

# 지렁이 *labial* 유전자의 동정 및 머리재생 시 발현 양상에 관한 연구

조성진 · 이명식 · 탁은식 · 허소영 · 이종애 · 박범준 · 조현주 · 신주옥<sup>1</sup> · 박순철\*  
(중앙대학교 생명과학과, <sup>1</sup>연세대학교 생명과학과)

## Isolation of *labial* Gene in the Oligochaeta *Perionyx excavatus* and Expression Patterns during Head Regeneration

Cho, Sung Jin, Myung Sik Lee, Eun Sik Tak, So Young Hur, Jong Ae Lee, Bum Joon Park, Hyun Ju Cho, Chuog Shin<sup>1</sup> and Soon Cheol Park\*

(Department of Life Science, Chung-Ang University, <sup>1</sup>Department of Life Science, Yonsei University at Wonju Campus)

### ABSTRACT

*Hox* genes are pivotal in the control of morphogenesis along the anterior-posterior (AP) axis in various bilaterians. Several indications suggest their involvement in the control of cell growth and regeneration. For the *labial* full-length fragment, RACE-PCR was employed to obtain the 3' and 5' flanking regions. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that the *labial* expression began to increase at 12 hours after amputation. The peak expression was approximately 1.5-fold more than the unamputated controls. This result could give us information on the significance of *Hox* genes and the relationships between *Hox* genes during regeneration.

**Key words** : Earthworm, *Hox* genes, *labial* gene, regeneration

### 서 론

현대발생생물학에 있어서의 중심과제는 body plan을 결정하는 형태형성과정 (pattern formation)이 어떠한 과정으로 확립되며, 이러한 과정들이 어떻게 정교하게 조절되는가 하는 것에 관심이 고조되어지고 있다. 형태형성과정은 크게 두 단계로 나뉘어 진행되어지고 있다. 첫 번째 단계는 각 배아세포가 우선적으로 positional information을 획득한 후, 두 번째 단계로 각 부분에 주어진 위치에 대한 정보에 따라 예정된 유전자 활성 프로그램과 상호 작용하여 최종적인 적절한 구조를 형성하게 된다 (Goss 1991). Positional identity의 확립은 발생과정 동안, 중배엽 형성시기에 전-후, 좌-우, 등-배 축 등을 따라 maternal effect gene, gap gene, pair-rule gene, segment polarity gene 및 homeotic genes 등 여러 유전자들이 순차적으로 발현되어지고, 전사조절인자 (transcription factor)로 작용하는 이 유전자들의 단백질 산물들이 시

공간적으로 다르게 발현되어 확립되는 것으로 보고되었다 (Kessel and Gruss 1990). 이러한 연구결과 배아의 발생과정 시기에 각 부분을 특수화된 조직으로 분화할 수 있도록 세포들의 운명을 결정짓는 유전자군이 밝혀졌으며, 이들을 Homeotic Complex (*Hom-C*; *Hox*) 유전자라고 한다.

Homeobox 유전자는 초파리 (*Drosophila melanogaster*)에서 homeotic transformation을 통하여 1980년대 중반에 최초로 발견되었으며 (Krumlauf 1994), 그 이후 거의 모든 진핵생물에서 발견되어지고 있다. *Hox* 유전자는 발생과정 중 여러 과정에서 중요한 역할을 하는 전사조절인자를 encoding하고 있다 (Irvine *et al.* 1997). 이러한 전사조절인자는 모두 homeodomain이라고 불리는 진화적으로 잘 보존된 60개의 아미노산구조를 가지고 있다. Homeodomain의 기능은 homeotic 유전자에 의해 조절되는 유전자의 특정 DNA 염기서열을 인식하고 결합하여 전사를 유도 또는 억제한다. Homeodomain은 3개의 나선구조를 가지며 helix-turn-helix motif를 이루고 있다 (Gilbert 1997). 초기 발생과정에서 사람을 포함한 포유동물의 body pattern 형성은 *Hox* 유전자에 의해 결정되며 이 유전자는 초파리의 homeotic complex

\* Corresponding author  
Phone) +82-2-820-5212, Fax) +82-2-820-5212  
E-mail)scpark@cau.ac.kr

(*HOM-C*) 유전자와 구조적, 기능적으로 매우 유사하다. 포유동물의 *Hox* 유전자는 초파리의 *HOM-C* 유전자가 이중 복제되어 진화된 것으로 생각되며 발생시 그 발현시기와 장소도 매우 유사하다. 포유류의 전후 positional identity는 이들 *Hox* 유전자에 의해 조절되고 있으며, 4개의 cluster로 이뤄져 있는 *Hox* 유전자들은 각 유전자의 발현부위 및 시기가 cluster 내의 유전자 위치와 colinear하게 나타난다. 즉 3'쪽에 위치한 유전자는 보다 앞쪽에 일찍 발현되며 반대로 5'쪽에 위치한 유전자는 보다 뒤쪽에 늦게 발현된다(Pendleton *et al.*, 1993). 이와 같이 *Hox* 유전자는 포유동물의 전-후축(Anterior-Posterior Axis) 결정에 필수적인 것으로 생각되어지고 있으며, 이를 위해서는 이들 유전자가 발생시 정확한 시기에 정확한 장소에서 발현되어야 하며 하위유전자들의 발현을 정확히 조절할 수 있어야 한다.

지렁이는 뇌의 구조를 갖고 있는 동물 중 머리재생을 할 수 있는 가장 고등한 동물로 머리재생 기작에 관한 연구 모델로 적합한 동물로 생각된다. 본 연구의 재료로 선택된 megascolecidae과의 *Perionyx excavatus*는 재생 능력이 매우 뛰어나 머리 및 꼬리의 재생에 2주일 정도의 짧은 시간이 소요되며 머리 제거시에도 90% 이상의 생존율을 나타낸다. 이러한 지렁이의 머리재생과정은 재생 시 형성되는 재생아 세포의 positional identity를 정확하게 조절할 수 있어야 하며, 재생아 세포의 positional identity가 결정되면 이에 따라 정확한 순서대로 각각의 기관이 재분화 되어져야 한다. 또한 *labial* 유전자는 *Hox* cluster내에서 3'쪽에 위치한 유전자로서 5개의 *Antennapedia* complex (ANTP-C) 유전자 중에 하나이다(Long and Byrne 2001). 이러한 *labial* 유전자는 생물체의 체전방의 구조들을 형성하는데 있어서 매우 중요한 역할을 수행하며, 특히 머리의 발생 및 중장의 형성과정에 중요한 요소로서 작용한다.

따라서 본 연구는 모든 동물의 *Hox* 유전자가 구조 및 기능적으로 오랜 진화과정을 통해 잘 보존되어 있으며, 사람을 포함한 포유동물 이외의 다른 동물에서의 연구가 사람의 초기발생 및 분화연구에 있어서 중요한 학문적 기초를 마련해 줄 수 있다는 사실에 입각하여 현재까지 지렁이에서 보고된 바 없는 *labial* 유전자의 전체염기서열을 결정하고 또한 지렁이의 머리재생과정을 모델로 재생 시 positional identity를 결정해 할 것으로 사료되어지는 *labial* 유전자의 시간적 발현 양상을 연구하여 이들의 기능을 탐색하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. *P. excavatus*의 배양

본 연구에 사용한 팔딱이 지렁이 (*P. excavatus*)는 환형동물문(Phylum Annelida), 빈모綱(Class Oligochaeta), 지렁이

목(Order Neoligochaeta), 지렁이과(Family Megascolecidae)에 속하며, 농촌진흥청(수원시)에서 제공받았다. 이중 환대가 잘 발달한 성숙한 개체만을 선택하여 마디 수가 90-110개 정도인 개체를 Cho 등(2003)에 의한 방법으로 사육하였다. 선택된 지렁이는 증류수로 여러 차례 세척한 후 peat moss로 채워진 20×30×10 cm 크기의 플라스틱 용기에 약 200개체씩 넣어 배양기(SANYO)에서 23±1°C를 유지하며 암소에서 배양하였다. 배양 전에 peat moss는 지렁이 성장에 해로운 선충류의 성장을 최소화하기 위해서 65°C 건조용 전기오븐에서 12시간 이상 건조시킨 후 사용하였다. 배양 시 습도는 주기적으로 증류수를 공급하여 80% 이상을 유지하고, 양분으로는 우분을 peat moss 위에 공급하였다. 지렁이는 최소한 일주일 정도 기초 배양한 후 실험에 사용하였다.

### 2. 머리 절단 및 재생

지렁이 머리재생 시 *labial* 유전자의 발현양상을 실험하기 위하여 다음과 같이 머리 부위를 절단하였다. 머리재생실험에 사용된 지렁이는 환대를 포함하여 꼬리 쪽으로 2체절을 70% 에탄올로 소독된 면도칼로 절단하였다. 절단 후 peat moss가 채워진 glass petri dish에 약 30개체씩 넣은 후 위와 같은 방법으로 배양하였다. 절단된 지렁이는 재생시간 경과에 따라 채취한 후 0.1% DEPC 처리용액으로 세척하고 재생 조직을 절단하였다. 위의 모든 절단과정은 해부현미경(Olympus) 하에서 수행하였다.

### 3. 머리재생 시 시간대별 total RNA 추출

절단 후 각각 0시간, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 12시간 및 24시간이 경과하여 재생 중인 지렁이를 최소 30개체씩 채취하여 최초의 절단부위로부터 재생되어 나온 부위를 정확히 절단하여 취한 후 -80°C에서 보관하였다. Total RNA 분리는 재생된 부분을 각 재생시간대별 100 mg씩 취하여 Tri-reagent (Sigma) 1 ml을 첨가한 후 Glass-Taflon homogenizer (Wheaton)를 이용하여 균질액을 만들었다. 이후 균질액을 상온에서 7분간 배양 후 chloroform 200 µl를 첨가하여 교반한 뒤 4°C에서 15분간 12,000×g에서 원심 분리하였다. 원심분리 후 얻어진 3개의 phase 중 RNA가 포함되어 있는 무색의 상층액만을 취하여 새로운 튜브에 옮긴 뒤 동량의 isopropanol를 첨가하여 -20°C에서 8분간 배양하였다. 배양 후 12,000×g에서 15분간 4°C를 유지하며 원심 분리하여 RNA만을 침전시켰으며, 수용액을 제거하고 남은 침전물에 75% 에탄올 1 ml을 첨가한 후 7,500×g에서 5분간 4°C를 유지하며 원심 분리하였다. 에탄올을 제거한 뒤 침전물이 완전히 마르기 전에 DEPC로 처리된 3차 증류수 50 µl에 용해시켰다.

#### 4. *labial* 유전자의 5'/3'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR

Cho 등(2003)의 연구에서 분리된 *P. excavatus labial* 유전자의 부분적인 염기서열을 이용하여 5'/3' RACE-PCR를 통하여 *labial* 유전자의 full-length open reading frame (ORF)의 염기서열 정보를 얻기 위하여 RACE-PCR을 수행하였다. RACE-PCR은 SMART RACE cDNA amplification Kit (Clontech)를 이용하였으며, 각각의 유전자에 대해 특이적인 5' 및 3'-gene specific primer (GSP)를 제작하여 사용하였다. 머리재생 시 시간대별로 추출된 total RNA를 혼합하여 정량한 후 5' 및 3'-RACE를 위한 주형으로 사용하였다. 5'-RACE를 위한 first-strand cDNA의 합성은 total RNA 1 µg/3 µl를 주형으로 이용하였으며, 5' CDS primer (5'-(T)<sub>25</sub>N-1N-3') 1 µl, SMART II Oligo A 1 µl를 첨가하여 2분 동안 70°C에서 배양한 후 5 × first strand buffer 2 µl, 20 mM DTT 1 µl, dNTP mix (각 10 mM) 1 µl, Powerscript reverse transcriptase 1 µl를 첨가하여 42°C에서 1시간 30분간 반응시켰다. 3'-RACE를 위한 first-strand cDNA의 합성은 total RNA 1 µg/4 µl를 주형으로 이용하였으며, 3' CDS primer (5'-AAGCAG-GTGGTATCAACGCAGAGTAC (T)30N-1N-3') 1 µl를 첨가하여 2분 동안 70°C에서 배양한 뒤 5 × first strand buffer 2 µl, 20 mM DTT 1 µl, dNTP mix (각 10 mM) 1 µl, Powerscript reverse transcriptase 1 µl를 첨가하여 42°C에서 1시간 30분간 반응시켰다. 합성된 cDNA들은 Tricine-EDTA buffer 200 µl로 희석하여 RACE-PCR 반응에 사용하였으며, PCR 반응의 primer로는 각각의 유전자에 특이적으로 제작된 5' 및 3'-gene specific primer (GSP)와 Universal Primer A mix를 이용하였다. 5' 및 3'-RACE의 PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시한 후 94°C에서 1분(denaturation), 65-68°C에서 1분(annealing), 그리고 72°C에서 2분(extension)의 반응과정을 30회 반복하여 수행하였다. 증폭된 PCR 절편은 클로닝 및 염기서열결정을 수행하였다.

#### 5. *labial* 유전자의 염기서열 및 유전자 계통 분석

*labial* 유전자의 open reading frame (ORF)이 포함된 전체 유전자 염기서열은 GenBank database의 BLASTX를 사용하여 이미 보고되어진 여러 종들의 *labial* 유전자들과 비교하여 유사성을 분석하였다. 또한 현재까지 보고되어진 절지동물, 환형동물, 편형동물, 연체동물 및 완족동물의 *labial* 유전자와의 정렬(alignment)을 통하여 잘 보존된 서열 및 반복서열을 분석하기 위하여 ClustalW와 GeneDoc program (Corpet 1988)을 사용하였다.

#### 6. 머리재생 시 시간대별 semi-quantitative RT-PCR

##### 1) 재생시간대별 cDNA합성

재생시간대별로 추출한 total RNA를 주형으로 이용하여

oligo dT<sub>15</sub>primer (500 µg/ml, Roche) 1 µl, mRNA 2.5 µl, DEPC 7.5 µl를 혼합한 후 70°C에서 10분간 배양하여 2차 구조를 제거한 뒤, 최종 부피가 20 µl가 되도록 반응액(5 × reaction buffer 4 µl, dNTP mixture (10 mM each) 2 µl, PowerScript reverse transcriptase (200 U/µl, Clontech) 1 µl)을 첨가하였다. 이 반응액을 42°C에서 1시간 30분 동안 반응시켰으며 70°C에서 10분간 처리함으로써 역전사효소의 활성을 억제하였다. 반응이 종결된 cDNA 합성액은 -20°C에 보관하면서 PCR을 위한 주형으로 사용하였다.

#### 7. Semi-quantitative RT-PCR

*labial* 유전자의 재생시간대별 발현양상을 semi-quantitative RT-PCR을 통하여 조사하였다. 상기방법에 따라 합성된 재생시간대별 cDNA를 1 µl당 50 ng으로 조정된 뒤 PCR cycle (18, 23, 28 및 33 cycle)의 횟수를 달리하여 각 유전자의 증폭률이 linearity를 갖는 semi-quantitative RT-PCR조건을 확인하였다.

#### 8. 발현 양상의 표준화

지렁이 머리재생 시 시간대별 *labial* 유전자의 발현 양상의 표준화는 OptiQuant (v2.0) program (Packard Bioscience)를 사용하였다. semi-quantitative RT-PCR 결과 재생시간대별로 발현되는 *labial* 유전자들의 밴드와 β-actin 유전자 밴드의 비율을 계산하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. RACE-PCR을 이용한 *labial* 유전자의 Full-length cDNA 염기서열 분석

*labial* 유전자의 full-length를 확보하기 위하여 3'/5' RACE-PCR을 수행하였다. RACE-PCR을 수행하기 위한 gene specific primer (GSP)는 RT-PCR수행 결과 얻어진 부분적인 염기서열을 이용하여 제작하였다(Cho *et al.* 2003). *labial* 유전자는 ORF를 포함하여 전체 염기서열 절편이 1,255 bp로 증폭되었다(Fig. 1). *labial* 유전자의 ORF는 133 bp (start codon: ATG)에서부터 시작하여 1,161 bp (stop codon: TAA)까지 총 1,028 bp로 구성되어 있었다. homeodomain은 ORF내에서 691 bp에서부터 871 bp까지 정확히 180 bp로 구성되어 있었으며 60개의 아미노산을 encoding 하고 있었다. 또한 *labial* 유전자의 hexapeptide motif인 WLTVRR 아미노산 잔기는 homeodomain에서 5' 상류쪽(541 bp-559 bp)에 위치하고 있었다. 3'-UTR (untranslation region) 부분에는 1,231 bp에서부터 poly (A) tail이 시작되었고, 19 bp 상류쪽에 polyadenylation signal인 AATAA가 확인되었다.

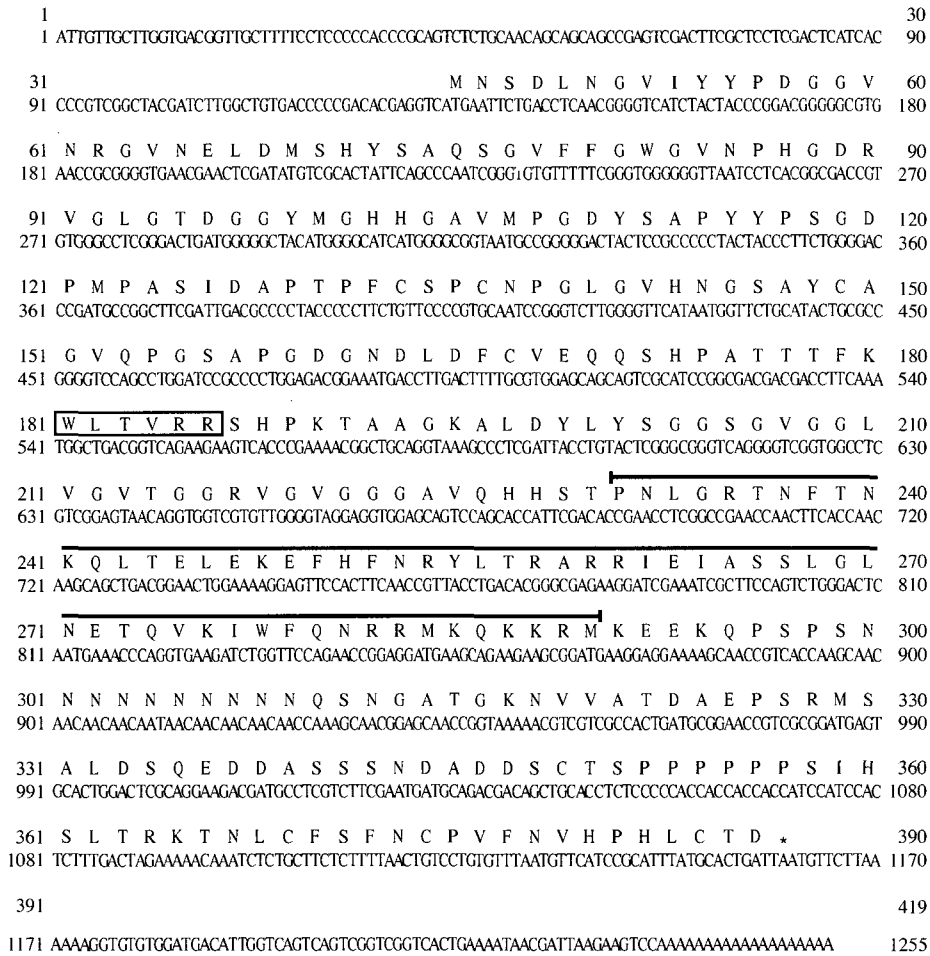


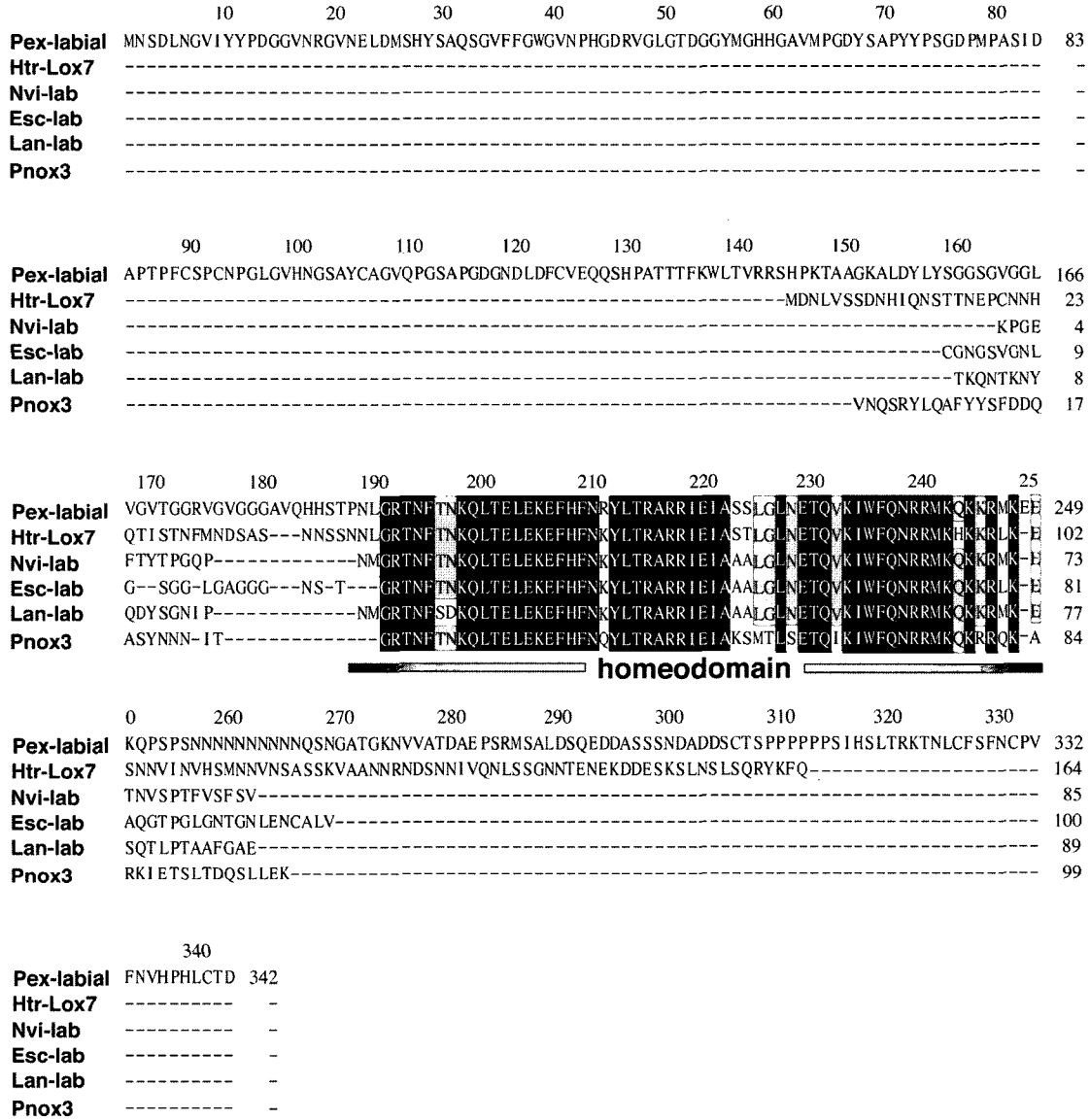
Fig. 1. Nucleotide sequence with inferred translation of the longest ORFs for *Perionyx excavatus labial* gene. The hexapeptide and homeodomain regions are boxed and underlined, respectively.

*labial* 유전자의 염기서열 분석을 위하여 지금까지 보고된 어진 척추동물의 *labial* 유전자 중에서 homeodomain을 포함하여 5' 및 3' flanking region까지 보고된 유전자를 선택하여 잘 보존된 서열 및 반복서열을 분석하였다 (Fig. 2). GenBank database에 ORF를 포함한 전체 염기서열이 등록된 척추동물의 *labial* 유전자는 환형동물 거머리강의 *Htr-Lox7* 유전자만이 확인되었다. *Htr-Lox7* 유전자를 제외한 *Nvi-lab*, *Esc-lab*, *Lan-lab* 및 *Pnox3* 유전자들은 homeodomain을 포함하여 5' 및 3'쪽으로 부분적인 염기서열만이 등록되어 있었다. 척추동물의 *labial* 유전자와 지렁이 *labial* 유전자들의 전체염기서열을 분석한 결과, homeodomain내의 염기서열은 잘 보존되어있는 것이 확인되었으나 5' 및 3' flanking region들은 어떠한 signature 아미노산 잔기들도 확인 할 수 없었다 (Fig. 2). *P. excavatus*에서 동정된 *labial* 유전자는 homeodomain내의 *labial* signature 아미노산 잔기들을 모두 포함하고 있었으며, 후구동물 및 선구동물들에서 보고된 *labial* hexapeptide motif를 가지고 있었다.

2. 머리재생 시 *labial* 유전자의 시간적 발현양상 분석

*Hox* 유전자는 초기 배아의 형태 형성에 관여할 뿐만 아니라 재생능력을 가진 동물의 재생과정에 있어서도 재생기관의 positional identity를 결정해 줄 수 있는 유전자로 생각되고 있다. 그러므로 재생기작에 관한 연구는 배 발생 및 분화기작을 이해하는데 중요한 토대가 될 것으로 생각된다. 척추동물에서 재생과 관련된 *Hox* 유전자의 연구는 지금까지 플라나리아의 재생 과정 중 *Hox* 유전자의 발현 양상에 관한 연구가 가장 활발히 진행되었고 (Salo et al. 1997, Orii et al. 1999), 다모강인 *Chaetopterus* (Irvine and Martindale 2000)와 질강인 *Helobdella* (Shankland et al. 1997)에서는 발생 과정 중 *Hox* 유전자의 발현 양상이 연구된 바 있다. 그러나 지렁이 재생 기작에 관한 분자 생물학적 연구는 국내 외적으로 거의 전무한 상태이며, 재생 및 발생과정동안 *Hox* 유전자의 동정 및 발현에 관한 연구는 현재까지 연구된 바가 없다. *labial* 유전자는 *Hox* cluster에서 3'쪽에 위치한 유전자로서 5개의 *Antennapedia* complex (*ANTP-C*) 유전자 중

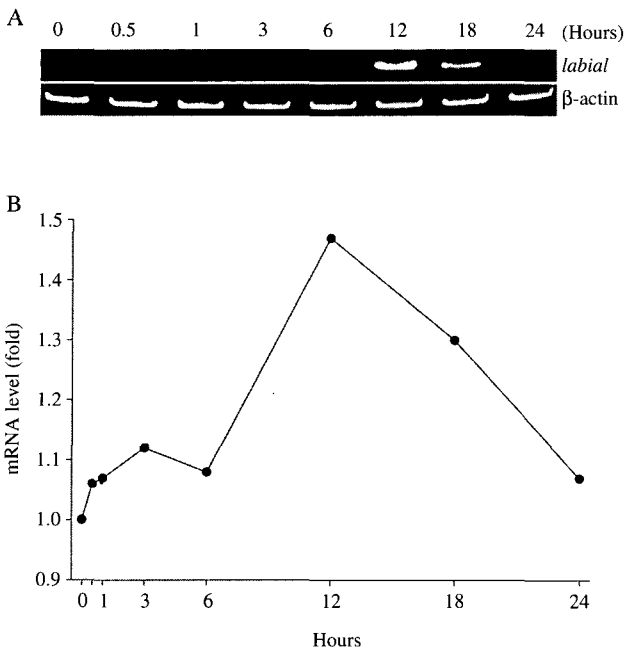
지렁이 *labial* 유전자의 동정 및 발현



**Fig. 2.** Alignments of full-length *labial* sequence from *Perionyx excavatus* with other lophotrochozoans (*Htr-Lox7*, *Helobdella triserialis*; *Nvi-lab*, *Nereis virens*; *Esc-lab*, *Euprymna scolopes*; *Lan-lab*, *Lingula anatina*; *Pnox3*, *Polycelis nigra*). Alignment was formatted using the ClustalW algorithm.

에 하나이다 (Long and Byrne 2001). 이러한 *labial* 유전자는 생물체의 체전방의 구조들을 형성하는데 있어서 중요한 역할을 수행하며, 특히 머리의 발생 및 중장의 형성 과정에 중요한 요소로서 작용한다. 머리 재생 시 *labial* 유전자의 시간적 발현 양상을 알아보기 위하여 재생 시간대별로 RNA를 추출하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. PCR cycle의 횟수를 달리하여 *labial* 유전자의 증폭률이 linearity를 갖는 28 cycle을 선택하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다 (Fig. 3). 또한 각 재생 시간대별 cDNA의 정량 확인을 위하여 housekeeping 유전자인  $\beta$ -actin을 사용하였다. *labial* 유전자는 초파리의 머리 부위를 형성하는 것으로 알려져 있으며, 포유류의 *labial*-type 유전자인 PG 1 유전자들도 역시 머리 및

뇌 형성에 관여한다고 보고되어져 왔다 (McGinnis *et al.* 2000). 본 연구에서 *labial* 유전자는 0시간부터 6시간까지 발현이 거의 나타나지 않다가 재생 12시간째에 0시간보다 약 1.5배 수준의 발현 양상을 보였으며, 재생 12시간 이후 발현이 점차 감소하다가 24시간째에는 거의 발현이 나타나지 않았다 (Fig. 3). 본 연구 결과 *labial* 유전자는 지렁이 머리 재생 시 재생 초기 과정인 12시간에서 제한적인 발현 양상을 나타내었다. 이러한 발현 양상의 결과는 *labial* 유전자가 머리 재생 초기에 관여할 것으로 생각되어지며, 또한 머리 형성 과정에서 중요한 역할을 수행할 것으로 사료되어진다. 그러나 현재까지 본 연구에서와 같이 머리 재생이라는 독특한 모델 시스템을 이용한 연구 보고가 없었기 때문에 이에 대한



**Fig. 3.** Semi-quantitative RT-PCR (A) and densitometric analysis (B) of the *labial* expressed at the different stages during head regeneration.

*labial* 유전자의 역할 규명이 더욱 필요할 것으로 생각된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

### 인 용 문 헌

Cho, S.J., P.Y. Cho, M.S. Lee, S.Y. Hur, J.A. Lee, S.J. Kim, K.S. Koh,

Y.E. Na, J.K. Choo, C.B. Kim and S.C. Park. 2003. *Hox* genes from the earthworm *Perionyx excavatus*. *Dev. Genes Evol.* **213** : 207-210.

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**(22) : 10881-10890.

Gilbert, S.F. 1997. Molecular regulation of development : The homeodomain protein In "Developmental Biology" 5th edition pp. 576-577, Sinauer Associates, Inc.

Goss, R.J. 1991. The natural history (and mystery) of regeneration. Cambridge University Press, New York, pp. 7-23.

Irvine, S.Q., S.A. Warinner, J.D. Hunter and M.Q. Martindale. 1997. A survey of Homeobox genes in *Chaetopterus variopedatus* and analysis of polychaete homeodomain. *Mole. Phylo. Evol.* **7** : 331-345.

Irvine, S.Q. and M.Q. Martindale. 2000. Expression patterns of anterior *Hox* genes in the polychaete *Chaetopterus*: Correlation with morphological boundaries. *Dev. Biol.* **217** : 333-351.

Kessel, M. and P. Gruss. 1990. Murine developmental control genes. *Science* **249** : 374-379.

Krumlauf, R. 1994. *Hox* genes in vertebrate development. *Cell* **78**(2) : 191-201.

Long, S. and M. Byrne. 2001. Evolution of the echinoderm *Hox* gene cluster. *Evol. Dev.* **3**(5) : 302-311.

McGinnis, W., A. Veraksa and M.D. Campo. 2000. Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mole. Genet. Metabol.* **69** : 85-100.

Orii, H., K. Kato, Y. Umesono, T. Sakurai, K. Agata and K. Watanabe. 1999. The planarian *HOM/Hox* homeobox genes (*Plox*) expressed along the anteroposterior axis. *Dev. Biol.* **210** : 456-468.

Pendleton, J.W., B.K. Nagai, M.T. Murtha and F.H. Ruddle. 1993. Expansion of the *Hox* gene family and the evolution of chordates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**(13) : 6300-6304.

Salo, E., J.R. Bayascas and E. Castillo. 1997. Planarian *Hox* gene : novel patterns of expression during regeneration. *Development* **124** : 141-148.

Shankland, M., J.M. Kourakis, A.V. Master, K.D. Lokhorst, D. Nardelli-Haeffliger, J.C. Wedeen and Q.M. Martindale. 1997. Conserved anterior boundaries of *Hox* gene expression in the central nervous system of the leech *Helobdella*. *Dev. Biol.* **190** : 248-300.