mayoritariamente en el segundo dominio inmunoglobulina del receptor, que además constituye la principal interfaz de unión. Aunque la presencia del segundo dominio inmunoglobulina es de vital importancia para la activación mediada por el ligando, otros motivos del dominio extracelular también ejercen un efecto regulador sobre la función del receptor. Por un lado, los motivos ricos en leucina probablemente contribuyen a estabilizar la unión ligando-receptor (Ninkina *et al.*, 1997); por otro lado, ambos dominios inmunoglobulina son necesarios para prevenir la auto-activación descontrolada del receptor (Arevalo *et al.*, 2000). Por ello, la precisa combinatoria de módulos proteicos en los receptores Trk hace de ellos proteínas únicas, con propiedades exclusivas, constituyendo así una familia entera en sí mismos.

RECEPTOR P75

Antes de que los receptores Trk fueran reconocidos como receptores para neurotrofinas, este rol le era únicamente atribuido a p75. En un principio conocido como receptor de baja afinidad para neurotrofinas, hoy se sabe que sus constantes de asociación-disociación, y las respectivas de los receptores Trk, varían dependiendo del entorno microambiental, más que de la naturaleza del receptor en sí. A pesar de ser el primer receptor para neurotrofinas identificado como tal, aún actualmente es el más controvertido de ellos.

Es único en su especie y pertenece a la gran familia de receptores TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*). Como el resto de miembros pertenecientes a dicha familia, p75 es un receptor transmembrana de único paso, sin capacidad catalítica intrínseca y con un dominio extracelular rico en cisteínas. Su región extracelular consta de cuatro series iterativas de cisteínas, que constituyen el dominio de unión al ligando (**Fig. 14**). En el interior de estas series, seis de las

cisteínas presentes están conservadas en todos los miembros de la familia, indicando un rol estructural esencial para la interacción receptor-ligando. No obstante, p75 destaca dentro de la familia de receptores TNFR por ser el único capaz de interactuar con ligandos díméricos y solubles, como es el caso de las neurotrofinas, indicando un modo de acción distinto respecto al reconocimiento de su ligando (Barker, 1998). En lo que se refiere a su dominio intracelular, p75 contiene varios motivos implicados en la interacción proteína-proteína. El más prominente de ellos es el dominio de muerte celular (*death domain*), que se extiende sobre unos 90 aminoácidos (Fig. 14). Éste consta de un par de tríos de hélices κ enfrentados perpendicularmente, lo que proporciona al dominio una característica forma globular (Liepinsh *et al.*, 1997). Aunque dicha estructura globular es común a todos los dominios de esta clase, en base a diferencias de la primera hélice κ y regiones conectoras entre las distintas hélices, los dominios de muerte celular son clasificados en dos subtipos, siendo p75 del subtipo II (Feinstein *et al.*, 1995). Otros motivos, localizados en la fracción intracelular de p75, incluyen un dominio PDZ o DHR, definido por la presencia de una secuencia consenso de unión a proteínas de tipo PSD (*Postsynaptic Density Proteins*), un dominio de unión a proteínas G, localizado en la quinta hélice κ del dominio de muerte celular, y un dominio de unión a proteínas de la familia TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*) (Barker, 1998).

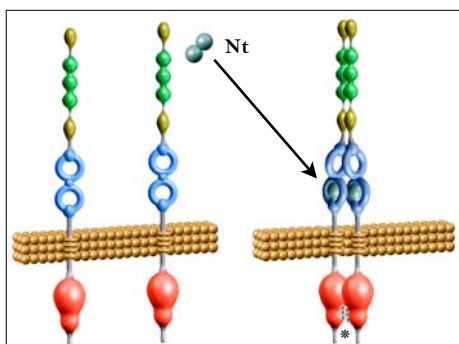


Fig 13. Representación esquemática del modo de activación de los receptores Trk.

La unión del dímero de neurotrofina (Nt) al Ig-like C2.2 del receptor, induce la dimerización de éste último. Como consecuencia, los respectivos monómeros del dímero son fosforilados recíprocamente en los residuos tirosina, del bucle de autofosforilación o autoactivación, del dominio tirosina quinasa (*).

INTERACCIONES NEUROTRÓFICAS

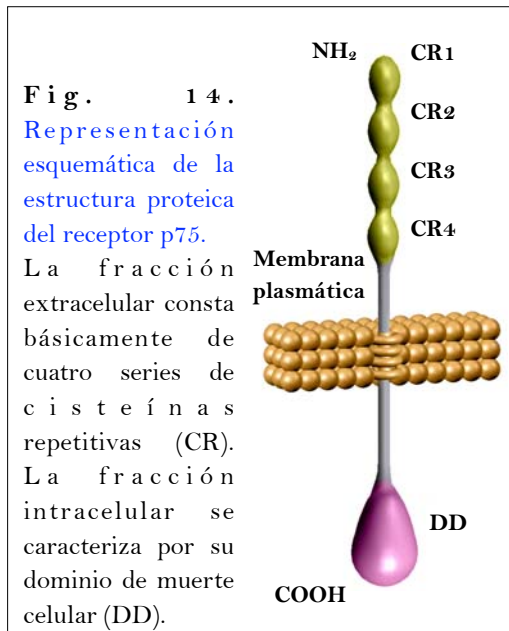
Casi medio siglo después del descubrimiento de la primera neurotrofina, es aún fascinante y hasta cierto punto casi enigmático como esta reducida familia de factores neurotróficos es capaz de llevar a cabo tan variados y complejos efectos biológicos. A través de la imprescindible interacción con sus dos tipos de receptores, Trk y p75, las neurotrofinas ejercen un papel esencial en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central

y periférico de vertebrados. Ello abarca efectos tan diversos como la regulación de la supervivencia y diferenciación neuronal, el crecimiento y guía de terminales nerviosas, e incluso algunos de los aspectos más evolucionados de nuestro cerebro, como la capacidad de aprendizaje.

DÚOS TRK-NT

En general, el repertorio de receptores Trk expresados por una determinada neurona pronostica el tipo de neurotrofina capaz de promover la supervivencia y diferenciación de dicha neurona. La presencia de TrkA, TrkB o TrkC sensibiliza las neuronas que los expresan frente a NGF, BDNF y Nt-4/5, o Nt-3, respectivamente. Esta capacidad de discriminación reside principalmente en el segundo dominio inmunoglobulina del receptor y regiones variables en contacto, del ligando. No obstante, sin ser del todo inflexible, esta capacidad de discriminación viene en algunos casos atenuada por la presencia de cierto grupo de aminoácidos localizados en la región de yuxtamembrana adyacente a la interfaz de unión ente ligando y receptor. Por este motivo, las isoformas de TrkA y TrkB que presentan estas características son adicionalmente capaces de responder ante Nt-3. Ello permite que la supervivencia y diferenciación de una determinada población neuronal no esté totalmente supeditada a la presencia de una única neurotrofina. En base al grado de promiscuidad en las relaciones Trk-Nt se pueden establecer varios modelos de dependencia neurotrófica (Huang y Reichardt, 2001):

- MODELO 1: Una determinada neurotrofina interacciona únicamente con un solo tipo de receptor Trk. En este caso, la ausencia tanto del ligando como del receptor genera un fenotipo similar. Como ejemplo, ambos ratones deficientes para NGF o TrkA carecen de la misma población neuronal en los



ganglios craneales y de la raíz dorsal (DRG) (**Tabla 2**).

- **MODELO 2:** Un determinado receptor Trk es susceptible de ser activado por más de una neurotrofina. En este caso la deficiencia del receptor provoca un fenotipo más severo que el de la deficiencia de las neurotrofinas por separado. Como ejemplo, la deficiencia de TrkB genera una pérdida casi total de las neuronas de ganglio nodoso, frente a la pérdida parcial observada en ratones deficientes para BDNF o Nt-4/5, que parecen sustentar diferentes poblaciones del mismo ganglio (**Tabla 2**).
- **MODELO 3:** Una determinada neurotrofina actúa como ligando para varios receptores Trk. La ausencia de Nt-3, aparentemente la neurotrofina más promiscua, afecta a poblaciones que expresan los tres receptores (**Tabla 2**).

La dependencia neurotrófica, mediada por el sistema Nt-Trk está dirigida básicamente por dos de las vías de transducción de señal activadas por los receptores Trk: la vía de Ras/Raf/Erk y la vía de PI3K/AKT (**Fig 15**). Ambas vías son iniciadas tras la activación del receptor (ver **Fig. 13**), que resulta en una rápida fosforilación de residuos tirosina localizados en su dominio intracelular. Éstas fosfotirosinas actúan entonces como puntos de anclaje específicos para las distintas proteínas adaptadoras que inician las diferentes cascadas de señalización intracelular (Bibel y Barde, 2000). En función de las proteínas adaptadoras

	TrkA	NGF	TrkB	BDNF	Nt-4/5	TrkC	Nt-3
<i>Ganglios sensoriales</i>							
Trigeminal	70%	75%	60%	30%	NS	21%	60%
Nodoso-Petrosal	ND	ND	90%	45%	40%	14%	30%
Vestibular	NS	ND	60%	85%	NS	15%	20%
Coclear	NS	NS	15%	7%	ND	50%	85%
Raíz dorsal	70%	70%	30%	35%	NS	20%	60%
Geniculado	ND	ND	ND	ND	ND	11%	35%
TMN	ND	ND	38%	41%	8%	45%	57%
<i>Ganglios simpáticos</i>							
Superior cervical	>95%	>95%	ND	ND	NS	NS	50%
<i>Motor</i>							
Facial	ND	ND	ND	NS	ND	ND	ND
Médula espinal	ND	ND	NS	NS	NS	ND	ND
CNS	1	ND	ND	2	ND	ND	3
<i>Viabilidad</i>							
	B	B	MB	BM	Bu	M	MB

Tabla 2. Pérdidas neuronales observadas en ratones deficientes para cada uno de los receptores Trk y sus correspondientes neurotrofinas, en algunas de las estructuras del sistema nervioso.

Todas las cantidades están expresadas en porcentajes. TMN: Neuronas del núcleo mesencéfalo trigeminal; ND: No descrito; NS: No significativo; 1: Reducida innervación en el hipocampo; 2: Defectos en el cerebelo y reducción de la expresión de NPY, calbindina y parvalbumina; 3: Sin disfunción; B: Baja; MB: Muy baja; BM: Baja-media; Bu: Buena. Adaptado de Huang y Reichardt, 2001.

reclutadas, las vías de señalización Ras/Raf/Erk y PI3K/AKT pueden ser potenciadas en mayor o menor grado, incidiendo de manera decisiva en el reclutamiento de proteínas intermediarias con efectos colaterales diversos. Así, por ejemplo, mientras Shc está asociada a la activación transitoria de la vía Ras/Raf/Erk, Crk produce una activación sostenida de la misma vía. Esta variabilidad en el efecto mediado por los receptores Trk se atribuye al uso preferencial de las distintas proteínas adaptadoras, según el tipo de neurotrofina, receptor, tipo celular y estadio de desarrollo (Segal, 2003). De esta manera, las neurotrofinas y sus receptores Trk regulan la supervivencia y diferenciación neuronal modulando la actividad transcripcional, la morfología del citoesqueleto, la motilidad celular y el tráfico intracelular. La tercera vía de señalización activada por los receptores Trk es la de PLCK, implicada en algunos de los aspectos más complejos asociados a este sistema: la plasticidad sináptica. La unión directa de PLCK al extremo carboxi-terminal del receptor resulta en la activación del enzima, por fosforilación del mismo. Una vez activa, PLCK es capaz de hidrolizar fosfatidil inositol, generando inositol tri-fosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (**Fig. 15**). Mientras la activación de PKC por DAG contribuye a la vía de las ERK quinasas, el incremento de Ca²⁺ intracelular producido por IP₃ promueve la activación de distintas enzimas regulados por Ca²⁺, con consecuencias diversas (Huang y Reichardt, 2003). Algunas de estas consecuencias incluyen la transcripción de genes que codifican para canales de sodio, la traducción de mRNA acumulados localmente y cambios en la eficacia para la exocitosis de vesículas sinápticas. De esta manera, las neurotrofinas y sus receptores Trk inciden sobre el potencial de membrana y fuerza sináptica, contribuyendo así a la inducción de LTP (*Long-Term Potentiation*), proceso activado durante la formación de la memoria (Poo, 2001).

DÚOS P75-NT

A diferencia de los receptores Trk, p75 es capaz de interactuar con todas las neurotrofinas por igual, tanto en su forma madura como inmadura (proneurotrofinas). Ello es debido a que las neurotrofinas utilizan distintas regiones para asociarse con cada uno de sus receptores. En el caso de p75, las neurotrofinas contactan mediante algunas de sus regiones constantes, de secuencia y estructura compartida, por lo que el receptor es incapaz de discriminar las unas de las otras (He y Garcia, 2004). En general, el extremo

asociación directa de diversas proteínas citosólicas con el dominio intracelular del receptor. Éstas incluyen TRAF, (*TNF receptor associated factor*), NRAGE (*neurotrophin receptor interacting MAGE homolog*), NADE (*neurotrophin associated cell death executor*), FAP1 (*Fas associated phosphatase 1*), RhoA, ARMS (*ankyrin repeats membrana spanning molecule*), SC-1 (*Schwan cell factor 1*), RIP-2 (*receptor-interacting molecule*) y NRIF (*neurotrophin receptor interacting factor*) (Hempstead, 2002). Como consecuencia, la muerte celular o apoptosis es provocada a través de diversas cascadas de señalización, de las cuales la más conocida es la vía de JNK-p53-Bax (**Fig. 16**).

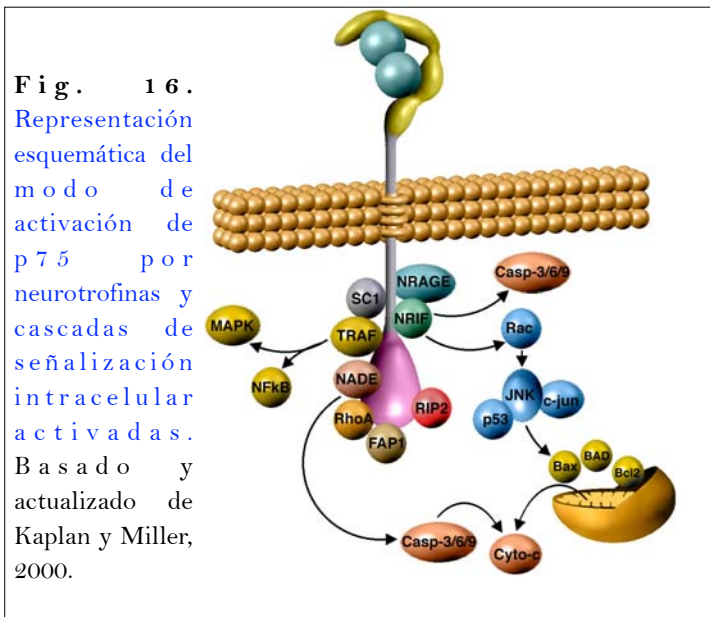
TRÍOS TRK-P75-NT

A pesar de la pronunciada función de p75 en muerte neuronal, su coexpresión con los receptores Trk muestra resultados muy distintos. La presencia de receptores Trk en la misma célula parece silenciar las vías apoptóticas iniciadas por p75, a la vez que potencia, por ejemplo, la activación de NF- κ B como vía de supervivencia mediada por p75 (**Fig. 16**). De manera recíproca, p75 también es capaz de modular las señales neurotróficas mediadas por los receptores Trk. Esta transmodulación se lleva a cabo mediante la asociación directa de los respectivos dominios intracelulares de p75 y Trk. En este complejo ternario, p75 actúa como co-receptor, reduciendo la promiscuidad de Trk frente al ligando y potenciando algunas de sus cascadas de señalización. En este sentido, p75 es capaz de interactuar con Shc, una de las proteínas adaptadoras de Trk, favoreciendo su fosforilación e intensificando las vías de transducción iniciadas por ésta. En determinadas condiciones, p75 puede aprovechar la capacidad catalítica de Trk para fosforilar ARMS, una de las proteínas adaptadoras de p75, involucrada en crecimiento y supervivencia (Nykjaer *et al.*, 2005).

APOPTOSIS

Desde que se descubrieron los factores neurotróficos, la muerte neuronal era considerada como un proceso pasivo, en el que la célula moría simplemente de inanición frente a la ausencia de dichos factores. En 1988, Martin y colaboradores mostraron que la supervivencia de neuronas simpáticas, privadas de NGF, podía ser sostenida por inhibición de la síntesis de ARN y

proteína. Ello implicaba que la muerte neuronal estaba subyugada a la activa participación de la maquinaria celular, que seguía un programa establecido para este propósito (Martin *et al.*, 1988). En este sentido, la denominada muerte celular programada no solo se diferenciaba de otros tipos de muerte celular por sus características morfológicas, sino también por los mecanismos moleculares en ella implicados.



La manifestación morfológica de la muerte celular programada se conoce como apoptosis. A diferencia de otros tipos de muerte celular, como la autofagia o la necrosis, la morfología de una célula apoptótica se caracteriza por la condensación de su citoplasma y cromatina, la fragmentación de su ADN (*DNA ladder*), el colapso del citoesqueleto

y la formación de unos característicos cuerpos apoptóticos, que son rápidamente fagocitados por macrófagos u otras células adyacentes. A nivel molecular, la apoptosis es el único tipo de muerte celular que esta controlado por proteínas especializadas (Yuan *et al.*, 2003). Dichas proteínas comprenden miembros de la familia Bcl-2, Apaf-1 y, como núcleo central ejecutor de la muerte, las caspasas. La familia Bcl-2 incluye miembros anti-apoptóticos y pro-apoptóticos que regulan la actividad de las caspasas, mientras que Apaf-1 es un activador de unión directa. Actualmente la familia de las caspasas está constituida por 14 miembros en mamíferos. Todas ellas son sintetizadas en forma de precursor inactivo que consta de un prodominio amino-terminal seguido de dos subunidades, una grande y una pequeña, localizada en su extremo carboxi-terminal. Por proteólisis, el proenzima es liberado de su prodominio dando lugar al enzima activo, que actúa en forma de heterodímero.

En base a la estructura peptídica del proenzima, las caspasas se dividen en dos grupos: las de prodominio corto, denominadas caspasas efectoras (caspasas -3, -6, -7, -14), y las de prodominio largo, denominadas caspasas iniciadoras (**Tabla 3**). Éstas últimas están a su vez divididas funcionalmente en dos grupos: las que regulan directamente la muerte celular (caspasas -2, -8, -9, -10) y las que además están involucradas en la maduración de citoquinas pro-inflamatorias (caspasas -1, -4, -5, -11, -13, -12). Así como las caspasas efectoras actúan sobre una gran número de substratos intracelulares, las caspasas iniciadoras actúan preferencialmente sobre los precursores de las propias caspasas. Para ello, las caspasas iniciadoras presentan dos tipos de motivos implicados en la interacción proteína-proteína: el dominio efector de muerte (DED) y el dominio de unión a caspasas (CARD), ambos asociados a la oligomerización y activación de diferentes caspasas (Twomey y McCarthy, 2005).

Durante el desarrollo embrionario de los mamíferos aproximadamente el 50-70% de células nerviosas mueren por apoptosis. Esta extensiva muerte forma parte esencial de los procesos morfogénicos que esculpen el sistema nervioso de los mamíferos (De Zio *et al.*, 2005). Sin embargo, la apoptosis no es patrimonio exclusivo de la neuronas, ocurre en todo tipo de células, donde la combinatoria de caspasas y miembros de la familia Bcl-2 es específica, dependiendo del estadio del desarrollo y del tejido al que pertenecen. Como muestra del nivel de especificidad y control sobre este sistema, la apoptosis puede ser activada de diferentes formas. De manera autónoma, una célula entra en apoptosis cuando viene predeterminado por su propio destino celular, como ocurre en nemátodos. No obstante, en organismos más complejos como los mamíferos, la apoptosis se produce de manera no autónoma, en la que la comunicación intercelular juega un papel esencial. En este caso, la apoptosis puede ser activada mediante dos vías diferentes: la vía intrínseca y la vía extrínseca. La vía intrínseca se da por despolarización mitocondrial y consiguiente liberación del citocromo c al espacio citosólico. Como consecuencia,

Prodominio Largo		Dominios
Iniciadoras	Caspasa 2	CARD
	Caspasa 8	DED
	Caspasa 9	CARD
	Caspasa 10	DED
Inflamatorias	Caspasa 1	CARD
	Caspasa 4	CARD
	Caspasa 5	CARD
	Caspasa 11	CARD
	Caspasa 12	CARD
	Caspasa 13	CARD
Prodominio Corto		
Efectoras	Caspasa 3	
	Caspasa 6	
	Caspasa 7	
	Caspasa 14	

Tabla 3. Clasificación de las diferentes caspasas de vertebrados.

el citocromo c es capaz de agregarse con Apaf-1 y la procaspasa-9, formando un complejo llamado aptosoma, en el que la caspasa efectora resulta activada. La vía extrínseca es mediada por receptores de superficie celular, ya sea por falta de inhibición, como en el caso de la muerte mediada por los receptores Trk, o por activación a través de dominios de muerte celular, como el de p75 (ver **Fig. 16**). En este caso se forma un complejo multimérico de señalización (DISC (*Death Inducing Signalling Complex*)) en el que las correspondientes proteínas reclutadas por los respectivos receptores se agregan para mediar la activación autocatalítica de las caspasas (Twomey y McCarthy, 2005).

Bibliografia

- Arevalo, J.C., Conde, B., Hempstead, B.L., Chao, M.V., Martin-Zanca, D., Perez, P. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20: 5908-5916.
- Atkin, N.B., Ohno, S. (1967) *Chromosoma* 23: 10-13.
- Barde, Y.A., Edgar, D., Thoenen, H. (1982) *EMBO J.* 1: 549-553.
- Barker, P.A. (1998) *Cell Death Diff.* 5: 346-356.
- Berkemeier, L.R., Winslow, J.W., Kaplan, D.R., Nikolics, K., Goeddel, D.V., Rosenthal, A. (1991) *Neuron* 7: 857-866.
- Bibel, M., Barde, Y.A. (2000) *Genes Dev.* 14: 2919-2937.
- Bone, Q. (1960) *Q. J. Microsc. Sci.* 101: 371-379
- Brooke, N.M., Garcia-Fernández, J., Holland, P.W. (1998) *Nature* 392: 920-922.
- Cerfontaine, P. (1906) *Arch. Biol. Liege* 22: 229-418.
- Cohen, S. (1983) *Cancer* 51: 1787-1791.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R. (1957) *Cancer Res.* 17: 15-20.
- Conklin, E.G. (1933) *J. Morphol.* 54: 69-151.
- Conway-Morris, S. (1998) *The crucible of creation: The Burgess Shale and the rise of animals.* Oxford University Press.
- Conway Morris, S. (2000a) *Cell* 100: 1-11.
- Conway-Morris, S. (2000b) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 25: 4426-4429.
- Demski, L.S., Beaver, J.A., Morrill, J.B. (1996) *Isr. J. Zool.* 42: S117-S129.
- DeZio, D., Giunta, L., Corvaro, M., Ferraro, E., Cecconi, F. (2005) *Semin. Cell Dev. Biol.* 16: 281-294.
- Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M., Varfolomeev, E. (1995) *Trends Biochem. Sci.* 20: 342-344.
- Fernandes, J., Celniker, S.E., Lewis, E.B., VijayRaghavan, K. (1994) *Curr. Biol.* 4: 957-964.
- Garcia-Fernández, J. (2005) *Heredity* 94: 145-152.
- Garcia-Fernández, J., Holland, P.W. (1994) *Nature* 370: 563-566.

Bibliografija

- Gellon, G., McGinnis, W. (1998) *Bioessays* 20: 116-125.
- Gotz, R., Koster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharl, M., Thoenen, H. (1994) *Nature* 372: 266-269.
- Hallböök, F., Ibáñez, C.F., Persson, H. (1991) *Neuron* 6: 845-858.
- Hamburger, V. (1980) *Perspect. Biol. Med.* 23: 600-616.
- Harris, C.L. (1996) *Concepts in Zoology*. Second Edition. Harper Collins. New York.
- Hatscheck, B. (1893) *The amphioxus and its development*. Trans. Tuckey. Swan Sonnenschein & Co. London. MacMillan & Co. New York.
- He, X.L., Garcia, C. (2004) *Science* 304: 870-875.
- Hempstead, B.L. (2002) *Curr. Opin. Neurobiol.* 12: 260-267.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., Barde, Y.A. (1990) *Nature* 344: 339-341.
- Holland, N.D., Chen, J. (2001) *Bioessays* 23: 142-51.
- Holland, P.W.H. (1996) *Isr. J. Zool.* 42: S247-S272.
- Holland, P.W.H. (2003) *J. Struct. Funct. Genomics* 3: 75-84.
- Holland, P.W.H., Garcia-Fernández, J., Williams, N.A., Sidow, A. (1994) *Dev. Suppl.* 125-133.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 677-736.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* 72: 609-642.
- Ibáñez, C.F. (1994) *J. Neurobiol.* 25: 1349-1361.
- Ibáñez, C.F. (1995) *Trends Biotechnol.* 13: 217-227.
- Jefferies R.P.S. (1986). *The ancestry of vertebrates*. British Museum (Natural History). Dorset Press.
- Kaplan, D.R., Miller, F.D. (2000) *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 381-391.
- Klein, R., Parada, L.F., Coulier, F., Barbacid, M. (1989) *EMBO J.* 8: 3701-3709.
- Kowalevsky, A. (1867) *Entwicklungsgeschichte des Amphioxus lanceolatus*. Mem. de l'acad. Imp. Desc. de St. Petersburg.
- Lacalli, T.C. (2002) *J. Morphol.* 252: 227-237.
- Lacalli, T.C., Kelly, S.J. (2003) *J. Morphol.* 257: 190-211.
- Lamballe, F., Klein, R., Barbacid, M. (1991) *Cell* 66: 967-979.
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., Barde, Y.A. (1989) *Nature* 341: 149-152.

- Levi-Montalcini, R. (1987) *Science* 235: 1154-1162.
- Levi-Montalcini, R., Cohen, S. (1960) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85: 324-341.
- Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. (1951) *J. Exp. Zool* 116: 321-361.
- Liepinsh, E., Ilag, L.L., Otting, G., Ibáñez, C.F. (1997) *EMBO J.* 16: 4999-5005.
- Lundin, L.G., Larhammar, D., Halböök, F. (2003) *J. Struct. Funct. Genomics* 3: 53-63.
- Mallatt, J., Chen, J.Y. (2003) *J. Morphol.* 258: 1-31.
- Martin, D.P., Schmidt, R.E., DiStefano, P.S., Lowry, O.H., Carter, J.G., Jonson, E.M.Jr. (1988) *J. Cell Biol.* 106: 829-844.
- Martin-Zanca, D., Hughes, S.H., Barbacid, M. (1986) *Nature* 319: 743-748.
- Martin-Zanca, D., Oskam, R., Mitra, G., Copeland, T., Barbacid, M. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9: 24-33.
- McDonald, N.Q., Chao, M.V. (1995) *J. Biol.Chem.* 270: 19669-19672.
- Nelsen, O.E. (1953) *Comparative embryology of the vertebrales*. McGraw-Hill. New York.
- Nilsson, A.S., Fainzilber, M., Falck, P., Ibáñez, C.F. (1998) *FEBS Lett.* 424: 285-290.
- Ninkina, N., Grashchuck, M., Buchman, V.L., Davies, A.M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 13019-13025.
- Nykjaer, A., Willnow, T.E., Petersen, C. (2005) *Curr. Opin. Neurobiol.* 15: 49-57.
- Ohno, S. (1970) *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag. New York
- Ohno, S. (1999) *Semin. Cell. Dev. Biol.* 10: 517-522.
- Oppenheim, R.W. (1989) *Trends Neurosci.* 12: 252-255.
- Pallas, P.S. (1774) *Naturgeschichte merkwürdiger tiere in welcher vornehmlich neue unbekannte tierarten durch kupferstiche, beschreibungen und erklärungen erläutert werden. (Historia natural de animales singulares, en la cual se describen principalmente especies nuevas desconocidas mediante grabados y explicaciones).*
- Philippe, H., Lartillot, N., Brinkmann, H. (2005) *Mol. Biol. Evol* 22: 1246-1253.
- Poo, M.M. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 24-32.
- Presley, R., Morder, T.J., Slipka, J. (1996) *Isr. J. Zool.* 42: S-97-S116.
- PROSITE. www.expasy.org/prosite.
- Ramón y Cajal, S. (1968) *Degeneration and Regeneration of the nervous system*. Trans. R. May, 1928. Reprint. New Cork: Hafner.

Bibliografija

- Ramón y Cajal, S. (1972) The structure of the retina. Trans. Thorpe and Glick. Springfield, Ill.: Thomas.
- Schwartz, J.H. (1999) Sudden origins: Fossils, Genes, and the emergence of species. John Wiley & Sons, Inc.. New York.
- Scott, J., Selby, M., Urdea, M., Quiroga, M., Bell, G.I., Rutter, W.J. (1983) *Nature* 302: 538-540.
- Segal, R.A. (2003) *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 299-330.
- Shu, D.G., Conway Morris, S., Han, J., Chen, L., Zhang, X.L., Zhang, Z.F., Liu, H.Q., Li, Y., Liu, J.N. (2001) *Nature* 414: 419-424.
- Shu, D.G., Morris, S.C., Han, J., Zhang, Z.F., Yasui, K., Janvier, P., Chen, L., Zhang, X.L., Liu, J.N., Li, Y., Liu, H.Q. (2003) *Nature* 30: 526-529.
- Stokes, M.D., Holland, N.D. (1995) *Acta Zool* 76: 105-120.
- Tung, T.C., Wu, S.C., Tung, Y.Y.F. (1958) *Sci. Sinica* 7: 1280-1319.
- Twomey, C., McCarthy, J.V. (2005) *J. Cell. Mol. Med.* 9: 345-359.
- Whittaker, J.R. (1997) Cephalochordates, the Lancelets. pp. 365-381. In *Embryology: Constructing the organism*. Gilbert and Raunio. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland.
- Wicht, H., Lacalli, T.C. (2005) *Can. J. Zool.* 83: 122-150.
- Yan, S. (1999) *Develop. Growth Differ.* 41: 503-522.
- Yuan, J., Lipinski, M., Degterev, A. (2003) *Neuron* 40: 401-413.

CAPÍTULO II



Objetivos

Desarrollo del anfióxico como modelo en Evo-Devo experimental

Los modelos animales comúnmente utilizados en experimentación, como *Caenorhabditis*, *Drosophila*, *Xenopus*, ratón o pollo, comparten ciertas características que facilitan su manipulación en el laboratorio. En términos generales, son organismos de ciclo biológico relativamente corto y conocido en todas sus fases. Su estabulación se lleva a cabo de manera rutinaria, empleando protocolos bien establecidos, que aseguran su reproducción en cautividad. Todo ello ha contribuido al desarrollo de tecnologías que actualmente se aplican en los mismos organismos, con el objetivo de estudiar la regulación, estructura y función de los genes y sus productos, en sus más diversos aspectos. Gran parte de dichas tecnologías están todavía fuera del alcance del anfióxico. En los últimos diez años la clonación de genes y su caracterización, principalmente por hibridación *in situ*, ha realizado su importancia como modelo biológico, pero también ha constatado la necesidad de realizar estudios funcionales. Uno de los principales inconvenientes al respecto es la extremada dificultad para mantener y reproducir este organismo en cautividad. Como consecuencia, la obtención de embriones está supeditada a las condiciones reproductivas de los animales en su entorno natural, que son variables y en gran parte impredecibles, generando una ventana de tiempo muy limitada para trabajar con el animal *in vivo*.

Así pues, los **objetivos** que se plantearon son:

- Estudio del ciclo reproductivo de *Branchiostoma lanceolatum*
- Estudio de las condiciones para la correcta estabulación de *Branchiostoma lanceolatum*
- Desarrollo de métodos para la obtención y cría de los embriones de *Branchiostoma lanceolatum*

Aislamiento y caracterización de factores y receptores neurotróficos en Branchiostoma floridae

Los factores y receptores neurotróficos son esenciales para la elaboración del sistema nervioso vertebrado. Su sistema de señalización está formado por múltiples componentes que se relacionan entre sí de manera compleja. En mamíferos consta de cuatro neurotrofinas (NGF, BDNF, Nt-3 y Nt-4/5), tres receptores de la familia Trk (TrkA, TrkB, TrkC) y un receptor p75. Todos ellos componen un sistema estrechamente vinculado a la adquisición de caracteres complejos en vertebrados superiores. Ello queda plasmado principalmente por su importante papel en funciones neuronales superiores, tales como la capacidad cognitiva y el comportamiento complejo, así como también por su expresión en estructuras que únicamente están presentes en vertebrados, como las crestas neurales y sus derivados. Tras la secuenciación del genoma humano, el análisis comparado con los genomas de *C.elegans* y *Drosophila* ha destacado, por un lado, la conservación de algunos mecanismos como los relacionados con la apoptosis y, por otro, la expansión de ciertas familias génicas involucradas en el funcionamiento del sistema inmune y del sistema nervioso. Entre ellas se encuentran los receptores Trk y las neurotrofinas, cuya ausencia en los genomas invertebrados analizados ha inducido la creencia generalizada de que el sistema neurotrófico Nt/Trk es una innovación de los vertebrados e, incluso, requisito indispensable para la construcción de sistemas nerviosos complejos.

Así pues, los **objetivos** que se plantearon son:

- Búsqueda de genes implicados en apoptosis en el anfioxo *B. floridae*.
- Búsqueda y aislamiento de genes homólogos a los receptores Trk y neurotrofinas de vertebrados en el anfioxo *B. floridae*.
- Caracterización de su estructura genómica.
- Análisis *in silico* de dominios proteicos y secuencias peptídicas conservadas. Análisis filogenéticos .
- Caracterización funcional en sistemas heterólogos de células en cultivo.
- Análisis de los patrones de expresión durante la embriogénesis y en el adulto de *B. floridae*

CAPÍTULO III



Resultados

Resumen

Desde el inicio de esta tesis doctoral el trabajo de laboratorio ha sido combinado con el trabajo de campo, durante la época reproductiva tanto del anfioxo americano (*Branchiostoma floridae*) como del anfioxo europeo (*Branchiostoma lanceolatum*). El aislamiento y caracterización de los genes descritos en este volumen ha sido realizada exclusivamente en *Branchiostoma floridae*. Por este motivo, todo el material biológico referente al anfioxo procede de la recolección de especímenes y la obtención de embriones de diferentes poblaciones naturales de *Tampa Bay*, en Florida, Estados Unidos. Además del coste económico que comporta el traslado a Florida durante la época reproductiva estival de *Branchiostoma floridae*, la cantidad de material obtenido es muy variable, en algunos casos incluso insuficiente dada la duración de la estancia, porque depende únicamente de las condiciones naturales que inducen la puesta. Con el objetivo de localizar poblaciones más accesibles se inició una búsqueda en el litoral mediterráneo próximo a la costa catalana. Antiguos registros de algunas instituciones oceanográficas indicaban la presencia de especímenes de *Branchiostoma lanceolatum* en el litoral de la Costa Brava catalana, concretamente en Blanes, y en el litoral de la frontera Franco-Española, concretamente en Banyuls-sur mer. Mientras que la población de Blanes parece estar constituida permanentemente por individuos juveniles (Rafael Sardà, comunicación personal), la población próxima a Banyuls-sur-mer, frente a la costa de Argelès-sur-mer es variada y demográficamente muy densa. En base a la experiencia obtenida con el anfioxo americano, se realizó un seguimiento discontinuo de la población de Argelès-sur-mer para acotar el período reproductivo durante la época estival. Así se observó que el desarrollo gonadal era adecuado para la puesta durante los primeros meses de verano. Posteriormente, a principios del año 2002, una iniciativa conjunta de los diferentes laboratorios europeos que utilizan el anfioxo como modelo, decidió establecer en Banyuls-sur-mer un centro de recogida y estudio de la población detectada en Argelès-sur-mer. El mismo verano de 2002 se inició un período rotativo entre los diferentes miembros de distintos grupos europeos para cubrir más de tres meses continuados de observación y estudio de especímenes procedentes de esta población. Dicho periodo rotativo se ha repetido anualmente y continúa en la actualidad. Los resultados obtenidos durante los dos primeros

años de cooperación aparecen descritos en el siguiente artículo, donde todos los autores han contribuido por igual.

En este trabajo se describen los primeros métodos desarrollados para la reproducción del anfibio mediterráneo en cautividad. Los animales estabulados se mantuvieron en acuarios de agua marina filtrada, bajo diferentes condiciones de temperatura, aireación y alimentación, con el objetivo de establecer un entorno artificial favorable para su estabulación prolongada. Asimismo, se estudió el comportamiento reproductivo en paralelo entre la población natural y los animales estabulados. La puesta espontánea de los animales capturados coincidía con la puesta de la población natural, indicando que las condiciones de estabulación no alteran el comportamiento reproductivo normal. Con el objetivo de inducir la puesta a voluntad en los animales estabulados se desarrolló un protocolo de choque térmico resultando en una eficacia de hasta el 95 por ciento, incluso en periodos de inactividad reproductiva en la población natural.

Preliminary Observations on the Spawning Conditions of the European Amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) in Captivity

MICHAEL FUENTES¹, MICHAEL SCHUBERT⁴, DIANA DALFO², SIMONA CANDIANI³, ELIA BENITO², JOSEP GARDENYES², LAURA GODOY², FREDERIC MORET⁵, MARGARITA ILLAS², IAIN PATTEN², JON PERMANYER², DIANA OLIVERI³, GILLES BOEUF¹, JACK FALCON¹, MARIO PESTARINO³, JORDI GARCIA FERNANDEZ², RICARD ALBALAT², VINCENT LAUDET⁴, PHILIPPE VERNIER⁵, AND HECTOR ESCRIVA^{4*}

¹Laboratoire Arago, UMR 7628, CNRS and Université Pierre et Marie Curie, BP 44, F-66651 Banyuls sur Mer, France

²Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

³Dipartimento di Biologia Sperimentale, Ambientale e Applicata, Università di Genova, 16132, Genova, Italy

⁴Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, UMR 5161 CNRS/ENS de Lyon, Ecole Normale Supérieure de Lyon, IFR128 BioSciences Lyon-Gerland, 69364 Lyon Cedex 07, France

⁵Developpement, Evolution et Plasticité du Système Nerveux, UPR 2197, Institut de Neurobiologie A. Fessard, CNRS, 91118 Gif-sur-Yvette, France

ABSTRACT Members of the subphylum Cephalochordata, which include the genus *Branchiostoma* (i.e. amphioxus), represent the closest living invertebrate relatives of the vertebrates. To date, developmental studies have been carried out on three amphioxus species (the European *Branchiostoma lanceolatum*, the East Asian *B. belcheri*, and Floridian-Caribbean *B. floridae*). In most instances, adult animals have been collected from the field during their ripe season and allowed (or stimulated) to spawn in the laboratory. In any given year, dates of laboratory spawning have been limited by two factors. First, natural populations of these three most studied species of amphioxus are ripe, at most, for only a couple of months each year and, second, even when apparently ripe, animals spawn only at unpredictable intervals of every several days. This limited supply of living material hinders the development of amphioxus as a model system because this limitation makes it more difficult to work out protocols for new laboratory techniques. Therefore we are developing laboratory methods for increasing the number of amphioxus spawning dates per year. The present study found that a Mediterranean population of *B. lanceolatum* living near the Franco-Spanish border spawned naturally at the end of May and again at the end of June in 2003. Re-feeding experiments in the laboratory demonstrated that the gonads emptied at the end of May refilled with gametes by the end of June. We also found that animals with large gonads (both, obtained from the field and kept and fed at the laboratory during several weeks) could be induced to spawn in the laboratory out of phase with the field population if they were temperature shocked (spawning occurred 36 hours after a sustained increase in water temperature from 19°C to 25°C). *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 302B:384–391, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

The invertebrate chordate amphioxus (Chordata, Cephalochordata, Branchiostomidae) is of considerable importance for understanding the

*Correspondence to: Hector Escriva, Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, UMR 5161 CNRS/ENS de Lyon, Ecole Normale Supérieure de Lyon, IFR128 BioSciences Lyon-Gerland, 46, Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France. E-mail: hector.escriva.garcia@ens-lyon.fr

Received 23 March 2004; Accepted 30 March 2004

Published online 28 June 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jez.b.20025

evolution of the vertebrates from the invertebrates. Amphioxus was first described as a mollusk in 1774 by the German zoologist Peter Simon Pallas (Pallas, 1774), who called it *Limax lanceolatus*, from a specimen from the coast of Cornwall. The European amphioxus was re-discovered in 1834 by the Italian naturalist Gabriel Costa, who considered it to be closely related to vertebrates and renamed it as *Branchiostoma lubricum* (Costa, 1834). William Yarrell in 1836 was the first to call it amphioxus (*Amphioxus lanceolatus*) and to describe its notochord (Yarrell, 1836). Today, the European amphioxus, known as *Branchiostoma lanceolatum*, is the most widely distributed species in the genus. Traditionally, myomere counts, counts of fin chambers, position of atriopore and anus, and qualitative differences in notochord and caudal fin shape have been used to distinguish up to 23 species of the genus *Branchiostoma* around the world (Poss and Boschung, '96). *B. lanceolatum* has been found in the North Sea, the south coast of England, and the Atlantic coasts of France, Spain, and Portugal, in the Mediterranean as well as in the Black sea. It has also apparently been found in the Suez Canal, and in the Indian Ocean (Poss and Boschung, '96).

During the last ten years, developmental studies using amphioxus embryos have led to the establishment of homologies between amphioxus and vertebrates that have given insights into the origin and evolution of many vertebrate body parts (e.g., different vertebrate brain regions, neural crest or rostrocaudal segmentation). Thus, both amphioxus and vertebrates possess a notochord, a dorsal hollow nerve chord, segmented muscle blocks, and a perforated pharyngeal region, whereas amphioxus lacks vertebrate-specific characters, such as definite neural crest cells and placodes, a cartilaginous or bony endoskeleton, and a morphologically segmented hindbrain (Holland and Chen, 2001). In addition, the amphioxus genome resembles that of a prototypical vertebrate in that it has not undergone the extensive gene duplications that characterize the diversification of vertebrates (Furlong and Holland, 2002). This developmental and genetic simplicity of amphioxus (when compared to vertebrates) makes amphioxus an excellent animal model for studies of the evolution of development (Evo-Devo). However, although amphioxus has been raised through postmetamorphic stages starting from gametes spawned in the laboratory, laboratory spawnings tend to be infrequent and unpredictable. Thus, in order to

get embryos, researchers have to travel to Florida (USA) or Qingdao (China) during the spawning season, which is a major limitation for the development of novel laboratory techniques for amphioxus.

To date, developmental studies have been carried out on three amphioxus species (the European *Branchiostoma lanceolatum*, the East Asian *B. belcheri*, and Floridian-Caribbean *B. floridae*). In most instances, adult animals have been collected from the field during their ripe season and allowed (or stimulated) to spawn in the laboratory. In any given year, dates of laboratory spawning have been limited by two factors. First, natural populations of these three most studied species of amphioxus are ripe, at most, for only a couple of months each year and, second, even when apparently ripe, animals spawn only at unpredictable intervals of every several days. The spawning behavior of different amphioxus species varies from a few contiguous days per year for *B. belcheri* (Wu and others, '94), to approximately weekly spawnings during the breeding season for *B. floridae* (Stokes and Holland, '96a). Concerning the European lancelet (*B. lanceolatum*), previous studies have suggested that the breeding season expands over a period of several weeks when the water temperature is high (Cerfontaine, '06) and have assumed that individuals spawn only once a year (Courtney, '75). The lack of control of the spawning events combined with the relatively small number of natural spawnings per year presents a serious limitation for the development of amphioxus as a laboratory model animal. In the present study, we have analyzed the reproductive behavior of *Branchiostoma lanceolatum* and we present a protocol with which, for the first time, spawning of amphioxus can be induced in captivity independent of natural spawnings in the field.

MATERIALS AND METHODS

Sampling of amphioxus

During May and June 2003 adult amphioxus (*B. lanceolatum*) were collected daily in coastal waters close to Argelès-sur-Mer (France) at a depth of 5-10m from sandy substratum approximately 50-100m offshore (Fig. 1). The density of amphioxus at the collecting place was 1-5 adult animals per liter of sand. The latitude and longitude of the collecting place were, respectively, 42° 32' 53" N and 3° 03' 27" E. Collection was performed with a research boat from the "Laboratoire Arago,

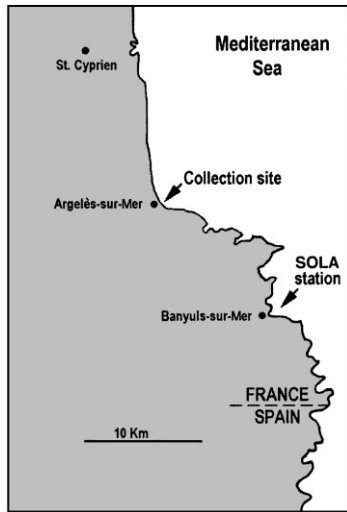


Fig. 1. A map of the Mediterranean shoreline in the vicinity of the Franco-Spanish border showing the collection site for adult specimens of the European amphioxus, *Bran-chiostoma lanceolatum*. Also shown is the SOLA hydrographic site where seawater temperatures were recorded.

Observatoire Océanologique, Université Pierre et Marie Curie/C.N.R.S," Banyuls-sur-Mer, France (Fig. 1). Animals were collected either with a "Charcot-Picard" (60cm × 20cm, mesh size 50µm) or a "Van Veen" (300cm²) sediment dredge. After collection, the animals were transported to the "Laboratoire Arago, Observatoire Océanologique," Banyuls sur Mer, France (Fig. 1).

Maintenance of amphioxus in the laboratory

Following collection, adult animals were kept in tanks with filtered seawater. Incoming seawater was always filtered through four sand filters of 1m³, each filled with 1mm grain size sand. For the temperature tolerance experiments, ≈200 adult animals were kept in 50l thermostated tanks without food and without sand at constant temperatures of 15°C, 20°C, 25°C or 30°C for two weeks. Water was changed two times a week, continuous air supply was provided, and the animals were subjected to a 14/10 hours days/night cycle.

For the experiments of observation of spontaneous spawning (Exp. I, Fig. 4), mature amphioxus adults (with full gonads) were kept in 15l rectangular plastic tanks (100–200 animals/tank) in non-thermostated natural filtered seawater without feeding in a room with direct sunlight.

Animals with empty gonads (post-spawning stage) were maintained at 19°C in 15l rectangular plastic tanks (100–200 animals/tank) without sand and with continuous air supply (Exp. II, Fig. 5). Water was changed twice a day and food was added twice a day just after the water change. Animals were fed with crushed "Tetramicrofood" (1g/day) (www.tetra-online.com) supplemented with 30,000–80,000cells/ml/day of mixed algae (1/3 of *Dunaliella tertiolecta*, 1/3 of *Isochrysis galbana*, and 1/3 of *Tetraselmis suecica*). Algal cultures were grown in f/2 medium as described in Guillard et al. (Guillard and Ryther, '62). The animals used in the temperature-shock experiments were maintained at 19°C in 15l plastic tanks without sand and without feeding (Exp. IIIA, Fig. 6), water was changed twice a week, and continuous air supply was provided in a room with direct sun light.

RESULTS AND DISCUSSION

Natural spawning behavior of the European amphioxus

It has been proposed that water temperature is the most important factor for controlling the breeding season of amphioxus (Stokes and Holland, '96b). Thus, we carried out our analysis between May and July 2003, when coastal water temperature increases along the Mediterranean coast of France (Fig. 2). When living amphioxus are looked at with the naked eye, gonads were usually visible through the translucent body wall. On the day of collection, the size of the gonads was used to assign each animal to one of five ripeness categories, namely: not grossly visible, very small, medium-small, medium-large, or large (method of Kubokawa and others, 2003) (Fig. 3). From these observations we were able to establish that, during the period of this study, the population of the European amphioxus off Argelès-sur-Mer spawned in approximate synchrony twice (± 2–3 days) with a one-month interval between the two consecutive spawnings. The first spawning was at the end of May (between May 29 and May 31) and the second at the end of June (between June 29 and June 30) (Fig. 3).

In general, the spawning behavior of different species of amphioxus tends to show significant variability. Thus, it has been proposed for *B. belcheri* that breeding in the field is limited to a few contiguous days per year, even if animals kept in the laboratory may spawn over a period of many weeks (Wu et al., '94). For *B. floridae*,

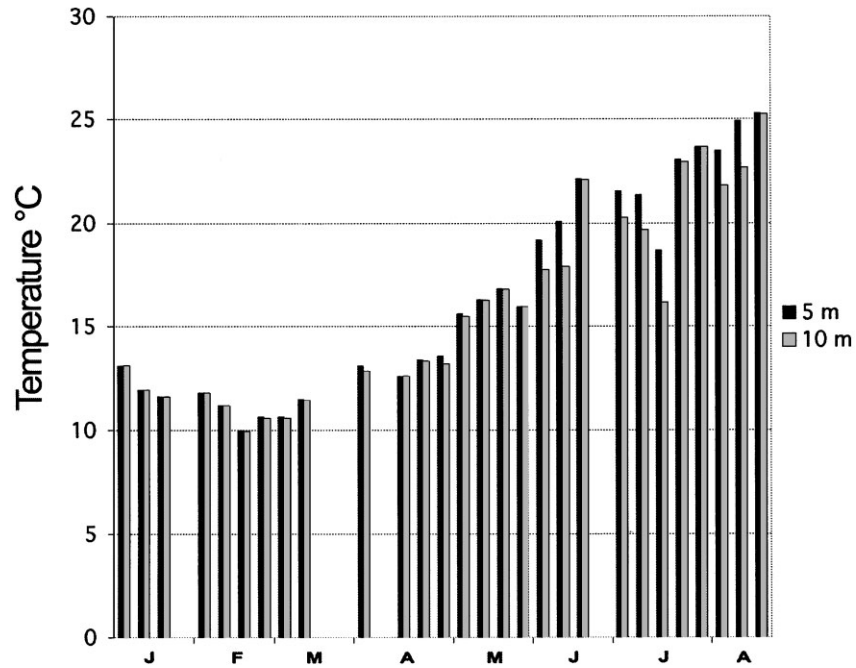


Fig. 2. Seawater temperature offshore of Banyuls sur Mer at 5m (black bars) and 10m depth (gray bars) from January to August 2003 recorded weekly by the SOLA hydrographic station (<http://www.obs-banyuls.fr/sola/sola.html>). In the

fourth week of January, the third and fourth week of March, the second week of April and the fourth week of June temperatures were not recorded. Our study started in May 2003 when the water temperature had risen above 15°C.

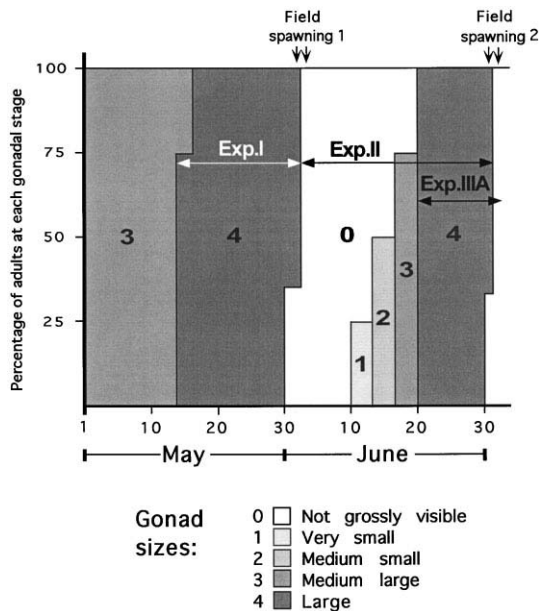


Fig. 3. Gonadal stages of *B. lanceolatum* determined from daily collections made from the beginning of May through early July 2003. The data reveal two relatively synchronous spawnings by the field population one close to the end of May and a second close to the end of June. This figure also depicts the time intervals, during which the laboratory-based experiments shown in figures 4 (Exp. I), 5 (Exp. II), and 6 (Exp. IIIA) were carried out.

multiple partially synchronous spawnings within one breeding season have been observed with a 1-2 week interval between two consecutive spawnings (Stokes and Holland, '96a). From our preliminary data, the European species, which has in the course of our analysis spawned in a synchronous way at least two times during the breeding season, seems to exhibit a spawning behavior closer to the one of the Florida species than to the one of the Chinese species, even though the interval between two consecutive spawnings seems to be longer for *Branchiostoma lanceolatum*.

Temperature tolerance in adult animals

To test the effects of temperature on amphioxus adults' fitness, adult animals were kept in 50l thermostated tanks without sand at constant temperatures of 15°C, 20°C, 25°C, and 30°C for two weeks. About 200 animals were used for each temperature assay. The animals did not receive any food, the water was changed two times a week, continuous air supply was provided, and the animals were subjected to an artificial 14/10 hours day/night cycle. The health status of the animals was assessed by their response to startling by light: healthy animals tend to stay at the bottom of

the tank when it is dark and become very active (e.g. they swim to the surface of the water) when the light is turned on, whereas unhealthy animals stay passively at the bottom of the tank when the light is turned on. After two weeks, animals cultured at 15° to 20°C were very active (90-100% of the animals were startled by light in the above test). Animals at 25°C survived but their activity was reduced (30-50% of the animals were startled), and at 30°C all animals died after 5–7 days (100%).

Observation of spontaneous spawning in captivity (Exp. I)

Spontaneous spawning occurred at night in tanks where males and females were kept together, in tanks with only males, and in tanks containing exclusively female animals. The presence of embryos as well as empty gonads of the adults was used as markers for spawnings. Different animal cultures were started at different days during the month of May 2003 (Fig. 4). Cultures were kept in 15l rectangular plastic tanks (100-200 animals/tank) in non-thermostated natural filtered seawater, in a room with direct sunlight, and without feeding. Surprisingly, all these cultures spawned spontaneously at days close to the natural spawning day in the field (29th–30th of May) (Fig. 4). One culture (≈ 100 animals) that was started on May 15 (culture A in Fig. 4), spawned twice, on May 30 and May 31 (70% and 30% of the animals, respectively). A second culture (culture B in Fig. 4), containing ≈ 100 animals mixed from three consecutive

collection days (22nd to 24th of May), spawned twice on May 26 and May 30 (50% of the animals each day). A third culture, in which males and females were separated (≈ 50 males and ≈ 50 females) (culture C in Fig. 4), was started on May 27 and a spontaneous spawning of the separated animals occurred on May 30 (20% of the animals). These spontaneous spawnings in captivity seem to represent a general behavior of sexually mature amphioxus in captivity since similar behavior has already been reported for the European amphioxus (Lankester and Willey, 1890) as well as for the Chinese (Wu and others, '94, Kubokawa and others, 2003), and the Florida species (D. Meulemans, personal communication).

Amphioxus gonadal maturation in culture (Exp. II)

After spontaneous spawning in the tank, animals with empty gonads (from culture A, Fig. 4) were kept in culture and fed as described in the Materials and Methods section. These animals slowly re-developed their gonads, even though this process in captivity was slower than in animals in the field (Fig. 5). Thus, in mid/late-June the amphioxus in the laboratory showed medium-large gonads (Fig. 5), while amphioxus in the field already showed large gonads (Fig. 3). This difference in the rate of gonadal maturation, together with the observation that animals with empty gonads do not re-develop their gonads without feeding (P. Vernier, personal communication) and the observation that mature animals kept for a long period without food resorb their gonads (L. Holland, personal communication)

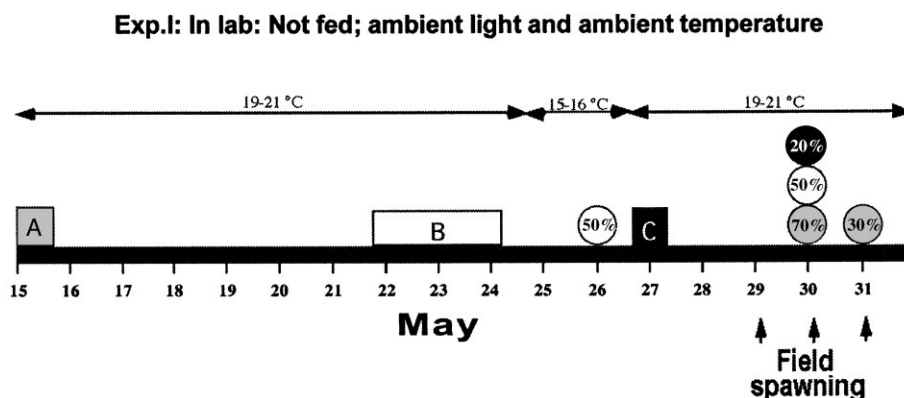


Fig. 4. A time line showing laboratory spawnings by three laboratory-maintained groups of amphioxus (A, B, and C). The animals, which were not fed, were maintained at ambient light and temperature. The boxes show the date(s) when each group

was collected, and the circles show the percentages of animals spawning on particular dates. Interestingly, for group B, about half of the animals spawned four days before the other half of the animals that spawned in synchrony with the field population.

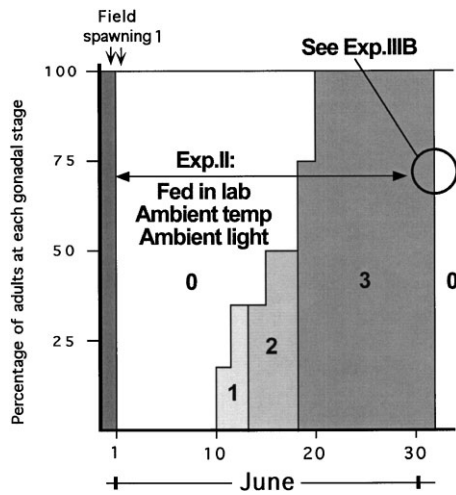


Fig. 5. The gonadal stages of a group of laboratory-maintained amphioxus that were fed and held under conditions of ambient light and temperature. All the animals in the group spawned out at the beginning of June and then, during the next few weeks, their gonads got successively riper (although never as fully ripe as the gonads of animals collected from the field during the same period). None of these amphioxus spawned in synchrony with the field animals at the end of June; therefore, in early July, they were used in a test for temperature induced spawning (Exp. IIIB shown in Fig. 6).

implies that food requirements are critical for the maturation of the gonads. However, other environmental parameters (like temperature, aeration or light) doubtlessly also influence gonadal maturation of amphioxus.

Protocol to induce spawning in cultured amphioxus (Exp. IIIA, B)

It has previously been reported that a temperature shock might be sufficient to induce spawnings in amphioxus (Stach, '99). Using this idea, we have developed a protocol to induce spawning of cultured amphioxus (*B. lanceolatum*) by changes of water temperature. With this protocol, we were able to induce spawnings on days that are not the natural spawning day both in amphioxus collected from the field (Exp. IIIA) as well as in amphioxus, which were kept in culture after spawning and had re-developed their gonads in captivity (Exp. IIIB). The protocol is as follows:

a) Keep animals with medium-large/large gonads (gonadal stages 3 and 4, Fig. 3) at 19°C (i.e., in tanks in a 19°C water bath), change the water twice a week; use continuous air supply and a 14/10 hours day/night cycle. Keep the animals under these conditions for a minimum of 3–5 days.

b) Change the animals to 25°C in the morning (no air supply, no water changes, under a 14/10 hours-day/night cycle) (i.e., put the tanks in a 25°C water bath).

c) The animals will subsequently spawn spontaneously in the aquarium after the sunset of the second day following the temperature change (i.e., about 36 hours later).

With this protocol we were able to obtain three independent inductions of controlled spawnings in adult *Branchiostoma lanceolatum* (Exp. III, Fig. 6). The first experiment (Exp. IIIA, Fig. 6) started on June 21 (ten days before the natural spawning day). Two tanks with 50 animals each were used. The first tank was temperature shocked (on June 25) and the second was used as a control (maintained at 19°C). 50% of the shocked animals spawned and the control animals did not spawn. The control animals still had full gonads 13 days later (3 days after the natural spawning day). The control animals were subsequently temperature shocked (on July 3) (Exp. IIIA, Fig. 6) and 95% of them spawned. In a third, independent experiment (Exp. IIIB, Fig. 6), the previously described empty animals that had been kept in culture and fed until their gonads were at the gonadal stage 3 (Fig. 3) were thermoshocked (on July 3) and 95% of these animals spawned (Exp. IIIB, Fig. 6). Thus, the described protocol is able to induce spawnings from premature animals on days that do not correspond to the natural spawning day. This new technical approach will significantly increase the availability of embryologic material from the European amphioxus and will be very helpful for future studies of evolution and development (Evo-Devo) using amphioxus.

For the Florida species, it has been suggested that a single amphioxus is able to spawn several times during the breeding season (Stokes and Holland, '96a,b). However, the only way to verify this hypothesis would be to continuously observe individual animals over long periods of time during the breeding season. In the present study, we have successfully reared post-spawning amphioxus until their gonads had re-developed and we have then induced a second spawning from these adults within the same breeding season (Exp. IIIB, Fig. 6). This is the first evidence that a given specimen of the European amphioxus is able to spawn at least twice during the same breeding season.

Embryos from induced spawnings develop normally in the tanks. The developmental timing of embryos from *B. lanceolatum* differs slightly from

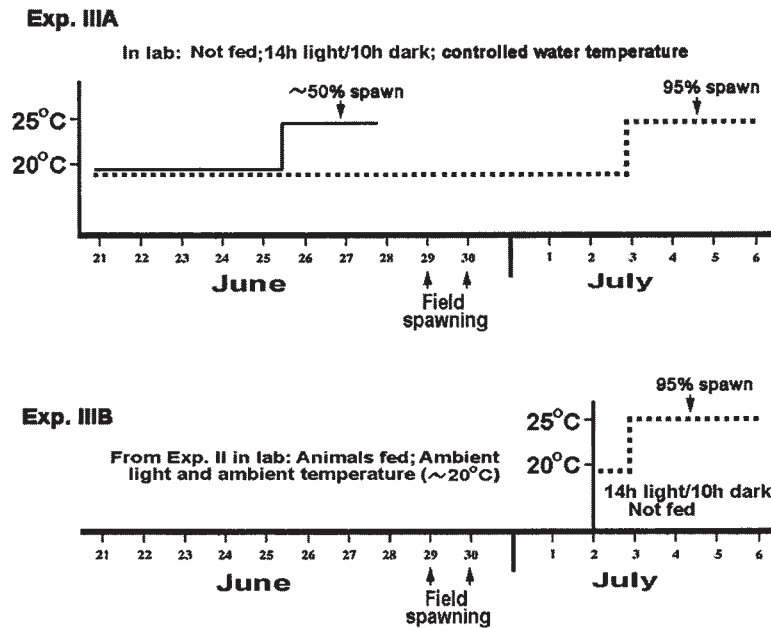


Fig. 6. Induction of spawning in laboratory-maintained amphioxus by temperature shock (a sustained 5°C increase in water temperature). In experiment IIIA, the animals were not fed and were maintained on a 14 hour light/10 hour dark cycle at thermostatically controlled water temperatures. Of the animals collected on June 21, a sub-sample (solid line) subjected to temperature shock on June 25 spawned 36 hours later, whereas the unshocked control subsample (dotted line) did not spawn at that time. The sub-sample of amphioxus that

had served as a control group in June was subsequently temperature shocked on July 3 and spawned 36 hours later. In experiment IIIB, the animals that had re-developed relatively large (although not maximum sized) gonads while being fed in the laboratory during June were temperature shocked on July 3 and spawned 36 hours later. Importantly, the induced spawnings of experiments IIIA and IIIB were not on dates when the field population of amphioxus spawned.

that of the Florida species (Stokes and Holland, '95). In general, *B. floridae* embryos and larvae develop faster than those of *B. lanceolatum*, probably due to differences in ambient water temperature, which is significantly higher in Florida. When we have cultured *B. lanceolatum* embryos at 24°C the development of these embryos speeds up and becomes much more like that of *B. floridae* embryos. Interestingly, when *B. lanceolatum* embryos are kept at 24°C for more than 24 hours they die, which suggests that embryos are more sensitive to high temperatures than adults (see the "Temperature tolerance in adult animals" section). When cultured at 19°C, *B. lanceolatum* embryos develop normally. While *B. floridae* larvae open their mouths at ≈36 hours (when reared at 22,5°C), *B. lanceolatum* larvae open their mouths at ≈48 hours (when reared at 19°C). This difference in developmental timing is more evident when comparing later developmental stages: for example, *B. floridae* develops the fifth gill slit at ≈20 days (when reared at 22,5°C) whereas *B. lanceolatum* reaches this developmental stage only after ≈30 days (when reared at 19°C).

CONCLUSIONS

The present study of the European amphioxus, *Branchiostoma lanceolatum*, has shown a common behavior of lancelet species, which is their capacity to spontaneously spawn in captivity during the breeding season. We have also established the optimal temperature conditions for rearing the European amphioxus, and, for the first time, we describe a feeding protocol for adult animals, with which they efficiently re-develop their gonads in captivity starting from empty animals that had previously spawned spontaneously in the laboratory. Moreover, we describe a method that, by using a temperature shock, induces spawning of mature animals in captivity on days that do not correspond to the natural spawning day. Using this protocol we were able to demonstrate that one *Branchiostoma lanceolatum* is able to spawn at least twice during one breeding season.

The preliminary data presented here will have to be further developed in the future since many questions still remain: When does the breeding season start and when does it end? What is the

extent of the amphioxus bed off Argelès-sur-Mer? Can spawnings be induced outside of the natural breeding season? How many spawnings can be induced from one single animal? Can the re-development of gonads in adult amphioxus be induced in a laboratory, which is not close to the Mediterranean Sea? Even so, the preliminary data presented here can probably be adapted to other amphioxus species, which will have an extraordinarily important impact on the community of amphioxus researchers working on evolution of development (Evo-Devo). Finally, our work probably represents an important step towards the establishment of a long-term laboratory culture of amphioxus for on-demand spawning.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Jean Luc Martinez, Arnaud Catania, Christophe Mariotti, and Eric Martinez for their help on the "Nereis boat." We thank Marcel Farre and Jean Claude Lecourt for their invaluable help on the "Argelès boat." We would also like to thank Claire Biron for her help at the Laboratoire Arago. We are indebted to Nicholas D. Holland and Linda Z. Holland for helpful discussion and their comments on this paper. We also thank François Bonneton and Stéphanie Bertrand for critical reading of the manuscript. Finally, we are very grateful to two anonymous reviewers for their comments and suggestions, which have greatly improved this paper.

LITERATURE CITED

- Cerfontaine P. 1906. Recherches sur le développement de l'amphioxus. Arch Biol Liege 22:229-418.
- Costa OG. 1834. Cenni zoologici, ossia descrizione delle specie nuove di animali scoperti in diverse contrade del regno nell' anno 1834. Annuario Zoologico 12, p. 49.
- Courtney WAM. 1975. The temperature relationships and age-structure of North Sea and Mediterranean populations of *Branchiostoma lanceolatum*. Symp Zool Soc Lond 36: 213-233.
- Furlong RF, Holland PW. 2002. Were vertebrates octoploid? Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci 357:531-544.
- Guillard RRL, Ryther JH. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Can J Microbiol 8:229-239.
- Holland ND, Chen J. 2001. Origin and early evolution of the vertebrates: new insights from advances in molecular biology, anatomy, and palaeontology. BioEssays 23: 142-151.
- Kubokawa K, Mizuta T, Morisawa M, Azuma N. 2003. Gonadal state of wild amphioxus populations and spawning success in captive conditions during the breeding period in Japan. Zool Sci 20:889-895.
- Lankester ER, Willey A. 1890. The development of the atrial chamber of amphioxus. Q J Microsc Sci 31(NS)123: 445-466; pl xxix-xxxii.
- Pallas PS. 1774. Spicilegia zoologica, quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque comentariis illustrantur. G.A. Lange. Berlin. I(10).
- Poss SG, Boschung HT. 1996. Lancelets (Cephalochordata: Branchiostomatidae): How many species are valid? Israel J Zool 42suppl:13-66.
- Stach T. 1999. The ontogeny of Poss the notochord of *Branchiostoma lanceolatum*. Acta Zool (Stockh) 80:25-33.
- Stokes MD, Holland ND. 1995. Embryos and larvae of a lancelet, *Branchiostoma floridae*, from hatching through metamorphosis: growth in the laboratory and external morphology. Acta Zool (Stockh) 76:105-120.
- Stokes MD, Holland ND. 1996a. Reproduction of the Florida lancelet (*Branchiostoma floridae*): spawning patterns and fluctuations in gonad indexes and nutritional reserves. Invert Biol 115:349-359.
- Stokes MD, Holland ND. 1996b. Life-history characteristics of the Florida lancelet, *Branchiostoma floridae*: some factors affecting population dynamics in Tampa bay. Israel J Zool 42suppl:67-86.
- Wu XH, Zhang SC, Wang YY, Zhang BL, Qu YM, Jiang XJ. 1994. Laboratory observation on spawning, fecundity and larval development of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*). Chin J Oceanol Limnol 12: 289-294.
- Yarrell W. 1836. A history of British fishes. 1st edition. London: J. Van Voorst, London 1:xxxvii + 408.

CAPÍTULO IV



Resultados

Resumen

La apoptosis es la manifestación morfológica de la muerte celular programada, un mecanismo genéticamente controlado que regula la eliminación de células en exceso o dañadas, ya sea durante el desarrollo embrionario o durante la etapa adulta de diferentes organismos. El creciente número de moléculas implicadas en procesos apoptóticos incluye, como núcleo central ejecutor, una gran familia de cisteína-proteasas englobada bajo el nombre de caspasas. Su esencial papel ejecutor en procesos apoptóticos ha sido descrito prácticamente en todos los metazoos. Hasta la fecha trece caspasas diferentes han sido identificadas en vertebrados, donde sus funciones se han diversificado tanto en procesos apoptóticos como inflamatorios. Tomando la ventaja que representa el anfibio, por el parentesco directo de sus antecesores con el ancestro de los vertebrados, se ha estudiado este sistema en *Branchiostoma floridae*. Este trabajo documenta por primera vez el patrón de muerte celular programada durante el desarrollo embrionario de un cefalocordado. Asimismo describe el aislamiento, realizado por la autora de esta tesis doctoral, del primer miembro conocido de la familia de las caspasas en el genoma de anfibio, la denominada AmphiCASP3/7. Su expresión ubicua durante el desarrollo embrionario de anfibio se inicia en las etapas tardías de la gastrulación y la caracterización funcional la vincula a las caspasas efectoras de vertebrados. AmphiCASP3/7 induce la muerte celular cuando se expresa de manera ectópica en células humanas en cultivo HEK293T y su actividad es inhibida por inhibidores específicos de caspasas efectoras. Cabe señalar que el comportamiento de AmphiCASP3/7 frente a su sustrato la asemeja a la caspasa-7 de vertebrados. No obstante, el análisis filogenético sitúa a AmphiCASP3/7 en la base de ambas caspasas -3 y -7 de vertebrados. Los resultados obtenidos reflejan en AmphiCASP3/7 la condición primitiva de las caspasas efectoras -3 y -7, en un estadio previo a las duplicaciones génicas que tuvieron lugar en el origen de los vertebrados, y realzan en cada una de ellas nuevas propiedades que podrían haber surgido en el transcurso de la evolución en vertebrados.

Isolation of AmphiCASP-3/7, an ancestral caspase from amphioxus (*Branchiostoma floridae*). Evolutionary considerations for vertebrate caspases

JR Bayascas¹, VJ Yuste¹, E Benito², J Garcia-Fernàndez² and JX Comella*¹

¹ Grup de Neurobiologia Molecular, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Av. Rovira Roure 44, E-25198 Lleida, Spain

² Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

* Corresponding author: JX Comella, Av. Rovira Roure 44, E-25198 Lleida, Spain. Tel: +34 973702414; Fax: +34 973702438; E-mail: joan.comella@cmb.udl.es

Received 9.10.01; revised 12.3.02; accepted 22.4.02
Edited by SJ Martin

Abstract

Caspases are a large family of cysteine proteases that play an essential role as effectors of apoptosis in metazoans. Thirteen different caspases have been identified in vertebrates so far, and their function in apoptotic or inflammatory responses is well documented. We have taken advantage of the broadly accepted condition of amphioxus (*Cephalochordata*, *Branchiostoma floridae*) as the closest living relative to vertebrates to study the molecular evolution of caspases. Here we report for the first time the pattern of programmed cell death during development of cephalochordates. We also describe the isolation and functional characterisation of the first caspase related gene in amphioxus, which we named AmphiCASP-3/7. The amphioxus caspase is expressed throughout development, from the gastrula to larva stage. AmphiCASP-3/7 induced cell death when ectopically expressed in human HEK 293T cells, and the recombinant protein was inhibited by DEVD peptides. AmphiCASP-3/7 reflects the primitive condition of the executor vertebrate caspases -3 and -7, prior to vertebrate specific duplication. Interestingly, AmphiCASP-3/7 is functionally closer to vertebrate caspase-7, as shown by substrate specificity both *in vitro* and in MCF7 cells. Our phylogenetic and functional data help in drawing the evolutionary history of caspases, and illustrates an example of acquisition in vertebrates of novel functional properties after gene duplication.

Cell Death and Differentiation (2002) 9, 1078–1089.
doi:10.1038/sj.cdd.4401075

Keywords: apoptosis; whole-mount TUNEL; caspases; amphioxus; gene duplication

Abbreviations: Ac-DEVD-afc, acetyl-Asp[OMe]-Glu[OMe]-Val-Asp[OMe]-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin; Ac-IETD-afc, acetyl-Ile-Glu[OMe]-Thr-Asp[OMe]-7-amino-4-trifluoromethylcoumar-

in; Ac-VEID-afc, acetyl-Val-Glu[OMe]-Ile-Asp[OMe]-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin; BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; bp, base pair; BSA, bovine serum albumin; CARD, caspase recruitment domain; CHAPS, 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propanesulfonic acid; DED, death effector domain; DTT, dithiothreitol; EDTA, sodium ethylenediaminetetraacetic acid; kb, kilobase; HEK 293T, human embryonic kidney 293T cells; IPTG, isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside; NBT, nitro blue tetrazolium; ORF, open reading frame; PBS, phosphate buffered saline; PCD, programmed cell death; PCR, polymerase chain reaction; PEG, polyethylene glycol; SDS, sodium dodecyl sulphate; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase; TUNEL, TdT mediated dUTP nick end-labelling; UTR, untranslated region; z-DEVD-fmk, benzyloxycarbonyl-Asp[OMe]-Glu[OMe]-Val-Asp[OMe]-fluoromethylketone; z-VAD-fmk, benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp[OMe]-fluoromethylketone

Introduction

Apoptosis is the morphological manifestation of programmed cell death (PCD), a genetically controlled mechanism that is used to remove surplus or damaged cells during embryonic development and in the adult.¹ The number of known molecules controlling apoptosis has rapidly grown during the past few years. Among them, there is a large family of cysteine proteases that cleave proteins after aspartate residues and are therefore named caspases. These proteases are now considered the core of the apoptotic machinery during the execution phase of apoptosis.^{2–7}

Caspases are synthesised as inactive zymogens composed of an amino-terminal prodomain, a large subunit and a small carboxy-terminal subunit. Proteolytic processing of the proenzyme at internal aspartate sites results in the removal of the prodomain and the formation of active heterodimers composed of two large and two small subunits.^{8–10} Active caspases recognise tetrapeptidic target sites, which are cleaved after an aspartate residue and are themselves activated by cleavage at specific aspartate sites.^{3,4,11}

Ten different human caspases were initially identified.^{12,13} Since the cloning of two new caspases in mouse (caspase-11 and caspase-12)¹⁴ and the identification of the human and mouse caspase-14 representatives,^{15–17} the number of mammalian caspases has increased to thirteen. Mammalian caspases are divided functionally into two main groups, one of them directly regulating cell death; the other one involved in the maturation of pro-inflammatory cytokines.^{4–6,18} On the basis of the prodomain structure, caspases are grouped into short-prodomain caspases (caspases -3, -6, -7 and -14) and long prodomain caspases. Long prodomains contain two types

of motifs involved in protein–protein interactions, the Death Effector Domain (DED) and the Caspase Recruitment Domain (CARD). Apoptotic caspases with long prodomains (caspase-2, -9, -8 and -10) are also known as initiator or apical caspases and are able to be auto-activated when aggregated with adaptor molecules. Caspases with short prodomains (executor or effector caspases) are usually activated by the initiator caspases.^{19–21} Consistent with this, initiator caspases exhibit a substrate preference for cleavage sites found in caspase precursors, while effector caspases act preferentially on other cellular substrates.⁶

Albeit this general outline of the hierarchy of caspases is generally accepted, the particular contribution of an individual caspase to the execution of the cell remains speculative. Analysis of cells from caspase-3 mutant mice or cell lines deficient in caspase-3 have established that this protein is the main executor caspase.^{22–25} Recently it has also been shown that depletion of either caspase-7 or caspase-6 from cell free extracts has minimal impact on apoptotic characteristics.²⁶ However, while caspase-7 null mice are embryonically lethal, caspase-6 mutant mice do not exhibit major developmental defects.²⁷ Tissue specific regulation and partial redundancy of these proteins may account for these discrepancies.

Caspases homologous have been described in a few taxa. The isolation of Hv Casp3A and Hv Casp3B in *Hydra vulgaris*,²⁸ and detection of apoptosis tightly linked with morphogenesis in *Hydractina echinata* metamorphosis²⁹ supports the idea that the advent of the apoptosis was instrumental for the evolution of metazoans. Although three novel caspases have been cloned in the nematode *Caenorhabditis elegans*,³⁰ only ced-3 is necessary to promote all the developmental programmed cell death in the worm.³¹

In *Drosophila melanogaster*, seven different caspases have been described to date. An outline of the apoptotic signalling pathways is currently emerging, where DREDD, DRONC and STRICA may act as initiator caspases, while DCP-1, drICE, DEWAY and DAMM are believed to be executor caspases.^{32,33} DREDD and DRONC contain long prodomains carrying DED and CARD motifs respectively^{34,35} and STRICA contains a long prodomain with unique serine/threonine stretches.³⁶ DCP-1, drICE, DEWAY and DAMM are short-prodomain caspases with a cleavage preference for DXXD sites.^{37–41} It has also been described that DRONC is able to process itself and to activate the effector caspase drICE.⁴² However, the precise pathway of activation of *Drosophila* caspases have remained elusive, and the evolutionary relations of *Drosophila* and vertebrate caspases is confusing, most probably due to the higher degree of divergence of the *Drosophila* genes.

Amphioxus has recently received high attention in the fields of comparative development and genomics. Cephalochordates are the closest extant relatives to vertebrates, and retain a sort of frozen, vertebrate-like, primitive genome.⁴³ Increasing molecular data is providing definite evidence for extensive genome duplications during the evolution of vertebrates. Particularly, large increasing in gene numbers, up to full polyploidization, has been claimed

at the time of vertebrate origins, just after the split between cephalochordate and vertebrate lineages.^{44–46} Hence, amphioxus is a key landmark for the study of a given vertebrate multigenic family.

Here, we report the first description of programmed cell death in amphioxus early embryos and larvae. Furthermore, we report the isolation, expression and functional characterisation of the first caspase related protein in a non-vertebrate chordate. AmphiCASP-3/7 messenger was detected throughout the embryonic and larval development from the gastrula stage. AmphiCASP-3/7 has a canonical caspase structure that consists of an amino-terminal short prodomain, a large subunit containing a QACRG catalytic consensus site and a carboxy-terminal small subunit. AmphiCASP-3/7 induced cell death when overexpressed in HEK 293T cells, and the removal of the prodomain resulted in an increased ability to promote cell death. Sequence analyses establishes AmphiCASP-3/7 as the vertebrate caspase-3/caspase-7 pre-duplicative and prototypic counterpart. However, both the *in vitro* enzymatic activity and the inability to rescue the MCF7 caspase-3 deficient cell line most closely relates AmphiCASP-3/7 to caspase-7 than to caspase-3. These results suggest that most properties of the caspase-3 arose after gene duplication at vertebrate origins, thus such properties may be considered novelties during the evolution of vertebrates.

Results

Evidence for programmed cell death during amphioxus embryonic and larval development

Programmed cell death has been implicated in a wide range of functions during embryonic development. Thus, selective cell death could be useful in sculpting forms and cavities or deleting structures, adjusting cell numbers or eliminating harmful cells. We have taken advantage of the TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) mediated dUTP nick end-labelling (TUNEL) technique to detect the characteristic DNA fragmentation which occur during normal developmental cell death. The pattern of apoptosis during amphioxus embryonic and larval development is depicted in Figure 1.

The earliest stage of amphioxus development that showed TUNEL positive nuclei was the neurula. Apoptotic nuclei were never detected at earlier stages. Thus, the first distinct pattern of TUNEL-positive cells was detected in a broad ventral region of the early neurula that corresponds to the two more posterior thirds of the archenteron (Figure 1A). Later on, as the embryo grew in length, signals were spread over the gastrodermis (Figure 1B). At this stage a strong spotted signal was detected in the anterior left side of the late neurula, in a region where the embryonic mouth will open to the exterior (Figure 1C). At 30-h post fertilisation, a number of the late embryos were found to be almost depleted of apoptotic nuclei. The few remaining embryos exhibited the signal confined to clusters of cells in the embryonic gut (Figure 1D), and at the 2-day larval stage the staining pattern changed substantially (Figure 1E). Apoptotic cells were found in the gill slits, serial

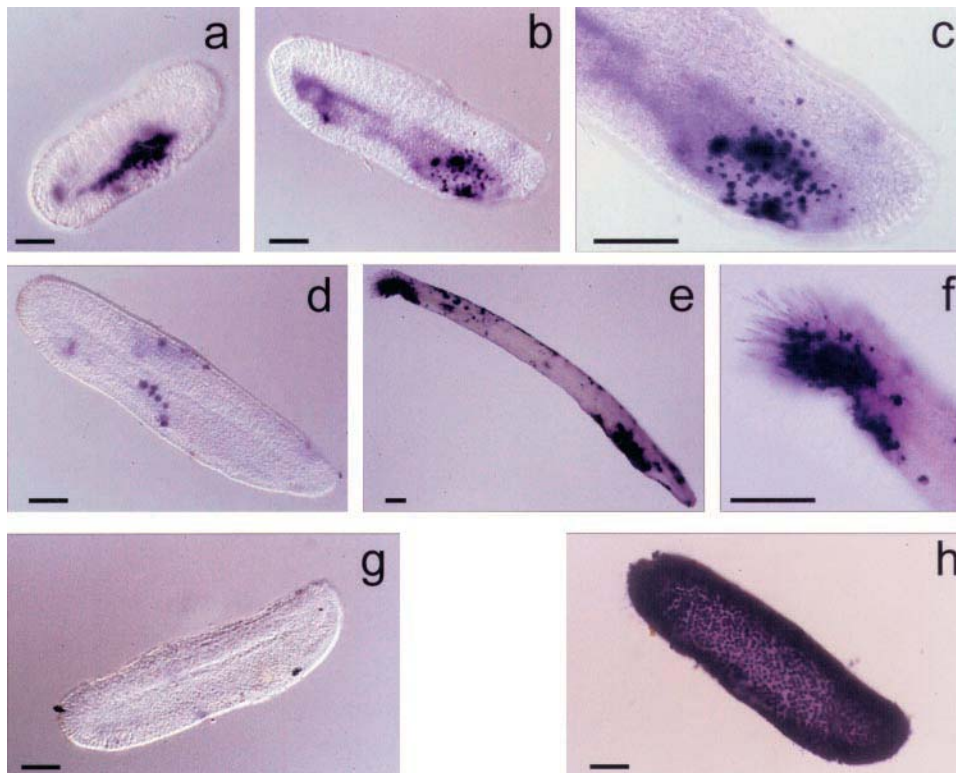


Figure 1 TUNEL whole mount staining of amphioxus embryos shows programmed cell death during development. All embryos are orientated with the anterior part to the right and dorsal part toward the top. (a) Lateral view of a 18-h post-fertilization neurula showing TdT reactivity in the archenteron; (b) 24-h neurula reveals a weak signal in the gastrodermis, and a strong spotted signal in the anterior left side; (c) enlarged vision of b, where the anterior left signal is in focus; (d) Dorsolateral view of a 30-h embryo showing a discrete, spotted signal which corresponds to clusters of nuclei in the gut. (e) 2.5-day larva exhibiting a region of active programmed cell death surrounding the gill slits, and another region in the posterior tip of the organism. Note the scattered signals along the larval body wall. (f) Enlarged image of e showing the posterior zone of the larva, where a number of ciliar structures are located. (g and h) Same stage as b, where g is a negative control in which TdT enzyme was omitted, and h a positive control performed by pre-treating the embryos with 10 $\mu\text{g/ml}$ of DNase I for 30 min at room temperature. Scale bar, 50 μm

structures which open the pharynx to the exterior. At the same stage, the posterior tip of the organism was strongly stained (Figure 1F).

As a negative control, embryos were included in a TUNEL detection in which TdT enzyme was omitted and as expected, no positive nuclei were found (Figure 1G). As a positive control, embryos were treated with DNase prior to the TUNEL-reaction, which resulted in an extensive staining of nuclei throughout the embryo (Figure 1H).

AmphiCASP-3/7, the first caspase described in amphioxus

To gain insights into the apoptotic mechanisms in amphioxus, we started a search for caspase related sequences in this organism. Degenerate PCR amplification of amphioxus genomic DNA and embryonic cDNA yielded different types of products. Of them, translation of CSPF7 gave an ORF that was 63% identical with the human caspases-3 and -7. Screening of a cDNA library using this product as a probe yielded 11 positive clones. Mapping of these clones with seven different restriction enzymes revealed only partially coincident restriction patterns. Sequence analysis showed that all these cDNA clones encode the same protein. On the

basis of the homology of the new amphioxus protein with vertebrates caspases-3 and -7 we named it AmphiCASP-3/7. Differences between clones may reflect the normal variability in restriction site polymorphism in wild populations of amphioxus.

The overall structure of the longest messenger exhibited a short 5' UTR (untranslated region) of 169 bp and a long 3' UTR of around 2 kb (Figure 2A). Presence of big trailer sequences have been previously reported for human caspases -3 and -7.^{47,48} AmphiCASP-3/7 protein has a predicted sequence of 328 amino acids with a high degree of homology to vertebrate caspases, especially with representatives of the caspase-3 subfamily. When compared to the GenBank database, it exhibited approximately 55–57% identity (71–72% similarity) with different vertebrate caspase-7 proteins; 49–51% identity (65–70% similarity) with vertebrate caspase-3 representatives; 44–48% identity (57–64% similarity) with vertebrate caspase-6 proteins; 43–45% identity (57–63% similarity) with *Spodoptera frugiperda* caspase-1, *Drosophila* drICE and DCP-1, and was more distantly related to vertebrate caspase-8 (39–41% identity, 54% similarity), *Drosophila* DECAY (38% identity, 55% similarity) or *Drosophila* DAMM (27% identity, 42% similarity).

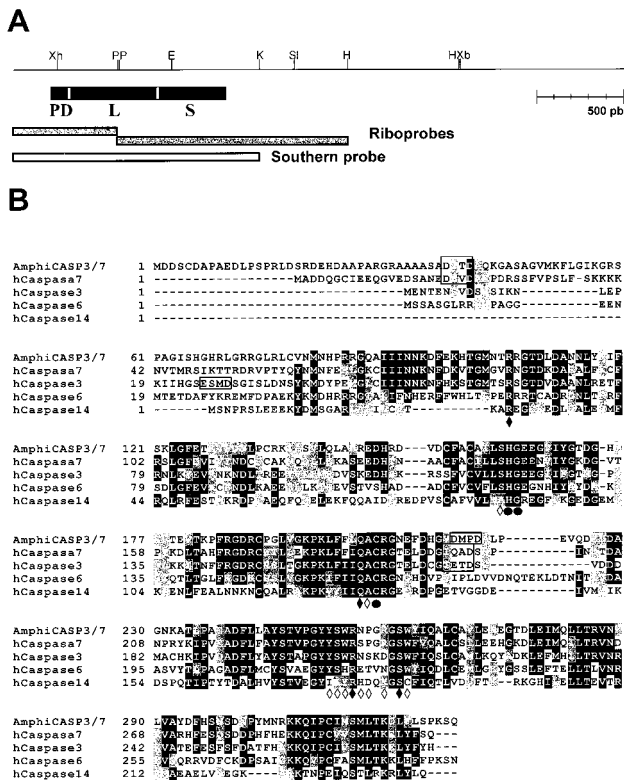


Figure 2 AmphiCASP-3/7 is homologous to the vertebrate effector caspases. (A) Structure of the longest amphioxus AmphiCASP-3/7 messenger. The scale bar indicates size in base pairs. The overall restriction map deduced from different clones is indicated at the top. The predicted structure of the open reading frame is represented below. Regions from which the riboprobes (grey bars) and southern probe (white bar) were designed are also indicated and labelled accordingly. (B) Amino acid sequence alignment of AmphiCASP-3/7 with human caspases containing short prodomains was obtained using CLUSTAL W program at the European Bioinformatics Institute. Black shaded indicates identity and grey shaded indicates conservation in at least three out of five sequences, respectively. Filled circles indicate residues implicated in catalysis. Open diamonds identify residues which forms the P2-P4 pocket and those implicated in the P1 binding pocket are indicated with filled diamonds. Putative internal cleavage sites are boxed. E, *EcoRI*; K, *KpnI*; H, *HindIII*; P, *PstI*; S, *Sall*; Xb, *XbaI*; Xh, *XhoI*; PD, Prodomain; L, Large subunit, S, Small subunit

Aminoacidic sequence alignment of AmphiCASP-3/7 with human caspases containing short prodomains showed that the amphioxus caspase exhibited a primary structure clearly related to the so-called effector caspases (Figure 2B). In particular, the putative cleavage sites (open boxes) were well conserved between AmphiCASP-3/7 and human caspases-3 and -7. These aspartate positions denoted the presence of a short prodomain (PD), a long subunit (L) and a short subunit (S, Figure 2A). The QACRG pentapeptide motif present in most caspases was also conserved in the amphioxus caspase. Moreover, the positions His163, Gly164 and Cys205 of the AmphiCASP-3/7 protein were in agreement with the consensus of residues implicated in catalysis (filled circles). The Arg106, Gln203, Arg255 and Ser261 residues (filled diamonds), which could form a binding pocket for the P1 aspartate acid, were conserved among all proteins in the alignment. However, the putative

residues which form the P2-P4 pocket (open diamonds), particularly the Trp254, Asn256, Pro257 and Arg259,¹⁰ clearly related AmphiCASP-3/7 to human caspase-3 and caspase-7, suggesting a preference of this protease for an aspartate residue at the P4 position.

Amphioxus caspase 3/7 is expressed throughout development from gastrula to larva

Whole mount *in situ* hybridization of amphioxus embryos and larva was performed with specific riboprobes of the AmphiCASP-3/7 messenger (Figure 3). AmphiCASP-3/7 was first expressed by the onset of gastrulation, where a faint signal was seen in mesodermal tissues (Figure 3B). Later during the neurula stage, AmphiCASP-3/7 was detected mainly around the notochord and paraxial mesoderm (Figure 3C,D). Of note is that the body wall epidermis did not express AmphiCASP-3/7 messenger. As embryos grew the signal expanded among almost all tissues except the epidermis and became less intense (Figure 3E,F). At the early larva stage, a strong signal appeared in the posterior ventral region, with an extended shape that may correspond to the neurenteric canal (Figure 3G). This pattern was maintained during larval development. The profile of expression did not correlate with the TUNEL data, except for the onset of expression of AmphiCASP-3/7, which preceded the first apoptotic signals.

AmphiCASP-3/7 could represent the pre-duplicative ancestor of vertebrate caspases-3 and -7

Molecular phylogenetic analysis was performed using the whole aminoacidic sequence of all the short prodomain caspases described so far in vertebrates and *Drosophila melanogaster*. A distance tree constructed by the Neighbour Joining Method is shown in Figure 4. Maximum Parsimony Analysis produced similar results, but with lower bootstrap values. The overall topology of the dendrogram supported three main clades, which corresponded to the caspase-3, caspase-7 and caspase-6 vertebrate families, while the human and mouse caspase-14 and the *Drosophila* caspases were placed apart. AmphiCASP-3/7 sequence located as the sister group of caspase-3 and -7, with a bootstrap value of 87.4%, and can not be considered closer to either caspase-3 or caspase-7. As Southern blot analysis of genomic DNA from a single organism yielded a hybridization signal that was compatible with the pattern of a single copy gene (Figure 5), we suggest that caspase-3 and caspase-7 arose in the lineage leading of vertebrates by duplication of an ancestral gene from which AmphiCASP-3/7 is the amphioxus representative. The tree also predicted that the caspase-6 family appeared before the split of cephalochordates and vertebrates and could be represented in the amphioxus genome. Whether or not other caspases, in particular caspase-1, caspase-8 or caspase-9 representatives, are present in the amphioxus genome is an unsolved question. The degenerate primers designed to address the cloning of effector caspases in amphioxus do not allow the detection of other caspases. Another strategy would be necessary to characterise the whole amphioxus caspase family.

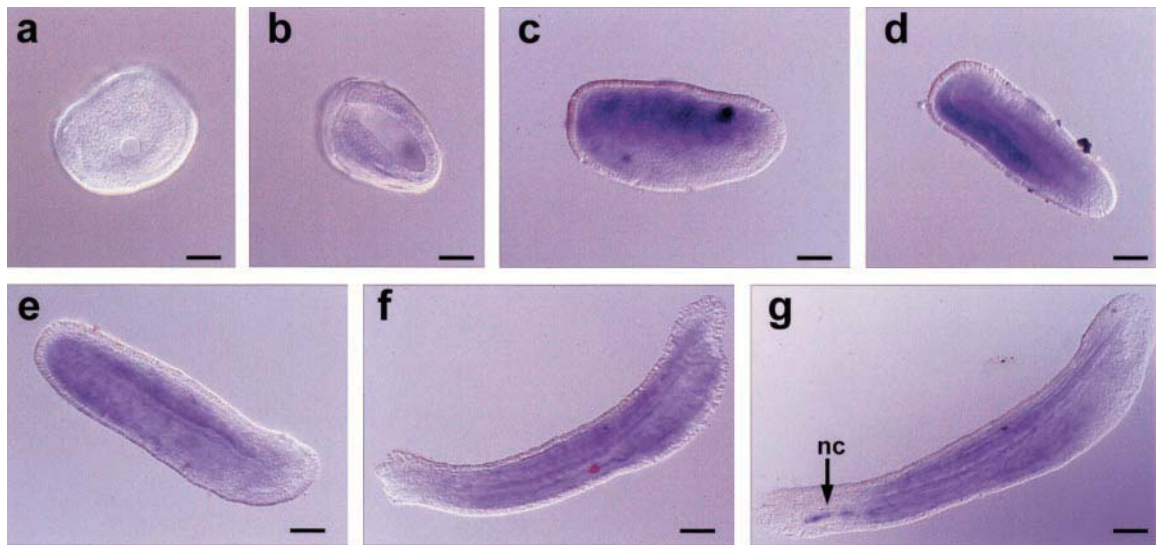


Figure 3 Developmental expression of AmphiCASP-3/7. All embryos are orientated with the anterior part to the right and dorsal part toward the top. Unless otherwise indicated, all embryos are photographed in lateral view. (a) Eight hours early gastrula seen from the blastopore. No signals were still detected at this stage. (b) Side view of a 10-h gastrula. The first detectable signals appeared in the mesodermal layer. (c and d) Side and dorsal view, respectively, of a 12-h middle neurula showing a broad expression of AmphiCASP-3/7, which was stronger in the dorsal region, where the somites, the notochord and the neural tube appeared stained. Note that the epidermal tissues were negative. (e) Dorso-lateral view of an 20-h late neurula in which the notochord is in focus showing expression roughly in all tissues except the epidermis. (f) In the early 30-h larva all the structures except the epidermis were uniformly stained. (g) Later on, in the 36-h larva, the pattern of expression was somewhat more restricted, and a strong signal in the neurenteric canal (nc) appeared. Scale bars, 50 μm

Overexpression of AmphiCASP-3/7 induces apoptosis in HEK 293T cells

Several reports on the cloning of new caspases have consistently proved that many caspases induce apoptotic cell death when overexpressed in cultured cells. It is worth nothing that in a few examples the removal of the prodomain was necessary to induce apoptosis. This was the case for drICE overexpression in *Drosophila* S2 cells³⁸ and caspase-7 ectopic expression in either MCF-7 or COS cells.^{49,50} Removal of the prodomain was not necessary for DRONC and DECAY to induce cell death in 3T3 cells^{35,40} or for STRICA to induce death in SL2 cells.³⁶ To confirm that AmphiCASP-3/7 is indeed a caspase, we transiently transfected HEK 293T cells with either the full-length AmphiCASP-3/7 or a mutated version lacking the first 41 residues roughly corresponding to the predicted prodomain. Thirty-six hours post-transfection, about 40% of the cells expressing wild-type AmphiCASP-3/7 exhibited blebbing and chromatin condensation. This represent a threefold increase when compared with cells transfected with the empty pCDNA3 expression vector (Figure 6). Similar results were obtained by expressing human caspase-3 and human caspase-7. Interestingly, removal of the amino-terminal domain of AmphiCASP-3/7 resulted in a considerable increase in the percentage of apoptotic cells. Altogether, these results clearly demonstrate that AmphiCASP-3/7 is a typical caspase that induces programmed cell death when overexpressed in mammalian cells. Moreover, differences between the cell death inducing activity of whole AmphiCASP-3/7 or the truncated form lacking the prodomain, strongly suggest a role for the amino-terminal domain of

AmphiCASP-3/7 in regulating the activity of this enzyme, thus demonstrating that it is not only structurally, but also functionally, a prodomain.

Amphioxus caspase-3/7 protein has a substrate specificity similar to the executor caspases

To further characterise the substrate preference of the amphioxus caspase, we expressed the wild-type AmphiCASP-3/7 and the catalytic mutated form in which Cysteine 205 was changed to Serine (C205S) in *E. coli*. A caspase assay was performed with the soluble fraction of bacterial lysates using fluorogenic peptidic substrates as described previously.⁴⁰ Recombinant AmphiCASP-3/7 protein efficiently cleaved the caspase-3/caspase-7 substrate Ac-DEVD-afc, while the caspase-6 substrate Ac-VEID-afc and the caspase-8 substrate Ac-IETD-afc were not processed (Figure 7A). As expected, the mutation of the Cys 205 to Ser (C205S) completely abolished the AmphiCASP-3/7 activity. Pre-incubation of the lysates with the specific executor caspase inhibitor z-DEVD-fmk and the broad range inhibitor z-VAD-fmk also prevented processing of Ac-DEVD-afc peptides.

AmphiCASP-3/7 substrate preference was quite similar to that found for human caspase-7. On the contrary, in our hands human caspase-3 showed significant cleavage activity not only on the Ac-DEVD-afc peptides, but also on the Ac-VEID-afc and the Ac-IETD-afc peptides. Even at saturating protein concentrations neither AmphiCASP-3/7 nor caspase-7 significantly cleaved the Ac-VEID-afc substrate, while caspase-3 was able to process equally both Ac-DEVD-afc and Ac-VEID-afc substrates (Figure 7B). It has recently been demonstrated that caspase-3 exhibits

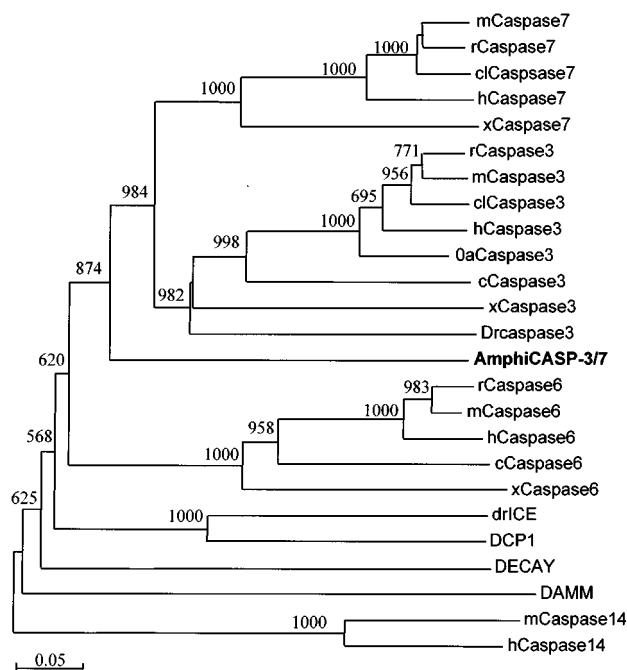


Figure 4 Phylogenetic relationships among different caspases. Distance tree constructed by the Neighbour Joining Method from a protein alignment of vertebrates effector caspase -3, -7 and -6, human and mouse caspase-14, *Drosophila melanogaster* DCP1, DECAy, driCE and DAMM, and the amphioxus sequence reported here. Numbers at the branch nodes indicate bootstrap values on 1000 replicates. Bottom bar indicates the branch length corresponding to 0.05 substitutions per site. Gene species nomenclature is used as follows: c, chick; cl, hamster; Dr, zebra-fish; h, human; m, mouse; Oa, sheep; r, rat; x, *Xenopus*

150-fold greater activity than caspase-7 when a valine is placed at P4 position.⁵¹ The absence of activity on Ac-VEID-afc and Ac-IETD-afc substrates agrees with the higher sequence homology of AmphiCASP-3/7 with caspase-7 than with caspase-3.

AmphiCASP-3/7 protein can not rescue the phenotype of MCF7 caspase-3 deficient cells

Since it is becoming clearer that each type of cell expresses a complex subset of caspases, we took advantage of the fact that the MCF7 breast carcinoma cell-line lacks active caspase-3²² to further characterise AmphiCASP-3/7 during cellular apoptosis. MCF-7 cells fail to degrade several substrates upon apoptosis induction. From this, it was concluded that caspase-3 is required for α -fodrin processing,²³ and also for proper cleavage and activation of both DFF45 and gelsolin.⁵² MCF-7 cells were transiently transfected with carboxy-terminal FLAG tagged forms of caspase-3, AmphiCASP-3/7 or a truncated form of AmphiCASP-3/7 lacking the prodomain, then their ability to process either α -fodrin or DFF45 upon staurosporine treatment was assessed by Western blot. As expected, overexpression of caspase-3 in MCF7 restored the ability of these cells to produce the 120-kDa fragment resulting from the specific cleavage of α -fodrin by active caspase-3. Moreover, the p-11 carboxy-terminal fragment of DFF45, which results from the

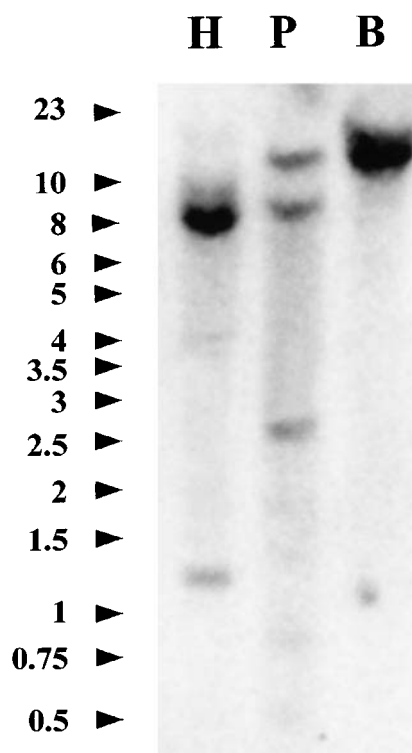


Figure 5 Southern blot analysis suggests that AmphiCASP-3/7 is a single copy gene. Thirty micrograms of DNA from a single organism were digested with the corresponding restriction enzyme: H, *HindIII*, P, *PstI*, B, *BamHI*. Probing the membrane with an 1.3kb 5' fragment of the amphioxus cDNA yielded a hybridisation pattern which was compatible with the presence of no other genes related to AmphiCASP-3/7. Detection of several bands in the *PstI* lane may indicate the presence of internal sites for this restriction enzyme. Numbers on the left indicates size of the DNA markers in kilobases

cleavage and activation of DFF45 by caspase-3, was also observed in MCF7 cells expressing caspase-3 when they were treated with staurosporine (Figure 8A). On the contrary, neither α -fodrin nor DFF45 were properly processed in MCF7 cells expressing AmphiCASP-3/7 or its truncated version. It is well known that internucleosomal DNA fragmentation depends on the activity of CAD, which is activated when its inhibitor ICAD is processed by active caspase-3. Consistently with this, MCF7 cells do not exhibit DNA laddering when treated with different apoptotic stimulus. Transient transfection of caspase-3 was able to rescue the nuclear phenotype in MCF7 cells and a pattern of DNA degradation was observed (Figure 8B). However, ectopic expression of either wild-type AmphiCASP-3/7 or the truncated form lacking the prodomain did not promote any change in the apoptotic DNA degradation of MCF7 cells. Thus, α -fodrin cleavage, DFF45 cleavage and activation, and DNA degradation were not observed in staurosporine-induced apoptotic cells transfected with either AmphiCASP-3/7 or truncated AmphiCASP-3/7, albeit the level of expression of these proteins was comparable to that of caspase-3 (as detected by Western blot using an anti-FLAG antibody). Altogether, these results strongly support the hypothesis that AmphiCASP-3/7 is more closely related to caspase-7 than to caspase-3.

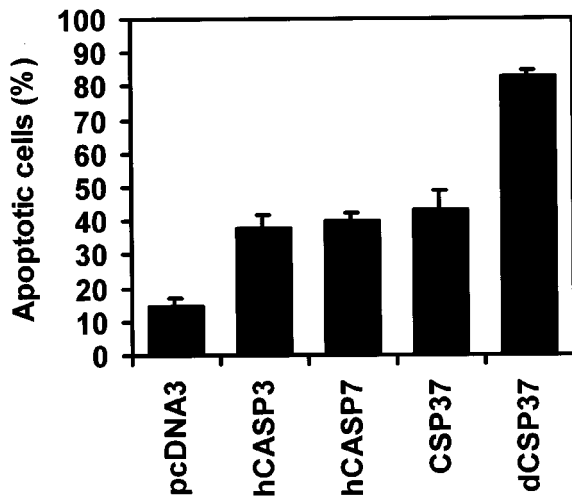


Figure 6 AmphiCASP-3/7 promotes cell death when over expressed in human cells. HEK 293T cells were co-transfected with 6 μ g of the indicated expression plasmids and 1.5 μ g of a pEGFP-expressing reporter construct. The data (mean \pm S.E.M., $n=3$) represent the percentage of apoptotic nuclei, as visualised by the Hoechst nuclear staining, in the population of EGFP positive cells. The experiment was repeated once with similar results. AmphiCASP-3/7 (CSP37) promoted cell death to a similar level when compared to human caspase-3 (hCASP3) and caspase-7 (hCASP7). Deletion of the prodomain increased twofold the death inducing ability of AmphiCASP-3/7 (dCASP37). Transfection with the empty vector was including as a control (pcDNA3)

Discussion

Animal development is based on multiple cellular functions, and recently programmed cell death has been receiving much attention. The contribution of programmed cell death to the development of vertebrates and a few invertebrate taxa, which include Arthropods, Nematodes and Cnidarians, has been well documented. Here, we describe for the first time the pattern of developmental cell death in amphioxus, the closest invertebrate relative to vertebrates.⁴³ Amphioxus offers a stereotypical model of development which gives rise to a primitive embryonic body form representative of the vertebrate embryo.

The pattern of DNA fragmentation detected by the TUNEL technique clearly demonstrated that apoptosis takes place during amphioxus development. There were several examples of normal programmed cell death, which occurred in a reproducible manner at specific stages of amphioxus development. Since treatment *in vivo* of amphioxus embryos with caspase inhibitors involves complex logistics, we were unable to perform these experiments. Therefore, we can only speculate that this pattern of cell death could be related with morphogenesis during amphioxus development. Thus, the restricted signal detected in the ventral part of the neurula may be an example of cavitation related with the archenteron formation. Later on, at the late neurula stage, the gastrodermic signal could reflect the renewal of the epithelia. Interestingly, the clusters of cells that were detected at this stage in the left anterior body wall could correspond to the position of mouth formation. In amphioxus, the mouth opening is an

asymmetric process that involves an endodermal thickening in the left wall of the archenteron.

In the larva, the gill slit region appeared strongly stained. Gill slits develop from the endoderm, then migrate to fuse with the ectoderm and break through the body wall. Their formation could represent a good example of programmed cell death involved in hollowing out solid structures. The tail also exhibited active programmed cell death in the larva stage. Consistently with this, cells located in the most posterior tip of the larva exhibit prominent cilia that will be lost in the adult, presumably by apoptosis.

It is worth noting the great variability in the distribution of TUNEL staining for each stage analyzed in all the experiments carried out. Thus, a fraction of the embryos were negative for each stage analyzed. It has been proposed that programmed cell death takes place during development in a well controlled temporal window, and cells that undergo cell death are degraded rapidly. As amphioxus embryos coming from a fertilized spawn are not perfectly synchronous, the rapid clearance of dead cells may explain the existence of embryos showing no staining.

Apart from the well stereotyped and reproducible patterns of cell death described above, there were some positive signals which change from embryo to embryo, with no defined pattern and an almost random distribution. These signals could be explained by the elimination of damaged cells, where patches of positive cells may originate from a single cell. These scattered signals were often localised along the body wall. As amphioxus embryo and larva show ectodermal derived cilia, which are retained until metamorphosis begins, the epidemric positive cells mentioned above may be a sign of the selective deletion of the ciliar epithelium.

AmphiCASP-3/7 was ubiquitously expressed throughout amphioxus development in most tissues, which suggest a role of AmphiCASP-3/7 in conferring the ability to die rather than instructing the apoptotic cell death during development. An exception was the high accumulation of AmphiCASP-3/7 messenger detected in the neurenteric canal, structure which connects temporarily the neural tube with the gut cavity that is eliminated during the larval development. How this up-regulation of AmphiCASP-3/7 expression could be related to the deletion of the neurenteric canal is an unsolved question. Nevertheless, in our hands TUNEL whole mount experiments have never revealed any indication of apoptosis inside this canal.

Mammalian effector caspases are a subgroup of apoptotic caspases mainly characterised by the presence of a short prodomain, an initiator caspase dependent activation, and a preference of cleavage sites found in cellular substrates. Among them, caspase-3 and caspase-7 seem to share a common origin by gene duplication. They exhibit 56% identity (72% similarity) at the aminoacid sequence level, and they share five intronic positions in their coding region. Mapping of caspase-3 in 4q34 and of caspase-7 in 10q25,⁵³ two chromosomal regions which exhibit traits of paralogy, strongly support that both genes arose in vertebrates by genome duplication. Moreover, the *in vitro* activities of caspase-3 and caspase-7 are nearly indistinguishable.

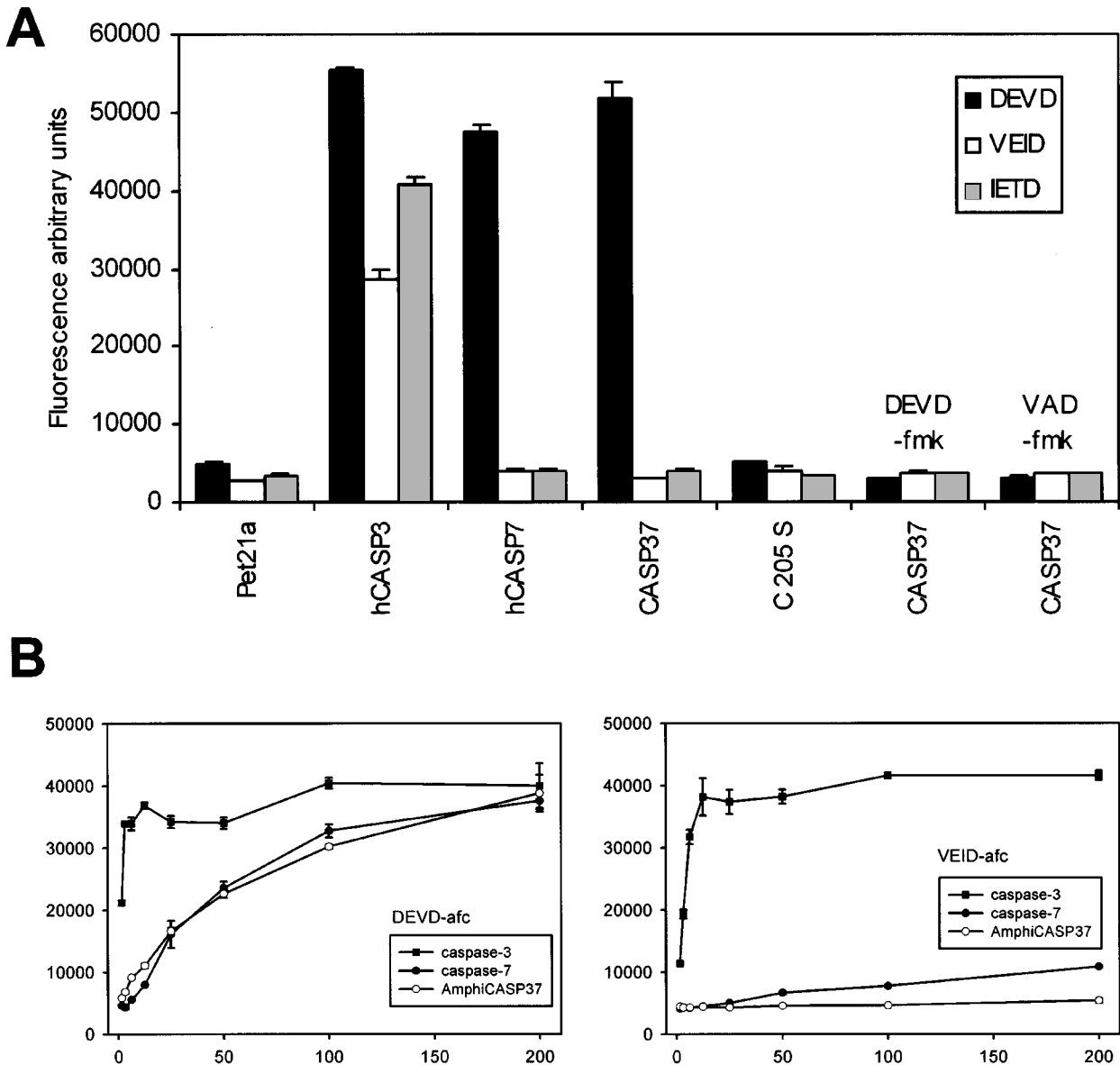


Figure 7 AmphiCASP-3/7 has a substrate specificity similar to caspase-7. **(A)** Fifty micrograms of bacterial lysates from clones expressing recombinant human caspase-3 (hCASP3), human caspase-7 (hCASP7), amphioxus AmphiCASP-3/7 (CASP37) and mutated AmphiCASP-3/7 (C205S) were assessed for the ability to cleave different fluorogenic substrates for 7 h at 37 °C. AmphiCASP-3/7 extracts were also either left untreated or pre-incubated with 20 μ M of the inhibitors DEVD-fmk and VAD-fmk. As a control, extracts from cultures transformed with the empty vector were included (Pet21a). Caspase activity was monitored measuring the -afc release on Ac-DEVD-afc (black bars) Ac-VEID-afc (white bars) and Ac-IETD-afc (grey bars) substrates as arbitrary fluorescence units in a Bio-Tek FL 600 fluorimeter (Izasa, Spain) at 360 nm (40 nm bandwidth) of excitation and 530 nm (25 nm bandwidth) of emission. Data (\pm S.E.M.) were derived from one experiment performed in triplicate. **(B)** Different concentrations (μ g) of bacterial lysates expressing recombinant human caspase-3 (filled squares), caspase-7 (filled circles) and AmphiCASP-3/7 (open circles) were assessed for their ability to process Ac-DEVD-afc (left plot) and Ac-VEID-afc (right plot) as described in (A)

The caspase coding sequence described in amphioxus was compatible with a hypothetical ancestral caspase-3/caspase-7 protein. First, structural homology, analyzed by phylogenetic methods, stated AmphiCASP-3/7 is equally (and closely) related to vertebrate's caspase -3 and -7. Second, albeit the degenerate PCR approach has allowed amplifying other amphioxus sequences related to caspases (JR Bayasas and J Comella, unpublished results), no other homologous to caspase-3 nor to caspase-7 has been cloned. Third, moderate stringency screening of cDNA libraries

yielded a high number of positive clones, all coding for the same protein. Fourth, Southern blot analysis does not suggest the existence of genes closely related to AmphiCASP-3/7.

Evolution of vertebrates involved an increase in anatomical complexity, which was supported by genome wide duplications followed by maintenance of multiple members of many gene families.^{44–46} Altogether our data suggest that vertebrate caspases-3 and -7 arose by duplication of a gene closely related to AmphiCASP-3/7 in the vertebrates lineage.

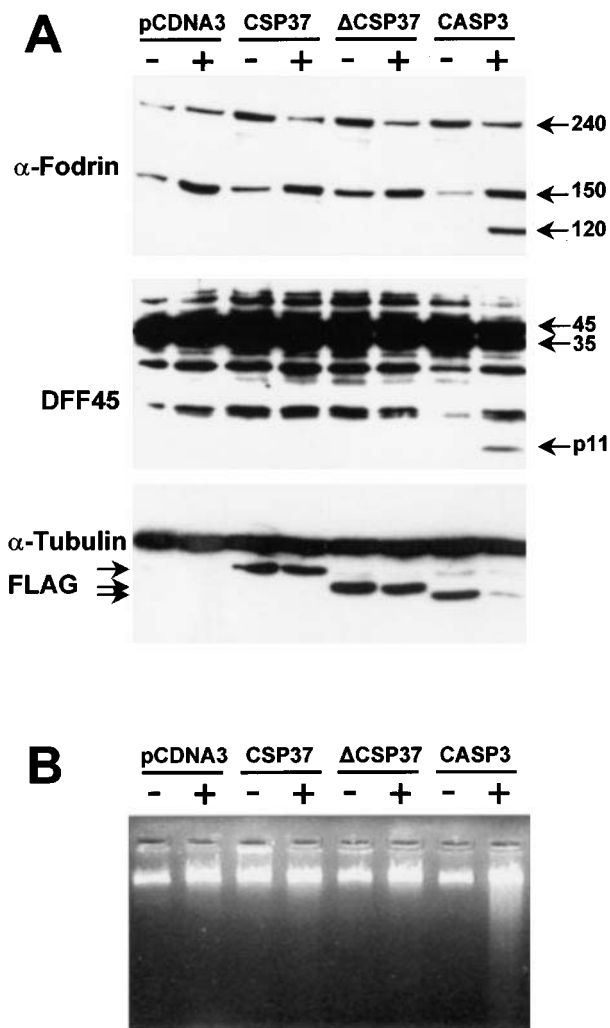


Figure 8 AmphiCASP-3/7 does not restore the apoptotic phenotype in staurosporine-treated MCF-7 cells. MCF7 cells transiently transfected with the indicated plasmids (empty vector, pCDNA3; AmphiCASP-3/7, CSP37; truncated AmphiCASP-3/7, CASP37; human caspase-3, CASP3) were treated with 500 nM staurosporine (+) or left untreated (-). **(A)** RIPA extracts were loaded either into 6% or 15% polyacrilamide gels for the α -fodrin and DFF45 Western blot analysis, respectively. The molecular weights that are indicated in the right part of the figure are those reported for the intact proteins and the corresponding specific fragmentation products. Membranes were stripped and reprobbed with a FLAG antibody to assess the expression of the transfected constructs, and further reprobbed with a α -tubulin antibody to control protein loading. Only caspase-3 expressing cells were able to degrade α -fodrin and DFF45 in their corresponding p120 and p11 specific fragments. **(B)** Analysis of the DNA degradation of the same transfections used above. A clear pattern of DNA degradation was only observed in the lane corresponding to staurosporine-treated cells expressing caspase-3

Nevertheless, overall sequence homology indicated great similarity of AmphiCASP-3/7 with caspase-7 representatives. Although the second putative cleavage site of AmphiCASP-3/7 was equally related to both caspase-3 and caspase-7, the caspase target site located between the prodomain and the large subunit was well conserved between amphioxus caspase and caspase-7. Moreover, AmphiCASP-3/7 shares with caspase-7 an almost exclusive preference for DEVD peptides in the fluorogenic

caspase assay, while caspase-3 is able to process also Ac-VEID-afc and Ac-IETD-afc substrates. The lack of complementation of MCF7 cells transfected with AmphiCASP-3/7 ruled out the possibility of AmphiCASP-3/7 being a caspase-3 orthologue.

It is well known that caspase-3 is the main effector caspase in vertebrates, accounting for cleavage of many cellular substrates which are degraded during apoptosis. Since our results suggest that AmphiCASP-3/7 is a bona fide representative of the ancestral caspase-3/caspase-7 duplication, it could be proposed that caspase-3 has acquired most of its functional innovations during the evolution of vertebrates, while caspase-7 has retained a more ancestral condition.

Materials and Methods

Species

Adults Amphioxus (*Branchiostoma floridae*) were collected from Old Tampa Bay (Florida, USA). Ripe male and females were induced to spawn by electro-shocking. After *in vitro* fertilization, embryos were allowed to develop to the desired stage at 23 C.⁵⁴

Whole mount detection of apoptosis on amphioxus embryos using TUNEL methodology

Detection of apoptotic DNA degradation was carried out with the ONCOR ApopTag *in situ* Apoptosis Detection kit (INTERGEN, USA) following supplier instructions, with some modifications. Embryos stored in 70% ethanol were rehydrated in PBT (0.1% Tween in PBS), washed in PBS (phosphate buffered saline), digested with 2.5 μ g/ml proteinase K for 5 min at 37 C, washed in PBS, and equilibrated in ONCOR Equilibration Buffer. Terminal deoxynucleotidyl transferase reaction was carried out according to the manufacturer instructions using digoxigenin-dUTP as substrate, for 12 h at 4 C plus 2 h at 37 C. The reaction was terminated by rinsing the embryos in PBS-1 mM EDTA for 40 min at 37 C, followed by washes in TBST (0.14 M sodium chloride, 10 mM potassium chloride, 25 mM Tris-Cl pH 7.0 and 0.1% Tween) and a heat inactivation step of 20 min at 65 C. Subsequent immunodetection and chromogenic reaction was essentially adapted from the whole mount hybridization protocol described below. Briefly, the embryos were incubated with 0.5% Blocking Reagent (Boehringer Mannheim), 2 mg/ml BSA in PBT for 1 h at room temperature, followed by incubation with anti-Digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim) diluted 1:3000 in the same blocking buffer, overnight at 4 C. Embryos were extensively washed for 24 h in PBS and staining developed using nitro blue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) substrates. Reaction was stopped within 60 min with PBS. Colour reaction was fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and stained embryos were mounted in glycerol for photography.

Whole mount *in situ* hybridization

Detection of AmphiCASP-3/7 messenger during development was carried out essentially as described.⁵⁵ Ribonucleotide probes were synthesised from the *Pst*I/*Hind*III 1.4 kb fragment or from the most 5' *Pst*I 0.7 kb subclone (see Figure 2A). Both probes gave rise to identical results.

Cloning and sequencing of AmphiCASP-3/7 cDNA

PCR (Polymerase chain reaction) amplification was performed from either genomic DNA or cDNA libraries. Primers fully degenerated corresponding to the peptides LSHGEE, specific of vertebrates effector caspases, and (I/V)QAC(Q/R)G, which contains the active site and is present in most caspases, were designed. The primers sequences were CSP-1: CTGTC(ATCG)CA(AT)GG(ATCG)GA(AG)-GA and CSP-4: CC(ATCG)(TC)(GT)(AG)CA(ATCG)GC(TC)TG(ATC-G)A, for the forward and reverse primers, respectively. PCR conditions were 94 C/20 s, 45–50 C/20 s and 72 C/30 s for 35 cycles. Products of around 150 base pair (bp) in length were blunt ended, cloned in pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, California) and sequenced with the Abi PRISM BigDie terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems).

An amphioxus cDNA library representative of 6-h to 20-h post fertilization embryos (a gift from J Langeland) was screened under middle stringency conditions using the CSPF7 degenerate PCR product as a probe. Approximately 10^6 p.f.u. were hybridised in the buffer described by Church and Gilbert⁵⁶ at 60 C. Positive clones were plaque purified and excised in pBluescript II (SK+) according to manufacturer's instructions. Since sequencing of positive clones with degenerate primers was proved unsuccessful, degenerate PCR was performed to confirm the resulting cDNAs, which were then mapped by restriction analysis and sequenced with specific primers.

Genomic analysis by Southern blot

Genomic DNA was extracted from a single organism, digested with three different restriction enzymes, resolved on 0.7% agarose gels and transferred onto Hybond-N Amersham membranes.⁵⁷ Hybridisation conditions were the same as for library screening. Briefly, hybridisation was carried out in 0.5 M Na₂HPO₄ pH 7.2, 1 mM EDTA (sodium ethylenediaminetetraacetic acid) pH 8.0, 1% BSA (Bovine serum albumin, V Fraction, Sigma), 7% SDS (sodium dodecyl sulphate) and 100 ng of a 10^9 c.p.m./ μ g specific ³²P random primed labelled probe corresponding to the *Kpr1* band of 1.4 kilobases (kb), for 20 h at 60 C. Filters were washed in 40 mM Na₂HPO₄ buffer pH 7.2, 1 mM EDTA, 5% SDS for 15 min at 60 C two times, then with phosphate buffer 40 mM pH 7.2, 1 mM EDTA and 1% SDS 15 min at 60 C twice. Exposition was performed on super RX from Fuji with intensification screens for 1 week.

Phylogenetic analysis

Alignment of vertebrate and *Drosophila* caspases with short prodomains with that of amphioxus was performed by using the CLUSTAL-X computer program.⁵⁸ Phylogenies were reconstructed both by the Neighbour Joining Method⁵⁹ of the CLUSTAL-X package and the Maximum Parsimony Method of the MEGA program version 2.0.⁶⁰ Confidence of the results thus generated was assessed by performing either 1000 or 100 bootstrap re-samplings of the data for the distance and parsimony methods, respectively.

Cell lines, expression constructs and transfections

Human breast carcinoma MCF7 cells⁶¹ were cultured in DMEM containing 10% foetal calf serum. Human embryonic kidney 293T cells⁶² were cultured in MEM containing 10% horse serum. Unless otherwise stated, all media and reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

The 984 bp coding region of AmphiCASP-3/7 was amplified from a cDNA clone by polymerase chain reaction with primers CSP37NHf:

CCCCAAGCTTCATATGGACGATTTCGTGCGACGCTCCA and CSP37HR: CCCCCAAGCTTCTGTGATTTCCGAGACAGGAA (nucleotides corresponding to cDNA sequence are underlined). Amplified product was purified and cloned in the *NdeI/HindIII* sites of PET21a (Novagen, Darmstadt, Germany).

The whole coding sequence of AmphiCASP-3/7 and a form lacking the prodomain were amplified with forward primers CSP37EF: GGAATTCATGGACGATTTCGTGCGACGC and CSP37EF: GGAATTCATGGCAACGAAGGGCGCATCGGCA respectively, and the reverse primer CSP37XR: CCCGCTAGACTGTGATTTCCGAGACAGGA (nucleotides corresponding to cDNA sequence are underlined, and the new start codon of the truncated caspase is indicated in italic). Both products were cloned in the *EcoRI/XbaI* sites of a pCDNA3-derived vector that fused the FLAG epitope at the carboxy-terminus of the protein.

Human caspase-3 and -7 were PCR amplified and cloned following similar strategies, with primers designed to amplify the ORF derived from the GenBank sequences with accession numbers NM 004346: and NM 001227, respectively.

The catalytic cysteine residue of AmphiCASP-3/7 was mutated to a serine residue by the Quickchange mutagenesis strategy (Stratagene, La Jolla, California) with the rTth DNA polymerase XL (Perkin Elmer) by using the PET21a constructs as templates. A second silent mutation, which generates a new restriction site, was introduced to make easier the selection of positive constructs. For the AmphiCASP-3/7 directed mutagenesis, primers used were CSP37-C/S-F: CCCAACTCTTCTTTCTACAaGcItTCGAGGGAATGAGTTTGACC and CSP37-C/S-R: GGTCAAACCTCATTCCCTCGAgAaGcITGTA-GAAAGAGATTTGGG, which introduced a new *HindIII* restriction site (underlined). Changed positions are indicated in lower case.

For the MCF-7 complementation experiments, approximately 10^6 cells per condition were seeded in 60-mm dishes. Twenty-four hours later cells were transfected with 15 μ l of the Lipofectamine 2000TM reagent (Life Technologies Inc, Rockville, USA) plus 10 μ g of the desired DNA following manufacturer's instructions. Thirty-six hours post-transfection cells were treated with 500 nM of staurosporine for 6 h or left untreated.

For the HEK 293T induced cell death, a total of 10^5 cells were seeded in 35-mm dishes. Twenty-four hours later, cells were co-transfected in triplicate with 6 μ g of the adequate expression plasmids by the calcium phosphate method.⁵⁷ 1.5 μ g of enhanced green fluorescent protein (EGFP) expressing plasmid was included systematically in all experiments to recognise transfected cells during counting. The total amount of transfected plasmid was adjusted with empty-pcDNA3 to be always the same in individual experiments. Thirty-six hours post-transfection cells were stained with 0.5 μ g/ml of Hoechst 33258, and the number of apoptotic *versus* normal nuclei in EGFP expressing cells was scored using an inverted Olympus microscope equipped with epifluorescence optics under UV illumination. Experiments were repeated twice and no less than 100 cells were counted per condition. Statistical significance was determined by Student's *t*-test.

Western blot analysis

Cells were extracted in RIPA total buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF) and protein was quantitated in the supernatants (Bio Rad DC Protein Assay, Bio Rad, Hercules, CA, USA). Fifty μ g of protein per condition were loaded in SDS-polyacrylamide gels. Proteins were electrotransferred from the gels to Immobilon filters (Millipore, Bedford, MA, USA) with a semidry methodology and they

were reacted with the appropriate primary antibody. Immunoblots were further incubated with the adequate secondary antibodies conjugated with peroxidase (Sigma). Subsequently, blots were developed with the chemiluminescent SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA). The α -fodrin (Chemichon), DFF45 (StressGen), α -tubulin (Sigma) and FLAG (Sigma) antibodies were purchased commercially.

DNA ladder analysis

MCF7 cells were homogenised in 600 μ l of NDS lysis buffer (0.5 M EDTA, 1% lauryl sarcosine, 10 mM Tris-HCl pH 9.5). Homogenates were clarified by centrifuging at 13,000 g for 15 min, supernatants were collected to a new tube and extracted with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). DNA was precipitated with two volumes of cold ethanol and 0.5 volumes of 7.5 M ammonium acetate. Precipitate was washed once in 70% ethanol and resuspended in TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) containing DNase-free RNase at a final concentration of 20 μ g/ml. DNA was analyzed in 1.8% agarose gels in TAE buffer (1 mM EDTA, 40 mM Tris-acetate pH 7.6).

Recombinant proteins and caspase assays

Recombinant caspases were produced by transformation of *Escherichia coli* BL21 cells with the PET21a constructs. Overnight cultures were diluted 1:20 and growth 3 h at 37 C. Fresh cultures were induced with 1 mM IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside) for 5 h at room temperature. Cells were pelleted and lysed by sonication in caspase assay buffer (0.1 M HEPES pH 7.0, 10% PEG (polyethylene glycol), 0.1% 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propanesulphonic acid (CHAPS) and 10 mM DTT (dithiothreitol). Fifty μ g of total protein from cleared lysates were either left untreated or treated for 15 min at 37 C with 20 μ M of the caspase inhibitors z-DEVD-fmk (benzyloxycarbonyl-Asp[OMe]-Glu[OMe]-Val-Asp[OMe]-fluoromethylketone) and z-VAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp[OMe]-fluoromethylketone). Samples were then incubated with 50 μ M of the fluorogenic peptide substrates (Enzyme Systems Products, Livermore, CA, USA) Ac-DEVD-afc (acetyl-Asp[OMe]-Glu[OMe]-Val-Asp[OMe]-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin), Ac-VEID-afc (acetyl-Val-Glu[OMe]-Ile-Asp[OMe]-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) or Ac-IETD-afc (acetyl-Ile-Glu[OMe]-Thr-Asp[OMe]-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) and assayed for caspase activity as described.⁶³

Acknowledgements

We thank the people from the Molecular Neurobiology Group at Lleida and the Amphioxus Team at Barcelona for their contribution to the elaboration of this work. In particular we acknowledge Xavi Dolcet, Joaquim Egea, Mario Encinas and Carolina Minguillón. We specially thank to Anna Santamaria for her help in searching for amphioxus caspases and to Jane Thompson for checking the English. We thank A Manonelles (Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain) for help with the ABI PRISM 310 Automatic Sequence Analyzer (Perkin Elmer) and Isabel Sanchez, Inma Montoliu and Roser Pané for technical support. We also thank Nick Holland and Linda Holland for their help with the amphioxus embryos collection. This study was supported by grants from Projectos FEDER (1FD97-0514-002-01) and Plan Nacional Salud y Farmacia (SAF 2000-0164-002-01) from Spanish Government, RTD project number QLG3-CT-1999-00602 from the European Union and Telemarató de TV3. JR Bayascas is a postdoctoral researcher supported

by FEDER (1FD97-0514-002-01), VJ Yuste and E Benito hold postgraduate fellowships from Telemarató de TV3.

Accession number

AmphiCASP-3/7 sequence has been deposited in the GenBank database under Accession number AF412335

References

- Jacobson MD, Weil M and Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347–354
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1–16
- Salvesen GS and Dixit VM (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91: 443–446
- Thornberry NA and Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312–1316
- Earnshaw WC, Martins LM and Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383–424
- Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6: 1028–1042
- Wolf BB and Green DR (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* 274: 20049–20052
- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hamill LD, Herzog L, Hugunin M, Houy W, Mankovich JA, McGuinness L, Orlewicz Z, Paskind M, Pratt CA, Reis P, Summani A, Terranova M, Weich JP, Xiong L, Moller A, Tracey DE, Kamen R and Wong WW (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78: 343–352
- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA and Livingston DJ (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370: 270–275
- Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA and Becker JW (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* 3: 619–625
- Cryns V and Yuan J (1998) Proteases to die for. *Genes Dev.* 12: 1551–1570.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171
- Thornberry NA (1999) Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ.* 6: 1023–1027
- Van de Craen M, Vandenabeele P, Declercq W, Van den Brande I, Van Loo G, Molemans F, Schotte P, Van Crielinge W, Beyaert R and Fiers W. (1997) Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Lett.* 403: 61–69
- Van de Craen M, Van Loo G, Pype S, Van Crielinge W, Van den brande I, Molemans F, Fiers W, Declercq W and Vandenabeele P (1998) Identification of a new caspase homologue: caspase-14. *Cell Death Differ.* 10: 838–846
- Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G and Dixit VM (1998) Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J. Biol. Chem.* 273: 29648–29653
- Ahmad M, Srinivasula SM, Hegde R, Mukattash R, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES (1998) Identification and characterization of murine caspase-14, a new member of the caspase family. *Cancer Res.* 58: 5201–5205
- Slee EA, Adrain C and Martin SJ (1999) Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6: 1067–1074
- Green DR and Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309–1312
- Kumar S (1999) Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ.* 6: 1060–1066
- Salvesen GS and Dixit VM (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10964–10967
- Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR and Porter AG (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273: 9357–9360

23. Janicke RU, Ng P, Sprengart ML and Porter AG (1998) Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273: 15540–15545
24. Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW and Mak TW (1998) Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 12: 806–819
25. Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL and Flavell RA (1998) Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13618–13623
26. Slee EA, Adrain C and Martin SJ (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276: 7320–7326
27. Zheng TS and Flavell RA (2000) Divinations and surprises: genetic analysis of caspase function in mice. *Exp. Cell Res.* 256: 67–73
28. Cikalá M, Wilm B, Hobmayer E, Bottger A and David CN (1999) Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr. Biol.* 9: 959–962
29. Seipp S, Schmich J and Leitz T (2001) Apoptosis – a death-inducing mechanism tightly linked with morphogenesis in Hydractinia echinata (Cnidaria, Hydrozoa). *Development* 128: 4891–4898
30. Shaham S (1998) Identification of multiple Caenorhabditis elegans caspases and their potential roles in proteolytic cascades. *J. Biol. Chem.* 273: 35109–35117
31. Metzstein MM, Stanfield GM and Horvitz HR (1998) Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet.* 14: 410–416
32. Kumar S and Doumanis J (2000) The fly caspases. *Cell Death Differ.* 11: 1039–1044
33. Adrain C and Martin SJ (2001) Search for Drosophila caspases bears fruit: STRICA enters the fray. *Cell Death Differ.* 8: 319–323
34. Chen P, Rodriguez A, Erskine R, Thach T and Abrams JM (1998) Dredd, a novel effector of the apoptosis activators reaper, grim, and hid in Drosophila. *Dev. Biol.* 201: 202–216
35. Dorstyn L, Colussi PA, Quinn LM, Richardson H and Kumar S (1999) DRONC, an ecdysone-inducible Drosophila caspase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4307–4312
36. Doumanis J, Quinn L, Richardson H and Kumar S (2001) STRICA, a novel Drosophila melanogaster caspase with an unusual serine/threonine-rich prodomain, interacts with DIAP1 and DIAP2. *Cell Death Differ.* 8: 387–394
37. Song Z, McCall K and Steller H (1997) DCP-1, a Drosophila cell death protease essential for development. *Science* 275: 536–540
38. Fraser AG and Evan GI (1997) Identification of a Drosophila melanogaster ICE/CED-3-related protease, drICE. *EMBO J.* 16: 2805–2813
39. Fraser AG, McCarthy NJ and Evan GI (1997) drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in Drosophila cells. *EMBO J.* 16: 6192–6199
40. Dorstyn L, Read SH, Quinn LM, Richardson H and Kumar S (1999) DECAY, a novel Drosophila caspase related to mammalian caspase-3 and caspase-7. *J. Biol. Chem.* 274: 30778–30783
41. Harvey NL, Daish T, Mills K, Dorstyn L, Quinn LM, Read SH, Richardson H and Kumar S (2001) Characterization of the Drosophila caspase, DAMM. *J. Biol. Chem.* 276: 25342–25350
42. Hawkins CJ, Yoo SJ, Peterson EP, Wang SL, Vernoooy SY and Hay BA (2000) The Drosophila caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. *J. Biol. Chem.* 275: 27084–27093
43. Minguillón C, Ferrier D, Cebrián C and Garcia-Fernández J (2002) Gene duplications in the prototypical cephalochordate amphioxus. *Gene* 287: 121–128
44. Garcia-Fernandez J and Holland PW (1994) Archetypal organization of the amphioxus Hox gene cluster. *Nature* 370: 563–566
45. Holland PW, Garcia-Fernandez J, Williams NA and Sidow A (1994) Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Development Suppl.* 125–133
46. Holland PW and Garcia-Fernandez J (1996) Hox genes and chordate evolution. *Dev. Biol.* 173: 382–395
47. Fernandes-Alnemri T, Litwack G and Alnemri ES (1994) CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 269: 30761–30764
48. Fernandes-Alnemri T, Takahashi A, Armstrong R, Krebs J, Fritz L, Tomaselli KJ, Wang L, Yu Z, Croce CM, Salveson G, Earnshaw WC, Litwack G and Alnemri ES (1995) Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res.* 55: 6045–6052
49. Lippke JA, Gu Y, Sarnecki C, Caron PR and Su MS (1996) Identification and Characterization of CPP32/Mch2 Homolog 1, a Novel Cysteine Protease Similar to CPP32. *J. Biol. Chem.* 271: 1825–1828
50. Duan H, Chinnaiyan AM, Hudson PL, Wing JP, He W-W and Dixit VM (1996) ICE-LAP3, a Novel Mammalian Homologue of the Caenorhabditis elegans Cell Death Protein Ced-3 Is Activated during Fas- and Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271: 1621–1625
51. Stennicke HR, Renatus M, Meldal M and Salvesen GS (2000) Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem. J.* 350: 563–568
52. Tang D and Kidd VJ (1998) Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273: 28549–28552
53. Tiso N, Pallavicini A, Muraro T, Zimbello R, Apolloni E, Valle G, Lanfranchi G and Danieli GA (1996) Chromosomal localization of the human genes, CPP32, Mch2, Mch3, and Ich-1, involved in cellular apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: 983–989
54. Holland LZ and Holland ND (1993) Embryos and larva of invertebrate deuterostomes. In “*Essential Developmental Biology: A Practical Approach*” Stern CD and Holland PWH, eds. Oxford: IRL Press, pp 21–32
55. Holland PW, Holland LZ, Williams NA and Holland ND (1992) An amphioxus homeobox gene: sequence conservation, spatial expression during development and insights into vertebrate evolution. *Development* 116: 653–661
56. Church GM and Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991–1995
57. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
58. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876–4882
59. Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425
60. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB and Nei M (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244–1245
61. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S and Brennan M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 5: 1409–1416
62. Graham FL, Smiley J, Russell WC and Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59–74
63. Yuste VJ, Bayasas JR, Llecha N, Sanchez-Lopez I, Boix J and Comella JX (2001) The absence of oligonucleosomal DNA fragmentation during apoptosis of IMR-5 neuroblastoma cells: disappearance of the caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.* 276: 22323–22331

CAPÍTULO V



Resultados

Resumen

Las neurotrofinas (Nt) y sus receptores tirosina quinasa (Trk) juegan un papel esencial en el desarrollo y mantenimiento del complejo sistema nervioso de vertebrados. Tras la completa secuenciación de diversos genomas invertebrados, el sistema Nt/Trk destaca por ser considerado una de las innovaciones surgidas con el origen de los vertebrados. En este trabajo se describe el aislamiento y caracterización del único receptor Trk presente en el genoma del anfibio *Branchiostoma floridae*: *AmphiTrk*. Su ancestral parentesco con los receptores Trk de vertebrados es respaldado por análisis filogenéticos y por la composición y organización de sus dominios proteicos. La estructura génica de *AmphiTrk* indica que el hipotético *ProtoTrk*, del que derivan los receptores Trk de vertebrados, podría haber surgido mediante el barajado de exones pre-existentes (*exon-shuffling*), previo a la separación entre cefalocordados y vertebrados. La respuesta fisiológica de *AmphiTrk* frente a las neurotrofinas de vertebrados muestra que, a pesar de 500 millones de años de divergencia, *AmphiTrk* es aún capaz de transducir cascadas de señalización intracelular tras la activación mediada por las diferentes neurotrofinas de mamíferos: NGF, BDNF, NT3 y NT4. Notablemente, *AmphiTrk* es capaz de activar, en células en cultivo de mamíferos, las vías de señalización que conducen a la supervivencia y diferenciación neuronal, pero carece de la habilidad para activar la vía iniciada por PLC γ , la cual conduce a la regulación de la plasticidad sináptica en vertebrados superiores. Durante el desarrollo embrionario del anfibio, *AmphiTrk* se expresa en precursores neuronales localizados en la epidermis, que contiene ciertas células con capacidad migratoria individual, tal como se desprende del marcaje *in vivo* con marcadores fluorescentes. Los resultados obtenidos sugieren que la duplicación y divergencia del sistema Nt/Trk, junto con el reclutamiento de la vía de señalización intracelular mediada por PLC γ , podrían haber proporcionado la base genética para uno de los aspectos clave en la evolución de los vertebrados: la adquisición de un sistema nervioso complejo.

The single *AmphiTrk* receptor highlights increased complexity of neurotrophin signalling in vertebrates and suggests an early role in developing sensory neuroepidermal cells

Èlia Benito-Gutiérrez¹, Christian Nake², Marta Llovera², Joan X. Comella^{2,*} and Jordi Garcia-Fernàndez^{1,*†}

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

²Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Avinguda Rovira Roure 44, E-25198, Lleida, Spain

*These authors contributed equally to this work

†Author for correspondence (e-mail: jordigarcia@ub.edu)

Accepted 24 February 2005

Development 132, 2191-2202

Published by The Company of Biologists 2005

doi:10.1242/dev.01803

Summary

Neurotrophins (Nt) and their tyrosine kinase Trk receptors play an essential role in the development and maintenance of the complex vertebrate nervous system. Invertebrate genome sequencing projects have suggested that the Nt/Trk system is a vertebrate innovation. We describe the isolation and characterisation of the amphioxus Trk receptor, *AmphiTrk*. Its ancestral link to vertebrate Trk receptors is supported by phylogenetic analysis and domain characterisation. The genomic structure of *AmphiTrk* strongly suggests that a *ProtoTrk* gene emerged by means of exon-shuffling prior to the cephalochordate/vertebrate split. We also examined the physiological response of *AmphiTrk* to vertebrate neurotrophins, and found that despite 500 million years of divergence, *AmphiTrk*

transduces signals mediated by NGF, BDNF, NT3 and NT4. Markedly, *AmphiTrk* is able to activate survival and differentiation pathways, but fails to activate the PLC γ pathway, which is involved in synaptic plasticity in higher vertebrates. *AmphiTrk* is expressed during amphioxus embryogenesis in sensory neural precursors in the epidermis, which possesses single migratory cells. We propose that the duplication and divergence of the Nt/Trk system, in tandem with recruitment of the PLC γ pathway, may have provided the genetic basis for a key aspect of vertebrate evolution: the complexity of the nervous system.

Key words: Amphioxus, Exon shuffling, Vertebrate transition, Nervous system, Neurotrophic activity

Introduction

Neurotrophins (Nt) and their tyrosine kinase Trk receptors are gene families deeply involved in the development of complex traits within the vertebrate nervous system, where they regulate neuronal survival, axonal growth and guidance, synaptic plasticity and long-term potentiation events (Huang and Reichardt, 2001; Poo, 2001). In mammals, four distinct neurotrophins (NGF, BDNF, NT3 and NT4) activate three different Trk receptors (TrkA, TrkB and TrkC) with a significant degree of specificity, leading to a variety of finely controlled biological processes (Ibañez, 1998).

A deep understanding of the basal role of the Nt/Trk system is hampered by the presence of multiple members in vertebrates. The study of homologous gene families in simpler systems, devoid of high genetic redundancy, often has led to a better understanding of complex functions in vertebrates (Chao, 2000). Nevertheless, the neurotrophic field currently lacks non-vertebrate representatives (Hallböök, 1999). Genome sequencing projects have shown that invertebrate model systems, such as *Drosophila* or *C. elegans*, do not possess either Nt or Trk homologues (Adams et al., 2000; The C. elegans Sequencing Consortium, 1998). The formerly claimed *Drosophila* Trk receptor (Pulido et al., 1992) has recently been discarded as a Trk homologue, and re-named *off-*

track (Winberg et al., 2001). Until now, the closest invertebrate Trk-related molecule was the molluscan LTrk receptor, but its extracellular domain features a non-vertebrate structure (van Kesteren et al., 1998). Furthermore, the absence of Nt and Trk in the genome of the ascidian *Ciona intestinalis* has recently led to the contention that Nt/Trk signalling system may well be a vertebrate innovation (Dehal et al., 2002).

The origin of vertebrates dates back 530-550 million years from a lancelet-like relative (Zimmer, 2000). Present-day lancelets (amphioxus) are in the appropriate place to illuminate the critical transition towards vertebrate complexity. Amphioxus (Cephalochordata) possesses a vertebrate-like body plan, but lacks many of the complex features of vertebrates, including a complex nervous system. Remarkably, the simplicity of the amphioxus body plan is mirrored by the simplicity of its genome: it escaped the extensive gene duplication events that took place coincidentally with the origins of vertebrates and the early stages of vertebrate evolution (Furlong and Holland, 2002).

Whether Nt/Trk signalling mechanisms are compulsory for evolving complex nervous systems, and whether their evolutionary appearance coincided with the origin of vertebrates, remains a subject of debate (Jaaro et al., 2001). We show that Trk receptors are not a vertebrate innovation, and

originated prior to the cephalochordate/vertebrate split. We report the isolation, molecular characterisation and expression of the single amphioxus Trk receptor, *AmphiTrk*. Its orthology to vertebrate Trk receptors is strongly supported by both phylogenetic analysis and full-length protein domain structure. Its genomic structure suggests that the Trk gene emergence occurred by means of exon shuffling. We also investigate the physiological response of *AmphiTrk* to vertebrate neurotrophins. Developmental expression suggests an ancestral function for the Trk family in the formation of an ectodermal peripheral nervous system.

Materials and methods

Isolation of *AmphiTrk*

Degenerate oligonucleotides corresponding to sequences GDFGMSR and WMPPEI were designed based on conserved regions within the tyrosine kinase domain of vertebrate Trk receptors. PCR reactions (50 µl) were run on 50–100 ng of *Branchiostoma floridae* embryonic cDNA. PCR conditions were: 35 cycles of denaturation at 94°C for 20 seconds, annealing at 50–55°C for 30 seconds and 20 seconds of elongation at 72°C. PCR products were ligated into plasmid and sequenced. Two identical 90 bp fragments with high similarity to vertebrate Trk receptors were used to isolate full-length cDNAs via screening of an embryonic *B. floridae* cDNA library, generously given by J. Langeland. A *B. floridae* genomic library (Ferrier et al., 2000) was screened using the same probe for cDNA isolation. Further screenings with specific cDNA fragments allowed the isolation of a contiguous 24 kb region containing the complete transcribed sequence of *AmphiTrk*. For Southern blotting, 10 µg of genomic DNA from a single individual was digested with *EcoRI* or *XbaI*, and hybridised at medium stringency conditions with probes amplified from exons 4–5 or exon 10 of *AmphiTrk*.

Sequence and phylogenetic analysis

Public domain sequence tools were used to characterise the *AmphiTrk* gene and the peptide domains (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>, <http://www.expasy.ch/tools>). Putative vertebrate and invertebrate orthologue sequences were retrieved from the GeneBank database. Alignment with *AmphiTrk* sequence was performed using ClustalX and bootstrapped trees were calculated by neighbour-joining method over 1000 replicas. Cladograms were visualised using TreeView V.1.5.3. For tyrosine kinase domain phylogenetic analysis, human and mouse ROR1 receptors were used as outgroups.

Functional assays

To express *AmphiTrk* in mammalian cultured cells, the complete coding region was cloned into a pCDNA3 vector. The chimaeric receptor rTrkA-*AmphiTrk*, including an HA epitope in its 5' end, was generated by replacement of the intracellular domain of the rat TrkA (kindly provided by M. Zanca) with that of *AmphiTrk* through PCR amplification. Plasmids (3 µg) were transiently transfected into cultured PC12 nnr5 cells (Green et al., 1986), as described by Egea et al. (Egea et al., 1999). rTrkA and pcDNA3 were used as controls. DMEM medium containing 10% foetal calf serum (FCS) was changed 5 hours after transfection and cultures were left overnight. Cells were then serum-deprived for 12 hours before stimulation for 5 minutes with 10, 50 or 100 ng/ml of NGF (Sigma), BDNF, NT3 or NT4 (Alomone Laboratories). Cultures were then rinsed with ice-cold PBS and solubilised in lysis buffer (2% SDS, 125 mM Tris, pH 5.8). Protein was quantified with a BioRad-DC assay system. Total cell lysates were western blotted and immunodetected with anti-phospho-ERK or anti-phospho-Akt (Cell Signalling Technology). To control the protein content in each lane, membranes were stripped and re-probed with an anti- α -tubulin antibody (Sigma). For PLC γ

immunoprecipitation, pc12nr5 cells were stimulated as above with 100 ng/ml of NGF. Total cell lysates (500 µg) were incubated overnight with 1.5 µg of an anti-PLC γ -conjugated antibody. After immunoprecipitation with Protein G-sepharose beads, blots were immunodetected with anti-phospho-Tyr 4G10 (Cell Signalling Technology), stripped and re-probed with anti-PLC γ (BD Transduction Laboratories) as a control for immunoprecipitation efficiency. For neurite outgrowth assays, PC12nr5 cells were plated onto polyornithine- and collagen-precoated 35-mm plates (1×10^6 cells/plate). Twenty-four-hour-old cell cultures were co-transfected with enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) and the chimera rTrkA/*AmphiTrk*, *AmphiTrk*, rTrkA or the pcDNA3 vector as described above. Following overnight incubation, medium was changed and supplemented with NGF (50 ng/ml), and then renewed after three days. After 6 days, transfected cells were examined and those whose neurite lengths were twice the cell body diameter were counted as differentiated.

In situ hybridisation

Ripe *B. floridae* adults were collected from Old Tampa Bay (FL, USA) and induced to spawn by electric stimulation. Embryos and adults were obtained and fixed as described in Holland and Holland (Holland and Holland, 1993). Sense and antisense DIG-labelled probes were generated by in vitro transcription of the cDNA full-length coding region. Whole-mount in situ hybridisation and subsequent sectioning was performed in accordance with Benito-Gutiérrez et al. (Benito-Gutiérrez et al., 2005).

A novel method for in situ hybridisation of adult sections was specially developed, whereby fixed adults were dehydrated through an ethanol series, cut in three pieces and then prepared for embedding in paraplast (Sigma) by xylene series; xylene:ethanol (1:1), xylene, xylene:paraplast (1:1). Blocks were solidified and settled at 4°C for 12 hours prior to sectioning. Slides were immersed in 10% HCl for 5 minutes, washed with DEPC-water and immersed in acetone for 2 minutes before drying. They were then immediately covered with 2% silane-acetone (Sigma), dried and autoclaved. Serial sections (6 µm) were deposited on silane-coated slides, and settled at 45°C for 6 hours. Tissue slides were immersed in xylene and sections were rehydrated through an ethanol series. Tissue was digested using 1 µg/ml proteinase K in PBS for 30 minutes at 37°C and the reaction stopped by immersion in 0.2% glycine. Sections were refixed in 4% PFA-PBS for 20 minutes, and then immersed in 0.1 M triethanolamine with a posterior addition of 0.25% acetic anhydride. Slides were washed with PBS and then pre-hybridised for 3 hours at 60°C in 100 µg/ml heparin, 5×SSC, 0.1% Tween-20, 5 mM EDTA, 1×Denhardt's. A DIG-labelled probe (100 ng/ml) in pre-hybridisation buffer was added and incubated at 60°C for 14 hours. After hybridisation, slides were washed in 50% formamide/5×SSC/1% SDS (twice for 15 minutes each) and 50% formamide/2×SSC/1% SDS (twice for 15 minutes each), treated with 2 mg/ml RNaseA and 100 U/ml RNaseT1 in 2×SSC/0.1% Tween20 at 37°C for 30 minutes, and washed with 0.2×SSC/0.1% Tween20 (twice for 20 minutes each). DIG staining was performed following supplier recommendations (Roche). Slides were refixed in 4% PFA-PBS, immersed in 0.1% sodium azide/PBS and mounted in Mowiol.

In vivo DiI labelling

Hatching neurulae, which are extremely motile, were anaesthetised by placing them in a reduced drop of seawater, causing oxygen deprivation. A glass capillary tube was filled with Fast DiI oil (D-3899, Molecular Probes) and immersed in seawater causing the dye to crystallise at the tip. Using a micromanipulator the crystallised dye was applied to the ventral surface of the immobilised hatching neurulae. Immediately after dye deposition, embryos were transferred to seawater, regaining movement and developing normally. At late neurula stage, embryos were fixed and photographed under a fluorescence rhodamine filter.

Results

Isolation and sequence analysis of the single amphioxus Trk receptor

Using a combination of degenerate PCR, cDNA and genomic screenings, we isolated the single gene coding for a tyrosine kinase Trk receptor, *AmphiTrk*, in the amphioxus *Branchiostoma floridae*. The cDNAs coded for a single open reading frame of 797 amino acids, with high similarity to vertebrate TrkA, TrkB and TrkC receptors (Fig. 1). All three degenerate PCR, medium-stringency cDNA and genomic screenings consistently produced the same sequence. To further confirm *AmphiTrk* was the only Trk gene in the amphioxus genome, Southern blots of genomic DNA from a single individual were hybridised with probes derived from exons encoding extracellular or intracellular domains (Fig. 2). One or two bands were detected in each lane, consistent with *AmphiTrk* being a single copy gene.

The in silico characterisation of *AmphiTrk* revealed a canonical vertebrate domain structure at every extracytoplasmic, transmembrane and intracytoplasmic level (Fig. 1A). Visually, the extracellular region of *AmphiTrk* shares a common architecture with the extracytoplasmic domain of vertebrate Trk receptors (Fig. 1A). It consists of two consecutive leucine-rich repeats (Fig. 1B, italics) flanked by cysteine-rich clusters (Fig. 1B, bold), followed by two immunoglobulin (Ig)-like domains (Fig. 1B, underlined). Leucine-rich motifs and cysteine-rich clusters have been reported to participate in ligand binding: TrkB splicing variants lacking leucine-rich motifs are unable to bind any TrkB ligands (Ninkina et al., 1997). However, the major interface for neurotrophin binding is the second Ig-like domain, where specific residues come into direct contact with the ligand (Wiesmann et al., 1999). Both Ig-like domains are of the C2 type in vertebrates and amphioxus, and the most C-terminal pole, which belongs to the second Ig-like domain, contains asparagine residues with structural roles for ligand-receptor interactions. *AmphiTrk* also possesses such residues (N355 and N364, Fig. 1B, dots).

On the cytoplasmic side, *AmphiTrk* includes a tyrosine kinase (TK) domain that contains all the key residues necessary to carry out its function as a catalytic receptor. Like its vertebrate counterparts, it contains the signature pattern of class II tyrosine kinase receptors [DIYSTDYR (Fig. 1B, grey background)]. Within this short amino acid sequence, three tyrosine residues (Y676, Y680 and Y681; Fig. 1B, black background) constitute the putative auto-phosphorylation activation loop. A presumptive ATP-binding region is located at the N-terminal pole of the TK domain and contains a conserved lysine (K544, Fig. 1B, black background)

responsible for binding ATP. In addition, two potential phosphorylation sites for cAMP/cGMP-dependent kinase proteins, lie in positions comparable to those in vertebrates: KIS at the juxtamembrane intracytoplasmic part preceding the TK domain; and RKFT following the activation loop within the

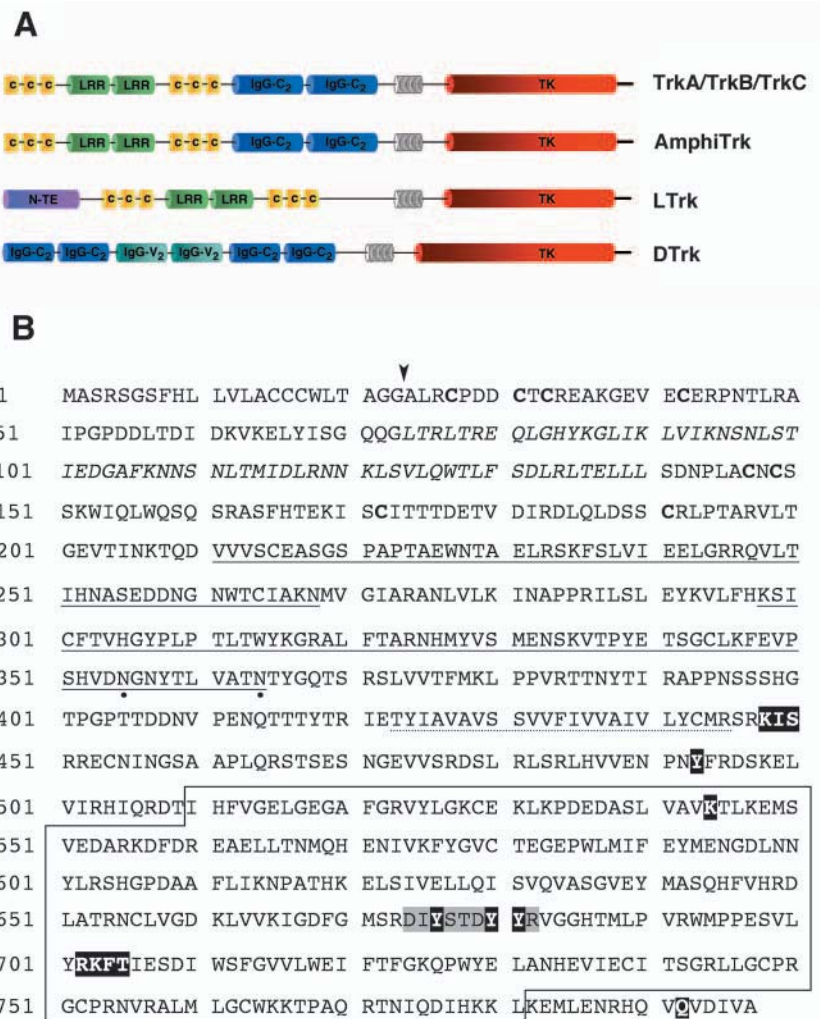


Fig. 1. (A) Domain structure comparison of *AmphiTrk*, vertebrate Trk receptors (TrkA, TrkB and TrkC) and representative invertebrate Trk-like proteins from *Lymnaea stagnalis* (LTrk) and *Drosophila melanogaster* (DTrk). Modules are colour coded: yellow, Cys-rich clusters; green, leucine-rich domains; blue, type C2 IgG domains; grey, transmembrane domain; red, tyrosine-kinase domain; purple, N-terminal extension; turquoise; type V2 IgG domains. (B) *AmphiTrk* amino acid sequence. Amino acid positions are numbered on the left. The putative signal sequence cleavage site is indicated by an arrowhead. Leucine-rich motifs are in italics and flanking cysteine clusters in bold. Both Ig-like domains are underlined; conserved asparagines with structural roles for ligand binding are indicated by dots. The transmembrane region is underlined by a dotted line. The first phosphorylation site by cAMP/cGMP-dependent kinase proteins, KIS, is shown with a black background, as is the tyrosine responsible for Shc recruitment. Within the tyrosine kinase domain (boxed), the lysine responsible for ATP binding and the second phosphorylation site by cAMP/cGMP-dependent kinase proteins, RKFT, are shown by a black background. The autophosphorylation sequence (DIYSTDYR) is highlighted in grey and the autophosphorylated tyrosines are shown by a black background. Glutamine located in the same position as the vertebrate docking site for PLC γ is shown by a black background. *AmphiTrk* sequences have been deposited in the GeneBank under Accession Numbers AY902361-AY902364

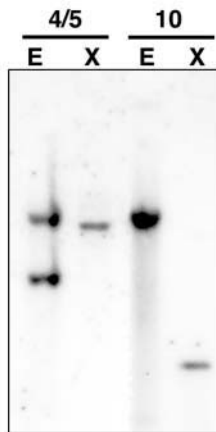


Fig. 2. Southern blot of a *Branchiostoma floridae* individual genomic DNA, digested with *EcoRI* (E) or *XbaI* (X). Hybridisations with probes derived from exons 4/5 or exon 10 show that *AmphiTrk* is a single copy gene.

TK domain (Fig. 1B, black background). In vertebrates, the former motif is a binding site for SNT, a protein involved in neuronal differentiation and neurite outgrowth pathways (Peng et al., 1995). Also present in amphioxus is the docking site for Shc, an adaptor protein which in vertebrates activates the Ras-Raf-Erk and PI3kinase-AKT signalling pathways involved in neuronal survival and differentiation events. It is identically placed, preceding the tyrosine kinase domain (Y493, Fig. 1B, black background). A distinctive feature of *AmphiTrk* resides at the furthest C terminus of the protein, outside the TK domain: a glutamine residue (Q792, Fig. 1B, black background). It occupies the position of a tyrosine (Y785), which in mammals serves as the docking site for PLC γ , whose transduction pathway leads to initiation and maintenance of long-term potentiation events (Huang and Reichardt, 2003).

Genomic structure

The genomic structure of the *AmphiTrk* gene was elucidated by screening a *Branchiostoma floridae* genomic library. Isolated genomic clones yielded an overlapped region of 21.4 kb, containing the complete transcriptional unit and flanking regions. The *AmphiTrk* transcriptional unit consists of 13 coding exons. Analysis of exonic domain distribution, and comparisons with the genomic structure of human TrkA, TrkB and TrkC, revealed a similar, but appreciably less fragmented, structure (Fig. 3A,B).

The first five exons exhibit the same domain arrangement as human Trk receptors. The signal peptide and the N-terminal cysteine-rich cluster are coded by the first exon, while the leucine-rich repeats are spread among exons 2, 3 and 4, leaving the C-terminal cysteine-rich cluster in exon 5. In contrast to human Trk proteins, each Ig-like domain in *AmphiTrk* is coded by a single exon (exons 6 and 7). In vertebrate Trk proteins, the first Ig-like domain is encoded by two exons. The extracellular juxtamembrane region is mainly encoded by exon 8 and the following transmembrane region by exon 9. The latter comprises the KIS motif and residue Y493, both located in the adjacent cytoplasmic part.

This region around the transmembrane domain is structured differently in human Trk receptors, where analogous exons are split in two pairs (9/10 and 11/12). Interestingly, human exon 9 encodes a short amino acid sequence alternatively spliced in several of the isoforms described in vertebrate species. The presence or absence of this short amino acid sequence is tissue specific and affects ligand preference. Human and rat TrkAII isoforms, which lack six amino acids in this region (coded by exon 9), are expressed in non-neuronal tissues and bind only NGF, while TrkA-II isoforms, which contain the six amino acid insertion, are localised in neuronal tissues and can interact with both NGF and NT3 (Barker et al., 1993). The absence of this mini-exon in *AmphiTrk* suggests either that ligand flexibility is absent in amphioxus Trk, or that only one ligand molecule is present in amphioxus.

The TK domain and the intracytoplasmic C-terminus are distributed over four exons (10, 11, 12 and 13). Exons 11, 12 and 13 are indistinguishable between human and amphioxus in terms of structure and key residue distribution. However, exon 10 of *AmphiTrk* is split in two exons in humans (13 and 14), with a breakpoint centrally located in the ATP binding residue K544.

Although we cannot formally rule out the loss of some introns in the amphioxus lineage, it is more likely that four new introns were generated early in vertebrate evolution, because in *AmphiTrk* particular domains are encoded by fewer numbers of exons than occur in vertebrates. In summary, our data suggest that fragmentation occurred after the generation of a new modular protein, constructed through the shuffling of domain-encoding exons and predating the cephalochordate/vertebrate split.

Phylogenetic analysis

To establish *AmphiTrk* phylogenetic relationship with its vertebrate relatives and invertebrate Trk-related receptors, three different trees were generated. Trk receptors from rat, human and chicken were taken to avoid a biased mammalian representation; no other vertebrate species were included because of the incompleteness of available sequences. *Drosophila* Trk and *Limnaea* LTrk were used as Trk-related invertebrate representatives, as no other similar receptors have been reported in non-vertebrate clades.

All trees had similar topology and positioned *AmphiTrk*, with high bootstrap values at the base of, and equally related to, all three vertebrate Trk receptors (Fig. 4). When full-length

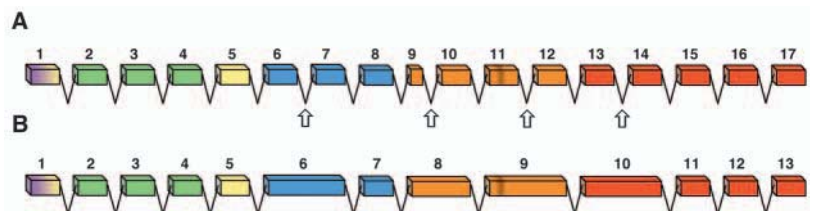


Fig. 3. Comparison of the genomic structure of *AmphiTrk* and human Trk genes. (A) Exonic domain distribution of human *TRKA*, *TRKB* and *TRKC*. Newly generated introns in human Trk receptors are indicated by arrows. (B) Exonic domain distribution of *AmphiTrk*. Domains are colour coded: purple, signal peptide; green, leucine-rich domains; yellow, cys-rich clusters; blue, type C2 Ig-like domains; orange, transmembrane surrounding regions; brown, transmembrane domain; red, tyrosine-kinase domain.

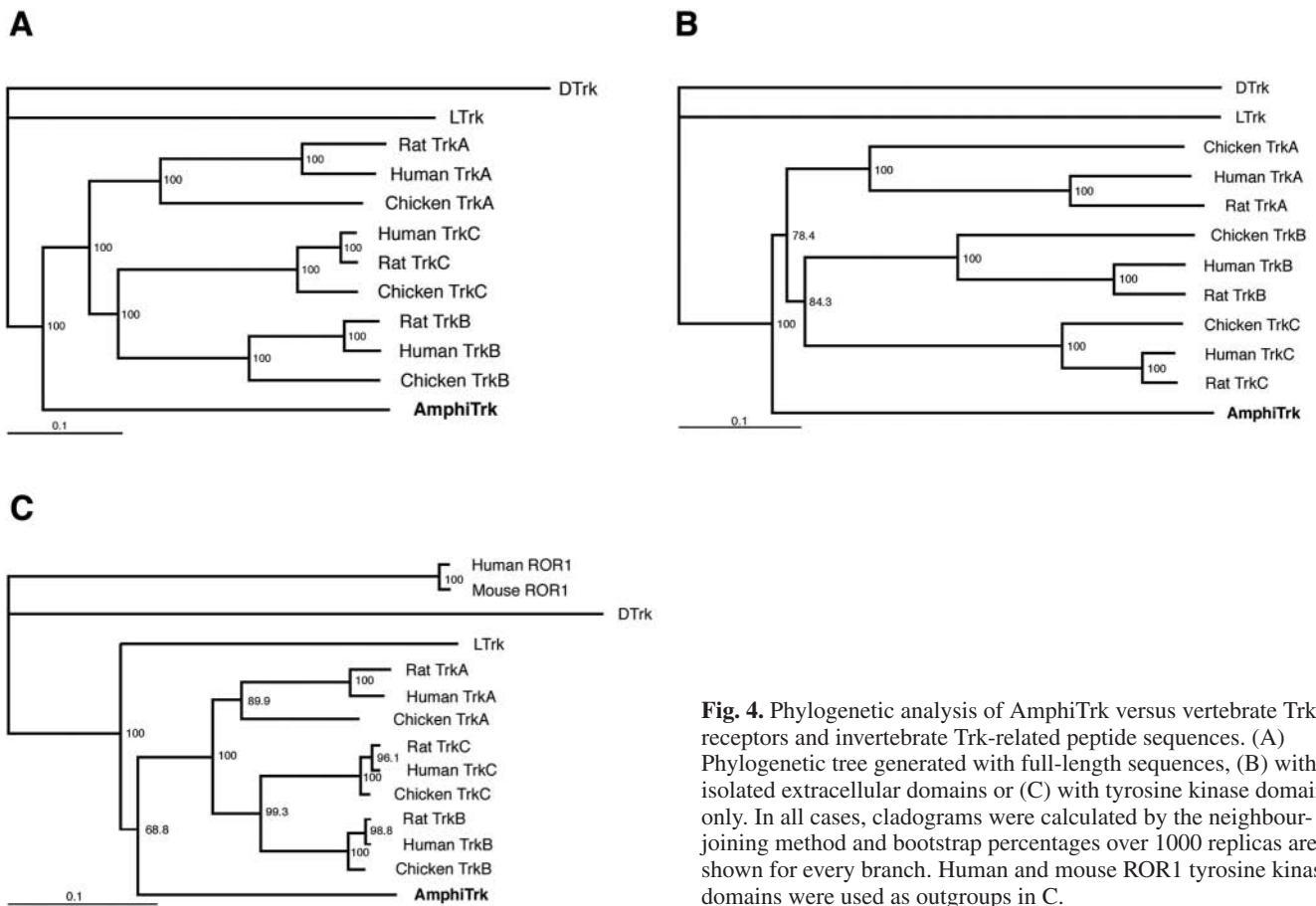


Fig. 4. Phylogenetic analysis of AmphiTrk versus vertebrate Trk receptors and invertebrate Trk-related peptide sequences. (A) Phylogenetic tree generated with full-length sequences, (B) with isolated extracellular domains or (C) with tyrosine kinase domains only. In all cases, cladograms were calculated by the neighbour-joining method and bootstrap percentages over 1000 replicas are shown for every branch. Human and mouse ROR1 tyrosine kinase domains were used as outgroups in C.

proteins were used, a clade formed by AmphiTrk and vertebrate TrkA, TrkB and TrkC excluded LTrk and DTrk (Fig. 4A). In the tree generated using only the extracellular domain, a similar topology was obtained (Fig. 4B). Although minor regions of the extracellular domains of DTrk and LTrk were conserved, these fell outside the group formed by AmphiTrk and vertebrate Trks. We also generated a tree using only the tyrosine kinase domain (Fig. 4C), wherein human and mouse ROR1 TK domains were taken as outgroups. In all analyses, AmphiTrk position was consistent with it being a direct descendant of the pre-duplicative, vertebrate-like, Trk, strengthening its condition as a primitive neurotrophic receptor.

Responsiveness of AmphiTrk to vertebrate neurotrophins

To examine AmphiTrk ability to respond through mammalian ligand binding, the receptor was transiently expressed in cultured PC12 *nnr5* cells (PC12 derived, *Trk^{-/-}*) (Green et al., 1986). AmphiTrk-expressing PC12 *nnr5* cells were acutely stimulated with increasing concentrations of NGF, BDNF, NT3 or NT4. Total cell lysates were western blotted to detect phosphorylated forms of Erk1/2 and AKT, which is indicative of AmphiTrk activation (Fig. 5A,D). Phosphorylation of AKT and Erk1/2 was stronger in cells stimulated by either of the neurotrophins than in non-stimulated cultures, in a dose-dependent manner. This suggests that AmphiTrk is not only able to bind to all vertebrate neurotrophins, but can also

activate the vertebrate Erk1/2 and AKT transduction pathways. To determine whether AmphiTrk signalling strength, through mammalian neurotrophins, was most influenced by its extracellular domain, we tested its catalytic abilities. This was accomplished by transferring the AmphiTrk intracellular domain under mammalian extracellular control. The chimaeric receptor rTrkA-AmphiTrk (Fig. 5E) was generated by using the extracellular and transmembrane domains of an HA-tagged rat TrkA receptor and replacing its intracellular domain with that of AmphiTrk. Proceeding as above, downstream phosphorylations of AKT and Erk1/2 was detected through stimulation with NGF. The results obtained for rTrkA-AmphiTrk were comparable with those for rTrkA (Fig. 5F), indicating that the intracellular domain of AmphiTrk is able to mimic completely the function of the endogenous vertebrate receptor.

To functionally approach the sequence analyses suggestion for the inability of AmphiTrk to activate the PLC γ pathway, we analysed phosphorylation of PLC γ following NGF stimulation in rTrkA-AmphiTrk and rTrkA transfected cell cultures (Fig. 5G). Tellingly, the intracellular domain of AmphiTrk failed to induce phosphorylation of PLC γ .

In addition, we studied the ability of AmphiTrk and the chimaeric rTrkA-AmphiTrk receptor to induce neurite outgrowth through NGF activation in cultured PC12 *nnr5* cells (Fig. 5H,K). rTrkA-AmphiTrk was found to induce neurite outgrowth following stimulation with NGF at comparable levels with those measured in rTrkA. However, although native

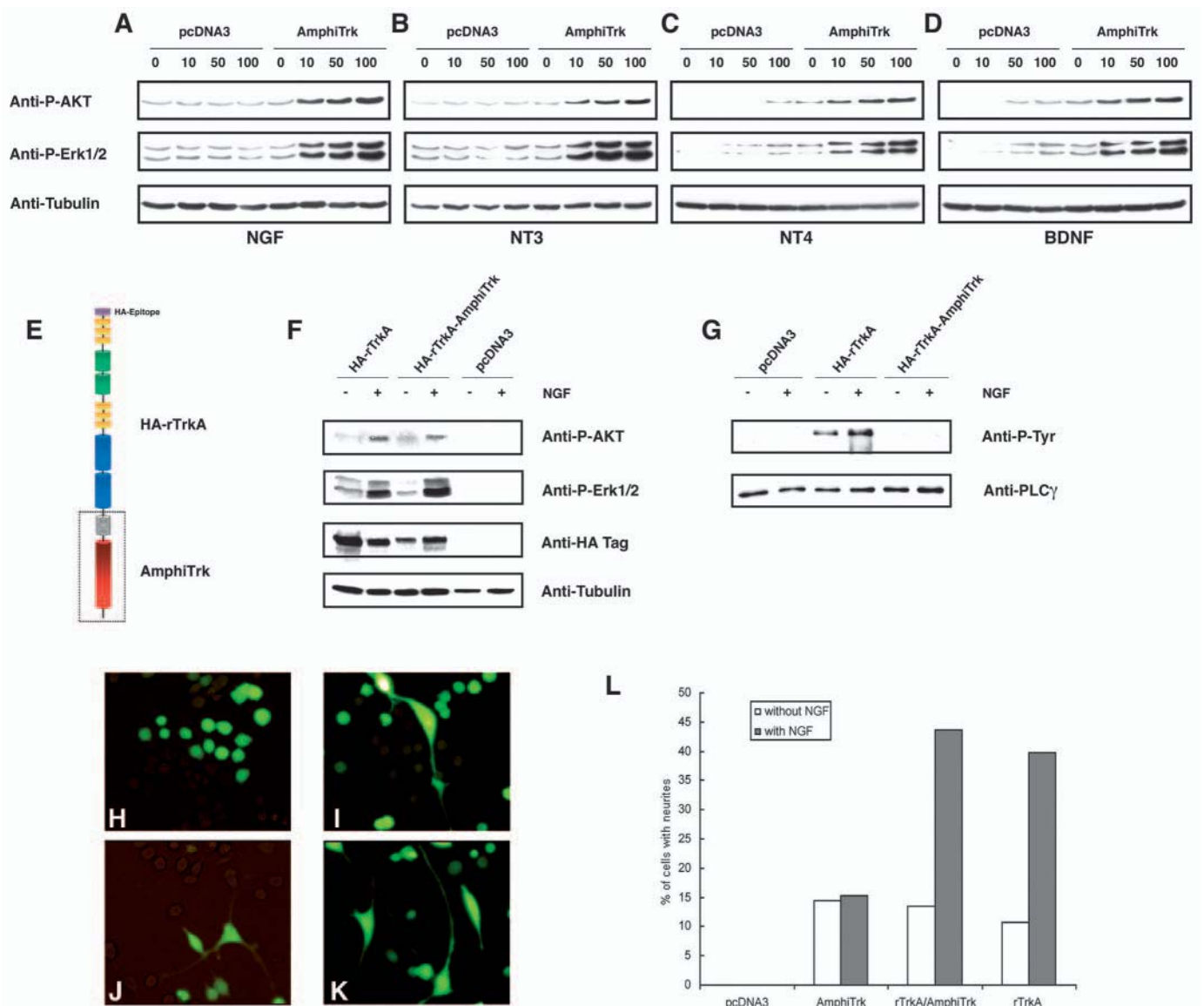


Fig. 5. Interaction of AmphiTrk with mammalian neurotrophins. (A-D) Western blots of AmphiTrk induced phosphorylation of AKT and Erk1/2 following stimulation with mammalian neurotrophins in transfected cell cultures. Concentrations of neurotrophins are indicated above the blots (ng/ml) (E) Schematic representation of the chimaeric rat TrkA receptor containing the intracellular domain of AmphiTrk (HA-rTrkA-AmphiTrk). (F) Western blot of HA-rTrkA-AmphiTrk induced phosphorylation of AKT and Erk1/2 after stimulation with NGF. Detection of the HA epitope was carried out to confirm expression of the chimaeric receptor and the native rat TrkA, which was used as a positive control. (G) Detection of PLC γ phosphorylation after stimulation with NGF (100 ng/ml) and immunoprecipitation with anti-PLC γ . No phosphorylation of PLC γ was detected through HA-rTrkA-AmphiTrk. An anti-PLC γ antibody was used to control immunoprecipitation efficiency. Stimulation of cultures transfected with the empty vector (pCDNA3) was performed as a negative control in A-D,F,G. Tubulin detection was used to control the loading of the lanes in A-D,F,G. (H-K) Neurite outgrowth assays. Neurite outgrowth was induced by NGF stimulation and visualised by co-transfection with an enhanced yellow fluorescent protein (EYFP). (H) Empty vector (pCDNA3), (I) AmphiTrk, (J) chimaeric HA-rTrkA-AmphiTrk and (K) rTrkA. (L) Percentages of cells that developed neurites under the absence or presence of NGF stimulation.

AmphiTrk was able to induce neurite outgrowth as well, no clear increase under NGF incubation was observed (Fig. 5L).

Developmental expression of AmphiTrk

AmphiTrk expression throughout embryonic development was examined by whole-mount in situ hybridisation. *AmphiTrk* transcripts are first detected at early neurula stage in about a dozen scattered individual epidermal cells of the ventral midline (Fig. 6A). As development proceeds, the number of

expressing cells increases fourfold, and the signal moves dorsally to mediolateral positions on both sides of the embryo (Fig. 6B,K). Previous observations of adults and larvae have shown the presence of widespread ectodermal sensory cells in amphioxus (Bone and Best, 1978). More recently, scanning electron microscope (SEM) observations of mid-late neurula embryos show some of these cells to be morphologically differentiated by this stage (Mazet et al., 2004). Gene expression patterns of the pan-neuronal marker *AmphiElav*, in

tandem with other morphological evidence, suggest that the origin of these sensory neurons stems from general epidermal cells in the developing embryo (Sato et al., 2001; Benito-Gutiérrez et al., 2005). *AmphiTrk*-expressing cells possess a distinctive fusiform morphology with respect to the surrounding rounded epidermal cells (Fig. 6J). Indeed, their localisation, in the ventrolateral epidermis of the embryos, is similar to that reported for sensory neurons in late neurulae and larvae, and their scattered distribution is similar to that of neurons expressing *AmphiElav*. Hence, *AmphiTrk* positive cells are probably sensory neurons belonging to the peripheral nervous system. Given that no morphologically differentiated sensory neurons have been found in early neurula stages (Mazet et al., 2004), the present results suggest that *AmphiTrk* is expressed by these sensory neurons during earlier stages of differentiation.

The puzzling laterodorsalisation of the *AmphiTrk* signal through neurulation raises the issue of whether epidermal movements occur at these stages or simply represent gene expression shifts. As signal intensity among individual *AmphiTrk*-expressing cells is homogeneous throughout, combinatorial down- and upregulation of transcripts within distinct cells seems unlikely. To determine whether the shifting position of the *AmphiTrk* signal correlated with cell migration, *in vivo* DiI labelling experiments were performed (Fig. 6L,O). To then distinguish whether movement was due to an entire epidermal layer dragging or to individual cell migrating upwards, we deposited DiI crystals, which preferentially adsorb to neural cells (Holland and Yu, 2002), on the ventral surface of hatching neurulae (Fig. 6L arrows), allowing them to develop until they reached late neurula stage. Consequently, individual fluorescent cells in mediolateral positions were detected in these late neurulae (arrows in Fig. 6N and in the merged image, Fig. 6O). This indicates that individual cells, in the ventral midline at early neurula stages, incorporated DiI and then migrated to dorsal territories. Although our data cannot reliably conclude that *AmphiTrk*-labelled cells are those that are migrating, detailed localisation in cross-sections, either within the epidermis or just beneath it (Fig. 6E,H, arrows and arrowheads, respectively), is consistent with dorsal migration through mesenchymal territories. This behaviour suggestively mimics that of the epithelial-mesenchymal transition and the migration of vertebrate neural crest cells.

In larval stages, *AmphiTrk* is expressed asymmetrically in the left dorsolateral quadrant of the developing Hatschek's pit (Fig. 6P, arrow), a neurosecretory structure thought to be homologous to the vertebrate adenohypophysis (Gorbman et al., 1999). In early larva, weak labelling is also visible at the most anterior tip of the embryo (Fig. 6P, arrowhead). This probably corresponds to the sensory cell clusters marking the future corpuscles of the Quatrefags, whose axonal processes contribute to rostral nerves.

Expression in adults

AmphiTrk expression in adults was tested by *in situ* hybridisation of sections (Fig. 7). *AmphiTrk* transcripts were detected along the nerve cord and diffuse labelling was still visible in the Hatschek's pit (Fig. 7B, asterisk). The anterior limit of *AmphiTrk* expression was located at the beginning of the proper nerve cord, caudal to the Joseph cells group, and next to the posteriormost dorsal part of the cerebral vesicle.

Conspicuous labelling was recognisable around the ventral midline of the neural tube (Fig. 7A,F). *AmphiTrk*-expressing cells were clustered at the ventral periventricular grey and deeper ventral white matter, forming a characteristic V-shaped pattern, which was maintained along the entire nerve cord. Based on previous examination of the amphioxus ventral nerve cord, *AmphiTrk*-expressing cells seem to be located within this compartment, where massive synaptic inputs arrive from a variety of sensory and interneuronal sources (Lacalli and Kelly, 2003). The ventral compartment motoneurons extend from the primary motor centre to far beyond the nerve cord, coincident with *AmphiTrk* expression. However, the number of ventral motoneurons was apparently lower than the number of labelled cells in our sections, indicating that *AmphiTrk* transcripts may also be present in glial-like cells and motoneuron-associated neurons (including interneurons). This is consistent with the wide range of neuronal cell types expressing Trk receptors within the vertebrate central nervous system. Intriguingly, at some levels, perikarya included in the V vertex touch the surrounding membrane of the notochord (Fig. 7F, arrow), a structure that is under nervous control in adult amphioxus (Stach, 1999).

In the dorsal part of the nerve cord, only a few labelled cells were intermittently visible on the right or left side of the central canal (Fig. 7A,D). Such a segmented pattern is consistent with the paired motoneurons of the dorsal compartment (Lacalli, 2002). They are positioned near the somitic boundaries, and as do the dorsal *AmphiTrk*-expressing cells, they show a slight offset, that parallels the left/right asymmetry of the somites. These iterative patterns through the serial sections are concurrent with the weak labelling found in Hatschek's pit-including sections (Fig. 7B). Large columnar cells in the dorsalmost part of the Hatschek's pit are diffusely labelled in only the most posterior portions (Fig. 7B, asterisk). Based on previous examinations of this structure, *AmphiTrk* transcripts may localise in the infundibulum, which is composed of axonal, endocrine and other cell types (Gorbman et al., 1999).

Discussion

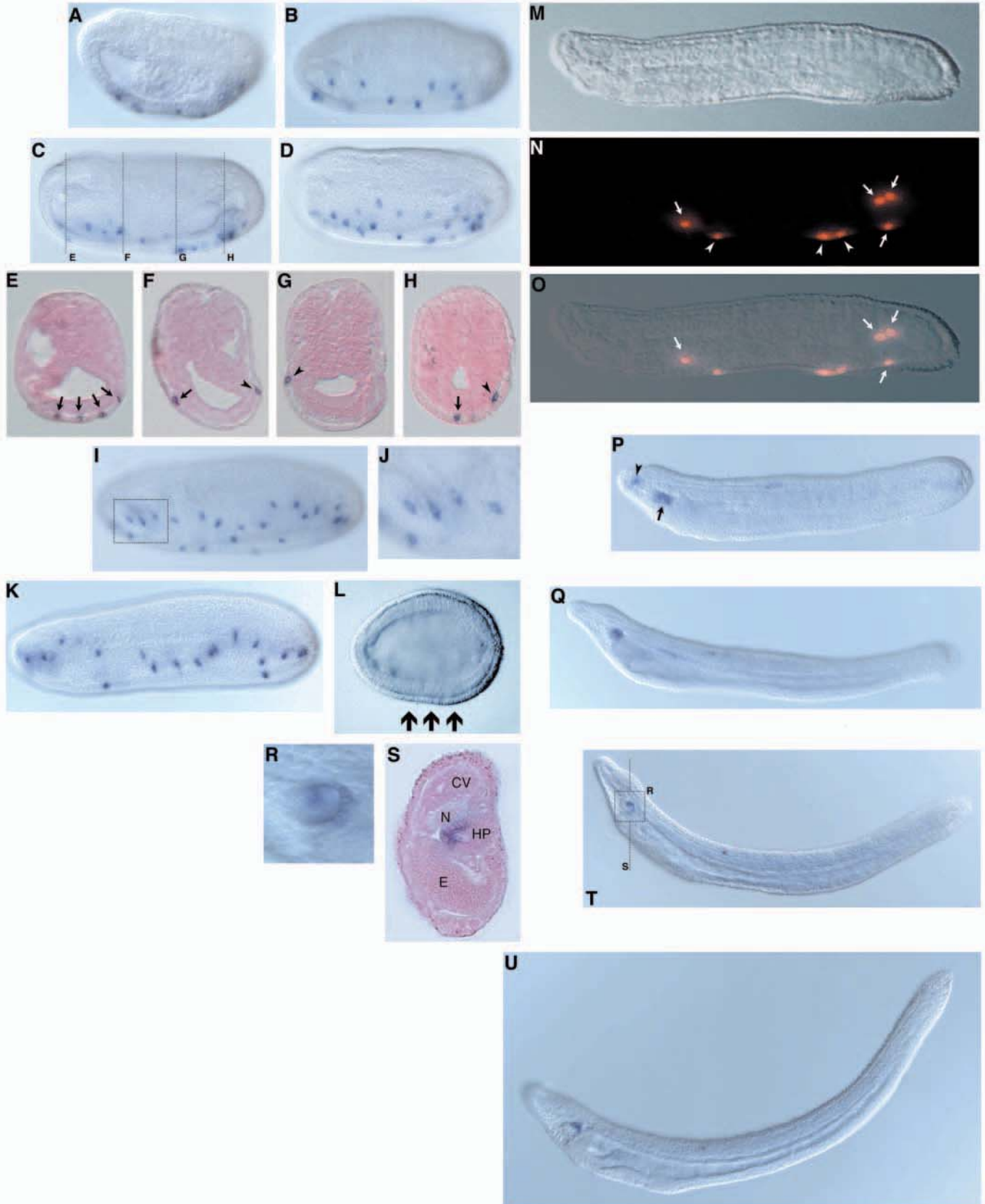
Invention of the Trk receptor by exon shuffling in the lineage leading to vertebrates

The isolation of the bona fide amphioxus Trk receptor demonstrates that the Trk family was not an invention of vertebrates, dating its origin back to the cephalochordate/vertebrate split. Our phylogenetic data argue that *AmphiTrk* is the pro-orthologue of vertebrate Trk receptors, as well as a direct descendant of the pre-duplicative pioneer *ProtoTrk* gene. High bootstrap values confirm the primitive nature of *AmphiTrk*, even when extracellular or intracellular domains are weighed separately, or together as a full-length protein. The rift between *AmphiTrk* and invertebrate Trk-related receptors is remarkable and strengthened by phylogenetic analyses and domain structure. The *Drosophila* Trk is, in fact, a plexin-binding protein and has been recently renamed Doff-Track (Winberg et al., 2001). LTrk has an extracellular part lacking the key Ig-like domains characteristic of vertebrate Trks, and has a peculiar N-terminal extension. However, *AmphiTrk* precisely possess all domains characteristic of vertebrate Trk receptors in the correct position.

Recent advances in comparative genomics suggest that the

increase in genome size is paralleled by a general decrease in genome compactness and an increase in the number and size of introns (Patthy, 1999). *AmphiTrk* genomic structure reveals

a more compacted domain distribution when compared with that of human Trks. Noticeably, the central core of the molecule may have been a target for the generation of four new



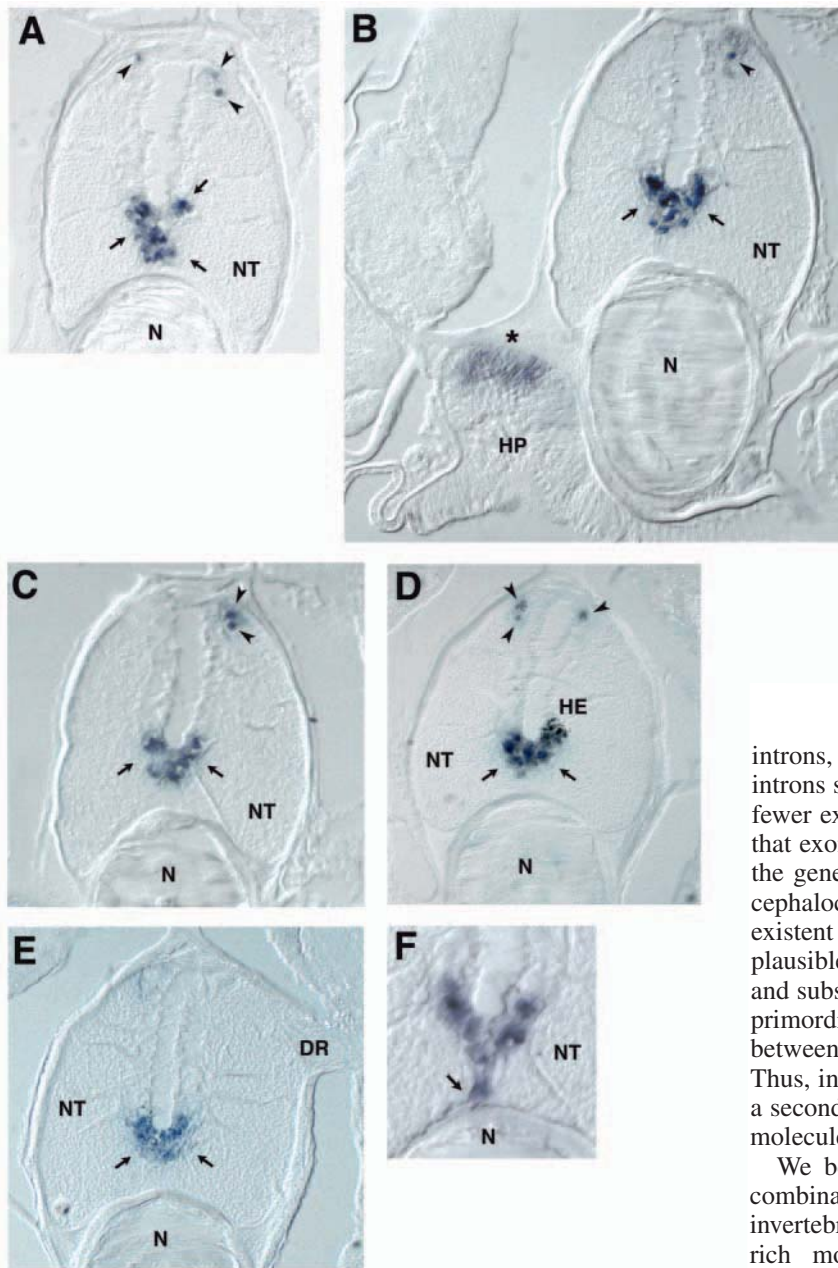


Fig. 7. *AmphiTrk* expression in the adult central nervous system. Pictures are lettered from most anterior (A) to most posterior (E) section. (A) The anteriormost limit of *AmphiTrk* expression is located at the beginning of the proper nerve cord, where strong signal is visible around the ventral part of the central canal (arrows). Coincidentally, some cells are labelled in both sides of the dorsal part of the neural tube (arrowheads), at the level where the primary motor centre initiates. (B) Section including the posterior part of the Hatschek's pit, showing *AmphiTrk* expression in the most dorsal part (asterisk). Arrows and arrowhead indicate *AmphiTrk*-expressing cells in the ventral and dorsal compartments, respectively. (C-E) *AmphiTrk* expression is maintained along the neural tube around the ventral side of the central canal (arrows). Iteratively, some cells simultaneously express *AmphiTrk* in the dorsal part of the neural tube, albeit with a slight right-left offset (arrowheads). (F) At some points along the neural tube, *AmphiTrk*-expressing cells extend ventrally, touching the surrounding membrane of the notochord (arrows). N, notochord; NT, neural tube; HP, Hatschek's pit; HE, Hesse eyecup; DR, dorsal root.

introns, present in humans but not in amphioxus. These introns split domains that are coded by a single exon or by fewer exons in the amphioxus gene. This finding suggests that exon shuffling was the crucial mechanism involved in the generation of a ProtoTrk modular protein prior to the cephalochordate/vertebrate split. Rearrangement of pre-existent domains, rather than creation of new ones, is a plausible mode for generating molecules able to expand and subsequently evolve to complexity. When domains are primordial encoded by single exons, the exchange between different genomic regions may be facilitated. Thus, insertion of introns within single exons may well be a secondary trait, result of the divergence from an original molecule successfully selected by evolution.

We believe that *AmphiTrk* novelty resides in its new combination of protein modules already present in lower invertebrate genomes. Certainly, LTrk possesses leucine-rich motifs sandwiched between clustered cysteines. Similarly, the tyrosine kinase domain itself arose before the divergence of animals from other higher eukaryotes (King

Fig. 6. Developmental expression of *AmphiTrk*. In all lateral views, the anterior is towards the left and the dorsal is towards the top. (A) Earliest *AmphiTrk* expression was detected in individual epidermal cells of the ventral midline of the early neurula. (B) The number of expressing cells began to increase at 14 hours of development. (C,D) Left- and right-hand views of the same neurula at 16 hours of development. (E-H) Cross-sections at different levels of the embryos shown in C and D (dotted lines). Positive cells are located within the epidermal layer (arrows) or just beneath it (arrowheads). (I) At 18 hours of development *AmphiTrk*-expressing cells in ventrolateral positions extend towards dorsal directions. (J) Magnified view of the area inside the rectangle in I, showing the fusiform shaped positive cells and the cytoplasmic distribution of *AmphiTrk* transcripts. (K) At late neurula stages, dorsalisation of the *AmphiTrk* signal was more evident. (L-O) In vivo DiI labelling assays. (L) Initial DiI crystal deposition in the ventral epidermis of the hatching neurula (arrows). (M) Cultured late neurula after DiI labelling shown in L. (N) Rhodamine filtered view of M, showing DiI labelled cells (arrows and arrowheads). (O) Merged image of M and N showing labelled cells that migrated individually towards dorsal positions (arrows). (P) In the early larval stage *AmphiTrk* was upregulated during Hatschek's pit formation (arrow) and weak expression was detected in a rostral patch of cells (arrowhead). (Q) At 26 hours of development, expression was just visible in the developing Hatschek's pit. (R) Magnified view of the area inside the dotted square in T, showing the dorsoposterior expression of *AmphiTrk* during Hatschek's pit formation. (S) Cross-section at the level of the dotted line in T, showing staining limited to the left-sided dorsolateral part of the Hatschek's pit primordia. (T,U) *AmphiTrk* expression was maintained in the Hatschek's pit at 28 hours (T) and 30 hours (U) of development. HP, Hatschek's pit; N, notochord; E, endostyle; CV, cerebral vesicle.

and Carrol, 2001). Nevertheless, assembly of the central core most probably occurred just predating the cephalochordate/vertebrate split, as the genome of the lower chordate *Ciona intestinalis* does not contain a Trk-like gene (Dehal et al., 2002). Conversely, we cannot totally rule out secondary loss of Trk in tunicates, even though the lack of Trk receptors in the nearly completed genome of a sea urchin species (<http://sugp.caltech.edu>) strongly strengthens the argument for a nascent Trk gene close to the cephalochordate/vertebrate split.

Acquisition of functional complexity

Neurotrophin signalling through Trk receptors elicits many biological effects. Beyond its crucial role in neuronal survival and differentiation during development, neurotrophin signalling is critically involved in axonal regulation and dendritic outgrowth, synapse formation and function, and cell migration. Among the numerous ways of controlling these processes, differential splicing and distinct preferences for ligand binding seem to be two decisive mechanisms (Segal, 2003).

We have no evidence for the presence of *AmphiTrk* splicing variants. *AmphiTrk* does not possess the separated miniexon, which in vertebrates confers a loose Trk-binding ability to the distinct neurotrophins. Therefore, promiscuous ligand-receptor relationships may be absent in amphioxus, or regulated by other means. The latter, however, seems unlikely as the pre-duplicative nature of the amphioxus genome suggests the *AmphiTrk* ligand to be a single amphioxus neurotrophin. *AmphiTrk* peptide characterisation reveals all the features defining a functional vertebrate Trk receptor. The sequence analysis was further confirmed by experiments in cultured rat cells, where *AmphiTrk* activated the Ras-Raf-Erk and PI3kinase-AKT signalling pathways in response to neurotrophins. *AmphiTrk* responded similarly to NGF, BDNF, NT3 and NT4. This indicates that after 500 million years of divergence, the extracellular domain of *AmphiTrk* can still molecularly bind and recognise post-duplicative vertebrate neurotrophins. Our functional data suggests that the biological functions of *AmphiTrk* may include neuronal survival and differentiation during development, as well as a likely role in axonal elongation and dendritic outgrowth, processes that are associated with the signalling pathways mentioned above (Patapoutian and Reichardt, 2001). Remarkably, the inability of *AmphiTrk* to activate the PLC γ pathway underscores its primitive nature as a Trk receptor, because this pathway is believed to drive the most complex responses generated by Trk-Nt interactions in mammals (Koponen et al., 2004).

The increase in the numbers of neurotrophin and Trk receptors does not always imply the increase in nervous system complexity, as exemplified by the lineage-specific duplications in teleost fishes (Hallböök, 1999). However, as we suggest here, vertebrate Trk receptors were originated from a single *ProtoTrk* gene through the wide genome duplication events that were linked to the invertebrate/vertebrate transition. Consistent with amphioxus position in the transition from simple to complex nervous systems, our results suggest that a *ProtoTrk*, *AmphiTrk*-like, ancestral gene may well have provided the genetic basis for acquisition of functional complexity. The recruitment of the PLC γ pathway, the expansion of the gene family, the appearance of alternative splicing, the co-evolution

of ligands and receptors, and the finely graded control of promiscuity may have been instrumental in the development of the vertebrate complex nervous system and in the acquisition of higher neuronal functions.

Evolutionary developmental insights from expression patterns

The variety of actions driven by the vertebrate Nt/Trk system are further manifested by their complicated gene expression patterns during development and adulthood. Furthermore, interpretation of gene knockout phenotypes in mice is hampered by the partial overlapping and redundancy among the three Trk receptors. The amphioxus simple nervous system offers an uncomplicated context in which to study the expression of a single Trk receptor, and may serve to provide insights into the basic function of this gene family in vertebrates.

During embryogenesis, *AmphiTrk* expression is restricted to the developing peripheral nervous system. Our results suggest that *AmphiTrk* is involved in sensory neuronal fate commitment and differentiation. *AmphiTrk* transcripts are detected earlier than epidermal differentiated primary neurons are identified in SEM observations, and also earlier than neurons are revealed by the pan-neural marker *AmphiElav* (Satoh et al., 2001; Mazet et al., 2004; Benito-Gutiérrez et al., 2005). As the number of *AmphiElav*-expressing cells is higher than the number of positive cells shown by our whole-mount experiments, we suspect that *AmphiTrk* is specifying only a subset of the neurons later identified by *AmphiElav*. Conversely, the reduced number of primary neurons shown by SEM observations suggests that *AmphiTrk* also plays a role in differentiating other types of sensory neurons, i.e. secondary neurons without an axonal process embedded in the epidermal layer.

Interestingly, *TrkB^{-/-}TrkC^{-/-}* (*Ntrk2/Ntrk3* – Mouse Genome Informatics) double-mutant mice show severe sensory defects (Silos-Santiago et al., 1997), and mice deprived of NGF/TrkA signalling during embryogenesis exhibit reduced sensitivity to painful stimuli (Fariñas, 1999). Neuronal losses of primary neurons in these null mice are localised in the sensory ganglia, structures absent in amphioxus. Nevertheless, prevention of TrkB and TrkC signalling in knockout mice for NT4, BDNF and NT3 leads to a severe deficiency in cutaneous sensory neurons, e.g. D-hair receptors, slow adapting mechanoreceptors and cutaneous mechanoreceptors, respectively (Stucky et al., 1998), all of them secondary neurons. Considering that *AmphiTrk* may well function in similar fashion to all the three vertebrate Trk receptors, these data support the idea that *AmphiTrk* is expressed by both primary and secondary neurons in the peripheral nervous system.

Some innovative vertebrate hallmarks can be correlated to the acquisition of a complex nervous system. Neural crest and placodes are exclusive vertebrate features clearly absent in amphioxus. It is widely accepted that the genetic machinery of neural crests was already present in amphioxus and, by extension, in the ancestor of vertebrates. However, the ability of neural crest cells to migrate individually seem to have arisen during vertebrate evolution (Trainor et al., 2003). We have evidence to show the presence of individually migrating cells in the amphioxus embryonic ectoderm (the first time this has been reported), which appealingly mimics that of neural crest

cells in vertebrates. Interestingly, vertebrate Trk receptors are expressed in migrating neural crest cells (Airaksen and Meyer, 1996). Moreover, many placode and neural crest derivatives express Trk receptors in vertebrates (Baker et al., 2002; Huang and Reichardt, 2001). Among these derivatives, adenohypophysis, which has its homologous in the amphioxus Hatschek's pit, originates from nonneurogenic placodes, and a wide variety of mechano- and chemosensory structures, including the olfactory epithelium, from neurogenic placodes (Holland and Holland, 2001). *AmphiTrk* is expressed during the formation of Hatschek's pit throughout larval stages, and into adulthood. Transcript locations in the infundibulum are comparable with those of the vertebrate Trk receptors in the anterior pituitary gland (Aguado et al., 1998). The corpuscles of Quatrefores are specialised organs, presumably with sensory roles, whose structure has been likened to the vertebrate olfactory placode. This structure, which lacks a counterpart in any other chordate, expresses *AmphiTrk* for a short time during the early larval stage.

Conspicuous labelling for *AmphiTrk* is evident in the adult central nervous system. As the pathways activated by *AmphiTrk* seem to be limited to survival and differentiation actions, as suggested by our functional studies in cell cultures, we cannot discard more complex roles for *AmphiTrk* in adults. Vertebrate neurotrophin signalling through Trk receptors modulates not only dendritic growth, but also the number of synapses as well as the efficacy of synaptic transmission (Bibel and Barde, 2000). Thus, *AmphiTrk* may have a similar role within the CNS of adults. Although *AmphiTrk* is unable to drive PLC γ -mediated actions, this does not prevent *AmphiTrk* from having a role in regulating neurotransmitter release within the neural tube.

We thank Nick Holland, Seb Shimeld and Mario Pestarino for help, advice and encouraging discussions. We also thank Robin Rycroft for editorial assistance. This research was funded by the Fundació La Marató de TV3, by grant BMC2002-03316 (MCYT, Spain), by the Generalitat de Catalunya (Distinció per la Promoció de la Recerca Universitaria to J.X.C. and J.G.F.) and by the European Community's Human Potential Programme HPRN-CT-2002-00263 'Neurogenome'. C.N. was supported by a postdoctoral contract from the above named EC programme.

References

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Aguado, F., Majó, G., Gómez de Aranda, I. and Ferrer, I. (1998). Trk neurotrophin receptor family immunoreactivity in rat and human pituitary tissues. *Neurosci. Lett.* **243**, 13-16.
- Airaksen, M. S. and Meyer, M. (1996). Most classes of dorsal root ganglion neurons are severely depleted but not absent in mice lacking neurotrophin-3. *Neuroscience* **73**, 907-911.
- Baker, C. V. H., Stark, M. R. and Bronner-Fraser, M. (2002). Pax3-expressing trigeminal placode cells can localize to trunk neural crest sites but are committed to cutaneous sensory fate. *Dev. Biol.* **249**, 219-236.
- Benito-Gutiérrez, E., Illas, M., Comella, J. X. and Garcia-Fernández, J. (2005). Outlining the nascent nervous system of *Branchiostoma floridae* (amphioxus) by the pan-neural marker *AmphiElav*. *Brain Res. Bull.* (in press).
- Bibel, M. and Barde, Y. A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* **14**, 2919-2937.
- Bone, Q. and West, C. G. (1978). Ciliated sensory cells in amphioxus (*Branchiostoma*). *J. Mar. Biol. Ass. UK* **58**, 479-486.
- Chao, M. V. (2000). Trophic factors: an evolutionary cul-de-sac or door into higher neuronal function? *J. Neurosci. Res.* **59**, 353-355.
- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., de Tomaso, A., Davidson, B., di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D. M. et al. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157-2167.
- Egea, J., Espinet, C. and Comella, J. X. (1999). Calcium influx activates extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway through a calmodulin-sensitive mechanism in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 75-85.
- Fariñas, I. (1999). Neurotrophin actions during the development of the peripheral nervous system. *Mic. Res. Tech.* **45**, 233-242.
- Ferrier, D. E., Minguión, C., Holland, P. W. H. and Garcia-Fernández, J. (2000). The amphioxus Hox cluster: deuterostome posterior flexibility and Hox14. *Evol. Dev.* **2**, 284-293.
- Furlong, R. and Holland, P. W. H. (2002). Were vertebrates octoploid? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **357**, 531-544.
- Gorbman, A., Nozaki, M. and Kubokawa, K. (1999). A brain-Hatschek's pit connection in amphioxus. *Gen. Comp. Endocrinol.* **113**, 251-254.
- Green, S. H., Rydel, R. E., Connolly, J. L. and Greene, L. A. (1986). PC12 cell mutants that possess low- but not high-affinity nerve growth factor receptors neither respond to nor internalize nerve growth factor. *J. Cell Biol.* **102**, 830-843.
- Hallböök, F. (1999). Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 616-621.
- Holland, L. Z. and Holland, N. D. (2001). Evolution of neural crest and placodes: amphioxus as a model for the ancestral vertebrate. *J. Anat.* **199**, 85-98.
- Holland, N. D. and Holland, L. Z. (1993). Embryos and larvae of invertebrate deuterostomes. In *Essential Developmental Biology, A Practical Approach* (ed. C. D. Stern, and P. W. H. Holland), pp. 21-32. Oxford: IRL Press.
- Holland, N. D. and Yu, Jr-K (2002). Epidermal receptor development and sensory pathways in vitally stained amphioxus (*Branchiostoma floridae*). *Acta Zool.* **83**, 309-319.
- Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 677-736.
- Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 609-642.
- Ibañez, C. F. (1998). Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* **21**, 438-444.
- Jaaro, H., Beck, G., Conticello, S. G. and Fainzilber, M. (2001). Evolving better brains: a need for neurotrophins. *Trends Neurosci.* **24**, 79-85.
- King, N. and Carroll, S. B. (2001). A receptor Tyrosine kinase from choanoflagellates: molecular insights into early animal evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 15032-1537.
- Koponen, E., Voikar, V., Riekk, R., Saarelainen, T., Rauramaa, T., Rauvala, H., Taira, T. and Castrén, E. (2004). Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor TrkB exhibit increased activation of the TrkB-PLC γ pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol. Cell Neurosci.* **26**, 166-181.
- Lacalli, T. C. (2002). The dorsal compartment locomotory control system in amphioxus larvae. *J. Morphol.* **252**, 227-237.
- Lacalli, T. C. and Kelly, S. J. (2003). Ventral neurons in the anterior nerve cord of amphioxus larvae. I. An inventory of cell types and synaptic patterns. *J. Morphol.* **257**, 190-211.
- Mazet, F., Masood, S., Luke, G. H., Holland, N. D. and Shimeld, S. M. (2004). Expression of *AmphiCoe*, an Amphioxus COE/EBF Gene, in the developing central nervous system and epidermal sensory neurons. *Genesis* **38**, 58-65.
- Ninkina, N., Grashchuck, M., Buchman, V. L. and Davies, A. M. (1997). TrkB variant with deletions in the leucine-rich motifs of the extracellular domain. *J. Biol. Chem.* **272**, 13019-13025.
- Patapoutian, A. and Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors, mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 272-280.
- Patthy, L. (1999). Genome evolution and the evolution of exon-shuffling – a review. *Gene* **238**, 103-114.
- Peng, X., Greene, L. A., Kaplan, D. R. and Stephens, R. M. (1995). Deletion of a conserved juxtamembrane sequence in Trk abolishes NGF-promoted neuritegenesis. *Neuron* **15**, 395-406.
- Poo, M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 1-9.
- Pulido, D., Campuzano, S., Koda, T., Modolell, J. and Barbacid, M. (1992).

- DTrk, a Drosophila gene related to the Trk family of neurotrophin receptors, encodes a novel class of neural cell adhesion molecule. *EMBO J.* **11**, 391-404.
- Satoh, G., Wang, I., Zhang, P. and Satoh, N.** (2001). Early development of amphioxus nervous system with special reference to segmental cell organisation and putative cell precursors: a study based on the expression of pan-neuronal marker *Hu/elav*. *J. Exp. Zool.* **291**, 354-364.
- Segal, R. A.** (2003). Selectivity in neurotrophin signalling: theme and variations. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 299-330.
- Silos-Santiago, I., Fagan, A. M., Garber, M., Fritsch, B. and Barbacid, M.** (1997). Severe sensory deficits but normal CNS development in newborn mice lacking TrkB and TrkC tyrosine protein kinase receptors. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2045-56.
- Stach, T.** (1999). The ontogeny of the notochord of Branchiostoma lanceolatum. *Acta Zool. Stockholm* **80**, 25-33.
- Stucky, C. L., DeChiara, T., Lindsay, R. M., Yancopoulos, G. D. and Koltzenburg, M.** (1998). Neurotrophin 4 is required for the survival of a subclass of hair follicle receptors. *J. Neurosci.* **18**, 7040-7046.
- The C. elegans Sequencing Consortium** (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*, a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-2018.
- Trainor, P. A., Melton, K. R. and Manzanares, M.** (2003). Origins and plasticity of neural crest cells and their roles in jaw and craniofacial evolution. *Int. J. Dev. Biol.* **47**, 541-553.
- van Kesteren, R., Fainzilber, M., Hauser, G., van Minen, J., Vreugdenhil, E., Smit, A. B., Ibáñez, C. F., Geraerts, W. P. M. and Bulloch, A. G. M.** (1998). Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *EMBO J.* **17**, 2534-2542.
- Wiesmann, C., Ultsch, M. H., Bass, S. H. and de Vos, A. M.** (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* **401**, 184-188.
- Winberg, M. L., Tamagnone, L., Bai, J., Comoglio, P. M., Montell, D. and Goodman, C. S.** (2001). The transmembrane protein Off-Track associates with plexins and functions downstream of semaphorin signaling during axon guidance. *Neuron* **32**, 53-62.
- Zimmer, C.** (2000). In search of vertebrate origins, Beyond brain and bone. *Science* **287**, 1576-1579.

CAPÍTULO VI



Resultados

Resumen

Actualmente el cefalocordado anfióxico es ampliamente considerado el pariente vivo más cercano al ancestro de los vertebrados. La anatomía y el desarrollo de su sistema nervioso está mostrando ser instrumental para entender la organización básica del sistema nervioso cordado, previa al incremento de la complejidad asociada al origen de los vertebrados. En este trabajo se analiza la expresión del marcador neuronal *AmphiElav* a lo largo del desarrollo embrionario del anfióxico americano (*Branchiostoma floridae*). *AmphiElav* se expresa en el cordón nervioso en formación, con una dinámica temporal y espacial estrechamente correlacionada con la diferenciación neuronal en este tejido. Además, a partir de las etapas intermedias de neurulación, *AmphiElav* se expresa en células epidérmicas individuales, probablemente correspondientes a neuronas sensoriales. Junto al patrón de expresión reportado para otros marcadores neuronales, en este trabajo se discute la relevancia evolutiva de los precursores neuronales ectodérmicos en relación al origen de algunas de las innovaciones más significantes de los vertebrados, la aparición de la cresta neural y las placodas.

Outlining the nascent nervous system of *Branchiostoma floridae* (amphioxus) by the pan-neural marker *AmphiElav*

Èlia Benito-Gutiérrez^a, Margarita Illas^a, Joan X. Comella^b, Jordi Garcia-Fernàndez^{a,*}

^a *Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, E-08028 Barcelona, Spain*

^b *Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Av. Rovira Roure 44, E-25198 Lleida, Spain*

Available online 2 April 2005

Abstract

The cephalochordate amphioxus is the closest living relative of the vertebrates. The anatomy and development of the amphioxus nervous system is giving insights into the basic chordate neural organisation, prior to the increase in neural complexity that characterised the origin of vertebrates. We have analysed the expression of the pan-neural marker *AmphiElav* in the Florida lancelet (*Branchiostoma floridae*) through development and up to larval stages. *AmphiElav* is expressed in the developing neural tube with particular temporal and spatial dynamics that correlate with neuronal differentiation. In addition, *AmphiElav* is expressed in isolated epidermal cells from mid-neurula embryos. This epidermal expression probably corresponds to precursors of sensory neurons. Together with data from other neural markers, we discuss the evolutionary relevance of these neural precursors to the origin of some of the most dramatic vertebrate inventions, neural crests and placodes. © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Sensory neurons; Neural crests; Placodes; Vertebrate innovations

1. Introduction

Comparative anatomy and embryology places the cephalochordate amphioxus at a privileged position for illuminating the origins of vertebrates. Cephalochordates are the closest living relatives of the vertebrates [15], retaining similarities to the extinct ancient chordate ancestor *Pikaia* [8]. Amphioxus is vertebrate-like in possessing a dorsal hollow nerve cord, notochord, segmented muscles, pharyngeal gill slits and a post anal tail. Amphioxus, however, lacks neural crest cells, placodes, and endoskeleton. The simplicity of the amphioxus body plan is mirrored by the simplicity of its genome: it escaped the extensive gene duplication events that took place coincidentally with the origins of vertebrates and the early stages of vertebrate evolution [2]. As a rule, for a given gene family in vertebrates (containing a few related genes), amphioxus possesses a single pro-orthologue representative. Interestingly, the neural tube of amphioxus is devoid of overt segmentation. In recent years, however,

the use of molecular markers has revealed homologous relationships between regions of the amphioxus and vertebrate nervous systems (reviewed in [5]). Moreover, whether the chordate ancestor had a tripartite brain is still under controversy (see [13] for a recent update). Although territorial markers have been widely used to infer homologies in the central nervous system, data on the amphioxus peripheral nervous system is scarce. In vertebrates, such cells develop from the vertebrate-exclusive neural crest cells and sensory placodes. In amphioxus, distinct classes of epidermal sensory cells have been identified, thought to be mechanoreceptor and chemoreceptor neurons, probably developed directly from the epidermis [1,4,7]. In order to follow the timing and location of neuronal differentiation in the central and peripheral nervous system in amphioxus, we have analysed the expression pattern of *AmphiElav*, a pan-neural marker, during embryonic and larval stages of the Florida lancelet, *Branchiostoma floridae*. The Elav/Hu gene family is composed of four members in vertebrates. They are expressed in proliferating neuroblasts and postmitotic neurons, and are required for neuronal differentiation in a wide range of animals [11]. Here we describe the temporal and spatial expression profile

* Corresponding author. Tel.: +34 934034437; fax: +34 934034420.
E-mail address: jordigarcia@ub.edu (J. Garcia-Fernàndez).

of *AmphiElav* through development, and discuss the evolutionary implications of epidermal *AmphiElav* positive cells.

2. Materials and methods

Ripe *B. floridae* adults were collected from Old Tampa Bay (Florida, USA). In vitro fertilisation, embryo culture, fixation and in situ hybridisations were performed as described in [3]. Antisense DIG-labelled probes were generated by in vitro transcription of an *AmphiElav* cDNA clone identified in a *B. floridae* EST survey [10]. Embryos were imaged and photographed using a Zeiss Axiophot microscope prior to sectioning. Whole mount in situ were contrasted in 1% Ponceau S-acetic acid and embedded in Spurr's resin. 3 µm serial sections were cut with a glass knife and mounted for photography.

3. Results

Expression of *AmphiElav* was examined by whole-mount in situ hybridisation on *B. floridae* embryos. Transcripts are first detected in the neural plate of the late gastrula (Fig. 1A) and restricted to this territory until the early neurula stage (Fig. 1B,C). A dorsal view shows the expression all over the entire area comprising the early neural plate (Fig. 1A,C). Later in neurulation (Fig. 1D–J) *AmphiElav* expression continues in the neural plate, but transcripts are clearly excluded from the most anterior and posterior parts. The positive cells are distributed in two rows (Fig. 1E, dorsal view), corresponding to the right and left sides of the neural tube. An antero-posterior periodicity of strong hybridising cell clusters becomes evident, revealing molecular segmentation within the neural tube (Fig. 1E). Cross sections localise the expressing cells throughout the dorsoventral extent of the neural tube (Fig. 1J). Noticeably, *AmphiElav* transcripts are not detected in the floor plate. At the early-mid neurula stage, *AmphiElav* is also upregulated in individual epidermal cells (Fig. 1D,F). Very few scattered positive cells are visible at this stage; these show clear cytoplasmic distribution of *AmphiElav* transcripts (Fig. 1F). As development proceeds the number of epidermal labelled cells increases in number in both sides of the embryos (Fig. 1G,H). At the late-neurula stage (Fig. 1H) the ventro-lateral expression is expanded to more dorsal territories within the epidermal layer. Cross sections (Fig. 1I,J) show that these isolated positive cells are present in (arrows) or just beneath (arrowhead) the epidermis. Once the cerebral vesicle has formed (26 h larva, Fig. 1K), *AmphiElav* is clearly detected in the posteriormost part of the structure. Along the antero-posterior axis, staining extends through the neural tube for two thirds of the total length of the larva. Although two defined rows of positive cells are apparent from a dorsal view (Fig. 1M), the periodicity of positive cell clusters is less evident at this stage. Staining in isolated epidermal cells is still evident when changing the focal plane in the same

larva (Fig. 1L) or in a dorsal view, where epidermal positive cells are arranged laterally to the neural tube (Fig. 1M, dots). Cross sections through distinct axial levels in K (Fig. 1N–P) show neural tube expression laterally (asterisks) and in isolated epidermal cells (arrows). In the anterior tip of the larva, positive cells appear in the epidermis. Based on their position, they may correspond to rostral sensory neurons [5]. Similar expression pattern is seen in 30 h larvae (Fig. 1Q); however, the number of epidermal positive cells is reduced. In larvae with three gill slits, only a few individual positive cells remain in the neural tube (Fig. 1T, arrowheads).

4. Discussion

The invertebrate/vertebrate transition was probably associated with an increase in the complexity of the central nervous system and the evolutionary origin of the neural crest cells and placodes, coincidentally with the availability of many nascent duplicated genes. In amphioxus, we used the single *AmphiElav* gene as a pan-neural marker to follow the genesis of neuronal populations through embryonic development, and facilitate comparison of sensory nervous system development between amphioxus and vertebrates. *AmphiElav* is expressed throughout the early forming neural plate, as well as during neural tube formation and early maturation, when it becomes restricted to rows of cells in the anterior two-thirds of the neural tube. *AmphiElav* becomes downregulated in the neural tube by larval stages, and only few individual cells in each side of the neural tube remain labelled after one week of development. Our expression data are in agreement with previous reports in young stages of *B. belcheri* [12], although a segmental arrangement of positive cells clusters associated with somite boundaries is not obvious. The expression of *AmphiElav* in the developing neural tube partially overlaps with that of other amphioxus neural markers: *neurogenin*, *FoxB*, *islet*, *Mnx* and *COE/EBF* [9], and is consistent with early expression of *AmphiElav* in dividing neuroblasts in the nascent neural plate, and latter in postmitotic neurons. Interestingly, most of the neural-specific genes analysed, including *AmphiElav*, are not expressed in the most posterior part of the embryonic neural tube. It has been suggested that this may be due to a late differentiation of neurons in caudal regions [14]. Our data in one week larva suggest that this late differentiation should occur very late, at least after one week of development, as only few cells, far anterior to the pigment spot, were stained at this stage for *AmphiElav*. Noticeably, *AmphiElav* is expressed from mid to late neurula, but also up to larval stages, in individual, scattered ectodermal cells. Our sections confirm they are in the epidermis, or just beneath it. The number of cells increases during development, although we cannot resolve whether *Elav*-positive cells are dividing and daughter cells are maintaining high levels of *Elav* expression, or whether the number of epidermal cells that upregulate *Elav* increases with time. In addition, our data cannot unambiguously

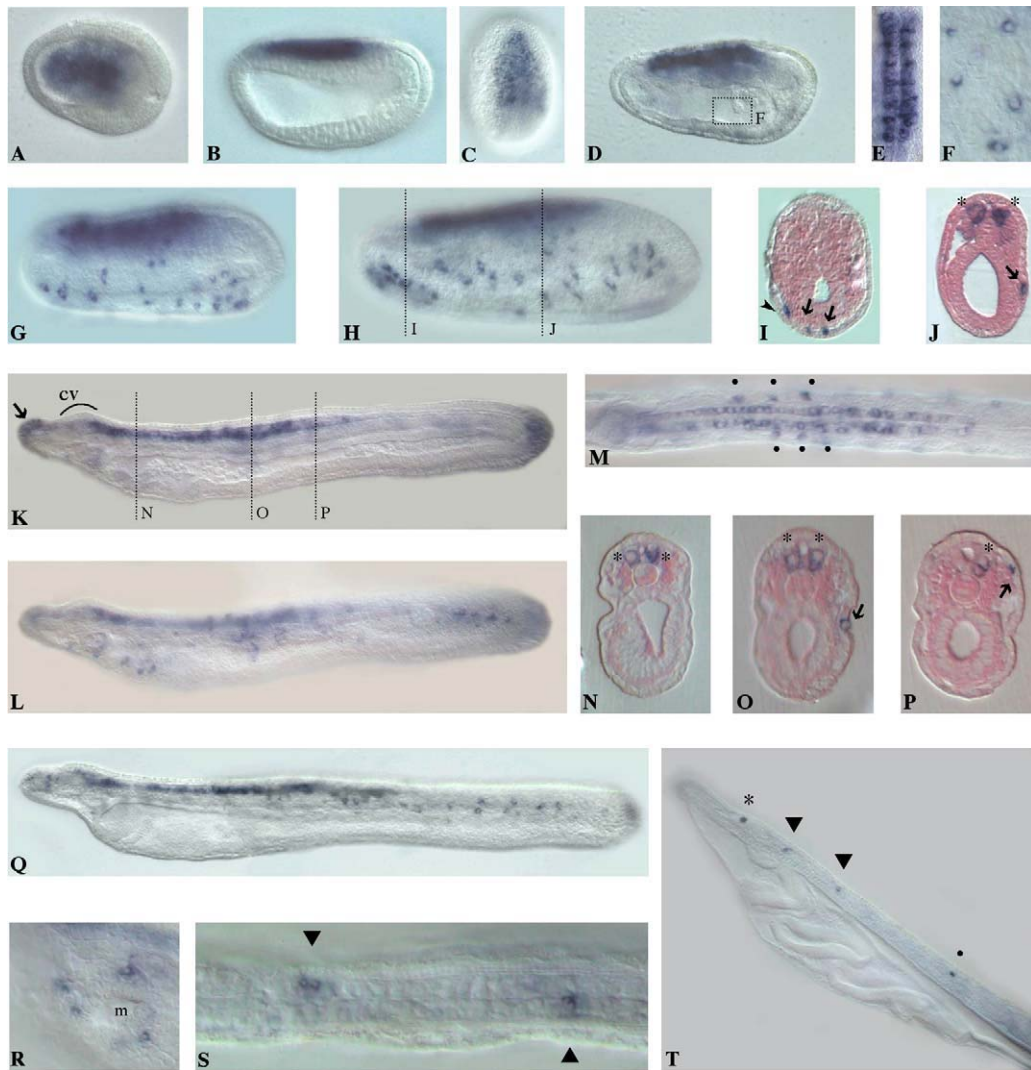


Fig. 1. *AmphiElav* expression throughout development detected by whole mount in situ hybridisation from gastrula to one-week larval stage. In all lateral views, the anterior is toward the left and the dorsal is at the top. (C), (E) and F are dorsal views with anterior at the top. (A) Dorsal view. Earliest *AmphiElav* expression is detected in the neural plate of the late gastrula. (B) Lateral view of an early neurula. (C) Dorsal view of (B) showing labelling in the early neural plate. (D) In early-mid neurula *AmphiElav* transcripts are first detected in the epidermis (out of focus). (E) Dorsal view of (D) showing clusters of positive cells in both sides of the neural tube. (F) Magnified view of the dotted rectangle in (D), showing labelled individual epidermal cells. (G) Mid-late neurula with increased number of *AmphiElav* expressing cells in the epidermis. (H) Late neurula epidermal expression stretches up to more dorsal territories. (I) Cross section through the first dotted line in (H) showing labelled cells in (arrow) or beneath (arrowhead) the epidermal layer. (J) Cross section through the second dotted line in (H) showing expression on both lateral sides of the neural tube (arrow) and in an isolated cell in the epidermis (arrow). (K) 26 h larva with expression in the neural plate, the most caudal portion of the cerebral vesicle (cv) and a patch of rostro-dorsal cells (arrow). (L) Epidermal view of (K) showing scattered positive cells. (M) Dorsal view of (K) showing labelling in the neural tube and the dorsalmost epidermal cells (dots). (N–P) Cross sections through distinct axial levels in K showing, in addition to the neural tube, a mid-lateral (arrow in (O)), and a dorsal (arrow in (P)) epidermal positive cell. (Q) 30 h larva with reduced number of epidermal positive cells. (R) Detail of epidermal labelled cells around the opening mouth (m). (S–T) One week larva. Dorsal (S) and lateral views (T) show few cells expressing *AmphiElav* in the neural tube (black triangles) (asterisk, frontal eye; dot, pigment spot).

reveal whether these cells are migrating dorsally, although later stage embryos seem to have *Elav* positive cells in dorsal positions that were devoid of positive cells in earlier stages. Recently, Mazet et al. [9] reported expression of *AmphiCOE/EBF* in isolated epidermal cells, although in two to four times less numbers than *AmphiElav*. *AmphiElav* is probably marking sensory neuronal precursors that will later develop into the distinct epidermal sensory cells of the larva and adult [6]. Mazet et al. [9] also reported the presence

of cells with neuronal morphology located at least partially beneath the epidermis of the late neurula. A possibility to explore is whether *AmphiCOE/EBF* positive cells are a subset of *AmphiElav* positive cells; perhaps the latter gene is expressed in all neuronal sensory precursor, while the former gene is expressed in such subset differentiating to a particular type of sensory cell. Neural crests and placodes were crucial to the advent of vertebrates. Positional coding informed by Hox and other regulatory genes are acting in

vertebrate neural crest derivatives [14]. Excitingly, some Hox genes in amphioxus are also expressed in epidermal cells with delimited anterior limits [5]. Further work is needed to characterise the processes underlying the formation of the epidermal neural system in amphioxus. However, we suggest that neuronal differentiation in the epidermis may be a primitive feature with evolutionary links to the origin of neural crests and placodes in the lineage leading to vertebrates.

Acknowledgements

We thank Dr. Georgia Panapoulou for providing the *AmphiElav* clone and Prof. S. Pierce for laboratory space in the University of South Florida. We also thank P.W.H. Holland for critical reading and suggestions on the manuscript. This work was funded by grants 98510 (Fundació La Marató de TV3), BMC2002-03316 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain), HPRN-CT-2002-00263 (European Community's Human Potential Programme), and by the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Distinció per la Promoció de la Recerca Universitaria to JXC and JGF).

References

- [1] E. Baatrup, Primary sensory cells in the skin of amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*, *Acta Zool.* 62 (1981) 147–157.
- [2] R.F. Furlong, P.W.H. Holland, Were vertebrates octoploid? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 357 (2002) 531–544.
- [3] P.W.H. Holland, Wholemout in situ hybridization to amphioxus embryos. *Methods in molecular biology*, in: P.T. Sharpe, I. Mason (Eds.), *Molecular Embryology: Methods and Protocols*, vol. 97, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1999, pp. 641–644.
- [4] N.D. Holland, J.K. Yu, Epidermal receptor development and sensory pathways in vitally stained amphioxus (*Branchiostoma floridae*), *Acta Zool. Stockh.* 83 (2002) 309–319.
- [5] L.Z. Holland, V. Laudet, M. Schubert, The chordate amphioxus: an emerging model organism for developmental biology, *Cell. Mol. Life Sci.* (2004), in press.
- [6] T.C. Lacalli, New perspectives on the evolution of protochordate sensory and locomotory systems, and the origin of brains and heads, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356 (2001) 1565–1572.
- [7] T.C. Lacalli, T.H.J. Gilmour, S. Hou, A reexamination of the epithelial sensory cells of amphioxus (*Branchiostoma*), *Acta Zool.* 80 (1999) 125–134.
- [8] J. Mallatt, J.Y. Chen, Fossil sister group of craniates: predicted and found, *J. Morphol.* 258 (2003) 1–31.
- [9] F. Mazet, S. Masood, G.N. Luke, N.D. Holland, S.M. Shimeld, Expression of *AmphiCoe*, an amphioxus COE/EBF gene, in the developing central nervous system and epidermal sensory neurons, *Genesis* 38 (2004) 58–65.
- [10] G. Panapoulou, S. Hennig, D. Groth, A. Krause, A.J. Poustka, R. Herwig, M. Vingron, H. Lehrach, New evidence for genome-wide duplications at the origin of vertebrates using an amphioxus (*Branchiostoma floridae*) gene set and completed animal genomes, *Genom. Res.* 13 (2003) 1056–1065.
- [11] N. Perrone-Bizzozero, F. Bolognani, Role of HuD and other RNA-binding proteins in neural development and plasticity, *J. Neurosci. Res.* 68 (2002) 121–126.
- [12] G. Satoh, Y. Wang, P. Zhang, N. Satoh, Early development of amphioxus nervous system with special reference to segmental cell organization and putative sensory cell precursors: a study based on the expression of pan-neuronal marker gene *Hu/elav*, *J. Exp. Zool.* 291 (2001) 354–364.
- [13] T. Takahashi, P.W.H. Holland, Amphioxus and ascidian *Dmbx* homeobox genes give clues to the vertebrate origins of midbrain development, *Development* (2004), in press.
- [14] P.A. Trainor, K.R. Melton, M. Manzanares, Origins and plasticity of neural crest cells and their roles in jaw and craniofacial evolution, *Int. J. Dev. Biol.* 47 (2003) 541–553.
- [15] H. Wada, N. Satoh, Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18S rDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 1801–1804.

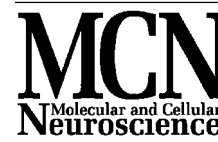
CAPÍTULO VII



Resultados

Resumen

Entre los numerosos receptores tirosina quinasa hasta la fecha identificados, aquellos incluidos dentro de la familia Trk están destacadamente involucrados en el desarrollo de los caracteres complejos que definen el sistema nervioso de vertebrados. La ausencia del sistema Nt/Trk en invertebrados ha liderado la creencia generalizada de que éste constituye una de las innovaciones de los vertebrados. Datos recientes han desafiado dicha idea con la identificación de un receptor Trk canónico en un invertebrado cefalocordado. Este trabajo revisa y discute la historia evolutiva de la familia de receptores Trk y plantea un plausible escenario en el que el origen de este sistema antecede al origen de los vertebrados. Un único gen *ProtoTrk*, del que deriva toda una familia génica en vertebrados, fue probablemente generado por el barajado de exones preexistentes en genes ancestrales, dando lugar a la combinación única de dominios que caracteriza actualmente a los receptores Trk. Así, en el curso de la evolución, este único gen habría sido substrato de mutaciones y duplicaciones génicas, que junto con el reclutamiento diferencial de un sistema Nt/Trk primitivo en distintos territorios, habría constituido una herramienta esencial para la elaboración del complejo sistema nervioso de vertebrados.



www.elsevier.com/locate/ymcne
Mol. Cell. Neurosci. xx (2005) xxx – xxx

Origin and evolution of the Trk family of neurotrophic receptors

Èlia Benito-Gutiérrez,^{a,*} Jordi Garcia-Fernández,^a and Joan X. Comella^{b,*}

^aDepartament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 645, Barcelona E-08028, Spain

^bDepartament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, C/Montserrat Roig 2, Lleida E-25008, Spain

Received 8 July 2005; revised 11 August 2005; accepted 8 September 2005

Among the numerous tyrosine kinase receptors, those belonging to the Trk family are distinctively involved in the development of complex traits within the vertebrate nervous system. Until recently, the lack of a proper Nt/Trk system in invertebrates has led to the belief that they were a vertebrate innovation. Recent data, however, have challenged the field, and proved that bona fide Trk receptors do exist in invertebrates. Here, we review and discuss the evolutionary history of the Trk receptor family, and draw a comprehensive scenario that situates the origin of the Nt/Trk signalling prior to the origin of vertebrates. Probably, a ProtoTrk receptor was invented by means of domain and exon shuffling from pieces of ancient genes, generating the unique combination of domains found in extant Trk receptors. It is suggestive to propose that subtle protein mutations, gene duplications, and co-options in particular territories of a primitive Nt/Trk system were instrumental to the development of a complex vertebrate nervous system.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

Introduction	0
The Nt/Trk signalling system	0
Basic concepts	0
Refined tuning of Trk activity	0
Vertebrate Trk receptors: function and phylogenetic distribution	0
Trk surveys in vertebrates	0
Trk function in vertebrate specific territories and organs	0
An update of invertebrate Trk-related receptors	0
Overview of invertebrate receptors	0
The moluscan Trk-like receptors	0

The amphioxus Trk receptor: illuminating the birth of the Nt/Trk system at the invertebrate/vertebrate transition	0
AmphiTrk is a Trk receptor	0
Ancestral role of the Trk receptor	0
Domain bricolage and exon shuffling to build a Trk receptor	0
Evidences of exon shuffling	0
Domain bricolage	0
Caveats	0
Conclusions and prospectives	0
Acknowledgments	0
References	0

Introduction

Everyday, Earth witnesses a dramatic battle for survival between animals. Intelligent and resourceful predators make use of complex brains, highly adapted sense organs, and rapid motor responses to chase their prey, whose complex brains, highly adapted sense organs, and rapid motor responses desperately aim to escape from a painful death.

The sophistication of this life theatre is to be found in higher vertebrates, which possess a highly complex nervous system. Nervous system complexity is hard to define in a simple manner, although some features can be correlated with the complexity of the vertebrate nervous system. High neuronal number and diversity, together with the ability of neurons to establish at the same time multiple, but distinctly modulated, interconnections, are several of the traits that distinguish the vertebrate nervous system from their invertebrate relatives.

The molecular basis underlying such complexity is a major task of research in Neurosciences in the XXI century, and will be probably resolved only by an integrative, systems biology approach, that combines genetics, genomics, proteomics, and physiology. However, the pioneer finding of neurotrophins by Rita Levi Montalcini more than 50 years ago lighted the way of identifying a genetic system which contributes significantly to

* Corresponding authors. È. Benito-Gutiérrez is to be contacted at fax: +34 934034420. J.X. Comella, fax: +34 973702438.

E-mail addresses: eliabenito@ub.edu (È. Benito-Gutiérrez), joan.comella@cmb.udl.es (J.X. Comella).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

this complexity. Neurotrophins and their tyrosine kinase Trk receptors play an essential role in the development and maintenance of the vertebrate nervous system, where they regulate neuronal survival, axonal growth, and guidance, synaptic plasticity, and long-term potentiation events (Huang and Reichardt, 2001; Poo, 2001).

Until recently, the evolutionary emergence of the Nt/Trk system had remained obscured, and it has been a subject of debate whether its origin was coincidental or not with the origin of vertebrates (Jaaro et al., 2001). Here, we summarize recent findings in the field, coming from genome surveys and gene hunting in selected invertebrate species, and draw a comprehensive evolutionary scenario that situates the origin of the Nt/Trk signalling prior to the origin of vertebrates. Most probably, a ProtoTrk receptor was invented by means of domain and exon shuffling from pieces of ancient genes, generating the unique combination of domains found in extant Trk receptors. Then subtle protein mutations, gene duplications, and co-options in particular territories allowed the formation of specific and distinct functions in selective neuronal populations during the evolutionary elaboration of the vertebrate nervous system.

The Nt/Trk signalling system

Basic concepts

Historically, tyrosine kinases (TK) define the prototypical class of protooncogenes involved in most forms of human malignancies, due to their critical roles in the regulation of multicellular aspects of the organism. Stereotypically, the first Trk receptor was initially discovered as an oncogene product of the *trk* gene (tropomyosin-related kinase), a chimeric tyrosine kinase oncoprotein present in a human colon carcinoma (Martin-Zanca et al., 1986). The ulterior characterization of the protooncogene counterpart (TrkA) and two additional sibling genes (TrkB and

TrkC) (Martin-Zanca et al., 1989; Klein et al., 1989; Lamballe et al., 1991) allowed the foundation of a new subfamily of TK receptors. Currently, the three-member Trk family of neurotrophin receptors is one of the 20 subfamilies grouping the 58 genes coding for TK receptors in the human kinome (Robinson et al., 2000). Among these 58 genes, Trk receptors have unique structural features and are broadly expressed in the central and peripheral nervous systems, where their actions are particularly diverse and complex.

Trk receptors are cell surface transmembrane proteins that possess an intrinsic, ligand-sensitive, tyrosine kinase activity. All TrkA, TrkB, and TrkC share a common organization at both extracellular and intracellular levels. Their extracellular domain exhibits two distinct subsets of cell adhesion-related motifs: at the amino-terminal end, arrays of leucine-rich motifs (LRM) are flanked by two cysteine clusters (Fig. 1). Next to the second cysteine cluster, two consecutive immunoglobulin-like domains, of the C2 type, stretch down to a single transmembrane domain. Facing the inner side of the cell membrane, Trk receptors display a tyrosine kinase domain followed by a short carboxy-terminal extension. While their TK domain shares a similar topology with other TK receptors, specific features allow their classification into the class II of TK receptors, defined by the presence of the consensus sequence [DN]-[LIV]-x (3)-Y-Y-R (Prosite PDOC00212).

The key presence of Ig-like C2 domains, within their extracellular part, enables Trk receptors to bind specifically distinct members of the NGF family of neurotrophins (Nt). In particular, the second Ig-like C2 domain is the major interface for Nt binding and selectivity, controlling TrkA, TrkB, and TrkC responsiveness to NGF, BDNF or NT4/5, and NT3, respectively (Perez et al., 1995; O'Connell et al., 2000; Arevalo et al., 2001). Apart from their critical role on ligand-receptor binding, Ig-like C2 domains prevent uncontrolled auto-activation of Trk receptors, probably by reciprocal repulsion of the monomeric forms up to ligand binding. Other extracellular domains also exert

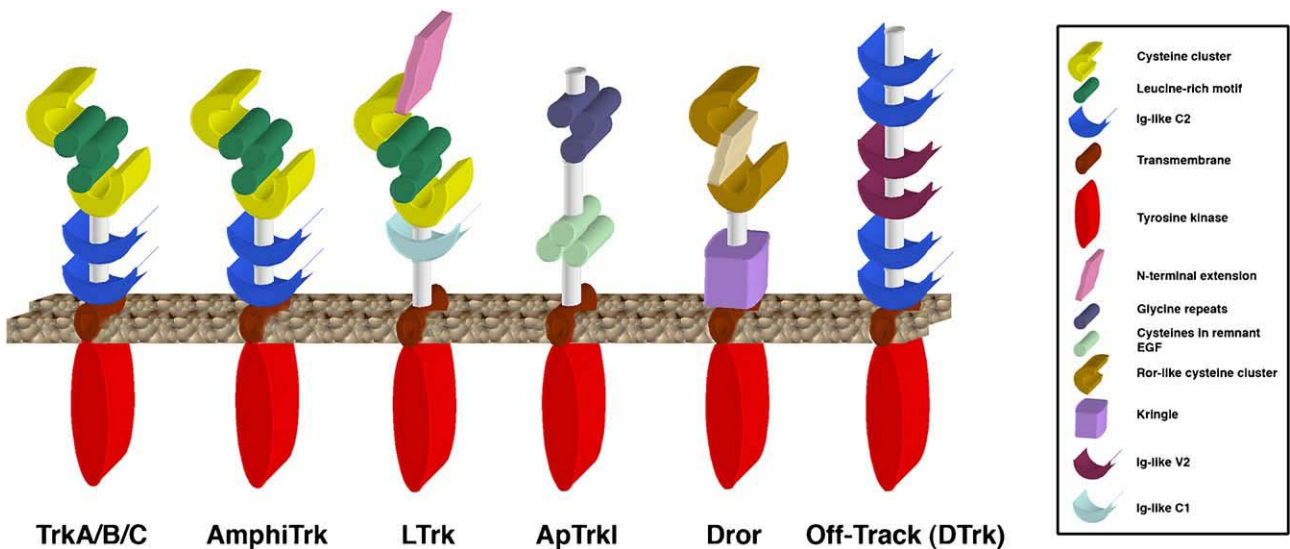


Fig. 1. Domain structure of vertebrate and invertebrate Trk and Trk-related receptors. Invertebrate representatives [*Lymnaea*: LTrk; *Aplysia*: ApTrkI; *Drosophila*: Dror, Off-Track (DTrk)] show disparities from the canonical domain composition and arrangement, in their extracellular portion. The domain structure of the amphioxus receptor (AmphiTrk) totally parallels that of all vertebrate receptors (TrkA, TrkB, TrkC) at both extracellular and intracellular levels. Protein modules shapes and color codes are described in the right side panel. The longitudinal bar represents the cytoplasmic membrane separating the extracellular domains (up) from the intracellular, tyrosine kinase domain (down).

important regulatory effects on Trk catalytic activity, since deletion of the entire extracellular domain greatly affects diverse Trk activities other than proliferation (Arevalo et al., 2000).

From a genetic point of view, the receptor–ligand system used by Trk receptors to generate diverse effects is relatively simple. Indeed, the basics of Trk receptors activation do not greatly differ from that of other TK receptors, since oligomerization is generally induced by ligand binding, inducing a reciprocal phosphorylation of their partners' tyrosine residues within the autophosphorylation loop, also denominated activation loop. Likewise, neurotrophin-induced dimerization of Trk receptors results in receptor auto-transphosphorylation and rapid generation of phosphorylated docking sites for adaptor cytoplasmic proteins. As a common denominator, proteins attracted by tyrosine phosphorylated residues, are those containing PTB (phosphotyrosine binding) and/or SH2 (Src homology 2) domains. The best characterized adaptor proteins for Trk receptors are Shc and Frs2, both interacting with the phosphorylated Trk Y490 residue, enclosed within the NPXY motif. These interactions initiate downstream phosphorylation cascades centrally activating the Ras/Raf/Erk and the PI3K/AKT pathways, ascribed to the classical NT/Trk-promoted neuronal survival and differentiation biological effects. A second major site of tyrosine phosphorylation occurs at the further C-terminus of the receptor, outside of the tyrosine kinase domain, where the Y785 residue recruits, via SH2 domain binding, the PLC γ protein leading into the most complex effects produced by the NT/Trk system, the modulation of synaptic plasticity.

Refined tuning of Trk activity

In spite of this apparent simplicity, the Nt/Trk system integrates more than a set of few ligand-receptor genes and three signalling pathways. The competence of a Trk receptor to convey appropriate signals to the inside of the cell is finely regulated by additional factors, summing up multiple levels of complexity.

Strikingly, the distinct Trk receptors do not signal identically after ligand binding. Depending on the neuronal background where the receptor is expressed, concrete pathways are switched on to activate a same biological process or alternative pathways with unusual consequences (Atwal et al., 2000). Competition of substrates or target proteins for binding or for being recruited may well be a mode of downstream control by Trk receptors (Lee et al., 2001). In this regard, subcellular localization of assorted proteins is important in terms of availability of the interacting parts. Differences in the turnover of each receptor in distinct neuronal cell types are also determining Trk responsiveness to neurotrophins. Conversely, the repertoire of endogenous Trk receptors expressed by a particular neuron predicts the set of neurotrophins able to elicit a response (Huang and Reichardt, 2003). Besides, Trk receptors signalling specificity is greatly affected by subtle differences in the amino acid sequence of each of the three receptors. Particularly, alternative splicing plays a crucial role in ligand discrimination. The presence of short amino acid strings in the juxtamembrane portion of each receptor, encoded by a facultative exon, encourages promiscuous Nt/Trk relationships (Clary and Reichardt, 1994; Strohmaier et al., 1996). Alternatively, insertions within the tyrosine kinase domain of some Trk isoforms may adversely affect their catalytic abilities. This has been suggested to influence and modulate the strength of downstream signalling pathways (Tsoulfas et al., 1996).

Truncated Trk isoforms are also produced naturally. Some hints on isoforms lacking the tyrosine kinase domain indicate that they may act as negative regulators of full length receptors, by forming non-productive heterodimers (Palko et al., 1999), or positive regulators, by presenting Nt to neurons expressing the full length variant (Stoilov et al., 2002). Despite the absence of a kinase domain, TrkB and TrkC truncated isoforms have been shown to signal after Nt binding when they are not co-expressed with their full-length variants. BDNF stimulation of either TrkBT1 or TrkBT2 induces changes in cell physiology and glial morphology, by coupling to alternative signalling cascades, via direct intracellular interaction with other proteins, as for example RhoGDI1 or TTIP (Baxter et al., 1997; Kryl and Barker, 2000; Rose et al., 2003; Ohira et al., 2005). Likewise, Nt-3 stimulation of truncated TrkC receptors promotes neuronal differentiation but only in the presence of the pan-neurotrophin receptor p75 (Hapner et al., 1998).

The timing of ligand binding is particularly important in the control of synaptic transmission by the Nt/Trk system (Blum and Konnerth, 2005). Short pulses of NGF or BDNF induce the insertion of sodium channels in the plasma membrane and may boost up PLC γ activation (Toledo-Aral et al., 1995; Segal, 2003), generating long-term potentiation events. Accumulating evidences indicate that Trk trafficking also plays a key role in Nt/Trk-mediated effects not only during development but also in the mature nervous system (Chao, 2003; Kuruvilla et al., 2004). Additionally, Trk receptors actions are crucially modulated by the absence or presence of the unique pan-neurotrophin receptor p75, as shortly mentioned above, which enables agonistic or antagonistic effects on Trk signalling. The wide and complex roles of p75 will not be further discussed here, and recent comprehensive reviews may be found elsewhere (Dechant and Barde, 2002; Bronfman and Fainzilber, 2004; Bandtlow and Dechant, 2004; Yamashita et al., 2005).

Vertebrate Trk receptors: function and phylogenetic distribution

Trk surveys in vertebrates

In the past 10 years, mice have provided the main source of information on Trk structure and function. The valuable data obtained from Trk-deficient mice point up the importance of the Nt/Trk system to build a complex nervous system. Comparable conclusions come from the characterization of these receptors and their ligands in a number of vertebrates, not only mammals, but also birds, amphibians, and fishes. A combination of bioinformatics tools and experimental evidences has contributed to expand the knowledge on the Trk receptors distribution among the major vertebrate groups (Fig. 2). The most basal living vertebrates are the jawless hagfish and lampreys (Agnatha). Vertebrates with jaws are called Gnathostomes and are divided into two groups: Chondrichthyes (cartilaginous fishes: sharks and rays) and Osteichthyes. The osteichthyans are in turn divided into the Actinopterygians (bonny ray-finned fish or teleosts, such as zebrafish and pufferfish) and the sarcopterygians (the coelacanth and tetrapods). Mammals are tetrapods, as are amphibian, reptiles, and birds.

Trk receptors have been identified in the genomes of placental (dog, *Canis familiaris*), cow (*Bos taurus*), chimpanzee (*Pan*

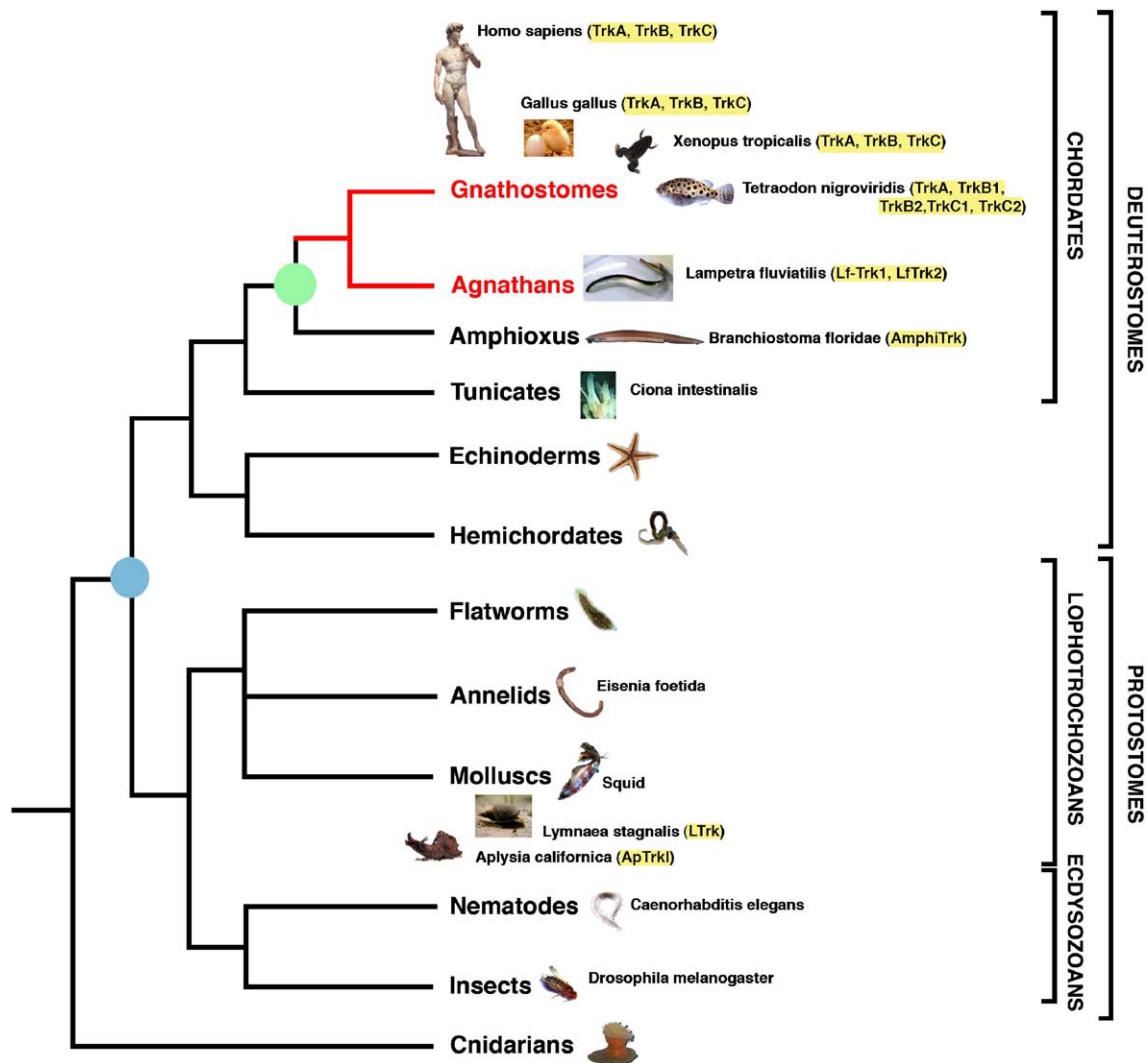


Fig. 2. Major animal groups and their evolutionary relationships. Invertebrate branches are shown in black. Vertebrates (Gnathostomes and Agnathans) are shown in red. Selected animals and Trk and Trk-like receptors discussed in the text are indicated. The green dot shows a proposed origin of the Trk family, just predating the amphioxus (Cephalochordates)/vertebrate split. The alternative scenario discussed in the text, in which Trk receptor originated before the Protostomes and Deuterostomes, is indicated by a blue dot.

troglydytes), and non-placental mammals (short-tail opossum *Monodelphis domestica*), and in the pufferfishes tetraodon (*Tetraodon nigroviridis*) and fugu (*Fugu rubripes*) (see Table 1). All of them share the same structure in both extracellular and intracellular domains. In all these organisms Trk A, B, and C maintain an orthologue relationship, since they respectively share a common ancestor by speciation. The main exception lies on teleost fishes, as illustrated by the zebrafish genome where five Trk receptors were isolated (Martin et al., 1995). Based on tyrosine kinase domain comparisons of the zebrafish and mammalian receptors, one of the fish genes was most related to TrkA, two to TrkB, and the remaining two to TrkC, so they were accordingly named zfTrkA, zfTrkB1, zfTrkB2, zfTrkC1, and zfTrkC2. Consistently, the correspondence between the zebrafish and the mammalian receptors was maintained when analyzing their extracellular domains, except for the zfTrkA, which extracellular domain is yet unknown. In the recently fully sequenced genome of the pufferfish Tetraodon, there are also five Trk receptors, one of the A class, and 2 of each B and C classes. This situation correlates

well with the doubling of the genome that occurred early during the evolution of teleost fishes (Chiu et al., 2004), and implies that one of the duplicated TrkA genes was lost early in the fish lineage. In higher vertebrates, the only missing link resides in reptilians where the Nt/Trk system has been poorly characterized. Few attempts have been performed by Trk immunoreactivity in the gut and kidney of the lizard *Podarcis sicula*, and in the retina of the turtle *Pseudemys* (Lucini et al., 2001; De Girolamo et al., 2004; Cellerino and Kohler, 1997). However, the only conclusive results on the presence of an Nt/Trk system in reptilians are the isolation of neurotrophin genes in the viper (Nt4) (Hallböök et al., 1991) and the snakes *Bungarus multicinctus* and *Agkistrodon halys* Pallas (NGF) (Danse and Garnier, 1993; Guo et al., 1999).

In lower vertebrates (agnathans), the better-characterized Nt/Trk system is that of the lamprey *Lampetra fluviatilis*, where one neurotrophin (Lf-NT) and two Trk receptors, Lf-Trk1 and Lf-Trk2, were isolated by a degenerate PCR approach (Hallböök et al., 1998). Only a neurotrophin fragment, Mg-Nt, was isolated in the hagfish *Mixine glutinosa* (Hallböök et al., 1998). However, full

Table 1
Vertebrate Trk receptors genes

Species name	Gene identifier ^a /accession number ^b	Trk type
<i>Homo sapiens</i>	ENSG00000198400	A
	ENSG00000148053	B
	ENSG00000140538	C
<i>Canis familiaris</i>	ENSCAFG00000016528	A
	ENSCAFG00000001380	B
	ENSCAFG000000011457	C
<i>Mus musculus</i>	ENSMUSG00000028072	A
	ENSMUSG00000005254	B
	ENSMUSG000000059146	C
<i>Gallus gallus</i>	ENSGALG00000013253	A
	ENSGALG00000012594	B
	ENSGALG00000006793	C
<i>Pan troglodytes</i>	ENSPTRG00000001478	A
	ENSPTRG000000021064	B
	ENSPTRG000000007418	C
<i>Rattus norvegicus</i>	ENSRNOG00000013953	A
	ENSRNOG000000018839	B
	ENSRNOG000000018674	C
<i>Xenopus tropicalis</i>	ENSXETG00000018040	A
	ENSXETG000000011726	B
	ENSXETG000000021221	C
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	GSTENG00019520001	A
	GSTENG00014464001	B
	GSTENG00029370001	B
	GSTENG00022390001	C
	GSTENG00022402001	C
<i>Fugu rubripes</i>	SINFRUG00000120767	A
	SINFRUG00000135558	B
	SINFRUG00000123069	B
	SINFRUG00000121403	C
	SINFRUG00000141138	C
<i>Danio rerio</i>	S78348 ^c	A
	XM693697 ^c	B
	ENSDARG000000006218	B
	XM687841 ^c	C
	XM693544 ^c	C
<i>Lampetra fluviatilis</i>	AF071435 ^c	Trk1
	AF071434 ^c	Trk2

^a Gene identifiers from Ensembl (<http://www.ensembl.org>).

^b Accession numbers from GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

^c mRNA sequences.

characterization of the Nt/Trk complement in jawless vertebrates is still incomplete, since no information is available from the extracellular domains of the lamprey receptors, and hagfish receptors have not been yet identified.

Trk function in vertebrate specific territories and organs

Among vertebrates, Trk receptors are broadly expressed in the peripheral and central nervous systems although at a lesser extent also in non-neural tissues. From an evolutionary perspective, their expression in the neural crest and its derivatives, which are exclusive vertebrate features, is noteworthy. The neural crest gives rise to an astonishing number of cell types and contributes either directly, by providing cells, or indirectly, by induction, to a vast number of both neural and non-neural tissues and organs (Hall, 1999). Neural crest itself and most of its derivatives express either the Trk receptors or their ligands at some point during development, as illustrated by conserved expression patterns in distinct vertebrate models (Lindsay, 1996; Bibel and Barde, 2000).

Consistently, early during development, Trk receptors are expressed in migrating neural crest cells (Airaksinen and Meyer, 1996) and later in all peripheral sensory neurons (Patapoutian and Reichardt, 2001). During gangliogenesis, Trk receptor expressions determine the neuronal composition of the sensory and sympathetic ganglia (Huang et al., 1999), which are able to integrate a variety of information from assorted sources.

The set of Trk receptors expressed by a neuron establishes its responsiveness to concrete neurotrophins. Co-expression or sequential expression of distinct Trk receptors during embryonic development, in particular neuronal populations, will lead to the differentiation of neuronal subtypes that subserve specific sensory modalities in the adult (Ernfors, 2001). Extensive cell death is a naturally occurring phenomena characteristic of the vertebrate nervous system development (Davies, 2003). Through neurogenesis, Trk activity is particularly visible during critical periods of innervation, in a target-derived mode, regulating neuronal numbers by inhibition of apoptosis. In this regard, Trk-deficient mice exhibit prominent neuronal losses in the trigeminal, nodose-petrosal, vestibular, cochlear, dorsal root, and superior cervical ganglia, as well as minor deficits within the central nervous system (Huang and Reichardt, 2001). In ovo manipulated chick embryos yielded similar conclusions to that derived from knockout mice (Hallböök et al., 1995), and the expression profiles of Trk receptors in zebrafish embryos and larvae are consistent with those described in tetrapods (Heinrich and Lum, 2000; Lum et al., 2001).

Interestingly, Trk receptors are also involved in distinctive features of particular vertebrates. They are expressed during tooth development (Luukko et al., 1996), which is a specific structure only present in jawed vertebrates, and in the anterior and posterior lateral line ganglia of zebrafish, solely present in fishes and amphibians (Martin et al., 1996). Trk receptors expression in the lamprey has been only studied in adult animals, where Lf-Trk1 and LfTrk2 transcripts are overlapped in the periventricular areas of the brain, olfactory bulbs, forebrain, hindbrain, spinal cord, and optic tectum (Hallböök et al., 1998). In contrast with higher vertebrates, jawless fishes do not have sympathetic ganglia and the nociceptive sensory system is poorly developed; however, Lf-Trk expression is found over cells of the reticular formation, which is considered to be an evolutionary old part of the vertebrate brain (Hallböök et al., 1998).

An update of invertebrate Trk-related receptors

Overview of invertebrate receptors

The term invertebrates include a diverse grouping of animal phyla, with an ancient evolutionary history (Fig. 2). They embrace non-vertebrate bilaterian animals (animals with antero-posterior, dorso-ventral, and lateral body axis) but also the primitive, radially symmetric early metazoans, as Cnidarians (corals, jellyfishes, and hydras). Modern molecular phylogeny divides higher bilaterians in two major groups, Protostomes and Deuterostomes, which originated in the so-called Cambrian Explosion, more than 550–600 million years ago. Protostomes include Lophotrochozoans (Platyhelminthes, Molluscs, and Annelids among other phyla) and Ecdysozoans (including Nematodes and Arthropods). Deuterostomes consist of Echinoderms (sea stars and urchins), Hemichordates, and Chordates. The phylum Chordates is characterized by the presence of a notochord and a dorsal nerve cord, and is

divided in three classes: Urochordates (ascidians), Cephalochordates (amphioxus), and Vertebrates.

Predating the genome-sequencing era, the first invertebrate tyrosine kinase receptor related to the Trk family of neurotrophic receptors was isolated in the fly *Drosophila melanogaster*. The initially denominated *Dtrk* (Pulido et al., 1992) and further renamed *Off-track* (Winberg et al., 2001) exhibits a tyrosine kinase domain slightly related to that of the vertebrate Trk receptors. However, its unrelated extracellular domain soon excluded it as belonging to the Trk family of TK receptors and functional analysis showed it as a component of the semaphorin-plexin signalling system. Soon after the isolation of *Dtrk*, Dror was proposed to be a fly neurotrophic receptor owing to its neural-specific expression and similarity to the tyrosine kinase domain of Trk receptor (Wilson et al., 1993), but its extracellular domain has no relation at all to vertebrate Trk receptors. Subsequently, the isolation of a *Drosophila* neurospecific receptor kinase, *Dnrk*, yielded similar conclusions (Oishi et al., 1997), again based on similarities along the tyrosine kinase domain. Indeed, vertebrate Ror receptors were originally identified on the basis of their similarity of their tk domain to that of vertebrate Trks (Masikowski and Carroll, 1992). Hanks classification of the membrane-spanning tyrosine kinase proteins groups Trk and Ror receptors in a single class, since among the different PTKs, their respective TKs are most similar between them than to any other PTKs (Hanks and Hunter, 1995). Congruously, the nematode *C. elegans* KIN-8 gene was barely mentioned as a distant tyrosine kinase receptor related to vertebrate Trk's, based on its resemblance with vertebrate Ror receptors (Koga et al., 1999).

Attempts to detect the presence of Trk receptors in earthworms (Annelid) and squid (molluscan cephalopod) have been done by antibody cross-reactivity. In both cases, TrkA, TrkB, and TrkC immunoreactivity was detected using polyclonal antibodies that map within the catalytic domains of the different Trk receptors, which misguidedly are conserved in distinct tyrosine kinase receptors. In the earthworm *Eisenia foetida*, anti-Trk antibody and anti-NGF antibody positive cross-reactivity was detected in the central and peripheral nervous system, as well as in epidermal cells and gut (Lucini et al., 1999; Davoli et al., 2002). Similarly, immunoreactivity using an antibody against TrkA was detected in the squid giant synapse (Moreno et al., 1998) and an anti-BDNF antibody immunoreacted in the silk moth brain. However, no bona fide genes have been isolated in these species and invertebrate lectins have been suggested as probable sources for cross-reactivity in antibody-based detection systems (Hahn et al., 1996).

After the completion of the Protostome *C. elegans*, *Drosophila*, and the Deuterostome Urochordate *Ciona intestinalis* genome sequences (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Adams et al., 2000; Dehal et al., 2002), the common feeling was that the Nt/Trk signalling system was a vertebrate innovation (Dehal et al., 2002; Chao, 2000) reinforcing the presumption that short-lived, small sized species would not require neurotrophic support for nervous system development or maintenance (Barde, 1994). In favor of this hypothesis, survival of neuronal cells during *Drosophila* development seems to be sustained by either physical contact of axonal projections or by the actions of EGFR ligands (Hidalgo, 2002).

The moluscan Trk-like receptors

Among invertebrates, moluscan Trk-related receptors merit particular consideration. The marine mollusc *Aplysia californica* is

able to modulate the excitability of its sensory neurons (Castellucci et al., 1986). Indirect evidences indicate that tyrosine kinases might be involved in these processes; however, tyrosine kinases are vast family of proteins widespread through metazoans, with important functions in all kinds of intercellular communication. Similarly to *Drosophila*, where neuronal survival does not require neurotrophic support (Hidalgo, 2002), Aplysia long-term facilitation (LTF) events seem to be essentially controlled by serotonin (5HT), either directly or by interactions with downstream components of 5HT (Purcell and Carew, 2001). After the puzzling finding that mammalian BDNF is able to enhance 5HT-induced LTF in Aplysia (Purcell et al., 2003), much effort to find a Trk receptor yielded into the isolation of ApTrk1 (Ormond et al., 2004). This recently isolated Trk-like receptor is expressed in sensory neurons, which are the locus for synaptic facilitation. While ApTrk1 tyrosine kinase domain is most similar to that of Trk receptors than to that of other TKs, its ectodomain and long intracytoplasmic C-terminal extension are totally unrelated to the Trk family of neurotrophic receptors (Ormond et al., 2004). Accordingly, ApTrk1 was not responsive to mammalian neurotrophins stimulation, but to 5HT, yet leaving an open window regarding the nature of the receptor which was able to respond to BDNF in previous studies.

On the other hand, the isolation of a Trk-related receptor, specifically expressed in the central nervous system of the snail *Lymnaea stagnalis* (Ltrk) (Bulloch et al., 2005) revolutionized the neurotrophic field, since this invertebrate tyrosine kinase receptor contains many of the features that characterize the vertebrate Trk receptors (van Kesteren et al., 1998). Ltrk is most similar to Trk receptors than to other tyrosine kinase receptors in its tyrosine kinase domain, but its extracellular pole does not totally fit with the canonical vertebrate structure. The LRM flanked by clustered cysteines are vertebrate-like structures; however, it possesses an N-terminal extension not found in any vertebrate Trk. Most importantly, Ltrk lacks both Ig-like domains, which in vertebrates are the major interface for neurotrophin binding (Wiesmann et al., 1999). Recent in silico analysis revealed that Ltrk exon number 6 might encode an Ig-like domain of the C1 type (Beck et al., 2004). In opposition to the Ig-like C2 domains present in the vertebrate Trk's, Ig-like domains of the C1 type are exclusively found in molecules involved in immune system function, such as immunoglobulins, major histocompatibility complex molecules, and T-cell receptors (PDOC50835). The finding that Ltrk specifically binds the mammalian Nt3 (van Kesteren et al., 1998) does not clarify the function of the predicted Ig-like C1, since Ltrk is not stimulated at all. Given that the leucine-rich motifs seem to play a discrete role in ligand binding (Ninkina et al., 1997), a plausible explanation is that Nt3 might be able to bind the leucine-rich motifs of Ltrk but unable to induce a favorable conformation of the receptor for its activation.

Although, the absence of invertebrate Nt genes is somewhat perplexing, since ectopic addition of vertebrate Nt mimics vertebrate Nt/Trk-mediated effects, as neuronal growth and synaptic facilitation, in some invertebrates (McKay et al., 1999). BDNF promotes neurite growth in the silk moth (Kim et al., 2005) and the molluscan Aplysia (Lee et al., 2003), and NGF in *Drosophila* (Hayashi et al., 1992), *Lymnaea* (Syed et al., 1996), and Aplysia (Gruenbaum and Carew, 1999). As mentioned above, BDNF is able to enhance long-term facilitation in Aplysia (Purcell et al., 2003). Conversely, the molluscan growth factor CRNF is able to bind the mammalian p75 (Fainzilber et al., 1996). Hence, the paradox is whether the receptors responding to vertebrate Nt are undiscovered invertebrate Trk molecules, or other related

tyrosine kinase receptors, as NMDA receptors, due to flexibility in the three-dimensional structure of ligand/receptor binding. Functional homology can be present at the level of three-dimensional structure, even in the absence of obvious amino acid sequence similarity (McKay et al., 1999).

The amphioxus Trk receptor: illuminating the birth of the Nt/Trk system at the invertebrate/vertebrate transition

AmphiTrk is a Trk receptor

Recently, the gap between invertebrate Trk-related and vertebrate Trk receptors has been challenged by the isolation of an invertebrate Trk receptor in the amphioxus (lancelet) *Branchiostoma floridae* (Benito-Gutiérrez et al., 2005). The denominated AmphiTrk parallels the structure of the three TrkA, TrkB, and TrkC vertebrate receptors, at both intracellular and extracellular levels (Fig. 1), and retains in position the key residues to act as a neurotrophic receptor. For the first time, strong evidences point to the existence of a rudimentary neurotrophic system in invertebrates, that possibly correlates to the acquisition of complex nervous systems at the invertebrate/vertebrate transition, and not within the vertebrate radiation.

The origin of vertebrates dates back to 530 million years fruit of a divergence period, which began 545 million years ago, from a lancelet-like relative (Zimmer, 2000). Present lancelets (amphioxus) are the closest extant relative to the vertebrates. They are similar in possessing a dorsal nerve cord, notochord, segmented muscles, branchial openings, and post-anal tail. However, they are less complex than vertebrates (by primitive), lacking neural crests, placodes, elaborated brain, and complex mesenchyme (Holland and Holland, 2001). Amphioxus closely resembles the most primitive cephalochordate dated by fossil record, *Pikaia*, and their similitude with fossil craniate ancestors, as *Haikouella* and *Yunnanozoon* (Mallatt and Chen, 2003), sets amphioxus predecessors in the scenario of transition towards vertebrate complexity, illuminating the critical invertebrate/vertebrate transition, in probable morphological stasis since its separation from the proper vertebrate ancestor.

Many gene families have been expanded in vertebrates after the two rounds of genome duplications that occurred at the origin of vertebrates and early steps of vertebrate evolution, just after the cephalochordate split from the vertebrate stem lineage (Holland et al., 1994; Furlong and Holland, 2002). Total or partial genome doubling gives rise to new sets of gene copies that potentially may acquire new functions, but also may increase functional redundancy. Consistently with its preduplicative condition, the genome of the cephalochordate amphioxus contains a single Trk receptor that is equally related in sequence to the three TrkA, B, and C receptors of vertebrates. Phylogenetic analyses always locate AmphiTrk at the root of vertebrate Trk's, supporting its pro-orthology not only when full-length sequences are used but also when the extracellular and intracellular domains are considered separately. The extracellular region of AmphiTrk features, as its vertebrate counterparts, the adequate combination of domains to allow neurotrophin binding. Leucine-rich motifs flanked by clustered cysteines are followed by two consecutive Ig-like domains of the C2 type, which in turn contain the specific residues which in vertebrates are compulsory to couple neurotrophin molecules (Urfer et al., 1998). On the cytoplasmic side, AmphiTrk includes a tyrosine kinase domain with the consensus activation loop that defines the class II of tyrosine

kinase receptors. Located in the N-terminal pole of the TK domain, a conserved lysine is responsible to bind ATP molecules representing, as in vertebrates, the energetic source to carry out their catalytic activity. Preceding the TK domain, the consensus NPXY motif in the juxtamembrane is also present in the amphioxus protein and located in the appropriate place to recruit the Shc and Frs2 adaptor proteins responsible for the activation of the Ras/Raf/Erk and PI3K/AKT pathways. Remarkably, a distinctive trait of AmphiTrk lies in the further C-terminus of the molecule, where the tyrosine (Y785 in TrkA) recruiting the PLC γ pathway in mammals is absent.

As predicted by the AmphiTrk sequence, the amphioxus receptor is able to interact with mammalian neurotrophins. In vitro analyses demonstrated that AmphiTrk is able to interact with all NGF, BDNF, NT3, and NT4, mimicking the primary effects triggered independently by TrkA, TrkB, and TrkC. In contrast with molluscan Trk-related receptors, AmphiTrk is biochemically activated by neurotrophin binding, resulting in the phosphorylation of downstream targets, as Erk and AKT. It is possible that the coupling of several specific downstream signalling pathways occurred in parallel with the elaboration of an ancestral Trk molecule, where specific residues were adopting new abilities. An important data to consider is that a chimeric Ltrk, carrying TrkC Ig-like domains, is able to phosphorylate Erk proteins (Beck et al., 2004). However, such ability is lost when the native LTrk is exposed to mammalian Nt.

The inability of AmphiTrk to phosphorylate PLC γ is appealing, but also puzzling. Mammalian TrkY785 mutants do not phosphorylate PLC γ in cell cultures (Middlemas et al., 1994), and the knock-in mice show memory defects and hyperactivity (Minichiello et al., 2002). However, LTrk has a Tyr residue in this position. Nevertheless, to our knowledge, no functional assay has been performed to ascertain whether LTrk is able to phosphorylate PLC γ . Hence, two possible scenarios can be outlined. (i) The recruitment of the pathway was a vertebrate specific innovation, and (ii) the invertebrate Trk-like receptors already possessed the ability to activate the pathway that was secondarily lost in the amphioxus lineage. No direct functional proof is currently available to discern between the two possibilities. A positive activation mediated by LTrk would demonstrate the latest scenario. However, Ltrk and ApTrk1, still having in position the rest of Tyr key residues to activate the Akt pathway, are unable to do so (Beck et al., 2004; Ormond et al., 2004). This may suggest that although the given Tyr residues are absolutely necessary, other accompanying residues, or a given structural conformation, are also needed. Circumstantial data in favor of this argument come from comparative sequence data: neither AmphiTrk (QVQVDIVA) nor LTrk (PVYIDIIA) conforms the stretch of amino acid residues surrounding Y785 [P(VIS)YLD(IV)L(GE)] that are present in all TK families able to activate the PLC γ pathway (<http://www.ensembl.org>). If the inability to activate PLC γ is a primitive feature of amphioxus Trk, the recruitment of the pathway must have occurred early in vertebrate evolution, before the gene duplications that generated multiple Trk members in vertebrates. A hint to this will come after the full sequencing of lamprey Trk; currently the available sequences of LfTrk 1 and 2 do not include the most carboxy-terminal part of the molecule.

Ancestral role of the Trk receptor

Some aspects of amphioxus development and morphology liken some of the basic vertebrate features; however, traits related

to complexity are completely absent, for example, a complex nervous system. Amphioxus peripheral nervous system (PNS) consists of numerous sensory cells and free nerve terminal ends spread over the entire epidermis and few organs (Bone and West, 1978; Mazet et al., 2004). These sensory cells are divided into different subtypes depending on its morphology and properties (Holland and Yu, 2002). They may be primary (with axonal processes) or secondary (lacking axons) neurons, but never are linked to sensory ganglia, which are missing in amphioxus (Lacalli, 2004). Interestingly, during embryogenesis, AmphiTrk expression is restricted to the developing PNS, in scattered epidermal sensory neurons. These data indicate that AmphiTrk is involved in sensory neuronal fate commitment and differentiation, since it is expressed by subpopulations of sensory neurons that stem from general epidermal cells. This role is comparable between amphioxus and vertebrates, though the origin of the respective systems is clearly different: amphioxus is devoid of neural crest and placodes, which are central to construct the complex PNS in vertebrates. Intriguingly, however, a neural-crest like migratory behavior during neurulation, temporarily matching the neural crest migration in vertebrates, has been described in amphioxus embryos (Benito-Gutiérrez et al., 2005).

In larval stages, *AmphiTrk* is upregulated during Hatscheck's pit formation and downregulated but maintained to adulthood. Within this structure, which is considered to be the homologue of the vertebrate adenohypophysis (Gorbman et al., 1999), AmphiTrk transcripts are distributed asymmetrically, questioning once again whether parts of this heterogeneous structure belong to the PNS and whether it is connected somehow to the CNS. *AmphiTrk* expression in the Hatscheck's pit is comparable to that of the vertebrate Trk receptors in the anterior pituitary gland (Aguado et al., 1998), which originates from non-neurogenic placodes. In adult animals, AmphiTrk is expressed for the first time in the CNS, within the ventral and dorsal neural tube. Its expression profile tracks ventral and dorsal motoneurons, interneurons and associated neurons, which are likely involved in the integration of synaptic inputs from a variety of sensory and interneuronal sources (Lacalli and Kelly, 2003).

Domain bricolage and exon shuffling to build a Trk receptor

Evidences of exon shuffling

Trk receptors are mosaic proteins in which individual domains have specific functions that crucially contribute to their overall activity. The singularity of being a Trk receptor comes precisely from its exclusive combination of protein modules. Indeed, AmphiTrk novelty resides in that for the first time in evolution all domains forming a canonical Trk receptor were recruited in a single molecule. The modular nature of the AmphiTrk protein is reflected by the structure of the gene. Consistent with the compact genome of amphioxus, AmphiTrk is encoded by a less number of exons than Trk receptors are by the human genes. Although the amount of genetic material in a species is not necessarily correlated to its level of complexity, the increase in genome size is usually paralleled by a general decrease in genome compactness and an increase in the number and size of introns (Patthy, 1999). Comparative analyses of the amphioxus and human genes are in agreement with this thesis, since the genomic organization is roughly maintained between amphioxus and humans, but is more fragmented by introns in the human genes (Fig. 3).

Maintenance of the genomic organization means that there is a parallelism in the domain distribution through the exon–intron structure. That is, specific domains are encoded by less number of exons in the amphioxus gene but introns flanking the limits of the complete domains are conserved. This is particularly well illustrated by the fact that each Ig-like domain is encoded by a single exon in AmphiTrk, while in human Trk receptors, the first Ig-like domain is encoded by two exons. Remarkably, the sum of both exons coding for domain in humans (exons 6 and 7) results in the size of the correspondent exon in amphioxus (exon 6), indicating that the N- and C-terminal ends of the domain are equally defined in the human and amphioxus genes. Noticeably, the central core of the amphioxus Trk molecule seems to follow comparable rules. The only exception lies in the extracellular juxtamembrane domain, again coded by two exons in humans (exons 9 and 10) but just one in amphioxus (exon 8). The first of these exons (the mini exon 9) has a variable size in the

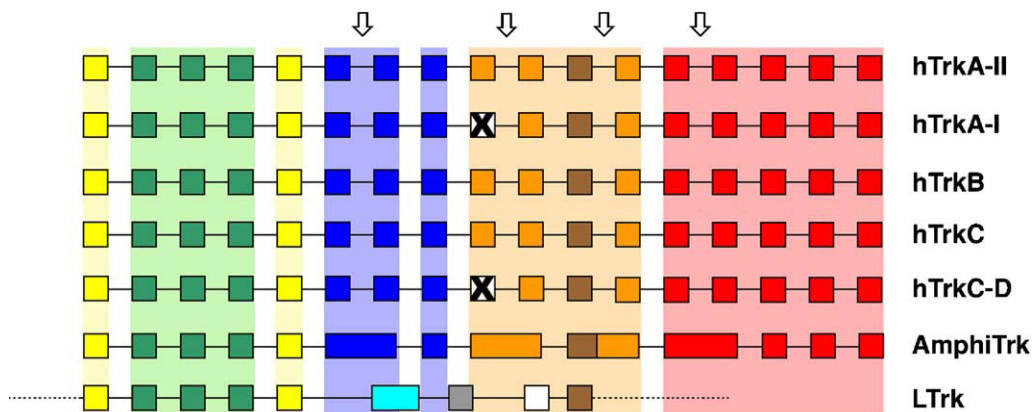


Fig. 3. Functional domains across exon distribution of human, amphioxus, and *Lymnaea* genes. Color shadows indicate complete protein modules and their limits on the exon (solid boxes)—intron structure. Cysteine clusters (yellow) and leucine-rich motifs (green) are identically arranged in all genes, probably indicating that this was part of an older unrelated gene. The central core of the *Lymnaea* molecule shows no comparable organization with respect to the vertebrate and amphioxus genes, suggesting that the Ig-like C2 (dark blue), transmembrane (brown), and surrounding juxtamembrane (orange) domains were assembled latter in evolution, at the level of the Cephalochordate/vertebrate split. Crossed exons represent facultative vertebrate promiscuity mini-exons. Arrows point to four newly generated introns in the vertebrate lineage. The white box represents a *Lymnaea* exon predicted in silico but not confirmed in current cDNA clones. Dotted lines indicate unknown genomic organization. Light blue: Ig-like C1 domain; red: tyrosine kinase domain.

different human TrkA, TrkB, and TrkC genes. It contributes to distinctive short amino acid strings located after the C-terminal pole of the second Ig-like domain. Most remarkably, this particular exon is specifically regulated by alternative splicing, resulting in Trk isoforms able to establish promiscuous relations with the different neurotrophins.

Domain bricolage

Cystein-rich modules, Ig-like domains, and leucine-rich motifs, as well as tyrosine kinase domains, are individually widespread in

metazoans, forming parts of unrelated molecules (King et al., 2003), but are uniquely combined in Trk receptors. This suggests that these protein modules may have an evolutionarily mobile component (Liu et al., 2005) (Fig. 4). Insertion of mobile domains in pre-existent or newly combined proteins would supply additional functional modules providing new capabilities to the resulting product (Kolkman and Stemmer, 2001). To make that possible, these domains should be able to fold independently from their new protein environment, and self-contain in single exons. This is the case for the Ig-like domains within the *AmphiTrk* gene, thus suggesting that they were inserted as individual blocks, at

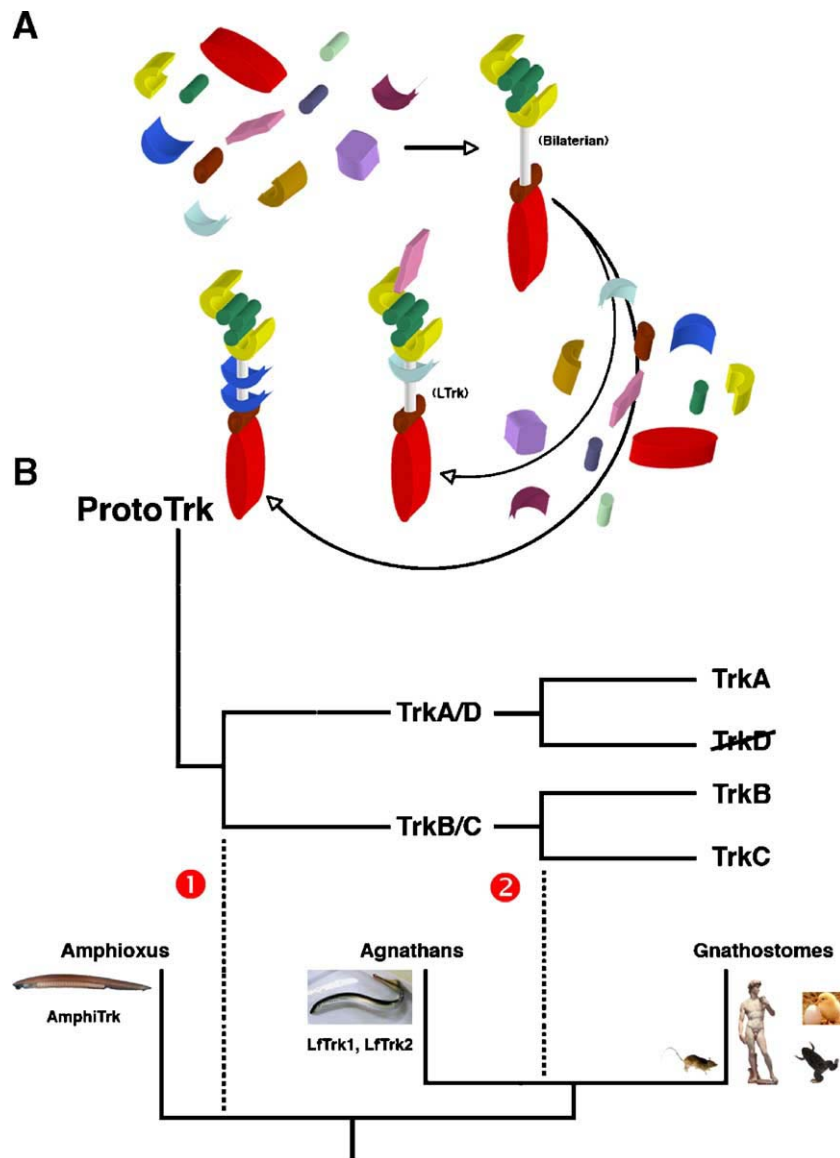


Fig. 4. Genesis of the Trk receptor by domain bricolage, and expansion by gene duplication in vertebrates. (A) Early in the evolution of bilaterian animals, a Tyrosine kinase domain (red) receptor, that included cysteine clusters (yellow) sandwiching leucine rich motifs (green), was generated by bricolage of pre-existing domains (Bilaterians). Further, bricolage added distinct domains in the different lineages. In the lineage leading to *Lymnaea*, an IgG1 domain (light blue) and a N-terminal extension generated the actual LTrk receptor. Only in the lineage leading to vertebrates, just before the amphioxus/vertebrate split, domain tinkering generated a ProtoTrk molecule with the particular combination of domains found in the Trk family of receptors. (B) Two rounds of genome duplication (labels 1 and 2) generated the complexity of the Trk family in higher vertebrates. Amphioxus possesses a direct descendant of the ProtoTrk gene. Early in vertebrate evolution, the ProtoTrk gene duplicated giving rise to TrkA/D and TrkB/C. Extant lower vertebrates, as lampreys, possess descendants of this intermediate stage. A further duplication before the origin of higher vertebrates generated four Trk genes, A, B, C, and D, but TrkD was lost early afterwards. Further genome duplications in fishes are omitted for simplicity.

some point during evolution, just before the cephalochordate-vertebrate split. Based on the correlation between exon boundaries and domain limits (Long et al., 2003; Liu and Grigoriev, 2004), not only Ig-like but also domains in the central part of the molecule might have been similarly assembled to an older gene, by means of exon shuffling.

The information on the genomic organization of molluscan Ltrk is limited to the region between the N-terminal cysteine repeats and the transmembrane domain of the receptor (Fig. 3), so we cannot ascertain the fragmentation degree of its tyrosine kinase domain, which might be indicative of how old this part of the molecule is. Notwithstanding, we can fairly argue that the part containing the leucine-rich motifs and clustered cysteines was already present in the ancestral gene that was subsequently modified to become a ProtoTrk (see Fig. 3), given that the exon–intron structure at this level is equal in the Limnaea, amphioxus, and human genes. Conversely, the genomic organization of Ltrk coding for the central part of the molecule does not show similarities to the human and amphioxus genes. This indicates that novel domain recruitment in this part (including the IgG domains) happened later in evolution. Due to the absence of Trk receptors in other Protostomes and lower Deuterostomes, we propose that such recruitment took place just predating the amphioxus/vertebrate split.

Whether introns were lost in the amphioxus gene cannot be formally excluded. However, the most plausible explanation is that the additional introns observed in human genes were newly generated during vertebrate evolution, since some of them might have conferred advantageous abilities to Trk receptors in higher vertebrates. The most illustrative example is the intron located between the promiscuity mini-exon 9, and the following one, since this possibly enabled its own regulation by alternative splicing. As mentioned previously, depending if the mini-exon is transcribed or not, the translated Trk receptor will be able to respond through additional neurotrophins (Barker et al., 1993). This flexibility for the ligand represents an advantage when multiple ligands exist for a given receptor or receptors, and would multiply the complexity of the whole signalling system. Implicitly, a pressure for ligand–receptor co-evolution may have forced the generation of new splicing modules. This might explain why the exon 8 of AmphiTrk is a single block, given that just one neurotrophin ligand is expected from the preduplicative genome of amphioxus.

Caveats

Evolutionary reconstructions and inferences on ancestral conditions of genes can be made only by analyzing available data, gene sequences from a small sample of animals from distinct phyla. In addition, contemporary genes are the result of independent evolution in each particular lineage, which may have included gene losses and duplications, and domain losses and gains. In the case of Trk receptors, we have discussed the available data, and argued in favor to the gain of IgG domains in the chordate lineage, after the cephalochordate/vertebrate split. Our argument is based in the absence of Trk receptor in the fully sequenced genomes of the Protostomes *Drosophila* and *C. elegans*, and in the Chordate *C. intestinalis*. Furthermore, there are no Trk receptors in the genome database of Echinoderms (<http://sugp.caltech.edu/>). A converse alternative, however, cannot be discarded: a receptor with a domain structure as of vertebrate Trk existed in early Bilaterians, prior to the

Protostome/Deuterostome divergence. The full receptor was then lost in Nematodes and Arthropods, and within molluscs, the IgG domain was lost in the lineage to Lymnaea, and an N-terminal extension was gained (see Fig. 1), and in Deuterostomes, it was lost in Echinoderms and Tunicates. In the Trk-related Ror family of TK, an IgG domain clearly was lost in the *Drosophila* lineage, as it is present in the Ror proteins of *C. elegans* and *Aplysia* (Yoda et al., 2003). Similarly, vertebrate Musks, close relatives to Rors, have lost their kringle domain, which is present in *Drosophila* and zebrafish (Zhang et al., 2004). Receptors able to bind to vertebrate neurotrophins surely exist in Protostomes, as demonstrated by the physiological effects of vertebrate neurotrophins in *Aplysia*, *Lymnaea*, or *Bombyx mori*. No data, however, undoubtedly indicate whether it is a canonically vertebrate-like receptor that binds to the neurotrophins, or other Tyr-kinases, of related families (e.g., NMRD, Ror, EGFR). Up to now, after extensive efforts, none canonical Trk receptor has been isolated in such invertebrates. The definite answer will come only after genomic-based analyses of a wide range of invertebrates. At the present time, with the available data, parsimony slightly favors a late chordate ensemble of a Trk receptor.

Conclusions and prospectives

In the course of constructing new genes, pre-existent material rather than new ones may serve evolution to generate diversity. Tinkering with reduced sets of ancestral components often leads into novel forms of increased complexity and multifunctionality (Duboule and Wilkins, 1998). The exon shuffling mechanism allows the construction of new genes in pieces by reusing functional modules encoded within older exons (Liu and Grigoriev, 2004). Evidences for exon shuffling must be provided by a correlation between the exon-structure of the genes and the domain-organization of proteins (Patthy, 1991). This correlation is obvious among the amphioxus and human Trk receptors, strongly suggesting that the origin of this family stems from a ProtoTrk gene that was elaborated through domain bricolage. Given that no other canonical Trk receptors have been isolated in other invertebrates, this traces back the origin of Trk receptors prior the cephalochordate/vertebrate split, most probably at the level of the last common ancestor of vertebrates and cephalochordates.

At least 550 million years ago, a pioneer AmphiTrk-like ProtoTrk gene provided the genetic basis to build up a whole family of proteins. Through expansion by gene duplication and co-evolution with its also multiplied ligands, Trk receptors equipped the vertebrate descendants with tools to construct a complex and highly plastic nervous system. Two doubling of the genome occurred separately in time during vertebrate evolution, first at the root of vertebrates, and second after the agnathan-agnathostome (jawless-jawed) split. The first duplication generated a TrkB/C gene (ancestor of Trk B and C, which group together in phylogenetic trees) and a TrkA/D gene (ancestor of TrkA and a further, fourth gene, denominated here TrkD). Matching with this scenario, two Trk receptors were isolated from lamprey (Hallböök et al., 1998; Hallböök, 1999). The second round of genome duplication produced four Trk genes, TrkA, B, C, and D. TrkD was consequently lost, before or after, the Chondrichthys fishes radiation (unfortunately there is no information on Trk receptors in sharks). Since then, TrkA, B, and C remained unchanged in all the higher vertebrates,

including mammals, with the sole exception of lineage-specific duplications in teleost fishes (Jaillon et al., 2004).

Following the genome expansion, alternative splicing might have played a major role to expand the Trk proteome, thus generating an even wider spectrum of activities. No splice variants have been described for *Ltrk* or *AmphiTrk*, but in higher vertebrates, they are commonly used in different species. Hence, the spatial–temporal orchestration of a variety of isoforms might have crucially contributed to optimize neuronal development and activity. Beyond the microenvironmental situation in individual neuronal cells, a further level of complexity in the vertebrate nervous system is achieved by the multiple interconnections among an increased population of diverse neuronal cell types. A sophisticated co-ordination of such connections, in which the neurotrophic system plays a prevalent role, may have facilitated the complex emergent properties of the vertebrate brain.

Indeed, the incapability of *AmphiTrk* to phosphorylate PLC γ suggests either that Trk-mediated activation of the PLC γ pathway was lost in the cephalochordate lineage, or it represents a true vertebrate innovation. Functional assay data are needed to discern between the two possibilities. Nonetheless, and taking into account that this pathway is responsible of neuronal plasticity and the acquisition of higher neuronal functions in vertebrates, as complex behavior, memory, and learning, we temptingly speculate that subtle mutations in an earlier vertebrate Trk molecule unlock the pathway in the road towards higher levels of neural complexity, behavior, and thinking.

We finally predict that the *AmphiTrk* ligand will be a proper neurotrophin molecule, which will become visible after the completion of the amphioxus genome sequencing, and that the evolutionary scenario for the Nt/Trk system evolution, and its consequences for vertebrate neural system complexity, will not be an isolated case. Further signalling gene families involved in nervous system development may have passed similar circumstances at the invertebrate/vertebrate transition. It is tempting to speculate that domain shuffling permitted the appearance, in the closest invertebrate ancestor of vertebrates, of functional gene families regulating nervous system complexity. Those newly born systems, after gene duplication and divergence may thus have provided the genetic basis for a key aspect of vertebrate evolution, namely the development of higher neural functions and cognitive ability. The amphioxus genome may still provide some clues for these predictions and speculations.

Acknowledgments

The author's research is funded by grants of the Ministerio de Educación y Ciencia to JGF, and by the FIS (Ministerio de Sanidad y Consumo) to JXC, by the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Distinció per la Promoció de la Recerca Universitària) to JGF and JXC, and the collaborative effort is granted by the European Community's Human Potential Programme HPRN-CT-2002-00263 "Neurogenome".

References

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F.,

- et al., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.
- Aguado, F., Majo, G., Gomez de Aranda, I., Ferrer, I., 1998. Trk neurotrophin receptor family immunoreactivity in rat and human pituitary tissues. *Neurosci. Lett.* 243, 13–16.
- Airaksinen, M.S., Meyer, M., 1996. Most classes of dorsal root ganglion neurons are severely depleted but not absent in mice lacking neurotrophin-3. *Neuroscience* 73, 907–911.
- Arevalo, J.C., Conde, B., Hempstead, B.L., Chao, M.V., Martin-Zanca, D., Perez, P., 2000. TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5908–5916.
- Arevalo, J.C., Conde, B., Hempstead, B.I., Chao, M.V., Martin-Zanca, D., Perez, P., 2001. A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation. *Oncogene* 20, 1229–1234.
- Atwal, J.K., Massie, B., Miller, F.D., Kaplan, D.R., 2000. The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* 27, 265–277.
- Bandtlow, C., Dechant, G., 2004. From cell death to neuronal regeneration, effects of the p75 neurotrophin receptor depend on interactions with partner subunits. *Sci. STKE*, pe24.
- Barde, Y.A., 1994. Neurotrophic factors: an evolutionary perspective. *J. Neurobiol.* 25, 1329–1333.
- Barker, P.A., Lomen-Hoerth, C., Gensch, E.M., Meakin, S.O., Glass, D.J., Shooter, E.M., 1993. Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 15150–15157.
- Baxter, G.T., Radeke, M.J., Kuo, R.C., Makrides, V., Hinkle, B., Hoang, R., Medina-Selby, A., Coit, D., Valenzuela, P., Feinstein, S.C., 1997. Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB, T1 and trkB.T2. *J. Neurosci.* 17, 2683–2690.
- Beck, G., Munno, D.W., Levy, Z., Dissel, H.M., Van-Minnen, J., Syed, N.I., Fainzilber, M., 2004. Neurotrophic activities of trk receptors conserved over 600 million years of evolution. *J. Neurobiol.* 60, 12–20.
- Benito-Gutiérrez, E., Nake, C., Llovera, M., Comella, J.X., Garcia-Fernández, J., 2005. The single *AmphiTrk* receptor highlights increased complexity of neurotrophin signalling in vertebrates and suggests an early role in developing sensory neuroepidermal cells. *Development* 132, 2191–2202.
- Bibel, M., Barde, Y.A., 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14, 2919–2937.
- Blum, R., Konnerth, A., 2005. Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)* 20, 70–78.
- Bone, Q., West, C.G., 1978. Ciliated sensory cells in amphioxus (*Branchiostoma*). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 58, 479–486.
- Bronfman, F.C., Fainzilber, M., 2004. Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep.* 5, 867–871.
- Bulloch, A.G., Diep, C.Q., Logan, C.C., Bulloch, E.S., Robbins, S.M., Hislop, J., Sossin, W.S., 2005. *Ltrk* is differentially expressed in developing and adult neurons of the *Lymnaea* central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 487, 240–254.
- Castellucci, V.F., Frost, W.N., Goelet, P., Montarolo, P.G., Schacher, S., Morgan, J.A., Blumenfeld, H., Kandel, E.R., 1986. Cell and molecular analysis of long-term sensitization in *Aplysia*. *J. Physiol. (Paris)* 81, 349–357.
- Cellerino, A., Kohler, K., 1997. Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor TrkB is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina. *J. Comp. Neurol.* 386, 149–160.
- Chao, M.V., 2000. Trophic factors: an evolutionary cul-de-sac or door into higher neuronal function? *J. Neurosci. Res.* 59, 353–355.
- Chao, M.V., 2003. Retrograde transport redux. *Neuron* 39, 1–2.
- Chiu, C.H., Dewar, K., Wagner, G.P., Takahashi, K., Ruddle, F., Ledje, C., Bartsch, P., Scemama, J.L., Stellwag, E., Fried, C., et al., 2004. Bichir

- HoxA cluster sequence reveals surprising trends in ray-finned fish genomic evolution. *Genome Res.* 14, 11–17.
- Clary, D.O., Reichardt, L.F., 1994. An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11133–11137.
- Danse, J.M., Garnier, J.M., 1993. Molecular cloning of a cDNA encoding a nerve growth factor precursor from the krait, *Bungarus multicinctus*. *Growth Factors* 8, 77–86.
- Davies, A.M., 2003. Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *EMBO J.* 22, 2537–2545.
- Davoli, C., Marconi, A., Serafino, A., Iannoni, C., Marcheggiano, A., Ravagnan, G., 2002. Expression of nerve growth factor-like polypeptides and immunoreactivity related to the two types of neurotrophin receptors in earthworm tissues. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 527–539.
- Dechant, G., Barde, Y.A., 2002. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat. Neurosci.* 5, 1131–1136.
- De Girolamo, P., Arcamone, N., Lucini, C., Simeoli, M.P., Castaldo, L., Gargiulo, G., 2004. TRK neurotrophin receptor-like proteins in the kidney of frog (*Rana esculenta*) and lizard (*Podarcis sicula*): an immunohistochemical study. *Anat. Embryol. (Berl)* 207, 481–487.
- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R.K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D.M., et al., 2002. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298, 2157–2167.
- Duboule, D., Wilkins, A.S., 1998. The evolution of 'bricolage'. *Trends Genet.* 14, 54–59.
- Ermfors, P., 2001. Local and target-derived actions of neurotrophins during peripheral nervous system development. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1036–1044.
- Fainzilber, M., Smit, A.B., Syed, N.I., Wildering, W.C., Hermannvan, van der Schors, R.C., Jimenez, C., Li, K.W., van Minnen, J., Bulloch, A.G., et al., 1996. CRNF, a molluscan neurotrophic factor that interacts with the p75 neurotrophin receptor. *Science* 274, 1540–1543.
- Furlong, R.F., Holland, P.W., 2002. Were vertebrates octoploid? *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 357, 531–544.
- Gorbman, A., Nozaki, M., Kubokawa, K., 1999. A brain–Hatschek's pit connection in amphioxus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 251–254.
- Gruenbaum, L.M., Carew, T.J., 1999. Growth factor modulation of substrate-specific morphological patterns in *Aplysia* bag cell neurons. *Learn. Mem.* 6, 292–306.
- Guo, L.Y., Zhu, J.F., Wu, X.F., Zhou, Y.C., 1999. Cloning of a cDNA encoding a nerve growth factor precursor from the Agkistrodon halys Pallas. *Toxicol.* 37, 465–470.
- Hahn, U.K., Fryer, S.E., Bayne, C.J., 1996. An invertebrate (Molluscan) plasma protein that binds to vertebrate immunoglobulins and its potential for yielding false-positives in antibody-based detection systems. *Dev. Comp. Immunol.* 20, 39–50.
- Hall, B.K., 1999. *The Neural Crest in Development and Evolution*. Springer-Verlag, New York.
- Hallböök, F., 1999. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 616–621.
- Hallböök, F., Ibanez, C.F., Persson, H., 1991. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6, 845–858.
- Hallböök, F., Backstrom, A., Kullander, K., Kylberg, A., Williams, R., Ebendal, T., 1995. Neurotrophins and their receptors in chicken neuronal development. *Int. J. Dev. Biol.* 39, 855–868.
- Hallböök, F., Lundin, L.G., Kullander, K., 1998. *Lampetra fluviatilis* neurotrophin homolog, descendant of a neurotrophin ancestor, discloses the early molecular evolution of neurotrophins in the vertebrate subphylum. *J. Neurosci.* 18, 8700–8711.
- Hanks, S.K., Hunter, T., 1995. Protein kinase 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576–596.
- Hapner, S.J., Boeshore, K.L., Large, T.H., Lefcort, F., 1998. Neural differentiation promoted by truncated trkC receptors in collaboration with p75(NTR). *Dev. Biol.* 201, 90–100.
- Hayashi, I., Perez-Magallanes, M., Rossi, J.M., 1992. Neurotrophic factor-like activity in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 73–79.
- Heinrich, G., Lum, T., 2000. Fish neurotrophins and Trk receptors. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18, 1–27.
- Hidalgo, A., 2002. Interactive nervous system development: control of cell survival in *Drosophila*. *Trends Neurosci.* 25, 365–370.
- Holland, L.Z., Holland, N.D., 2001. Evolution of neural crest and placodes: amphioxus as a model for the ancestral vertebrate? *J. Anat.* 199, 85–98.
- Holland, N.D., Yu, Jr.-K., 2002. Epidermal receptor development and sensory pathways in vitally stained amphioxus (*Branchiostoma floridae*). *Acta Zool.* 83, 309–319.
- Holland, P.W., Garcia-Fernández, J., Williams, N.A., Sidow, A., 1994. Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Dev. Suppl.*, 125–133.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 677–736.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609–642.
- Huang, E.J., Wilkinson, G.A., Farinas, I., Backus, C., Zang, K., Wong, S.L., Reichardt, L.F., 1999. Expression of Trk receptors in the developing mouse trigeminal ganglion: in vivo evidence for NT-3 activation of TrkA and TrkB in addition to TrkC. *Development* 126, 2191–2203.
- Jaaro, H., Beck, G., Conticello, S.G., Fainzilber, M., 2001. Evolving better brains: a need for neurotrophins? *Trends Neurosci.* 24, 79–85.
- Jaillon, O., Aury, J.M., Brunet, F., Petit, J.L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., et al., 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431, 946–957.
- Kim, J.H., Sung, D.K., Park, C.W., Park, H.H., Park, C., Jeon, S.H., Kang, P.D., Kwon, O.Y., Lee, B.H., 2005. Brain-derived neurotrophic factor promotes neurite growth and survival of antennal lobe neurons in brain from the silk moth, *Bombyx mori* in vitro. *Zool. Sci.* 22, 333–342.
- King, N., Hittinger, C.T., Carroll, S.B., 2003. Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* 301, 361–363.
- Klein, R., Parada, L.F., Coulier, F., Barbacid, M., 1989. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* 8, 3701–3709.
- Koga, M., Takeuchi, M., Tameishi, T., Ohshima, Y., 1999. Control of DAF-7 TGF- α expression and neuronal process development by a receptor tyrosine kinase KIN-8 in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 126, 5387–5398.
- Kolkman, J.A., Stemmer, W.P., 2001. Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nat. Biotechnol.* 19, 423–428.
- Kryl, D., Barker, P.A., 2000. TTIP is a novel protein that interacts with the truncated T1 TrkB neurotrophin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 925–930.
- Kuruvilla, R., Zweifel, L.S., Glebova, N.O., Lonze, B.E., Valdez, G., Ye, H., Ginty, D.D., 2004. A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell* 118, 243–255.
- Lacalli, T.C., 2004. Sensory systems in amphioxus: a window on the ancestral chordate condition. *Brain Behav. Evol.* 64, 148–162.
- Lacalli, T.C., Kelly, S.J., 2003. Ventral neurons in the anterior nerve cord of amphioxus larvae: I. An inventory of cell types and synaptic patterns. *J. Morphol.* 257, 190–211.
- Lamballe, F., Klein, R., Barbacid, M., 1991. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967–979.

- Lee, F.S., Kim, A.H., Khursigara, G., Chao, M.V., 2001. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 281–286.
- Lee, S.H., Han, J.H., Choi, J.H., Huh, E.Y., Kwon, Y.K., Kaang, B.K., 2003. The effect of brain-derived neurotrophic factor on neuriteogenesis and synaptic plasticity in *Aplysia* neurons and the hippocampal cell line HiB5. *Mol. Cells* 15, 233–239.
- Lindsay, R.M., 1996. Role of neurotrophins and trk receptors in the development and maintenance of sensory neurons: an overview. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 351, 365–373.
- Liu, M., Grigoriev, A., 2004. Protein domains correlate strongly with exons in multiple eukaryotic genomes—Evidence of exon shuffling? *Trends Genet.* 20, 399–403.
- Liu, M., Walch, H., Wu, S., Grigoriev, A., 2005. Significant expansion of exon-bordering protein domains during animal proteome evolution. *Nucleic Acids Res.* 33, 95–105.
- Long, M., Deutsch, M., Wang, W., Betran, E., Brunet, F.G., Zhang, J., 2003. Origin of new genes: evidence from experimental and computational analyses. *Genetica* 118, 171–182.
- Lucini, C., Castaldo, L., Lamanna, C., Maruccio, L., Vega, J.A., Gargiulo, G., 1999. Neuronal and non-neuronal Trk neurotrophin receptor-like proteins in *Eisenia foetida* (Annelida Oligochaeta). *Neurosci. Lett.* 261, 163–166.
- Lucini, C., de Girolamo, P., Lamanna, C., Botte, V., Vega, J.A., Castaldo, L., 2001. TrkA and TrkC neurotrophin receptor-like proteins in the lizard gut. *Cell Tissue Res.* 303, 345–350.
- Lum, T., Huynh, G., Heinrich, G., 2001. Brain-derived neurotrophic factor and TrkB tyrosine kinase receptor gene expression in zebrafish embryo and larva. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 569–587.
- Luukko, K., Moshnyakov, M., Sainio, K., Saarna, M., Sariola, H., Thesleff, I., 1996. Expression of neurotrophin receptors during rat tooth development is developmentally regulated, independent of innervation, and suggests functions in the regulation of morphogenesis and innervation. *Dev. Dyn.* 206, 87–99.
- Mallatt, J., Chen, J.Y., 2003. Fossil sister group of craniates: predicted and found. *J. Morphol.* 258, 1–31.
- Martin, S.C., Marazzi, G., Sandell, J.H., Heinrich, G., 1995. Five Trk receptors in the zebrafish. *Dev. Biol.* 169, 745–758.
- Martin, S.C., Sandell, J.H., Heinrich, G., 1996. Zebrafish TrkC1 and TrkC2 receptors define two different cell populations in the nervous system during the period of axonogenesis. *Dev. Biol.* 195, 114–130.
- Martin-Zanca, D., Hughes, S.H., Barbacid, M., 1986. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319, 743–748.
- Martin-Zanca, D., Oskam, R., Mitra, G., Copeland, T., Barbacid, M., 1989. Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 9, 24–33.
- Masikowski, P., Carroll, R.D., 1992. A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. *J. Biol. Chem.* 267, 26181–26190.
- Mazet, F., Masood, S., Luke, G.N., Holland, N.D., Shimeld, S.M., 2004. Expression of *AmphiCoe*, an amphioxus COE/EBF gene, in the developing central nervous system and epidermal sensory neurons. *Genesis* 38, 58–65.
- McKay, S.E., Purcell, A.L., Carew, T.J., 1999. Regulation of synaptic function by neurotrophic factors in vertebrates and invertebrates: implications for development and learning. *Learn. Mem.* 6, 193–215.
- Middlemas, D.S., Meisenhelder, J., Hunter, T., 1994. Identification of TrkB autophosphorylation sites and evidence that phospholipase C-gamma 1 is a substrate of the TrkB receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 5458–5466.
- Minichiello, L., Calella, A.M., Medina, D.L., Bonhoeffer, T., Klein, R., Korte, M., 2002. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36, 121–137.
- Moreno, H., Nadal, M., Leznik, E., Sugimori, M., Lax, I., Schlesinger, J., Llinas, R., 1998. Nerve growth factor acutely reduces chemical transmission by means of postsynaptic TrkA-like receptors in squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14997–15002.
- Ninkina, N., Grashchuck, M., Buchman, V.L., Davies, A.M., 1997. TrkB variants with deletions in the leucine-rich motifs of the extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 272, 13019–13025.
- O'Connell, L., Hongo, J.A., Presta, L.G., Tsoulfas, P., 2000. TrkA amino acids controlling specificity for nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 275, 7870–7877.
- Ohira, K., Kumanogoh, H., Sahara, Y., Homma, K.J., Hirai, H., Nakamura, S., Hayashi, M., 2005. A truncated tropo-myosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J. Neurosci.* 25, 1343–1353.
- Oishi, I., Sugiyama, S., Liu, Z.J., Yamamura, H., Nishida, Y., Minami, Y., 1997. A novel *Drosophila* receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. Unique structural features and implication in developmental signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 11916–11923.
- Ormond, J., Hislop, J., Zhao, Y., Webb, N., Vaillaincourt, F., Dyer, J.R., Ferraro, G., Barker, P., Martin, K.C., Sossin, W.S., 2004. ApTrkl, a Trk-like receptor, mediates serotonin-dependent ERK activation and long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 44, 715–728.
- Palko, M.E., Coppola, V., Tessarollo, L., 1999. Evidence for a role of truncated trkC receptor isoforms in mouse development. *J. Neurosci.* 19, 775–782.
- Patapoutian, A., Reichardt, L.F., 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 272–280.
- Pathy, L., 1991. Exons—original building blocks of proteins? *BioEssays* 13, 187–192.
- Pathy, L., 1999. Genome evolution and the evolution of exon-shuffling—A review. *Gene* 238, 103–114.
- Perez, P., Coll, P.M., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., 1995. NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol. Cell. Neurosci.* 6, 97–105.
- Poo, M.M., 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev., Neurosci.* 2, 24–32.
- Pulido, D., Campuzano, S., Koda, T., Modolell, J., Barbacid, M., 1992. *Dtrk*, a *Drosophila* gene related to the trk family of neurotrophin receptors, encodes a novel class of neural cell adhesion molecule. *EMBO J.* 11, 391–404.
- Purcell, A.L., Carew, T.J., 2001. Modulation of excitability in *Aplysia* tail sensory neurons by tyrosine kinases. *J. Neurophysiol.* 85, 2398–2411.
- Purcell, A.L., Sharma, S.K., Bagnall, M.W., Sutton, M.A., Carew, T.J., 2003. Activation of a tyrosine kinase-MAPK cascade enhances the induction of long-term synaptic facilitation and long-term memory in *Aplysia*. *Neuron* 37, 473–484.
- Robinson, D.R., Wu, Y.M., Lin, S.F., 2000. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19, 5548–5557.
- Rose, C.R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K.W., Konnerth, A., 2003. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426, 74–78.
- Segal, R.A., 2003. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 299–330.
- Stoilov, P., Castren, E., Stamm, S., 2002. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1054–1065.
- Strohmaier, C., Carter, B.D., Urfer, R., Barde, Y.A., Dechant, G., 1996. A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* 15, 3332–3337.
- Syed, N., Richardson, P., Bulloch, A., 1996. Ciliary neurotrophic factor, unlike nerve growth factor, supports neurite outgrowth but not synapse formation by adult *Lymnaea* neurons. *J. Neurobiol.* 29, 293–303.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998. Genome sequence of the

- nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012–2018.
- Toledo-Aral, J.J., Brehm, P., Halegoua, S., Mandel, G., 1995. A single pulse of nerve growth factor triggers long-term neuronal excitability through sodium channel gene induction. *Neuron* 14, 607–611.
- Tsoufias, P., Stephens, R.M., Kaplan, D.R., Parada, L.F., 1996. TrkC isoforms with inserts in the kinase domain show impaired signaling responses. *J. Biol. Chem.* 271, 5691–5697.
- Urfer, R., Tsoufias, P., O'Connell, L., Hongo, J.A., Zhao, W., Presta, L.G., 1998. High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 5829–5840.
- van Kesteren, R.E., Fainzilber, M., Hauser, G., van Minnen, J., Vreugdenhil, E., Smit, A.B., Ibanez, C.F., Geraerts, W.P., Bulloch, A.G., 1998. Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *EMBO J.* 17, 2534–2542.
- Wiesmann, C., Ultsch, M.H., Bass, S.H., de Vos, A.M., 1999. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 401, 184–188.
- Wilson, C., Goberdhan, D.C., Steller, H., 1993. Dror, a potential neurotrophic receptor gene, encodes a *Drosophila* homolog of the vertebrate Ror family of Trk-related receptor tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7109–7113.
- Winberg, M.L., Tamagnone, L., Bai, J., Comoglio, P.M., Montell, D., Goodman, C.S., 2001. The transmembrane protein Off-track associates with Plexins and functions downstream of Semaphorin signaling during axon guidance. *Neuron* 32, 53–62.
- Yamashita, T., Fujitani, M., Hata, K., Mimura, F., Yamagishi, S., 2005. Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor. *Anat. Sci. Int.* 80, 37–41.
- Yoda, A., Oishi, I., Minami, Y., 2003. Expression and function of the Ror-family receptor tyrosine kinases during development: lessons from genetic analyses of nematodes, mice, and humans. *J. Recept. Signal Transduction Res.* 23, 1–15.
- Zhang, J., Lefebvre, J.L., Zhao, S., Granato, M., 2004. Zebrafish unplugged reveals a role for muscle-specific kinase homologs in axonal pathway choice. *Nat. Neurosci.* 7, 1303–1309.
- Zimmer, C., 2000. Evolution. In search of vertebrate origins: beyond brain and bone. *Science* 287, 1576–1579.

CAPÍTULO VIII



Discusión general

El anfiexo en Evo-Devo experimental

En términos generales, el desarrollo embrionario de los anfiexos *Branchiostoma floridae* y *Branchiostoma lanceolatum* no difieren de manera significativa. Las formas adultas son morfológicamente casi indistinguibles y la formación de estructuras se lleva a cabo de la misma forma. Por este motivo, a pesar de ser *B. floridae* una de las especies mayoritariamente utilizadas para estudios en biología del desarrollo, siempre se han utilizado como referencia las clásicas descripciones embriológicas de *B. lanceolatum*. La reciente re-evaluación del desarrollo embrionario del anfiexo europeo (ver Capítulo III) ha mostrado que *B. lanceolatum* se desarrolla a un ritmo más lento que *B. floridae*. Ello es debido principalmente a la diferencia de temperaturas en sus respectivos hábitats. Durante el período reproductivo de cada una de estas especies, la temperatura oscila entre los 24°C y 28°C en Tampa Bay, lugar de recogida de *B. floridae* en Florida (EUA) (Stokes y Holland, 1996), y entre los 15°C y 18°C en Argeles-sur-mer, lugar de recogida de *B. lanceolatum* en Francia. Ello implica que la temperatura óptima para el desarrollo de cada especie está específicamente adaptada a las condiciones de su entorno natural, algo extensible a las 29 especies de anfiexo distribuidas por todo el mundo en ecosistemas marinos de aguas frías, templadas y cálidas (Poss y Boschung, 1996). Además del retraso generalizado del desarrollo en *B. lanceolatum* respecto de *B. Floridae*, la eclosión de la néurula sucede más tarde, pero no en relación al tiempo post-fertilización, sino a las estructuras desarrolladas durante la neurulación (**Fig. 17**). Así como el embrión del anfiexo americano suele eclosionar cuando los primeros somitos son apenas visibles, el embrión del anfiexo mediterráneo tiene una tamaño mucho mayor cuando está aún dentro del corion y eclosiona cuando

Discusión general

los tres primeros somitos están ya bien formados. Por otro lado, la morfología de la néurula es ligeramente distinta, dado que la depresión que constituye la placa neural es mucho más pronunciada en los embriones del mediterráneo, dándoles un aspecto en forma de corazón que contrasta con la forma casi completamente elipsoidal del embrión americano. Las larvas también presentan rasgos morfológicos diferenciales, quizás el más destacable de ellos es la pigmentación púrpura de la cola en *B. lanceolatum* (**Fig. 17**). Aunque se debe profundizar en su estudio para saber la naturaleza de esta pigmentación, no parece que se trate de fotorreceptores, ya que el comportamiento frente a un estímulo de luz no es diferente del de la especie americana, y ambas huyen de la luz intensa en estos estadios. Asimismo la aleta caudal es mucho más grande y la parte rostral mucho más protuberante en la especie europea. La larva del anfioxo es pelágica y por tanto puede ser arrastrada por corrientes marinas. Ello explicaría porqué el anfioxo está ampliamente distribuido por el globo. En este contexto, la actual población asentada en Blanes, en el litoral gerundense (ver Resumen del Capítulo III), desprovista de adultos sexualmente maduros, podría proceder de larvas que de manera continuada han sido arrastradas desde el Golfo de León, en las costas francesas.

La especie *B. floridae* es la mayoritariamente utilizada por científicos americanos y europeos, por lo que el trabajo de campo está metodológicamente estipulado para esta especie. Hace ya más de 15 años que Linda y Nicholas Holland basaron un centro de recogida de *B. floridae* en Tampa Bay, Florida (comunicación personal). Durante todos estos años un gran número de investigadores del anfioxo se han desplazado hasta allí, durante el período estival reproductivo, principalmente para obtener embriones y, en los últimos años, para trabajar *in vivo* con este organismo. La obtención de embriones está completamente supeditada a las condiciones del entorno natural. La primera puesta del año parece estar correlacionada en parte con un aumento más o menos repentino de la temperatura. A partir de entonces, cada puesta aparece espaciada por un período de entre 10 y 20 días, que se repite a lo largo de aproximadamente dos meses (julio y agosto). Por tanto, sólo entre tres y seis puestas son esperables anualmente. Cada una de las puestas sucede al ponerse el sol y de manera sincrónica entre los individuos de una misma población. Tras la puesta, normalmente las gónadas de cada individuo quedan vacías por completo, liberando al mar una enorme cantidad de huevos y esperma, que por fertilización externa darán lugar a miles de embriones. Con el objetivo de que esta

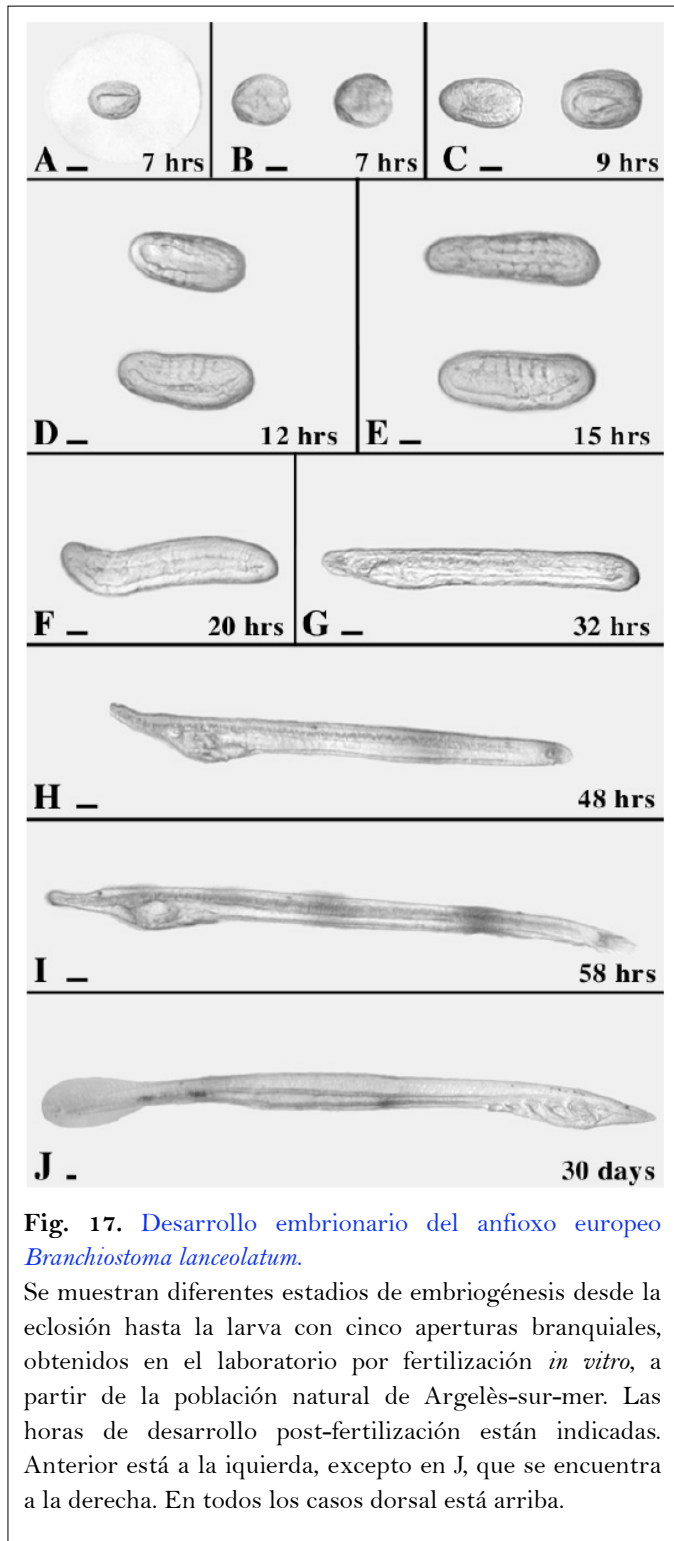


Fig. 17. Desarrollo embrionario del anfioxo europeo *Branchiostoma lanceolatum*.

Se muestran diferentes estadios de embriogénesis desde la eclosión hasta la larva con cinco aperturas branquiales, obtenidos en el laboratorio por fertilización *in vitro*, a partir de la población natural de Argelès-sur-mer. Las horas de desarrollo post-fertilización están indicadas. Anterior está a la izquierda, excepto en J, que se encuentra a la derecha. En todos los casos dorsal está arriba.

fertilización ocurra en un entorno controlado, los adultos son recogidos diariamente y transportados al laboratorio, donde después de ponerse el sol son electroestimulados. La electroestimulación es practicada diariamente porque únicamente es efectiva la noche que coincide con la puesta natural. La previa observación del desarrollo gonadal de los adultos es indicativa pero insuficiente para establecer la fecha de la puesta, por ello es impredecible. La electroestimulación es aplicada individualmente provocando la expulsión de los huevos y el espermatozoides por separado. La fertilización es entonces realizada *in vitro*, en placas de petri, donde se cultivan los embriones a lo largo del desarrollo. Para el correcto desarrollo de los embriones, los huevos deben ser fertilizados rápidamente con espermatozoides fresco, lo que impide realizar fertilizaciones en

Discusión general

días sucesivos a la puesta. Todo ello limita la manipulación *in vivo* de los embriones, dejando una reducida ventana de tiempo para desarrollar nuevas técnicas experimentales invasivas.

Paradójicamente no existía tal metodología para *B. lanceolatum*, a pesar de ser la primera especie descrita (Pallas, 1774) y a la que corresponde la literatura clásica en anatomía y embriología del anfióxico (pe. Hatschek, 1893). Los resultados obtenidos con la población localizada en Argelès-sur-mer (Capítulo III) muestran que el comportamiento reproductivo de *B. lanceolatum* es muy parecido al de *B. floridae*. Las puestas son sincrónicas, escasas y también están influenciadas por el incremento de la temperatura ambiental, lo que hace que el período reproductivo se sitúe aproximadamente entre los meses de mayo y julio, aunque se ha observado que en el mes de marzo sus gónadas ya están bien desarrolladas. A diferencia de la metodología utilizada con *B. floridae*, los animales son capturados y estabulados en acuarios de agua marina filtrada y termostata. Esto evita la recolección diaria, por lo que la población natural no se ve tan afectada y permite un control continuo sobre los individuos. Tras un período de aclimatación al entorno artificial, la puesta es inducida por choque térmico. Los animales, que son mantenidos a 19°C (temperatura del mar en la época más calurosa), son sometidos a una temperatura de 25°C durante unas 36 horas. Así, coincidiendo con la puesta del sol del segundo día, esperma y huevos son obtenidos separadamente. La fertilización es entonces realizada *in vitro* del mismo modo que en el caso de *B. floridae*. La efectividad de éste método permite así obtener embriones de manera asincrónica respecto de las puestas naturales, ampliando considerablemente el número de puestas anuales, por el momento durante el período estival de reproducción.

En paralelo, la estabulación prolongada del anfióxico europeo ha sido llevada a cabo por primera vez en un laboratorio “seco”. Durante los dos últimos años de la realización de esta tesis doctoral se ha seguido una metodología similar a la empleada en el Laboratoire Aragò, contribuyendo asimismo a la optimización del sistema en general. Los anfióxos son criaturas muy sensibles a contaminantes, por tanto el estado del agua es esencial para su supervivencia en cautividad. En un sistema sin agua corriente, como el que se ha utilizado en este caso, la filtración y el recambio diario del agua es esencial para evitar la contaminación, así como la utilización de antibióticos (penicilina y estreptomicina) de manera rutinaria. Ello impide asimismo el crecimiento de algas en los acuarios, que aunque se administran en dos tomas diarias para no

sobrecargar el sistema, podría verse favorecido por la oxigenación permanente de los acuarios. En el laboratorio los animales son mantenidos permanentemente a una temperatura de entre 17°C y 18°C, simulando la temperatura media del agua durante el período estival. Además el ciclo noche:dia (10h:14h) está programado de la misma manera que ocurre en su entorno natural durante su época reproductiva. Con todo ello se intenta estimular a los animales para prolongar su período reproductivo artificialmente. La temperatura de choque térmico ha sido rebajada a 21°C, dado que la exposición de las gónadas a 25°C durante 36 horas, aunque no rebaja la eficiencia de fertilización, afecta al posterior desarrollo de los embriones. Esta metodología ha permitido obtener embriones diariamente durante aproximadamente seis meses, de manera totalmente independiente de las puestas naturales y excediendo en más de tres meses el período reproductivo silvestre.

Los resultados aquí presentados representan un avance considerable en la utilización del anfioxo como modelo de laboratorio. Además de las ventajas que implica “convivir” con el anfioxo en el laboratorio, la obtención de embriones a voluntad, algo sin precedentes, permite el desarrollo de técnicas para la manipulación *in vivo* de este organismo. Hasta la fecha los estudios *in vivo* son casos aislados (**Fig. 18**), debido a la limitada disponibilidad de embriones en

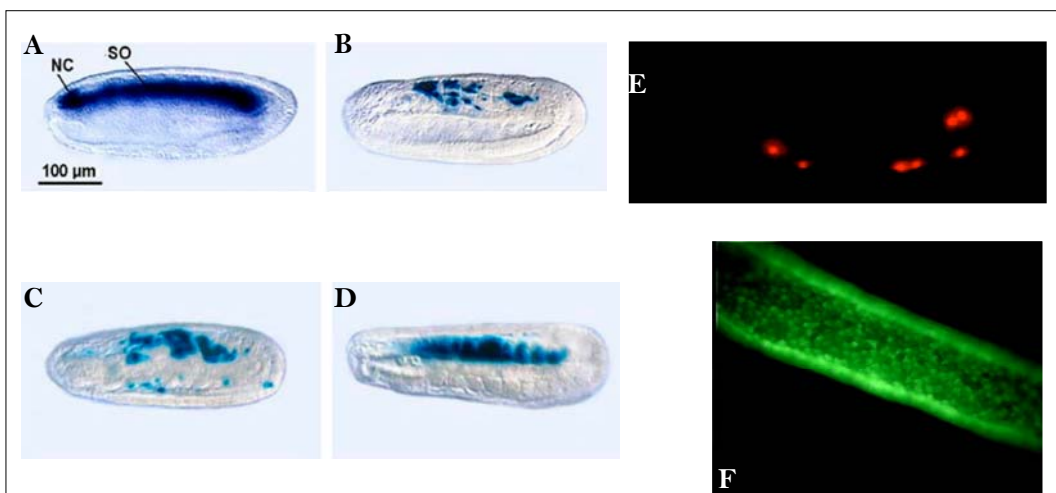


Fig. 18. Manipulación *in vivo* del anfioxo.

A-D. Expresión de un gen reportero LacZ dirigida por la región reguladora de *AmphiFoxD*. Extraído de Yu *et al.*, 2004. **E:** Trazado de linaje celular *in vivo* con el marcador vital lipofílico fluorescente DiI (ver Capítulo V). **F:** Expresión de proteínas fluorescentes mediante transfección con liposomas portadoras de una construcción GFP (Benito-Gutiérrez y García-Fernández, datos no publicados).

Discusión general

desarrollo y a la elevada inversión de tiempo que requiere la puesta a punto de la técnica en sí, dado que el reducido número de puestas suele incurrir en la demora del experimento durante años. En esta tesis doctoral (ver Capítulo V), por ejemplo, se describe el primer trazado de linaje celular *in vivo* durante la neurulación del anfibio (Fig. 18), un experimento que ha tomado dos años para completarse. Estos resultados prometen el inicio de una era donde el anfibio será objeto de estudios funcionales, como otros modelos de laboratorio, con el atractivo añadido de su posición evolutiva clave, desentramando los diversos eventos (no solo a nivel genómico) que tuvieron lugar en una de las grandes transiciones del reino animal, la aparición y radiación de los vertebrados, entre los que nos encontramos nosotros mismos.

AmphiTrk: el único receptor Trk invertebrado

Aunque los receptores Trk y las neurotrofinas han sido ampliamente descritos en vertebrados, la ausencia de una representación clara en invertebrados ha oscurecido la historia evolutiva del sistema neurotrófico. Ello ha diseminado la idea de que este sistema es una de las innovaciones de los vertebrados que ha permitido el desarrollo de un sistema nervioso complejo tanto a nivel morfológico como funcional. La inmunoreactividad a anticuerpos policlonales de Trk en tejidos de anélidos (lombriz de tierra) y cefalópodos (calamar) no ha resuelto la presencia de genes homólogos en estos organismos (Lucini *et al.*, 1999; Davoli *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 1998). Una situación que se ha mantenido invariable tras la secuenciación de los genomas de *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Ciona intestinalis*. Quizás el impacto más significativo que el campo del sistema neurotrófico ha recibido de los invertebrados, en el pasado, procede de la presencia de dos genes relacionados con los receptores Trk de vertebrados en moluscos. *Aplysia californica*, por ejemplo, posee un receptor tirosina quinasa (*ApTrkl*) con un dominio catalítico similar al de Trk, pero su organización extracelular es completamente diferente (Ormond *et al.*, 2004). Previamente, el aislamiento de *Dtrk* en *Drosophila* (Pulido *et al.*, 1992), ahora renombrado como *Off-track* (Winberg *et al.*, 2001), resultó ser un caso similar, así como el aislamiento en vertebrados de un supuesto cuarto miembro de la familia Trk, denominado inicialmente *TrkE* (di Marco *et al.*, 1993) y actualmente conocido como receptor para la discoidina (*DDR1*) (Playford *et al.*, 1996). Sin duda el más controvertido

Discusión general

de los dos genes aislados en moluscos es *Ltrk*, identificado en *Lymnaea stagnalis* (van Kesteren *et al.*, 1998). Éste posee gran parte de las características que definen los receptores Trk de vertebrados, pero carece del dominio de unión al ligando y su larga extensión en el extremo amino-terminal es del todo discordante. Ello destaca que la esencia de los receptores Trk no reside únicamente en su dominio tirosina quinasa, sino en todos y cada uno de los dominios que los componen, formando un conjunto capaz de llevar a cabo la diversidad de funciones asociadas a ellos.

En esta tesis doctoral se describe pues el primer receptor Trk aislado en un invertebrado (ver Capítulo V). *AmphiTrk* posee todas las características que definen a los tres receptores Trk de vertebrados (TrkA, TrkB y TrkC). La composición y la organización de sus dominios proteicos es idéntica a la de los receptores Trk y su secuencia peptídica lo relacionan por igual con TrkA, TrkB y TrkC. El paralelismo entre *AmphiTrk* y los tres receptores de vertebrados está incluso reflejado en su estructura génica (ver Capítulos V y VII). La compacta estructura de *AmphiTrk* a nivel genómico muestra una menor fragmentación de sus dominios, en algunos casos codificados enteramente por un único exón, pero en todo caso coincidiendo con las regiones intrónicas flanqueantes de los correspondientes en vertebrados. Este resultado rebate la idea de que los receptores Trk son una de las innovaciones evolutivas surgidas con el origen de los vertebrados. En base a la ausencia en otros invertebrados, estos datos indican que *AmphiTrk* es el actual representante y descendiente de un único gen ancestral ProtoTrk, ya presente en el ancestro común a todos los vertebrados.

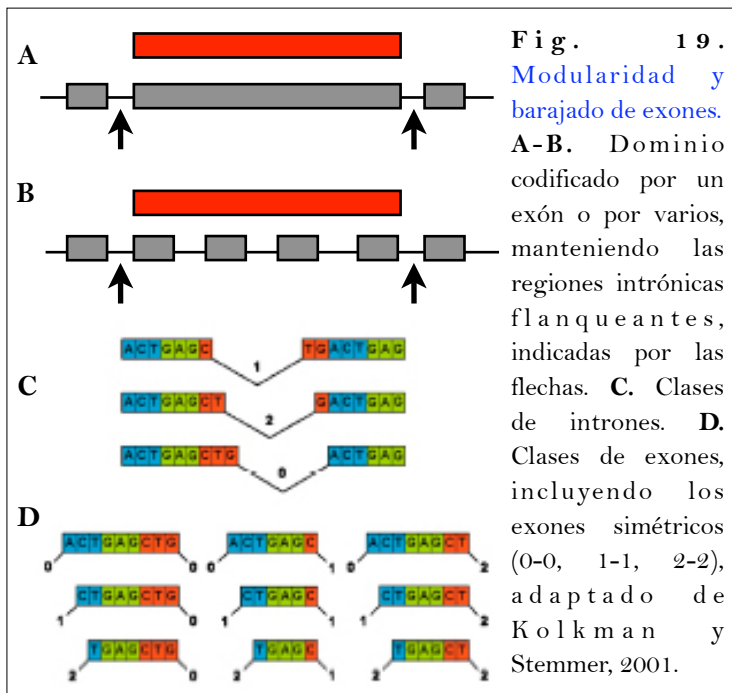
ORIGEN MOLECULAR DE LOS RECEPTORES TRK

Los receptores Trk son proteínas modulares cuya precisa combinación de dominios los hace únicos en su especie. En general, las proteínas modulares son muy abundantes en los metazoos. El limitado número de dominios proteicos contrasta con la casi ilimitada manera que tienen de combinarse entre sí, en diferentes proteínas (Tordai, 2005). Como en el caso de los receptores Trk, los dominios individuales de las proteínas modulares contribuyen de manera determinante en su función global. Todo ello indica que los diferentes dominios integrados en las distintas proteínas modulares son elementos evolutivamente móviles. Las principales propiedades que permiten la movilidad de estos dominios son su capacidad de pliegue independiente del entorno proteico en el

que están intercalados y su contención en exones individuales (Kolkman y Stemmer, 2001). Dichas características facilitan así el intercambio de estos dominios sin pérdida de su funcionalidad individual. El principal mecanismo a través del cual sucede este intercambio de dominios entre diferentes genes es el barajado de exones (*exon shuffling*), normalmente por recombinación intrónica ilegítima. De entre los diferentes mecanismos implicados en la generación de nuevos genes en el curso de la evolución, la proporción estimada de genes formados por barajado de exones asciende hasta un 19% en los eucariotas (Long *et al.*, 2003). Ello implica la notable importancia de este proceso durante la evolución de los metazoos y explica la conservación de determinadas estructuras peptídicas en proteínas sin relación alguna (Long *et al.*, 2003).

A pesar de que no siempre es fácil discernir con claridad el patrón de formación de un gen por barajado de exones, debido al dinamismo de la propia estructura exon-intrón, ciertas condiciones han sido destacadas como evidencias de este proceso. En primer lugar, un gen recientemente creado normalmente muestra, por comparación con sus descendientes, una marcada conservación de las regiones intrónicas que flanquean los exones que codifican para los extremos del dominio proteico que se ha transferido por barajado de exones. Si el dominio ha sido transferido muy recientemente puede estar aún codificado por un único exón, lo que facilita el intercambio sin pérdida funcional. No obstante, aún cuando el dominio está codificado por más de un exón, su integración por barajado de exones es todavía identificable. En segundo lugar, el intercambio de dominios está estrechamente relacionado con la simetría del exón o conjunto de exones transferidos (**Fig. 19**), evitando así la ruptura de la pauta de lectura (Patthy, 1999; Kaessmann *et al.*, 2002).

En base a estas premisas, la estructura génica de *AmphiTrk* sugiere la reciente formación, ya en el ancestro de cefalocordados y vertebrados, de un gen Trk primitivo probablemente generado por barajado de exones. En comparación con los genes de los receptores Trk humanos, *AmphiTrk* es codificado por un menor número de exones, pero en todo caso la posición de las regiones intrónicas que flanquean los extremos de cada dominio son idénticas en ambas especies. Como dato significativo, cuando la correspondencia entre los exones de los receptores de anfibio y humanos es de uno a más de uno, la suma de nucleótidos de los exones que en humanos codifican para un único dominio resulta en la longitud del único exón que codifica para el mismo dominio en el anfibio. La única excepción se encuentra en el miniexón número 9 de los receptores



humanos, cuya longitud es variable entre TrkA, TrkB y TrkC. Ello indica que a pesar de la expansión de los intrones en humanos, la región codificante ha mantenido su estructura génica en el curso de la evolución. De manera destacada, cada dominio inmunoglobulina está codificado por un exón en el anfioxo, mientras que en humanos el

primer dominio inmunoglobulina está repartido en dos exones. Aunque no se puede descartar la pérdida de un intrón en el linaje de los cefalocordados, los resultados indican que probablemente el intrón que divide el primer dominio inmunoglobulina en los receptores humanos surgió *de novo* durante la evolución de los vertebrados. Además de la contención del dominio completo en un único exón, ambos exones son simétricos en el anfioxo, lo que además de sugerir una inserción reciente en la proteína, plantea un barajado de exones viable en cuanto al mantenimiento de la funcionalidad del dominio en sí. Por el contrario, el intrón que divide el primer dominio inmunoglobulina de los receptores humanos genera la asimetría de los dos exones implicados, reduciendo la probabilidad de que ésta fuera la situación original. Aunque los dominios inmunoglobulina representan un ejemplo claro, el mismo planteamiento es aplicable para los tres intrones adicionales que aparecen en los receptores Trk humanos. Por comparación con el receptor Ltrk del molusco *Lymnaea*, que posee un dominio tirosina quinasa parecido al de los receptores Trk, y un “sandwich” formado por regiones ricas en leucinas y cisteínas, la innovación en el linaje de los Cordados parece concentrada en el núcleo central de la molécula, donde *AmphiTrk* presenta una estructura más compacta. La novedad de *AmphiTrk* radica pues en que por primera vez en la evolución todos los dominios indispensables para la formación de un receptor

Trk fueron reclutados en una única molécula, lo que induce a proponer la tentadora hipótesis de que ello sentó la base genética para el desarrollo de algunos de los aspectos más complejos que caracterizan a los vertebrados superiores.

EVOLUCIÓN FUNCIONAL

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

La mayoría de proteínas modulares son proteínas extracelulares o proteínas transmembrana dotadas de fracción extracelular (Kolkman y Stemmer, 2001). Ello sugiere que la elaboración de este tipo de moléculas ha contribuido de manera significativa en la evolución de la multicelularidad, un contexto en el que la comunicación intercelular ha adquirido una mayor relevancia. De hecho, algunos de los módulos proteicos presentes en este tipo de proteínas son compartidos por animales, plantas, hongos y protistas, lo que da una idea de su antigüedad. Como casos más representativos, los dominios tirosina quinasa y EGF (*Epidermal Growth Factor*) están presentes en todo tipo de eucariotas (King y Carroll, 2001). Otros dominios, como los LRR (dominios ricos en leucina) están incluso presentes en procariotas (Kobe y Kajava, 2001), y algunos otros, como los dominios inmunoglobulina, ligeramente más restringidos a los animales (Prosite DOC50835). No obstante, la elaboración de proteínas modulares podría tener sus orígenes en organismos como los coanoflagelados, en los que se han identificado algunos dominios de adhesión y señalización celular, en ocasiones combinados, pero de manera muy limitada. Entre éstos se hallan los dos únicos receptores transmembrana tirosina quinasa presentes fuera de los metazoos, de los cuales solo uno presenta dominios identificables en su fracción extracelular (King *et al.*, 2003). Aunque los coanoflagelados son organismos unicelulares, su capacidad de agregarse formando colonias se ha correlacionado con la modularización de algunas de sus proteínas.

La presencia de los mismos módulos proteicos en organismos tan dispares y evolutivamente tan distanciados, sugiere la reorganización constante de un material “básico” preexistente, en el curso de la evolución de los metazoos. Quizás ello ha permitido la diversificación de éstos dominios, que aunque son identificables por sus motivos conservados, han desarrollado características propias observables según el linaje y familia génica a la que pertenecen. De modo

Discusión general

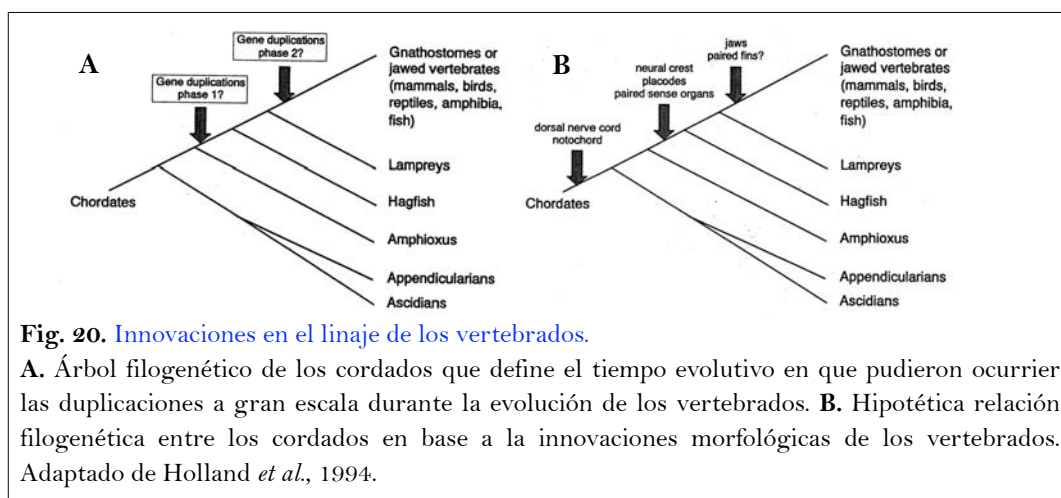
representativo, entre las diferentes subfamilias de dominios LRR, aquellos que se encuentran en la fracción extracelular de una proteína acostumbran a estar flanqueados por dominios ricos en cisteínas, lo que produce una ligera modificación en su conformación tridimensional primordial (Kajava, 1998). Este mismo fenómeno es observable en otros dominios proteicos, lo que sugiere una evolución independiente de cada dominio por separado, en paralelo con la evolución de los mismos dominios como parte integrante de las moléculas que los han ido incorporando, de manera que pequeños cambios conformacionales inducidos por dominios adyacentes podrían haber contribuido a la estabilidad de la molécula en su conjunto.

En el caso de los receptores Trk, la incorporación de dominios inmunoglobulina de tipo C2 a una molécula con capacidad catalítica intrínseca podría considerarse uno de los pasos más críticos que dio lugar a su origen en los cefalocordados. La presencia de los dominios inmunoglobulina es indispensable para la interacción Nt/Trk, lo que controla en gran parte la regulación del mismo sistema. Buena prueba de ello es la activación constitutiva del receptor cuando estos dominios son delecionados (Arevalo *et al.*, 2000). De esta manera, una única molécula ancestral, tipo AmphiTrk, no solo habría sido capaz de integrar información procedente del exterior de la célula sino que, además, habría adquirido la capacidad de hacerlo de manera controlada y específica a través de moléculas difusibles, que a su vez estarían sujetas a mecanismos de regulación propios. Ello integra dos componentes en un mismo sistema, añadiendo un nivel más de complejidad, susceptible de un mayor incremento por co-evolución de los dos miembros, como ha sucedido en el caso de los receptores Trk.

DUPLICACIÓN Y FUNCIÓN

Actualmente se sabe que la duplicación génica ha tenido un impacto decisivo en la elaboración del genoma de los vertebrados. Ello ha quedado implícito tras la completa secuenciación de los diferentes genomas, vertebrados e invertebrados, hasta la fecha disponibles (C.elegans Sequencing Consortium, 1998; Adams *et al.*, 2000; Venter *et al.*, 2001; Aparicio *et al.*, 2002; Waterston *et al.*, 2002; Dehal *et al.*, 2002) . El número total de genes estimados en los diferentes genomas indica que la duplicación génica fue exhaustiva en el linaje de los vertebrados, por lo menos tras la divergencia entre urocordados y vertebrados (Furlong y Holland, 2004). Sin embargo, los mecanismos por los cuales el

genoma de los vertebrados superiores ha alcanzado tal complejidad, son todavía sujeto de acalorado debate. Para ello la secuenciación y el análisis de los genomas de otros protocordados, en especial el de cefalocordados, y de vertebrados inferiores, como el de las lampreas y el pez brujo, sería de inestimable ayuda. Aún y así, la creciente información genómica y filogenética procedente de distintos cordados apoya sustancialmente la hipótesis que Susumo Ohno propuso (Hipótesis de las 2R), hace ya más de 30 años (Ohno, 1970), como uno de los principales mecanismos involucrados en la expansión del genoma de los vertebrados. En ella, Ohno proponía dos rondas de duplicación a gran escala, llegando a dos poliploidizaciones completas, separadas en el tiempo y coincidentes la primera con el origen de los vertebrados (de hecho en sus primeros trabajos propuso una duplicación genómica entre urocordados y cefalocordados, que fue refinando hasta situarla en el origen mismo de los vertebrados, tras la divergencia de los cefalocordados) y la segunda en las etapas tempranas de la evolución de los vertebrados. Posteriormente, el estudio de ciertas familias génicas en el anfibio y vertebrados inferiores podrían haber acotado el espacio temporal en que estas duplicaciones tuvieron lugar, situando la primera de ellas después de la separación entre cefalocordados y vertebrados, y la segunda de ellas después de la separación entre vertebrados no mandibulados y mandibulados (**Fig. 20A**). Dichos períodos temporales coinciden, además, con la aparición de caracteres morfológicos propios de los vertebrados (**Fig. 20B**), como son la cresta neural, las placodas y los órganos sensoriales pares, ya presentes en las lampreas y en el pez brujo, o como las mandíbulas, que surgieron posteriormente en el grupo formado por mamíferos, aves, reptiles, anfibios y



Discusión general

peces (Holland *et al.*, 1994). Cabe señalar que tras la secuenciación de varios genomas de peces teleósteos se han obtenido evidencias de una añadida duplicación total del genoma en este linaje en concreto, lo que ha sido correlacionado con la radiación de estos organismos y su adaptabilidad a la multitud y diversidad de ecosistemas en los que actualmente habitan (Jaillon *et al.*, 2004; Christoffels *et al.*, 2004; Hoegg *et al.*, 2004).

El modo en que esta masiva duplicación génica tuvo lugar en los vertebrados, bien por duplicación independiente de genes o por duplicación parcial o completa del genoma, es aún motivo de controversia. No obstante, el estudio de regiones de paralogía, en cromosomas de diferentes especies de cordados, ha aportado una valiosa información al respecto. Tras la secuenciación del genoma humano se estima la presencia de entre 400 y 500 paralogones, con una longitud media de 700Kb, donde estaría representado el 80% del genoma. Cada uno de estos paralogones aparece distribuido entre los distintos cromosomas de manera no aleatoria, lo que minimiza la probabilidad de que hayan surgido por duplicación de genes individuales, por tanto apoyando la duplicación total, y no parcial, del genoma, en el transcurso de la evolución (Panopoulou y Poutska, 2005). La presencia de paralogones no es exclusiva del genoma humano, este tipo de topología cromosómica también ha sido observada en otros genomas vertebrados, como el del ratón y el de los teleósteos, lo que indica que al menos una de las duplicaciones completas del genoma antecede a la separación entre los linajes de vertebrados mandibulados y no mandibulados (Lundin *et al.*, 2003; Dehal y Boore, 2005). En concreto, la caracterización de tres extensas regiones cuadruplicadas, correspondientes al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), el complejo extendido Hox y la familia génica de receptores para el factor de crecimiento fibroblástico (FGFR), representan evidencias de que el genoma de los vertebrados superiores pudo haber sido diseñado por doble tetraploidización del genoma en el ancestro de los vertebrados. Estas conclusiones se derivan principalmente de la comparación con la organización génica de los correspondientes genes, CMH y Hox, en el anfibio, donde los genes de los complejos preduplicativos mantienen un vínculo entre ellos y con otros genes circundantes, comparable al observado en las regiones cuadruplicadas de los vertebrados (Pollard y Holland, 2000; Castro *et al.*, 2004). Recientemente, un caso similar ha sido reportado tras la secuenciación del genoma de *Ciona intestinalis*. La sintenia entre paralogones humanos y de ascidias ha sido probada para la familia génica de la insulina-relaxina, lo que respalda la

duplicación completa del genoma tras la divergencia de los protocordados, acompañada de la posterior duplicación de genes individuales dentro del mismo complejo (Olinski *et al.*, 2006).

Con los datos de que se dispone actualmente el genoma del anfibio representaría, entonces, un estadio preduplicativo, similar al del genoma del ancestro, que tras el primer evento de duplicación a gran escala daría lugar a todos los vertebrados hoy existentes. En una situación ideal, la relación de genes ortólogos entre el anfibio y los vertebrados inferiores debería ser entonces de 1:2. De la misma manera, considerando un segundo evento de duplicación total del genoma tras la separación entre los vertebrados inferiores y superiores, la relación de genes ortólogos entre el anfibio y los vertebrados superiores debería ser entonces de 1:4. El análisis comparativo de 98 familias génicas compartidas por el anfibio y los mamíferos establece una relación mayoritaria de 1:2 (anfibio:mamíferos), aparentemente contradictoria en relación a las hipótesis planteadas (Furlong y Holland, 2002). No obstante, cabe señalar que los genomas en general son dinámicos y que los destinos de un gen duplicado son muy diversos (ver Introducción). Por tanto, estos resultados sugieren una importante pérdida de genes en el linaje de los vertebrados, que podría estar correlacionada con la diploidización de un genoma octoploide, ancestral para todo los vertebrados (Furlong y Holland, 2002) o diploidización de un genoma tetraploide, ancestral para los vertebrados inferiores, seguida de la diploidización de un genoma octoploide, ancestral para los vertebrados superiores.

En el caso de los receptores Trk, el análisis comparativo entre el único receptor Trk del anfibio y los receptores Trk de vertebrados respalda la hipótesis 2R, estableciendo una relación de de 1:3 (anfibio:mamíferos y aves), lo que sugiere la pérdida de un receptor tras la divergencia entre agnatos y gnatostomados (ver Capítulos V y VII). *AmphiTrk* aparece en la base de los tres receptores TrkA, TrkB y TrkC, de mamíferos y aves, estableciendo una relación ecuánime con todos ellos. Esta relación de ortología, entre *AmphiTrk* y los tres receptores Trk, indica que el genoma del anfibio actual posee un representante del único gen ProtoTrk que dio lugar a toda una familia génica en los vertebrados. Los dos receptores aislados en lampreas (LfTrk-1 y Lf-Trk-2) son secuencias parciales del dominio tirosina-quinasa (Hallböök *et al.*, 1998), con lo que es difícil discernir si se trata de genuinos representantes de la relación 1:2 (anfibio:vertebrados inferiores), o se trata de genes procedentes de una duplicación específica del linaje de las lampreas. La identificación de los

Discusión general

representantes de Trk en el pez brujo (recientemente se ha construido una genoteca de *Mixine glutinosa* en BACs, P.W.H. Holland, comunicación personal) sin duda clarificará este estadio intermedio en la historia evolutiva de la familia Trk. La pérdida del cuarto miembro en esta familia génica en vertebrados superiores se ha propuesto en base a la disposición de los distintos receptores Trk, en los diferentes cladogramas realizados, que agrupan en todos los casos a TrkB con TrkC, dejando de lado a TrkA, dentro de la misma rama de los vertebrados (Ver Fig. 4 de Capítulo V). Ello sugiere la pérdida de un gen parálogo de TrkA tras la separación entre vertebrados no mandibulados y mandibulados. Aunque en los peces teleósteos se han descrito cinco receptores Trk: zfTrkA, zfTrkB1, zfTrkB2, zfTrkC1 y zfTrkC2 (Martin *et al.*, 1995), el análisis filogenético respalda la pérdida del parálogo de TrkA, previa a la duplicación extra del genoma en este linaje, que explica el incremento de receptores Trk. Por tanto, considerando la segunda ronda de duplicación a gran escala, quizás aún sería posible, si quedara rastro actual de dicha duplicación ancestral, identificar cuatro receptores Trk en alguno de los genomas no analizados de los primitivos peces cartilagosos.

Un importante dato a añadir es la distribución cromosómica de los receptores Trk y sus ligandos en regiones de paralogía, tanto en el genoma humano como en el del ratón. En cada caso, cada uno de los miembros de dichas familias aparece en un cromosoma diferente, donde son acompañados por los respectivos parálogos y ortólogos de otras familias génicas (Hallböök *et al.*, 1998; Hallböök, 1999). Esta sinténia entre el ratón y humanos, apoya pues, que la segunda ola de expansión de los receptores Trk sucedió por duplicación total del genoma, y no por duplicación en tándem de dos copias similares a las de las lampreas, y sugiere que en algún momento en la historia evolutiva de los receptores Trk existió algún organismo cuyo genoma contenía cuatro copias. Como evidencia de lo último, podría considerarse el cuarto segmento cromosómico parálogo observado en humanos, que aunque carece de un cuarto receptor Trk, contiene los parálogos de aquellos genes que circundan a cada uno de los genes Trk en las correspondientes regiones parálogas. Asimismo, cabe señalar, que el sistema NT/Trk en vertebrados superiores está formado por cuatro neurotrofinas y tres receptores Trk. Por tanto, no se puede descartar la posibilidad de que una de las cuatro neurotrofinas, actualmente conocidas, sea descendiente del ligando para el parálogo extinto y haya co-evolucionado con el resto de receptores. En este contexto, quizás Nt-3 sería la mejor candidata, dada

su capacidad para interactuar y provocar una respuesta a través de los tres receptores TrkA, TrkB y TrkC.

Aunque la duplicación no siempre conlleva neofuncionalización, la diversificación funcional de los receptores Trk parece estar estrechamente correlacionada con estos eventos. La multiplicación de receptores y ligandos en el sistema Nt/Trk podría ser responsable de la co-opción de dichos duetos en distintos territorios, coincidiendo, además, con la diversificación de tipos celulares, tejidos y estructuras nuevas en los vertebrados. Asimismo dicho incremento podría haber incentivado la promiscuidad de interacción entre los distintos miembros, ampliando así su espectro de acción. Los profundos cambios en el ritmo y modo de desarrollo embrionario, asociado a los distintos grupos de vertebrados, también podrían correlacionarse con la dinámica espacio-temporal descrita para la expresión de los receptores Trk en dichos organismos. En vertebrados superiores, los receptores Trk no sólo son expresados por un amplio rango de tipos celulares, sino también en diferentes etapas del desarrollo embrionario y post-natal, incluso de manera combinatorial, es decir, en una misma célula diferentes pares pueden actuar a distintos tiempos, dando como resultado efectos muy dispares. Esta capacidad combinatoria espacio-temporal pudo haber permitido, especialmente en mamíferos, con periodos de gestación y desarrollo nervioso post-natal largos en comparación con otros vertebrados, el desarrollo de sistemas nervioso extraordinariamente complejos.

SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

Una de las principales cuestiones que acecha desde hace años al sistema neurotrófico Nt/Trk es averiguar cómo este relativamente reducido número de receptores es capaz de mediar, a través de las neurotrofinas, efectos biológicos tan diversos y complejos, a la vez que altamente específicos. Más allá de las funciones clásicas de supervivencia y diferenciación neuronales, esenciales para la elaboración del sistema nervioso, los receptores Trk y las neurotrofinas también están estrechamente involucrados en la regulación del crecimiento axonal y dendrítico, la estructuración, conectividad y plasticidad sináptica, la liberación de neurotransmisores y la potenciación a largo plazo (PLP), lo que los hace participe de funciones neuronales superiores (Chao, 2003).

El mecanismo por el cual los receptores Trk se activan por unión a sus ligandos es similar al de otros receptores tirosina quinasa. El contacto entre el

Discusión general

receptor y su ligando provoca un cambio conformacional del monómero que facilita el reclutamiento y dimerización de los receptores en la membrana plasmática. Como consecuencia de la dimerización, el acercamiento de los dominios tirosina quinasa de ambas subunidades, permite la fosforilación cruzada de residuos tirosina específicos, localizados en el bucle de autoactivación (ver Fig. 13). Este proceso conduce a la potenciación del poder catalítico del receptor, desencadenando toda una serie de fosforilaciones en residuos específicos de su dominio intracelular. La conformación abierta que adopta entonces la fracción intracelular del dímero permite el acceso de diferentes proteínas intracelulares, que se unen a sus respectivos puntos de anclaje para iniciar las vías de transducción de señal activadas por este sistema. Quizás uno de los aspectos más sorprendentes del sistema de señalización Nt/Trk, es que las principales vías de señalización activadas: Ras/Raf/Erk, PI3K/AkT y PLC γ , son también activadas por otros sistemas ligando/receptor con consecuencias muy distintas. En este contexto, el modo, lugar, tiempo, tipo de receptor Trk y tipo de neurotrofina involucrados parece ser crucial para que a través de cascadas bioquímicas convencionales se den resultados tan extraordinarios (Segal, 2003).

El primer factor de variabilidad es la naturaleza del receptor y del ligando que participan de la interacción. Cada uno de los receptores Trk muestra una destacada preferencia por cada una de la neurotrofinas, siendo TrkA, TrkB y TrkC, receptores para NGF, BDNF y NT4/5, y NT-3, respectivamente. Esta especificidad es principalmente dictada por los dominios inmunoglobulina (*Ig-like*) de cada uno de los receptores, que además de inhibir su activación espontánea, establecen contacto directo, a través del segundo dominio *Ig-like*, con algunas de las regiones variables y específicas de las correspondientes neurotrofinas, contribuyendo de manera decisiva a la unión ligando-receptor (Urfer *et al.*, 1995; Ultsch *et al.*, 1999; Wiesmann, 1999). Otros dominios extracelulares están también implicados en la estabilización del complejo, pero sin duda uno de los factores más determinantes es la presencia o ausencia de una pequeña cadena de aminoácidos localizada en la región yuxtamembrana, adyacente al segundo dominio *Ig-like*. Las isoformas de TrkA y TrkB que carecen de este inserto son únicamente activadas de manera eficiente por NGF y BDNF, respectivamente. Sin embargo, las isoformas de TrkA y TrkB que presentan el inserto, son adicionalmente activadas por Nt-3, en ambos casos, y además por Nt-4, en el caso de TrkB (Clary y Reichardt, 1994; Strohmaier *et al.*, 1996). La presencia o ausencia de dicha cadena polipeptídica está regulada por *splicing*

alternativo en los tres receptores, aunque para TrkC no se han descrito las consecuencias de dicha variación. Dado el patrón de expresión, diferencial para las formas alteradas por *splicing* alternativo, éste podría ser uno de los mecanismos a través de los cuales se regula la dependencia de ciertas poblaciones neuronales ante la disponibilidad de las diferentes neurotrofinas (Boeshore *et al.*, 1999). El papel que juega el *splicing* alternativo en la familia de receptores Trk no está únicamente restringido a la regulación de la promiscuidad entre ligandos y receptores, sino también a los efectos biológicos que de éstos se derivan. De modo ilustrativo, algunas isoformas truncadas en su dominio intracelular y, por tanto, privadas de su capacidad catalítica intrínseca, son capaces de alterar el metabolismo celular, en el caso de TrkB-T1 y TrkB-T2, o de inducir la diferenciación neuronal en colaboración o no con p75, como es el caso de la forma truncada de TrkC (Baxter *et al.*, 1997; Hapner *et al.*, 1998; Yacoubian y Donald, 2000; Ichinose y Snider, 2000; Cronk *et al.*, 2002).

Otros factores de variabilidad que afectan al sistema Nt/Trk se refieren, por ejemplo, a la diversidad de poblaciones neuronales que los expresan, cuya supervivencia depende en cada caso de diferentes “sets” Nt/Trk, como ha sido demostrado en ratones deficientes (ver Tabla 2). El periodo en el que se expresan también afecta a sus funciones, ya sea en relación al desarrollo embrionario o post-natal, o localmente en respuesta a una secreción sostenida o puntual de neurotrofinas. En adultos, por ejemplo, el sistema Nt/Trk está activamente implicado en regeneración neuronal (Sofroniew *et al.*, 2001). Por otro lado, las acciones rápidas de las neurotrofinas, a través de los receptores Trk, modulan ampliamente diferentes aspectos de la transmisión y plasticidad sinápticas dependientes de actividad (Blum y Konnerth, 2005). Todo ello ofrece un contexto intracelular variable, que diversifica el conjunto de proteínas citoplasmáticas capaces de interactuar en cada momento con la fracción intracitosólica de cada uno de los receptores Trk, cuya accesibilidad depende asimismo de su localización subcelular en cada situación.

Quizás uno de los aspectos más relevantes de la señalización intracelular del sistema Nt/Trk, desde un punto de vista evolutivo, es la capacidad de mediar eventos de PLP, actualmente considerados como la base fisiológica de la memoria y de la capacidad de aprendizaje en vertebrados (Chao, 2003). Dichos eventos de PLP han sido principalmente estudiados en el hipocampo, donde TrkB a través de su estimulación por BDNF ha demostrado tener un papel trascendental. En este sentido, la señalización a través de PLC γ ha mostrado ser necesaria e

Discusión general

imprescindible para inducir ambas etapas de PLP: la etapa temprana, independiente de transcripción génica, y la etapa tardía, de efecto duradero y dependiente de transcripción génica. La activación de PLC γ por los receptores Trk provoca, como efecto inmediato un incremento en los niveles de Ca²⁺ intracelular, que potencian la actividad de enzimas dependientes de calcio, incidiendo de manera determinante sobre la actividad de las quinasas CaM que regulan la función sináptica y mediando la activación de CREB, independientemente de la vía Ras/Raf/Erk (Minichiello *et al.*, 2002; Ernfors y Bramham, 2003). Si bien la supresión de la vía de PLC γ produce un significativo déficit de memoria, la potenciación de la misma vía, por sobreexpresión, resulta en la facilitación de la memoria y el aprendizaje, así como en la reducción de la ansiedad (Koponen *et al.*, 2004), lo que establece un estrecho vínculo entre el sistema Nt/Trk y algunas de las funciones neuronales más complejas, como la modulación de la capacidad cognitiva y el comportamiento complejo.

Como anticipaba la estructura peptídica de Amphitrk, el único receptor Trk del anfibio podría considerarse funcionalmente equivalente a los tres receptores Trk de vertebrados. A pesar de más de 500 MA de divergencia, Amphitrk es capaz de interactuar de manera ecuánime con las cuatro neurotrofinas testadas: NGF, BDNF, Nt4/5 y Nt3, como demuestra la fosforilación de dianas intracelulares tras su estimulación con los correspondientes ligandos de mamífero (ver Capítulo V). Esta indiscriminada unión a las diferentes neurotrofinas sugiere una ausencia de mecanismos implicados en la regulación de la interacción ligando-receptor, probablemente necesaria cuando diferentes ligandos son capaces de interactuar con un mismo receptor. De manera destacada, las acciones de Amphitrk no parecen ser reguladas por *splicing* alternativo, como ocurre en los vertebrados. El escrutinio de la genoteca de cDNA de *B. floridae*, de diferentes etapas del desarrollo, no proporcionó evidencia alguna de que las copias aisladas correspondieran a ningún ARN mensajero que pudiera haber estado sometido a tal proceso. Asimismo, la estructura génica de *Amphitrk* sugiere robustamente que el receptor del anfibio es probablemente incapaz de regular su flexibilidad ante diferentes ligandos por *splicing* alternativo de la secuencia, que en vertebrados, condiciona la promiscuidad entre los distintos ligandos y receptores. En los receptores humanos, esta secuencia está codificada por un miniexón (número 9) independiente, de longitud variable, entre TrkA, TrkB y TrkC. La secuencia equivalente en el anfibio está incluida en el exón número 8, que comprende

además la parte yuxtamembrana adyacente a la región transmembrana, que en humanos está codificada por el exón que precede al mencionado miniexón (ver Capítulo V y VII). Todo ello indica pues que el ligando natural de AmphiTrk es una neurotrofina de copia única en el genoma preduplicativo del anfibio.

El dominio intracitoplasmático de AmphiTrk contiene todos los residuos necesarios para llevar a cabo su función catalítica como receptor neurotrófico. Previa estimulación con las neurotrofinas de mamíferos, AmphiTrk es capaz de activar las vías de señalización intracelular Ras/Raf/Erk y PI3K/Akt, como se desprende de la fosforilación de Erk1, Erk2 y Akt en células en cultivo de feocromocitoma de rata, defectivas para la expresión de TrkA, TrkB y TrkC (PC12nr5) (ver Capítulo V). Estos resultados sugieren que AmphiTrk es capaz de regular la diferenciación y la supervivencia neuronales, y quizás otros de los efectos impulsados a través de estas mismas vías de señalización, aunque todavía no se tiene prueba de ello. Actualmente se sabe de la interacción cruzada entre diferentes cascadas de señalización, coexistentes en tiempo y lugar, con las iniciadas por el sistema Nt/Trk. Ello podría correlacionarse con el incremento de dominios de interacción proteína-proteína, revelado tras la secuenciación del genoma humano, en diferentes proteínas neuronales (Venter *et al.*, 2001), lo que ampliaría sustancialmente la versatilidad del sistema Nt/Trk, observada en vertebrados superiores. Sin duda uno de los rasgos que caracteriza a AmphiTrk es la ausencia del residuo responsable para el reclutamiento y activación de PLC γ . De manera consistente, AmphiTrk es incapaz de fosforilar a PLC γ , como muestran los resultados de expresión y estimulación heteróloga en células en cultivo de mamífero (ver Capítulo V), indicando la ausencia de esta vía de señalización en el anfibio, al menos a través de este sistema (**Fig. 21**). Dada la implicación de esta vía de señalización intracelular en funciones neuronales superiores, ello es de destacada relevancia a nivel evolutivo. El acoplamiento de PLC γ al sistema de señalización Nt/Trk, podría ser una innovación de los vertebrados, lo que podría haber contribuido de manera decisiva en el desarrollo de los aspectos más complejos del sistema nervioso de los vertebrados, culminando en algunos de los aspectos que caracterizan la propia personalidad humana.

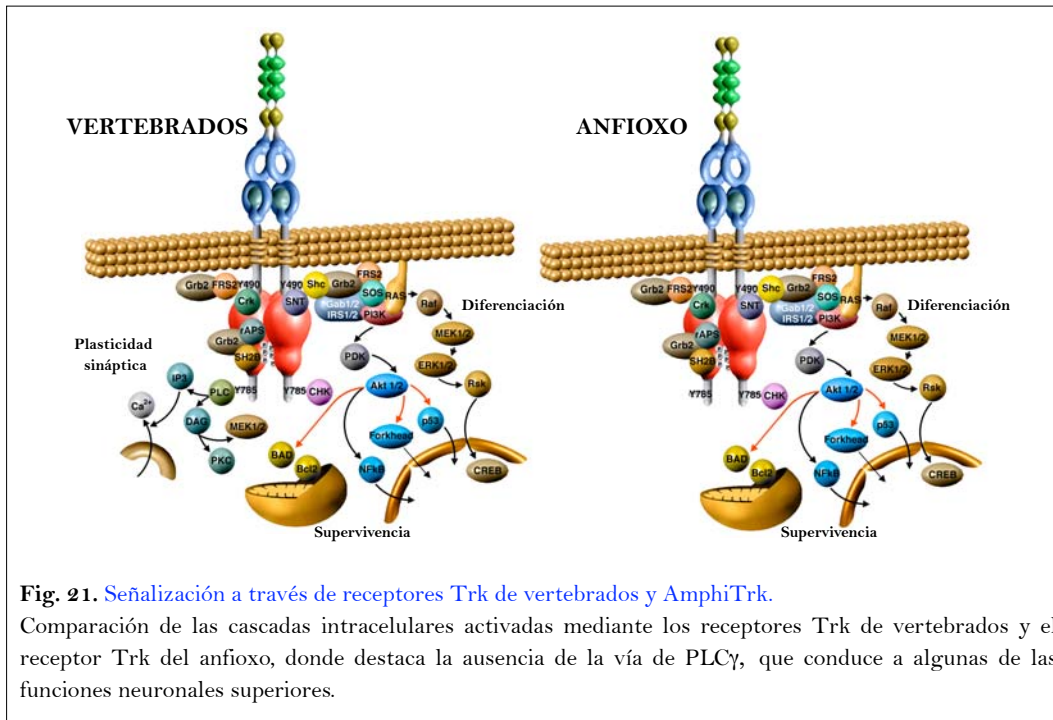


Fig. 21. Señalización a través de receptores Trk de vertebrados y AmphiTrk. Comparación de las cascadas intracelulares activadas mediante los receptores Trk de vertebrados y el receptor Trk del anfiexo, donde destaca la ausencia de la vía de PLCγ, que conduce a algunas de las funciones neuronales superiores.

EXPRESIÓN

La variedad de efectos biológicos mediados por el sistema Nt/Trk queda en cierta manera plasmada por el complejo patrón de expresión que cada uno de sus miembros muestra durante el desarrollo embrionario y post-natal de los diferentes vertebrados en que se han estudiado. Los receptores Trk y sus ligandos son ampliamente expresados por distintas poblaciones neuronales del sistema nervioso central y periférico, y aunque en menor grado, también por tejidos extraneurales. Ello implica un diverso contexto celular, espacio-temporal, que probablemente ha contribuido a la diversificación de las funciones de este sistema, incidiendo de manera decisiva sobre el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso vertebrado.

Desde del punto de vista evolutivo, uno de los aspectos más interesantes del sistema Nt/Trk es su distintiva expresión en tejidos que representan algunas de la innovaciones morfológicas con mayor impacto en la evolución de los vertebrados: la cresta neural y las placodas (ver Fig. 20). La cresta neural, que por sus extraordinarias propiedades ha llegado incluso a ser denominada la “cuarta” hoja embrionaria (Hall, 1999), surge de la confluencia entre el

neuroectodermo y el ectodermo, en los bordes de la placa neural, durante la neurulación temprana del embrión vertebrado. La principal razón por la que se la podría considerar una “cuarta” hoja embrionaria es a la pluripotencia de sus células, que dan lugar a una gran variedad de estructuras, comparable a las que se derivan del endodermo, mesodermo o ectodermo, pero mucho más especializadas y absolutamente definitorias de los vertebrados. Si bien el ectodermo y el endodermo están ya presentes en estadios muy iniciales del desarrollo, el mesodermo aparece por inducción secundaria derivada de la interacción entre las dos hojas embrionarias primarias, de manera similar a la cresta neural, que aparece por inducción neural durante los estadios tempranos del desarrollo (Hall, 1999). Esta peculiar población celular embrionaria es capaz de migrar largas distancias hasta colonizar los respectivos territorios donde las células se diferenciarán para desarrollar diferentes estructuras. Esta migración comporta una transición epitelio-mesénquima, que permite el movimiento individual de dichas células a través de rutas bien definidas. Las placodas también se originan en la confluencia entre el neuroectodermo y el ectodermo, pero en este caso en los laterales del tubo nervioso anterior, por engrosamiento local del ectodermo, en diferentes puntos en el eje antero-posterior. Mediante este proceso se originan poblaciones neuronales específicas que contribuyen de manera indispensable al sistema óptico (placoda de las lentes), auditivo (oído interno), adenohipofisario (placoda de la adenohipófisis) y sensorial (parte del sistema nervioso periférico, ganglios sensoriales localizados en el sistema nervioso central y, en peces y anfibios, la línea lateral).

La cresta neural y prácticamente todos sus derivados, así como también las placodas, expresan, en algún momento del desarrollo, alguno de los receptores Trk y sus ligandos (Lindsay, 1996; Bibel y Barde, 2000). Aparentemente las distintas poblaciones neuronales parecen modular, a lo largo del desarrollo, la expresión de los diferentes receptores Trk, en función de las condiciones microambientales, incluyendo la disponibilidad de las distintas neurotrofinas en cada momento y territorio (Huang y Reichardt, 2001). En este sentido, es de destacada relevancia la expresión de los receptores Trk en células de la cresta neural durante su migración (Airaksinen y Meyer, 1996), así como la expresión mesenquimática de Nt-3, inducida por la transición epitelio-mesénquima (Patapoutian *et al.*, 1999; O'Connor y Tessier-Lavigne, 1999). Durante la gangliogénesis, la co-expresión o expresión secuencial de los receptores Trk dictamina la composición neuronal de los ganglios (Huang *et al.*,

Discusión general

1999), y contribuye a la especialización funcional de las subpoblaciones neuronales constituyentes (Ernfors, 2001). Además, los receptores Trk se expresan durante el desarrollo de los dientes y de la línea lateral, estructuras exclusivas de los mandibulados y de los peces y anfibios, respectivamente (Luukko *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1998).

El origen evolutivo de la cresta neural y las placodas es desde hace mucho motivo de acalorado debate, ya que tras un siglo de investigaciones todavía no existe evidencia clara que trace el mecanismo morfogenético que inició tal evento. Algunos de los genes implicados en la especificación inicial de la cresta neural pre-migratoria presentan un patrón de expresión común entre el anfibio y los vertebrados, lo que sugiere que los mecanismos de especificación en los bordes de la placa neural están conservados. Sin embargo, los genes implicados en la determinación de la identidad de estas células, como células de la cresta neural migratoria, se expresan en otros territorios, lo que dificulta conceptualmente que las células del borde de la placa neural del anfibio puedan llegar a alcanzar un estado en el que delaminen para posteriormente colonizar otros territorios donde diferenciarse (Meulemans y Bronner-Fraser, 2004). Esta situación es compartida por los urocordados. Ello sugiere que al menos parte de la maquinaria genética que pudo originar la cresta neural en los vertebrados ya estaba presente en el ancestro común a todos ellos, pero que la pluripotencia y capacidad migratoria probablemente aparecieron en etapas muy tempranas de la evolución de los vertebrados.

El patrón de expresión de *AmphiTrk*, durante la neurulación del anfibio define cierta población de células en la epidermis embrionaria. Éstas poseen una morfología característicamente fusiforme, que claramente las diferencia del resto de células epidérmicas. Las primeras células positivas para *AmphiTrk* aparecen de manera dispersa al inicio de la neurulación, en la línea media ventral del embrión, pero a medida que el desarrollo embrionario avanza, incrementan en número y su posición es desplazada en dirección dorsal (ver Capítulo V). La disposición aparentemente desorganizada de estas células en los flancos de la nébula tardía concuerda con la presencia, en posiciones similares, de diferentes neuronas sensoriales descritas en la piel de larvas y adultos (Bone y Best, 1978). En el momento en que se realizó dicho estudio de expresión, no había otros datos que aportaran evidencia de la presencia de precursores neuronales en la epidermis de embriones tan jóvenes. Por este motivo, se procedió a la búsqueda de marcadores epidérmicos que pudieran destacar la presencia de subpoblaciones diferenciales

en el ectodermo embrionario. Ello condujo al estudio de la expresión de *AmphiElav* (ver Capítulo VI), el miembro en anfibio de la familia génica Elav/Hu, que en vertebrados se expresa en neuroblastos proliferativos y neuronas post-mitóticas del sistema nervioso central y periférico (Akamatsu *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000). El patrón de expresión epidérmica de *AmphiElav*, durante la neurulación del anfibio, es prácticamente idéntico al de *AmphiTrk*, pero ligeramente retardado en el tiempo. Ello indica que las células que expresan *AmphiTrk* son probablemente precursores neuronales en proceso de diferenciación, una tesis que además viene reforzada por la capacidad de *AmphiTrk*, a nivel bioquímico, para activar las correspondientes cascadas de señalización intracelular (ver Capítulo V).

Uno de los aspectos más fascinantes de la expresión de *AmphiTrk* y *AmphiElav* en la epidermis embrionaria es el desplazamiento dorsal del marcaje, en ambos casos, de precursores neuronales en el transcurso del desarrollo. En vertebrados, como se ha discutido anteriormente, los receptores Trk se expresan en células migratorias de la cresta neural. Ésta topología es compartida en parte por algunos de los genes Elav/Hu de vertebrados, cuya expresión es específica para precursores neuronales, derivados de la cresta neural, en sus últimas fases de migración (Wakamatsu y Weston, 1997). Ello sugiere que los precursores neuronales epidérmicos, marcados por la expresión de *AmphiTrk* y *AmphiElav*, presentan al menos parte de la maquinaria molecular, que en vertebrados está implicada en la adopción de un fenotipo migratorio. En los cordados invertebrados la única descripción de células migratorias corresponde a las células pigmentarias del urocordado *Ecteinascidia turbinata* (Jeffery *et al.*, 2004). Previa a esta publicación y sin indicios de células migratorias en el anfibio, se realizaron los primeros estudios de linaje celular *in vivo* durante la neurulación de *B. floridae* (ver Capítulo V). Con el objetivo de identificar células migratorias en el ectodermo embrionario, se marcó la línea media ventral de los embriones justo en el momento de su eclosión, etapa que viene precedida inmediatamente por la expresión inicial de *AmphiTrk* en la epidermis. Para ello se utilizó un colorante lipofílico vital (DiI), que es preferencialmente absorbido por las membranas de las células neuronales (Holland y Yu, 2002). Los embriones fueron observados en el momento del marcaje, para confirmar la localización inicial del colorante, y posteriormente cultivados hasta alcanzar el estadio de neurula tardía, coincidiendo así con las últimas etapas del desarrollo en que *AmphiTrk* se expresa en la epidermis. El patrón de fluorescencia observado en la neurula

Discusión general

tardía reveló la presencia de células que individualmente habían migrado desde la parte ventral, en que fueron inicialmente marcadas, hasta regiones más dorsales de los flancos del embrión. Este comportamiento migratorio encaja perfectamente con la dorsalización de la señal de *AmphiTrk* y *AmphiElav*, destacando que el ectodermo embrionario del anfibio posee células migratorias, que probablemente corresponden a los precursores de las neuronas sensoriales epidérmicas. Aunque se debería estudiar la co-localización de *AmphiTrk* en las células migratorias marcadas con DiI, estos resultados, junto con los patrones de expresión de los receptores Trk en vertebrados, sugieren que *AmphiTrk* es expresado por precursores neuronales migratorios, de una manera semejante a lo observado en la cresta neural. Cabe señalar, además, que la localización detallada, en secciones histológicas, de las células positivas, tanto para *AmphiTrk* como para *AmphiElav*, sitúa dichos precursores dentro de la capa epidérmica y, en ocasiones, justamente por debajo de ésta. Ello sugiere que estas células podrían estar

migrando a través de la capa subyacente a la epidermis, un comportamiento que evoca al de la transición epitelio-mesénquima de las células de la cresta neural (**Fig. 22**).

Como se ha mencionado previamente, los receptores Trk también son expresados por células de diferentes placodas, durante ciertas etapas de su formación y desarrollo. En el anfibio, como en el resto de protocordados, no existe evidencia alguna de la presencia de placodas morfológicamente identificables. No obstante, existen algunas estructuras en el anfibio, que en base a ciertos caracteres morfológicos y moleculares se han comparado con el sistema olfativo y adenohipofisario de los vertebrados. Entre éstos se encuentra los corpúsculos de Quatrefages (ver Capítulo I), cuyo primordio expresa *AmphiTrk* durante un breve período de

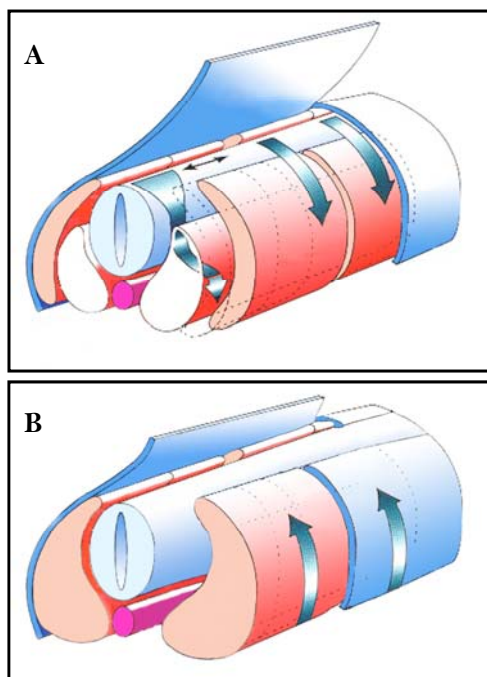


Fig. 22. Comparación entre el comportamiento de la cresta neural de vertebrados (A) y el de las células epidérmicas migratorias del ectodermo embrionario del anfibio (B).

tiempo, en los estadios de larva temprana (ver Capítulo V). Esta estructura conforma un órgano presumiblemente sensorial, sin igual en el resto de los cordados. Sus neuronas encapsuladas, acumuladas en el extremo rostral, hacen sinapsis con neuronas del sistema nervioso central, característica por la cual han sido comparadas con la placoda olfativa de vertebrados, que es la única formada por neuronas primarias, y no secundarias (Holland y Holland, 2001). No obstante, no hay pruebas que rechacen la presencia de neuronas secundarias en los corpúsculos de *Quatrefages*, por lo que no se puede descartar su homología con la placoda del oído interno, donde también ha sido destacado el papel del sistema Nt/Trk (Fritzsich *et al.*, 2005; Fritzsich, comunicación personal). *AmphiTrk* también se expresa durante la formación de la fosilla de Hatscheck, durante los estadios larvarios, y posteriormente en el adulto. Aunque esta estructura no forma parte del sistema nervioso en sentido estricto, su heterogeneidad queda plasmada por la diversidad de genes expresados en sus diferentes tipos celulares, algunos de ellos de naturaleza neuronal y endocrina, por lo que se ha establecido un paralelismo con la adenohipófisis de vertebrados (Gorbman *et al.*, 1999). La restrictiva y localizada expresión de *AmphiTrk* en el interior de la fosilla de Hatscheck es comparable a la de los receptores Trk en la glándula pituitaria anterior de los vertebrados (Aguado *et al.*, 1998), lo que sugiere que el anfibio podría tener un sistema hipotálamo-hipofisario rudimentario.

En el sistema nervioso central, *AmphiTrk* no se expresa hasta estadios adultos, donde lo hace en poblaciones particulares de motoneuronas e interneuronas. La falta de expresión en el tubo nervioso durante la embriogénesis es consistente, en términos generales, con el fenotipo de los ratones deficientes para los receptores Trk, que no muestran una reducción significativa en el número de motoneuronas. Una posible explicación es que la dependencia neurotrófica de las motoneuronas pueda ser compensada por su accesibilidad a otros factores tróficos (Huang y Reichardt, 2001). Así, la ausencia de *AmphiTrk* en el sistema nervioso central durante la embriogénesis sugiere que la neurogénesis embrionaria en anfibio, patente por el hecho, entre otros, de que *AmphiElav* se exprese en el tubo nervioso en desarrollo (ver Capítulo VI) dependa de otras moléculas, particularmente otros factores tróficos. La expresión de *AmphiTrk* en el tubo nervioso adulto sugiere, por tanto, su implicación en funciones más elaboradas que la simple supervivencia neuronal, a través de las mismas vías de señalización Ras/Raf/Erk y PI3K/Akt.

Reflexión final y perspectivas

Sin duda, uno de los aspectos que diferencia al hombre, como especie, del resto de animales es la complejidad de su sistema nervioso. Éste nos dota de capacidades extraordinarias que incluyen un variado repertorio de sentimientos, sofisticados comportamientos, la utilización de herramientas y del lenguaje, el pensamiento simbólico y el aprendizaje cultural. Con la llegada de la biología molecular, la genética heredó de la morfología la responsabilidad de explicar el porqué de la complejidad de nuestro sistema nervioso. Sin embargo, tras la secuenciación del genoma humano, muchos de los interrogantes siguen abiertos.

En vísperas de la era post-genómica, la base genética de la complejidad del sistema nervioso humano se ha visto oscurecida por el elevado porcentaje de genes compartidos con otros mamíferos. Ello ha dirigido la mirada hacia genomas invertebrados, en búsqueda de genes de presencia y funcionalidad exclusiva en el sistema nervioso vertebrado, realzando así el interés sobre las grandes transiciones ocurridas en el Reino Animal. Aún y así, el número de genes candidatos que pudieran satisfacer dichos criterios ha sido reducido significativamente tras la secuenciación de los genomas de *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *Ciona intestinalis*. Entre este restringido número de genes candidatos se encuentra la familia génica de los receptores Trk, sus ligandos las neurotrofinas, y el receptor p75, que por su ausencia en genomas invertebrados y su implicación en funciones neuronales superiores, han sido aclamados como innovaciones de los vertebrados. El trabajo aquí presentado rebate esta idea y propone que el origen del sistema neurotrófico Nt-Trk-p75 se

Discusión general

remonta al menos 550 millones de años atrás, en el escenario de una de las grandes transiciones del reino animal, la transición invertebrados/vertebrados.

El único receptor Trk presente en el genoma del anfibio, *AmphiTrk*, es probablemente el único representante actual de un hipotético gen ancestral *ProtoTrk*, que en vertebrados dio lugar a toda una familia génica de receptores neurotróficos. Ello queda plasmado por el paralelismo entre *AmphiTrk* y los diferentes tipos de receptores vertebrados, *TrkA*, *TrkB* y *TrkC*, no sólo por su estructura peptídica sino también por el análisis filogenético, que sitúa en todo caso a *AmphiTrk* en la base evolutiva de todos los receptores Trk de vertebrados. De manera congruente, la trinidad funcional de *AmphiTrk* queda reflejada por su capacidad de interactuar con todas las neurotrofinas de mamíferos. Sin embargo, tras la estimulación con NGF, BDNF, Nt4/5 o Nt3, *AmphiTrk* sólo es capaz de activar las cascadas de señalización principalmente implicadas en diferenciación y supervivencia neuronal, quedando fuera de su alcance la potencialidad de llevar a cabo funciones neuronales superiores, debido a la ausencia de señalización a través de la vía de PLC γ , lo que exalta aún más su naturaleza primitiva.

Del patrón de expresión de *AmphiTrk* destaca su probable función durante el desarrollo del sistema nervioso periférico del anfibio, definiendo una población de precursores neuronales en el ectodermo embrionario y en los corpúsculos de Quatrefages. El creciente número de genes típicamente neurogénicos o de tubo nervioso central en vertebrados, como *Trk*, *Elav* y otros, que se detectan expresados en células individuales en la epidermis embrionaria del anfibio podría apoyar la idea de que, evolutivamente, el sistema nervioso centralizado en la parte dorsal de los vertebrados tiene su origen evolutivo, de hecho, en una red nerviosa, epidérmica o sub-epidérmica, que envolvería todo el embrión, y que paulatinamente se habría concentrado en la parte dorsal. En este escenario, denominado *skin brain evolution* (Holland, 2004), los hemicordados, que junto a equinodermos representarían los deuterostomados más primitivos, todavía poseerían esta red neural epidérmica difusa, que utilizaría no obstante los mismos instrumentos genéticos que los vertebrados en el tubo nervioso (genes *Hox* entre otros), para delimitar la posición antero-posterior (Lowe *et al.*, 2003). El anfibio bien podría representar un estadio intermedio en la evolución hacia la concentración dorsal: posee un tubo nervioso dorsal, poco diferenciado, pero aún mantiene, en la epidermis, suficiente capacidad neurogénica, vestigio de la red

neural difusa primitiva, y de ahí la expresión, en estas poblaciones celulares, de genes *Hox*, de *AmphiTrk*, o de *AmphiElav*.

Así pues, ¿cuál es la gran “transición” entre invertebrados y vertebrados, en el contexto de la red Nt/Trk/p75, si el anfibio ya la posee? La respuesta tal vez la de un simple, o unos pocos cambios aminoacídicos, que marcan una clara diferencia: *AmphiTrk* es incapaz de activar la vía de transducción de PLC γ , mientras que los Trk de vertebrados sí lo hacen, desencadenando así funciones neurales complejas, ausentes en anfibio. Pero seguramente no sea tan simple. El sistema vertebrado posee aún mayor complejidad: no hay un solo receptor, sino tres, no hay una sola neurotrofina, sino cuatro, no hay un único transcrito, sino varios, por maduración diferencial del RNA, lo que da lugar a las sutiles diferencias que caracterizan a cada una de las isoformas, y no hay una única forma proteica, sino varias, por modificación postraducciona diferencial, que regula por ejemplo la presencia de proneurotrofinas o de neurotrofinas maduras, con funciones diferenciadas, todo ello en un amplio abanico de contextos microambientales que diversifica aún más sus funciones, dependiendo asimismo de la localización subcelular de cada uno de los componentes del sistema, como ilustra por ejemplo el secuestro en vesículas de los receptores Trk.

En conjunto, pues, la visión reduccionista de ligando/receptor/vía de transducción/función no va a ser suficiente para entender la contribución del sistema Nt/Trk en la complejidad del sistema nervioso vertebrado. Sólo una aproximación global, en el marco de la “biología integrativa”, o biología de sistemas, que permite aproximarse a un sistema, que funciona como un todo, y no como la suma de sus partes, con metodologías globales (genómicas, proteómicas, regulómicas), integrativas, propias de los sistemas complejos, pueda empezar a desentrañar los cómo, funcionales, y evolutivos, de la complejidad nerviosa de los vertebrados.

El dócil y tranquilo “triste filete de anchoa”, parecido a nuestro antepasado invertebrado, con menos complejidad en el sistema Nt/Trk, puede ser de gran ayuda: un sistema neurotrófico más sencillo, más fácil de entender como sistema. Desentrañar los restantes miembros del sistema en el anfibio: la única neurotrofina, *AmphiNt* (datos no publicados), el único receptor p75, *Amphi p75* (datos no publicados), y las vías de transducción en anfibio, pueden bien ser el primer paso para entender como entendemos y como sentimos.

Bibliografia

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., et al. (2000) *Science* 287: 2185-2195.
- Aguado, F., Majo, G., Gomez de Aranda, I., Ferrer I. (1998) *Neurosci. Lett.* 243: 13-16.
- Airaksinen, M.S., Meyer, M. (1996) *Neuroscience.* 73: 907-911.
- Akamatsu, W., Okano, H.J., Osumi, N., Inoue, T., Nakamura, S., Sakakibara, S., Miura, M., Matsuo, N., Darnell, R.B., Okano, H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96: 9885-90.
- Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J.M., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., et al. (2002) *Science* 297: 1301-1310.
- Arevalo, J.C., Conde, B., Hempstead, B.L., Chao, M.V., Martin-Zanca, D., Perez, P. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20: 5908-5916.
- Baxter, G.T., Radeke, M.J., Kuo, R.C., Makrides, V., Hinkle, B., Hoang, R., Medina-Selby, A., Coit, D., Valenzuela, P., Feinstein, S.C. (1997) *J. Neurosci.* 17: 2683-2690.
- Bibel, M., Barde, Y.A. (2000) *Genes Dev.* 14: 2919-2937.
- Blum, R., Konnerth, A. (2005) *Physiology* 20: 70-78.
- Boeshore, K.L., Luckey, C.N., Zigmond, R.E., Large, T.H. (1999) *J Neurosci.* 19: 4739-47.
- Bone, Q., West, C.G. (1978) *J. Mar. Biol. Ass. UK* 58: 479-486.
- C.elegans Sequencing Consortium (1998) *Science* 282: 2012-2018.
- Castro, L.F., Furlong, R.F., Holland, P.W.H. (2004) *Immunogenetics* 55: 782-784.
- Chao, M.V. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 299-309.
- Christoffels, A., Koh, E.G.L., Chia, J.M., Brenner, S., Aparicio, S., Venkatesh, B. (2004) *Mol. Biol. Evol.* 21: 1146-1151.
- Clary, D.O., Reichardt, L.F. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 11133-7.
- Cronk, K.M., Wilkinson, G.A., Grimes, R., Wheeler, E.F., Jhaveri, S., Fundin, B.T., Silos-Santiago, I., Tessarollo, L., Reichardt, L.F., Rice, F.L. (2002) *Development* 129: 3739-3750.
- Davoli, C., Marconi, A., Serafino, A., Iannoni, C., Marcheggiano, A., Ravagnan, G. (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 527-539.
- Dehal, P., Boore, J.L. (2005) *Plos Biol.* 3: 1700-1708.

Bibliografija

- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R.K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D.M., et al. (2002) *Science* 298: 2157-2167.
- di Marco, E., Cutuli, N., Guerra, L., Cancedda, R., de Luca M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 24290-24295.
- Ernfors, P. (2001) *Cell. Mol. Life. Sci.* 58: 1036-1044.
- Ernfors, P., Bramham, C.R. (2003) *Trends Neurosci.* 26: 171-173.
- Fritsch, B., Pauley, S., Matei, V., Katz, D.M., Xiang, M., Tessarollo, L. (2005) *Hear. Res.* 206: 52-63.
- Furlong, R.F., Holland, P.W.H. (2002) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357: 531-544.
- Furlong, R.F., Holland, P.W.H. (2004) *Biol. J. Linnean Soc.* 82: 425-430.
- Gorbman, A., Nozaki, M., Kubokawa, K. (1999) *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 251-254.
- Hall, B.K. (1999) *The neural crest in development.* Springer-Verlag New York, Inc.
- Hallböök, F. (1999) *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 616-621.
- Hallböök, F., Lundin, L.G., Kullander, K. (1998) *J. Neurosci.* 18: 8700-8711.
- Hapner, S.J., Boeshore, K.L., Large, T.H., Lefcort, F. (1998) *Dev. Biol.* 201: 90-100.
- Hatschek, B. (1893) *The amphioxus and its development.* Trans. Tuckey. Swan Sonnenschein & Co. London. MacMillan & Co. New York.
- Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J.S., Meyer, A. (2004) *J. Mol. Evol.* 59: 190-203.
- Holland, L.Z., Holland, N.D. (2001) *J. Anat.* 199: 85-98.
- Holland, N.D. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 617-627.
- Holland, N.D., Yu, Jr-K. (2002) *Acta Zool.* 83: 309-319.
- Holland, P.W., Garcia-Fernández, J., Williams, N.A., Sidow, A. (1994) *Dev. Suppl.* 125-133.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 677-736.
- Huang, E.J., Wilkinson, G.A., Farinas, I., Backus, C., Zang, K., Wong S.L., Reichardt, L.F. (1999) *Development* 126: 2191-203.
- Ichinose, T., Snider, W.D. (2000) *J. Neurosci. Res.* 59: 365-371.
- Jaillon, O., Aury, J.M., Brunet, F., Petit, J.L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., et al. (2004) *Nature* 431: 946-957.
- Jeffery, W.R., Strickler, A.G., Yamamoto, Y. (2004) *Nature* 431: 696-699.
- Kaessmann, H., Zöllner, S., Nekrutenko, A., Li, W.H. (2002) *Genome Res.* 12: 1642-1650.

- Kajava, A.V. (1998) *J. Mol. Biol.* 277: 519-527.
- King, N., Carroll, S.B. (2001) *PNAS* 98: 15032-15037.
- King, N., Hittinger, C.T., Carroll, S.B. (2003) *Science* 301: 361-363.
- Kobe, B., Kajava, A.V. (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 725-32.
- Kolkman, J.A., Stemmer, W.P.C. (2001) *Nature Biotechnol.* 19: 423-428.
- Koponen, E., Lakso, M., Castren, E. (2004) *Brain. Res. Mol. Brain Res.* 4: 81-94.
- Lindsay, R.M. (1996) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci* 351: 365-373.
- Long, M., Betrán, E., Thornton, K., Wang, W. (2003) *Nature Rev. Gen.* 4: 865-875.
- Lowe, C.J., Wu, M., Salic, A., Evans, L., Lander, E., Stange-Thomann, N., Gruber, C.E., Gerhart, J., Kirschner, M. (2003) *Cell* 113: 853-65.
- Lucini, C., Castaldo, L., Lamanna, C., Maruccio, L., Vega, J.A., Gargiulo, G. (1999) *Neurosci. Lett.* 261: 163-166.
- Lundin, L.G., Larhammar, D., Hallböök, F. (2003) *J. Struct. Funct. Genomics.* 3: 53-63.
- Luukko, K., Moshnyakov, M., Sainio, K., Saarma, M., Sariola, H., Thesleff, I. (1996) *Dev. Dyn.* 206: 87-99.
- Martin, S.C., Marazzi, G., Sandell, J.H., Heinrich, G. (1995) *Dev. Biol.* 169: 745-758.
- Martin, S.C., Sandell, J.H., Heinrich, G. (1998) *Dev. Biol.* 195: 114-130.
- Meulemans, D., Bronner-Fraser, M. (2004) *Dev. Cell.* 7: 291-299.
- Minichiello, L., Calella, A.M., Medina, D.L., Bonhoeffer, T., Klein, R., Korte, M. (2002) *Neuron* 36: 121-137.
- Moreno, H., Nadal, M., Leznik, E., Sugimori, M., Lax, I., Schlessinger, J., Llinas, R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95:14997-5002.
- O'Connor, R., Tessier-Lavigne, M. (1999) *Neuron* 24: 165-178.
- Ohno, S. (1970) *Evolution by gene duplication.* Springer-Verlag. New York
- Olinski, R.P., Lundin, L.G., Hallböök, F. (2006) *Mol. Biol. Evol.* 23: 10-22.
- Ormond, J., Hislop, J., Zhao, Y., Webb, N., Vaillancourt, F. Dyer, J.R., Ferraro, G., Barker, P., Martin, K.C., Sossin, W.S. (2004) *Neuron* 44: 715-728.
- Pallas, P.S. (1774) *Naturgeschichte merkwürdiger tiere in welcher vornehmlich neue unbekannte tierarten durch kupferstiche, beschreibungen und erklärungen erläutert werden.* (Historia

Bibliografija

- natural de animales singulares, en la cual se describen principalmente especies nuevas desconocidas mediante grabados y explicaciones).
- Panopoulou G., Poustka, A.J. (2005) *Trends Genet.* 21: 559-567.
- Park, H.C., Hong, S.K., Kim, H.S., Kim, S.H., Yoon, E.J., Kim, C.H., Miki, N., Huh, T.L. (2000) *Neurosci Lett.* 279: 81-84.
- Patapoutian, A., Backus, C., Kispert, A., Reichardt, L.F. (1999) *Science* 283: 1180-1183.
- Patthy, L. (1999) *Gene* 238: 103-114.
- Playford, M.P., Butler, R.J., Wang, X.C., Katso, R.M., Cooke, I.E., Ganesan, T.S. (1996) *Genome Res.* 6: 620-627.
- Pollard, S.L., Holland, P.W.H. (2000) *Curr. Biol.* 10: 1059-1062.
- Poss, S.G., Boschung, H.T. (1996) *Isr. J. Zool.* 42: S13-S66.
- Pulido, D., Campuzano, S., Koda, T., Modolell, J., Barbacid, M (1992) *EMBO J.* 11: 391-404.
- Segal, R.A. (2003) *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 299-330.
- Sofroniew, M.V., Howe, C.L., Mobley, W.C. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1217-1281.
- Stokes, M.D., Holland, N.D. (1996) *Isr. J. Zool.* 42: S67-S86.
- Strohmaier, C., Carter, B.D., Urfer, R., Barde, Y.A., Dechant, G. (1996) *EMBO J.* 15: 3332-7.
- Tordai, H., Nagy, A., Farkas, K., Patthy, L. (2005) *FEBS J.* 272: 5064-5078
- Ultsch, M.H., Wiesmann, C., Simmons, L.C., Henrich, J., Yang, M., Reilly, D., Bass, S.H., de Vos, A.M. (1999) *J. Mol. Biol.* 290: 149-59.
- Urfer, R., Tsoulfas, P., O'Connell, L., Shelton, D.L., Parada, L.F., Presta, L.G. (1995) *EMBO J.* 14: 2795-2805.
- van Kesteren, R.E., Fainzilber, M., Hauser, G., van Minnen, J., Vreugdenhil, E., Smit, A.B., Ibáñez, C.F., Geraerts, W.P., Bulloch, A.G. (1998) *EMBO J.* 17: 2534-2542.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al. (2001) *Science* 291: 1304-51.
- Wakamatsu, Y., Weston, J.A. (1997) *Development* 124: 3449-3460.
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An P., et al. (2002) *Nature* 420: 520-562.
- Wiesmann, C., Ultsch, M.H., Bass, S.H., de Vos, A.M. (1999) *Nature* 401: 184-8.

Bibliografia

Winberg, M.L, Tamagnone, L., Bai, J., Comoglio, P.M., Montell, D., Goodman, C.S. (2001)

Neuron 32: 53-62.

Yacoubian, T.A., Donald, D.C. (2000) Nature Neurosci. 3: 342-349.

Yu, J.K., Holland, N.D., Holland, L.Z. (2004) Dev. Biol. 274: 452-461.

CAPÍTULO IX



Conclusiones

Conclusiones

Las **conclusiones** derivadas de este trabajo son:

- Se ha desarrollado una metodología que permite la reproducción en cautividad del anfibio europeo, *Branchiostoma lanceolatum*. La puesta se puede inducir a voluntad e independientemente del ciclo natural de reproducción. La disponibilidad rutinaria de embriones abre las puertas a la aplicación de técnicas experimentales invasivas en un modelo clave para la Evo-Devo experimental.
- El genoma del anfibio posee una caspasa ancestral, AmphiCASP3/7, cuya combinatoria funcional refleja la condición primitiva de las caspasas efectoras -3 y -7 de vertebrados, realzando en cada una de ellas nuevas propiedades que podrían haber surgido en el transcurso de la evolución en vertebrados.
- Se ha aislado un gen de copia única en el genoma de anfibio, *AmphiTrk*, prototípico respecto a los tres receptores Trk de vertebrados, lo que rebate la idea de que los receptores Trk son una innovación de los vertebrados.
- La organización genómica de *AmphiTrk*, sugiere que el miembro fundador de la familia génica de receptores Trk pudo haberse formado por barajado de exones en un genoma ancestral previo a la separación entre cefalocordados y vertebrados.
- La estructura peptídica de AmphiTrk pronostica la presencia de un sistema Nt/Trk/p75 rudimentario en el anfibio, compuesto de miembros únicos cuya expansión probablemente ocurrió por duplicación génica durante la evolución de los vertebrados.
- La expresión de *AmphiTrk* define una población de precursores neuronales, en la epidermis embrionaria, probablemente con capacidad migratoria en dirección ventral-dorsal. La capacidad

bioquímica de AmphiTrk para activar las cascadas de señalización implicadas en diferenciación neuronal sugiere su potencial neurogénico *in vivo* para diferenciar neuronas sensoriales a partir de células epidérmicas.

- El comportamiento migratorio de células epidérmicas en el ectodermo embrionario, destacado por los estudios de linaje celular *in vivo*, imita algunas de las propiedades de la cresta neural de vertebrados, en un organismo carente de dichas estructuras.
- Previa estimulación por NGF, BDNF, Nt4/5 o Nt3, AmphiTrk es capaz de activar dos de las tres principales vías de señalización mediadas por sus ortólogos vertebrados: la vía de Ras/Raf/Erk y la vía de PI3K/Akt, pero no la vía de PLC, sugiriendo el posterior acoplamiento de esta vía durante la evolución de los vertebrados.

El trabajo descrito en esta memoria ha sido financiado por los proyectos 980510 de la Fundació La Marató de TV3, PB98-1261-C02-02 y BMC2002-03316 del Ministerio de Educación y Ciencia, y HPRN-CT-2002-00263 de la Unión Europea. Èlia Benito-Gutiérrez ha disfrutado de una beca de colaboración en proyectos de investigación y de una beca de Recerca i Docencia de la Universitat de Barcelona.