

03072
24
2eje.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO DEL
C.C.H.
PROYECTO ACADEMICO DE LA LICENCIATURA MAESTRIA Y DOCTORADO EN
BIOTECNOLOGIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**ANALISIS A NIVEL CELULAR Y MOLECULAR DEL
MUTANTE AJOLOTE " SHORT
TOES"**

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

KATIA DEL RIO-TSONIS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUERNAVACA, MORELOS

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles
(En colaboración con el Dr. Panagiotis Tsonis)

COMITE TUTORIAL

Dr. Horacio Merchant-Larios

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE: Dr. Miguel Lara

SECRETARIO: Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

VOCAL: Dr. Horacio Merchant-Larios

SUPLENTE: Dr. Mario Rocha Sosa

SUPLENTE: Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología, U.N.A.M. y en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Dayton bajo la dirección del Dr. Luis Covarrubias Robles y el Dr. Panagiotis Tsonis.

Una nota especial de agradecimiento para los Drs Luis Covarrubias Robles y Panagiotis Tsonis por su apoyo y dirección brindada durante la preparación de este proyecto

...A mi comité tutorial le agradezco su interés, apoyo y constante estímulo académico

...A mis compañeros de trabajo les agradezco su amistad y apoyo tanto académico como moral

...A mis padres les agradezco profundamente, ya que sin ellos este trabajo no se hubiera podido realizar, y por lo tanto les dedico este trabajo.

INDICE

RESUMEN	1-2
I. GENERALIDADES	3-8
A. REGENERACION DE EXTREMIDADES	3
B. AJOLOTE MUTANTE SHORT TOES	5
C. GENES CON CAJAS HOMEOTICAS Y "s"	7
D. GEN DEL TUMOR DE WILMS Y "s"	7
II. OBJETIVOS METAS	9
III. RESULTADOS	10-19
A. ESTUDIOS DE REGENERACION DE EXTREMIDADES EN "s"	10
B. ANALISIS DE LOS DEFECTOS DEL DESARROLLO EN "s"	12
C. ESTUDIOS GENETICOS	
1. ESTUDIOS DE RFLP	16
2. REACCION DE POLIMERIZACION EN CADENA (PCR)	17
3. CLONAJE DEL GEN DEL TUMOR DE WILMS	18
4. PRESENCIA DEL MENSAJE WT1 EN "s"	19
IV. MATERIALES Y METODOS	20-30
V. DISCUSION	31-35

VI. CONCLUSIONES	36
VII. PERSPECTIVAS	37
VII. REFERENCIAS	38-44
VIII. APENDICE	45
A) PNAS 89: 5502-5506	A
B) LIMB DEVELOPMENT AND REGENERATION : 171-179	B
C) JOURNAL OF MORPHOLOGY 217: 1-8	C
D) MAPA DE pcrII	D
E) DIAGRAMA DEL GEN WT1	E

RESUMEN

El ajolote mutante " Short toes " (s) ha sido seleccionado como modelo para estudiar el fenómeno de regeneración de extremidades en anfibios, pues además de presentar defectos durante el desarrollo de las extremidades y elementos del sistema urogenital, también muestra deficiencia en su capacidad regenerativa. Aunque la cola de estos mutantes regenera normalmente, las extremidades de estos se detienen en el estadio de cono sin señas de diferenciación.

Estudios histológicos muestran que la membrana basal que separa el blastema de la capa epidérmica es anormal. Además existe una acumulación de material extracelular en exceso en el blastema. Por medio de estudios inmunohistoquímicos de las moléculas que constituyen la membrana basal (colágeno IV y laminina), se encontró que no existe diferencia entre los mutantes y los animales fenotípicamente normales, los cuales regeneran sus extremidades completamente normales.

Estudios de RFLP, utilizando una sonda de ajolote que contiene una caja homeótica (AhoxI), revelaron dos bandas polimórficas en los mutantes "s" (s/s) y en los heterocigotos de "s" (+/s), pero no en los animales normales (+/+). Al remover la caja homeótica de esta sonda, las bandas polimórficas no se reconocieron. Por el contrario, al utilizar solamente la caja homeótica de AhoxI las bandas polimórficas se reconocieron y por lo tanto se dedujo que el polimorfismo se debe a una mutación de un gen o genes que contienen una caja homeótica. A través de la técnica de PCR, se han amplificado fragmentos conteniendo una caja homeótica de las zonas que mostraron el polimorfismo

en los estudios de RFLP.

Además de la posible asociación de genes conteniendo cajas homeóticas en "s", se propone la posible participación del gen del Tumor de Wilms, pues las manifestaciones de pacientes con tumores de Wilms son similares a las manifestaciones que se encuentran en "s". Como estudio inicial se ha clonado parte del gen de Tumor de Wilms en ajolote y se ha analizado la presencia del mensaje de wt1 en "s".

En este estudio se muestra un análisis detallado de las anomalías del desarrollo de "s", al igual que de su deficiencia regenerativa. También se han iniciado estudios a nivel molecular para intentar identificar el gen ó genes responsables de tal fenotipo y eventualmente investigar sí este ó estos gen ó genes juega(n) un papel inhibitorio en la regeneración de sus extremidades.

REGENERACION DE EXTREMIDADES

Los anfibios son los únicos vertebrados que poseen la capacidad de regenerar sus extremidades al ser amputadas (1,2,3). Entre los anfibios, algunos urodelos (anfibios con cola) pueden regenerar sus extremidades durante su vida adulta, entre estos se encuentran las familias Salamandriade (ie. *Noththalmus viridecens*) y Ambystomatidae (ie. *Ambystoma mexicanum* = ajolote) (4,5). La mayoría de los anuros (anfibios sin cola) también pueden regenerar sus extremidades durante su vida larvaria, pero pierden esta capacidad después de su metamorfosis (4).

Los eventos involucrados durante el proceso regenerativo incluyen la cicatrización de la herida, la formación de un cono de células mesenquimáticas, y la subsecuente diferenciación de estas células que reconstruirán los tejidos ausentes. Al amputarse las extremidades de estos animales a cualquier nivel del eje próximo-distal se observa una migración casi inmediata de células epiteliales que cubren la herida formando una capa epidérmica. Esta capa epidérmica es esencial para que el proceso regenerativo ocurra, ya que si se interrumpe la interacción entre la epidermis y el mesénquima, el proceso regenerativo no continúa (6). Hay y Fishman (1961) observaron a través de estudios radioactivos que tres días después de la amputación, las células progenitoras del tejido regenerativo aparecen bajo la capa epidérmica. Los tejidos en el plano de amputación tales como músculo, cartílago, dermis y tejido nervioso pierden su morfología de origen y producen una población de células de mesénquima llamada blastema (7,8). La desdiferenciación de tejidos diferenciados terminalmente es la clave para la formación

del blastema. El mecanismo de desdiferenciación no se conoce, sin embargo el proceso en sí se ha demostrado usando técnicas histológicas y radioactivas (7,8), al igual que con estudios utilizando marcadores celulares y moleculares (9, 10, 11). La presencia de células de reserva sugerida por Cameron et al. no puede ser descartada, pues estas células sí existen por lo menos en el tejido muscular, pero su participación en el proceso regenerativo no ha sido comprobada (12). Las células del blastema se dividen bajo la influencia del sistema nervioso por 2-3 semanas para más tarde rediferenciarse y dar lugar a los diferentes tejidos que constituyen la extremidad (13). Es imperativo mencionar que la regeneración de las partes amputadas no ocurriría sin la dirección hormonal ó del sistema nervioso. Esto equivale a decir que factores hormonales ó factores neurotróficos parecen ser esenciales para el proceso de regeneración y que al remover la glándula pituitaria ó al desnervar las extremidades se inhibe este proceso regenerativo (13,14). El proceso regenerativo tiene una duración de 6-8 semanas dependiendo de la especie de urodelo, su edad, estadio de desarrollo y el tamaño de los animales (2,5).

El fenómeno de regeneración de extremidades en anfibios ha sido estudiado por más de doscientos años, siendo este reportado originalmente en 1768 por Spallanzani. Hasta la fecha, los mecanismos celulares y moleculares que dictan este proceso regenerativo no han sido comprendidos en su plenitud. Productos esenciales para este proceso son virtualmente desconocidos; por lo tanto estudios a nivel molecular no se han realizado con profundidad en este campo. Tampoco existe un modelo "in vitro" ó de animales transgénicos que pueda facilitar la identificación de factores cruciales en este proceso. La existencia de mutantes espontáneos ó creados experimentalmente puede

aportar la herramienta necesaria para la identificación de genes responsables en el proceso de regeneración.

AJOLOTE MUTANTE SHORT TOES

Recientemente se ha caracterizado un ajolote mutante incapaz de regenerar sus extremidades al ser amputadas (15,16). Este mutante ha sido denominado "Short toes"- "Dedos cortos"-. Fue primeramente identificado como un mutante con defectos en el desarrollo de sus extremidades. En 1967, Humphrey reportó por primera vez sobre estos ajolotes describiendo los defectos del esqueleto en las extremidades, al igual que las anomalías presentes en el desarrollo de sus riñones y ductos Mülerianos (17). Esta mutación induce una reducción en el tamaño de las extremidades de estos animales, siendo los dedos las estructuras más afectadas al mostrar una reducción en el número de falanges. Muchos de estos mutantes muestran anomalías en los carpos/tarsos y metacarpos/metatarsos y también muestran reducción de tamaño en los huesos mayores de las extremidades.

El mal funcionamiento renal es evidente por el edema que aparece en estos animales cerca de su muerte y se observa inicialmente en el tronco del cuerpo y en las extremidades. Los túbulos de los mesonefros aparecen amarillentos y agrandados. Las cápsulas de Bowman's aparecen dilatadas conteniendo un líquido transparente y a veces sangre (16).

La mutación ha sido clasificada como recesiva-mortal (s/s). Estos animales mueren

jóvenes (aproximadamente de un año), antes de su maduración sexual y fallecen por complicaciones en los riñones. Los heterocigotos son fenotípicamente normales y se reproducen normalmente.

Humphrey estudió la capacidad regenerativa de los ajolotes mutantes "s" y obtuvo regeneración incompleta de sus extremidades sin elementos digitales (17). Del Rio-Tsonis et al. repitieron estos experimentos de regeneración con individuos de seis meses de edad, mientras Humphrey trabajó con individuos de tres meses de edad. Los resultados mostraron que el mutante es incapaz de regenerar sus extremidades a esta edad (15,16). Estudios recientes de Mescher con embriones "s" de diferentes edades apoyan los resultados mencionados (18). Sorprendentemente, este mutante regenera la cola, lo cual sugiere que la regeneración de la cola y de las extremidades son eventos independientes (15,16,19).

En vista de la potencialidad de "s" en estudios de regeneración de extremidades, se ha realizado un análisis detallado de los órganos afectados al igual que de su deficiencia regenerativa. También se han iniciado estudios moleculares en busca del gen ó genes responsables de esta mutación. Se proponen varios genes que podrían ser la causa de las manifestaciones de "s", se incluyen entre estos genes conteniendo cajas homeóticas y el gen del Tumor de Wilms.

¿ PORQUE ESTUDIAR GENES CON CAJAS HOMEOTICAS EN "s" ?

Genes con cajas homeóticas han sido implicados en varios mecanismos de desarrollo incluyendo segmentación, determinación de linajes celulares y eventos de inducción (20,21,22). Por lo tanto, existe la posibilidad que genes que contienen cajas homeóticas sean responsables de alguna ó todas las manifestaciones del mutante; pues la mayoría de los defectos aparecen durante el desarrollo temprano (17). Esta posibilidad es apoyada por la reciente identificación de fragmentos polimórficos en el mutante "s" al usar una sonda que contiene una caja homeótica.

¿ QUE SE SABE SOBRE EL GEN DEL TUMOR DE WILMS Y SU RELEVANCIA CON "s" ?

El gen del Tumor de Wilms (WT1) es un oncogen recesivo que codifica una proteína nuclear conteniendo cuatro motivos con "zinc fingers". En pacientes con Tumores de Wilms (tumores en los riñones) este gen se encuentra mutado, y normalmente la mutación es una delección en el cromosoma 11p13. La enfermedad del Tumor de Wilms es una condición que se manifiesta muy temprano durante el desarrollo y se ha encontrado que tiene cierto tipo de relación con la condición de aniridia (defectos en el desarrollo del ojo), con anormalidades de los órganos genitales, y con retardo mental, lo que en conjunto se le llama el Síndrome de WAGR (Wilms, Aniridia, Genitourinary Malformations, Mental Retardation) (23). En ratón y en humanos se ha

encontrado expresión de WT1 durante el desarrollo del sistema urogenital (24,25). En el ratón también se ha detectado expresión de WT1 durante el desarrollo de las extremidades (Hastie, comunicación personal). Uno de los objetivos a largo plazo de este estudio es analizar la posible participación de WT1 en "s", pues se han observado similitudes entre las manifestaciones del mutante " Short toes" con las manifestaciones de pacientes con Tumores de Wilms. Además los patrones de expresión del gen WT1 coinciden con los patrones de las manifestaciones en los mutantes de "s".

I. OBJETIVOS

1. Estudiar la capacidad regenerativa del mutante ajolote " Short toes " a nivel celular y molecular.
2. Determinar el gen o los genes responsables de la mutación de "s".

II. METAS ESPECIFICAS

1. Determinar la capacidad regenerativa de las extremidades en "s".
2. Determinar la severidad del daño en los órganos afectados en "s" a través de estudios histológicos e inmunohistoquímicos.
3. Estudios moleculares con el fin de identificar posibles factores involucrados en la mutación de "s"

RESULTADOS

ESTUDIOS DE REGENERACION DE EXTREMIDADES

Estudios Histológicos.- Estudios histológicos mostraron que el mutante es capaz de producir un cono regenerativo formado de células de mesénquima (blastema). El proceso regenerativo se interrumpe en este estadio y no aparecen señales de diferenciación, aún cuando estos ajolotes se observaron por más de 4 meses.

Un ajolote normal (+/+) regenera sus extremidades completamente en un lapso de 1 a 2 meses. Un cono regenerativo se forma a las 2 semanas y a partir de 3 semanas los eventos de diferenciación comienzan a aparecer en estas extremidades. La característica más prominente en "s" es la formación anormal de la membrana basal, la cual aparece exageradamente gruesa y ondulada, al igual que la aparición de material extracelular en exceso en el blastema. Es posible que la comunicación entre la epidermis y el mesénquima haya sido interrumpida, evitando la finalización del proceso regenerativo.

En la figura #1 de PNAS:89 se pueden observar secciones de blastemas de animales mutantes y animales control en donde se nota la diferencia en la formación de la membrana basal. La figura **1a-b/PNAS** muestra una extremidad de un animal fenotípicamente normal en proceso de regeneración (3 semanas post-amputación) donde la membrana basal se encuentra de tamaño y apariencia normal. En la figura **1c/PNAS** se encuentra una extremidad de un mutante de 3 semanas post-amputación en donde

se observa un cono pequeño y con cantidades anormales de material extracelular dentro del blastema. Extremidades que se dejaron regenerar por meses no señalaron ningún indicio de diferenciación. En la figura **1d/PNAS** se nota que el cono regenerativo de 11.5 semanas contiene abundante material extracelular, interrumpiendo la morfología normal del blastema. En la figura **1e/PNAS** se puede apreciar que la membrana basal del blastema arrestado está exageradamente gruesa y ondulada. Otras secciones de extremidades en proceso de regeneración, de animales normales y mutantes, se puede apreciar en la publicación: Limb Development and Regeneration, pp 171-179, 1993 Wiley-Liss, Inc., figuras **1 y 2**.

En contraste con las extremidades de estos mutantes, la cola de animales "s" regenera relativamente normal, mostrando solo un poco de retraso en el proceso. La comparación de una cola de un animal normal (**2a**) y de un animal "s" (**2b**) se puede apreciar en la figura **2** de PNAS:89.

Estudios Inmunohistoquímicos.- Cuando se analizaron a través de técnicas inmunohistoquímicas las moléculas que componen principalmente la membrana basal (colágeno IV y laminina), no se encontró diferencia entre los mutantes y los animales fenotípicamente normales, los cuales regeneran sus extremidades completamente (15,16). Esto no excluye la posibilidad de que existan defectos en la estructura de los genes que codifican estas moléculas, o su nivel de expresión. Otras proteínas extracelulares como fibronectina, proteoglicanos, y otros colágenos serán estudiados más tarde con anticuerpos que reaccionen con tejidos de *Ambystoma mexicanum* (ajolote).

La figura 3 de PNAS:89 muestra secciones de extremidades en diferentes estadios de regeneración incubados con los diferentes anticuerpos policlonales de colágeno IV y de laminina, los cuales fueron reconocidos por anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína. Las figuras 3 a y b muestran secciones de blastema con dos semanas de regeneración de un animal fenotípicamente normal en donde se observa que la membrana basal se ha teñido utilizando ambos anticuerpos, laminina (a) y colágeno IV (b). Durante la formación temprana del blastema (2 semanas), cuando la membrana basal inicia su formación, se observa que las células de la capa epidérmica se tiñen fuertemente, especialmente las más próximas a la membrana basal. Las figuras 3 c y d muestran secciones equivalentes a 3 a y b pero estas corresponden a animales "s". La figura 3e muestra una sección de blastema de 6.5 semanas de un mutante "s" teñida con el anticuerpo policlonal de laminina. Se observa claramente que la membrana basal expresa esta molécula. Igualmente en la figura 3f se encuentra un blastema de un animal "s" de 5 semanas que se teñió con colágeno IV, y se observó también que la membrana basal expresa esta molécula. Es importante mencionar que las extremidades de animales control después de 5 semanas de post-amputación se encuentran casi completamente regeneradas.

ANALISIS DE LOS DEFECTOS DEL DESARROLLO EN "s"

Al analizar los órganos afectados en "s", se observó un patrón interesante donde los mutantes mostraron un gradiente de severidad en los defectos en todos los órganos

afectados. Los mutantes con más defectos en el desarrollo de extremidades también mostraron el mismo patrón de severidad en los riñones y ductos Mülllerianos/ Wolffianos. Este hecho también coincide con la mortalidad de estos ajolotes donde los más afectados mueren primero.

I. ANALISIS DEL DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES

Humphrey reportó que la anomalía más notable en los mutantes "s" es el desarrollo incompleto de los dedos. Los resultados del presente estudio mostraron los mismos patrones de este defecto, aunque se notó una variabilidad en los defectos de cinco mutantes "s" (favor de referir a la figura 1 de Journal of Morphology [JM]). Las extremidades fueron teñidas con Victoria Azul B. Como se puede ver los animales "s" tienen un número reducido de falanges y una tibia/fíbula más pequeña que los ajolotes normales. También existe una fusión de los tarsos/metatarsos en las extremidades de los mutantes. Como se nota en la figura **1a/JM**, la extremidad del animal control es perfectamente normal. El patrón de los efectos en las extremidades varió desde el mutante más dañado con solo dos dígitos (fig **1f/JM**) hasta el menos dañado con todos los cinco dígitos, siendo estos anormales con un número reducido de falanges y tarsos fusionados (fig**1b/JM**).

II. ANALISIS DE LOS RIÑONES

Estudios Histológicos.- Los riñones de los mutantes "s", eran de tamaño más pequeño que aquellos de los animales control. Los estudios histológicos de los riñones en los mutantes presentaron una organización anormal de los glomérulos y de los túbulos nefróticos; principalmente se observaron vacuolas en sitios donde los glomérulos deberían de existir (fig **2/JM**). Aquí también se observó un patrón de variabilidad de la manifestación del factor "s", en donde el animal menos afectado poseía riñones con varias unidades de glomérulos funcionales. En estos animales también se observó una desorganización de los túbulos y de los ductos en relación con los glomérulos (fig **2b/JM**). El ajolote más afectado mostró muy pocas unidades funcionales de glomérulos y un número elevado de vacuolas (fig **2c/JM**).

Estudios Inmunohistoquímicos.- Estudios inmunohistoquímicos usando anticuerpos policlonales que reconocen laminina indicaron que en los ajolotes normales la molécula de laminina se localiza en el interior (Parafina, fig **5a/JM** y PFA, fig **5d/JM**) como en el exterior (PFA, fig **5D/JM**) de la mayoría de los túbulos (referir a tabla #1 en Limb Development and Regeneration, pp 171-179, 1993 Wiley-Liss, Inc). Por lo contrario, la presencia de laminina en los túbulos de los mutantes fue muy limitada ó ausente (fig **5b y 5e/JM**). Los anticuerpos en contra de colágeno IV no reaccionaron lo suficientemente fuerte y claro con los tejidos del riñón, por lo tanto los datos obtenidos se clasificaron insuficientes para obtener una conclusión certera.

III. ANALISIS DE LOS ORGANOS REPRODUCTIVOS

Estudios Histológicos.- En los ajolotes mutantes, los ductos ya sean de machos (ductos Wolffianos) ó de hembras (ductos Müllerianos), presentaron variaciones de severidad de los defectos; desde la falta de ductos hasta la reducción del tamaño de estos, mostrando deterioro en las células columnares y compactación en las áreas vasculares. En la figura **3/JM** se puede observar la comparación de los ductos Wolffianos entre un ajolote fenotípicamente normal (**a**) y un "s" (**b**), en donde la gran diferencia se encuentra en la región vascular y en las células mesoteliales columnares. Igualmente en la hembra, el animal fenotípicamente normal (**c**) muestra estructuras completamente normales, mientras tanto en "s" los ductos Müllerianos aparecen distorsionados. Las células

mesoteliales columnares en estos ductos han desaparecido y la zona vascular se encuentra altamente distorsionada (d).

Los ovarios y testículos de los mutantes nunca completaron su estadio de maduración. Defectos en los ovarios de los mutantes fueron observados, sin embargo los testículos de estos animales aparecieron normales. Específicamente se detectaron vacuolas dentro de la mayoría de los ovocitos (fig 4/JM). Estudios preliminares a través de técnicas inmunohistoquímicas en estos tejidos no detectaron ninguna estructura positiva.

ESTUDIOS GENETICOS

I. RFLP

Se ha utilizado el ensayo de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) para tratar de identificar defectos a nivel molecular en estos mutantes. Inicialmente, se utilizó una sonda repetitiva proveniente de *Notophthalmus viridecens*, a través de la cual no se observó ningún polimorfismo. Una serie de digestiones diferentes fueron utilizadas incluyendo: EcoRI, BamHI, HindIII, PstI, XbaI, XhoI, HaeIII y HinfI (fig 1). Recientemente se utilizó una sonda de *Ambystoma mexicanum* que contiene una secuencia con una caja homeótica. Esta sonda, denominada AhoxI (26), demostró una diferencia en el patrón genómico al digerir el DNA con la enzima HinfI (fig 2). Los resultados mostraron que solo los heterocigotos y los mutantes poseen las bandas polimórficas.

Para analizar con más detalle este polimorfismo, se decidió separar la caja

homeótica de Ahoxl de sus secuencias 3' y 5' y utilizar estos fragmentos como sondas. Al utilizar la sonda que contiene solo la secuencia 5' del gen Ahoxl, no se obtuvo ningún patrón definido. Al utilizar la sonda que contiene la caja homeótica (homeobox) se observaron las bandas originales (3.5kb, 2 kb), presentes en los mutantes y los heterocigotos (fig 3). Estos resultados sugieren que el polimorfismo observado contiene secuencias de genes con cajas homeóticas y no necesariamente específicas para el gen Ahoxl.

II. REACCION DE POLIMERIZACION EN CADENA (PCR) ESPECIFICA PARA CAJAS HOMEOTICAS

Se eligió la técnica de PCR para amplificar secuencias conteniendo cajas homeóticas por la ventaja de poder amplificar secuencias heterólogas al utilizar oligonucleótidos degenerados de las regiones más conservadas de genes con cajas homeóticas (27). A través de esta técnica se han amplificado fragmentos de aproximadamente 130 pb que corresponden a la región que contiene el dominio de unión al DNA. Primero el DNA se desnaturizo a alta temperatura, mas tarde se escogio una temperatura óptima para que los oligonucleótidos reconozcan secuencias en el DNA de molde y finalmente se utilizo la polimerasa Taq que tiene su actividad máxima a 72°C. Esta polimerasa es estable durante todos los cambios de temperatura y por lo tanto este proceso se puede repetir por varios ciclos, amplificando la secuencia deseada. En estas reacciones de PCR se utilizaron los dos fragmentos polimórficos como molde (fig 4). El

DNA amplificado ha sido clonado en el vector pcrII. Tres clonas del fragmento 3.5 kb han sido identificadas. Cada clona representa un experimento diferente e independiente. La secuencia de estas clonas muestran 100% identidad con la caja homeótica de Ahox1. Nuestros datos señalan a la posibilidad de contaminación vía aerosol durante las reacciones de PCR con el plásmido Ahox1 .

III. CLONAJE DEL GEN DE TUMOR DE WILMS

Con el fin de estudiar el gen del Tumor de Wilms en este sistema, se ha clonado parte del cDNA de ajolote vía RTPCR, utilizando oligonucleótidos semi-degenerados que flanquean el área del gen que contiene los dedos de zinc. Esta técnica es parecida a la mencionada en la sección anterior, pero en este caso se utiliza el cDNA en lugar de DNA como modelo. Se obtuvo primero el cDNA utilizando la enzima Transcriptasa de Reversa a partir de RNA. Se amplificó un fragmento de 216 pb cuando se utilizó ARN de riñones de ajolote (fig 5). Se han obtenido 12 clonas de las cuales todas contienen el fragmento correcto. De estas clonas, 3 han sido secuenciadas (fig 6). Todas mostraron ser el mismo gen con una identidad a nivel aminoácido con el wt1 de Xenopus y de cocodrilo de 99% (fig 7).

IV. PRESENCIA DEL MENSAJE DE WT1 EN LOS RIÑONES DE "s" Y EN LOS RIÑONES DE AJOLOTES NORMALES.

En reacciones de RTPCR fue utilizado ARN asilado de riñones de ajolotes normales y de riñones de animales "s" para corroborar la presencia del mensaje de wt1 en "s". Al utilizar uno de los pares de oligonucleótidos que flanquean los dedos de zinc del gen wt1 se observaron las bandas esperadas de 277 pb en ambos casos.

METODOS UTILIZADOS

ANIMALES

De la Colonia de Ajolotes de la Universidad de Indiana, Bloomington se obtuvieron inicialmente cinco ajolotes "s" y cinco hermanos de estos fenotípicamente normales. Estos animales tenían aproximadamente seis meses de edad. Más tarde se recibieron otros dos mutantes, cuyos datos de edad y relación mutua eran desconocidos. También se recibieron otros ajolotes fenotípicamente normales sin ningún rastro de "s" en su genealogía, incluyendo un ajolote proveniente directamente de México . Cada animal se mantuvo por separado en una solución de 20% Holtfreter's a 27 °C.

Para los estudios de regeneración, las extremidades de los ajolotes fueron amputadas a un nivel distal (al nivel de la muñeca), y los animales se observaron diariamente por un lapso de 16 semanas. Muestras de tejido en proceso de regeneración fueron colectadas a diferentes intervalos incluyendo: 2,3,5,6.5, 11.5, 13, 14, y 16 semanas.

Para realizar estudios de los órganos afectados, se tomaron las extremidades originales de ajolotes fenotípicamente normales y de mutantes y estas se analizaron por medio de la técnica de Victoria Azul B. También los riñones y los órganos sexuales de estos animales fueron colectados al final de los estudios de regeneración, cuando los animales fueron sacrificados, o fallecieron. Los tejidos fueron tratados en diferentes maneras: congelados ó fijados en Bouin's, para más tarde realizar estudios histológicos, inmunológicos y de expresión.

VICTORIA AZUL B

Los extremidades originales fueron fijadas en Bouin's por 24 horas. Posteriormente estas se incubaron con hidróxido de amonio (NH_3OH) 2% por un mínimo de 48 horas, con varios cambios de esta solución, la cual fue reemplazada con agua oxigenada (H_2O_2) 10% hasta que el tejido perdió toda su pigmentación. Los tejidos fueron más tarde deshidratados en etanol 50% y 70% por 2 horas en cada solución y posteriormente fueron teñidos con la solución de Victoria Azul B al 1% (en 70% etanol) por 2 horas. Los tejidos fueron desteñidos a través de una serie gradual de baños con etanol (70%-100%). Finalmente los tejidos se transfirieron a una solución de benzoato de metileno, la cual convierte los tejidos desteñidos en tejidos transparentes, esto permite contrastarlos con los tejidos cartilagosos que tiñen de azul.

HISTOLOGIA

Muestras de tejidos en proceso de regeneración, al igual que tejidos de riñón y de órganos sexuales fueron fijados en Bouin's para ser procesados en parafina. Los tejidos de las extremidades fueron descalcificados en ácido triclorídrico 5% por 24 horas y deshidratadas a través de una serie de lavados con etanol (de 70% a 100%) y eventualmente en xileno. Posteriormente los tejidos fueron incrustados en parafina.

Secciones en serie ($8\mu\text{m}$) fueron colectadas en portaobjetos que fueron previamente cubiertos con gelatina (+/- 1%). Las secciones fueron teñidas con Gomori's

Trichome, Periodic Acid Schiff-Orange G (PAS-O), ó Hematoxylina y Eosina. Las primeras dos técnicas tiñen tejidos que contienen componentes de la matriz extracelular (Gomori's = colágeno, PAS = membrana basal). La última es una tinción general: Eosina = citoplasma y Hematoxylina = núcleo (28).

INMUNOHISTOQUIMICA

Las muestras congeladas ó en parafina fueron seccionadas (6-8µm). Usando xileno se eliminó la parafina de las secciones. Posteriormente estas fueron hidratadas a través de una serie de lavados con etanol de 100-50% y finalmente enjuagados en PBS 1x (phosphate buffer saline)/NGS 5% (normal goat serum) por 20 minutos. Algunas muestras congeladas fueron fijadas con paraformaldehído 4 % después de haber sido seccionadas. Después de incubar las secciones congeladas en PBS 1x/NGS 5% por 20 minutos, estas se procesaron junto con las muestras de parafina. Posteriormente todas las muestras fueron incubadas con los diferentes anticuerpos policlonales por 1 hora a 37°C. Las muestras se enjuagaron tres veces en PBS 1x por 10 minutos cada vez, y luego se incubaron con el anticuerpo secundario que esta conjugado a una molécula de fluoresceína (IgG-Fitc) de Cappel Laboratories por 1 hora, 37°C. De nuevo las muestras se enjuagaron con PBS 1x tres veces y finalmente fueron montadas con glicerol 90%/PBS 1x al 10% y observadas en un microscopio fluorescente. Los anticuerpos primarios fueron dirigidos en contra de la molécula completa de colágeno tipo IV y de laminina; estos fueron donados por Hynda Kleiman (NIH) y por Eva Engvall (LCRF). Ei

anticuerpo de Laminina fue purificado del Sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón (29) ó de tumores del saco amniótico de ratas L2 (30). El anticuerpo en contra de colágeno tipo IV se purificó del Sarcoma EHS (29).

ESTUDIOS DE RFLP

AISLAMIENTO DE DNA

El DNA fue aislado de las colas de ajolotes mutantes, heterocigotos, y ajolotes normales usando el método de fenol/cloroformo descrito en Sambrook et al (31).

SOUTHERN BLOT

El DNA fue digerido con diferentes enzimas incluyendo BamHI, EcoRI, HindIII, XbaI, PstI, HaeIII y HinfI a 37 °C por 12 horas. Las muestras fueron sometidas a electroforesis de DNA y más tarde fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa, usando el protocolo descrito en Sambrook et al (34). Después los filtros fueron fijados sometiénolos a una temperatura de 80°C en vacío por 1 hora. Los filtros se prehibridizaron en una solución conteniendo 35% formamida, SSC 5x, Denhart's 2.5x, SDS 0.1%, fosfato de sodio 20mM pH 6.8, tRNA 0.2 mg/ml y ssDNA 0.1 mg/ml por un mínimo de 4 horas y posteriormente se hibridizaron usando sondas de cDNA radioactivas. Las condiciones de hibridización utilizadas no fueron severas: formamida

35% a 42°C por 12-14 horas. Al lavarse los filtros, las condiciones que se usaron fueron relativamente rigurosas: de SSC 2x/SDS 0.1% a SSC 0.1 x/SDS 0.1%, de 37-68°C con variaciones en temperatura y tiempo de lavado. Los filtros fueron expuestos a película de rayos x por diferentes lapsos de tiempo a -70°C. Las sondas fueron marcadas con ³²p utilizando el método de "oligoprimering" (USB). Las sondas utilizadas fueron las siguientes:

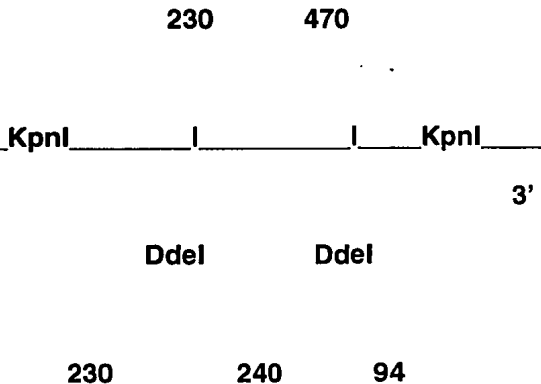
- a) Secuencia repetitiva dispersada D6 de *Noptothalmus viridescens*, la cual fue obtenida del Dr. Joseph Gall y tiene una medida de 600 bases.
- b) Se utilizó la sonda genómica *Ahoxl*- una secuencia conteniendo una caja homeótica aislada del ajolote, la cual tiene homología a la secuencia de *Antp* homeobox en *Drosófila* (66%), a *Hox-1.6* de ratón (84% identidad) y al gen labial de *Drosófila* (79% identidad).

La sonda consiste de un fragmento *KpnI* (560bp) la cual contiene la caja homeótica y parte de la secuencia específica de *Ahoxl* 3' y 5' de la caja. Más tarde *Ahoxl* fue digerido con la enzima *Ddel* para obtener la secuencia específica conteniendo la caja homeótica (240bp), y con *Ddel* y *KpnI* para obtener la secuencia 5'(230) y 3'(94) de *Ahoxl*.

La siguiente es la secuencia de aislamiento de estas sondas:

- 1) Digestión con *Ddel*
- 2) Aislar la caja homeótica 240 bp
- 3) Colectar fragmento conteniendo la secuencia 5' y parte del plásmido PTZ19R, aislar y digerir con *KpnI* para obtener la banda que contiene la secuencia 5'-

230bp y posteriormente aislar este fragmento.



SONDAS USADAS: HB= 240bp
5'= 230bp

CLONAJE DE FRAGMENTOS CONTENIENDO UNA CAJA HOMEOTICA EN "s"

ASLAMIENTO DE FRAGMENTOS

Se realizó un Southern Blot con DNA de ajolotes mutantes digerido con HinfI usando las mismas condiciones que se utilizaron anteriormente. El gel contenía muestras en duplicado y se dividió en dos: una parte se utilizó para repetir el análisis de RFLP usando la sonda Ahoxl y la otra se guardó a 4°C y eventualmente se aislaron las bandas correspondientes a las mostradas en el autoradiograma. Las bandas de interés se obtuvieron del gel utilizando filtros DEAE (S@S). Pedazos de filtros fueron insertados adelante y atrás de las bandas deseadas. EL DNA fue electrotransferido en el filtro delantero, mientras que el filtro trasero protegió contra contaminación de DNA no deseado. El DNA adherido a estos filtros fue posteriormente eluído en una solución de NaCl 1M, Tris 20 mM pH 8.0 y EDTA 0.1mM a 68°C por una hora. Posteriormente se extrajo el bromuro de etidio contenido en el DNA con alcohol isoamílico. EL DNA se limpió adicionalmente con una serie de extracciones de fenol y cloroformo para finalmente precipitar el DNA con acetato de amonio 3.25mM y 2.5 volúmenes de etanol al 95% a 4 °C por 16 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 14k, a 4°C y por 30 minutos. Se enjuagaron las muestras con etanol al 70% y se liofilizaron y resuspendieron en un volumen de 10 µl de agua destilada.

REACCIONES DE PCR

El DNA purificado se utilizó como molde en reacciones de PCR para amplificar secuencias que contienen cajas homeóticas. Tres oligonucleótidos degenerados se utilizaron en este análisis. Estos tres oligonucleótidos corresponden a secuencias conservadas en cajas homeóticas. HB1 corresponde a un pentapéptido que se encuentra en la posición 5' de la caja homeótica: 5'TGACATCTAGANTNTAYCCNTGGATG 3'; HB2 corresponde a una secuencia dentro de la caja homeótica : 5' TGACATCTAGAGARYTNGARAARGARTT 3', en el dominio de la primera hélice; HB3 corresponde a una secuencia en el dominio de la tercera hélice: 5'GCGACGGAATTCRTTYTGRAACCADATYTTN 3'.

Clave: N= A,C,G,T; R= A,G; Y= C,T; D= A,G,T.

En HB1 y HB2, letras destacadas se refieren a la secuencia de reconocimiento de la enzima XbaI, y en HB3 a la enzima EcoRI. Las secuencias subrayadas corresponden a las secuencias degeneradas/conservadas de cajas homeóticas. Oligonucleótidos HB2 y HB3 se usaron en estos experimentos.

Las condiciones en las reacciones de PCR fueron las siguientes: dNTPs 200 μ M, MgCl₂ 1.5 mM, oligoprimeros a 4 μ M, Taq a 2.5 U, tris-HCl 10mM y KCl 50mM. Los ciclos que se usaron fueron los siguientes: Desnaturalizar inicialmente por 3 minutos y posteriormente por 45 segundos, "annealing" a 37°C (30 segundos) con rampa a 72 °C/ 1.5 minutos y extender a 72°C por 1 minuto. Se utilizó una extensión final a 72°C por 5

minutos. 40 ciclos de PCR se usaron en total. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 3%.

CLONAJE

Los productos amplificados se clonaron en el plásmido pcrII (apéndice D) utilizando el kit de " TA cloning " de Invitrogen para la ligación. Después de verificar los productos vía electroforesis en un gel de agarosa al 3%, se utilizaron 3 μ l de cada reacción de PCR, para ligar directamente en el vector pcrII a 12 °C por 12-14 horas con 4 U de T4 ligasa.

Se utilizaron células E. coli DH5 α competentes de BRL para la transformación de las construcciones mencionadas. Se incubó 3 μ l de la ligación anterior con 50 μ l de células DH5 α por 30 minutos a 4°C. Posteriormente las muestras fueron incubadas a 37°C por 20 segundos e inmediatamente se pusieron a 4°C por 2 minutos. Más tarde se añadió a las muestras 0.95 ml de medio de Luria-Bertani; estas se incubaron y agitaron a 37°C por una hora. Finalmente se concentraron las células y estas se aplicaron a platos de agar con penicilina (100 μ g/ml) y X Gal (~100 μ g/ml). Solo las colonias blancas (vs azules) tenían la posibilidad de contener las construcciones correctas. La selección de la bacteria que contenía el plásmido correcto fue hecha a través de técnica de Birboim (31). Después de restringir las clonas con EcoRI e identificar aquellas que contienen el fragmento correcto, estas fueron secuenciadas mediante el método de Sanger (dideoxy), usando el " Sequenace " kit de USB (32).

RTPCR

El RNA fue aislado de los riñones de ajolotes normales ó de embriones de ajolotes normales en un estadio en donde los mesonefros y las gónadas ya habrán sido establecidas y en donde ya se habían iniciado los eventos de inducción necesarios para el desarrollo de las extremidades (33). El RNA fue aislado utilizando el método de CsCl descrito en Sambrook et al (31). Se realizaron reacciones de RTPCR utilizando el RNA mencionado y oligonucleótidos degenerados pero conservados del gen WT1 (apéndice E). Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: wt1= 5'- **AAGYTRTCCCAYTTRCAGATG** -3', el cual representa una secuencia 3' del séptimo "zinc finger"; wt2= 5'- **GAGCAGCTGAGAAACGICCITTCATGTG** -3', el cual representa una secuencia 5' del séptimo "zinc finger"; wt3= 5'- **ACCTGTATGAGTCCTIGTRTG** -3', el cual representa una secuencia 3' en el noveno "zinc finger". Wt1 y wt3 producen un fragmento de 216 pb, mientras que wt2 y wt3 producen un fragmento de 277 pb.

Clave: R= A,G; Y= C,T; I= Inosina

EL cDNA se produjo al utilizar el kit "SuperScript Preamplification System" de BRL que consiste en transcribir en reversa el RNA usando transcriptasa reversa y posteriormente RNase H para destruir cualquier molécula de RNA presente. Por lo tanto se incubó 1µg de RNA de cada tejido con 1µl de "random hexamers" (50 ng/µl) a 70°C por 10 minutos. Estas reacciones fueron colocadas en hielo inmediatamente después de la incubación. 2µl de buffer de síntesis 10x (Tris-Hcl 200 mM pH 8.4, Kcl 500 mM, MgCl₂ 25mM y BSA 1 mg/ml), 1 µl de mezcla de dNTP 10mM, 2 µl DTT 0.1M y 1 µl de

"SuperScript RT" (200 U/ μ l) se añadieron a cada reacción y se dejaron incubar a 26 °C por 10 minutos y luego a 42°C por 50 minutos. Las reacciones se detuvieron al incubarlas a 90 °C por 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron incubadas por 20 minutos a 37°C con 1 μ l de RNase H (2U/ μ l).

Se utilizaron 2-5 μ l de las muestras de RT para las reacciones de PCR. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: dNTPs 200 μ M, MgCl₂ 1.5 mM, oligoprimeros a 4 μ M, Taq a 2.5 U, tris-Hcl 10mM y KCl 50mM. Los ciclos que se usaron fueron los siguientes: Desnaturalizar inicialmente por 3 minutos y posteriormente por 45 segundos, templar a 50°C (30 sec) y extender a 72°C por 45 sec. Se utilizó una extensión final a 72°C por 5 minutos. 35 ciclos de PCR se usaron en total. Los fragmentos obtenidos han sido clonados en el vector pcrII como se describió en la sección anterior. Las clonas fueron estudiadas a través de análisis de restricción con la enzima EcoRI. Las clonas fueron secuenciadas utilizando el método de Sanger con el "Sequenase" kit de USB (32).

Para estudios de expresión de wt1 en "s", se aisló RNA de riñones de animales "s" y de animales normales a través del método de CsCl (31). Reacciones de RTPCR se formularon como se mencionó anteriormente. Las bandas obtenidas fueron verificadas de ser del tamaño esperado de 277 pb (usando los oligonucleótidos wt2 y wt3).

DISCUSION

El mutante ajolote Short toes ha mostrado una deficiencia en su capacidad regenerativa, lo cual lo expone como un modelo ideal para estudios en el area de regeneración de extremidades. Las manifestaciones más prominentes en estos mutantes durante el proceso regenerativo son: la apariencia anormal, gruesa y ondulada de la membrana basal y el material extracelular en exceso que se observan en el cono regenerativo (16). Estas dos características podrían interferir con la interacción y comunicación normal entre el epitelio y el mesénquima y por lo tanto los procesos que deberían proceder después de la formación del blastema no toman lugar. La importancia de la interacción íntima entre estos dos tejidos es ejemplificada en estudios donde la capa epidérmica se ha removido del resto del cono regenerativo dejando a la masa de células mesenquimales del blastema expuestas. Este procedimiento inhibe la continuación del proceso regenerativo (6).

El hecho de que la cola de estos mutantes regenera normalmente a diferencia de las extremidades, propone que estos dos procesos ocurren independientemente y que posiblemente utilicen mecanismos distintos. Esto podría implicar que la falta de capacidad regenerativa en las extremidades de "s" esté íntimamente relacionado con el desarrollo de este tejido. Por lo tanto, el defecto que consecuentemente ha afectado el desarrollo de "s", está probablemente asociado con la capacidad regenerativa de estos mutantes.

En este estudio se analizaron las manifestaciones del ajolote mutante Short toes,

las cuales incluyen el desarrollo anormal de sus extremidades al igual que de su sistema urogenital. Las anomalías más prominentes en las extremidades de "s" consistieron en la reducción y/o ausencia de elementos del esqueleto. Los riñones mostraron una desorganización del tejido en sí al igual que reducción de la cantidad de glomérulos funcionales y aparición de vacuolas. Igualmente, en los ductos se detectó una desorganización del tejido en general e interrupciones entre las diferentes estructuras. Los ovocitos de "s" mostraron vacuolas en el citoplasma, interrumpiendo esta estructura. Interrupción de interacciones entre tejidos diferentes es una de las características que predomina en Short toes.

La asociación de anomalías entre los riñones, el sistema reproductivo y las extremidades no es único a Short toes. En ciertos pacientes con Tumores de Wilms, defectos en el desarrollo de su sistema reproductivo al igual que nefroblastomas se han observado (34). Similarmente en la mutación de " limb deformity " (ld) en ratón se han asociado anomalías en el desarrollo de las extremidades con anomalías en el desarrollo de los riñones. En estos mutantes, el desarrollo de sus extremidades es afectado por la interrupción de eventos que ocurren durante el desarrollo temprano de estas. Las anomalías incluyen reducción y fusión de huesos distales (ulna, radio), de carpos, metacarpos y dígitos, al igual que total ausencia de dígitos post-axiales (35,36,37). Estas anomalías son muy parecidas a las que se observan en mutantes "s". Las anomalías mencionadas pueden ser atribuidas a la malformación de la capa apical ectodérmica durante el desarrollo de las extremidades. Se sabe que esta estructura es responsable de mantener el establecimiento propio del eje y de las

interacciones entre la epidermis y el mesénquima (38). Estas manifestaciones están acompañadas por aplasias en los riñones. Otro ejemplo de la íntima relación entre el desarrollo de los riñones y de las extremidades proviene de estudios en gallina en donde los mesonefros se han destruido vía láser durante el temprano desarrollo de este animal (39). Estos estudios mostraron una inhibición en el desarrollo de las extremidades o un desarrollo anormal de las extremidades, implicando un estímulo inductivo proveniente de los mesonefros necesario para el desarrollo de las extremidades. Tomando estos resultados en consideración, se podría sugerir que en "s" la presencia de un defecto a nivel de células progenitoras comunes de estos tres diferentes tejidos: riñones, extremidades y sistema reproductivo podría explicar las manifestaciones en Short toes.

El gradiente de severidades en "s" se podría explicar en varias maneras. Existe la posibilidad que el gen ó los genes responsables de esta mutación sea ó sean gen ó genes maestro(s) y que dependiendo, ya sea en el tipo de defecto en el gen, su número de copia, ó su nivel de expresión afecten los animales diferentemente. Otra posibilidad es que el fondo genético de estos mutantes sea lo suficientemente variado que afecte la penetración de "s".

Estudios moleculares en este sistema se han concentrado en el análisis de genes que participan en determinación de linajes (21) o que estén implicados en enfermedades que afecten órganos similares a los afectados en "s" (25,34). Inicialmente se utilizó una sonda que contiene una caja homeótica en estudios de RFLP. Genes con cajas homeóticas han sido asociados con mecanismos de diferenciación y de determinación linajes y patrones durante el desarrollo de organismos (20,21,22). Los resultados del

RFLP muestran la existencia de dos fragmentos polimórficos que se encuentran presentes en los mutantes y heterocigotos pero no en animales normales. La clonación de estos fragmentos polimórficos y el subsecuente análisis de estos, aportará información importante para continuar caracterizando este mutante.

Las similitudes entre las manifestaciones del mutante Short toes y las manifestaciones de la enfermedad de Tumor de Wilms, al igual que los patrones de expresión del gen wt1 durante el desarrollo del sistema urogenital (humanos y ratón) y durante el desarrollo de las extremidades (ratón), atrae a la posibilidad de que el gen del tumor de Wilms se encuentre afectado en "s" (24,25). En la mayoría de pacientes con Tumor de Wilms, se han detectado supresiones en el gen de wt1. Sin embargo, en 10% de los casos, en una condición que se llama Síndrome "Denys-Drash ", se han detectado mutaciones puntuales en la región de zinc fingers de wt1. Los pacientes con Síndrome "Denys-Drash", además de poseer nefroblastomas, también exhiben anomalías en su sistema genital (34). Por lo tanto, como estudio inicial, se ha clonado parte del gen de wt1 en ajolote. Se ha encontrado que el mensaje de wt1 se encuentra presente en los riñones de los ajolotes normales al igual que en los riñones de los mutantes "s". Existe la posibilidad que el gen de wt1 en "s" se encuentre mutado y que esta mutación afecte la estructura y/o función de la proteína que codifica, como lo ocurre en el síndrome de " Denys-Drash ". Futuros estudios se concentrarán en la clonación de wt1 de "s" y en el análisis de expresión cuantitativa de wt1 en los diferentes tejidos afectados en "s".

CONCLUSIONES

- I. La mutación del ajolote Short toes pudiera estar involucrado en la cascada de eventos que ocurre a partir de las interacciones epitelio- mesénquima que se observan durante el desarrollo temprano de los órganos afectados.

- II. La mutación del ajolote Short toes pudiera estar asociada con un defecto en un gen o genes conteniendo una caja homeótica.

- III. El gen de Tumor de Wilms se encuentra expresado en los riñones de ajolotes normales y en los riñones de Short toes.

PRESPECTIVAS

1. Los estudios que se han propuesto ayudarán a elucidar aspectos moleculares involucrados en la mutación del ajolote "Short toes". Por lo tanto estos estudios podrían aportar información relevante en las áreas del desarrollo del sistema urogenital, del desarrollo de extremidades y del sistema regenerativo.
2. Estos estudios ayudarán a establecer al mutante "Short toes" como un modelo para estudios moleculares en el área de regeneración de extremidades en anfibios.
3. Si es que se llega a establecer una relación entre el gen de Tumor de Wilms y el factor de "s", entonces estos estudios podrían contribuir con un modelo animal para estudiar la enfermedad de Tumor de Wilms.

REFERENCIAS

1. Thorton, CS (1968). Amphibian Limb Regeneration. *Adv. Morphog* 7: 205-249.
2. Wallace, H (1981). *Vertebrate Limb Regeneration*. Chechester, Wiley.
3. Tsonis, PA (1991). Amphibian Limb Regeneration. *In Vivo* 5: 541-550.
4. Scadding, SR (1980). Limb Regeneration in Adult Amphibia. *Can. J. Zool.* 59: 34-36.
5. Scadding, SR (1977). Phylogenetic Distribution of Limb Regeneration Capacity in Adult Amphibia. *Can. J. Zool.* 202: 57-68.
6. Thorton, CS (1957). The Effect of Apical Cap Removal on Limb Regeneration in *Amblystoma* larvae. *J. Exp. Zool.* 134: 357-384.
7. Hay, ED (1959). Electron Microscopic Observations of Muscle Dedifferentiation in Regenerating *Amblystoma* limbs. *Develop. Biol.* 1: 555-585.
8. Hay, ED, and Fischman, DA (1961). Origin of the Blastema in the Regenerating Limbs of the Newt *Triturus viridescens*. *Develop. Biol.* 3: 26-59.

9. Wallace, H, Maden, M, and Wallace, BM (1974). Participation of Cartilage in Amphibian Limb Regeneration. *J. Embryol. exp. Morph.* 32,2: 391-404.
10. Casimir, CM, Gates, PB, Patient RK, and Brockes, JP (1988). Evidence for Dedifferentiation and Metaplasia in the Amphibian Regeneration from Inheritance of DNA Methylation. *Development* 104: 657-668.
11. Lo, DC, Allen, F, and Brockes, JP (1993). Reversal of Muscle Differentiation during Urodele Limb Regeneration. *PNAS* 90: 7230-7234.
12. Cameron, JA, Hilgers, AR, and Hinterberger, TJ (1986). Evidence that Reserve Cells are a Source of Regenerated Adult Newt Muscle in Vitro. *Nature* 321: 607-610.
13. Singer, M (1952). The Influence of the Nerve in the Regeneration of the Amphibian Extremity. *Quart. Rev. Biol.* 27: 169-200.
14. Liversage, RA, McLaughlin, DS and McLauhlin, HMG (1985). The Hormonal Milieu in Amphibian Appendage Regeneration. In *Regulation of Vertebrate Limb Regeneration*, Oxford University press. (Sicard, RE, ed), pp 54-80.
15. Del Rio-Tsonis, K, Washabaugh, CH, and Tsonis, PA (1992). The Mutant Axolotl

Short toes Exhibits Impaired Limb Regeneration and Abnormal Basement Membrane Formation. PNAS 89: 5502-5506.

16. Tsonis, PA, Del Rio-Tsonis, K, and Washabaugh, CH (1993). Analysis of the Mutant Axolotl Short toes. Limb Development and Regeneration: 171-179, Wiley-Liss.
17. Humphrey, RR (1967). Genetic and Experimental Studies of a Lethal Trait (Short toes) in the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). J. Exp. Zool. 164: 281-296.
18. Mescher, AI (1993). Development and Regeneration of Limbs in the Short Toes Axolotl Mutant. Limb Development and Regeneration: 181-191, Wiley-Liss.
19. Egar MW, Madraswalla, F (1992): Tail Regeneration in the Juvenile and Adult Axolotls. Anat. Rec. 232: 29A-30A.
20. Izpisúa-Belmonte, JC and Duboule, D (1992). Homeobox Genes and Pattern Formation in the Vertebrate Limb. Devel. Biol. 152: 26-36.
21. Kessel, M and Gruss, P (1990). Murine Developmental Control Genes. Science 249: 374-379.

22. Cho, KWY, Blumberg, B, Steinbeisser, H and De Robertis, EM (1991). Molecular Nature of the Spemann's Organizer: The Role of the Xenopus Homeobox Gene Goosecoid. *Cell* 67: 1111-1120.
23. Call, KM, Glaser, T, Ito, CY, Buckler, AJ, Pelletier, J, Haber, DA and Housman, DE (1990). Isolation and Characterization of a Zinc Finger Polypeptide gene at the Human Chromosome 11 Wilm's Tumor Locus. *Cell* 60: 509-520.
24. Pelletier, J, Schalling, M, Buckler, AJ, Rogers, A, Haber, DA and Housman, D (1991). Expression of the Wilm's Tumor Gene Wt1 in the Murine Urogenital System. *Genes Dev.* 5: 1345-1356.
25. Pritchard-Jones, K, Fleming, S, Davidson, D, Bickmore, W, Porteous, D, Gosden, C, Bard, J, Buckler, A, Pelletier, J, Housman, D, van Heyningen, V and Hastie, N (1990). The candidate Wilms' Tumor Gene is Involved in Genitourinary Development. *Nature* 346: 194-197.
26. Whiteley, M and Armstrong B (1989). Isolation and Characterization of a Developmentally Regulated Homeobox Sequence in the Mexican Axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Biochem. Cell Biol.* 68: 622-629.
27. Mackem, S and Mahon, K (1991). Ghox 4.7: A Chick Homeobox Gene Expressed Primarily in Limb Buds with Limb-type Differences in Expression. *Development*

112: 791-806.

28. Drury, RAB and Wallington, EA (1980). In Carleton's Histological Technique, Oxford University press, 5th ed. pp 185, 237 y 137.
29. McGarvey, ML, Baro-Van Evercooren, A, Kleinman, HK and Dubois-Dalcq, M (1984). Synthesis and Effects of Basement Membrane Components in Cultured Rat Schwann Cells. Dev. Biol. 105: 18-28.
30. Engvall, E, Krusius, T, Wewer, U and Ruoslahti, E (1983). Laminin from Rat Yolk Sac Tumor: Isolation, Partial Characterization and Comparison with Mouse Laminin. Arch. Biochem. Biophys. 222: 649-656.
31. Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T (1989). Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nded. (Ford, N, Nolan, C and Ferguson, M, eds).
32. Sanger, F, Niklen, S and Coulson, AR (1977). DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors. PNAS 74: 5463-5467.
33. Bordzilovskaya, NP, Dettlaff, Duhon, ST and Malacinski, GM (1989). Table of Stages of the Normal Development of Axolotl Embryos and the Prognostication of

Timing of Successive Developmental Stages at Various Temperatures. In *Developmental Biology of the Axolotl*, Oxford University press (Malacinski and Armstrong, eds), pp 201-219.

34. Pelletier, J et al. (1991). Germline Mutations in the Wilms' Tumor Suppressor Gene are Associated with Abnormal Urogenital Development in Denys-Drash Syndrome. *Cell* 67: 437-447.
35. Kleinbrecht, J, Selow, J and Winkler, W (1982). The Mouse Mutant Limb Deformity (ld). *Anat. Anz. Jena* 152: 313-324.
36. Woychik, RP, Stewart, TA, Davis, LG, D'Eustachio, P and Leder, P (1985). An Inherited Limb Deformity Created by Insertional Mutagenesis in a Transgenic mouse. *Nature* 318: 36-40.
37. Woychik, RP, Maas, RL, Zeller, R, Vogt, TF and Leder, P (1990). "Formins": Proteins Deduced from the Alternative Transcripts of the Limb Deformity Gene. *Nature* 346: 850-855.
38. Saunders, JW, Jr, Cairns, JM and Gasseling, M (1957). The Role of the Apical Ridge of Ectoderm in the Differentiation of the Morphological Structure and Inductive Specificity of Limb parts in the Chick. *J. Morph.* 101: 57-58.

39. Geduspan, JS and Solursh, M (1992). A Growth-Promoting Influence from the Mesonephros during Limb Outgrowth. *Dev. Bio* 151: 242-250.

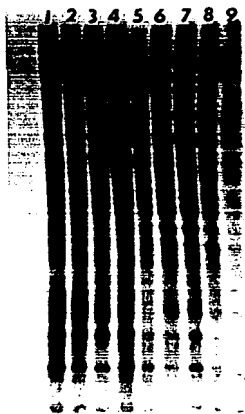


FIG. 1

RFLP de ADN aislado de ajolotes normales (+/+), mutantes (s/s) y heterocigotos (+/s). EL ADN fue digerido con la enzima *Hinf*I. Se utilizó la sonda repetitiva de *Noptthalmus viridescens* D6. No se observó ningún polimorfismo. 1-5 = s/s; 6,8,9 = +/s; 7 = +/+.

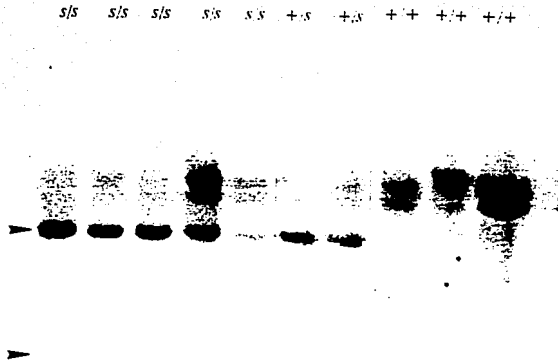


FIG. 2

RFLP donde el ADN fue digerido con la enzima *Hinf*I. Se utilizó la sonda *Ahox1* de ajolote. Existen dos bandas polimórficas presentes en los ajolotes mutantes (*s/s*) y en los heterocigotos (*+/s*), pero no en los ajolotes normales (*+/+*). Este análisis contiene 5 diferentes mutantes de la misma familia, 2 hermanos de "s" (heterocigotos) y 3 ajolotes normales. Las flechas señalan las bandas polimórficas (3.5 kb @ 2 kb).

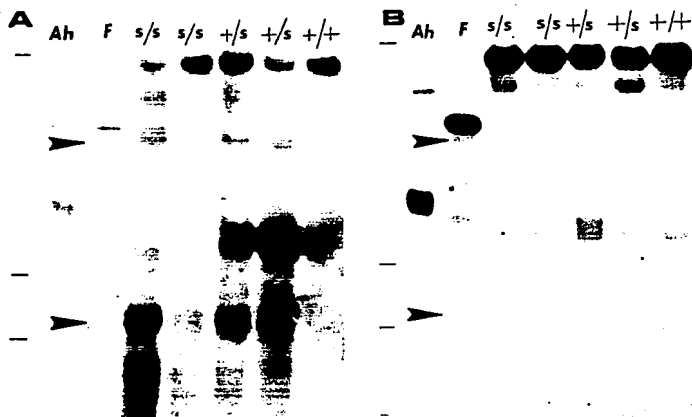


FIG. 3

Esta figura muestra el mismo Southern Blot hibridizado con dos diferentes sondas: (A) Se utilizó la sonda completa de Ahox1; (B) Se utilizó solo la secuencia 5' de Ahox1 sin la caja homeótica. Las flechas señalan las posiciones donde las bandas polimórficas se deben localizar. Notar que al usar solo la secuencia 5' de Ahox1 (B) las bandas polimórficas no se detectan. Mutantes = (s/s), heterocigotos = (+/s), normales = (+/+). Ah= Plásmido que contiene Ahox1; F= Plásmido que contiene Formina.

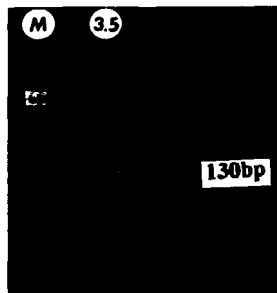


FIG. 4

PCR usando ADN aislado del fragmento polimórfico (3.5kb) de un ajolote "s" y oligos degenerados de las regiones más conservadas de genes con cajas homeóticas. Se amplificó un fragmento de 130 pb (flecha). (-) = control negativo, el cual contiene todos los reactivos menos el cADN.

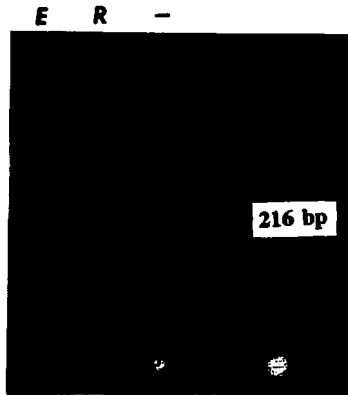


FIG. 5 RTPCR usando ARN aislado de riñones de ajolotes normales, al igual que de embriones de ajolote normales (estadio 38). Se amplificó un fragmento de 216 pb cuando se utilizaron oligos semi-degenerados de las regiones más conservadas del gen del Tumor de Wilms (WT1). E = embrión; R = riñón; (-) = control negativo, el cual contiene todos los reactivos menos el cADN.

AXOLOTL WTI (216pb)

AAAGTTGTCCCATTTGCAGATGCACAACCGAAAGCACACAGGTGAA	45
K L S H L Q M H N R K H T G E	
AAGCCGTACCAGTGTGATTTTAAGGATGTGAGCGGCGATTTTCC	90
K P Y Q C D F K D C E R R F S	
CGTTCCGACCAACTCAAAGACATCAAAGAAGACACACAGGTGTG	135
R S D Q L K R H Q R R H T G V	
AAACCATCCAATGTAAAACCTGTCAGAGAAAGTTCTCTCGATCT	180
K P F Q C K T C Q R K F S R S	
GATCATTTGAAGACCCACACCAGGACTCATACAGGT	216
D H L K T H T R T H T G	

FIG. 6

Secuencia parcial del gen axWT1 obtenido a través de RTPCR usando ARN de riñones de ajolotes normales. Incluye del séptimo al noveno "zinc fingers".

% de identidad con axWT	ADN	A.A
WT1 HUMANO	84	97
WT1 GALLINA	92	97
WT1 COCODRILO	90	99
WT1 XENOPUS	83	99

FIG. 7 Comparación de la secuencia parcial de axWT1 con las secuencias de Wt1 en otras especies al nivel ADN y al nivel aminoácido.

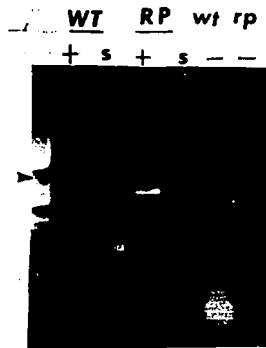


FIG. 8

Presencia del mensaje de axWt1 en los riñones de los ajolotes normales y en los riñones de "s" a través de reacciones de RTPCR. Se amplificaron bandas de 277 pb en ambas muestras. Como control positivo y estandard interno se amplifico parte del gen de la proteina ribosomal de ajolote = RP. + = ajolote normal; s = ajolote mutante; - = control negativo, conteniendo todos los reactivos menos el cADN.

APENDICE

The mutant axolotl Short toes exhibits impaired limb regeneration and abnormal basement membrane formation

KATIA DEL RIO-TSONIS, CHARLES H. WASHABAUGH, AND PANAGIOTIS A. TSONIS

Laboratory of Molecular Biology, Department of Biology, University of Dayton, Dayton, OH 45469-2320

Communicated by Susumu Ohno, March 17, 1992

ABSTRACT The mutant axolotl Short toes develops with abnormal kidneys, Mullerian ducts, and limbs and provides one of the few experimental systems for developmental studies in amphibia. The present paper describes another deviation from this animal's normal physiology, which is very characteristic of the wild type: amputated limbs of Short toes fail to regenerate. A blastema is formed but differentiation does not occur. Detailed histological analysis provides evidence of abnormal formation of the basement membrane and accumulation of extracellular matrix within the blastema, which could be attributed to an imbalance of extracellular matrix and basement membrane proteins. The basement membrane develops much thicker and is convoluted in the arrested blastema of mutant animals. In contrast to the limbs, the tails of Short toes regenerated normally with no apparent abnormalities. No gross genomic aberrations have been detected between normal and mutant DNA, indicating that a large deletion or insertion is not likely to be the cause of this mutation.

The isolation and characterization of genes that regulate pattern formation and differentiation during embryonic development in different organisms are of vital importance in elucidating the molecular mechanisms underlying these processes. Two ways to approach this problem are to create developmentally affected mutant organisms—i.e., transgenic mice—or to simply find these types of mutants as they occur in nature and perform detailed molecular analyses. The limb deformity mutation created in transgenic mice by insertional mutagenesis is an excellent example of how the study of such a mutation has added to our understanding of what genes and what events can possibly be involved in the development of limbs in mammals (1). Equally important have been the studies of homeobox-containing genes in *Drosophila* mutants, where several genes have been mapped as developmentally controlling master genes (2, 3).

The use of mutant organisms can be extended to the study of one of the most fascinating phenomena that takes place during adulthood of many amphibians—namely, limb regeneration. Urodeles, which have the ability to completely regenerate their limbs after they are amputated, undergo a unique series of events upon amputation. First, a wound epithelium is formed, followed by formation of a mass of undifferentiated mesenchymal cells called the blastema. When this blastema reaches a certain size, a basement membrane is formed (2–3 weeks postamputation) in the intersection of the wound epithelium and the blastema. This epithelium–mesenchyme establishment might give signals to the blastema cells to begin the process of differentiation, thus giving rise to the missing parts. The whole process can take 2–3 months depending on size, age, and species (4–6). The availability of mutants with impaired limb regeneration could provide an important tool and could be used to dissect the molecular mechanisms controlling this phenomenon and its

absence in higher vertebrates. Until now, mutations that affect amphibian limb regeneration have not been reported.

A naturally occurring white axolotl mutant, called Short toes (*s*), has been found to show abnormal development of limb and urogenital elements. In addition, Humphrey (7) reported that regeneration of such abnormal limbs is affected so the regenerates do not possess the same number of bones as the parental limb. These characteristics make this animal a prime subject for developmental as well as limb regeneration studies. Short toes mutants possess a lethal recessive mutation that affects the normal development of their limbs, Mullerian ducts, and kidneys. These axolotls rarely reach sexual maturity and usually die within 1 year from renal dysfunction; however, there have been exceptions to the time of death (7–9). The most-affected skeletal components of the developing limb are the fingers and toes, showing a significant reduction in size as well as almost complete absence of phalanges. Many of these mutants also have abnormal carpals and metacarpals and showed a reduced size on the major bones of the limbs (7, 8). The abnormalities of the affected organs are not the same in all mutant animals. They differ in severity, which correlates with the time of death. The most severely affected animals die first and the less affected ones die 2–3 months later. The degree of severity follows the same pattern in all affected organs of an individual—for example, the most-affected animal has the most-affected limbs, Mullerian ducts, and kidneys (unpublished data).

Since detailed studies of the regenerative capacity of the *s* mutant have not been performed, we decided to undertake a detailed histological analysis of the process of limb regeneration in these mutant axolotls to explore the probable events that take place during such a process. In addition, to understand molecular events and to characterize genes involved in limb regeneration, we have initiated genomic studies by Southern analysis of restriction fragment length polymorphisms.

Our studies show that limb regeneration is impaired in the mutant limbs, while tail regeneration is not. This finding makes Short toes the most suitable mutant for the study of limb regeneration at present. The inhibition of regeneration seems to be related to abnormal formation of the basement membrane and extensive production of extracellular matrix material within the blastema. Furthermore, the initial restriction fragment polymorphism studies show no apparent gross genomic differences between mutant and control animals that might be connected to the *s* mutation.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Axolotls were obtained from the Axolotl Colony (Indiana University, Bloomington). We received two shipments of Short toes: one in September 1990 (five animals; all siblings; 6 months old) and the other in September 1991 (two animals of unknown age and relationship).

Histological Analysis. All extremities of seven mutant Short toes and five normal axolotls were distally amputated. Samples of regenerates were collected at 2, 3, 5, 6.5, 11.5, 13, 14,

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

and 16 weeks. These samples were fixed in Bouin's fixative, decalcified in 5% trichloroacetic acid, and embedded in paraffin. Serial sections (8 μm) were cut for all samples and collected in gelatin-coated slides. Sections were stained with hematoxylin and eosin, periodic acid/Schiff reagent, or Gomori's trichrome. The latter two specifically stain for basement membrane and some extracellular matrix components.

Immunohistochemical Analysis. Paraffin-embedded samples and frozen samples were longitudinally cut at 6–8 μm . Paraffin sections were deparaffinized in xylene and passed through an ethanol gradient. Sections were preincubated in phosphate-buffered saline (PBS) containing 5% normal goat serum and were then incubated with the primary polyclonal antibody at 37°C for 1 hr. The primary antibodies were directed against the whole molecules of collagen type IV and laminin (1:50 dilution) [kindly provided by Hynda Kleinman (National Institutes of Health) and Eva Engvall (La Jolla Cancer Research Foundation)]. Laminin was purified either from murine Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarcoma (10) or from L2 rat yolk sac tumor (11). Collagen type IV was

purified from murine EHS sarcoma as described for laminin (10). Reactivity of these antibodies with muscle membranes and basement membranes in newts and axolotls has been demonstrated in other studies (12) and by us (unpublished data). The samples were washed three times with 1 \times PBS and afterwards they were incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cappel Laboratories) for 1 hr at 37°C. The samples were washed three times with 1 \times PBS, mounted in 90% (vol/vol) glycerol/10% PBS, and observed under a fluorescence microscope.

RESULTS

Limb and Tail Regeneration in *s* Mutants. Twenty-seven *s* limbs and 20 normal axolotl limbs from animals \approx 6 months old were amputated distally at the ulna-radius level and were observed at time intervals up to 16 weeks. Samples were also collected at different stages/times for histological analysis. Limbs from wild-type axolotls regenerated normally, forming a large cone by 2 weeks postamputation and initiating the

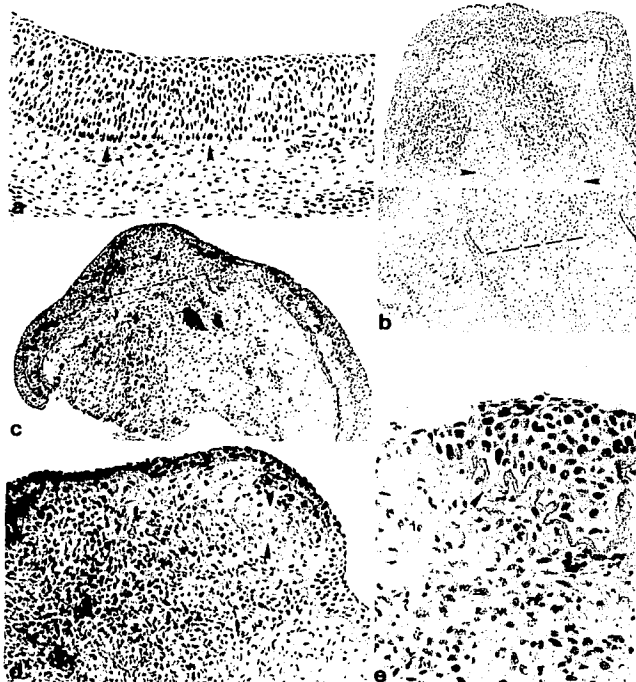


FIG. 1. Hematoxylin and eosin staining of regenerates. (a and b) Normal regenerating limb from a wild-type axolotl 3 weeks postamputation. (a) Magnified image of b showing thin basement membrane (arrowheads) between epithelium and underlying blastema. ($\times 55$.) (b) Note that the regenerate is quite large and has already initiated the process of differentiation, evident by the presence of cartilaginous tissues (arrowheads). ($\times 20$.) (c) Regenerating limb from a mutant animal 3 weeks postamputation. Note reduced size of the cone and lack of differentiated cells. Arrowhead indicates a region of abundant extracellular matrix deposition. This was also confirmed by Gomori's and periodic acid/Schiff staining. ($\times 20$.) (d) Blastema from a mutant axolotl 11.5 weeks postamputation, where the cone has been arrested with no signs of differentiation and displaying extensive extracellular matrix (arrowheads). ($\times 55$.) (e) Blastema from a mutant 11.5 weeks postamputation showing an abnormal basement membrane (arrowhead). The membrane is thick and convoluted. ($\times 105$.) Dashed line denotes amputation plane.

differentiation process at ≈ 3 weeks, which was apparent by the condensation of prechondrogenic cells (Fig. 1*b*). By 6 weeks, these axolotls were completely regenerated. On the other hand, regeneration of the limbs from the mutants was halted at the early to midcone stage. The cone formed as early as 2 weeks, but it never developed into a palette (Fig. 1*c* and *d*). In some cases, the blastema was enlarged up to the age of 16 weeks, which was the time of the last harvest. Histological analysis of mutant regenerates showed that the basement membrane, which usually appears right before differentiation begins, was abnormal (Fig. 1*d* and *e*). Even though, in early stages, this basement membrane morphologically resembled the one from the wild-type control, it later showed (after 6.5 weeks) an invasive behavior, moving inward toward the blastema itself. Finally, morphologically it also became convoluted (Fig. 1*e*). Careful inspection of our histological sections revealed that such an abnormal formation of the basement membranes, like the one shown in Fig. 1*e*, was not an artifact due to the sectioning angle. This specific anatomical feature observed in the mutant could be the consequence of the irregular formation of the blastema cone that failed to develop and, therefore, compressed the internal structures. In the arrested blastema of the mutants, abundant synthesis of extracellular matrix was apparent (Fig. 1*c* and *d*). In all but 3 (of 27) limbs that we analyzed, no obvious signs of differentiation were apparent. Those 3 limbs, even though they showed signs of differentiation, never regenerated the whole missing part, but rather an amorphous structure was formed 6–8 weeks postamputation. These 3 limbs (all forelimbs) belonged to the second group of mutants that we received and the difference might be due to the younger age of the animals. The regeneration process was very similar in all the other mutants and did not differ according to the severity of the limb abnormality.

Tail regeneration in the *s* mutants, interestingly enough, showed a quite normal process of regeneration, somewhat later than in the normal animals and displaying no apparent histological abnormalities (Fig. 2). Soon after amputation, a blastema cone was present in both sets of animals. As early as 2 weeks, the regenerating tails displayed differentiation of new tissues including cartilage. The controls were completely regenerated by 6 weeks, while the mutants took longer (8–9 weeks). No abnormalities in formation of basement membrane or other extracellular matrix components were apparent.

Immunohistochemistry. Paraffin or frozen sections from regenerating mutant and wild-type limbs ranging in time from 2 to 11.5 weeks postamputation were stained with anti-laminin and anti-type IV collagen antibodies, which are the main proteinaceous components of basement membranes. Histologically, the basement membrane is built 2–3 weeks postamputation in both cases. Our results showed that these antibodies reacted with the same tissues in control and mutant blastema (Fig. 3). In other words, both laminin- and type IV collagen-related molecules were present in abnormal basement membrane despite the use of paraffin or frozen sections. The pattern of expression was the same in normal and mutant limbs. During the early stages of blastema formation, epithelial cells synthesized the two proteins extensively, as can be judged from the intensity of staining. Specifically, there is a clear gradient of the expression in epithelium of tissues stained with anti-laminin antibodies; cells in closer proximity to the mesenchyme synthesized more protein, while cells closer to the distal tip of the epithelium synthesized less or no protein (Fig. 3*a* and *c*). Strong staining with both antibodies was also present in the outermost layer of the epithelium, the keratinized layer. This most likely was due to nonspecific staining of the antibodies. A fine lining at the border between the epithelium and the mesenchyme and where the basement membrane will be

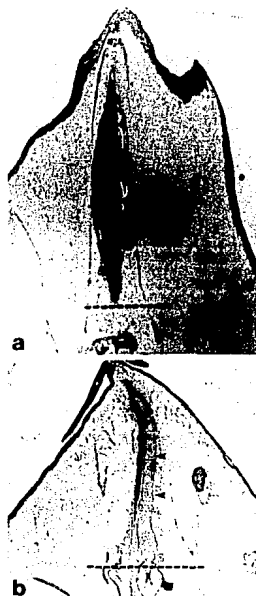


Fig. 2. (a) Regenerating tail 4 weeks postamputation from a wild-type axolotl with advanced differentiation of cartilaginous elements (arrowheads). ($\times 10$). (b) Regenerating tail from an *s* mutant 4 weeks postamputation showing differentiation of cartilaginous elements (arrowhead). Dashed line denotes plane of amputation. Basement membrane in both cases appears normal. ($\times 7$). Hematoxylin and eosin staining.

formed is evident as early as 2 weeks postamputation (Fig. 3*a–d*). This lining coincides with the upper layer of the basement membrane, the lamina rara (13). In later stages, mutant regenerates—5 weeks (Fig. 3*f*) and 6.5 weeks (Fig. 3*e*)—depicted a more-defined staining of the basement membrane with collagen type IV and laminin, respectively. By this time, the wild-type axolotl had formed digits and also showed similar patterns of staining (data not shown; see also ref. 12 for laminin). These results provide evidence that synthesis of proteins related to the two main proteins of the basement membrane does occur and, while they exclude the possibility of mutations affecting the synthesis of laminin or type IV collagen, they do not rule out the possibility of structural abnormalities in these proteins or in other proteins of the basement membrane, such as heparin sulfate proteoglycan and entactin. Similarly, a defect in regulation of the genes coding for proteins of the basement membrane should not be ruled out. Similar patterns of immunostaining were detected in tails from control and mutant animals (data not shown).

Genomic Analysis of *s* DNA. Preliminary genomic analysis of mutants and normal axolotls was performed through Southern blots with a new repetitive sequence probe, kindly provided by J. G. Gall (14). DNA from five different *s* mutants (all siblings; male and female), two white axolotls, possibly heterozygous (siblings with the mutants; one male and one female), two wild-type black axolotls (one male and

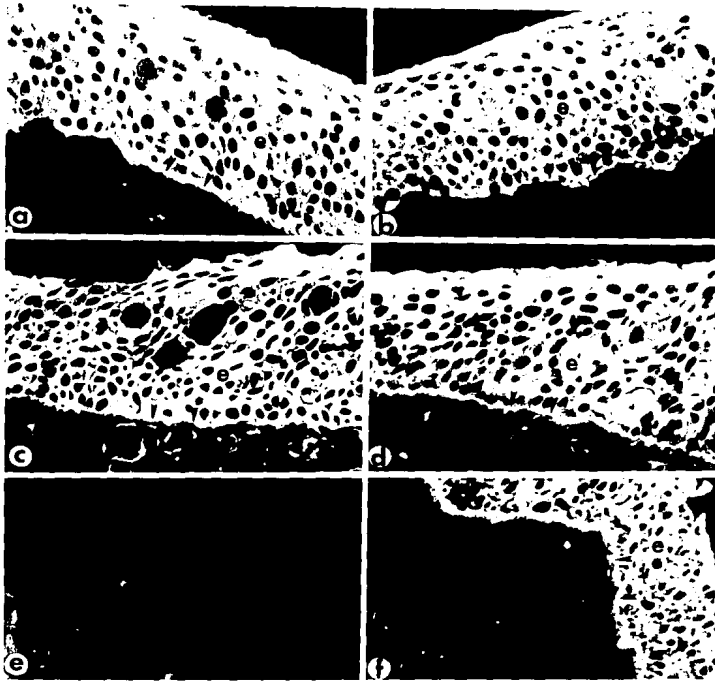


Fig. 3. Immunofluorescence staining of regenerating limbs depicting the border between wound epithelium (e) and the blastema. (a) Regenerate (2 weeks) from a wild-type axolotl stained with anti-laminin antibody. Note extensive staining in the epithelium (e), especially in those cells closer to the basement membrane, which by now is being deposited (arrowheads). (b) Wild-type blastema (2 weeks) stained with anti-collagen type IV antibody, indicating stronger staining where the basement membrane is being formed (arrowheads). (c) Mutant limb blastema (2 weeks) stained with anti-laminin antibody, showing extensive staining in proximal cells of the epithelium, especially those that synthesize basement membrane (arrowheads). (d) Mutant limb (2 weeks) stained with anti-collagen type IV antibody. Intensive staining is seen in the border between epithelium and blastema, the presumptive basement membrane (arrowheads). (e) Mutant limb blastema (6.5 weeks) stained with anti-laminin antibody, indicating a stronger staining of basement membrane (arrowheads). Epithelium is stained weakly. (f) Mutant limb blastema (5 weeks) stained with anti-collagen type IV antibody, denoting strong staining in epithelium and in components of basement membrane (arrowheads). *a-d* and *f* are frozen sections; *e* is a paraffin section. ($\times 105$.)

one female), and two white axolotls with no sign of the mutation for five generations (one male and one female) was prepared and digested with several restriction enzymes, including *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst* I, *Hae* III, and *Hin*DI. In all cases, no conclusive polymorphism was detected, suggesting that gross chromosomal aberrations such as insertions or deletions might not be present in the *s* mutant. These results imply that the Short toes' defects could be the outcome of a point mutation(s) or a consequence of abnormal regulatory events.

DISCUSSION

Limb regeneration in *Ambystoma mexicanum* is a well-studied phenomenon, where complete limbs regenerate within weeks to months after amputation (depending on the size and age of the animal). Short toes, the *s/s* lethal recessive mutant, on the other hand, follows an interesting pattern of regeneration. Humphrey (7) has reported that these mutants could undergo partial limb regeneration after their limbs had

been amputated, regenerating most of the missing parts, but missing either whole fingers or just phalanges. We found that, in contrast with Humphrey's observations, when the limbs of these animals were amputated, $\approx 90\%$ of the limbs showed that their regenerative process was halted at specific stages just before differentiation. This difference could be attributed to the following reasons: (i) Humphrey's amputations were performed in younger animals (3 months old), while we performed our amputations in animals at least 6 months old (except the three animals that were of unknown age and relationship to the others), suggesting that age may play a role in the mechanisms of action of such a mutant gene(s). (ii) Since the batch of mutants used for our experiments was from a much later generation than Humphrey's, it is possible that, as these alleles are passed through successive generations, the severity of the mutation increases. Such a possibility could be high since we have noticed that the degree of limb abnormalities varies among different mutants, ranging from mild (affecting only very distal limb parts) to severe (affecting more proximal regions as well) (unpublished data). Such a

case could indicate that several different mutations involving progressively stronger alleles cause deletions of discrete anatomical structures. On the other hand, this variation among the mutants could also be attributed to a gene dosage effect.

During development, this mutation affects the limb structures of axolotls in the proximal-distal axis and, therefore, there might be a gradient requirement for *s* activity in the developing limbs (unpublished data). A similar case can be observed in the Distal-less (*Dll*) mutation in *Drosophila*. The difference, however, is that in *Dll* progressively stronger alleles do not cause deletions of discrete structures in a simple distal to proximal series as in *s*, but parts are lost concomitantly so that the different regions of the limb are still present but are fused together and reduced in size (15). A homeodomain-containing protein is the product of *Dll*.

The limb deformity mutation (*ld*) created in transgenic mice by insertion of the *myc* oncogene revealed that the disrupted gene encodes a nuclear protein called formin.* Developing *ld* limbs show abnormalities in the apical ectodermal cap, a structure involved in proper establishment of the axis and epidermal-mesenchymal interactions (16). The limb abnormalities and the renal aplasia caused by that mutation share some similarities with *s*; therefore, the possibility of a formin involved in *s* mutation should be taken into consideration in future studies with this mutation.

The failure of these mutants to undergo differentiation during limb regeneration might be explained by the fact that the basement membrane develops abnormally, interfering with the normal interaction and communication between epithelium and mesenchyme. Disruptions of these interactions by removal of the wound epithelium result in inhibition of regeneration (17-20). In addition, in newt regenerates, the administration of potent chemical carcinogens retards formation of the basement membrane and eventually interferes with the normal regenerative process (21). Interestingly, the thick convoluted morphology of the basement membrane and excess extracellular material in the blastema resembles the one that can be formed in retinoic acid-treated nonregenerating double posterior zeugopodia and that seemed to have interfered with the normal epithelial-mesenchymal interactions as reported by Stocum and Crawford (22). Mutant regenerates also depicted abundant accumulation of extracellular matrix material, which could be also interrupting normal cell-cell interactions and eventually interfering with differentiation events. In contrast, during tail regeneration, the basement membrane of mutants developed intact and no abnormal accumulation of extracellular matrix material was detected. Tails regenerated were somewhat delayed but perfectly normal. These results suggest that the different regenerative capabilities of the salamander might not be linked to a single unique mechanism. Therefore, we have a mutation that affects only limb regeneration, depicting abnormalities in formation of the basement membrane and overproduction of extracellular matrix components within the blastema. Since laminin- and type IV collagen-related

molecules were detected in the epithelium and the abnormally thick basement membrane, it is possible that the *s* gene product regulates expression of the genes encoding proteins of the basement membrane. In this study, we only examined the expression of collagen type IV and laminin. The possibility that other proteins of the basement membrane and extracellular matrix components, such as heparin sulfate proteoglycan, entactin, fibronectin (12), and/or hyaluronate (23) are affected, as well as enzymes regulating their turnover (23), exists and should be tested.

Limb regeneration studies can greatly benefit from analysis of mutant animals such as that discussed in this paper. Our studies demonstrated that the *s* mutant is a suitable system for limb regeneration studies and that important information can be generated. The *s* mutation is a powerful tool to pinpoint and characterize genes involved in the process of differentiation as well as other key events during limb regeneration, a field awaiting a genetic breakthrough. Additional genomic studies, using different restriction enzymes and techniques on identification and subsequent cloning of fragments showing polymorphism(s), are needed.

We thank Drs. Hynda Kleinman, Eva Engvall, and Joseph G. Gall for their generous contribution of antibodies and probes used in this study and for their helpful discussions. This work was supported by a grant from the Research Council, University of Dayton Research Institute.

1. Woychik, R. P., Stewart, T. A., Davis, L. G., D'Eustachio, P., & Leder, P. (1985) *Nature (London)* **318**, 36-40.
2. Akam, M. (1987) *Development* **101**, 1-22.
3. Goulding, M. D. & Gruss, P. (1989) *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**, 1088-1093.
4. Hay, E. D. & Fishman, D. A. (1961) *Dev. Biol.* **3**, 26-59.
5. Wallace, H. (1981) *Vertebrate Limb Regeneration* (Wiley, Chichester, U.K.).
6. Tsonis, P. A. (1991) *In Vivo* **5**, 541-550.
7. Humphrey, R. R. (1967) *J. Exp. Zool.* **164**, 281-296.
8. Martin, R. & Signoret, J. (1968) *Ann. Embryol. Morphog.* **1**, 141-149.
9. Egar, M. W. & Jarial, M. S. (1991) *Tissue Cell* **23**, 631-639.
10. McGarvey, M. L., Baro-Van Evercooren, A., Kleinman, H. K. & Dubois-Dalcq, M. (1984) *Dev. Biol.* **105**, 18-28.
11. Engvall, E., Krusius, T., Wewer, U. & Ruoslahti, E. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 649-656.
12. Gulati, A. K., Zalewski, D. A. & Reddi, A. H. (1983) *Dev. Biol.* **96**, 355-365.
13. Sanders, E. J. (1983) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 949-956.
14. Epstein, L. M. & Gall, J. G. (1987) *Cell* **48**, 535-543.
15. Cohen, S. M., Bronner, G., Kuttner, F., Jurgens, G. & Jackle, H. (1989) *Nature (London)* **338**, 432-434.
16. Zeller, R., Jackson-Grusby, L. & Leder, P. (1989) *Genes Dev.* **3**, 1481-1492.
17. Thornton, C. S. (1968) *Adv. Morphol.* **7**, 205-249.
18. Tassava, R. A. & Mescher, A. L. (1975) *Differentiation* **4**, 23-24.
19. Mescher, A. L. (1976) *J. Exp. Zool.* **195**, 117-128.
20. Tassava, R. A. & Garling, D. J. (1979) *J. Exp. Zool.* **280**, 97-110.
21. Tsonis, P. A. & Eguchi, G. (1983) *Dev. Growth Differ.* **25**, 201-210.
22. Stocum, D. L. & Crawford, K. (1987) *Biochem. Cell Biol.* **65**, 750-761.
23. Toole, B. P. & Gross, J. (1971) *Dev. Biol.* **25**, 57-77.

*Jackson-Grusby, L., Vogt, T. F. & Leder, P., 50th Annual Symposium of the Society of Developmental Biology, June 20-23, 1991, Milwaukee, abstr.

ANALYSIS OF THE MUTANT AXOLOTL SHORT TOES

PANAGIOTIS A. TSONIS, KATIA DEL RIO-TSONIS
and CHARLES H. WASHABAUGH

Laboratory of Molecular Biology, Department of Biology,
University of Dayton, Dayton, OH 45469-2320

Genetics and Limb Regeneration

The field of amphibian limb regeneration is awaiting a molecular breakthrough. Isolation of genes involved in this process is of vital importance in order to understand the mechanisms of the phenomenon and its restriction to some urodele species. The identification and utilization of mutants is the most efficient way to isolate the gene(s) responsible for a certain trait. *Drosophila* genetics is the best example of how screening for mutations has led to the isolation of genes responsible for many developmental events. Similarly, cloned animal models or transgenic animals have also offered alternatives to the isolation of particular genes. The question that we have undertaken to investigate is how feasible (or how realistic) is to work with a mutant salamander which as opposed to the wild type does not regenerate its limbs. Such an idea seems at a first thought impossible. Newts or salamanders are not cloned, they do not mature and mate well in the lab and they do not, therefore, provide the best material for transgenic studies. The only species that is bred is the mexican axolotl *Ambystoma mexicanum*, but mutations that solely affect limb regeneration are not known. Our initial idea was that an animal with

a mutation affecting the development of the limbs would be a good candidate since in many instances the developing limb bud and the regenerating blastema show biochemical and morphogenetic similarities (data is now accumulating indicating that they are not entirely the same biochemically or at the molecular level). Such an animal, the *Short toes*, is available and regularly bred in the Axolotl colony, at Indiana University.

The *Short toes* has been identified and examined by Humphrey in 1967. Humphrey reported that the animal develops with abnormal kidneys, underdeveloped ducts and abnormal limbs. Detailed histological analysis of the affected organs was not presented. Humphrey also reported that regeneration of 3 months old larvae limbs was affected with fingers missing. We decided to examine limb regeneration in older *Short toes* because young animals might show regenerative abilities that would not exist at later times. Several amphibia show good regenerative properties when they are very young but their abilities are not present after metamorphosis or complete development.

For our experiments we used 6 months old *Short toes*. The limbs were amputated at the mid ulna-radius level and blastema were fixed for histology at times intervals from 1 week to 16 weeks post amputation. The removed limbs at the time of amputation were processed for anatomical analysis by staining with Victoria Blue B. Similarly, kidneys, ducts, ovaries and testis were isolated for detailed histological analysis.

Limb Regeneration in *Short toes*

Out of 27 mutant limbs examined in the present study only 3 showed some signs of regeneration. The rest 24 did not regenerate at all. Histological analysis showed that blastema formation proceeded in the mutant limb for about two weeks, but no differentiation of the blastema occurred. The most striking, however, feature of the blastema was the abnormal formation of the basement membrane. In the controls (normal wild type) a basement membrane was built as

soon as two weeks post amputation (Fig. 1). This did not differ from the mutant at that time. However, as time passed the membrane became convoluted and thick in the mutant limbs. Histological sections of the arrested regeneration cones stained with Gomori's showed very clearly this abnormality as well as enormous accumulation of extracellular matrix material (Fig. 2). In contrast with the limbs, tail regeneration proceeded normally but slightly delayed. For complete account on this topic see Del Rio-Tsonis *et al*, (1992) and Mescher (this volume).

Histological Features of Affected Organs

The general impression after examining all the affected organs and tissues of the mutant is that the severity of the abnormalities are not the same in all afflicted animals. The mutation ranges from mild to severe. This was true for all affected organs in an individual. The time of death correlates with the degree of abnormalities with the most affected animals losing their lives first. The mutant kidney was characterized predominantly by the disorganization of the glomeruli and the surrounding tubules. Egar and Jarial (1991) have reported an electron microscopy study showing abnormalities in the proximal tubules of the mutant animals. The number of tubules especially in the most affected animals were very low, the glomeruli virtually absent and cysts present throughout the kidneys. The limbs also showed anatomical variability. While the less affected ones lacked the metacarpals, others had fingers, carpals and even ulna or radius missing. The Mullerian ducts of the female displayed disorganization of the mucosal layer and absence of the columnar mesothelial cells, an abnormality also prominent in the male ducts. Sections through the ovaries of the *Short toes* indicated widespread cystic appearance of the eggs. The testis of the mutant showed no apparent defects. From the above mentioned abnormalities it seems that an important manifestation of this mutation might be the disruption of epithelial-mesenchymal interactions.

Laminin Expression

The apparent abnormalities in the epithelial-mesenchymal border of the regenerating blastema and the ducts as well as the nature of the abnormalities in the kidney, a tissue rich in basement membranes prompted us to examine expression of laminin and collagen type IV which are the major proteinous components of this membrane. For this we used two different polyclonal antibodies for laminin (one was provided by Dr. Eva Engvall, designated L1 in Table 1, and the other provided by Dr. Hynda Kleinman, designated as L2). The polyclonal antibody to collagen type IV was provided by Dr. Hynda Kleinman (ref. for antibodies: McGarvey *et al*, 1984; Engvall *et al*, 1983; Gulati *et al*, 1983). The reaction of these antibodies with the different tissues was tested under different conditions of fixation and the results are summarized in Table 1. As can be seen in Table 1, L2 showed interaction with the epithelial cells and the basement membranes in the mutant and the wild type limbs despite the method of fixation, while L1 reacted only in frozen sections (see also Del Rio-Tsonis *et al*, 1992). However, the reaction in the kidney differed between the mutant and the wild type especially when L1 was used. In fact only L1 reacted positively with wild type kidney tubules. This reaction was not observed in the mutant when paraffin sections were employed (except in tubules from one animal). The reaction was seen when the tissue was fixed with PFA but the distribution of the antigen in the tubules differed between the wild type and the mutant (see Table 1 for detailed account of these differences). The results presented in Table 1 could suggest that particular forms of laminin could be differentially regulated in the kidney and in the limb of the mutant. The possibility exists that the antibody might recognize a structural modification which might be related to the diseased state. This is mainly suggested from the differential reactivity of the same antibody, L1, to kidney tubules depending on the fixation conditions. At any rate, we believe that the abnormal expression of laminin in the kidney is a good molecular marker for this disease and more extensive studies are necessary. The antibody to collagen type IV showed not good reactivity in general with the kidney tissues.

Table 1

			L1	L2	Col IV
Kidney	Paraffin	C	+ ^a	-	-
		M	-?	-	-
	Frozen	C	+ ^b	-	+ ^{b,d}
		M	-	-	nd
	PFA	C	+ ^{a,b}	-	-
		M	+ ^a	nd	nd
Blastema	Paraffin	C	-	+ ^c	+ ^c
		M	-	+ ^c	+ ^c
	Frozen	C	+	+	+
		M	+	+	+

Immunohistochemistry of laminin and collagen type IV antibodies (see text) with kidney and blastema. + indicates positive reaction and - negative. a: The reaction was confined in the inner periphery of the tubules. b: the reaction was confined in the outer periphery of the tubules (membrane propria). c: The reaction was confined in the epithelial cells closer to the mesenchyme with intense staining in the cells lining at the border when the basement membrane is synthesized and in the basement membrane. d: The reaction was very faint. PFA: paraformaldehyde, C: control, M: mutant, nd: not determined. The reaction of L1 to the mutant kidney was very faint and only in a few tubules. The question mark indicates that tubules from one mutant animal showed some reactivity (see text).

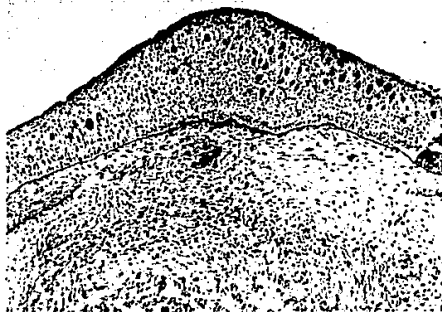


Figure 1 A two-week blastema from a wild type animal stained with PAS (Periodic Acid Schiff) showing the epithelial-mesenchymal border and the basement membrane X 10.

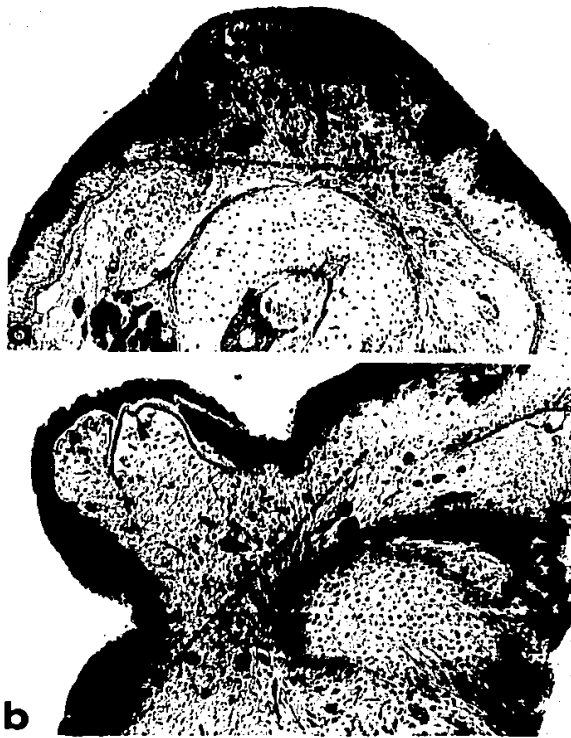


Figure 2 Sections through regenerating limbs from the mutant axolotl *Short toes* stained with Gomori's. a: 11.5 weeks post-amputation. b: 13 weeks post-amputation. Note absence of differentiation with presence of abnormal basement membrane. The membrane is convoluted and much thicker (arrows). Note also presence of extracellular matrix material in the blastema depicted as gray in a black and white picture. The dashed line represents the level of amputation X 10.

A Useful Mutation for Limb Regeneration?

Our analysis on the regenerative abilities of the *Short toes* indicated that limb regeneration was, indeed, impaired. The observation makes this animal a unique specimen for identifying the gene(s) that might play a role in the regenerative process of the limbs. The fact that blastema is formed, however, does not let us hope of isolating the gene that is involved in tissue dedifferentiation, a key process during limb regeneration. To what extent the mutation is the cause or the effect on the impaired limb regeneration is not known at the present time. Nevertheless, we have at hand a limb regeneration mutant that could provide valuable information, which cannot otherwise be obtained. We believe that with the limited sources on mutations in amphibia, the *Short toes* story should be pursued rigorously at the molecular level in order to understand fundamental events during limb development, regeneration and development of the urogenital system.

Genomic Analysis

Preliminary studies involving restriction fragment length polymorphism (RFLP) have been initiated using as a probe a newt repetitive probe (Epstein and Gall, 1987) provided by Dr. J.G. Gall. Our Southern hybridization analysis of DNA restricted with 5 different enzymes (BamHI, EcoRI, PstI, HaeIII and HinfI) showed no apparent polymorphism. This could indicate that the mutation is not likely to be the outcome of gross chromosomal aberrations such as insertions or deletions. Rather, these results imply that point mutations or abnormal regulatory events might be the cause of the *Short toes* mutation. Further analysis with more enzymes and probes is necessary to consolidate this conclusion.

Acknowledgements

We thank Drs. E. Engvall, H. Kleinman and J.G. Gall for the generous gifts of the antibodies and probes. This work was supported by the Research Council of the University of Dayton and by the National Kidney Foundation of Ohio.

References

- Del Rio-Tsonis K, Washabaugh CH, Tsonis PA (1992): The mutant axolotl Short toes exhibits impaired limb regeneration and abnormal basement membrane formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5502-5506.
- Egar MW, Jarial MS (1991): Structural changes in the proximal tubule of the Short toes axolotl mutant. *Tissue Cell* 23: 631-639.
- Engvall E, Krusius T, Wewer U, Ruoslahti E (1983): Laminin from rat yolk sac tumor: Isolation, partial characterization and comparison with mouse laminin. *Arch. Biochem. Biophys.* 222: 649-656.
- Epstein LM, Gall JG (1987). Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt. *Cell* 48: 535-543.
- Gulati AK, Zalewski AA, Reddi, AH (1983): An immunofluorescent study of the distribution of fibronectin and laminin during limb regeneration in the adult newt. *Develop. Biol.* 96: 355-365.
- Humphrey RR (1967): Genetic and experimental studies on a lethal trait (Short toes) in the mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *J. Exp. Zool.* 164: 281-296.
- McGarvey ML, Baro-Van Evercooren A, Kleinman HK, Dubois-Dalcq M (1984): Synthesis and effects of basement membrane components in cultured rat Schwann cells. *Develop. Biol.* 105:18-28.

Variable Manifestations in the Short Toes (s) Mutation of the Axolotl

CHARLES H. WASHABAUGH, KATIA DEL RIO-TSONIS,
AND PANAGIOTIS A. TSONIS

Laboratory of Molecular Biology, Department of Biology, University of Dayton, Dayton, Ohio 45469-2320 (C.H.W., K.D.R.-T., P.A.T.); Instituto de Biotecnología, Departamento de Biología Molecular, UNAM, Cuernavaca, Morelos, México (K.D.R.-T.)

ABSTRACT We describe a detailed histological analysis of the affected organs in the Short toes (s) mutation of the Mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*. The s mutant animals displayed a variation in the response to the mutation such as the time of death and the degree of abnormalities of the affected organs (limbs, kidneys, ducts, and reproductive structures). In addition to the numerous histological abnormalities characterized here, we also examined the presence of laminin-related molecules in s mutant kidney tissues to elucidate further the nature of the renal aplasia these animals encounter as a result of this recessive lethal mutation. Our data suggest that there may be a disruption in tissue interactions necessary for proper development and functioning of the affected tissues. © 1993 Wiley-Liss, Inc.

Among amphibians, a few natural mutants are known, and transgenic models have yet to be established. In one urodele, the Mexican axolotl, naturally occurring developmental mutants have already been identified and briefly characterized (for review, see Armstrong and Malacinski, '89). One of these mutants, called *Short toes*, was first described by Humphrey ('67). He characterized these animals as having skeletal (limb) and urogenital (kidney and Müllerian duct) abnormalities, the latter causing the lethality of the trait (see also Egar and Jarial, '91). In our previous studies (Del Rio-Tsonis et al., '92; Tsonis et al., '93) employing 6-month-old animals, we noticed other interesting characteristics in the Short toes mutation. These animals not only display the abnormal development of their forelimbs and hindlimbs (Humphrey, '67; Martin and Signoret, '68), but they also lack the ability to regenerate both fore- and hindlimbs, while tail regeneration is normal (Del Rio-Tsonis et al., '92). In similar studies it has been seen that younger s mutants show some regeneration (Mescher, '92). Within the developmental abnormalities, we also noted a variability in the severity of this recessive lethal trait among the s mutants. This variability encompasses the presence/absence of urogenital struc-

tures and the severity of the renal aplasia as well as that of the missing skeletal elements in the developing limbs. In this paper, we present a detailed analysis of the affected organs in s mutants. Furthermore, our previous work with the regenerating limb indicated an abnormal formation of the basement membrane, so we decided to examine the expression of laminin, a major component of basement membranes in kidneys (Sorokin and Ekblom, '92).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Sibling animals (five s mutants and five controls; 10 cm and 18 cm, respectively) were obtained from the Indiana University Axolotl Colony, where they are routinely produced from heterozygous crosses, and were maintained in isolated containers at room temperature in a 20% Holtfreter's solution. All developed limbs for each animal were removed, fixed in Bouin's fixative, processed for staining with Victoria blue B, and then photographed. Animals were sacrificed later (3-4 months), when excessive swelling, loss of appetite, and deterioration of gills were evident. A control sibling of the same sex was sacrificed at the same time as each of the s mutants.

Histology and immunostaining

The kidneys and reproductive organs, both of which develop in symmetrical pairs, were excised, and one was fixed in Bouin's fixative for paraffin processing, while the other was fixed in 4% paraformaldehyde and frozen in OCT compound for cryosectioning. Serial longitudinal or cross sections (8 μ m) were cut for frozen and paraffin-embedded tissues. Representative paraffin tissue sections were then stained with one of the following: Gomori's trichrome, periodic acid Schiff-orange G (PAS-O), or hematoxylin and eosin for histological observations. For immunohistochemical staining, paraffin-embedded tissues were deparaffinized in xylene and hydrated to 1 \times PBS via a graded ethanol series. At this point the frozen and paraffin tissues were treated the same. Slides were preincubated with PB-SNGS (1 \times PBS; 5% normal goat serum) and then incubated for 1 hr at 37°C with the primary polyclonal antibody (1:50 dilution; generous gift of Dr. Eva Engvall), which was directed against the whole molecule of laminin (reference for antibody: see Engvall et al., '83). Subsequently, the sections were washed thrice in 1 \times PBS and then incubated with the secondary antibody (FITC-conjugat-

ed antirabbit IgG) for 1 hour at 37°C. Finally, the samples were rinsed thrice in 1 \times PBS, mounted in 90% glycerol in PBS, and observed with fluorescence microscopy.

RESULTS

Morphology and histology of afflicted tissues

Limbs

Five different σ mutants showed diversity in the extent of the abnormalities, while each of the four limbs per animal was similarly affected. This is depicted in Figure 1A-F where representative σ mutant limbs were stained with Victoria blue B and compared to the control limb. The apparent loss of structures is limited not only to the digits/phalanges (Fig. 1C-F) but also to the short bones (i.e., radius-ulna, tibia-fibula). Fusion of carpals/metacarpals and tarsals/metatarsals was apparent in σ mutant animals and absent in all 20 control limbs examined from five individuals.

Kidneys

Overall, the mutant kidneys were much smaller in size compared to the controls; the smallest kidneys came from the most afflicted animal, which also displayed the most

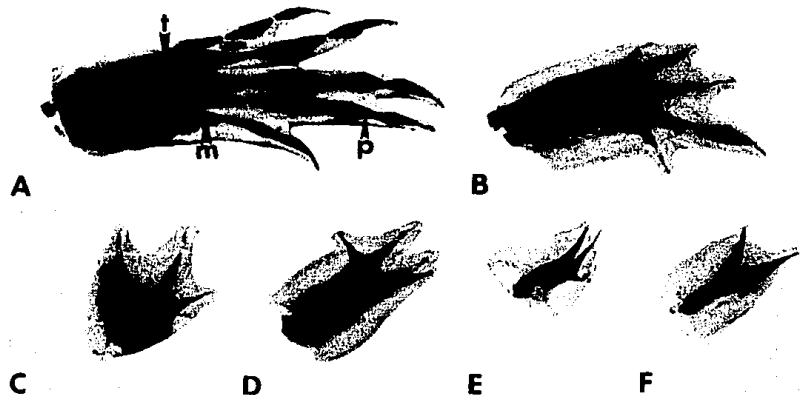


Fig. 1. *Ambystoma mexicanum*. Morphological analysis of limb development in the short toes and control axolotls using Victoria blue B staining. A: Six month control axolotl hindlimb displaying proper formation of the phalanges (p), the tarsals (t), and metatarsals (m). B-F: Representative σ mutant limbs removed at 6 months. Notice the appearance of the least affected σ

mutant (B) displaying reductions in the number of metatarsals and length of the phalanges. C-F: Variation in the severity of the limb mutation among the remaining animals. In each of the limbs the tarsals/metatarsals are absent and the size and number of the phalanges is greatly reduced as well as the overall number of toes. $\times 4$.



Fig. 2. *Ambystoma mexicanum*. Sections through the short toes and control axolotl kidneys. A: Control kidney section depicting the detailed structure of the glomeruli (g) and tubules (t). B: Slightly affected mutant axolotl kidney, in which there were more functional glomeruli present compared to the other mutants. C: A severely

afflicted axolotl, which had no functional glomeruli present and a high occurrence of cysts (c) in the tissue. These kidneys were much smaller than those of the controls. Arrowheads in b and c indicate accumulation of blood cells. All sections stained with Gomori's trichrome. $\times 20$.

deformed limbs. The kidneys of the least affected *s* mutants were almost normal in appearance, only slightly smaller in size, and similarly the limbs were the least deformed. When the kidneys were sectioned for histology, there was an apparent structural breakdown of the glomeruli in the kidneys of the severely affected mutants. There were very few functional glomeruli present compared to the control animals (Fig. 2A). In Figure 2B, this animal was slightly affected and displayed many large functional glomeruli within the kidneys. One severely afflicted animal displayed an extreme case of deterioration in the kidneys in which there were no structurally normal glomeruli present, leaving a cystic appearance to the kidney tissue (Fig. 2C). Although the kidneys of the *s* mutant animals retained proximal and distal convoluted tubules and collecting ducts, there

was an overall disorganization of the kidney tissue, most notably of the tubules and ducts in relation to the glomeruli. Strong inflammation was apparent in the tissue along with the accumulation of blood cells.

Reproductive organs

The ducts (both male and female) were structurally distorted in the *s* mutants while the control ducts were normal (Fig. 3A,C). The mutants displayed a wide variation in structure, which ranged from the lack of ducts to severely dysfunctional abnormalities (Fig. 3B,D). Figure 3B depicts the male Wolffian ducts of an *s* mutant, which were much smaller in size compared to control Wolffian ducts. Deterioration of the columnar mesothelial cells and a compacted appearance of the vascular areas were apparent. The Müllerian ducts from an *s* mutant were



Fig. 3. *Ambystoma mexicanum*. Cross sections of representative reproductive ducts from control and *s* mutant axolotls. A: Control Wolffian ducts, displaying the characteristic columnar mesothelial cells (cm), which form an interior border. B: Mutant Wolffian ducts showing a breakdown in the vascular structure and the deteriora-

tion of the columnar mesothelial cells (cm). C: Female control Müllerian ducts with normal structure, while the mutant female (D) depicts a severe breakdown of the vascular structure as well as loss of the columnar mesothelial cells (arrowheads) that line the lumen of the ducts.

smaller and had a thread-like appearance. Within the lumen of the Müllerian ducts, there was a marked breakdown of the overall structure such that the ciliated columnar epithelial cells that line the lumen were absent (Fig. 3D). Control Müllerian ducts were normal, as depicted in Figure 3C.

The ovaries and testes were immature in the *s* mutants. Mutant testes were histologically normal, with no gross aberrations present (not shown). The *s* mutant ovaries developed to approximately stage II oocytes (staged according to Hausen and Riebesell, '91), and they were abnormal compared to control oocytes at similar stages. The mutant oocytes were polycystic, as depicted in Figure 4A,B. This polycystic phenotype was displayed in all the female *s* mutants examined and in no oocytes of the control siblings.

Laminin expression in s mutant kidneys

Kidney tissue consists of basement membrane containing structures and has been

found to express developmentally regulated laminin (Ekblom et al., '90). Since the *s* mutants displayed apparent renal aplasia, and since in our previous work we found abnormalities in the basement membrane of the regenerating limb (Del Rio-Tsonis et al., '92), we examined the expression of laminin as a first step towards a biochemical marker. As was noted previously, the kidneys of the *s* mutants were in disarray; however, the structural integrity of the tubules present within the afflicted tissue remained intact for *s* mutants. Within the proximal and distal convoluted tubules, noteworthy structures include the inner brush border in proximal convoluted tubules and the outer membrane propria. As can be seen in Figure 5A,D, the control kidneys expressed laminin-related molecules in a regular manner in the proximal and distal convoluted tubules, in the membrane propria, and in the inner periphery (depending on fixation). In tissues fixed for paraffin sectioning, laminin expression was confined to the inner periphery of the tubules (Fig. 5A), whereas, in the frozen PFA-fixed tissues (Fig. 5D), laminin was detected in both the inner periphery and the membrane propria. However, in the *s* mutants (Fig. 5B,E), laminin was virtually absent regardless of fixation. A background yellow color was always present in *s* mutant kidneys, but it is not a sign of a positive reaction.

DISCUSSION

Variability of the s mutation in different individuals

The limbs of the *s* mutants developed abnormally and failed to regenerate (Del Rio-Tsonis et al., '92). In addition to these, we observed other abnormal features: 1) severe renal aplasia indicated by excessive inflammation, disorganization and presence of cysts in the kidneys, 2) structural breakdown of the Müllerian ducts (female) and Wolffian ducts (male), 3) polycystic nature of the developing oocytes, and 4) lack of expression of laminin-related molecules in the kidneys.

In view of these results, the common abnormality seems to be a disturbance in tissue interactions. This was observed in the Müllerian ducts and Wolffian ducts, where the columnar mesothelial cells were disrupted (Fig. 3), and may also be the reason for the disorganization of the kidney tissue and the limb blastema (epithelia-mesenchyme interactions; Del Rio-Tsonis et al., '92). The presence of cysts in the kidneys and in the developing oocytes was also prominent. The cysts

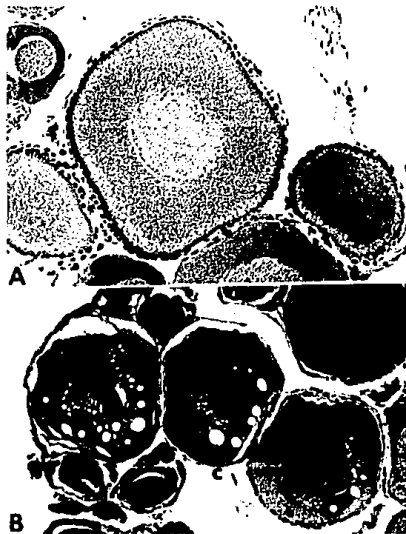


Fig. 4. *Ambystoma mexicanum*. Sections through control and mutant ovaries stained with Gomori's trichrome. A: Control stage IV ovaries, displaying normal structure. B: Mutant ovaries, with the apparent cyst-like structures (c) present. Almost all developing oocytes within the ovaries of the *s* mutants had this polycystic appearance. $\times 25$.

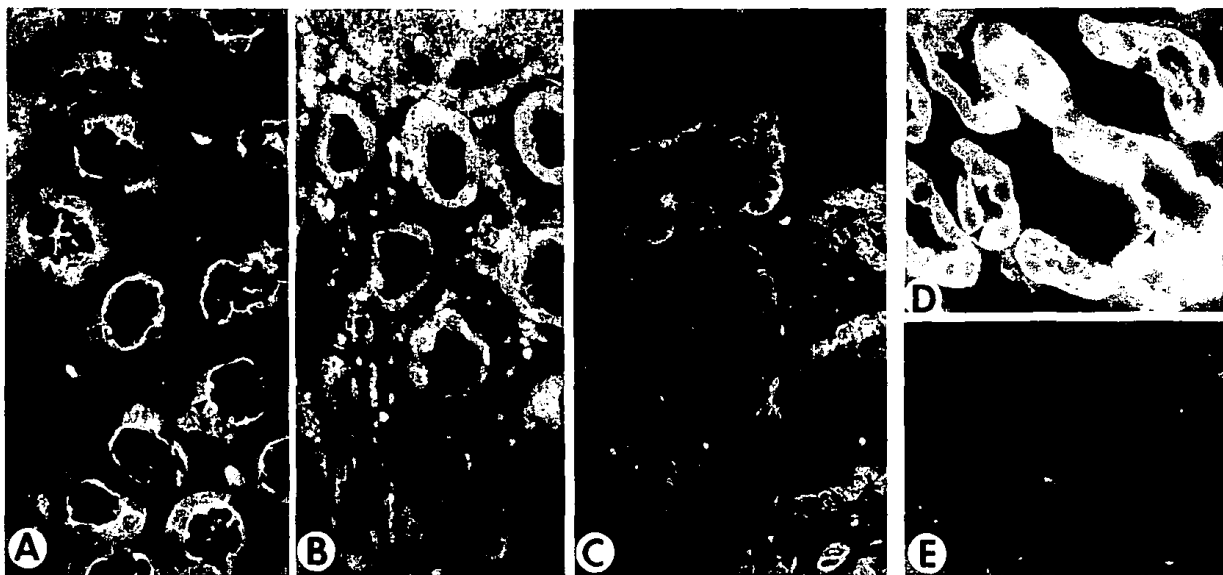


Fig. 5. *Anbystoma mexicanum*. Laminin-related expression in control and mutant axolotl kidney sections. Immunostaining using paraffin sections: wild-type (A), mutant (B), negative control-mutant (C). Note that in paraffin wild-type sections staining occurred only in the inner periphery of the tubules (arrowheads). PFA fixed frozen sections: wild-type (D), mutant (E). Staining can be seen in the inner periphery and also in the outside

membrane (membrane propria) depicted by the arrowheads. In the mutant, no apparent staining in the membrane propria was observed, while slight expression can be seen in the inner membrane. Negative controls for wild-type frozen sections displayed no specific staining, while the structural integrity of the tubules in both wild-type and Δ mutant frozen sections was intact when stained with hematoxylin and eosin and observed. $\times 100$.

of the kidney resemble in structure cysts that have been observed in kidney diseases, such as the autosomal dominant polycystic disease (ADPD) (Grantham et al., '87). Epithelial cells have been thought to play a central role in the etiology of ADPD (Grantham et al., '87; Hartman, '89). Therefore, disturbance of tissue interactions might be involved in the cysts observed in the s mutants.

These animals displayed a widespread variation in phenotypic response to the mutation. This was first noted in the developing limbs, which varied from the loss of only phalanges to the loss of carpals/tarsals and even some of the short bones (see Fig. 1). The severity of the renal aplasia likewise was variable. Animals with the best limb development had the least severe kidney abnormality and contained more functional glomeruli and ducts (Fig. 2B), while those with the most limb abnormality had the most affected kidneys with few functional glomeruli and a higher incidence of cysts (Fig. 2C). The time of death also is correlated with the degree of abnormalities; the most afflicted died first (8.5 months of age), and the least afflicted died last (11 months of age). The variable manifestations we observed may be the result of a dosage effect of the s gene product, but this is yet to be studied.

Expression of laminin-related molecules

The kidneys of the axolotl are large, possessing functional units, the nephrons. Kidney tissue is surrounded by basement membrane containing structures such as the glomeruli along with their associated tubules and ducts. Molecules such as laminin, collagen IV, and heparin sulfate proteoglycan are key components of these basement membranes (Gulati et al., '83). The loss of one of these key molecules may cause severe alterations depending on the role it plays in the kidney. In the amphibian kidney, the majority of the water reabsorption occurs in the proximal convoluted tubules (Deyrup, '64). We observed laminin-related molecules in both the proximal and distal convoluted tubules in control animals, while expression in the mutants was mostly absent in all tubules, indicating severe down-regulation or absence of a particular laminin isoform. Many laminin isoforms exist; however, within the kidney, a certain isoform consisting of B1, B2, and A chains is expressed mainly in the developing epithelial cells, while other isoforms that lack the A chain are expressed in some of the adult kidney basement membranes, espe-

cially of the glomeruli (Ekblom et al., '90; Sorokin and Ekblom, '92). Epithelia of the proximal tubules in adult kidney have been found to retain the A chain epitope in the basement membrane (Ekblom et al., '90). Alternatively, masking of an epitope in the s mutant is possible. Laminin-related molecules may aid in the reabsorption of water in a regulatory manner such that the lack of laminin (or more so a specific chain) may result in the inability to control the reabsorption of water in the tubules. Absence of laminin-related expression seems to be a good molecular marker for this diseased tissue.

The gene(s) responsible for the s mutation may be regulated early in the developmental process in a particular cell lineage (mesodermal) that gives rise to urogenital and limb structures. A similar example is the limb deformity (*ld*) gene in mouse identified through transgene insertion of the *c-myc* protooncogene (Woychik et al., '85, '90). This mammalian mutation also has the characteristic renal aplasia, and the limbs develop abnormally. Interestingly, the apical ectodermal ridge formation is not normal in *ld* mutants (Zeller et al., '89). The possibility that the short toes mutation is the amphibian counterpart of the mammalian *ld* mutation requires an amphibian candidate gene for comparison. Studies on the identification of possible candidate gene(s) are currently underway, and these may enable us to identify the precise developmental stage at which the s gene elicits its control over the developmental processes pertaining to the formation of the aforementioned structures, allowing a complete understanding of the effects of this mutation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Research Council of the University of Dayton and the National Kidney Foundation of Ohio for support and to Dr. Eva Engvall for generous contribution of the antibodies.

LITERATURE CITED

- Armstrong, J.A., and G.M. Malacinski (1989) Developmental Biology of the Axolotl. New York: Oxford University Press.
- Del Rio-Tsonis, K., C.H. Washbaugh, and P.A. Tsonis (1992) The mutant axolotl short toes exhibits impaired limb regeneration and abnormal basement membrane formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5502-5506.
- Deyrup, I.J. (1964) Water balance and the kidney. In J.A. Moore (ed): Physiology of the Amphibia. New York: Academic Press, pp 251-328.
- Egar, M.W., and M.S. Jarial (1991) Structural changes in

- the proximal tubule of the short-toes axolotl mutant. *Tissue Cell* 23:631-639.
- Eklblom, M., G. Klein, G. Mugrager, L. Fecker, R. Deutzmann, R. Timpl, and P. Eklblom (1990) Transient and locally restricted expression of laminin A chain mRNA by developing epithelial cells during kidney organogenesis. *Cell* 60:337-346.
- Engvall, E., T. Krusius, U. Wewer, and E. Rouslahti (1983) Laminin from yolk sac tumor: Isolation, partial characterization and comparison with mouse laminin. *Arch. Biochem. Biophys.* 222:649-656.
- Grantham, J.J., J.L. Geiser, and A.P. Evan (1987) Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 31:1145-1152.
- Gulati, A.K., A.A. Zalewski, and A.H. Reddi (1983) An immunofluorescent study of the distribution of fibronectin and laminin during limb regeneration in the adult newt. *Dev. Biol.* 96:355-365.
- Hartman, D.S. (1989) Renal Cystic Disease. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Hausen, P., and M. Riebesell (1991) The Early Development of *Xenopus laevis*: An Atlas of the Histology. New York: Springer Verlag.
- Humphrey, R.R. (1967) Genetic and experimental studies of a lethal trait (Short toes) in the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *J. Exp. Zool.* 164:281-296.
- Martin, R., and J. Signoret (1968) Contribution a l'etude de la mutation short toes chez l'axolotl. *Ann. Embryol. Morphogen.* 1:141-149.
- Mescher, A.L. (1993) Development and regeneration of limbs in the short toes axolotl mutant. In: J. Fallon et al (eds): *Limb Development and Regeneration*. New York: Wiley-Liss, pp. 181-191.
- Sorokin, L., and P. Eklblom (1992) Development of tubular and glomerular cells of the kidney. *Kidney Int.* 41:657-664.
- Tsonis, P.A., K. Del Rio-Tsonis, and C.H. Washbaugh (1993) Analysis of the mutant axolotl short toes. In: J. Fallon, et al. (eds): *Limb Development and Regeneration*. New York: Wiley-Liss, pp. 171-179.
- Woychik, R.P., T.A. Stewart, L.G. Davis, P. D'Eustachio, and P. Leder (1985) An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse. *Nature* 318:36-40.
- Woychik, R.P., R.L. Mass, R. Zeller, T.F. Vogt, and P. Leder (1990) "Formins": Proteins deduced from the alternative transcripts of the *limb deformity* gene. *Nature* 346:850-853.
- Zeller, R., L. Jackson-Grusby, and P. Leder (1989) The limb deformity gene is required for apical ectodermal ridge differentiation and anteroposterior limb pattern formation. *Genes Dev.* 3:1481-1492.

Evolutionary comparison WT1

