

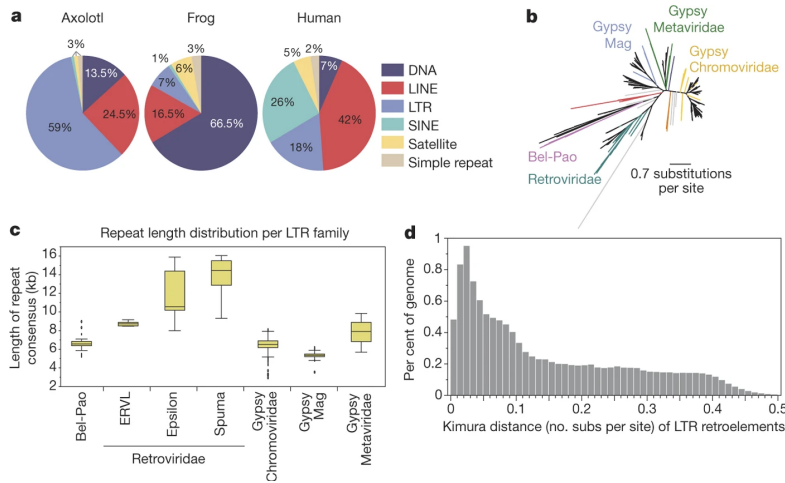
Axolotes 1.

GGA, profesor jubilado de la FC-UNAM.

19 de noviembre de 2021.

Contents

I	I: axolotes.	2
1	Los olvidados axolotes mexicanos.	3
1.1	El genoma del axolote en cautiverio.	3
1.1.1	Algunos antecedentes. Criatura pequeña, genoma gigante: secuenciación del axolote mexicano.	3
1.1.2	El genoma del axolote y secretos de reconstitución de partes.	6
1.1.3	Lo principal.	7
1.1.4	Un ensamblador de lectura larga para genomas grandes.	9
1.1.5	Un complemento reducido de la familia Pax.	10
1.1.6	Discusión.	10
1.1.7	Nada de estadística.	11
1.1.8	Disponibilidad de código.	11
1.1.9	Disponibilidad de datos.	11
1.1.10	De última hora.	12
1.1.11	REFERENCIAS.	12



Part I

I: axolotes.

Chapter 1

Los olvidados axolotes mexicanos.

1.1 El genoma del axolote en cautiverio.

1.1.1 Algunos antecedentes. Criatura pequeña, genoma gigante: secuenciación del axolote mexicano.

“Si un pequeño lagarto excita nuestra maravilla, por el poder de reproducir su cola, y langostas o cangrejos de río por la recuperación de sus garras, cuánto más debe admirarse a la salamandra, quién puede reparar la pérdida tanto de su cola como de sus patas?” –

Lazzaro Spallanzani, *An Essay on Animal Reproductions* (1769) [1]

Lazzaro Spallanzani estaba realizando experimentos sobre regeneración animal cuando descubrió la capacidad del *axolote mexicano* (*‘axolotl’* en lengua *nahuatl*, que significa *monstruo de agua* también conocido como la *salamandra mexicana*) para reproducir sus propias extremidades después de que habían sido cortadas. *Se sorprendió al descubrir* que esta criatura era capaz de hacer crecer no solo nuevos músculos, vasos sanguíneos y tejido nervioso, sino también huesos. Desde entonces, la maravillosa regeneración del *axolote* ha sido objeto de escrutinio científico, ya que algunos investigadores de todo el mundo intentan determinar los mecanismos de funcionamiento y cómo podría aplicarse potencialmente a la medicina. Estas lindas criaturas, en peligro de extinción en la naturaleza, pueden ser la clave para futuras innovaciones en la reparación de tejidos humanos [2]. Aún se conserva en reservas de agua de bosques de oyamel y humedales como lo poco que queda de los canales de Xochililco en la ciudad de México, representativo del Valle de México.



Fig.2 El axolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*), famoso por ser capaz de regenerar sus propias extremidades y su cola, ahora está en peligro crítico de extinción en la naturaleza.

Un obstáculo ha resultado lo lento de tal investigación: la *falta del genoma* del axolote mexicano completamente ensamblado. Con 32 mil millones de pares de bases, el *genoma del axolote* es más de 10 veces el tamaño del *genoma humano*, por lo que es una *tarea formidable* para *compilarlo*. Además, también *hay muchas partes repetitivas* periódicas o cuasiperiódicas dirían los matemáticos, con las que *la tecnología de secuenciación actual* puede tener *dificultades*. Sin embargo, un grupo de científicos de Viena, Dresde, Heidelberg e Irapuato (México) finalmente *han logrado unirlo*, formando *el mayor proyecto de genoma exitoso* hasta la fecha [3]. Este desarrollo resulta altamente atractivo no solo por la *investigación del axolote*, sino también por la *investigación genética en sí*, especialmente porque *requirió nuevas innovaciones técnicas* para poder procesar una *secuencia tan grande*.

El grupo ya *ha hecho descubrimientos a partir del genoma*. Utilizando conjuntos de datos publicados anteriormente, *pusieron encontrar 5 transcripciones del ARNm* (ácido ribonucleico mensajero, esto es moléculas formadas al expresarse los genes) que se *regularon al alza* durante el *nuevo crecimiento* de las *extremidades*. Por lo tanto, los *genes asociados* pueden ser *importantes* para comprender la *biología molecular subyacente a este fenómeno*.

Han pasado *casi 150 años* desde que se describió por primera vez esa notable habilidad del axolote y, finalmente, *nos otorgan el inicio de una visión de comprensión* de la *regeneración*. Ahora se puede intentar *procesar* hacia el *axolote*, acrecentando el *esfuerzo por garantizar* que su *especie* pueda *regenerarse* desde el *borde* mismo de su *extinción* (esto último dirigido a quienes asesoran a AMLO en esta temática)

·En el Hospital Brigham and Women's en Boston, *se cuenta con* alrededor de 2.800 salamandras de los llamados *axolotes* (del nahuatl 'axolotl')

·Pero las salamandras se destacan como los *únicos vertebrados* que pueden *reemplazar partes complejas* del cuerpo que se *pierden a cualquier edad*, por lo que los *investigadores* que buscan *respuestas* sobre la *regeneración* a menudo han *recurrido a ellas*.

·Sin embargo, mientras que los *investigadores que estudiaban animales* como ratones y moscas *progresaron en la era genómica*, los que trabajaban con los *axolotes* se *quedaron atrás*. El *mayor obstáculo*, como ya se dijo, fue que los *axolotes viven más tiempo* y *maduran más lentamente* que la *mayoría* de los *animales de laboratorio*, lo que los *convierte* en sujetos *engorrosos* para los *experimentos genéticos*. Peor aún, su *enorme y repetitivo genoma* se *resistió* con obstinación a la *secuenciación*.

·Luego, un *equipo de investigación europeo con coadyuvancia mexicana* superó los obstáculos y finalmente *publicó una secuencia genética completa* para el *axolote mexicano de laboratorio* [3] a principios de 2018. Ese *logro* podría *cambiarlo todo*.

·“El genoma era un gran problema que había estado persistiendo sobre las cabezas de todos los que trabajaban con axolotes” (*Jessica Whited*-profra. asis-

tente e investigadora que supervisa el laboratorio en la Escuela de Medicina de Harvard y el Hospital Brigham and Women's)

·Ya teniendo todo el genoma del axolote, se espera *descubrir* algunos *secretos* de la *regeneración* y *tal vez incluso aprender cómo* los *humanos* podrían *aprovechar* este poder para *nosotros mismos*. Pero *todavía* se tienen más *preguntas* que *respuestas*, y *algunas* de esas *preguntas* han *persistido* desde la *1ra. observación documentada* del *extraño talento* de dichos animales hace *más* de 250 años.

·La simplicidad de los diagramas del biólogo italiano desmentía la milagrosidad de lo que había visto. El primer boceto de *Lazzaro Spallanzani* se parecía a tres lados de un cuadrado, como una pequeña mesa de perfil; era el *muñón* de la *cola cortada* de un *axolote*. El siguiente mostraba un triángulo sentado encima de esa mesa; la cola de alguna manera estaba volviendo a crecer. En esta 2da., un montículo de *células no especializadas* llamadas *blastema* se había formado sobre el muñón como precursor del *rebrote*. Los *detalles* que significan el *desarrollo de una médula espinal* en la cola regeneradora son visibles en la 3ra. etapa



Fig.1.

Fig.1A.

Fig.1B.

Fig.1. *Lazzaro Spallanzani* (1729-1799), biólogo italiano. En 1767, los experimentos de *Spallanzani* sobre caldo sellado y bien hervido, cuestionaron la teoría de la *generación espontánea de microbios*. *Spallanzani* también demostró que *algunos organismos* pueden *vivir sin oxígeno*. Logró la *inseminación artificial* en anfibios, insectos y perros. También descubrió que los *murciélagos* podían volar y cazar incluso cuando estaban ciegos (precursor del radar). También fue el primero en observar el paso de sangre de las arterias a las venas en animales de sangre caliente. También estudió los *volcanes* y el *sistema digestivo* y además era *sacerdote católico*. **Fig.1A.** axolote de laboratorio (izquierda) y axolote salvaje.

Fig.1B. axolote con pata amputada.

·*Spallanzani* había estado *experimentando* con *axolotes*, *renacuajos*, *caracoles* y *lombrices de tierra* y *descubrió* que podían *regenerar partes perdidas* de su cuerpo. Compartió ese *descubrimiento* y sus *dibujos* en una *carta* al *naturalista Charles Bonnet* en 1766. Dos años más tarde, *Spallanzani* *publicó* sus *observaciones* más ampliamente en una *breve colección* de *ensayos* sobre *reproducción* y *regeneración*. El título de esa colección de 1768, el *Pródromo* [1] (o sea '*una indicación temprana*') insinuaba que un trabajo más largo sobre el tema seguiría de él, pero nunca ocurrió.

Sin embargo, *otros científicos tomaron* esas investigaciones, y el *axolote* (cuyo nombre científico es '*Ambystoma mexicanum*') pasó a ser el preferido. Los

axolotes se prestaron bien para *ser estudiados* en parte porque se *reproducen* y *sobreviven* muy bien *en cautiverio*.

·Son extremadamente *endogámicos*, después de todo la mayoría de los axolotes de laboratorio del mundo descenden de 34 animales que *llegaron a París* en directo *desde México* en la *década* de 1860. (La mayoría de los axolotes salvajes son de un color de barro moteado en lugar de rosa pálido, pero los animales de laboratorio *no son albinos*; los verdaderos *axolotes albinos* son *amarillentos*, con *ojos dorados* en lugar de *negros*). Desde que esos *animales* fueron *propriadamente eliminados*, sus *vías fluviales naturales nativas* alrededor de la *Ciudad de México* han sido contaminadas, *invadidas* por *especies introducidas* que *alteraron el ecosistema* y dramáticamente *agotadas por la urbanización*. Agréguese que los *axolotes* también *son una comida tradicional* para los *lugareños*. Irónicamente, para los *animales* que pueden *sobrevivir a tantas agresiones*, los *axolotes no han podido resistir* toda esta *combinación de asaltos* y ahora están *casi extintos en la naturaleza*. Pero *en cambio* la población de *laboratorio* ha *prosperado*.

·En 1935, algunos de esos *axolotes europeos* regresaron a Norte América y al fin se convirtieron en una *colección* en la Univ. de Indiana bajo la dirección del biólogo *George Malacinski*. Cuando se retiró en 2005, la Univ. de Kentucky *heredó su colonia* de más de 500 *animales*. *Malacinski* “*simplemente los cargó a todos y los bajó una noche*” (*Randal Voss* - quien ahora dirige el Centro de Stock Genético *Ambystoma* de la universidad) Aunque el *viaje* duró solo unas *tres horas*, el estrés hizo que *algunos* de los *axolotes* se *metamorfosearan*. “Tal vez un 10 por ciento decidió que ya no quería ser acuático debido al viaje desde Indianápolis” (*Voss*)

1.1.2 El genoma del axolote y secretos de reconstitución de partes.

Los *axolotes mexicanos* sirven como *modelos* importantes de *tetrápodos* para *estudios* de *desarrollo*, *regeneración* y *evolución*. Un *extenso surtido* de *herramientas moleculares* hace que el *axolote mexicano* (*Ambystoma mexicanum*) sea una *salamandra representativa clave* para las investigaciones moleculares. Aquí se pretende informar sobre la *secuenciación* y el *ensamblaje del genoma* de *axolote mexicano* de 32 *giga bases* usando un *enfoque* que *combinó a)* la *secuenciación de lectura larga*, *b)* el *mapeo óptico* y *c)* el *desarrollo de un nuevo ensamblador del genoma* llamado *Marvel*. Se observa una expansión del *tamaño de los intrones* y las *regiones intergénicas*, en gran parte atribuible a la multiplicación de *retroelementos de repetición* de *terminales largas*. Se proporciona evidencia de que el *tamaño del intrón* en los *genes del desarrollo* está *bajo restricción* y que los *genes restringidos por especies* pueden *contribuir* a la *regeneración de las extremidades*. El *ensamblaje del genoma del axolote no contiene el gen esencial del desarrollo Pax3*. Sin embargo, la mutación del parálogo *pax3 pax7* dio lugar a un *fenotipo del axolote similar* a los observados en *ratones mutantes Pax3-/- y Pax7-/-*. El *genoma del axolote proporciona un recurso biológico*

rico para estudios *evolutivos* y de *desarrollo*.



Fig.1C. Los axolotes mexicanos tan indispensables y al borde de su extinción.

1.1.3 Lo principal.

Las *salamandras* cuentan con una *ilustre historia* en la investigación biológica como el animal en el que el Organizador *Spemann* [1] y la *teoría quimioafinidad de Sperry* de la guía ajolonol [2] fueron descubiertos. Desde 1768, cuando *Spallanzani* descubrió la *regeneración* de la *cola* y las *extremidades*, los investigadores han sondeado las *notables capacidades regenerativas* de este animal con una *resolución molecular creciente*. El *axolote mexicano* (*A. mexicanum*) (Fig. 1a y 2) fue recolectado por 1ra. vez por *von Humboldt*, y ha sido cultivado en el laboratorio desde 1864 como el modelo para *investigar fenómenos* como la *reprogramación del nucleo*, la *embriología* de la *inducción de células germinales*, el *procesamiento y regeneración de neuronas retinianas* [3]. Debido a la facilidad con la que el *axolote* (*A. mexicanum*) se puede *criar en el laboratorio*, se ha *desarrollado un sofisticado conjunto de herramientas moleculares* para esta especie, que *incluye la transgénesis de la línea germinal* y la *mutación genética* mediada por *CRISPR*, así como los *métodos de transfección viral* y de otro tipo. Estas *herramientas* han *permitido descubrimientos* como la *identificación de las células fuente de regeneración* y las *vías moleculares que controlan* [4], [5] la *regeneración*. Una *explotación completa del modelo de axolote*, incluida la *comprensión de la regeneración* y *por qué está limitada en otros tetrápodos*, requiere el *análisis de su regulación y evolución del genoma*. Aunque, los *esfuerzos* hacia el *ensamblaje integral del genoma* de los *axolotes* han sido *desafiantes* por el *gran tamaño del genoma* (14-120 *Gb*) y el *gran número de regiones repetitivas* que contiene; el genoma de *ajolotl* de 32 *Gb*, que *resulta ser 10 veces el tamaño del genoma humano*. He aquí la información de la *secuenciación, ensamblaje y análisis del genoma del axolote*.

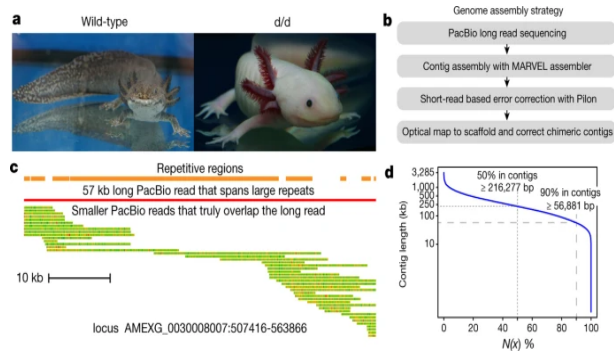


Fig.3: Contigüidad e integridad del ensamblaje del genoma del axolote.

1.1.4 Un ensamblador de lectura larga para genomas grandes.

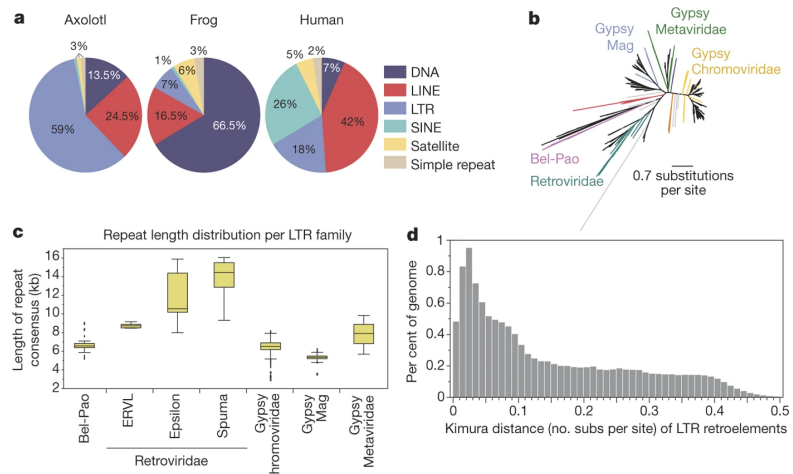


Fig.4 : El genoma del axolote contiene una expansión de los retroelementos LTR.

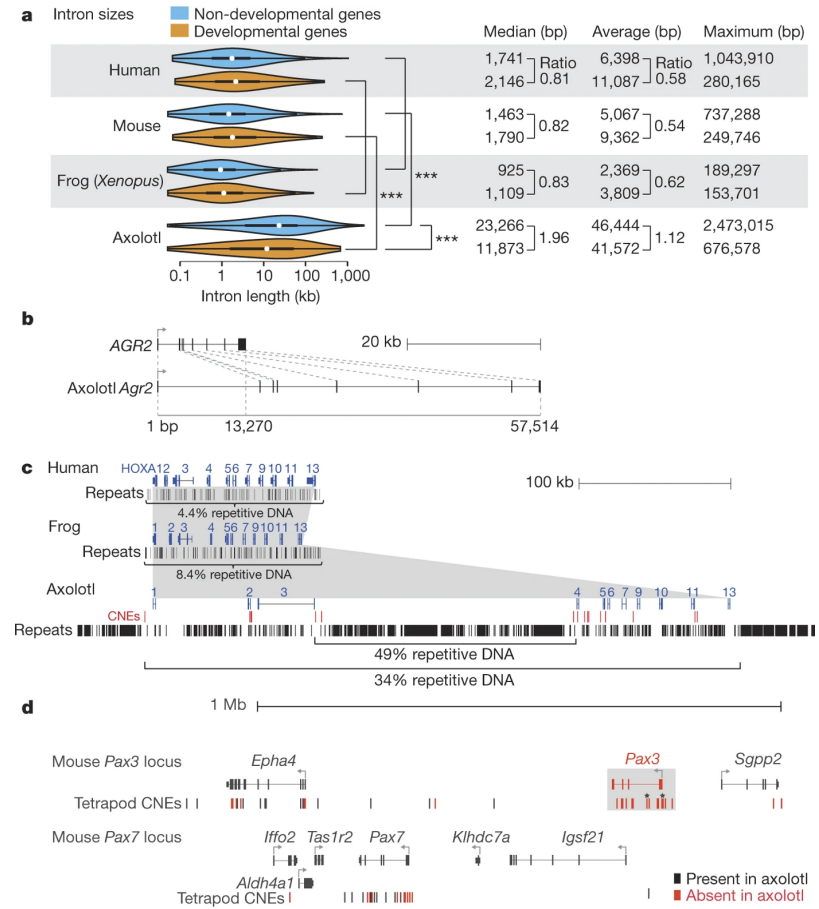


Fig. 5: Organización del genoma y pérdida de Pax3.

1.1.5 Un complemento reducido de la familia Pax.

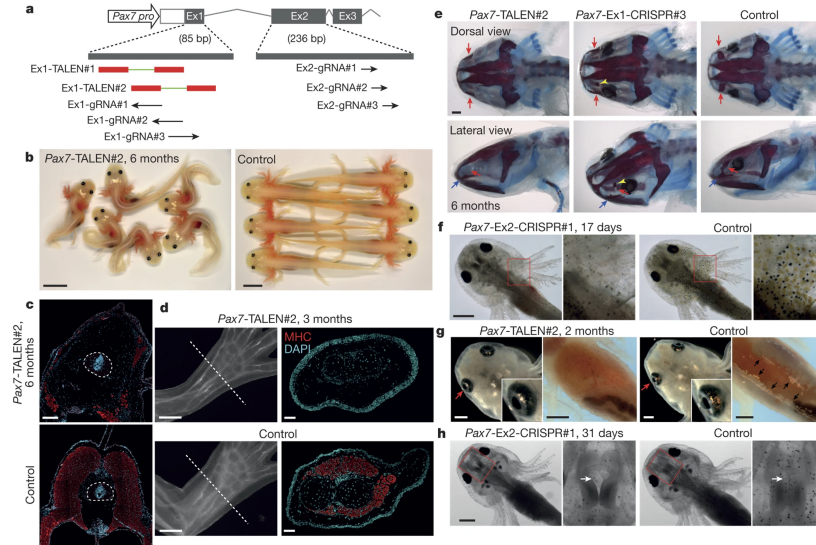


Fig.6: La mutación de Pax7 en *A. mexicanum* produce un fenotipo similar al de Pax3^{-/-}Pax7^{-/-} ratón.

1.1.6 Discusión.

Lograron generar un *ensamblaje integral de genoma completo* para la *axolote mexicano* (*A. mexicanum*), y el *análisis* de este *ensamblaje* que les permitió sacar *conclusiones* sobre la *estructura del genoma expandido*. Los datos, junto con los datos de las plantas y los datos parciales de varias otras especies de salamandras, muestran que la *expansión de LTR* es un importante contribuyente al tamaño del *genoma gigante en animales y plantas*. [6], [12], [35]. El *montaje propuesto* es lo *suficientemente completo* como para *detectar de forma fiable la ausencia de Pax3*, que *está presente en peces y otros anfibios*. Este *análisis* se *confirmó* mediante la *edición de genes*, que *mostró que AmPax7 ha asumido funciones que son llevadas a cabo por Pax3 en otros animales*.

El *análisis funcional del desarrollo*, la *fisiología* y la *regeneración del axolote* se ve *facilitado* por la *disponibilidad de perfiles de expresión génica dependientes del tejido y del tiempo* [28], [29], [30], [36]. El *genoma del axolote mexicano proporciona una base para aplicar métodos como la inmunoprecipitación de cromatina con secuenciación (ChIP-seq) o el ensayo para la cromatina accesible a la transposasa utilizando secuenciación (ATAC-seq) para investigar la base genómica de la regulación génica durante la regeneración*. Junto con métodos como la *edición de genes mediada por CRISPR*, los *métodos de expresión viral*, el *trasplante* y la *transgénesis*, el *axolote es un sistema poderoso para estudiar cuestiones como la base evolutiva de su notable capacidad de regeneración*. El *enfoque de secuenciación de lectura larga, mapeo óptico y ensamblaje del genoma*

utilizando *MARVEL* también muestra que ahora es factible ensamblar genomas muy grandes ricos en repeticiones.

1.1.7 Nada de estadística.

No se utilizaron métodos estadísticos para predeterminar el tamaño de la muestra. Los experimentos no fueron aleatorizados y los investigadores no fueron cegados a la asignación durante los experimentos y la evaluación de los resultados. El ADN genómico de axolote se preparó a partir de hígado y bazo recién aislados de un individuo adulto de tres años de edad d/d macho utilizando DNazol seguido de extracción de fenol / cloroformo y precipitación de etanol.

Se prepararon un total de 50 bibliotecas SMRTbell seleccionadas en tamaño con un corte mínimo de longitud de fragmento entre 10 kb y 20 kb. Se secuenciaron bibliotecas medianas y grandes de insertos en el instrumento PacBio RSII, haciendo uso de 3 polimerasas secuenciadoras diferentes (P4, P5 y P6) y las químicas de secuenciación correspondientes (C2, C3 y C4). Los tiempos de película variaron de 180 minutos a 360 minutos con la mayoría de las células SMRT (1.414 de 1.933) a 240 minutos.

Las secuencias se ensamblaron utilizando el ensamblador *MARVEL*. El mapeo óptico se realizó utilizando el Sistema Saphyr (Bionano) basado en la tecnología de matriz NanoChannel. El ADN se etiquetó con enzimas *Nt.BspQI* y *Nb.BssSI* en reacciones de etiquetado separadas. Cada reacción enzimática se ejecutó en el sistema Saphyr. Se recogieron 2,813 Tb de datos en 3 chips Saphyr para *Nt.BspQI* y se recogieron 2,0 Tb de datos en 2 chips Saphyr para muestras de *Nb.BssSI*; las longitudes de N50 de molécula única fueron de 240 kb y 184 kb, respectivamente. Cada conjunto de datos se ensambló de nuevo usando el software Bionano Solve 2.1.

El ARN se aisló de 22 tipos de tejidos utilizando reactivos TRIzol o RNeasy y se secuenció utilizando la tecnología Illumina. El paquete de software Trinity se utilizó para el ensamblaje del transcriptoma.

1.1.8 Disponibilidad de código

El ensamblador *MARVEL* con documentación está disponible en: <https://github.com/schloi/MARVEL>.

1.1.9 Disponibilidad de datos.

Un navegador del genoma del axolote está disponible en: <https://genome.axolotl-omics.org>.

Se puede acceder al ensamblaje del transcriptoma y a la base de datos BLAST del genoma y el transcriptoma en: <https://www.axolotl-omics.org>, sin restricciones.

Los datos de secuenciación y ambos conjuntos se han depositado en la base de datos del Wikiproyecto NCBI con los números de acceso PRJNA378970 (datos del genoma) y PRJNA378982 (datos del transcriptoma). Tanto los datos del genoma como los datos del transcriptoma se depositaron en la base de datos

de nucleótidos del NCBI (*nucore*) con números de acceso *PGSH00000000* y *GFZP00000000*, respectivamente.

Códigos de adhesión, Primary accessions, BioProject PRJNA378970, PRJNA378982.

NCBI Reference Sequence GFZP00000000, PGSH00000000.

1.1.10 De última hora.

En Venezuela rescatan a una *cría* de *axolote mexicano*, en *peligro crítico de extinción*, abandonada en una iglesia. “Al recibirlo era un bebé, Ya tiene un mes conmigo y le salieron sus extremidades, ha crecido bastante”, detalla la veterinaria Marqués, en su fundación, ubicada en una zona boscosa de la Gran Caracas, el pequeño vertebrado ha demostrado que es dócil y amistoso. “Come bien y lo hace de mi mano, son amigables. Son carnívoros, le doy camarones disecados ó pedacitos de pollo crudo previa congelación para evitar bacterias. Es voraz, al día come una cucharadita de proteína”.

Marqués, con 20 años de experiencia de trabajo con animales y fauna silvestre, añade que el axolote “es uno de los animales más impresionantes, maravillosos y extraños del planeta”, porque es un anfibio que no hace metamorfosis, como la Salamandra; y “Puede regenerar su cuerpo, lo que lo convierte en el único vertebrado capaz de regenerar sus extremidades, cola, tejidos de pulmones, corazón, ojos, ovarios, médula espinal y cerebro. Esto lo hace gracias a su genoma, 10 veces mayor a la del humano, de allí sus increíbles capacidades”.



Fig.7.



Fig.7A.



Fig.7B.

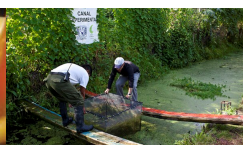


Fig.7C.

Fig.7. Axolote actual de los canales de Xochimilco. **Fig.7A.** El hallazgo en Venezuela. **Fig.7B.** “Actualmente se intenta comprobar si es un lugar idóneo para introducir el axolote dentro de los lagos semi naturales de ‘la Cantera’ donde se cuenta con varios lagos los cuales pueden funcionar como un hábitat temporal para los axolotes mientras se restauran los canales de Xochimilco. Estos lugares se generaron a partir de las excavaciones de la lava volcánica para construir la CU en CdMx”, donde una mitad es reserva ecológica y la otra está prestada al equipo de futbol UNAM (*Luis Zambrano González* - Instituto de Biología de la UNAM). **Fig.7C.** Canal experimental UNAM.

1.1.11 REFERENCIAS.

Bibliography

- [1] Copia completa disponible a través de Google libros: https://books.google.co.uk/books/about/An_essay_on_animal_reproductions.html?id=9es8AAAAYAAJ&redir_esc=y
- [2] Para obtener más información sobre lo que ya se sabe sobre la regeneración, vea un breve video: <https://www.youtube.com/watch?v=QFa6jP6WgzM>
- [3] Artículo original: *Sergej Nowoshilow, Siegfried Schloissnig, Ji-Feng Fei, Andreas Dahl, Andy W. C. Pang, Martin Pippel, Sylke Winkler, Alex R. Hastie, George Young, Juliana G. Roscito, Francisco Falcon, Dunja Knapp, Sean Powell, Alfredo Cruz, Han Cao, Bianca Habermann, Michael Hiller, Elly M. Tanaka & Eugene W. Myers; **The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators**; *Nature*, volume 554, pages 50–55 (2018) <https://doi.org/10.1038/nature25458>, 24 enero 2018.*
- [4] Spemann, H. & Mangold, H. Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch. Mikrosk. Anat. En.* 100, 599–638 (1924). Google Scholar.
- [5] Sperry, R. W. Effect of 180 degree rotation of the retinal field on visuomotor coordination. *J. Exp. Zool.* 92, 263–279 (1943). Article Google Scholar.
- [6] Voss, S. R., Epperlein, H. H. & Tanaka, E. M. *Ambystoma mexicanum*, the axolotl: a versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2009, <https://doi.org/10.1101/pdb.emo128> (2009).
- [7] Currie, J. D. et al. Live imaging of axolotl digit regeneration reveals spatiotemporal choreography of diverse connective tissue progenitor pools. *Dev. Cell* 39, 411–423 (2016). CAS Article Google Scholar.
- [8] Tanaka, E. M. The molecular and cellular choreography of appendage regeneration. *Cell* 165, 1598–1608 (2016). CAS Article Google Scholar
- [9] Keinath, M. C. et al. Initial characterization of the large genome of the salamander *Ambystoma mexicanum* using shotgun and laser capture chromosome sequencing. *Sci. Rep.* 5, 16413 (2015). CAS ADS Article Google Scholar.

- [10] Warren, R. L. et al. Improved white spruce (*Picea glauca*) genome assemblies and annotation of large gene families of conifer terpenoid and phenolic defense metabolism. *Plant J.* 83, 189–212 (2015). CAS Article Google Scholar.
- [11] Zimin, A. V. et al. An improved assembly of the loblolly pine mega-genome using long-read single-molecule sequencing. *Gigascience* 6, 1–4 (2017). CAS ADS PubMed PubMed Central Google Scholar
- [12] Bejerano, G. et al. Ultraconserved elements in the human genome. *Science* 304, 1321–1325 (2004), CAS ADS Article Google Scholar
- [13] Sun, Y.-B. et al. Whole-genome sequence of the Tibetan frog *Nanorana parkeri* and the comparative evolution of tetrapod genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, E1257–E1262 (2015). CAS Article Google Scholar.
- [14] Parra, G., Bradnam, K. & Korf, I. CEGMA: a pipeline to accurately annotate core genes in eukaryotic genomes. *Bioinformatics* 23, 1061–1067 (2007). CAS Article Google Scholar.
- [15] Sun, C. & Mueller, R. L. Hellbender genome sequences shed light on genomic expansion at the base of crown salamanders. *Genome Biol. Evol.* 6, 1818–1829 (2014) Article Google Scholar
- [16] Smith, J. J. et al. Genic regions of a large salamander genome contain long introns and novel genes. *BMC Genomics* 10, 19 (2009). CAS Article Google Scholar.
- [17] Davis, A. P., Witte, D. P., Hsieh-Li, H. M., Potter, S. S. & Capecchi, M. R. Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature* 375, 791–795 (1995). CAS ADS Article Google Scholar.
- [18] Roensch, K., Tazaki, A., Chara, O. & Tanaka, E. M. Progressive specification rather than intercalation of segments during limb regeneration. *Science* 342, 1375–1379 (2013). CAS ADS Article Google Scholar.
- [19] Voss, S. R. et al. Salamander Hox clusters contain repetitive DNA and expanded non-coding regions: a typical Hox structure for non-mammalian tetrapod vertebrates? *Hum. Genomics* 7, 9 (2013) Article Google Scholar 17
- [20] Feiner, N., Meyer, A. & Kuraku, S. Evolution of the vertebrate Pax4/6 class of genes with focus on its novel member, the Pax10 gene. *Genome Biol. Evol.* 6, 1635–1651 (2014) Article Google Scholar
- [21] Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F. 3rd ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31, 397–405 (2013). CAS Article Google Scholar.

- [22] Mansouri, A., Hallonet, M. & Gruss, P. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 851–857 (1996). CAS Article Google Scholar.
- [23] Mansouri, A., Stoykova, A., Torres, M. & Gruss, P. Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7^{-/-} mutant mice. *Development* 122, 831–838 (1996). CAS PubMed PubMed Central Google Scholar.
- [24] Kuang, S., Chargé, S. B., Seale, P., Huh, M. & Rudnicki, M. A. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J. Cell Biol.* 172, 103–113 (2006). CAS Article Google Scholar 22
- [25] Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A. & Buckingham, M. Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. *Genes Dev.* 18, 1088–1105 (2004). CAS Article Google Scholar.
- [26] Auerbach, R. Analysis of the developmental effects of a lethal mutation in the house mouse. *J. Exp. Zool.* 127, 305–329 (1954)Article Google Scholar 24
- [27] Nord, H., Dønnhag, N., Muck, J. & von Hofsten, J. Pax7 is required for establishment of the xanthophore lineage in zebrafish embryos. *Mol. Biol. Cell* 27, 1853–1862 (2016). CAS Article Google Scholar 25
- [28] da Silva, S. M., Gates, P. B. & Brockes, J. P. The newt ortholog of CD59 is implicated in proximodistal identity during amphibian limb regeneration. *Dev. Cell* 3, 547–555 (2002). CAS Article Google Scholar.
- [29] Garza-Garcia, A. A., Driscoll, P. C. & Brockes, J. P. Evidence for the local evolution of mechanisms underlying limb regeneration in salamanders. *Integr. Comp. Biol.* 50, 528–535 (2010). Article Google Scholar.
- [30] Sugiura, T., Wang, H., Barsacchi, R., Simon, A. & Tanaka, E. M. MARCKS-like protein is an initiating molecule in axolotl appendage regeneration. *Nature* 531, 237–240 (2016). CAS ADS Article Google Scholar.
- [31] Bryant, D. M. et al. A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell Reports* 18, 762–776 (2017). CAS Article Google Scholar 29
- [32] Stewart, R. et al. Comparative RNA-seq analysis in the unsequenced axolotl: the oncogene burst highlights early gene expression in the blastema. *PLOS Comput. Biol.* 9, e1002936 (2013). CAS Article Google Scholar 30
- [33] Knapp, D. et al. Comparative transcriptional profiling of the axolotl limb identifies a tripartite regeneration-specific gene program. *PLoS ONE* 8, e61352 (2013). CAS ADS Article Google Scholar 31
- [34] Calve, S., Odelberg, S. J. & Simon, H.-G. A transitional extracellular matrix instructs cell behavior during muscle regeneration. *Dev. Biol.* 344, 259–271 (2010). CAS Article Google Scholar 32

- [35] Tassava, R. A., Nace, J. D. & Wei, Y. Extracellular matrix protein turnover during salamander limb regeneration. *Wound Repair Regen.* 4, 75–81 (1996). CAS Article Google Scholar.
- [36] Kumar, A., Gates, P. B., Czarkwiani, A. & Brockes, J. P. An orphan gene is necessary for preaxial digit formation during salamander limb development. *Nat. Commun.* 6, 8684 (2015). CAS ADS Article Google Scholar. 34
- [37] King, B. L. & Yin, V. P. A conserved microRNA regulatory circuit is differentially controlled during limb/appendage regeneration. *PLoS ONE* 11, e0157106 (2016). Article Google Scholar.
- [38] Sun, C. et al. LTR retrotransposons contribute to genomic gigantism in plethodontid salamanders. *Genome Biol. Evol.* 4, 168–183 (2012). Article Google Scholar.
- [39] Jiang, P. et al. Analysis of embryonic development in the unsequenced axolotl: waves of transcriptomic upheaval and stability. *Dev. Biol.* 426, 143–154 (2017). CAS Article Google Scholar.
- [40] Llorens, C. et al. The Gypsy Database (GyDB) of mobile genetic elements: release 2.0. *Nucleic Acids Res.* 39, D70–D74 (2011). CAS Article Google Scholar.
- [41] Milewski, R. C. et al. Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3. *Development* 131, 829–837 (2004). CAS Article Google Scholar.39
- [42] Degenhardt, K. R. et al. Distinct enhancers at the Pax3 locus can function redundantly to regulate neural tube and neural crest expressions. *Dev. Biol.* 339, 519–527 (2010). CAS Article Google Scholar.