

Detecció de regions homòlogues a l'homeobox en l'ADN genòmic de planària mitjançant Southern blots.

E. Saló

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona.

Abstract

Detection of homologous regions to homeobox in genomic planarian DNA by Southern blot experiments.

We have analysed homeobox homologies by Southern blot experiments, using total genomic DNA from Dugesia(G)tigrina digested independently with EcoRI, Hind III and Sau 3AI, and total genomic DNA from Xenopus digested with EcoRI as a control. All have been probed with the 118-bp Sau/Sau fragment from AC1 (Carrasco et al, 1984), and with the 250-bp Hind III/EcoRI fragment from MM3 (Müller et al, 1984), in conditions of reduced stringency (Mc Ginnis et al, 1984b). We have found about 10 genomic restriction fragments that contain detectable homeoboxes.

Introducció

L'extens coneixement genètic de Drosophila ha permès d'identificar diferents tipus de gens que controlen els primers estadis del desenvolupament: gens d'efecte matern, gens de la segmentació i gens homeòtics. L'aspecte més sorprenent de l'anàlisi d'aquests gens és que alguns d'ells presenten una determinada seqüència d'ADN homòloga. Es tracta d'una seqüència curta de 180 parells de bases (pb) localitzada a l'extrem 3' de l'exó de cada gen, anomenada "homeobox" (McGinnis et al, 1984a,b; Scott i Weiner, 1984). Actualment, s'han aïllat més de 10 gens diferents que contenen l'Homeobox (Hb) a Drosophila (Gehring, 1985).

La hibridació creuada i els experiments de clonatje han mostrat que els Hb no sols es conserven en gens de Drosophila sinó que la mateixa seqüència també es manté en vertebrats: Xenopus (Carrasco et al, 1984; Müller et al, 1984), ratolí (McGinnis et al, 1984c), i l'home (Levine et al, 1984). Mitjançant Southern-blots d'ADN genòmic total també s'han detectat a Lumbricus sp, a Tenebrio molitor, i al pollastre (McGinnis et al, 1984b).

Malauradament, només s'han aconseguit hibriditzacions "in situ" a Drosophila, la qual cosa permet de demostrar clarament, i només en aquest organisme, els punts d'acció dels productes amb Hb, resultats que concorden perfectament amb els d'anàlisi clonal per recombinació mitòtica. Ara bé, es poden extrapolar els resultats en Drosophila als altres

organismes que contenen Hb?. En aquest sentit, el paper estricte del domini homeo (proteïna que prové del transcrit d'homeobox) en el desenvolupament resta encara per demostrar, fins i tot a Drosophila. Hi ha però, diferents línies d'evidència que suggereixen un paper important:

1- Transcripció en embrions.

Mitjançant Northern-blots de polia⁺ RNA de diferents estadis del desenvolupament de Xenopus s'ha demostrat que els gens que contenen l'homeobox (Hb) s'expressen en estadis específics del desenvolupament (Carrasco et al, 1984; Müller et al, 1984). Recentment, Colberg-Poley et al (1985) han demostrat la presència d'un transcrit amb Hb durant la diferenciació de cèl.lules de carcinoma de ratolí cap a cèl.lules endodèrmiques parietals extraembrionàries.

2- Estructura dels transcrits

Els mapes de restricció i la seqüenciació dels ADNs complementaris (cDNA) amb homeobox mostren una gran similitud en l'estructura dels transcrits. Així: a) l'Hb va sempre precedit d'un intró; b) l'Hb està sempre localitzat en l'últim exó; i c) tots els clons estudiats fins ara tenen una regió llarga d'uns 650 nucleòtids que no codifiquen a l'extrem 3' de l'Hb.

En els vertebrats s'observa una forta homologia no sols dins de la seqüència de Hb sinó també en les regions veïnes. Així, el MM3 de Xenopus (Müller et al, 1984) mostra una alta homologia en l'Hb i en les regions veïnes d'un clon de cDNA de fibroblasts humans transformats per SV40 (Simeoni i Boncinelli, en premsa), presentant el mateix exó a l'extrem 5' i una localització exacta d'una cua de poliglutàmics en l'extrem 3' de l'Hb. A Xenopus, la seqüenciació dels gens genòmics i dels cDNAs permet hipotetitzar l'existència d'un "splicing" alternatiu en els transcrits de AC1 (J.Gotz, comunicació personal).

3- Southernns genòmics

A Drosophila, dels 10 fragments de restricció que contenen Hb detectables (McGinnis et al, 1984b), almenys 8 corresponen a gens homeòtics i de segmentació (Gehring, 1985) i un és d'informació materna (Marek, en premsa). Per tant, a Drosophila, els Hb semblen estar íntimament associats amb gens del control del desenvolupament. Els vertebrats tenen un nombre similar de Hb: Southern-blots d'ADN genòmic total de pollastre, ratolí, home (McGinnis et al, 1984b) i Xenopus (Carrasco et al, 1984) mostren 10 fragments d'hibridització.

Als mamífers, els Hb es troben agrupats en el genoma (complexos gènics Hox1 i Hox2, Rabin et al, 1985) tal com els complexos Antp i Bx de Drosophila.

4- Homologies amb els gens de la reproducció del llevat ("yeast mating type")

Un cop obtinguda la seqüència del domini homeo, es va comprovar la seva homologia amb les seqüències proteiques conegudes mitjançant la llibreria proteica computeritzada de Dayhoff. Només es va trobar homologia amb les proteïnes al i $\alpha 2$ de la reproducció del llevat Saccharomyces cerevisiae (Shepherd et al, 1984). L'homologia és més alta en l'últim terç del domini homeo (fig 1). Aquesta regió és la més conservada en el gen engrailed (Poole et al, 1984; Fjose et al, 1984), gen que conté un Hb diferent dels de Antp, Ubx i ftz.

Aquesta homologia amb els gens del llevat és molt interessant, ja que els productes dels "yeast matting type cassette genes" estan involucrats en el manteniment de diferents estats fenotípics (determinació cel.lular) necessàries per la diferenciació cap a dos tipus d'espores (Herskowitz i Oshima, 1981; Nasmyth, 1982).

5- El domini homeo s'uneix a l'ADN

Les proteïnes del "yeast matting type" al i $\alpha 2$ presenten una forta homologia amb proteïnes procariòtiques que s'uneixen a l'ADN (Matthews et al, 1982); per això, Laughton i Scott (1984) i Shepherd et al (1984) varen proposar que el domini homeo podria unir-se directament a l'ADN. Els repressors procariotes tenen una estructura d'hèlix-volta-hèlix on l'hèlix representada pel cilindre negre (fig 1) s'uniria a punts específics del solc major de l'ADN (Pabo i Sauer, 1984). Les regions de l'Hb que correspondrien a l'hèlix-volta-hèlix són esquematitzades a la Figura 1. Aquestes regions estan extremadament conservades en tots els Hb. D. Smith (comunicació personal) amb proteïnes de fusió de l'Hb de Xenopus ha demostrat que s'uneixen a columnes d'ADN-cel.lulosa, essent la primera prova directa de la unió del domini homeo a l'ADN.

Tenim, doncs, bones evidències a favor de la implicació de l'Hb en el desenvolupament. En el cas de Drosophila està generalment acceptat que aquests gens actuarien, en diferents combinacions, activant bateries de gens que definirien les propietats de cadascun dels compartiments i donarien lloc als segments de la larva.

Material i Mètodes

Obtenció de l'ADN

Cap dels mètodes emprats per obtenir l'ADN i descrits a la bibliografia (Maniatis, 1982; McGinnis et al, 1984b) van permetre obtenir un ADN de grandària acceptable. El mètode utilitzat va ésser el següent:

Obtenció de nuclis

500 planàries són homogeneïtzades a 4°C amb 15ml d'àcid cítric 10mM, acetat càlcic 3.3mM i Tritó X-100 0.01%, emprant un homogenitzador "dounce". Seguidament es centrifuga a 5K durant 10 minuts. Es descarta el sobrenedant i el pòsit es redissol amb la mateixa solució, repetint el procés 4 vegades. Alíquotes observades al microscopi de contrast de fase permeten conèixer la puresa dels nuclis.

Extracció de l'ADN

El pòsit de nuclis es redissol amb un petit volum de la dissolució anterior i s'afegeix gota a gota a 13ml de tampó d'extracció (0.1M Tris-ClH pH 8.4; 0.1M NaCl i 20mM EDTA), 1.5ml de SDS al 10% i Proteïnasa K (200 µg/ml). S'incuba 1 hr a 50°C.

Seguidament es realitzen 2 extraccions amb fenol/cloroform, i la fase aquosa es digereix amb RNasa lliure de DNases (20 minuts a 80°C) 100 µg/ml durant 1 hora a 40°C. Es repeteix l'extracció fenòlica seguida d'una extracció amb èter saturat amb H₂O. La fase aquosa es precipita amb 0.1 volums d'acetat amònic i 2 volums d'etanol i es deixa a -70°C dues hores. Es centrifuga a 11K durant 30 minuts i el pòsit d'ADN es renta amb etanol al 70%, s'asseca 2 minuts al buit, i es redissol en 1 µg/µl de TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0; 1mM EDTA) durant tota la nit a 4°C.

Digestions

l'ADN redissolt s'incuba amb els tampons de digestió (Maniatis, 1982) durant tota la nit per comprovar la seva puresa i l'absència de DNases. L'ADN genòmic total de planària (10 µg per cada digestió) es va digerir independentment a 37°C durant 12 hores amb: 50 unitats de EcoRI; 50 unitats de HindIII i 10 unitats de Sau3AI. L'ADN genòmic total de Xenopus es va digerir en les mateixes condicions amb 50 unitats de EcoRI.

Southern-blots

Els ADNs digerits es varen sotmetre a electroforesi en gel d'agarosa al 0.8%. El gel es transfereix a un paper de nitrocel.lulosa segons el mètode de Southern (1975).

Sondes

Les sondes emprades provenen dels Hb de Xenopus i corresponen al fragment de 118pb Sau3A del gen AC1 (Carrasco et al, 1984), i al fragment de 250pb HindIII/EcoRI de MM3 (Müller et al, 1984). El primer conté exclusivament part de la seqüència d'Hb, mentre que el segon conté l'Hb sencer amb regions veïnes del MM3 genòmic. També s'ha utilitzat ADN del plàsmid pBR com a control. El marcatge de les sondes amb ^{32}P es realitzà pel mètode standard de "nick translation".

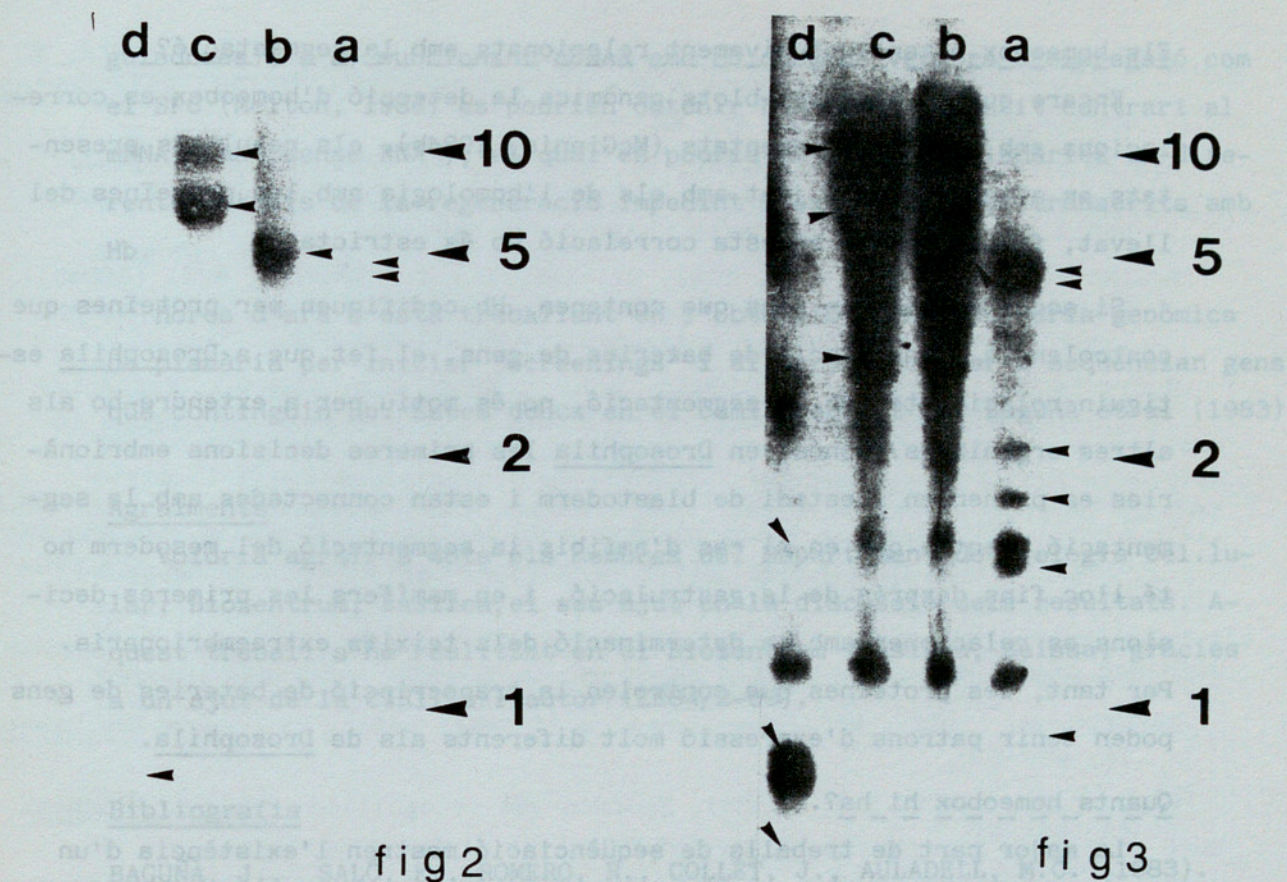
Hibridització

La prehibridització i la hibridització es van realitzar en condicions de baixa restricció segons Carrasco et al (1984); els rentats es varen realitzar segons McGinnis et al (1984b). Els blots es varen exposar de 1 a 10 dies a -70°C amb films Kodak XAR-5 proveïts de placa intensificadora.

Resultats

En les Figures 2 i 3 es pot observar el resultat d'un mateix Southern exposat durant 10 i 43 hores respectivament. Podem veure moltes bandes d'hibridització, algunes d'elles són inespecífiques i corresponen a ADN repetitiu (ADN ribosòmic,..) observant-se al tenyir el gel d'agarosa amb bromur d'etidi. Aquesta alta concentració d'ADN en una banda fa que el soroll de fons d'hibridització inespecífica que s'observa al llarg del gel s'incrementi donant una falsa banda positiva. El Southern de l'ADN genòmic de Xenopus digerit amb EcoRI (línia b), mostra el mateix patró de fragments de restricció que l'observat per Carrasco et al (1984), la qual cosa confirma la fiabilitat del Southern.

El Southern d'ADN total de planària digerit amb EcoRI (línia a), mostra 6 fragments específics d'homologia a l'Hb de llargades aproximades de 4.8, 4.5, 2.5, 2.2, 1.6 i 0.9 Kb. La línia c mostra el mateix ADN digerit amb HindIII amb 3 fragments d'homologia a l'Hb d'uns 10, 7 i 3.5 Kb. El fragment de 7Kb té la mateixa intensitat que la banda de 5Kb de Xenopus. Tot i tenint en compte que la complexitat de l'ADN de Xenopus és el doble del de planària i que ambdues línies varen ésser carregades amb la mateixa concentració d'ADN, el fort senyal d'hibridització ens indica una alta homologia vers l'homeobox de Xenopus. La línia d mostra el mateix ADN de planària digerit amb Sau3AI. Aquest enzim reconeix dianes de 4 nucleòtids; per tant dóna lloc a fragments més petits. Com era d'esperar doncs, els fragments positius tenen llargades inferiors: 1.8, 0.75 i 0.5 Kb.



Els filtres han estat rentats exhaustivament (5 minuts a 100°C), i tornats a hibriditzar amb una sonda marcada amb ^{32}P de pBR per tal de descartar altres bandes inespecífiques, ja que aquest és un contaminant general dels laboratoris de Biologia Molecular i d'enzims com EcoRI. Cap de les bandes observades corresponia a les del Southern de les figures 2 i 3.

Discussió

Els resultats del Southern-blot i la intensitat del senyal d'hibridització dels fragments de restricció positius suggereixen la presència de seqüències homòlogues a l'homeobox en l'ADN de planària. Ara bé, aquests resultats s'han de considerar com a preliminars, perquè la demostració inequívoca de la presència d'homeobox només es pot obtenir seqüenciant els gens de planària que contenen homeobox.

Els homeobox estan exclusivament relacionats amb la segmentació?

Encare que en Southern-blots genòmics la detecció d'homeobox es correlaciona amb metazous segmentats (McGinnis, 1984b), els resultats presentats en aquest treball junt amb els de l'homologia amb les proteïnes del llevat, fa pensar que aquesta correlació no és estricta.

Si acceptem que els gens que contenen Hb codifiquen per proteïnes que controlen la transcripció de bateries de gens, el fet que a Drosophila estiguin relacionats amb la segmentació, no és motiu per a estendre-ho als altres organismes. Doncs, en Drosophila les primeres decisions embrionàries es prenen en l'estadi de blastoderm i estan connectades amb la segmentació, mentre que en el cas d'amfibis la segmentació del mesoderm no té lloc fins després de la gastrulació, i en mamífers les primeres decisions es relacionen amb la determinació dels teixits extraembrionaris. Per tant, les proteïnes que controlen la transcripció de bateries de gens poden tenir patrons d'expressió molt diferents als de Drosophila.

Quants homeobox hi ha?

La major part de treballs de seqüenciació mostren l'existència d'un sol tipus d'Hb, la qual cosa no és d'estranyar si tenim en compte que els "screenings" s'han realitzat majoritàriament amb l'Hb de Antp. No més en el cas de engrailed (Poole et al, 1984; Fjose et al, 1984) sembla aparèixer una nova família d'Hb. En aquest sentit, l'aïllament i seqüenciació de possibles Hb a planàries pot definir noves famílies d'Hb que alhora es podrien emprar per caracteritzar nous gens implicats en el desenvolupament de Drosophila i vertebrats.

L'aïllament de gens de planària que continguin Hb, obriria noves perspectives en l'estudi de la regeneració?

La formació del patró és un mecanisme comú del desenvolupament i la regeneració. Per tant, no seria gens estrany que els gens que contenen Hb es trobesin involucrats en la regeneració. Així doncs, l'aïllament de gens amb Hb a planària permetria: a) estudiar l'expressió d'aquests gens durant la regeneració mitjançant Northern-blots; b) localitzar els transcrits en l'organisme mitjançant hibriditzacions "in situ"; c) localitzar la distribució dels productes del domini homeo mitjançant l'obtenció de proteïnes de fusió i d'anticossos contra aquestes proteïnes; d) a partir de columnes de cel.lulosa amb anticòs anti-galactosidasa, aconseguiríem fusionar-hi les proteïnes amb el domini homeo, les quals podrien unir-se a fragments específics d'ADN eluïts a través de la columna, obtenint així les zones de l'ADN que s'uneixen al domini homeo (molt probablement re-

guladores); i e) subclonant cDNAs amb Hb dins de vectors d'expressió com el SP6 (Melton, 1984) es podrien obtenir RNAs amb el sentit contrari al mRNA ("antisense RNA"), el qual es podria injectar a planàries en diferents estadis de la regeneració impedit l'expressió dels transcrits amb Hb.

Hores d'ara s'està treballant en l'obtenció d'una llibreria genòmica de planària per iniciar "screenings" i aïllar, subclonar i seqüenciar gens que continguin Hb. Estem doncs en el camí proposat per Baguñà et al (1983).

Agraïments

Voldria agrair a tots els membres del Departament de Biologia Cel·lular, Biozentrum, Basilea, el seu ajut en la discussió dels resultats. Aquest treball s'ha realitzat en el Biozentrum (Basilea, Suïssa) gràcies a un ajut de la CIRIT a l'autor (EE84/2-69).

Bibliografia

- BAGUÑÀ, J., SALÓ, E., ROMERO, R., COLLET, J., AULADELL, M.C. (1983). Planària com a model experimental per a estudis de regeneració, creixement i decreixement. Biol.Desenv. 1, 205-220.
- CARRASCO, A.E., MCGINNIS, W., GEHRING, W.J., DE ROBERTIS, E.M. (1984). Cloning of a X.laevis gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to Drosophila homeotic genes. Cell. 37, 409-414.
- COLDBERG-POLEY, A.M., VOSS, S.D., CHOWDHURY, K., GRUSS, P. (1985). Structural analysis of murine genes containing homeobox sequences and their expression in embryonal carcinoma cells. Nature 314, 713-718.
- FJOSE, A.W., MCGINNIS, W.J., GEHRING, W.J. (1985). Isolation of a homeobox-containing gene from the engrailed region of Drosophila and the spatial distribution of its transcripts. Nature 313, 284-289.
- GEHRING, W.J. (1985). The homeobox: a key to the understanding of development?. Cell 40, 3-5.
- HERSKOWITZ, I., OSHIMA, Y. (1981). Control of cell type and mating type interconversion. In: The Yeast Saccharomyces cerevisiae. J.N. Strathern, E.W. Jones, J. Broach, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- LAUGHTON, A., SCOTT, M.P. (1984). Sequence of a Drosophila segmentation gene: protein structure homology with DNA-binding proteins. Nature 310, 25-31.
- LEVINE, M., RUBIN, G.M., TIJIAN, R. (1984). Human DNA sequences homologous to a protein coding region conserved between homeotic genes of Drosophila. Cell 38, 667-673.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J. (1982). Molecular Cloning (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).

- MATTHEWS, B.W., OHLENDORF, D.H., ANDERSON, W.F., FISHER, R.G., TAKEDA, Y. (1982). Cro repressor protein and its interaction with DNA. Cold Spring Harbor.Symp.Quant.Biol. 47, 427-433.
- McGINNIS, W., LEVINE, M., HAFEN, E., KUROIWA, A., GEHRING, W.J. (1984a). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and Bithorax complexes. Nature 308,428-433.
- McGINNIS, W., GARBER, R.L., WIRZ, H., KUROIWA, A., GEHRING, W.J. (1984b). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. Cell 37, 403-408.
- McGINNIS, W., HART, C.P., GEHRING, W.J., RUDDLE, F.H. (1984c). Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*. Cell 38, 675-680.
- MELTON, D.A., KRIEG, P., REBAGLIATTI, M.R., MANIATIS, T., KINN, K., GREEN, M.R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucl.Acid.Res. 12, 7035-7036.
- MÜLLER, M.M., CARRASCO, A.E., DE ROBERTIS, E.M. (1984). A homeobox-containing gene expressed during oogenesis in *Xenopus*. Cell 39, 157-162.
- NASMYTH, K. (1982). Molecular genetics of yeast mating type. Ann.Rev.Genet. 16, 439-500.
- PABO, C.O., SAUER, R.T. (1984). Protein-DNA recognition. Ann.Rev.Biochem. 53, 293-321.
- POOLE, S.J., KANVAR, L.M., DREES, B., KORNBERG, T. (1985). The engrailed locus of *Drosophila*: structural analysis of an embryonic transcript. Cell 40, 37-43.
- RABIN, M., HART, C.P., FERGUSON-SMITH, A., McGINNIS, W., LEVINE, M., RUDDLE, F.H. (1985). Two homeobox loci mapped in evolutionarily related mouse and human chromosomes. Nature 314, 175-178.
- SCOTT, M.P., WEINER, A.J. (1984). Structural relationships among genes that control development. Sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax and fushi tarazu loci of *Drosophila*. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81,4115-4119.
- SHEPHERD, J.C.W., McGINNIS, W., CARRASCO, A.E., DE ROBERTIS, E.D., GEHRING, W.J. (1984). Fly and frog homeo domains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. Nature 310, 70-71.