

EL PETIT AMFIOX: EL MIRATGE DE L'ORIGEN DELS VERTEBRATS

JORDI GARCIA-FERNÀNDEZ¹ I ÈLIA BENITO-GUTIÉRREZ²

¹*Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona*

²*Developmental Biology Unit, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg*

Adreça per a la correspondència: Jordi Garcia-Fernàndez. Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona. Adreça electrònica: jordigarcia@ub.edu.

RESUM

L'origen dels vertebrats és un dels centres d'interès de molts científics i de la societat, i el nostre animal favorit, el petit i amigable amfiox, fa més d'un segle que ocupa aquesta posició privilegiada, i reflecteix en un miratge, com a fòssil vivent, el que va ocórrer en aquell transcendental moment de l'evolució. No és només morfològicament el representant viu de l'ancestre de tots els cordats, sinó que a més posseeix un genoma preduplicatiu, un model en versió simple del genoma de tots els vertebrats, incloent-hi l'humà. L'anàlisi del genoma de l'amfiox ha permès clarificar l'origen del nostre genoma propi, alhora que l'ha situat en una posició clau per entendre l'origen i funcionament de famílies i xarxes gèniques importants per al desenvolupament embrionari i la fisiologia. A més, els avenços tècnics en la reproducció i experimentació permeten raonadament somiar a resoldre els secrets dels nostres orígens i del funcionament del genoma.

Paraules clau: amfiox, *evo-devo*, cordats, genòmica comparada, fòssil vivent.

THE LITTLE AMPHIOXUS: A MIRAGE TO THE ORIGIN OF VERTEBRATES

SUMMARY

The origin of vertebrates is one of the top interests for many scientists and the society, and our favorite animal has occupied this privileged position for more than a century, reflecting in a mirage, as a living fossil, what occurred in this critical landmark of evolution. It is not only morphologically the closest living relative of Chordates, but also possesses a preduplicative genome, a simple model for the genome of all vertebrates, including humans. The analysis of the amphioxus genome has served to clarify the origin of our own

genome, and as showed it is in a key position to understand the origin and functioning of gene families and gene networks critical for embryonic development and physiology. Besides, technical advances in its reproduction and experimentation make plausible to dream in illuminating the secrets of our origins and the functioning of the genome.

Key words: amphioxus, evo-devo, chordates, comparative genomics, living fossil.

LA BAULA PERDUDA

«Sembla un peix però no és un peix, és un invertebrat molt semblant als nostres avantpassats». Aquesta descripció de la posició en l'arbre evolutiu de l'amfiox és d'en Roger Garcia als seus companys i companyes de quart de primària, quan va portar a l'escola uns exemplars que mantenia a casa, dins uns tubs hermètics als quals canviava l'aigua de mar tot sovint, i que alimentava amb algues unicel·lulars. El que en Roger no sap és que Darwin mateix, en *L'origen de les espècies* (Darwin, 1859), defineix l'amfiox com un peix senzill, tan estructuralment senzill que s'aproxima als invertebrats. I tampoc no sap que l'amfiox va ser descrit per primera vegada el 1774 com un llimac, dins els grup dels molluscs (Pallas, 1774). De fet, no va ser fins a la segona meitat del segle XIX que l'anatomia i l'embriologia comparades van reconèixer que l'amfiox compartia molts dels trets característics que defineixen els vertebrats (vegeu la figura 1): un tub nerviós en posició dorsal, musculatura segmentada, cua postanal i, sobretot, un tub d'origen mesodèrmic, ventral al tub nerviós, i transitori durant el desenvolupament embrionari dels vertebrats, el notocordi, que en l'amfiox es manté també en l'etapa adulta, i que dóna el nom al fílum dels cordats, fílum que inclou els vertebrats, els urocordats (ascidis) i cefalocordats (amfioxos) (vegeu la figura 2). No obstant això, a l'amfiox li manquen la majoria d'estructures avançades que comparteixen tots els vertebrats: extremitats, cervell anterior desenvo-

lupat, o òrgans sensorials parells. De fet, l'amfiox s'ha definit com la forma minimalista d'un vertebrat (Garcia-Fernández i Benito-Gutiérrez, 2009) o, en el context evolutiu, l'organisme més semblant al que hauria estat l'ancestre dels vertebrats, la baula perduda de la transició invertebrats/vertebrats.

En un antic llibre de text de biologia animal es deia que «si l'amfiox no hagués estat descobert, s'hauria d'haver inventat» (Grove i Newell, 1961). En el context d'un llibre sobre organismes model, doncs, no ha de ser difícil esbrinar per què l'amfiox és model. L'amfiox és el model dels vertebrats, de fet, de tots els cordats, en ser el parent viu més proper a com es creu va ser el nostre ancestre fa uns cinc-cents milions d'anys, el que anomenem un fòssil vivent. Aquesta posició es correspon, com es veurà, amb un patró corporal arquetípic, simple i model de tots els vertebrats. I, com sabem des de fa molt poc, també en un genoma simple, arquetípic respecte a com era el genoma ancestral dels cordats abans de patir els extensius fenòmens de duplicació gènica que van tenir lloc en l'origen i durant l'evolució dels vertebrats, fins a arribar a esculpir el nostre genoma actual.

UN FÒSSIL VIVENT AMB UN EXCITANT CICLE VITAL

Actualment, vint-i-nou espècies d'amfiox habiten els nostres oceans i mars. Aquest nombre és sorprenentment alt, tenint en compte que fa més de cinc-cents

milions d'anys ja hi havia animals molt similars als amfioxos actuals, com han revelat els fòssils de l'època cambriana *Pikaia* i *Haikouella* (Holland i Chen, 2001). Probablement *Pikaia*, com els actuals amfioxos, vivia ensorrat quasi totalment en el substrat sorrenc, bellugant-se amb moviments ondulatoris dirigits pel flexible notocordi, o mantenint només el cap fora del substrat, filtrant pacientment aigua a la recerca del seu aliment, les algues unicel·lulars procedents del plàncton de la superfície marina.

La seva pacífica vida s'altera en l'època reproductora, la primavera tardana en el cas de l'espècie europea que s'utilitza experimentalment, *Branchiostoma lanceolatum*, o l'estiu en el cas de l'americana, *Branchiostoma floridae* (Fuentes *et al.*, 2007). Aleshores, un vespre, en marxar el sol, els amfioxos de tota la població inicien sèries de ràpides fugides cap amunt, fins que inevitablement mascles i femelles inunden d'esperma i ous l'aigua que els envolta, i mili-

ons de zigots acabats de formar inicien dins la membrana de fecundació el desenvolupament embrionari. En l'estadi de nèurula primerenca els embrions surten de la membrana i inicien una vida lliure planctònica fins que, passades de tres a dotze setmanes, segons l'espècie, pateixen una lleugera metamorfosi que els convertirà en juvenils, estat en el qual tornaran a ensorrar-se al fons, per iniciar de nou el cicle vital.

EL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DE L'AMFIOX, MODEL DE LA TRANSICIÓ INVERTEBRATS/VERTEBRATS: MORFOLOGIA I GENÈTICA

La genètica del desenvolupament va revolucionar la biologia, i potser la nostra imatge de la vida i l'evolució, en mostrar que hi ha gens responsables per a la majoria

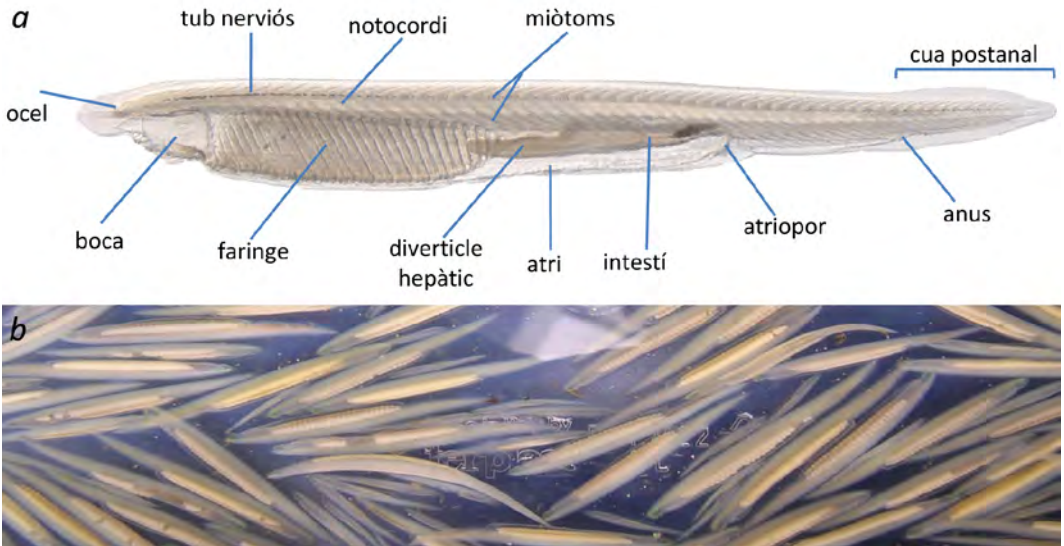


FIGURA 1. a) El pla corporal de l'amfiox. Fotografia d'un juvenil de l'espècie *Branchiostoma lanceolatum* amb les estructures i òrgans més destacats. b) Adults en l'època reproductora amb les gònades de color groc intens (femelles) o clar (mascles) situades a la part ventral de l'animal. Adaptat de Garcia-Fernández i Benito-Gutiérrez (2009).

ria d'esdeveniments clau en la formació del patró corporal i, sobretot, que gens molt similars estan presents en organismes tan distants com una mosca, un ratolí, o un cuc (Caroll, 2005). Sens dubte, l'exemple més clar el representen els gens dels complexos *Hox*, un grup de gens situats contigus en el genoma, que s'encarreguen d'esculpir el patró anteroposterior del cos de *Drosophila* o dels vertebrats (Lewis, 1978). La nova disciplina de l'*evo-devo*, o evolució del desenvolupament, és la punta d'aquesta revolució, en intentar explicar com els canvis en aquests gens i mecanismes que els regulen són, de fet, la base del procés evolutiu.

La genètica del desenvolupament va fer relançar amb força els estudis amb amfiox al final del segle xx. Durant el final del segle xix i l'inici del xx els embriòlegs comparats van estudiar en detall els processos inicials del desenvolupament embrionari de l'amfiox. Així, les etapes inicials, des de la segmentació radial fins a la gastrulació, són similars a les d'altres invertebrats deuteròstoms no cordats (hemicordats i equi-

noderns), com eriçons i estrelles de mar. No obstant això, a partir de la neurulació, l'embrió d'amfiox recapitula de manera simple els processos típics dels embrions de vertebrats, com la formació de la placa neural dorsal, o l'elongació posterior d'ectoderma, mesoderma i endoderma (vegeu la figura 3). Una vegada descoberts els gens del desenvolupament era obvi voler estudiar, doncs, si els mecanismes moleculars responsables del desenvolupament embrionari en l'amfiox eren els mateixos, similars, o més senzills que en els seus parents vertebrats.

I així va ser. L'amfiox té un complex *Hox* prototípic respecte als quatre complexos *Hox* dels vertebrats (Garcia-Fernández i Holland, 1994), un centre organitzador durant la gastrulació que instrueix els eixos anteroposterior i dorsoventral (Yu *et al.*, 2007), o centres senyalitzadors dirigits per *Fgfs*, entre molts altres exemples. En els darrers quinze anys un alt nombre de treballs, utilitzant l'amfiox com a model, han estudiat la base molecular comuna per

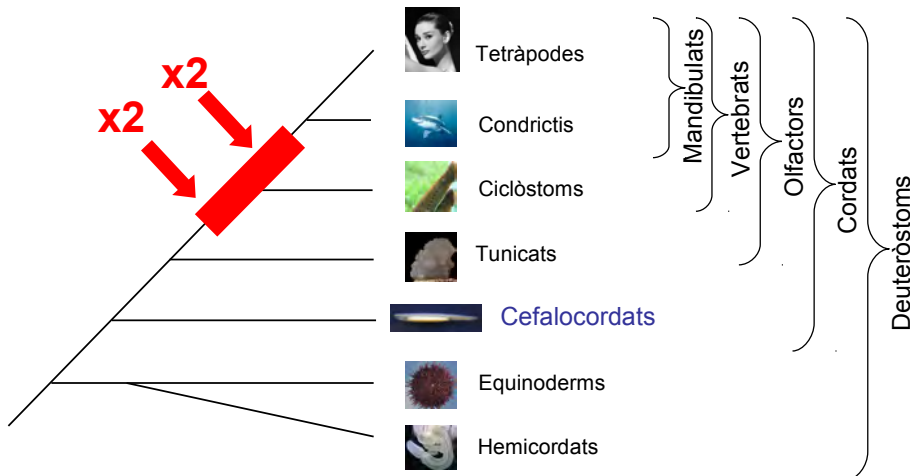


FIGURA 2. Representació esquemàtica de la filogenia dels deuteròstoms i la doble duplicació del genoma (2R). Els cefalocordats (amfiox) són descendents dels primers cordats. L'anàlisi del genoma de l'amfiox ha revelat que dues rondes de duplicació completa del genoma van tenir lloc aviat en l'origen dels vertebrats, abans de la radiació dels vertebrats mandibulats. Modificat de Garcia-Fernández i Benito-Gutiérrez (2009).

identificar els mecanismes moleculars bàsics de com es desenvolupa un cordat i, alhora, per identificar els canvis genètics que poden haver estat en la base de les innovacions morfològiques característiques dels vertebrats, com les estructures cranials derivades de la cresta neural, el cervell anterior, les extremitats, o les estructures esquelètiques (revisat a Benito-Gutiérrez, 2010).

Els vertebrats som poliploides i el genoma de l'amfiox és el model

L'era molecular en l'amfiox s'inicià el 1992, amb el descobriment del gen *Amphi-Hox3*, igualment relacionat amb els tres gens *Hox3* dels mamífers. Aquest resultat va rellançar la hipòtesi pionera de Susumu Ohno, que va suggerir el 1970 (Ohno, 1970) que la complexitat dels vertebrats podia ser deguda a la plasticitat gènica derivada de l'excés de còpies gèniques, no constrenyides evolutivament, que es van generar en l'origen dels vertebrats per fenòmens de duplicació del genoma, cosa que posterior-

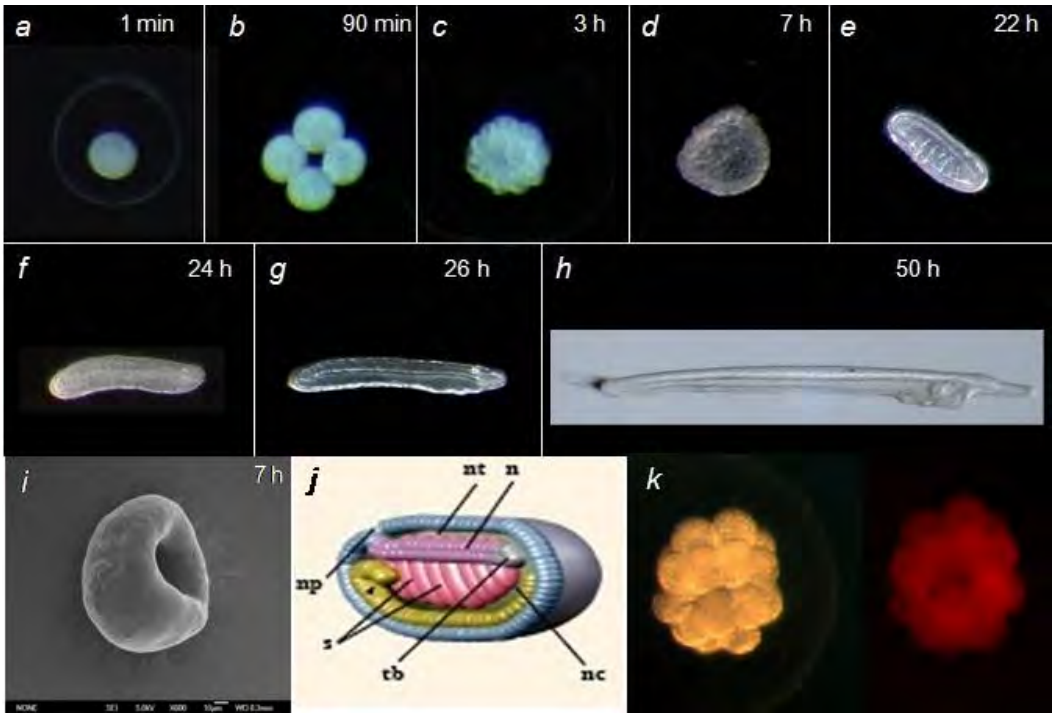


FIGURA 3. Desenvolupament embrionari. a-e) Embrions de *Branchiostoma lanceolatum* crescuts a 19 °C. El temps de desenvolupament s'indica a cada panell. i) Imatge de microscòpia de rastreig d'una gàstrula de 7 h de desenvolupament. j) Esquema d'una secció longitudinal d'una nèurula tardana. np: placa neural; nt: tub neural; n: notocordi; s: somites; tb: primordi de la cua; nc: canal neural. h) Embrions de *B. lanceolatum* procedents d'ous microinjectats amb un marcador fluorescent vermell, fotografiats amb llum visible (esquerra) o amb llum fluorescent (dreta). Adaptat de Garcia-Fernández *et al.* (2009) i Garcia-Fernández i Benito-Gutiérrez (2009).

ment s'ha anomenat hipòtesi 2R, o doble duplicació del genoma.

Ni l'anàlisi del genoma humà (Human Consortium, 2001) va permetre concloure si la hipòtesi 2R era correcta. Set anys més tard el genoma de l'amfiox va veure per fi la llum (Putman *et al.*, 2008) i va permetre resoldre el dubte. I aquí és quan més que mai l'amfiox és un model clau. En una frase, l'amfiox no és només el parent viu més semblant a l'ancestre dels vertebrats, sinó que el seu genoma és el model més semblant al genoma de l'ancestre dels vertebrats, que es va duplicar dues vegades en l'origen i les etapes inicials de la radiació dels vertebrats (vegeu la figura 2). És, doncs, un genoma clau per entendre l'evolució de gairebé qualsevol família gènica, xarxa de regulació gènica, o element estructural o funcional del nostre genoma. A continuació, s'esmenten alguns dels seus trets i conseqüències.

2R o no?

L'anàlisi del genoma de l'amfiox sense cap dubte confirma la hipòtesi 2R (vegeu la figura 2). Entre els seus 21.900 gens codificants, l'amfiox posseeix només un membre per a la majoria de famílies gèniques dels vertebrats. Això fa de l'amfiox un excellent representant del genoma ancestral en els cordats, no solament quant al contingut en gens, sinó també respecte a l'organització en exons/introns i cromosòmica. Després de les dues duplicacions genòmiques, aproximadament el 20-25 % dels gens duplicats es va mantenir en el genoma vertebrat, amb un clar biaix envers la retenció de gens duplicats involucrats en regulació transcripcional, transducció de senyal, desenvolupament i processos neuronals. Aquestes classes de gens acostumen a tenir regions reguladores complexes, cosa que

permet especular que els gens i regions reguladores duplicades produïssin flexibilitat genòmica que facilités l'emergència de novetats morfològiques i fisiològiques, en una versió actualitzada i refinada, més envers les regions reguladores i no tant les codificants, de les idees d'Ohno de la duplicació com a motor de l'evolució (Jiménez *et al.*, 2009).

Sintènia: grans blocs de genoma conservats fins a l'ésser humà

L'anàlisi del genoma de l'amfiox va servir per identificar disset grups de sintènia ancestrals (protocromosomes): grans segments de genoma que es conserven entre amfioxos i humans. Aquests disset grups es van duplicar dues vegades a l'origen i aviat en la radiació dels vertebrats. Posteriors reordenaments cromosòmics van dibuixar el genoma humà tal com el coneixem ara, amb restes d'aquests quatre blocs de disset protocromosomes reordenats en els vint-i-tres parells de cromosomes actuals (vegeu la figura 4). Així, ara coneixem l'origen del 95 % del genoma humà; per exemple, el protocromosoma 8 es va quadruplicar, i les quatre còpies van acabar en els cromosomes humans 5 i X (còpia *a*), en dos segments del cromosoma 4 (còpia *b*), en un segment del cromosoma 11 i en dos del 13 (còpia *c*) i en els cromosomes 2 i X (còpia *d*).

Elements no codificants conservats

En comparar els genomes humans i de l'amfiox, es van identificar cinquanta-nou petites regions no codificants de funció desconeguda. Molt probablement, algunes d'aquestes regions corresponen a elements funcionalment clau per a la regulació de

l'expressió de gens clau en el desenvolupament. En ser nous, aquesta troballa obre noves vies d'investigació amb vista a identificar-ne la funció en humans i, si és el cas, esbrinar si poden estar relacionats amb gens o processos d'importància mèdica o social. Avui dia, l'estudi de la regulació de l'expressió gènica i la seva disfunció són a la frontera de la recerca en biomedicina.

El genoma model ho té tot i no perd res

El genoma de l'amfiox ha permès clarificar la història evolutiva de moltes famílies gèniques i dels processos fisiològics o del desenvolupament (Holland *et al.*, 2008; Garcia-Fernández i Benito-Gutiérrez, 2009). Ara, quan es treballa amb el gen *x* en l'espècie *y*, les relacions d'homologia gènica sovint són més precises, cosa que fa que les inferències sobre evolució o com de mo-

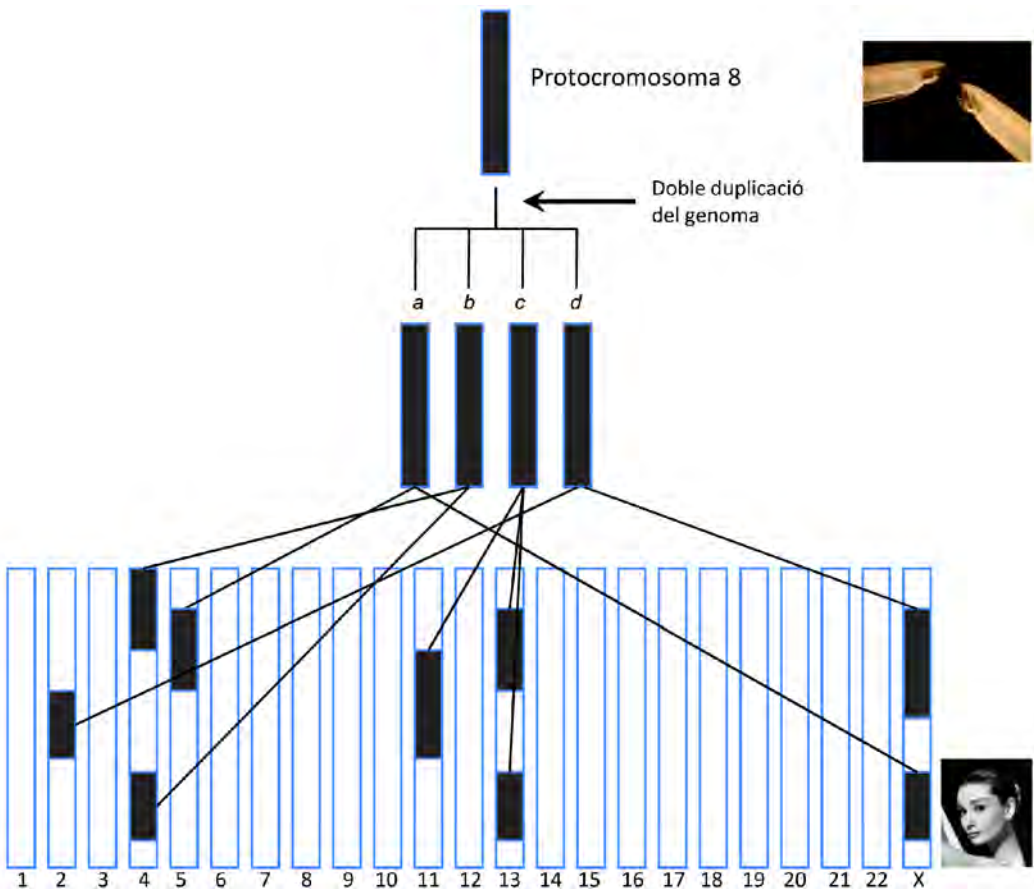


FIGURA 4. Origen del genoma humà per quadruplicació del genoma del cordat ancestral, representat pel genoma actual de l'amfiox (a dalt). Un genoma format per disset protocromosomes es va duplicar dues vegades, i les còpies resultants (*a*, *b*, *c* i *d*) van acabar esculpint els vint-i-tres cromosomes actuals de l'espècie humana (baix). L'esquema representa el destí del protocromosoma 8, que després de les duplicacions va anar a formar part dels cromosomes humans 2, 4, 5, 11, 13 i X.

del és un procés o un gen, s'haig clarificat. A més, el genoma de l'amfiox ha permès adonar-se que gens que es pensava que eren exclusius d'invertebrats no ho són, o que gens presumptament invencions dels vertebrats tampoc no eren exclusius d'aquests. De fet, en gairebé tots els llinatges evolutius han tingut lloc pèrdues gèniques, amb una excepció remarcable: l'amfiox. Dos exemples clars són la presència de vuitanta-set famílies de gens amb caixes homeòtiques (grup clau de factors de transcripció), cosa que implica que en el llinatge de l'amfiox no s'ha perdut ni una sola família (Takatori *et al.*, 2009), mentre que en el llinatge envers els humans se n'han perdut nou. O pel que fa als gens codificants dels receptors amb tirosina-cinasa (D'Aniello *et al.*, 2009); de nou, el genoma de l'amfiox ha mantingut les trenta-tres classes, mentre que en el llinatge envers el genoma humà se n'han perdut dues.

MODEL PER AL PASSAT ENVERS EL FUTUR

El reconeixement del genoma de l'amfiox com a prototípic dels vertebrats i el seu pla corporal primitiu està fent créixer sense aturada la recerca amb aquest pacífic animal. Els genomes de dues espècies més no trigaran a estar disponibles, i el nombre de grups de recerca que s'aturen en el punt de l'evolució que representa l'amfiox és cada dia superior al dia anterior. Anticipem que la recerca amb l'amfiox s'incrementarà encara més, i que l'estudi de processos biològics complexos sovint es traslladarà a un marc senzill (pel genoma preduplicatiu alhora que molt similar a l'humà), l'embrió o l'adult amfiox. La recerca amb l'organisme viu no és fàcil. No és un model pels seus avantatges tècnics, com tants d'altres, sinó per la seva posició

clau en l'escala animal. Fa pocs anys que, gràcies a una iniciativa conjunta de laboratoris europeus, l'amfiox es reproduïx, no sense dificultats, al laboratori (Fuentes *et al.*, 2007). També, els primers assaigs de manipulació genètica de l'embrió són incipients (Garcia-Fernández *et al.*, 2009), però alhora prometedors. Estem en l'excitant via de modificar el present, l'amfiox, per provar el passat, els mecanismes genètics que van generar els vertebrats, i per ajudar a entendre els secrets del genoma que han permès generar una immensa varietat de meravelloses formes vives, i entendre per què quelcom falla, i el primer que cal saber per solucionar la fallada.

BIBLIOGRAFIA

- BENITO-GUTIÉRREZ, E. (2010). «Amphioxus as a model for mechanisms in vertebrate development». A: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- CARROLL, S. B.; GRENIER, J. K.; WEATHERBEE, S. D. (2005). *From DNA to Diversity. Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design*. Malden: Blackwell Science.
- DARWIN, C. (1859). *On the origin of the species*. Londres: John Murray.
- FUENTES, M.; BENITO, E.; BERTRAND, S.; PARIS, M.; MIGNARDOT, A.; GODOY, L.; JIMENEZ-DELGADO, S.; OLIVERI, D.; CANDIANI, S.; HIRSINGER, E.; D'ANIELLO, S.; PASCUAL-ANAYA, J.; MAESO, I.; PESTARINO, M.; VERNIER, P.; NICOLAS, J. F.; SCHUBERT, M.; LAUDET, V.; GENEVIEVE, A. M.; ALBALAT, R.; GARCIA-FERNÁNDEZ, J.; HOLLAND, N. D.; ESCRIVA, H. (2007). «Insights into spawning behavior and development of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*)». *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.*, 308: 484-493.
- GARCIA-FERNÁNDEZ, J. (2005). «The genesis and evolution of homeobox gene clusters». *Nature Rev. Genetics*, 6: 881-892.
- GARCIA-FERNÁNDEZ, J.; HOLLAND, P. W. H. (1994). «Archetypal organization of the amphioxus *Hox* gene cluster». *Nature*, 370: 563-566.
- GARCIA-FERNÁNDEZ, J.; BENITO-GUTIÉRREZ, E. (2009). «It's a long way from amphioxus: descend-

- ants of the earliest chordate». *BioEssays*, 31: 665-675.
- GARCIA-FERNÁNDEZ, J.; JIMÉNEZ-DELGADO, S.; PASCUAL-ANAYA, J.; MAESO, I.; IRIMIA, M.; MINGUILÓN, C.; BENITO-GUTIÉRREZ, E.; GARDENYES, J.; BERTRAND, S.; D'ANIELLO, S. (2009). «From the American to the European amphioxus: towards experimental Evo-Devo at the origin of chordates». *Int. J. Dev. Biol.*, 53: 1359-1366.
- GROVE, A. J.; NEWELL, G. E. (1961). *Animal Biology*. Londres: University Tutorial Press Ltd.
- HOLLAND, N. D.; CHEN, J. Y. (2001). «Origin and early evolution of the vertebrates: new insights from advances in molecular biology, anatomy, and palaeontology». *BioEssays*, 23: 142-151.
- HOLLAND, L. Z. [et al.] (2008) «The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology». *Genome Research*, 18: 1100-1111.
- HUMAN CONSORTIUM (2001) «Initial sequencing and analysis of the human genome». *Nature*, 409: 860-921.
- JIMÉNEZ-DELGADO, S.; PASCUAL-ANAYA, J.; GARCIA-FERNÁNDEZ, J. (2009). «Implications of duplicated cis-regulatory elements in the evolution of metazoans: the DDI model or how simplicity begets novelty». *Brief. Funct. Genomic Proteomic*, 8: 266-275.
- LEWIS, E. B. (1978). «A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*». *Nature*, 276: 565-570.
- OHNO, S. (1970). *Evolution by gene duplication*. Londres: Allen & Unwin; Nova York: Springer-Verlag.
- PALLAS, P. S. (1774). *Spicilegia Zoologica Quibus Novae Imprimis et Obscurae Animalium Specie Iconibus, Descriptionibus atque Commentariis Illustrantur*. Berlín: Berolini and Stralund Gottlieb August Lange, p. 19.
- PUTMAN, I. [et al.] (2008) «The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype». *Nature*, 453: 1064-1071.
- TAKATORI, N.; BUTTS, T.; CANDIANI, S.; PESTARINO, M.; FERRIER, D. E.; SAIGA, H., HOLLAND, P. W. (2009). «Comprehensive survey and classification of homeobox genes in the genome of amphioxus, *Branchiostoma floridae*». *Dev. Genes Evol.*, 218: 579-590.
- YU, J. K.; SATOU, Y.; HOLLAND, N. D.; SHIN-I, T.; KOHARA, Y.; SATOH, N.; BRONNER-FRASER, M.; HOLLAND, L. Z. (2007). «Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer». *Nature*, 445: 613-617.