



Regulació de la regeneració anterior a través de la via *egfr-3/egr-4* en la planària *Schmidtea mediterranea*

Susanna Fraguas Garcia

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA
PROGRAMA DE DOCTORAT BIENI 2009-2010

Regulació de la regeneració anterior
a través de la via *egfr-3/egr-4*
en la planària *Schmidtea mediterranea*

SUSANNA FRAGUAS GARCIA

Tesi Doctoral
2014

Regulació de la regeneració anterior a través de la via *egfr-3/egr-4* en la planària *Schmidtea mediterranea*

MEMÒRIA PRESENTADA PER
SUSANNA FRAGUAS GARCIA

PER OBTENIR EL GRAU DE
DOCTORA PER LA UNIVERSITAT DE BARCELONA

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció del Dr. Francesc Cebrià Sánchez del
Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de
Barcelona

EL DIRECTOR

L'AUTOR

Dr. Francesc Cebrià Sánchez

Susanna Fraguas Garcia

Barcelona, 12 de Maig de 2014

**En el món en què vivim, el que sabem i el que no sabem
són com uns germans siamesos, inseparables,
que existeixen en un estat de confusió.
Qui pot distingir realment entre el mar i el que s'hi reflecteixi?
o dir quina és la diferència entre la pluja que cau i la solitud?
(fragment del llibre "El meu amor Sputnik")**

Haruki Murakami

Índex general

Índex	1
Introducció	5
Capítol 1. El fenomen de la regeneració	5
1.1.- Visió general de la regeneració.....	5
1.2.- Breu història de la regeneració	10
1.3.- Mecanismes regeneratius	12
1.4.- Organismes model	14
Capítol 2. Les planàries, un model clàssic per estudiar la regeneració	23
2.1.- Les planàries.....	23
2.2.- <i>Schmidtea mediterranea</i> , una espècie model.....	29
2.3.- Anatomia general	31
2.3.1.- Epidermis	31
2.3.2.- Parènquima.....	32
2.3.3.- Musculatura.....	34
2.3.4.- Sistema digestiu	35
2.3.5.- Sistema nerviós.....	36
2.3.6.- Òrgans sensorials	37
2.3.7.- Sistema excretor	39
2.3.8.- Sistema reproductor	40
2.4.- La regeneració de les planàries	41
2.4.1.- Tancament de la ferida	42
2.4.2.- Formació del blastema. Proliferació versus mort cel·lular.....	43
2.4.3.- Determinació i diferenciació de les noves estructures	47
2.4.4.- Restabliment de la polaritat durant la regeneració.....	51
Capítol 3. La via de senyalització dels receptors dels factors de creixement epidèrmics (EGFR).....	57
3.1.- Introducció.....	57
3.2.- Via de senyalització dels EGFR	58
3.3.- Estructura dels EGFR	61
3.4.- Cascades de senyalització regulades a través dels EGFR.....	63

3.4.1.- Via MAPK.....	63
3.4.2.- Via PI3k/Akt.....	64
3.4.1.- Via PLC γ	65
3.4.1.- Via JAK/STAT	65
3.5.- Importància dels EGFR durant el desenvolupament del càncer	66
3.5.1.- EGFR i teràpies contra el càncer	67
3.6.- Processos biològics regulats per la via EGFR	68
3.6.1.- Regulació de la via dels EGFR durant la proliferació	69
3.6.2.- Regulació de la via dels EGFRs durant la diferenciació	70
3.6.3.- Regulació de la via dels EGFRs durant la regeneració.....	71
3.7.- La via dels EGFR als Plathelminths	73
Objectius	79
Resultats	83
- Informe del Director sobre la participació de la doctoranda i l'índex d'impacte de les publicacions	85
- Article 1. <i>EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis</i>	89
Resum	91
Article	93
Material suplementari	109
- Article 2. <i>egr-4, a target of EGFR signaling, is required for the formation of the brain primordia and head regeneration in planarians</i>	121
Resum	123
Article	125
Material suplementari	139
Discussió	159
1. Regulació del procés de la regeneració en la planària <i>S. mediterranea</i>	161
2. La conservació de la via dels EGFR a <i>S. mediterranea</i>	161
3. La diversitat funcional dels <i>Smed-egfr</i>	163
4. Estudi funcional de <i>Smed-egfr-3</i> durant la regeneració	165
4.1.- Regulació del creixement del blastema a través de <i>Smed-egfr-3</i>	168

4.2.- L'activació de la diferenciació gràcies al receptor <i>Smed-egfr-3</i> ..	173
4.3.- Quines vies de senyalització regulades a partir de <i>Smed-egfr-3</i> estan implicades en l'estadi inicial de la diferenciació?.....	175
5. <i>egr-4</i> , un possible gen diana regulat per <i>Smed-egfr-3</i>	177
5.1.- Breu introducció de la família gènica dels <i>egr</i>	177
5.2.- Estructura de les proteïnes EGR	178
5.3.- Funció dels <i>egr</i> en altres organismes	179
5.4.- <i>egr</i> identificats a <i>S.mediterranea</i>	180
5.5.- Patró d'expressió de l' <i>egr-4</i>	182
5.6.- Caracterització funcional de l' <i>egr-4</i>	186
6. Regulació de la regeneració anterior a través de la via <i>egfr-3/egr-4</i>	189
Conclusions	193
Bibliografia	197
Annexes	225
Annex 1. Via de senyalització dels EGFR: els <i>rhomboids</i>	227
Annex 2. Identificació i caracterització de possibles gens regulats per la via dels EGFR mitjançant Digital Gene expression	237
Annex 3. Identificació de possibles gens diana regulats per <i>egr-4</i> mitjançant l'eina transcriptòmica <i>RNA-seq</i>	247
Annex 4. Article 3. <i>Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of Schmidtea mediterranea</i>	259
Resum	261
Article	263
Annex 5. Article 4. <i>Regeneration of neuronal cell types in Schmidtea mediterranea: an immunohistochemical and expressio study</i>	283
Resum	285
Article	287
Agraïments	299

Introducció

If there were no regeneration, there could be no life.

If everything regenerated, there would be no death.

R. J. Goss, Principles of Regeneration (1969)

Capítol 1.

El fenomen de la regeneració

1.1.- Visió general de la regeneració

En biologia, el terme regeneració s'acostuma a associar a la regeneració reparativa que comporta el reemplaçament de les estructures del cos perdudes a causa d'una ferida o d'un dany. Es considera una habilitat extremadament variable i estesa en el regne animal, que es pot donar a diferents nivells biològics: a nivell cel·lular, com en el cas dels axons i les fibres musculars, de teixit, per exemple l'epidermis de l'intestí, d'òrgan, com succeeix en el cor dels peixos zebra o el fetge humà, d'estructura, com poden ser les extremitats de les salamandres, o fins i tot del cos sencer a partir d'un petit fragment, com en el cas del nostre organisme model, les planàries. Degut a la seva àmplia distribució en el regne animal i la relació de les cèl·lules mare amb la medicina regenerativa, la regeneració s'ha convertit en un dels fenòmens més estudiats actualment, amb l'objectiu de conèixer quins són els mecanismes que permeten a aquests organismes la fascinant habilitat de regenerar (Sánchez-Alvarado, 2000; Brockes i Kumar, 2008).

A la natura, els animals poden patir la pèrdua d'una part del seu cos ja sigui per l'atac d'un depredador, durant la reproducció asexual o degut simplement a un trauma natural. El contacte entre l'epidermis de la ferida i els

Introducció

teixits adjacents (Gurtner i altres, 2008) o el flux d'ions (Levin, 2009) són processos claus perquè tinguin lloc el tancament inicial d'aquesta ferida, però aquest pas és comú en tots els animals, puguin regenerar o no. En el cas que es pugui donar el fenomen de la regeneració, a continuació tindran lloc una sèrie de respostes locals a la regió de l'amputació, independents o a la vegada. Així, per exemple a *Hydra*, es dona un remodelatge dels teixits preexistents per tal de regenerar les estructures amputades. En les planàries es dona una proliferació de les cèl·lules mare adultes a la vegada que un remodelatge, mentre que els vertebrats són capaços de presentar una proliferació cel·lular a partir principalment d'una desdiferenciació de les cèl·lules (Figura 1). Treballs recents han suggerit que, per tal que es puguin desencadenar aquestes respostes regeneratives, en diversos organismes l'apoptosi hi juga un paper crític, com succeeix a *Hydra*, on la inhibició de la mort cel·lular representa el bloqueig de la regeneració anterior (Chera i altres, 2009; Varga i altres, 2014).

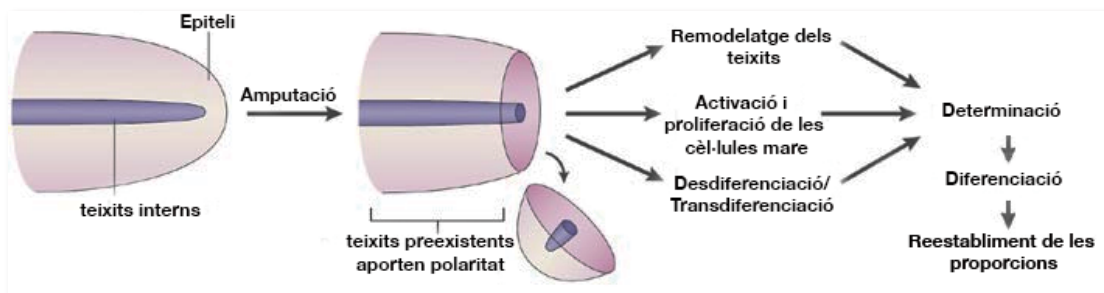


Figura 1. Mecanismes bàsics de la regeneració. Després d'una amputació, es poden donar tres processos diferents independentment o alhora, depenent de l'organisme: remodelatge dels teixits, activació de les cèl·lules mare i desdiferenciació/transdiferenciació cel·lular. Aquests processos permeten la diferenciació cel·lular per formar els nous teixits amb unes correctes proporcions i polaritat (adaptat de Sánchez-Alvarado i Tsonis, 2006).

Per reemplaçar una estructura amputada es requereix la formació de noves cèl·lules. Per aquest motiu, un dels primers senyals en desencadenar-se quan es reconstrueixen les estructures danyades és l'estimulació de la proliferació. En molts models de regeneració (per exemple, les planàries o en la regeneració de les extremitats dels amfibis) aquestes noves cèl·lules es concentren en la regió pròxima a la ferida, formant una massa cel·lular indiferenciada anomenada blastema. L'origen d'aquest increment de la proliferació pot ser divers depenent de l'espècie o, fins i tot, del teixit dins d'un

mateix organisme. És a dir, pot tenir lloc una proliferació de la població de cèl·lules mare residents o la divisió terminal de cèl·lules diferenciades o, fins i tot, la desdiferenciació/transdiferenciació de cèl·lules madures a cèl·lules precursors.

La capacitat regenerativa es troba àmpliament distribuïda, present en nombrosos fílums del regne animal, però mostrant una evident variabilitat entre ells i en alguns casos disminuïda o totalment absent, fins i tot en espècies molt properes a aquelles que sí poden regenerar (Dinsmore, 1991). La causa de la seva desaparició en alguns llinatges esdevé encara una incògnita, tot i les abundants hipòtesis que s'han anat formulant en les últimes dècades (Bely i Nyberg, 2010; Brockes i Kumar, 2008). És poc probable que la regeneració hagi aparegut independentment en tots aquests fílums amb capacitat regenerativa i per aquest motiu s'ha suggerit que originàriament la regeneració era una característica primitiva present en l'ancestre dels animals bilaterals que s'ha perdut secundàriament per diverses raons. L'anàlisi de la distribució filogenètica de la regeneració demostra que l'origen remunta en animals basals, suggerint una possible relació amb l'origen de la multicel·lularitat (Edgecombe i altres, 2011). Ara bé, si s'intenta analitzar l'habilitat de regenerar a través dels fílums és realment complex, ja que la morfologia d'aquests organismes és clarament divergent i això dificulta la comparació de determinades parts del cos homòlogues. S'han postulat diverses hipòtesis que intenten explicar el manteniment o la pèrdua no absoluta d'aquesta capacitat (Bely i Nyberg, 2010):

- **Hipòtesi adaptativa**, si l'habilitat de regenerar una estructura específica es manté activament per selecció, per tant, en aquest cas el benefici de la regeneració hauria de ser superior al seu cost energètic.
- Determinades espècies mantenen la seva capacitat regenerativa lligada a altres fenòmens, com poden ser la reproducció asexual, creixement o embriogènesi; en aquest escenari parlaríem d'una **hipòtesi pleiotròpica**.
- Altres **hipòtesis** postulen senzillament que el seu manteniment al llarg de l'evolució es deu a raons **històriques**, és a dir, la regeneració seria un caràcter ancestral que no s'ha perdut.

Malgrat tot, avui dia encara no és possible respondre certes qüestions com quins senyals inicien la regeneració o si podria reaparèixer en espècies que l'hagin perduda. Nous sistemes models s'han integrat en el seu estudi, amb la finalitat de trobar noves respostes esperançadores i així poder desvelar el misteri de la extraordinària capacitat de regenerar.

1.2.- Breu història de la regeneració

L'interès per conèixer l'origen de la capacitat d'alguns òrgans en regenerar es remunta als inicis de la humanitat, com ha quedat reflectit en la mitologia grega a través, entre d'altres, del mite de Prometeus. La història explica que Zeus encadenà a Prometeus en una columna com a càstig per haver desafiat l'ordre dels Déus. Durant el dia una àguila l'atacava, devorant-li el fetge, òrgan que Zeus li havia atorgat la capacitat immortal de regenerar cada nit. Aquesta característica feia que l'àguila tornés cada matí per torturar al condemnat fins que Hèrcules el va alliberar. Anecdòticament, el que la mitologia grega explicava amb el relat de Prometeus, recentment s'ha demostrat científicament que pot tenir lloc la regeneració del fetge humà (Ingle and Baker, 1957), però com ja diu la seva definició, un mite sempre exagera la realitat i mentre que Prometeus era capaç de regenerar cada nit el seu fetge després de ser devorat, l'home no hauria sigut capaç ni d'iniciar la síntesis d'ADN. Un altre relat de la mitologia grega vinculat a la regeneració és el de l'*Hydra* de Lerna, que explica la història de la criatura amb forma de serp amb set caps, els quals eren capaços de regenerar múltiples vegades quan eren tallats.

No va ser fins el segle XVIII que el fenomen de la regeneració animal va capturar l'atenció i la imaginació de naturalistes i intel·lectuals, esdevenint una disciplina pròpia dins de la biologia. La seva recerca va comportar la transició de la història natural descriptiva a una zoologia experimental moderna, on van aparèixer els primers estudis científics sistemàtics sobre regeneració realitzats, entre d'altres, per René-Antoine Ferchault de Réaumur (1683-1757). El 1712, Réaumur va donar a conèixer el seu treball basat en la regeneració observada en les extremitats dels crancs. En aquest mateix segle, un dels científics més

influent dins el camp, Abraham Trembley, considerat el pare de l'estudi modern de la regeneració, va presentar el seu treball a *Hydra*, on va demostrar que petits fragments d'aquests pòlips eren capaços de regenerar un nou individu adult. El treball de Trembley va significar un abans i un després en l'estudi experimental de la biologia. Peter Simon Pallas va descriure les singulars capacitats regeneratives d'una espècie desconeguda durant aquella època, anomenada avui en dia planària (Pallas, 1766). Encara en el segle XVIII, cal esmentar a Lazzaro Spallanzani (Spallanzani, 1768), que va introduir els primers estudis sobre la regeneració en vertebrats, centrant-se en la regeneració de les extremitats, mandíbula, ulls i cua dels llargardaixos i amfibis.

Els avenços en la investigació sobre la regeneració en el segle XIX van ser notablement més escassos, eclipsats per altres fenòmens que mantenien el centre d'atenció. Tot i així, gràcies al fenomen neurotròfic descrit per T. J. Todd, on s'explicava el descobriment d'una dependència de la innervació del teixit durant la regeneració (Todd, 1823), es va mantenir viu l'interès.

A finals del segle XIX, l'estudi de la regeneració va patir un gir, amb els treballs de W. Roux, H. Driesch i T. H. Morgan. Suposava a més a més l'inici de l'estudi de la Genètica Moderna junt amb l'Embriologia, mitjançant l'anàlisi del desenvolupament de models clàssics, com *Drosophila*, ratolins o *C. elegans*. La falta relativa de tècniques moleculars impedia avançar en l'estudi de la regeneració i es van arribar a construir idees contradictòries en el camp. Durant aquest segle, múltiples científics es van començar a interessar per la regeneració de les planàries, descrivint-les com "gairebé immortals sota la ganiveta" (Dalyell, 1814). Thomas H. Morgan va dur a terme exhaustius treballs relacionats amb la seva regeneració, introduint el terme morfol·laxis i epimorfosis (Morgan, 1900; veure apartat 1.3) i interessant-se per aspectes que encara ara desperten cert enigmes com la polaritat o com quedava aquesta afectada posteriorment a una amputació. Així doncs, va observar que les planàries podien donar lloc a estructures heteromòrfiques, al desenvolupar-se caps i cues revertits en fragments tallats extremadament petits, depenent de la part del cos on es produïa el tall i de factors interns (Morgan, 1901).

Introducció

Morgan va descriure que les planàries tenen la capacitat de regenerar qualsevol estructura a partir d'un fragment equivalent a una $1/279^a$ part del seu cos (Morgan, 1898), tenint en compte certes imperfeccions regeneratives. Sorprenentment, ja va observar aleshores que hi ha certs teixits o estructures incapaces de regenerar en les planàries: la faringe i la regió anterior als ulls (Morgan 1898), on més tard s'ha demostrat que és per falta de cèl·lules mare mitòticament actives, els neoblasts (Newmark i Sánchez-Alvarado, 2000) .

1.3.- Mecanismes regeneratius

La paraula “regeneració” és un terme genèric que es pot aplicar a una gran varietat de fenòmens però, en general, en els metazous es pot donar a través de dos mecanismes definits originàriament per Thomas H. Morgan (Morgan 1901), coneguts com a epimorfosis i morfàl·laxis:

- **Epimorfosis** és la regeneració que comporta proliferació cel·lular en la regió de la ferida o l'amputació, per tal de reconstruir les estructures danyades, en un teixit anomenat blastema (Figura 2). El blastema està format per un conjunt de cèl·lules epitelials que cobreixen una massa de cèl·lules mesenquimàtiques indiferenciades. No només s'ha descrit en les planàries, també es forma un blastema en els anèl·lids, mol·luscs, equinoderms, nemertins, crustacis, peixos teleosts, amfibis, llangardaixos i alguns mamífers. No obstant, la regeneració epimòrfica sense la formació d'un blastema també pot succeir, com a resultat de la transdiferenciació del teixit ja present, per la desdiferenciació de les cèl·lules que han sobreviscut o, en alguns casos, per la proliferació i la diferenciació de cèl·lules mare ja presents en el teixit danyat. Per exemple, en alguns platihelminths turbel·laris, com en el cas dels catenúlids (Egger i altres, 2009) o del macrostòmida *Microstomum lineare* (Palmberg, 1986), o en la regeneració del cristal·lí dels amfibis (Reyer, 1954).



Figura 2. Regeneració per epimorfosis de l'extremitat del llangardaix. La regeneració per epimorfosis implica la proliferació cel·lular i la formació d'un blastema per tal de formar les estructures amputades (adaptat de Muneoka i altres, 2008).

- **Morfal·laxis** és la regeneració que comporta la dràstica recreació de les parts del cos perdudes exclusivament per remodelatge de les cèl·lules preexistents, sense la necessitat d'una proliferació cel·lular. Hi trobem com a exemple clàssic la *Hydra* (Figura 3), on la plasticitat de les seves cèl·lules permet la formació d'un organisme adult a partir d'un individu que ha patit una ferida o ha sigut amputat.

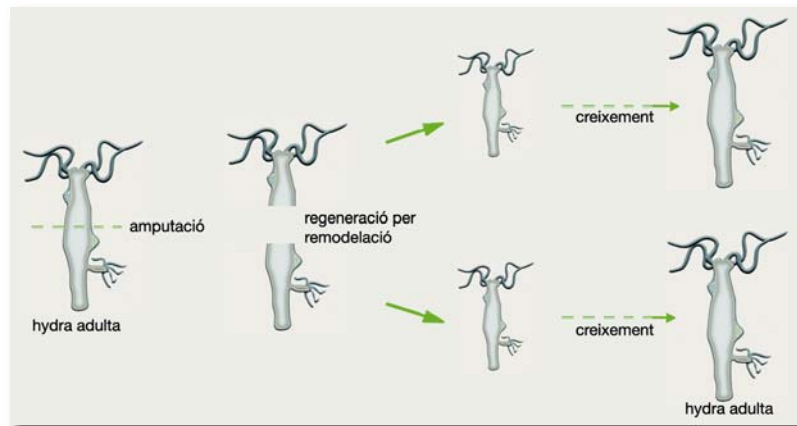


Figura 3. Regeneració per morfal·laxis en *Hydra*. La regeneració per morfal·laxis comprèn la transformació de parts del cos existents en estructures noves, mitjançant un remodelatge sense necessitat d'una proliferació cel·lular (adaptat de Poss, 2010).

No obstant, aquests dos conceptes clàssics han creat certa controvèrsia i ambigüitat ja des dels inicis amb la definició presentada per Morgan, que els va descriure com “dos processos que no estan completament separats i poden, fins i tot, aparèixer en alguns casos combinats”. Estudis recents han vist que no tots els cnidaris presenten exclusivament una regeneració mitjançant morfal·laxis, per exemple *Nematostella* promou la proliferació cel·lular després d'una amputació (Passamaneck i Martindale, 2012). Relatiu a les planàries, s'ha descrit un model mix de morfal·laxis i epimorfosis, ja que tot i que es formi un blastema després d'una amputació, és necessari un remodelatge dels teixits preexistents per restaurar les correctes proporcions corporals d'aquest platihelminth (Saló i Baguñà, 1984). Per aquest motiu, aquesta classificació ha sigut discutida i s'ha preferit no tractar-los com termes estrictament oposats i independents, evitant així punts de vista sobre la regeneració reduccionistes (Agata, 2007; Galliot i Ghila, 2010)

1.5.- Organismes model

Junt amb les planàries, actualment hi ha diversos organismes model àmpliament estudiats amb l'objectiu d'entendre el fenomen de la regeneració, entre els quals s'hi troben tan invertebrats com vertebrats (Figura 4). A continuació es citen algunes característiques fonamentals dels organismes model més estudiats:

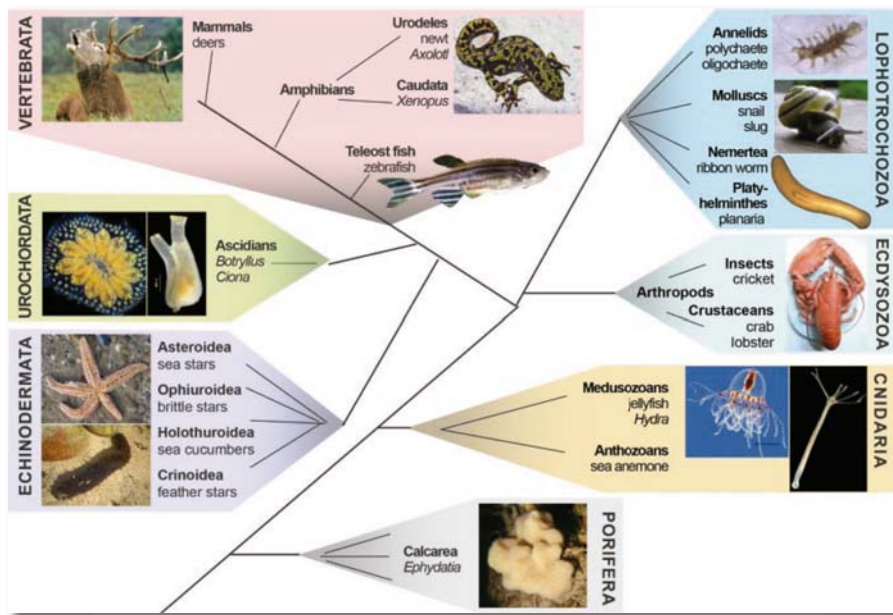


Figura 4.
Organismes amb capacitat regenerativa.
Arbre filogenètic que mostra els filums amb espècies que presenten un alt poder regeneratiu en un estadi larvari o adult, depenent de l'organisme (adaptat de Galliot i Ghila, 2010).

Hydra

Les *Hydres* són organismes d'aigua dolça que pertanyen al filum Cnidaria, considerats el primer sistema model estudiat en Biologia del Desenvolupament (Trembley 1744). Presenten exclusivament dues capes embrionàries (ectoderm i endoderm) i l'eix corporal està dividit en dos pols separats per una cos tubular (Figura 5). El pol oral o cap està compost per la boca (hipostoma) i l'anell tentacular i el pol aboral, o peu conté el disc basal que els hi permet adherir-se al substrat. Són capaces de reproduir-se tant sexualment com asexual (la propagació asexual es dona mitjançant una gemmació). Presenten una gran capacitat regenerativa que els fa notables, mitjançant un procés de morfol·laxis, és a dir, durant el fenomen de la regeneració indueixen un canvi en la morfologia tissular mitjançant la intervenció de cèl·lules preexistents, sense la necessitat d'una proliferació cel·lular (Holstein i altres, 2003; Galliot i Ghila, 2010; Cummings i Bode, 1984). Com succeeix en les planàries, *Hydra* presenta un reemplaçament cel·lular

continu gràcies a la presència de cèl·lules mare mitòticament actives que s'encarreguen de produir les cèl·lules germinals i les somàtiques al llarg de la seva vida, però a diferència de les planàries, les quals presenten una única població de cèl·lules mare anomenades neoblasts (Saló i altres, 2009), a *Hydra* es troben tres tipus diferents de cèl·lules mare: les intersticials, les epitelials endodèrmiques i les epitelials ectodèrmiques (Figura 5; Bosch, 2009; Galliot i Chera, 2010).

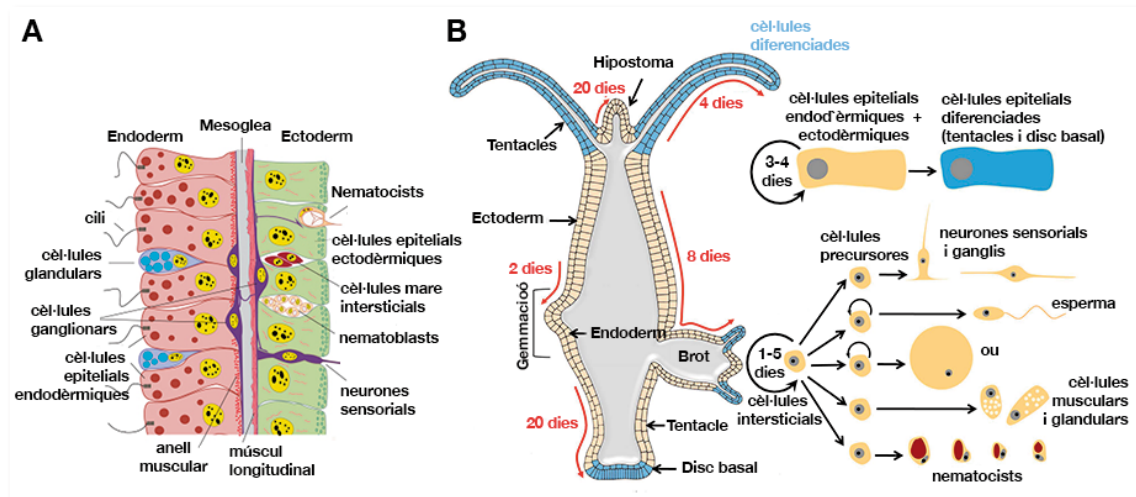


Figura 5. Anatomia del pòlip d'*Hydra*. (A) Organització en dues capes, l'endoderm i el ectoderm separades per una matriu acel·lular, la mesoglea. (B) Dinàmica cel·lular a l'*Hydra* adulta. Les cèl·lules ectodèrmiques i endodèrmiques en el cos columnar donen lloc a les cèl·lules diferenciades ectodèrmiques i endodèrmiques dels tentacles i del disc basal, mentre que les cèl·lules mare intersticials donen lloc a quatre tipus de cèl·lules diferenciades (adaptat de Martinez i Bridge, 2012; Technau i Steele, 2011).

Les cèl·lules mare epitelials endodèrmiques i ectodèrmiques proliferen contínuament amb l'objectiu de mantenir les capes tissulars, produint cèl·lules epitelials diferenciades. D'altra banda, les cèl·lules mare intersticials, les quals es troben entre la capa cel·lular de les cèl·lules ectodèrmiques, tenen la capacitat d'auto-renovar-se i es consideren multipotents, ja que produeixen neurones, nematocists, cèl·lules secretores i gàmetes.

Actualment la seva investigació es centra en explicar aquesta capacitat a nivell molecular, mitjançant tècniques com la d'interferència de l'ARN o transgènesi, examinant el paper de rutes de senyalització conservades i factors de transcripció, com per exemple la ruta de senyalització de *Wnt* i *Brachyury*, respectivament (Galliot i Chera, 2000; Holstein i altres, 2003; Technau i Bode, 1999).

Introducció

Nematostella

Nematostella vectensis s'ha convertit recentment en un bon organisme model per estudiar el fenomen de la regeneració i l'establiment del patró durant el desenvolupament. Mostren un increment de la proliferació cel·lular després d'una bisecció, entre 18-48 hores després de l'amputació, que es manté al llarg de la regeneració d'aquestes estructures orals. Addicionalment, l'ús d'inhibidors de la proliferació cel·lular (*hydroxyurea* i *nocodazol*) demostren que aquest increment de la proliferació és indispensable per la progressió correcta de la regeneració (Figura 6; Bossert i altres, 2013; Passamaneck i Martindale, 2012). Com en el cas d'*Hydra*, *Nematostella* forma part del fílum Cnidaria, però aquests dos sistemes presenten diferències evidents durant el procés regeneratiu que demostren la seva divergència (*Nematostella* forma part del clade Anthozoa, mentre que *Hydra* del clade Hydrozoa) i la possible evolució independentment l'un de l'altre. *Nematostella* mostra un evident increment de la proliferació cel·lular durant la regeneració de les estructures orals (tentacles, boca i faringe) (Passamaneck i Martindale, 2012), contràriament al cas d'*Hydra*, malgrat que estudis recents han demostrat que aquest model clàssic de regeneració mitjançant morfol·laxis podria induir també la proliferació cel·lular després d'una amputació quan és a nivell mesogàstric (Chera i altres, 2009).

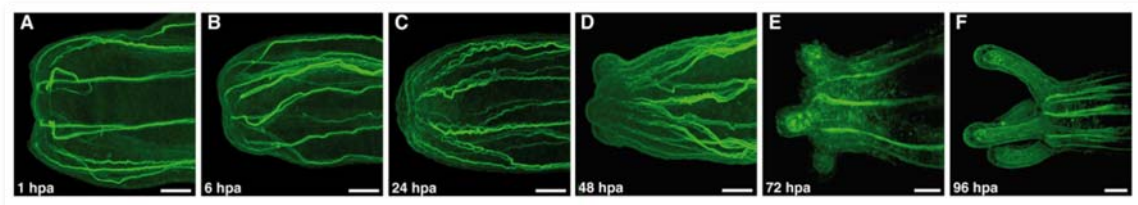


Figura 6. Regeneració oral de *Nematostella*. Immunotinció de l'actina F d'un pòlip regenerant a 1 hora post-amputació (hpa), 6 hpa, 24 hpa, 48 hpa, 72 hpa i 96 hpa, capaç d'acabar formant els tentacles, la boca i la faringe de nou. Barra d'escala 50μm (adaptat de Passamaneck i Martindale, 2012).

Ascídies

Dintre del fílum dels cordats, les ascídies (o ascidiacis) solitàries (*Ciona intestinalis* i *Styela*) i colonials (*Botryllus schlosseri*) són capaces de regenerar determinades estructures.

Els organismes adults de les ascídies *Ciona intestinalis* tenen una limitada habilitat regenerativa, restringida a estructures com el sífó (tant l'oral com l'atrial) i complexes neuronals (gangli cefàlic del SNC) (Jeffery, 2012; Hirschler, 1914; Dahlberg i altres, 2009; Auger i altres, 2010) i s'ha suggerit que aquestes estructures només poden regenerar si certs òrgans interns estan presents (cor, estomac, gònades i part de la faringe) (Hirschler, 1914). En el cas de la regeneració del sífó oral, s'ha demostrat un tancament de la ferida, la formació del blastema, proliferació cel·lular i el reemplaçament d'unes estructures conegudes com òrgans orals pigmentats (OPO). Aquests OPO es troben en els marges distals del sífó i es creu que actuen com a òrgans fotoreceptors. Després de l'amputació del sífó oral, el patró d'aquests OPO cal ser restaurat. En primer lloc, noves cèl·lules pigmentàries es diferencien a partir d'unes cèl·lules precursoras que es localitzen en la regió de l'amputació i migren distalment per acumular-se al llarg de la superfície de la ferida. A continuació, aquests cèl·lules pigmentàries disposades linealment es condensen per formar uns agregats pigmentats i acabar formant el patró dels nous OPO. Finalment les ascídies solitàries regeneraran completament tant el sífó oral com l'atrial transcorreguts 1-2 mesos.

En el cas de les ascídies colonials com *Botryllus*, aquestes són capaces de regenerar gràcies a la presència d'una població de cèl·lules mare adultes (Kawamura i altres, 2008; Voskoboynik i altres, 2008).

Crustacis

Diversos crustacis tenen la capacitat de regenerar des d'estadis juvenils fins adults, variant la seva taxa de regeneració depenent del cicle de muda (Morgan, 1900). Estudis recents han presentat un nou model amb capacitats regeneratives, el crustaci *Parhyale hawaiensis* (Figura 7A; Konstantinides i Averof, 2014), capaç de regenerar els seus apèndixs al llarg de tota la seva vida. El tancament de la ferida té lloc el primer dia després de l'amputació; 2-3 dies després de l'amputació es forma el blastema, on es poden observar cèl·lules en proliferació, mitjançant la incorporació d'EdU (Figura 7C). Aproximadament 4-6 dies després de l'amputació, el nou apèndix regenerant ja comença a ser visible. A mesura que transcorren els dies, l'apèndix pot anar

Introducció

augmentant la seva mida fins adquirir el seu patró de segmentació característic. La seva importància recau en les semblances que comparteix amb els vertebrats durant la regeneració de les seves extremitats. S'han identificat cèl·lules SLC ("satellite-like") que expressen Pax3/7 (Figura 7B), fins ara només caracteritzat en cordats, i han demostrat el paper crucial d'aquestes cèl·lules durant la regeneració del múscul de *Parhyale*.

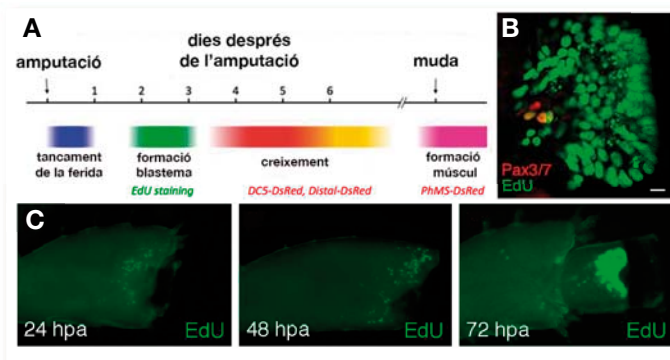


Figura 7. Regeneració de l'extremitat de *Parhyale*. A) Línia del temps de la regeneració de l'extremitat (representat en mesos). B) Les cèl·lules SLC que expressen Pax3/7 contribueixen en la formació del blastema. C) Fases de la regeneració de l'extremitat, marcant les cèl·lules proliferatives mitjançant EdU.(hpa: hores després de l'amputació) (adaptat de Konstantinides i Averof, 2014).

Amfibis

Dintre dels vertebrats, els organismes més utilitzats en l'estudi de la regeneració són els amfibis, on s'hi inclouen els **anurs** (granotes) i els **urodels** (tritons i axolots), capaços de regenerar extremitats amputades i, en alguns casos, altres estructures, com la cua, el cervell, la mandíbula, la medulla espinal o fins i tot part del cor (Tsonis, 2000). Tot i així, el seu estudi en el laboratori és més limitat que el dels invertebrats degut al seu manteniment, que els fa més inaccessibles i, en el cas dels anurs, cal tenir en compte que la capacitat regenerativa es limita exclusivament a determinats estadis previs a la metamorfosis i va decreixent gradualment, com s'ha demostrat en *Xenopus laevis* (Beck i altres, 2009; Sánchez-Alvarado i Tsonis, 2006).

En el cas dels tritons, la regeneració de les seves estructures ha sigut analitzada en detall, mitjançant l'estudi de la desdiferenciació/transdiferenciació. És a dir, presenten múltiples teixits que poden regenerar a través de mecanismes que no requereixen una població de cèl·lules mare o cèl·lules progenitores indiferenciades. Un exemple clàssic de transdiferenciació és la regeneració del cristal·lí dels organismes adults: en un escenari on s'elimina el cristal·lí, les cèl·lules epitelials pigmentàries de l'iris dorsal però no ventral són

capaces de desdiferenciar i tornar-se a diferenciar per formar un nou cristal·lí (Grogg i altres, 2005). D'altra banda, recentment també s'ha demostrat un paper important de les cèl·lules mare durant la regeneració dels amfibis, suggerint que la seva capacitat regenerativa podria implicar tant cèl·lules diferenciades com indiferenciades (Morrison i altres, 2006).

La regeneració de les extremitats dels tritons ha sigut extensament analitzada (Yin i Poss 2008; Brockes, 1997) però gràcies a la major flexibilitat dels experiments de transgènics en el cas de l'axolotl (Sobkow i altres, 2006), aquest darrer amfibi s'ha convertit en un dels sistemes clau per estudiar la regeneració d'aquestes estructures. En la zona amputada, es forma el blastema on tindrà lloc la reconstrucció dels diferents teixits. Estudis més recents han demostrat que aquest blastema està format en realitat per un conjunt de progenitors cel·lulars heterogenis i que la identitat posicional és una propietat específica del tipus cel·lular.

Durant la regeneració de l'axolotl, s'ha vist que les noves cèl·lules musculars, Schwann i epidèrmiques provenen de les cèl·lules musculars, Schwann i epidèrmiques respectivament, mentre que les cèl·lules de la dermis i esquelètiques es poden formar a partir tant de cèl·lules de la dermis i esquelètiques preexistents en ambdós casos. Així s'ha definit el terme "memòria cel·lular", ja que en certa manera les cèl·lules que es desdiferencien i proliferen per formar les noves estructures, mantenen una "memòria" del seu origen (Figura 8; Nacu i Tanaka, 2010; Kragl i Tanaka, 2009).

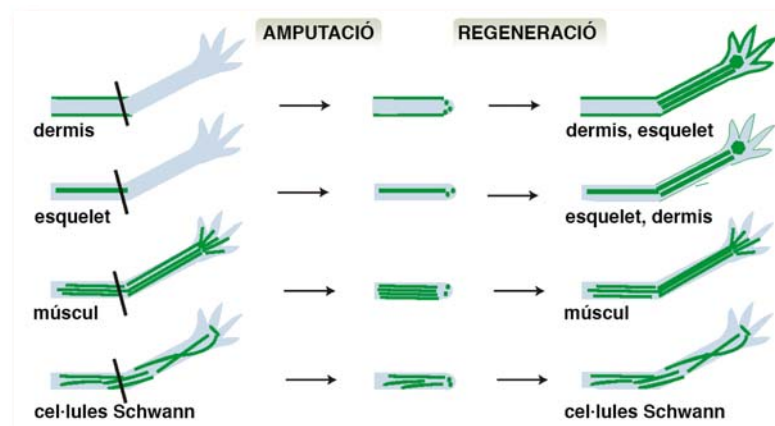


Figura 8. Regeneració de l'extremitat de l'axolotl. Les cèl·lules del blastema són capaces de conservar l'origen del seu llinatge gràcies a una "memòria cel·lular", amb excepció de les cèl·lules dèrmiques que poden donar a l'hora cèl·lules dèrmiques i esquelètiques, i el mateix succeeix en el cas de les cèl·lules esquelètiques (adaptat de Kragl i altres, 2008).

Peix zebra

El peix zebra té la habilitat de regenerar les seves aletes, la línia lateral, el cor i el cervell. Al mateix temps, poden regenerar fotoreceptors i neurones de la retina després d'una ferida. S'ha convertit en un bon organisme model informatiu i versàtil per dues característiques: una, la seva alta capacitat regenerativa, la qual els hi permet reconstruir des d'aletes amputades fins a estructures més complexes com el cervell. En segon lloc, permeten l'ús d'un gran nombre de tècniques moleculars i de manipulació genètica i la presència d'embrions transparents permeten la visualització "imaging" *in vivo*. Des de llavors, centenars de laboratoris han realitzat experiments en transgènics, inactivat determinats gens mitjançant mutagènesi o bloquejant-los a través de morfollins i han aconseguit seqüenciar el seu genoma (Woods i altres, 2005).

S'ha estudiat en detall la regeneració de l'aleta ja que, tot i ser un apèndix complex, es pot reconstruir ràpidament restaurant al mateix temps la forma i la mida, mitjançant la formació d'una massa proliferativa de cèl·lules morfològicament similars, el blastema, després d'un o dos dies de l'amputació (Figura 9; White i altres, 1994). Recentment, s'ha demostrat que, igual que els amfibis, presenten una memòria cel·lular durant la regeneració (Knopf i altres, 2011). No obstant, actualment el seu interès s'ha centrat en la regeneració del cor, ja que els peixos zebra presenten una alta capacitat regenerativa natural d'aquest òrgan. Perquè tingui lloc la seva reconstrucció és necessària la desdiferenciació i proliferació dels cardiomiòcits preexistents, com a font cel·lular primària i un entorn que estimuli la regeneració muscular des d'aquesta font (Jopling i altres, 2010; Kikuchi i altres, 2010).

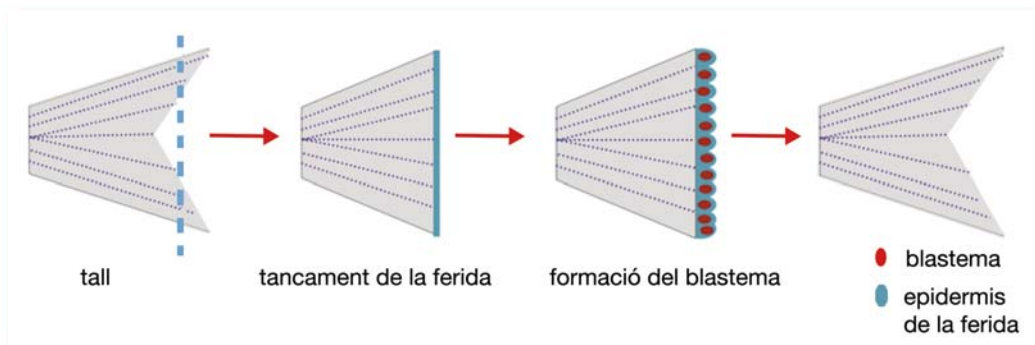


Figura 9. Esquema de la regeneració de l'aleta del peix zebra. Tancament de la ferida i formació del blastema durant la regeneració de l'aleta del peix zebra després d'una amputació (adaptat de Kawakami, 2010).

Rèptils

Els rèptils són amniotes anatòmicament i fisiològica diferents en molts aspectes als mamífers però, no obstant, histològicament similars i per aquest motiu s'han convertit en un model atractiu per estudiar la regeneració tissular o organular, sobretot si considerem la interessant capacitat regenerativa de les cues que presenten els llargardaixos. En general, es consideren vertebrats amb una capacitat regenerativa intermèdia, més baixa que els ciclòstoms, peixos o amfibis però més alta que els amniotes homeotermes (ocells i mamífers).

Sovint, la pèrdua i la conseqüent regeneració de la cua dels llargardaixos es deu a una resposta de defensa davant l'atac d'un depredador, alliberant aquesta extremitat per evitar ser totalment devorats. Tot i així, la reconstrucció d'aquesta estructura no serà mai perfecte, ja que no tots els teixits poden ser regenerats i li suposa al rèptil un cost energètic enorme. Això explica que en algunes espècies la regeneració de la cua es pugui donar tan sols una vegada a la vida o que la nova extremitat sigui en alguns casos més petita que l'original.

Cal citar altres exemples en la regeneració dels rèptils, com el cas de la cua i la mandíbula dels cocodrils o la closca d'algunes tortugues (Bellairs i Bryant, 1985).

Mamífers

Comparat amb altres vertebrats, la capacitat regenerativa de les estructures danyades en els mamífers és en general simplista i molt limitada, tot i així hi ha una contínua renovació de determinats teixits, gràcies a la presència d'unes cèl·lules mare multipotents. Cal tenir en compte però que normalment fa referència a una regeneració fisiològica més que reparativa.

Malgrat tot, s'han donat alguns casos com la regeneració de les puntes dels dígits dels ratolins en estadis fetals o neonatals, en el cas únicament que s'amputin distalment, amb la implicació de la via de senyalització BMP i l'expressió de *Msx1*, després d'observar que ratolins mutants *Msx1* presenten una expressió de BMP i una regeneració alterada (Han i altres, 2003).

Introducció

Continuant en el cas dels ratolins, s'ha vist també que és possible la regeneració del fetge, gràcies a la presència d'unes cèl·lules mare hepàtiques (Vessey, 2001) o del cor en ratolins acabats de néixer (Porrello i altres, 2011).

Per concloure aquest apartat, la taula 1 mostra un breu resum de la informació presentada prèviament sobre els principals organismes amb capacitats regeneratives, junt amb les tècniques i eines moleculars i genòmiques de les quals es disposa pel seu estudi.

Espècie	Capacitats regeneratives	"Microarray"	Transgènesi	"Knockout"/ "Knockdown"	Genoma Seqüenciat
Invertebrats					
<i>Hydra</i>	Tots els teixits i òrgans	No	Si	ARNi	No
Planària	Tots els teixits i òrgans	Si	No	ARNi	Si
Ascídia	Tots els teixits i òrgans	Si	Si	Morfolino	Si
Vertebrats					
Tritó	Extremitats, cua, cor, medul·la espinal, cristal·lí, retina	Si	Si	Morfolino	No
Axolot	Extremitats, cua, medul·la espinal	Si	Si	Morfolino	No
<i>Xenopus laevis</i>	Retina i, en el cas del capgròs, cua i extremitats	Si	Si	Morfolino	Si
Peix zebra	Aletes, cua, cor, medul·la espinal, línia lateral, retina, cèl·lules fol·liculars	Si	Si	Mutagènesi, Morfolino	Si
Pollet	cèl·lules fol·liculars interior oïda	Si	Si	Morfolino	Si
Ratolí	Fetge, marge dígit, sang, múscul, fetge, pàncrees, pell, cor	Si	Si	Mutagènesi, Recombinació homòloga	Si

Taula 1. Esquema dels organismes principals amb capacitat regenerativa i les tècniques moleculars i genòmiques que es poden utilitzar en cada un dels models per estudiar la seva regeneració (adaptat de Sánchez-Alvarado i Tsonis, 2006; Poss, 2010).

Capítol 2.

Les planàries, un model clàssic per estudiar la regeneració

2.1.- Les planàries

Les planàries d'aigua dolça s'han convertit en un bon model per estudiar el fenomen de la regeneració a nivell genètic i molecular, gràcies a la seva extraordinària capacitat de reconstruir qualsevol fragment danyat a conseqüència d'una amputació, des de qualsevol eix corporal i formar un nou organisme adult en un termini de temps molt curt (al voltant de 10-15 dies) (Saló i Baguñà, 2002; Reddien i Sánchez-Alvarado, 2004; Saló, 2006; Sánchez-Alvarado, 2006). Al mateix temps, durant l'estadi adult en l'absència d'una ferida, les planàries són capaces de reemplaçar les cèl·lules diferenciades dels teixits vells mitjançant una proliferació i diferenciació constant de les cèl·lules mare. Com succeeix en diversos cnidaris, anèl·lids, equinoderms i ascídies, aquesta capacitat regenerativa de les planàries es manté amb el temps (Nilsson-Sköld i Obst, 2011).

Pertanyen al quart fílum més gran del regne animal, després dels artròpodes, mol·luscs i cordats, els Plathelminths. El seu nom, compost per dues paraules gregues “platy” i “helminth” ja les descriu com uns cucs aplanats, que més tard s'han descrit com bilaterals, acelomats, amb una única

Introducció

obertura digestiva, sense aparell circulatori, respiratori ni esquelètic (Hyman, 1951).

Dins dels organismes bilaterals, els platihelminths formen part del superfílum *Spiralia* (=Lophotrochozoa), clade germà dels *Ecdysozoa*, on s'inclouen artròpodes (com *Drosophila melanogaster*) i nemàtodes (com *Caenorhabditis elegans*). Dins dels *Spiralia* es troben tots aquells organismes que comparteixen un ancestre comú amb una segmentació espiral durant el seu desenvolupament embrionari (Giribet i altres, 2000; Hejnol i altres, 2009). Tant els *Lophotrochozoa* com els *Ecdysozoa* formen part del tàxon dels Protòstoms. A diferència dels Deuteròstoms, on l'origen embrionari de la boca de l'adult és una neoformació, la dels Protòstoms prové del blastòpor embrionari (Figura 10).

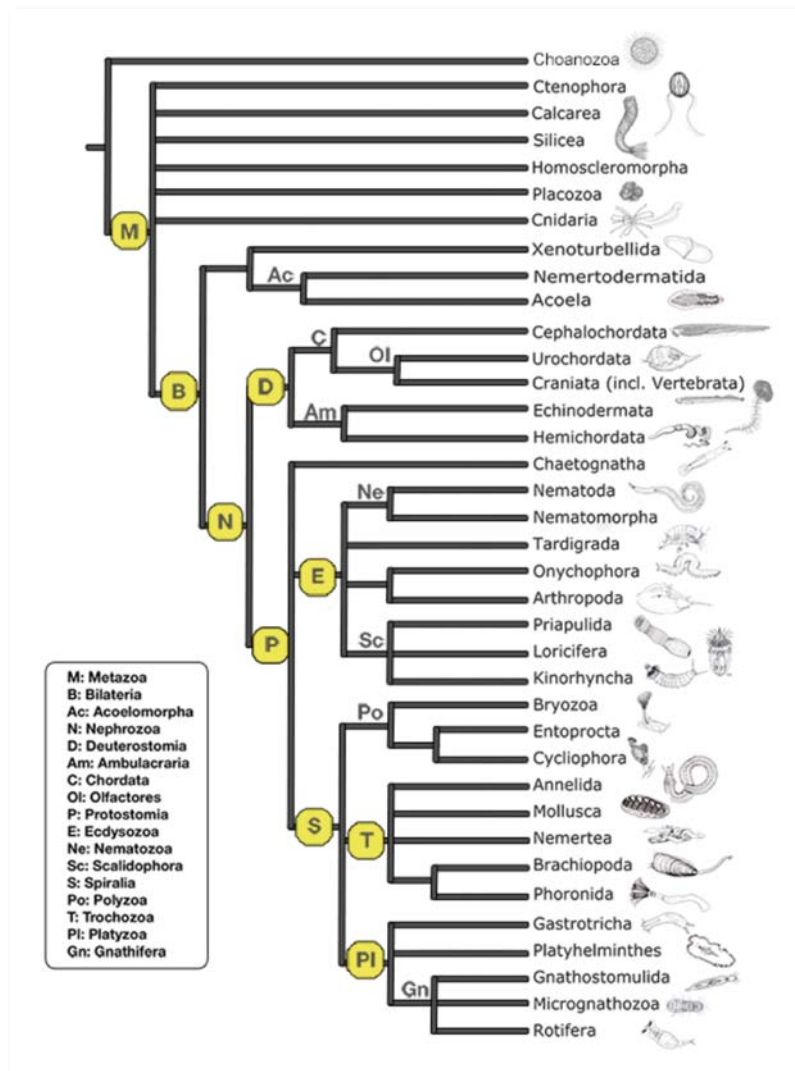


Figura 10. Relacions filogenètiques dintre dels Metazous. Les planàries formen part del superfílum *Spiralia*, el qual junt amb el superfílum *Ecdysozoa* constitueixen el tàxon dels Protòstoms (adaptat de Edgecombe, 2011)

Històricament, els Plathelminths s'han dividit en tres classes: turbel·laris, cestodes i trematodes. Els turbel·laris inclouen els grups *Acoelomorpha* i *Rhabditophora* i en aquest últim és on trobem les planàries, dins l'ordre *Tricladida*, on s'hi inclouen les espècies amb més capacitats regeneratives (Ruitort i altres, 2012). L'ordre *Tricladida* es divideix en tres subordres: *Maricola*, *Cavernicola* i *Continenticola*. La nostra espècie model *Schmidtea mediterranea* pertany a aquest últim subordre, dins la família *Dugesidae*, on s'inclouen també els gèneres *Dugesia* i *Girardia* (Carranza i altres, 1998).

L'estudi del fenomen regeneratiu en les planàries ha rebut un considerable interès per part de molts investigadors durant els últims 200 anys, començant amb els primers treballs descrits per Pallas al 1774 o els estudis de científics com Dalyell o Randolph, on ja presentaven l'habilitat fascinant d'aquests organismes de reemplaçar les estructures danyades després d'una amputació, el seu creixement/"decreixement" i la capacitat de fisionar-se o de canviar la seva estratègia reproductiva d'asexual a sexual i viceversa, depenent de les condicions (Brøndsted, 1969). Durant aquesta època la població de cèl·lules mare es van anomenar per primera vegada neoblasts (Randolph, 1897) i consideraven a les planàries com organismes immortals sota l'efecte de la ganiveta (Dalyell, 1814).

En el segle XX van aparèixer dos grans noms en el món de les planàries, Thomas H. Morgan i Charles M. Child. Les seves teories continuen avui dia sent un element bàsic per a la comprensió general del procés regeneratiu. Morgan es considera un científic pioner per introduir els conceptes d'epimorfosis i morfàl·laxis (veure apartat 1.3). A més a més, va detectar regions lliures de cèl·lules mare (davant els ulls i a la faringe) (Morgan, 1898), a la vegada que intentava esbrinar si les estructures durant la regeneració establien una polaritat específica, mitjançant l'anàlisi de diversos experiments d'amputació a diferents nivells. Va observar que amputacions transversals molt estretes causaven regeneració heteromòrfica i com a resultat obtenia fragments amb dos caps o amb dues cues (Figura 11; Morgan, 1900, 1904).

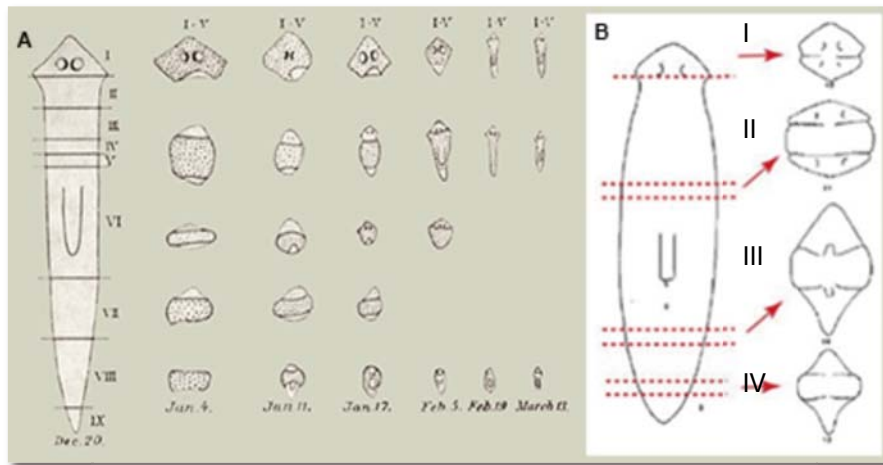


Figura 11. Il·lustracions del treball original de Morgan per demostrar la gran plasticitat de les planàries. (A) Restauració correcta de les proporcions dels fragments regenerants després d'una amputació. (B) Regeneració heteromòrfica que es dona en fragments amputats massa petit, formant planàries amb dos caps (I-II) o dos cues (III-IV) (adaptat de Morgan, 1904).

Child va aportar interpretacions naïve des d'un punt de vista més conservador, comparat amb Morgan. Va afegir el concepte d'un gradient fisiològic essencial durant la regeneració de les planàries, que era més accentuat en la regió anterior i decreixia posteriorment (Child, 1941). A més a més, va presentar els neoblasts com un element clau durant la regeneració del sistema nerviós de *Stenostomum*, un platihelminth catenulid (Child, 1903).

Durant aquesta època, van aparèixer hipòtesis contradictòries sobre el fenomen de la regeneració i l'origen dels neoblasts en motiu, en part, per l'aparició de noves tècniques que permetien un anàlisi experimental de l'organisme més elaborat. Hi havia científics que defensaven la hipòtesi que els neoblasts derivaven de cèl·lules mare embrionàries que tenien la capacitat de proliferar o d'autorenovar-se ("stemness"), altres suggerien que els neoblasts eren un *pool* de cèl·lules indiferenciades que derivaven de teixits diferenciats amb la capacitat de desdiferenciar/transdiferenciar (metaplàsia).

Nous experiments van demostrar que l'aplicació de la radiació en les planàries causava la mort dels neoblasts, induint la pèrdua de la capacitat regenerativa i finalment la mort de les planàries (Bardeen i Baetjer, 1904; Curtis i Hickman, 1925). Stéphan-Dubois i Wolff van anar més enllà, demostrant que després d'una irradiació local de la regió anterior i una posterior amputació, les planàries encara tenien la capacitat de regenerar un nou cap però més lentament, presentant una relació directa entre la regió irradiada i el temps

necessari per formar el blastema (Wolff & Stéphan-Dubois, 1948; Stéphan-Dubois & Wolff, 1947). Aquests experiments suggerien que els neoblasts que sobreviuen migraven cap a la ferida durant la regeneració, contradictòriament a la hipòtesi d'una desdiferenciació local dels teixits. A més a més, van observar que aquesta migració només s'estimulava després d'una amputació i els neoblasts no proliferaven durant la seva migració. Gràcies a aquests treballs es va poder començar a definir la funció dels neoblasts.

Amb l'objectiu d'entendre la connexió entre els neoblasts i la formació del blastema i amb els estadis posteriors (migració, diferenciació, establiment del patró), altres laboratoris van analitzar el patró mitòtic que presentaven aquestes cèl·lules mare amb capacitat de proliferació al llarg del temps durant el procés de la regeneració (Saló i Baguñà, 1984). Es van observar dos pics mitòtics clars: el primer a 4-12 hores i el segon a 2-4 dies (Baguñà, 1976a, b). Aquests resultats, junt amb la migració local dels neoblasts, van servir per reconsiderar i presentar el mecanisme regeneratiu de les planàries, descrites fins aleshores com un model típic de regeneració epimòrfica, com un model mixt que combina en realitat el mecanisme d'epimorfosis (on es diferencia un blastema), junt amb una regeneració per morfol·laxis (remodelatge dels teixits preexistents sense formació d'un blastema) (Saló i Baguñà, 1984).

Altres experiments clàssics en planàries, com la combinació dels trasplantaments i la irradiació, van servir per fer un pas endavant. Transplantaments realitzats entre diferents biotips de planàries van demostrar que la taxa de proliferació i la migració dels neoblasts eren el factor desencadenant per formar el blastema (Saló i Baguñà, 1985).

Paralelament, els mateixos autors van demostrar finalment que els neoblasts eren cèl·lules mare totipotents (Baguñà i altres, 1989a). La combinació d'experiments d'irradiació i trasplantaments (Baguñà i altres, 1989a) demostraven que un organisme irradiat era capaç de recuperar la seva activitat mitòtica i sobreviure si se li injectava una fracció cel·lular enriquida en neoblasts procedent d'un donador no irradiat. D'altra banda, quan se li injectava una població de cèl·lules diferenciades, l'organisme irradiat no era capaç de formar el blastema ni de recuperar-se (Figura 12).

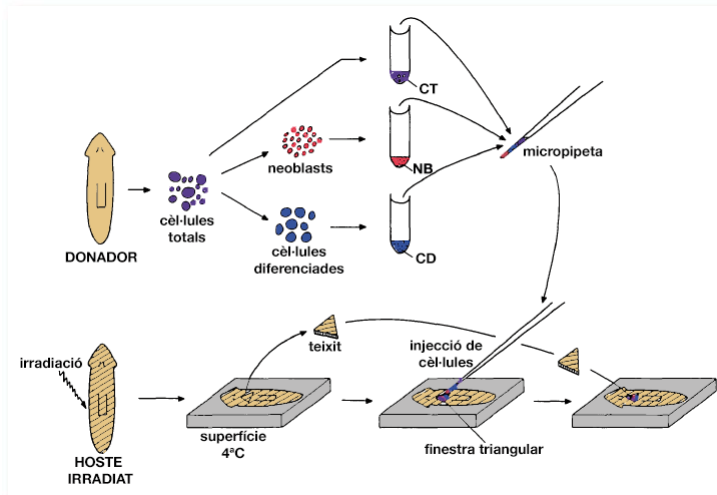


Figura 12. Recuperació d'una planària irradiada després de ser injectada amb una fracció cel·lular enriquida en neoblasts. Aïllament d'una fracció de cèl·lules total (CT), una fracció enriquida de neoblasts (NB) i una fracció enriquida de cèl·lules diferenciades procedents d'una planària no irradiada donadora per ser injectada al parènquima d'una planària hoste irradiada (adaptat de Baguñà i altres, 1989a).

Malgrat que aquests treballs van definir els neoblasts com una població de cèl·lules mare totipotents, no es coneixia el que succeïa en els neoblasts de forma individualitzada, fins que estudis recents han desvetllat el misteri. S'ha observat que una única cèl·lula mare pot donar lloc a tots els tipus cel·lulars (neuronal, intestinal o altres tipus cel·lulars postmitòtics), afirmant que almenys una part dels neoblasts individuals es poden considerar pluripotents (Wagner i altres, 2011). Aquest laboratori ha demostrat que la injecció d'un únic neoblast, anomenat neoblast clonogènic (cNeoblast) per la seva capacitat a formar colònies cel·lulars, en una planària hoste prèviament irradiada, és capaç d'impedir la mortalitat d'aquest organisme al diferenciar tots els tipus cel·lulars, restaurant la homeòstasi i recuperant la habilitat regenerativa (Wagner i altres, 2011).

Gràcies a l'avenç en diferents tècniques moleculars aquestes últimes dècades, les planàries s'han convertit en un organisme model ideal en l'estudi genètic de la regeneració. Per exemple, experiments d'ARN d'interferència (ARNi) han permès inhibir satisfactòriament l'expressió de determinats gens, introduint l'ARN de doble cadena del gen d'interès a silenciar a través de l'aliment (Newmark i altres, 2003), per injecció (Sánchez-Alvarado i Newmark, 1999) o per incubació en el medi (Orii i altres, 2003). Mitjançant aquesta eina s'han pogut identificar i caracteritzar funcionalment centenars de gens implicats específicament en el fenomen de la regeneració i la biologia de les cèl·lules mare i s'ha demostrat que la majoria estan conservats en l'espècie humana.

A més a més, la possibilitat de marcar l'expressió gènica mitjançant hibridacions *in situ* ha sigut determinant (Umesono i altres, 1997; Pearson i altres, 2009). Altres tècniques han sigut alhora indispensables, com el marcatge dels neoblasts mitjançant BrdU, immunotincions amb l'anticòs de l'histona 3 fosforilada (PH3) o citometria de flux pel seu aïllament (Hayashi i altres, 2006) i l'anàlisi de la seva diferenciació (Newmark i Sánchez-Alvarado, 2000; Guo i altres, 2006; Reddien i altres, 2005; Eisenhoffer i altres, 2008; Scimone i altres, 2010; Wenemoser i Reddien, 2010).

Junt amb aquesta sèrie de tècniques moleculars, cal afegir la disponibilitat del genoma seqüenciat de *Schmidtea mediterranea*, accessible gràcies al treball del Centre de Seqüenciació Genòmica de la Universitat de Washington (http://genome.wustl.edu/genomes/view/schmidtea_mediterranea i <http://smedgd.neuro.utah.edu/index>) així com la generació de diverses bases de dades de diferents transcriptomes, que han ajudat notablement a la identificació i caracterització de nombrosos fenotips (Sánchez-Alvarado i altres, 2002; Mineta i altres, 2003; Nakazawa i altres, 2003; Zayas i altres, 2005; Abril i altres, 2010; Blythe i altres, 2010; Adamidi i altres, 2011).

2.2.- *Schmidtea mediterranea*, una espècie model

Existeixen centenars d'espècies de planàries diferents en el nostre entorn, però només algunes han estat caracteritzades en rigorós detall, entre les quals trobem tres espècies amb extraordinàries capacitats regeneratives, *Schmidtea mediterranea* (*S. mediterranea*), *Dugesia japonica* (*D. japonica*) i *Girardia tigrina* (*G. tigrina*). Altres espècies model de planàries inclouen *Schmidtea polychroa* (*S. polychroa*), utilitzada com a model per estudiar la embriogènesi degut a la seva alta fecunditat (Martín-Durán i altres, 2012) i *Dugesia ryukyuensis* (*D. ryukyuensis*), estudiada com a model al poder intercanviar els modes de reproducció sexual a asexual (Ishizuka i altres, 2007).

S. mediterranea s'ha convertit en una particular espècie per estudiar la biologia cel·lular de les cèl·lules mare, la regeneració i la regulació de les proporcions corporals, gràcies a una sèrie de propietats que la converteixen en un sistema model excel·lent:

Introducció

- El manteniment de les planàries en els laboratoris arreu del món és en general simple i de baix cost, així s'ha aconseguit establir una línia clonal procedent d'un únic individu salvatge.
- En presentar els dos biotips sexual i asexual, permet l'estudi i la comparació dels dos tipus de reproducció, al mateix temps que la embriogènesi i la regeneració.
- És un organisme diploide amb quatre parells de cromosomes i un genoma relativament petit, una tercera part del genoma humà, que facilita i fa accessible la seva seqüenciació (Newmark i Sánchez-Alvarado, 2002). D'altra banda, s'ha demostrat que aproximadament el 80% dels 20.000 gens de planàries anotats tenen ortòlegs en els humans. (Friedländer i altres, 2009).
- Presenten una robusta capacitat regenerativa gràcies a la presència dels neoblasts. Aquesta població cel·lular representa el 25% del número total de cèl·lules en l'organisme adult, des d'un punt de vista morfològic, i són les úniques amb capacitat de dividir-se. Li aporten una elevada plasticitat ja que permeten augmentar la mida de l'organisme incrementant el número de cèl·lules, o de reduir-lo, eliminant-ne, depenent de la disponibilitat de nutrients i de les condicions ambientals, de manera que poden regular les proporcions corporals i mantenir la mida dels diferents òrgans durant el desenvolupament (Figura 13; Handberg-Thorsager i altres, 2008). Estudis clàssics demostren que el número total de cèl·lules augmenta de forma lineal amb la mida del cos. En situacions oposades, el decreixement de l'organisme implica una reducció en la llargada del cos, a conseqüència d'una disminució del número de cèl·lules i no a causa d'una reducció de la mida d'aquestes (Baguñà i Romero, 1981; Romero i Baguñà, 1991).

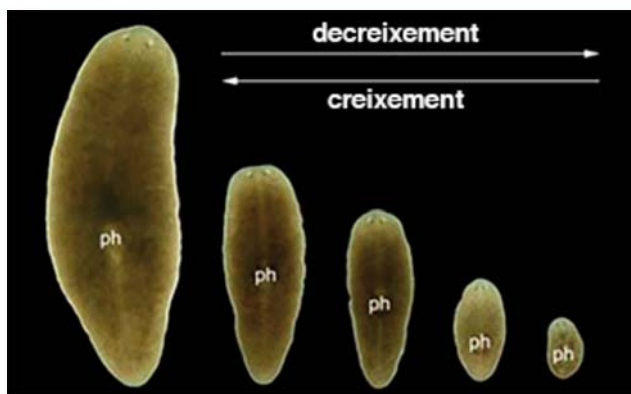


Figura 13. Creixement i decreixement de les planàries.

La capacitat que presenten les planàries a l'hora de restaurar les seves proporcions depenent de la disponibilitat de nutrients fa augmentar la seva supervivència davant determinades situacions adverses (adaptat de Handberg-Thorsager i altres, 2008).

En conclusió, les planàries poden variar les dimensions del seu cos depenent de la disponibilitat d'aliments, restaurar les proporcions originals durant la regeneració i decreïxer sota condicions de dejú per evitar la seva mort, sempre i quan es mantingui una ràtio constant de diferents tipus cel·lulars. Això és possible gràcies a la coordinació de la divisió cel·lular dels neoblasts amb una determinada mort cel·lular de les cèl·lules diferenciades.

Malgrat ser un model amb alguns punts febles, com la incapacitat de generar animals transgènics o la indisponibilitat de mantenir les cèl·lules mare en cultius, l'espècie *S. mediterranea* s'ha convertit en un sistema experimental prometedor per identificar els factors reguladors de la regionalització corporal dels metazous i estudiar en detall els factors que guien el manteniment i la regeneració dels teixits adults.

2.3.- Anatomia general

2.3.1.- Epidermis

L'epidermis de les planàries és multiciliada i forma una capa monoestratificada (Figura 14). En planàries adultes, les cèl·lules epidèrmiques estan estructuralment polaritzades: presenten cilis i microvilli a la superfície apical, unions intercel·lulars a la lateral i apareixen hemidesmosomes a la superfície basal. A la regió apical, juntament amb les vesícules del reticle endoplasmàtic llis i els mitocondris, apareixen també unes cèl·lules anomenades rabdits, capaces de secretar substàncies mucoses amb un funció protectora i immunitària, que intervenen també durant la locomoció de l'animal (Hori 1989).

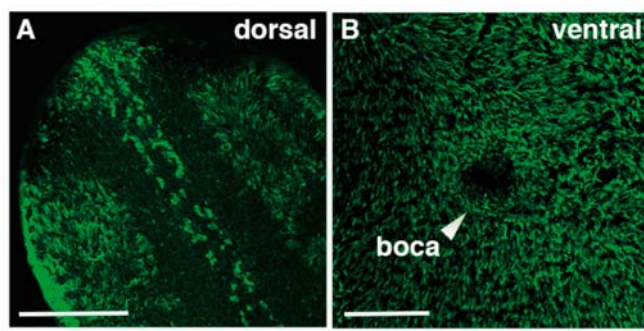


Figura 14. Distribució dels cilis mitjançant la immunotinció de l'anticòs α -tubulina (AA4.3). Els cilis es concentren dorsalment (A) a la línia mitja i en els dos laterals, mentre que en la regió ventral es localitzen de forma homogènia, amb l'excepció de l'orifici de la boca (B). Barra d'escala: A, 300 μ m i B, 100 μ m.

2.3.2.- Parènquima

El parènquima és el teixit conjuntiu existent entre els òrgans interns i la paret corporal, format per diversos tipus cel·lulars, entre els quals hi trobem cèl·lules **cromatòfores** responsables del pigment de les planàries, **secretores** i les úniques cèl·lules amb capacitat de proliferació, les cèl·lules mare anomenades **neoblasts**.

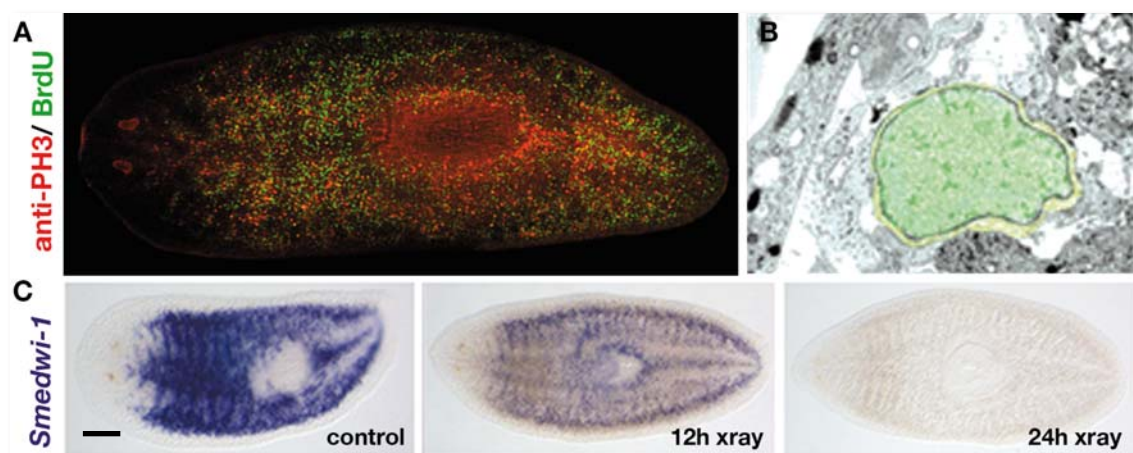
Les cèl·lules secretores es poden dividir en dos grans tipus: acidofíliques i cianofíliques. Les acidofíliques són cèl·lules arrodonides amb una gran quantitat de grànuls de secreció en el seu interior, que es troben al llarg del parènquima formant agrupacions cel·lulars adhesives marginals subepidèrmiques. Les cianofíliques són cèl·lules arrodonides que es troben generalment en el parènquima ventral, en regions subepidèrmiques, formant agrupacions cel·lulars amb prolongacions que es dirigeixen cap a l'exterior, amb l'objectiu d'alliberar els grànuls de secreció. Tot i que la composició química específica de les cèl·lules glandulars no ha sigut completament descrita, se sap que el mucus format a través d'aquest tipus cel·lular té un paper determinant durant l'adherència al substrat, la locomoció, la defensa i la captura de la presa (Hyman, 1951; Pedersen, 1963). Les cèl·lules secretores s'han pogut descriure en detall gràcies a marcadors específics, com les lectines (Zayas i altres, 2010).

Els neoblasts es caracteritzen per la seva mida petita (7-12 µm) i per presentar un nucli notablement més gran en relació al seu citoplasma, amb pocs orgànuls cel·lulars, bàsicament ribosomes i mitocondris. Un tret representatiu dels neoblasts és la presència de cossos cromatoides, uns grànuls amb complexos ribonucleoproteics (Coward, 1974; Hay i Coward, 1975; Hori, 1982; Morita i altres, 1969). Aquests cossos cromatoides presenten múltiples reguladors post-transcripcionals, com per exemple l'helicasa d'ARN amb motius "DEAD-box" anomenada *CBC-1* ("CB component-1/Me31b/Dhh1/DDX6") (Yoshida-Kashikawa i altres, 2007), l'snRNP (partícules ribonucleoproteiques nuclears petites) *SmB* (Fernandez-Taboada i altres, 2010), l'homòleg de *Tudor* (*Spoltud-1*) (Solana i altres, 2009) o *PRMT5* (protein arginine methyltransferase) (Rouhana i altres, 2012), els quals s'ha vist que són

imprescindibles durant la regeneració de les planàries, de manera que el seu silenciament afecta la mida de l'animal, el nombre de neoblasts o disminueix el nombre de cossos cromatoides (Rouhana i altres, 2012; Fernandez-Taboada i altres, 2010; Rouhana i altres, 2010; Solana i altres, 2009).

Els neoblasts es distribueixen al llarg de tot el parènquima, amb excepció de la faringe i de la regió anterior als ulls. Tot i així, al presentar-se com les úniques cèl·lules amb capacitat de divisió (Baguñá, 1976a, b; Newmark i Sánchez-Alvarado, 2000; Newmark i Sánchez-Alvarado, 2002), es poden definir com l'exclusiva font cel·lular de les planàries capaç d'aportar noves cèl·lules mare i diferenciades durant el creixement, la regeneració i l'homeòstasi.

Experimentalment, l'estudi dels neoblasts és possible gràcies a diferents marcadors, com per exemple *Smedwi-1* (Reddien i altres, 2005) que mostra el seu patró típic al llarg de tot el parènquima amb excepció de la faringe i la regió anterior davant dels ulls. A través d'immunotincions, l'anticòs contra la histona 3 fosforilada (PH3) permet marcar aquestes cèl·lules en mitosi. Els neoblasts es poden marcar també mitjançant BrdU (Newmark i Sánchez-Alvarado, 2000), un anàleg a la timidina que s'incorpora a l'ADN durant el cicle cel·lular, exactament en la fase S o aïllar per citometria de flux (Asami i altres, 2002; Hayashi i altres, 2006). En ser les úniques cèl·lules amb capacitat de proliferació, un altre mètode extensament utilitzat en planàries per analitzar la funcionalitat dels neoblasts en detall és mitjançant la irradiació (Figura 15), que permet analitzar les conseqüències de la seva eliminació (Wolff i Stéphan-Dubois, 1948).



Introducció

Figura 15. Distribució dels neoblasts (A) Projecció confocal d'una planària fixada 8 hores després d'un pols de bromodeoxyuridina (BrdU) i marcada per detectar BrdU (en verd) i immunotinció contra la histona 3 fosforilada (PH3) (en vermell). Regió anterior a l'esquerra. (B) Microscòpia electrònica d'un neoblast, pseudocolor marcant en verd el nucli i en groc el citoplasma. (A-B adaptat de Newmark i Sánchez-Alvarado, 2002) (C) Eliminació dels neoblasts mitjançant la irradiació dels animals i la seva posterior identificació a través del gen *Smedwi-1*, 12 i 24 hores (h) després, comparats amb els organismes control. Barra d'escala: 300µm.

2.3.3.- Musculatura

Sota l'epidermis, es troben diverses fibres musculars distribuïdes, des de la capa més externa a la més interna, formant una capa circular, una longitudinal externa, una obliqua i finalment una longitudinal interna, al llarg de tot el cos (Figura 16; Cebrià i altres, 1997). A més a més, les planàries presenten una distribució de les fibres musculars específica a la faringe, al voltant del digestiu i, en el cas de les sexuades, a l'aparell copulador. Aquest sistema muscular que travessa el parènquima i les fibres musculars dorso-ventrals compensen l'absència d'un sistema esquelètic i fa de suport a altres tipus cel·lulars.

Cal afegir el seu paper durant la regeneració, en permetre el tancament de la ferida poc després de l'amputació, mitjançant una forta contracció de les seves fibres (Chandebois, 1980). D'altra banda, estudis recents han demostrat una doble funció de les cèl·lules musculars durant la regeneració. En la capa subepidèrmica muscular s'expressen una sèrie de gens anomenats PCG (position control genes), "upregulated" després d'una ferida i fins i tot sense la presència dels neoblasts; s'ha suggerit que aquestes cèl·lules musculars presentarien una funció instructiva durant la regeneració, de manera que després d'una amputació, els neoblasts pluripotents s'encarreguen de regenerar qualsevol tipus cel·lular mentre que les cèl·lules musculars proporcionen instruccions posicionals per la correcta regeneració de qualsevol regió corporal (Witchley i altres, 2013).

En planàries, s'han identificat dos tipus diferents de miosines musculars anomenades MHC-A i B (Kobayashi i altres, 1998). Les dues són del tipus estriat però es creu que estan implicades en funcions diverses, degut a la seva distribució diferenciada: per exemple, en el cas de la planària *Dugesia japonica*, MHC-A s'expressa bàsicament en la faringe i al voltant del digestiu i

MHC-B es distribueix més generalment en la paret corporal (Orii 2002; Cebrià i altres, 1999). Succeeix el mateix a *S. mediterranea* (Cebrià, 2000).

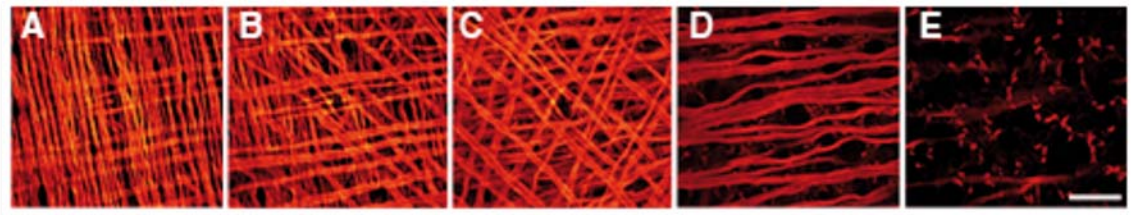


Figura 16. Distribució de la musculatura de les planàries. Des de la capa més externa a la més interna es localitzen fibres musculars: A) circulars, B) longitudinals externes, C) diagonals, D) longitudinals internes i E) dorsoventrals. Barra d'escala: 20µm (adaptat de Cebrià i altres, 1997).

2.3.4.- Sistema digestiu

El sistema digestiu de les planàries és cec, és a dir, manca d'anús, característica que els obliga a ingerir els aliments i expulsar els residus de la digestió a través del mateix orifici, una boca ventral situada en la regió central.

Les planàries, com a Triclad, presenten un sistema digestiu format per una branca anterior i dues branques posteriors, on a la vegada totes es poden dividir formant unes ramificacions secundàries, terciàries i fins i tot quaternàries (Figura 17), amb la finalitat de distribuir i fer arribar els nutrients a la resta dels teixits (Hyman, 1951; Forsthoefel i altres, 2011).

Les cèl·lules epitelials de l'intestí, o gastrodermis, estan organitzades en una única capa columnar envoltada per una làmina basal i fibres musculars (Bueno i altres, 1997; Orii i altres, 2002), a més a més d'un plexe nerviós (Baguñà i Ballester, 1978). Estudis histològics han demostrat la presència únicament de dos tipus cel·lulars: els fagòcits, amb una gran capacitat d'absorció que s'encarreguen d'engolir les partícules alimentàries, i les cèl·lules "goblet" secretores, que alliberen enzims digestius a l'interior del lumen (Hyman, 1951; Forsthoefel i altres, 2011).

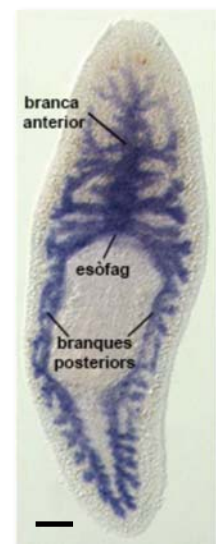


Figura 17. Sistema digestiu de les planàries. Hibridació *in situ* del marcador específic del sistema digestiu *Smed-pk1*, que demostra clarament la divisió de l'intestí en una branca anterior i dues posteriors. Barra d'escala: 300µm.

Introducció

El punt d'unificació de les tres branques digestives es coneix amb el nom d'esòfag (Figura 17) i constitueix a la vegada el lloc d'unió del sistema digestiu amb la faringe, on es connecten els lúmens respectius.

La faringe és un òrgan muscular i cilíndric, situat a la regió central del cos de la planària, on pot romandre en un estat relaxat a l'interior de la cavitat faríngea (Hyman, 1951). És capaç d'evaginar-se mitjançant un moviment muscular i emergir a l'exterior ventralment, a través de la boca. Entre l'epiteli protector extern de la faringe i l'intern del lumen faríngic es troben diferents teixits: una xarxa muscular, adjacent a la làmina basal, que fa una funció de suport i distribuïda de forma longitudinal, circular i transversal, una xarxa nerviosa en forma d'anell constituïda per un plexe subepitelial i un submuscular i, finalment, un conjunt de cèl·lules secretores distribuïdes al llarg del parènquima de la faringe que li aporten la seva funcionalitat (Bueno i altres, 1997).

2.3.5.- Sistema nerviós

El sistema nerviós central (SNC) està compost per un cervell situat a la regió anterior, connectat amb un parell de cordons ventrals nerviosos (CVN), que travessen l'eix antero-posterior i estan interconnectats per unes comissures transversals (Figura 18A). El cervell està constituït per uns ganglis cefàlics bilobulats connectats normalment per una simple comissura anterior. Es pot dividir estructuralment en una regió central esponjosa anomenada neuropil i diverses branques laterals que es projecten cap a la regió perifèrica del cap (Agata i altres, 1998; Cebrià i altres, 2002a).

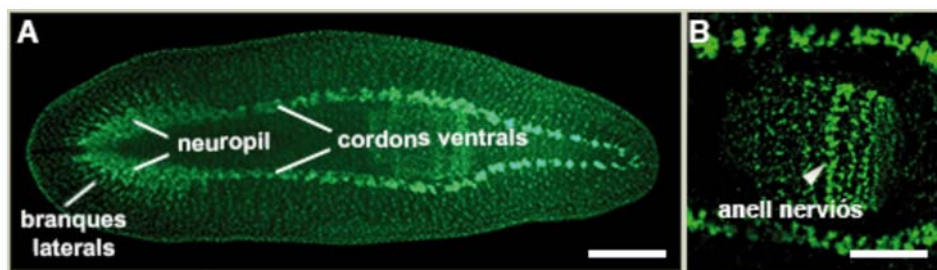


Figura 18. Estructura del sistema nerviós. Immunotinció de l'anticòs anti-SYNORF-1, que mostra: A) SNC, format per les branques laterals i el neuropil dels ganglis cefàlics bilobulats, connectats amb els cordons ventrals nerviosos. B) Detall del plexe faríngic, el qual es distribueix formant uns anells nerviosos. Barra d'escala: A, 300 μm i B, 100 μm .

El sistema nerviós perifèric (SNP) està format per diversos plexes nerviosos, on s'inclouen el plexe subepitelial, muscular, intestinal i faríngic (intern i extern, Figura 18B).

Tot i que morfològicament el sistema nerviós aparenta ser senzill, s'ha demostrat que, contràriament, presenta una complexitat molecular, cel·lular i genètica (Umesono i altres, 1997, 1999; Cebrià, 2008; Cebrià i altres, 2002b; Collins i altres, 2010).

Després d'una amputació, les planàries són capaces de reconstruir un nou cervell íntegre i al mateix temps permetre el creixement dels CVN truncats en pocs dies (Reuter i altres, 1996). Més recentment, s'ha proposat que la diferenciació del primordi dels nous ganglis cefàlics sorgeix un dia després de l'amputació en el blastema, abans que apareguin axons emergint dels CVN truncats (Cebrià i altres, 2002a; Agata i Umesono, 2008). A continuació, noves fibres nervioses brotaran d'aquests CVN per entrar al blastema i reconnectar-se amb el cervell. Tot i així, la manca de marcadors específics dels CVN ha dificultat la comprensió de la dinàmica temporal i espacial de la reconstrucció d'aquestes estructures, connectades entre si, durant la regeneració del sistema nerviós.

2.3.6.- Òrgans sensorials

El sistema sensorial es troba essencialment a la regió cefàlica, constituït per diversos tipus d'òrgans (reorreceptors, fotoreceptors, mecanorreceptors i quimiorreceptors) que s'encarreguen d'enviar projeccions axonals als ganglis cefàlics (Hyman 1951; Rieger i altres, 1991). La majoria d'espècies de planàries presenten un sistema visual format únicament per un parell d'ulls, localitzats anteriorment i a la part dorsal, que resten connectats al cervell, via axonal (Agata i altres, 1998). Els ulls estan compostos per dos tipus cel·lulars: les cèl·lules **pigmentàries** i les cèl·lules **fotoreceptores** rabdomèriques (Figura 19). El fet de presentar exclusivament dos tipus de cèl·lules, fa que es consideri un dels ulls de tipus rabdomèric més senzill (Saló i Batistoni, 2008):

- Les cèl·lules fotoreceptores (CF) són neurones bipolars amb extremitats dendrítiques i una estructura rabdomèrica que envia projeccions cap a les

Introducció

cèl·lules pigmentàries. Gràcies a la disponibilitat d'un anticòs específic de les cèl·lules visuals (anticòs monoclonal contra l'arrestina, anomenat VC-1, Sakai i altres, 2000) i mitjançant la tinció de les projeccions neuronals per tal de conèixer el seu traçat a través de la injecció fluorescent Dil, s'ha vist que alguns axons entren en contacte directe amb l'ull oposat, mentre que d'altres projecten connexions sensorials cap al cervell, formant un **quiasme òptic** (Okamoto i altres, 2005). Recentment, se sap que podrien existir com a mínim tres poblacions neuronals molecularment i anatòmica diferents en les cèl·lules fotoreceptores de les planàries: una subpoblació anterior, una posterior dorsal i una posterior ventral (Collins i altres, 2010; González-Sastre i altres, 2012). En aquests estudis s'ha demostrat un patró de les cèl·lules fotoreceptores al llarg de l'eix anteroposterior i dorsoventral, al veure que els gens que codifiquen per les prohormones *npp-12* i *eye53-1* només s'expressen en les neurones fotoreceptores anteriors, mentre que *mpl-2* i *eye53-2* s'expressen exclusivament en les neurones posteriors i, finalment, s'ha observat expressió de *mpl-2* en una subpoblació ventral de cèl·lules, que no co-expressen amb *eye53-2*.

- Les cèl·lules pigmentàries (CP), fàcilment visibles com dos punts negres a la regió antero-dorsal, constitueixen una estructura en forma de copa, que protegeixen a les cèl·lules fotoreceptores (Okamoto i altres, 2005).

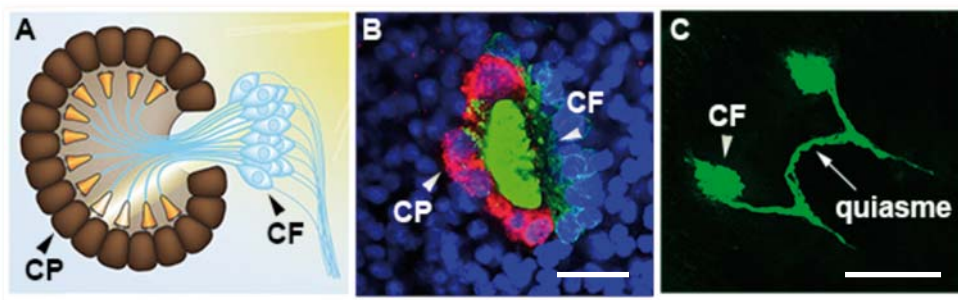


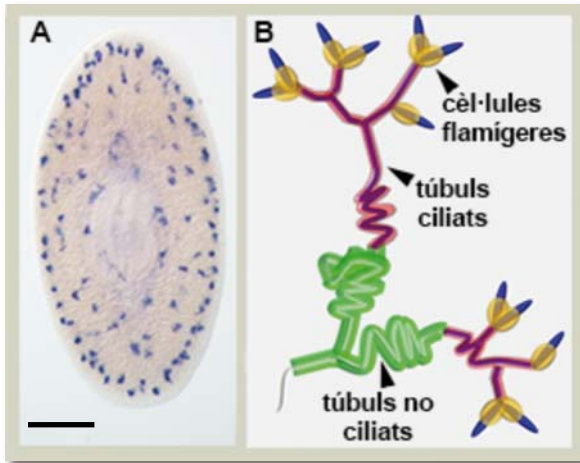
Figura 19. Estructura del sistema visual. A) L'ull està format per dos tipus cel·lulars, les cèl·lules pigmentàries (CP) i les fotoreceptores (CF) (adaptat de Lapan i Reddien, 2011). B) Detall de les CP, expressades a través del gen *Smed-tpH* (en vermell) i les CF, mitjançant la immunotinció de l'anticòs VC1 (en verd). C) Disposició del quiasme a través de la immunotinció de l'anticòs VC1. Barra d'escala: B, 30 µm i C, 400 µm.

La regeneració dels ulls en planàries ha sigut estudiada en detall. En general, la regeneració de l'ull es divideix en tres passos: el primer pas es caracteritza per la formació de les cèl·lules visuals amb una simetria bilateral en la regió dorsal i anterior del blastema, a dos dies de la regeneració. El segon pas implica la projecció contralateral d'axons, paral·lels a la regió antero-distal dels ganglis cefàlics, a partir del segon dia. Finalment, en el tercer pas es defineixen els axons que es projecten posteriorment cap al cervell. (Pineda i altres, 2000 i 2002; Saló i altres, 2002; Inoue i altres, 2004; Saló i Batistoni, 2008).

Tot i així, l'origen de les cèl·lules pigmentàries i fotoreceptores encara és incert. S'ha suggerit que, a l'espècie *D. japonica*, ambdues cèl·lules podrien diferenciar-se a partir d'un precursor comú (Takeda i altres, 2009). Estudis recents han descrit en *S. mediterranea* un gen en particular, *ovo*, que s'expressa en estadis inicials de la regeneració del cap (a partir del segon dia després de l'amputació), prèviament a la formació del primordi de l'ull, en una població de cèl·lules progenitores d'aquesta estructura. S'ha vist que *ovo* és imprescindible per la regeneració de totes les cèl·lules de l'ull, per la seva correcta diferenciació general (Lapan i Reddien, 2012). Altres treballs dels mateixos autors han descrit també els gens *dlx* i *sp6-9* que controlen la regeneració del sistema òptic, ja que el seu silenciament impedeix la regeneració de les cèl·lules progenitores dels ulls (Lapan i Reddien, 2011).

2.3.7.- Sistema excretor

El sistema excretor consta d'unes cèl·lules especialitzades del tipus protonefrídic, distribuïdes per tot el parènquima (Figura 20a), sota l'epidermis i connectades amb l'exterior mitjançant nefroporus, tant en la regió dorsal com ventral. Els protonefridis es caracteritzen per ser cossos cel·lulars amb un canal tubular principal, que es ramifica en branques secundàries més estretes, finalitzades amb una cèl·lula flamígera (Figura 20b; Hyman, 1951; Pedersen, 1963; McKanna, 1968a, b).



2.3.8- Sistema reproductor

La majoria de planàries són hermafrodites. Depenent de l'espècie, presentaran una reproducció sexual o exclusivament asexual, malgrat que en determinades condicions ambientals alguns casos poden adquirir la capacitat de reproduir-se sexualment. En les circumstàncies que presentin únicament una reproducció asexual, la propagació es dona per fissió transversal, on la planària perd posteriorment un petit fragment de la cua, a través del qual en podrà sorgir un nou individu adult en pocs dies (Figura 21; Cebrià i altres, 2011). En el cas de *S. mediterranea* es poden donar els dos biotips, sexual i asexual, malgrat que els nostres experiments han estat centrats exclusivament en l'asexual (Benazzi i altres, 1975).



Figura 21. Fissió transversal de la planària asexual *S. mediterranea*. Adquirida un certa mida o depenent de les condicions ambientals, la planària és capaç de fissionar-se, perdent la seva cua a l'estrènyer el seu cos fins trencar-se en dos fragments, els quals regeneraran i formaran les estructures que els hi falten en pocs dies (adaptat de Cebrià i altres, 2011).

El sistema reproductor està format per les gònades masculines i femenines, testicles i ovaris respectivament, i un aparell copulador (Figura 22; Chong i altres, 2011). Tots els components, incloses les cèl·lules germinals, deriven de les cèl·lules mare o neoblasts (Wang i altres, 2007):

- La gònada femenina es caracteritza per ser heterocel·lular, és a dir, els gàmetes femenins i els nutrients vitel·lins procedeixen de diferents òrgans, els ovaris i les glàndules vitel·lines. En la majoria dels casos, els ovaris apareixen bilateralment a la regió anterior, per darrere del cervell. Els oviductes presenten una estructura allargada anomenada tuba on hi va a parar l'esperma.
- D'altra banda, els testicles són nombrosos i es distribueixen al llarg de tot l'eix corporal, de forma bilateral.
- L'aparell copulador se situa a continuació de la faringe, posteriorment i entra en contacte amb l'exterior a través d'una única obertura anomenada gonopor.

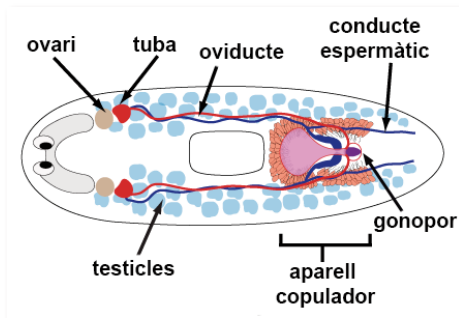


Figura 22. Sistema reproductor d'una planària sexual (adaptat de Chong i altres, 2011).

Una vegada ha tingut lloc la fecundació, els embrions es desenvolupen a l'interior d'unes estructures opaques anomenades "cocoons". Passades dos o tres setmanes, la cobertura externa d'aquest "cocoon" es trencarà i entre dues i sis noves planàries emergiran del seu interior (Martín-Durán i altres, 2008).

2.4.- La regeneració de les planàries

El procés regeneratiu es desenvolupa en qualsevol tipus d'amputació, independentment de l'eix corporal, tant antero-posterior com dorso-ventral. Així, després d'una secció transversal, la ferida anterior regenerarà un nou cap, mentre que la ferida posterior formarà una nova cua. Aquest fet indica que el teixit romanent manté la polaritat i coneix quines estructures s'han de construir *de novo*. D'altra banda, en una amputació longitudinal, el teixit romanent serà capaç de formar l'altra meitat del cos (regeneració lateral). A més a més, quan dos fragments distals procedents d'una secció transversal són empeltats entre ells, seran capaços de produir equitativament un blastema intercalant i formar la regió que manca (Figura 23; Saló i Baguñà, 1985; Handberg-Thorsager i altres, 2008).

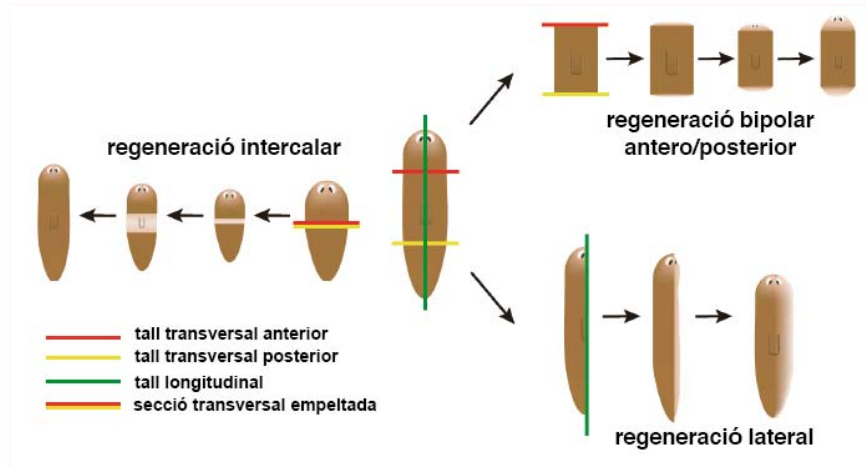


Figura 23. Tipus de regeneració de les planàries. Després d'una amputació des de qualsevol eix, les planàries són capaces de formar un blastema i regenerar les estructures que falten, tal i com mostra l'esquema, després d'un tall transversal (regeneració bipolar), longitudinal (regeneració lateral) o fins i tot empeltant els fragments resultat d'un tall, en aquest cas transversal (regeneració intercalar) (adaptat de Handberg-Thorsager i altres, 2008).

En general, el fenomen de la regeneració en les planàries es desencadena sempre a partir de quatre processos claus: el tancament de la ferida, la formació del blastema, la determinació i la diferenciació de les noves estructures i, finalment, el restabliment de la polaritat.

2.4.1.- Tancament de la ferida

Durant l'inici del procés de la regeneració, el principal objectiu és reduir la superfície de la ferida, així la primera resposta implica la contracció de la musculatura adjacent a la regió de l'amputació (Chandebois, 1980; Cebrià i altres, 1997). A més a més, aquesta ferida es recobrirà d'una capa mucosa protectora i amb una possible funció immunològica, sintetitzada per les cèl·lules secretores (Reisinger i Kelbetz, 1964).

A continuació, les cèl·lules epidèrmiques perdran la seva morfologia característica i s'estendran tan dorsalment com ventral per facilitar el tancament de la ferida, en tan sols 30 minuts. Aquesta extensió de les cèl·lules implica un contacte ectòpic d'ambdues epidermis ventral i dorsal i es creu que podria ser un dels factors desencadenants de la formació a la regió de la ferida del teixit despigmentat on es diferenciarien els nous teixits i estructures, anomenat blastema (Chandebois, 1980; Sánchez-Alvarado i Newmark, 1998; Kato i altres, 2001), com s'explicarà en més detall en el següent apartat. En

vertebrats s'ha demostrat que el contacte continu de l'epiteli amb el parènquima adjacent és imprescindible per la regeneració (Goss, 1956) però, en el cas de les planàries, hi ha poques evidències que demostrin que aquesta interacció sigui l'estímul responsable per iniciar la formació del blastema i el seu origen és encara incert (Baguñà i altres, 1989a).

La resposta davant d'una ferida ha de ser ràpida i en planàries el programa que controla aquesta fase inicial es desencadena poques hores després de l'amputació. Durant aquest procés d'iniciació de la regeneració, s'activen tota una sèrie de gens induïts al formar-se la ferida, que es classifiquen en dos grans grups: els que s'expressen en teixits diferenciats, on s'hi troben els gens W1, W2, W3, i els que s'indueixen en els neoblasts, grup format exclusivament pels gens W4 (Wenemoser i altres, 2012).

Els gens W1 s'indueixen entre 30 minuts i 1 hora després de l'amputació, adquirint un màxim de la seva expressió a les 3 hores de la ferida i són homòlegs al gens primerencs immediats (IEG) d'altres organismes. Dins aquest grup s'hi troben aquells gens que codifiquen per diferents factors de transcripció, per exemple, *egr-2*, *egr-3*, *jun-1*, *fos-1*.

D'altra banda, els gens W2 s'indueixen entre 3-12 hores després de l'amputació i s'expressen majoritàriament a la subepidermis de la ferida, per exemple *wnt-1*, *follistatin*, *nogging-like1* o *ADAM*.

A continuació, entre 6-12 hores s'indueix l'activació dels gens W3, situats a l'epidermis més allunyada de la ferida, per exemple *hadrian*.

Finalment es troben els gens W4, els quals s'activen passades 3 hores l'amputació i es diferencien de la resta perquè requereixen la presència dels neoblasts per la seva inducció, on hi trobem el gen *runt-1* (Wenemoser i altres, 2012).

2.4.2.- Formació del blastema. Proliferació *versus* mort cel·lular

Durant la formació del blastema a conseqüència d'una ferida, és indispensable el paper que juguen els neoblasts junt amb les cèl·lules en apoptosi, ja que ambdues taxes de proliferació i de mort cel·lular augmenten remarcablement seguint una dinàmica coneguda (Saló i Baguñà, 1984;

Introducció

Pellettieri i altres, 2010; Wenemoser i Reddien, 2010). Diferents estudis han proposat que aquest augment de les cèl·lules mare podria ser la font de les noves cèl·lules encarregades de formar el blastema (Baguñà, 1976a, b; Saló i Baguñà, 1984). A més a més, cal tenir en compte que un remodelatge del teixit preexistent permet restaurar la simetria i les proporcions originals en pocs dies (Wenemoser i Reddien, 2010). Aquest remodelatge és similar al que succeeix en animals intactes davant una situació prolongada de dejú, on té lloc un decreixement (veure apartat 2.2; Baguñà i Romero, 1981; Reddien i Sánchez-Alvarado, 2004; Romero i Baguñà, 1991).

En relació a la proliferació cel·lular, s'ha demostrat que durant aquesta etapa primerenca de la regeneració es dona un màxim nombre de neoblasts (Wenemoser i Reddien, 2010; Saló i Baguñà, 1984), assolint un primer pic mitòtic exactament a les 6 hores després de l'amputació, no només en regions properes a la ferida, sinó al llarg de tot l'animal, seguit per un notable decreixement general del nombre de cèl·lules en divisió, que assoleix un mínim a les 18 hores (Figura 24; Wenemoser i Reddien, 2010). Passats 2-3 dies en la regió de l'amputació es forma el blastema, on es diferenciarien les estructures *de novo* (Reddien i Sánchez-Alvarado, 2004) i els neoblasts es distribueixen pròximament, a una regió considerada la regió post-blastema. Durant aquesta acumulació de les cèl·lules mare en el post-blastema es dona un altre increment de la proliferació dels neoblasts, exactament 48 hores després de l'amputació (Figura 24). Aquest segon pic mitòtic, a diferència del primer, no s'estén per tot l'animal. L'origen i la localització d'aquest increment en la divisió de les cèl·lules mare ha sigut contínuament discutit, però estudis recents apunten cap a un origen local, en regions properes a la ferida (Saló i Baguñà, 1984; Wenemoser i Reddien, 2010).

Els dos pics mitòtics defineixen dues fases de divisió amb propietats diferents i en les quals s'indueix l'activació de senyals independents. L'elevat nombre de cèl·lules en proliferació es manté fins al 8è dia de regeneració, a partir d'aquest moment apareixen distribuïdes per tot l'organisme i són menys nombroses. Cal remarcar que entre el 5è i 6è dia de regeneració, l'absència de

cèl·lules mitòtiques en la nova faringe és òbvia i la seva presència a l'interior del blastema és molt reduïda. Contradictòriament al que s'havia vist anteriorment (Saló i Baguñà, 1984), es poden trobar alguns neoblasts a l'interior del blastema (Wenemoser i Reddien, 2010), malgrat que aquests són pocs per explicar el creixement del blastema.

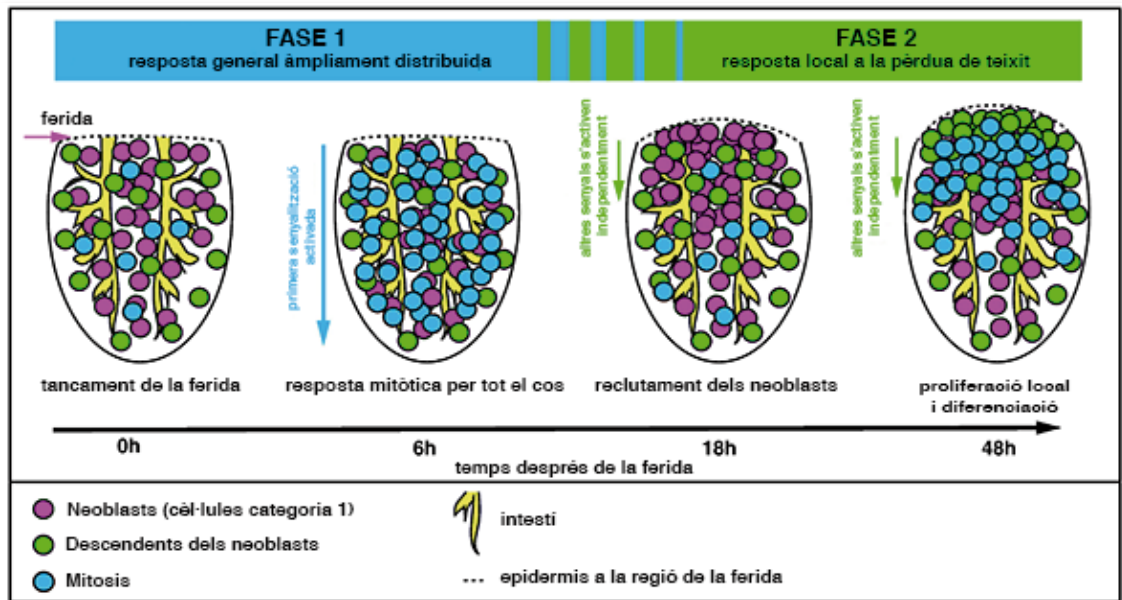


Figura 24. Respostes dels neoblasts induïdes després d'una ferida. Durant l'inici de la regeneració es donen dues respostes dels neoblasts. La primera fase implica una resposta genèrica davant d'una ferida que s'estén ràpidament des del lloc de la ferida, és dependent de la mida de la ferida i induïx un increment de la mitosi al llarg de tot el cos a les 6h. La segona fase té lloc exclusivament quan falta una proporció important de teixit, implica senyals locals que induïxen el reclutament dels neoblasts, seguit per una proliferació local passades 48 hores i una diferenciació cel·lular al lloc de la ferida. En el model es representen les dues fases en cues regenerants (adaptat de Wenemoser i Reddien, 2010).

Durant les fases primerenques de la regeneració, on es produeixen les dues fases de divisió mitòtiques, també es donen remarcables canvis en l'apoptosi (Pellettieri i altres, 2010). La mort cel·lular present en *S. mediterranea* fluctua favorablement al llarg de la regeneració i gràcies al marcatge de TUNEL ("terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling") s'han pogut visualitzar i quantificar les cèl·lules que entren en apoptosi en les planàries. Mitjançant aquesta tècnica s'ha observat que, entre 1-4 hores després de l'amputació, incrementa el nombre de cèl·lules positives marcades per TUNEL, exclusivament en la regió pròxima a la ferida, que podria estar induïnt el tancament de la ferida i la formació del blastema (Pellettieri i altres,

Introducció

2010). En altres organismes, com *Hydra*, també es dona aquest increment de la mort cel·lular 4 hores després d'amputar la regió anterior i s'ha demostrat que és un factor clau per induir la proliferació cel·lular en etapes primerenques de la regeneració (Vritz i altres, 2014). Malauradament, en el cas de les planàries es desconeix encara quin vincle existeix entre aquest primer pic apoptòtic i el primer pic mitòtic a les 6 hores. Als 3 dies de l'amputació es dona un segon pic apoptòtic, en aquest cas detectat de forma sistèmica i no exclusivament en la regió de la ferida, i es creu que podria estar relacionat amb el remodelatge de les estructures danyades, per tal de restaurar l'escala i les proporcions corporals dels animals regenerants (Pellettieri i altres, 2010).

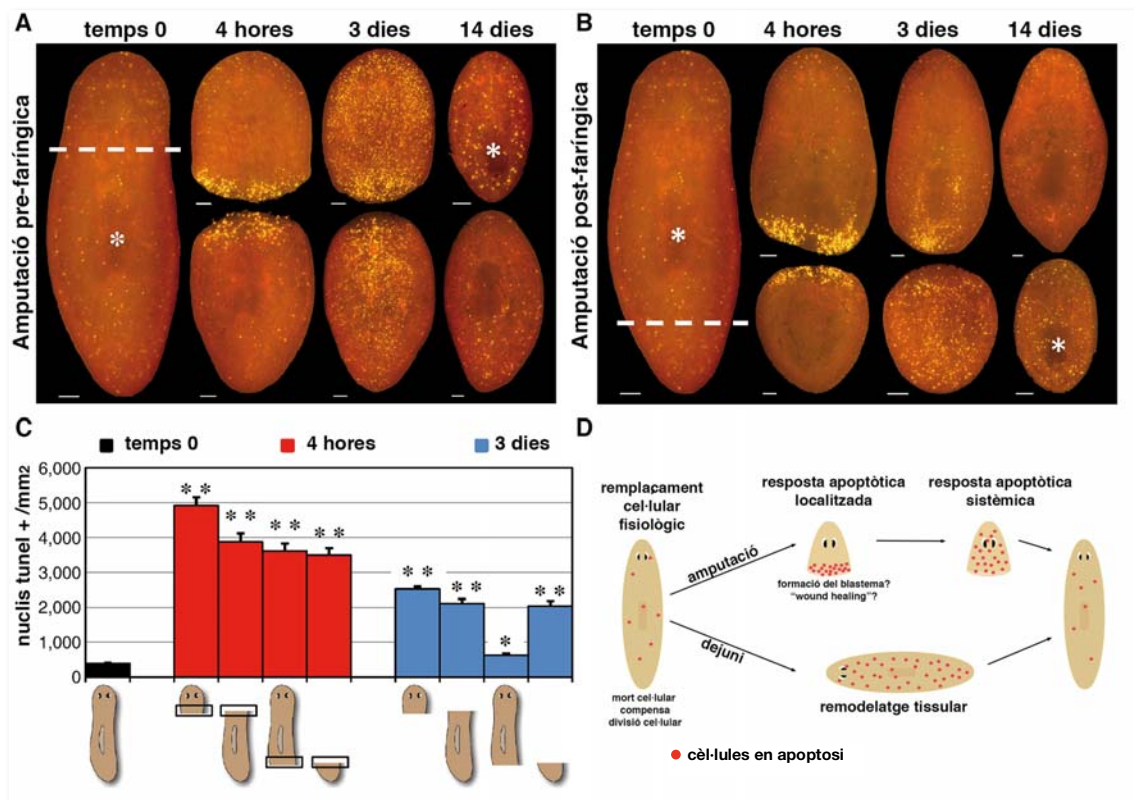


Figura 25. Dinàmica de l'apoptosi durant la regeneració. Després d'una amputació es donen dos pics apoptòtics a 4 hores i a 3 dies, tant en amputacions pre-faríngeiques (A) com post-faríngeiques (B). Barra d'escala: 100µm. C) Mitjana dels nivells d'apoptosi, segons la regió amputada, comparant fragments regenerants amb animals control intactes; a 4 hores la zona comptabilitzada es restringeix a una àrea d'100mm, respecte l'amputació. D) Model de la funció de l'apoptosi durant el remodelatge tissular de les planàries, on es reflecteixen les dues respostes apoptòtiques. La primera a 4 hores es localitza en la regió de la ferida i la segona a 3 dies es distribueix al llarg de tot el cos. La mort cel·lular sistèmica també s'indueix en animals intactes en un estat de dejuni prolongat (adaptat de Pellettieri i altres 2010).

Tot i que en les fases primerenques de la regeneració es produeixen dos pics proliferatius de les cèl·lules mare, aquest increment en la mort cel·lular succeeix en cèl·lules diferenciades quasi en la seva totalitat i, per tant, es creu que aquests dos pics apoptòtics són independents dels neoblasts. Hi ha altres hipòtesis que postulen l'escenari contrari, on l'augment d'aquestes cèl·lules apoptòtiques podria ser el factor desencadenant per activar els senyals que indueixen l'augment de la proliferació dels neoblasts, marcant un patró típicament bifàsic durant la regeneració primerenca (Pellettieri i altres, 2010).

D'altra banda, s'ha demostrat que durant un escenari d'inanició on els animals pateixen un conseqüent decreixement de la seva mida, també augmenta la mort cel·lular (González-Estevéz i altres, 2007; Pellettieri i altres, 2010). En aquest estat, el nivell mitòtic dels neoblasts es manté pràcticament constant, tot i que s'han obtingut resultats contradictoris (Baguñà, 1976a, b). Aquesta situació és reversible en el moment que els animals tenen aliments al seu abast, on podran induir el seu creixement i regular el nivell d'apoptosi per facilitar els canvis morfològics i mantenir les proporcions corporals (Pellettieri i altres, 2010).

S. mediterranea s'ha convertit doncs en un model excel·lent per investigar com es coordinen les cèl·lules diferenciades que entren en un procés d'apoptosi amb les cèl·lules mare en divisió per tal de regular la regeneració dels teixits danyats o la renovació del teixit adult.

2.4.3.- Determinació, diferenciació de les noves estructures

Abans i durant el segon pic mitòtic, una proporció de cèl·lules descendents dels neoblasts abandona el cicle cel·lular i migra cap a l'interior del blastema per formar una capa de cèl·lules no proliferatives a la regió de la ferida, que entraran en un estat determinat per acabar diferenciant-se en els diferents tipus cel·lulars de l'organisme adult (Saló i Baguñà, 1984; Wenemoser i Reddien, 2010; Guedelhofer i Sánchez-Alvarado, 2012). Perquè aquesta transició tingui lloc i s'indueixi la diferenciació cel·lular en el blastema, durant les etapes primerenques de la regeneració és indispensable l'activació de

Introducció

determinats senyals a la regió de la ferida (Eisenhoffer i altres, 2008; Wenemoser i Reddien, 2010). El procés és complex i recentment s'han postulat dos possibles models alternatius per entendre com actuen exactament els neoblasts durant aquesta etapa: el model dels neoblasts *naïve* i l'especialitzat (Reddien, 2013). En el model *naïve* es creu que els neoblasts són capaços de produir cèl·lules indiferenciades en el blastema, multipotents i sense capacitat de divisió, les quals es diferencien en els diferents tipus cel·lulars pertinents al rebre un senyal extern. D'altra banda, en el model especialitzat es postula que els neoblasts propers a la ferida adopten un estat especialitzat encarregat de formar unes cèl·lules en el blastema sense capacitat proliferativa, determinades a diferenciar els diferents llinatges cel·lulars; de manera que en aquest model es creu que l'especificitat de les cèl·lules del blastema que han de donar lloc als diferents tipus cel·lulars podria donar-se prèviament a l'entrada de les cèl·lules en el blastema (Reddien, 2013). Gràcies a estudis recents es creu que és més probable que es doni el model especialitzat i no el *naïve*, ja que diversos laboratoris han suggerit la possibilitat que, com a mínim, per alguns tipus cel·lulars existeixen progenitors específics, degut a la identificació de neoblasts que coexpressen *piwi-1* i diferents factors de transcripció necessaris per a la diferenciació de determinats llinatges cel·lulars. És el cas del sistema excretor, de les cèl·lules pigmentàries dels ulls i dels fotoreceptors (Scimone i altres, 2011; Lapan i Reddien, 2011).

Posteriorment, altres laboratoris han corroborat aquesta hipòtesi, suggerint per primera vegada l'existència de cèl·lules progenitores neuronals (März i altres, 2013; Currie i Pearson, 2013), en demostrar que els factors de transcripció *lhx175-1* i *pitx* són imprescindibles per la regeneració del llinatge de cèl·lules serotoninèrgiques. Aquest estudi s'ha ampliat recentment mitjançant l'anàlisi de múltiples factors de transcripció bHLH que podrien estar expressats en altres cèl·lules progenitores neuronals, com és el cas de *coe* (*collier/olfactory-1/early B-cell factor*), *hesl-3* (*hairy/enhancer of split*) i *sim* (*single-minded*), imprescindibles per diferenciar noves neurones durant la regeneració (Cowles i altres, 2013).

Estudis previs han mostrat la importància de múltiples gens durant la regulació de la proliferació de les cèl·lules mare, com per exemple *Smed-ago-2*, *Smed-H2B*, *Smed-inexin-11*, *Smed-TOR*, *Smed-raptor* entre d'altres, després d'observar que el seu silenciament provoca una disminució o una pèrdua absoluta de la capacitat proliferativa dels neoblasts (Li i altres, 2011; Solana i altres, 2012; Oviedo i Levin, 2007; González-Estévez, 2012; Peiris i altres, 2012; Tu i altres, 2012). Ara bé, cal tenir en compte la importància també de determinats gens (*Bruli*, *Smed-piwi-2*, *Smed-CHD4*, *pumilio*) que regulen els neoblasts però a altres nivells, alterant la diferenciació. Per exemple, *Bruli* (*Smed-bruno-like*) manté la població dels neoblasts durant la regeneració de les planàries, ja que després d'inhibir aquest gen els neoblasts es poden dividir i diferenciar, però perden la capacitat de generar més cèl·lules mare en cada divisió. Com a resultat es dona una disminució gradual de la població de les cèl·lules mare i, finalment, els organismes *Smed-bruno-like*(ARNi) tractats acaben morint (Guo i altres, 2006). En el cas del gen *Smed-piwi-2*, el seu silenciament no afecta inicialment el nombre de neoblasts ni la seva migració, però provoca posteriorment una anormal morfologia de la seva progènie i, com a conseqüència, la diferenciació es veu alterada (Reddien, Oviedo i altres, 2005; Palakodeti, 2008). Altres gens que podrien estar regulant la diferenciació dels neoblasts són *Smed-CHD4* o *Smed-p53*, ja que el seu silenciament implica una clara disminució de la descendència post-mitòtica dels neoblasts (Scimone i altres, 2010, Pearson i Sánchez-Alvarado, 2010).

D'altra banda, estudis recents han definit quatre categories de gens, depenent de la seva expressió específica en les cèl·lules mare adultes o en les seves cèl·lules descendents (Eisenhoffer i altres, 2008). Així, els gens de la Categoria 1 són aquells que regulen la proliferació, tot i que s'hi inclouen gens que no estan directament relacionats amb la progressió del cicle cel·lular, en general són gens amb un patró d'expressió que defineix als neoblasts, absents en la regió anterior dels fotoreceptors i en la faringe però presents en cèl·lules discretes del parènquima, com són *Smedwi-1* o *Smed-brunl-1*. Dins de la Categoria 2, es troben dos gens anomenats *Smed-NB.21.11e* i *Smed-NB.32.1g* que s'expressen en cèl·lules anteriors als fotoreceptors, és a dir, en

Introducció

cèl·lules mitòticament no actives (cèl·lules post-mitòtiques). Els gens de la Categoria 3 s'expressen en cèl·lules pròximes al marge, més distals que les cèl·lules marcades pels gens de la Categoria 2. Hi trobem, entre d'altres, *Smed-AGAT-1*, un gen expressat en cèl·lules post-mitòtiques, necessari pel manteniment del teixit i la formació del teixit nou durant la regeneració (Eisenhoffer i altres, 2008). Els gens de les Categories 2 i 3 no colocalitzen i, per aquest motiu, es considera que s'expressen en cèl·lules descendents dels neoblasts diferents que han entrat en progressius estadis de diferenciació (Figura 26); així, les cèl·lules marcades pels gens de la Categoria 2 corresponen a una descendència primerenca i les de la Categoria 3 a una descendència tardana dels neoblasts. Finalment, els gens de la Categoria 4, per exemple *Smed-H.18.1b*, s'expressen en cèl·lules distribuïdes per tot el parènquima amb excepció de la faringe, tot i que se sap que no corresponen a marcadors exclusius dels neoblasts.

Gràcies a la caracterització molecular dels neoblasts i la seva descendència post-mitòtica s'ha pogut analitzar la dinàmica de les cèl·lules mare en més detall, tant en condicions d'homeòstasi com durant la regeneració.

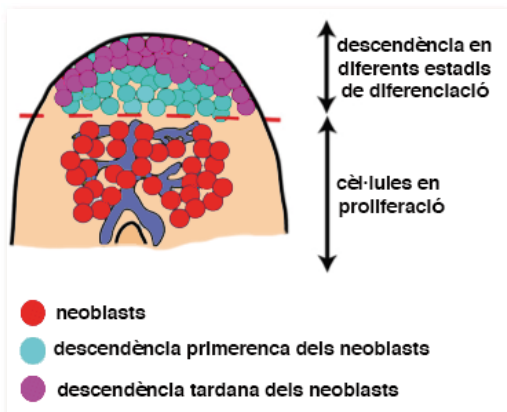


Figura 26. Model de la distribució dels neoblasts i la seva descendència post-mitòtica durant la regeneració. Els neoblasts, úniques cèl·lules amb capacitat proliferativa, es troben restringits sota la regió de l'amputació i donen lloc a la població descendent, primerenca (on s'expressen gens de la categoria 2) i tardana (on s'expressen gens de la categoria 3), que migrarà cap al blastema i es diferenciarà en el tipus cel·lular corresponent (adaptat de Eisenhoffer i altres, 2008).

Els primers signes de diferenciació es detecten ja en alguns teixits 1-2 dies després de l'amputació, per exemple en el cas dels primordis dels ganglis cefàlics (Cebrià, 2007). Ara bé, com poden les cèl·lules mare totipotents, sent les úniques amb capacitat proliferativa en les planàries, diferenciar-se en tots els llinatges cel·lulars és avui dia encara una incògnita no del tot resolta ja que, desafortunadament, la falta de marcadors de determinats tipus cel·lulars

discrets o la definició clara dels llinatges dels neoblasts impedeix resoldre qüestions essencials com quins són els senyals inductors que permeten que es desencadeni el procés de la diferenciació o com es controla el balanç entre el manteniment dels neoblasts i la seva diferenciació.

2.4.4.- Restabliment de la polaritat durant la regeneració

Les planàries són un dels models més favorables per investigar els mecanismes moleculars i cel·lulars que controlen l'establiment de la polaritat **anteroposterior** (AP), **dorsoventral** (DV) i **mediolateral** (ML) durant la regeneració. Principalment, les planàries són capaces de regenerar un cap o una cua en el fragment anterior o posterior, respectivament, d'una regió amputada, mantenint la polaritat AP original. Fa més d'un segle, Morgan ja va introduir el concepte de polaritat, en presentar en els seus experiments el terme "Janus-head", referint-se a les planàries que regeneraven incorrectament dos caps, que obtenia de tallar fragments extremadament petits. Així, Morgan va proposar que la polaritat durant la regeneració s'estableix gràcies a un "gradient de materials" distribuïts a través de l'eix antero-posterior però, en un tall transversal massa petit, aquest gradient no pot interpretar la seva identitat de forma adequada i, com a conseqüència, la regeneració succeeix incorrectament. Morgan ja va observar que era necessària una mínima distància entre l'eix AP per poder especificar la polaritat. Des d'aleshores, s'ha pogut anar més enllà, estudiant detalladament els mecanismes moleculars que dirigeixen aquest fascinant manteniment de la polaritat original i s'han descobert algunes de les cascades específiques de reaccions que coordinen els eixos de la polaritat durant la regeneració i la homeòstasi (Taula 2). La via *Wnt/ β -catenin*, imprescindible en els metazous per establir el patró AP durant la embriogènesi (Petersen i Reddien, 2009), té un paper essencial durant l'especificació i el manteniment de la polaritat en planàries regenerants o en homeòstasi (Petersen i Reddien, 2008; Gurley i altres, 2008; Iglesias i altres, 2008). Així, el silenciament específic de *Smed- β catenin-1* genera planàries amb un blastema posterior anterioritzat on s'hi hauria de formar una cua (Petersen i Reddien, 2008; Gurley i altres, 2008;

Introducció

Iglesias i altres, 2008), o en el cas del gen *Smed-wntP-1*, que s'expressa exclusivament en la regió posterior en animals intactes, la seva inhibició produeix planàries regenerants sense cua (Petersen i Reddien, 2009). Contràriament, el silenciament de *Smed-notum*, un inhibidor de la via Wnt, de *Smed-APC-1* i *Smed-axins* produeix planàries amb blastemes anteriors posterioritzats, on no s'hi pot regenerar un nou cervell però s'hi forma una cua (Petersen i Reddien, 2011; Iglesias i altres, 2011). La via Hedgehog (Hh) també és responsable de la determinació de la polaritat, promovent una posteriorització, mitjançant la regulació de la transcripció dels gens de la família Wnt durant la regeneració (Rink i altres, 2009; Yazawa i altres, 2009). Malgrat que els mecanismes exactes que permeten l'establiment de la polaritat A/P no es coneixen en la seva totalitat, sí que es parla de l'existència i la necessitat d'un gradient de la polaritat durant aquest manteniment, com ja va presentar Morgan. D'aquesta manera s'ha proposat un model on l'activitat de *Smed-βcatenin-1* es distribueix en gradient al llarg de tot el cos, amb un màxim a la regió posterior, encarregada d'aportar la informació posicional AP correcta a les cèl·lules (Adell i altres, 2010).

Altres hipòtesis parlen d'una funció dels nivells de calci i dels protons d'hidrogen durant la determinació de la polaritat. Estudis recents han presentat l'activitat durant la regeneració de les planàries de la bomba de protons o ATPasa (H^+/K^+ ATPasa) de membrana, un enzim que intercanvia hidrogen per potassi en ambdós costats de la bicapa lipídica. Bloquejant l'activitat H^+/K^+ ATPasa, s'impedeix l'expressió de marcadors anteriors, així com la diferenciació correcta del cervell o la regeneració de la branca anterior del sistema digestiu. D'altra banda, la seva inhibició és capaç de bloquejar la formació de caps ectòpics en un escenari de silenciament de *Smed-βcatenin-1*, suggerint que aquest enzim és essencial per la regulació de la formació del cap durant el procés de la regeneració (Beane i altres, 2011).

Finalment, hi ha estudis que suggereixen un paper crucial de les unions gap durant la determinació primerenca de la polaritat AP després d'una amputació en planàries (Oviedo i Levin, 2007) i recentment s'ha presentat la intervenció de les inxines (les proteïnes de les unions gap en invertebrats)

durant aquest procés (Oviedo i altres, 2010).

Al mateix temps, les planàries presenten la capacitat de coordinar l'establiment de la polaritat DV després d'una amputació, gràcies a la presència de determinades vies de senyalització, on de moment tots els elements identificats formen part de la via TGF- β , que té un paper conservat durant l'organització de l'eix DV en diversos metazous (Niehrs, 2010). El silenciament de la via TGF- β , mitjançant l'ARNi de *DjBMP/Smed-bmp4*, *Smed-smad1*, *Smed-smad4*, *Smed-admp* i *Smed-noggin-like-8*, implica una ventralització dels organismes, acompanyada per una duplicació dorsal del sistema nerviós i dels cordons nerviosos, una expressió ectòpica dorsal de marcadors ventrals i el creixement dorsal de cilis que impedeix que els organismes puguin nedar pròpiament (Molina i altres, 2007; Orii i Watanabe, 2007; Reddien i altres, 2007; Molina i altres, 2011). De la mateixa manera, un increment de la via BMP, silenciant determinats inhibidors com *Smed-noggin-1* i *Smed-noggin-2*, provoca el fenotip oposat, una dorsalització de l'organisme amb marcadors dorsals expressats ectòpicament en la regió ventral (Molina i altres, 2011).

Durant la regeneració, l'eix ML també està altament regulat. Randolph i Morgan ja van estudiar el seu establiment, en induir una incisió incompleta a nivell de la línia mitja, és a dir, sense arribar a produir dues meitats idèntiques (Randolph, 1897; Morgan, 1898; Morgan, 1901). Van observar que algunes planàries tancaven la ferida i regeneraven correctament, mentre que en altres casos es desenvolupava una duplicació de l'eix M/L, formant faringes duplicades i fotorreceptors ectòpics. Mitjançant experiments d'ARNi, s'han identificat diversos gens relacionats amb la regulació de l'eix M/L. Així s'ha demostrat que, entre altres funcions, el lligand SLIT s'encarrega de regular la migració de les projeccions axonals al llarg de la línia mitja (Cebrià i altres, 2007; Cebrià i Newmark, 2005). De manera que després del silenciament de *Smed-slit-1*, els teixits laterals es col·lapsen cap a la línia mitja, incloent els ganglis cefàlics, els cordons nerviosos, els fotorreceptors, el quiasme òptic i les branques del sistema digestiu; en conclusió, aquest gen és necessari per mantenir la simetria bilateral durant la regeneració (Cebrià i altres, 2007). Tant

Introducció

en invertebrats com en vertebrats, s'ha vist que SLIT, junt amb el seu receptor ROBO, juga un paper important durant la guia axonal (Araujo i Tear, 2003). Sorprenentment, el silenciament del receptor de *slit* a planàries (*Smed-roboA*) implica la formació de faringes supernumeràries i ganglis cefàlics ectòpics durant la regeneració anterior, a conseqüència d'una incorrecta connectivitat entre el gangli cefàlic regenerant i els cordons ventrals nerviosos (Cebrià i Newmark, 2007). Així, la presència d'axons aberrants en el quiasme òptic i d'una comissura anterior dels ganglis cefàlics reduïda ha suggerit l'existència de problemes específics durant l'establiment de l'eix M/L (Yamamoto i Agata, 2011; Cebrià i Newmark, 2007). En conclusió, s'ha suggerit una sinèrgia entre les vies Slit/ Netrin per dirigir el correcte establiment de l'eix M/L. D'altra banda, la via Wnt també juga un paper important durant l'establiment de l'eix M/L. Per exemple, el silenciament de *Smed-wnt11-2*, a part d'induir la formació de cues reduïdes, causa defectes en l'eix M/L (Adell i altres, 2009) o en el cas del gen *Smed-wnt5*, la seva inhibició origina una regeneració aberrant del cervell i dels nous cordons nerviosos, mostrant una expansió lateral de les estructures cap a la perifèria corporal. Per aquest motiu, s'ha suggerit que *Smed-wnt5* podria estar definint l'eix mediolateral (Almuedo-Castillo i altres, 2011; Gurley i altres, 2010).

Finalment, cal esmentar que la via TGF- β no només és important per a l'organització de l'eix DV com s'ha esmentat anteriorment, sinó també per la ML. *Smed-bmp-4* s'expressa a la línia mitja de la planària adulta i la seva expressió augmenta durant la regeneració lateral, en la regió de la ferida. Experiments ARNi de diferents elements de la via (*Smed-bmp4*, *Smedolloid-1*, *Smed-smad4*) reflecteixen una regeneració clarament aberrant al fer una bisecció seguint la línia mitja dels animals tractats (Reddien i altres, Development, 2007). Addicionalment, membres de la via TGF- β que impliquen una ventralització després del seu silenciament, mostren alhora blastemes indentats tant anterior com posteriorment, suggerint una regeneració de la línia mitja aberrant (Molina i altres, 2007; Orii i Watanabe, 2007; Reddien i altres, 2007; Gaviño i Reddien, 2011; Molina i altres, 2011). L'efecte és més evident en silenciar *Smed-admp* o *Smed-smad4*, ja que mostren una expressió clara

de *Smed-slit-1* (marcador de la línia mitja) a la perifèria dels animals tractats (Gaviño i Reddien, 2011).

En conclusió, les planàries presenten una gran complexitat molecular per complir amb la seva fascinant capacitat regenerativa i encara queda molt per entendre absolutament com es regula l'activació de els múltiples senyals que permeten determinar i mantenir la polaritat durant la regeneració i la homeòstasi.

Via	Silenciament ARNi	Defectes eix A/P						Defectes eix D/V		Defectes eix M/L
		Regeneració anterior			Regeneració posterior			Dorsa-lització	Ventra-lització	
		Dues cues	Sense cap	Ciclo-pia	Cua reduïda	Sense cua	Dos caps			
Wnt	<i>Dj/Smed-β-catenin-1</i>						x			
	<i>Smed-dvl-1/2</i>						x			x
	<i>Smed-evi</i>						x			x
	<i>Dj/Smed-wnt1</i>						x			
	<i>Smed-wnt5</i>									x
	<i>Smed-wnt11-2</i>				x					x
	<i>Smed-wnt11-5</i>						x			
	<i>Smed-notum</i>	x								
	<i>Dj/Smed-APC-1</i>	x								
	<i>Smed-axinA</i>	x								
	<i>Smed-axinB</i>	x								
Hh	<i>Smed-smo</i>				x	x				
	<i>Smed-Hh</i>				x	x				
	<i>Smed-sufu</i>	x	x	x						x
	<i>Smed-gli-1</i>				x	x				
	<i>Smed-ptc</i>	x	x	x						x
Slit/Netrin	<i>Dj/Smed-slit-1</i>			x						x
	<i>Dj/Smed-roboA</i>									x
	<i>Smed-netrin-2</i>									
	<i>Smed-netR</i>									
	<i>DjnetB</i>									poc penetrant
	<i>Djdcc</i>									poc penetrant
	<i>Djunc5A</i>									poc penetrant
Tgf-β	<i>Smed-smad1</i>								x	x
	<i>Smed-smad4</i>								x	x
	<i>Smed-bmp-1</i>								?	x
	<i>Smed-bmp4</i>								x	x
	<i>Smed-admp</i>								x	x
	<i>Smed-nlg8</i>								x	x
Altres	<i>Smed-noggin-1/2</i>							x		
	<i>Smed-follistatin</i>		x							
	<i>Smed-innexin-12</i>						x			
	<i>Smed-innexin-13</i>						x			
	<i>Smed-prep</i>		x	x						x
	<i>Djislet-1</i>					x				
	<i>Smed-innexin-5</i>						x			

Taula 2. Gens que intervenen en l'establiment de la polaritat dels eixos AP, DV, ML i els seus defectes després de la seva inhibició (adaptat de Elliott i Sánchez Alvarado, 2012).

Capítol 3.

La via de senyalització dels receptors dels factors de creixement epidèrmics

3.1.- Introducció

L'habilitat que té qualsevol cèl·lula a integrar els senyals que rep i respondre a aquests adequadament és essencial per assegurar-se el seu propi funcionament. Per aquest motiu, la senyalització cel·lular representa un element clau en la biologia cel·lular i és indispensable per dirigir tots els processos que tenen lloc durant el desenvolupament.

De forma simplificada, quan un senyal arriba a la superfície cel·lular, el responsable de rebre aquesta informació és en general un receptor que té la funció primordial de transmetre-la a l'interior de la cèl·lula. La transmissió del senyal consisteix en el pas del missatge a través d'una sèrie de components fins arribar al destí final, moment en el que la cèl·lula respondrà.

Les principals vies de senyalització implicades en la proliferació cel·lular i la diferenciació són la via TGF β /BMP (acrònim de "Transforming Growth Factor β / Bone Morphogenetic Protein"), JAK/STAT ("Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription"), Notch/Delta, Wnt, Hedgehog i la dels receptors tirosina quinasa (RK), on s'hi inclouen els EGFR ("Epidermal Growth Factors Receptors") o els FGFR ("Fibroblast Growth Factors Receptors").

Totes aquestes vies han estat estudiades en detall durant el desenvolupament embrionari i s'ha demostrat que estan conservades en els models clàssics de regeneració, on hi juguen un paper fonamental (Sánchez-Alvarado i Tsonis, 2006). En el cas concret de les planàries, estudis recents han demostrat la seva funció durant el procés de la regeneració. Per exemple, s'ha vist que la via $TGF\beta$ /BMP regula la polaritat dorsoventral (Molina i altres, 2011; Gaviño i Reddien, 2011; Molina i altres, 2007; Orii i Watanabe, 2007; Reddien i altres, 2007), les vies Wnt i Hedgehog controlen la polaritat anteroposterior (Rink i altres, 2009; Gurley i altres, 2008; Iglesias i altres, 2008; Petersen i Reddien, 2008; Yazawa i altres, 2009) i la via dels receptors dels FGF s'encarrega de restringir el cervell exclusivament en la regió del cap (Cebrià i altres, 2002c). Malauradament, altres vies de senyalització, relacionades amb el fenomen de la regeneració en altres organismes, continuen sent una incògnita en les planàries, com és el cas de la via dels receptors dels factors de creixement epidèrmics (EGFR). Hi ha diverses evidències en vertebrats que suggereixen que els EGFR i els seus lligands regulen processos biològics essencials, com la proliferació, migració o la inhibició de l'apoptosi (Normanno i altres, 2006), al mateix temps que intervenen en el manteniment i el desenvolupament de determinats teixits, on s'hi inclou el sistema nerviós (Birchmeier, 2009; Wong i Guillaud, 2004), però es desconeix encara la seva regulació en les planàries.

3.2.- Via de senyalització dels EGFR

Des del descobriment dels factors de creixement epidèrmics (EGF) l'any 1962, aïllats originalment per l'investigador premi nobel Stanley Cohen (Cohen, 1962), la ruta de senyalització dels EGFR ha estat vinculada amb processos cancerígens i, en general, amb l'estímul de la proliferació ja que s'hi troben els primers receptors dels factors de creixement identificats en cèl·lules oncogèniques (Carpenter i altres, 1975). Per aquest motiu, la majoria d'estudis d'aquesta via estan íntimament relacionats amb la investigació contra el càncer i l'intent de desenvolupar tractaments anticancerígens millorats (Gschwind i altres, 2004; Jutten i Rouschop, 2014; Chong i Jänne, 2013). En termes generals, la via de senyalització dels EGFR es pot definir com una via

de senyalització típica dels factors de creixement, on un lligand s'uneix a un receptor tirosina quinasa monomèric i activa la funció catalítica citoplasmàtica, al promoure la dimerització del receptor i la fosforilació dels residus tirosina (Yarden i Sliwkowski, 2001).

En el cas dels models invertebrats clàssics la via es força simple, si tenim en compte que únicament s'ha trobat un receptor EGF (EGFR), anomenat DER en el cas de *Drosophila* o Let-23 en el cas de *C. elegans* i 5 lligands diferents: vein, gurken, keren, spitz i lin-3. En el cas de *Drosophila*, se n'han descrit quatre dels cinc, vein, spitz, gurken i keren, mentre que a *C. elegans* se n'ha identificat exclusivament un, lin-3 (Stein i Staros, 2006). Contràriament, l'activació de la via en els vertebrats és més complexa, ja que s'han identificat múltiples lligands (Citri i Yarden, 2006), entre els quals hi trobem els EGF pròpiament dits, TGF α (factor de creixement tumoral α), AR (amfiregulina), BTC (betacelulina), HB-EGF (factor de creixement lligat a heparina), EPR (epiregulina) i quatre tipus de Neuregulines (NRG1-4). En relació als receptors, s'han identificat 4 membres diferents dins de la família dels EGFR: EGFR, erbB2, erbB3 i erbB4. El nom dels erbB deriva del primer gen de la família aïllat, un oncogen del virus de l'eritroblastosis aviar (v-ErbB); posteriorment s'ha demostrat que els erbB codifiquen per una variant mutant del receptor EGF (Burden i Yarden, 1997) i actualment es consideren dins de la mateixa família dels EGFR.

Cal tenir en compte, a més a més, que cada membre de la via presenta característiques específiques. Així, dels múltiples lligands identificats no tots s'uneixen als mateixos EGFR (Burgess i altres, 2003):

- El lligands EGF, TGF α (factor de creixement tumoral alfa) i amfiregulina (AR) s'uneixen als EGFRs.
- Els lligands BTC (Betacelulina), HB-EGF (factor de creixement lligat a heparina) i EPR (Epiregulina) es poden unir tan als EGFRs com als erbB4.
- Els lligands NRG1 (Neuregulina 1) i NRG2 (Neuregulina 2) s'uneixen als erbB3 i erbB4.
- Els lligands NRG3 (Neuregulina 3) i NRG4 (Neuregulina 4) s'uneixen exclusivament als erbB4.

Introducció

I en el cas dels 4 receptors diferents, es poden donar múltiples combinacions possibles de dímers actius (Figura 27), exactament 3 homodímers (dimerització entre dos receptors homòlegs, excepte en el cas d'erbB3) i sis heterodímers (formació de dímers entre dos receptors diferents de la família dels EGFRs):

- **EGFR**, anomenat també erbB1 o HER1, pot interaccionar amb altres EGFR (Hynes i Lane, 2005), però a la vegada es pot activar mitjançant interaccions asimètriques unint-se a erbB2 (Holbro i Hynes, 2004), erbB3 (Plowman i altres, 1990) o erbB4 (Plowman i altres, 1993).
- A diferència de la resta de receptors, els **erbB2**, designats també com neu o HER2, no s'uneixen a cap lligand pròpiament però si que s'associen a altres membres (homodímers o heterodímers) que es troben en la seva forma activa, actuant així com a co-receptors pels altres tres membres durant la dimerització (Garrett i altres, 2003). Aquest fet justifica per què formen preferiblement heterodímers per comptes d'homodímers.
- **erbB3**, anomenat també HER3, presenta unió al lligand però no una activitat de proteïna quinasa activa (domini tirosina quinasa deficient), per tant, requereix particularment la formació d'heterodímers amb la resta de receptors EGF, erbB2 o erbB4 (Plowman i altres, 1993; Burgess i altres, 2003).
- **erbB4**, designat també HER4, consta de dues isoformes que li permeten formar tan homodímers com heterodímers amb la resta de receptors.

Tot i el gran ventall de possibilitats a l'hora de formar els dímers, és important reconèixer cada un dels casos, ja que els efectes són molt diversos. Primer de tot, cal considerar que cada receptor té una afinitat exclusiva a específics elements "downstream"; per aquest motiu, depenent del dímer que es formi, s'activaran diferents vies de senyalització, comportant conseqüències molt diverses. D'altra banda, el nivell d'expressió específic de cada tipus d'EGFR en una cèl·lula influenciarà a la forma dimeritzada que pugui predominar. Així, se sap, per exemple, que els dímers més potents a la hora d'estimular la proliferació són els EGFR/erbB2, erbB2/erbB3 o els EGFR/erbB3, considerats els més oncogènics (Haley i Gullick, 2008).

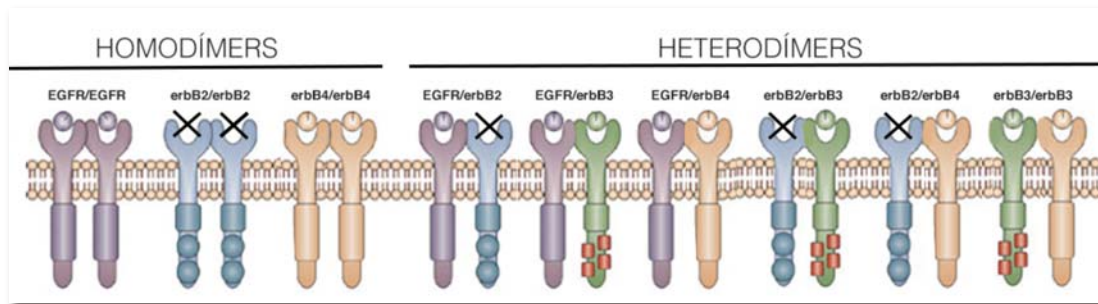


Figure 27. Possibles combinacions d'homodímers/heterodímers durant l'activació dels EGFR. La unió dels diferents lligands al domini extracel·lular dels quatre receptors EGFR induïx la homodimerització o heterodimerització, donant lloc a múltiples combinacions (adaptat de Linardou i altres, 2009).

En alguns casos, s'ha postulat la possibilitat d'activar els EGFR independentment d'un lligand EGF, per exemple, mitjançant la fosforilació directa del seu residu tirosina en el domini intracel·lular, en resposta a diferents estímuls (neutròfils activats produint estrès oxidatiu) (Burgel i Nadel, 2004) o reduint la quantitat de colesterol de la bicapa lipídica de la membrana cel·lular (Lambert i altres, 2006). Tot i així, el mecanisme capaç d'activar aquests dímers sense la presència absoluta de lligands EGF no s'ha pogut descriure amb claredat i el més probable és que en aquests casos, una altra molècula estigui involucrada durant la formació del dímer.

3.3.- Estructura dels EGFR

Els receptors EGFR pertanyen a la subclasse I de la superfamília dels receptors tirosina quinasa (RTKs), típicament constituïts per tres dominis: domini extracel·lular (DE), domini transmembrana (DT) i domini intracel·lular (DI) (Figura 28):

- **Domini extracel·lular**, on resideix el grup amino-terminal, està compost per 4 subdominis. Els subdominis I i III presenten una conformació típica d'hèlix β , de gran importància ja que es la regió on s'uneix el lligand, modelant una conformació anomenada nansa de dimerització o " β -hairpin" entre el domini II. Durant la forma inactiva, els subdominis II

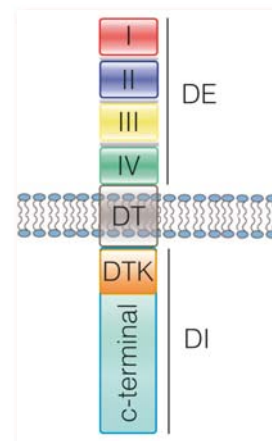


Figura 28. Estructura de l'EGFR: domini extracel·lular (DE), domini transmembrana (DT) i domini intracel·lular (DI), que conté un domini tirosina quinasa (DTK).

Introducció

i IV es mantenen units, de manera que la nansa de dimerització queda plegada, impedit la interacció del receptor adjacent. En el moment que es modifica la disposició dels dominis II i III, s'estableix una conformació oberta (activa) del receptor que trenca les unions intermoleculares dels subdominis II i IV, es pot donar la unió lligand-receptor i la nansa de dimerització queda accessible per què tingui lloc la formació d'homo/heterodímers (Figura 29).

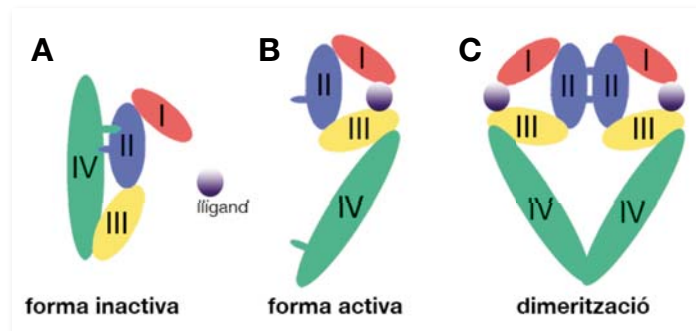


Figura 29. Diferents estats conformativals que poden formar els subdominis (I-IV) del domini extracel·lular. (A) Forma inactiva (estat basal), (B) forma activa (unió receptor-ligand), (C) formació dels dímers (homo/heterodímers) (adaptat de Bublit i Yarden, 2007).

La formació de dímers no es dona a l'atzar, cal que es formi una unió específica lligand-receptor, però hi ha altres factors que poden accelerar aquest procés, per exemple, alterant l'expressió precisa del receptor (augmentant la seva expressió o produint formes més actives mitjançant alteracions moleculars). D'altra banda, a excepció de la resta de receptors, erbB2 presenta un domini extracel·lular amb una conformació diferent que li impedeix la unió del lligand al receptor.

- **Domini transmembrana** que conté una seqüència de caràcter hidrofòbic que li permet travessar la membrana.
- **Domini intracel·lular** en el qual s'hi troba l'activitat tirosina quinasa del receptor, encarregat també de la regulació negativa d'aquest. Aquest domini citoplasmàtic amb activitat catalítica posseeix una cua intracel·lular amb cinc regions d'autofosforilació, imprescindibles per què els EGFR permetin la fosforilació d'un gran conjunt de substrats cel·lulars, a través d'aquest extrem C-terminal.

3.4. Cascades de senyalització regulades a través dels EGFRs

L'activació dels EGFRs a través de la dimerització indueix l'activació de múltiples proteïnes amb activitat tirosina quinasa, moment en que pot tenir lloc l'autofosforilació de la tirosina. Aquest mecanisme permet el reclutament i la fosforilació de diversos substrats intracel·lulars, generant l'activació de múltiples cascades de senyalització “downstream” (Figura 30; Alroy i Yarden, 1997; Riese i Stern, 1998), entre les quals s'hi inclouen vies clàssiques com les MAPK (“mitogen activated protein kinase”) (Scaltriti i Baselga, 2006), PLC γ (“phospholipase C γ ”), JAK/STAT (Silva, 2004) o PI3K (“phosphatidylinositol-3-OH kinase”) (Ono i Kuwano, 2006), depenent del context cel·lular.

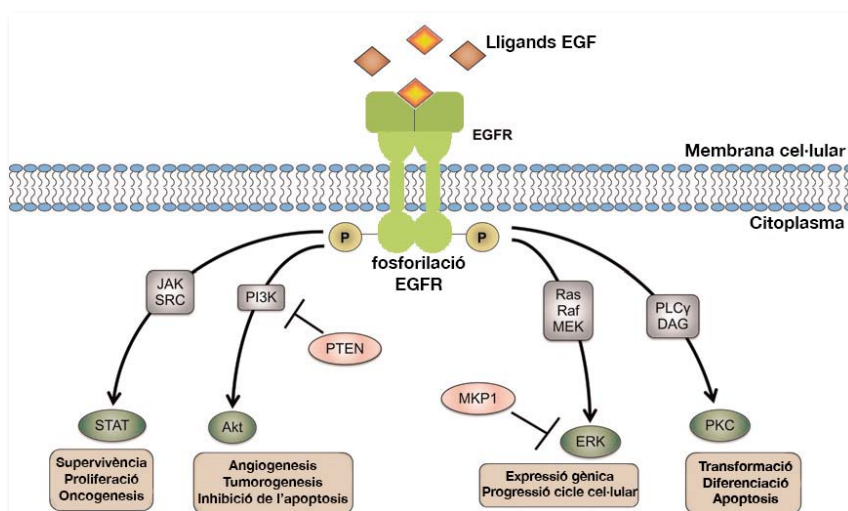


Figura 30. Vies de senyalització regulades a través de la via dels EGFR i la seva funció en múltiples processos biològics. (adaptat de Lee i Moon, 2011)

3.4.1. Via MAPK

L'activació citoplasmàtica de la tirosina quinasa dels EGFR a través de la fosforilació permet que s'hi uneixi el complex Grb2/Sos, component essencial durant l'inici de l'activació de la via de les MAPKs (Figura 31). La proteïna adaptadora Grb2 posseeix un domini SH2, que interacciona amb els residus fosfo-tirosina del receptor, i dos dominis SH3 que interaccionen amb factors que intercanvien nucleòtids de guanina, com poden ser Sos1/2. Un cop format el complex Grb2/Sos, es translocarà a la membra plasmàtica estimulant l'intercanvi de nucleòtids en Ras, provocant la transformació de ras-GDP a Ras-GTP (forma activa) (Lowenstein i altres, 1992). La forma activa de Ras és capaç d'interaccionar i activar les serina/treonina quinases Raf-1, A-Raf i B-Raf, generalment anomenades MAPKKK (“mitogen-activated protein kinase

Introducció

kinase kinase”). A continuació, les MAPKKK s’encarreguen de fosforilar a les tirosina/treonina quinases MEK1/2 (de l’acrònim “MAP/ERK kinases 1 i 2”, conegudes com MAPKK (“mitogen-activated protein kinase kinase”). Finalment, les MAPKK fosforilen a les serina/treonina quinases ERK1/2 (“extracellular-regulated kinase 1 i 2”) o també anomenades MAPK. L’activació de les ERK1/2 permet la fosforilació de diferents proteïnes localitzades en la membrana plasmàtica i en el citoplasma, amb l’objectiu final d’activar altres vies de senyalització i fosforilar múltiples factors de transcripció, com poden ser c-Myc, c-Jun, c-Fos, i així activar i inhibir la transcripció de determinats gens (Davis, 1993). Diversos estudis han demostrat que l’activació de la via Ras/MAPK regulada a través dels EGFR és essencial per la proliferació cel·lular (Osaki i altres, 2011; Roberts i Der, 2007; Walker i altres, 1998; Dent, 2014).

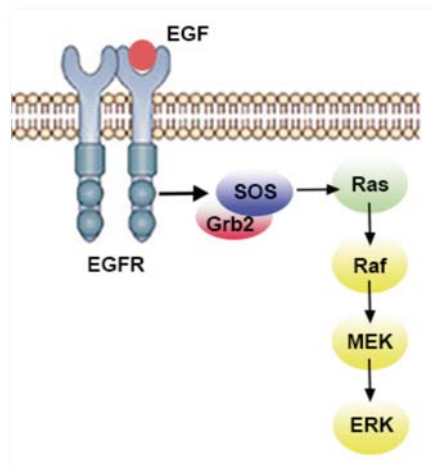


Figura 31. Regulació de la via MAPK a través de la via EGFR
(adaptat de Roberts i Der, 2007)

3.4.2. Via PI3K/Akt

Gràcies als EGFR, la via PI3K s’activa i com a conseqüència es produeix PIP3 (“phosphatidyl inositol triphosphate”), la qual interacciona amb Akt. A continuació, Akt fosforila indirectament a mTOR (“mammalian target of rapamycin”), un regulador imprescindible del creixement cel·lular i la proliferació (Figura32). En general, l’activació d’Akt regula múltiples processos biològics, on s’hi inclou l’apoptosi i la proliferació cel·lular (Wang i altres, 2000).

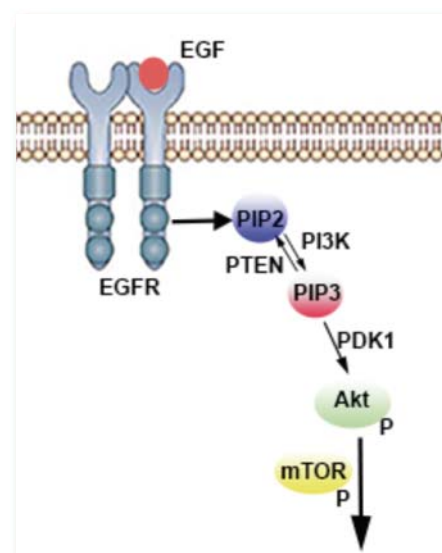


Figura 32. Regulació de la via PI3K/Akt a través de la via EGFR
(adaptat de www.cellsignal.com)

3.4.3. Via PLC γ

Les fosfotirosines de la conformació activa dels EGFR són capaces d'interaccionar amb les fosfolipases PLC γ , amb l'objectiu principal d'augmentar la concentració del calci citoplasmàtic. L'activació de l'enzim PLC γ permet la hidròlisi de PIP₂ ("phosphatidyl inositol triphosphate 4,5-bisphosphate"), per formar els missatgers secundaris IP₃ ("Inositol 1,4,5-trisphosphate") i DAG ("1,2-diacylglicerol") (Margolis i altres, 1989). DAG està implicat en l'activació de determinades isoformes de PKC ("protein kinase C"), mentre que IP₃ difon cap al reticle endoplasmàtic (RE) on s'unirà amb el seu receptor, un canal de calci amb la funció d'alliberar ions de calci del reticle endoplasmàtic (Figura 33).

Gràcies a l'activació de la via PLC γ a través dels EGFR es poden regular processos essencials com l'apoptosi, la migració o la diferenciació (Thomas i altres, 2003).

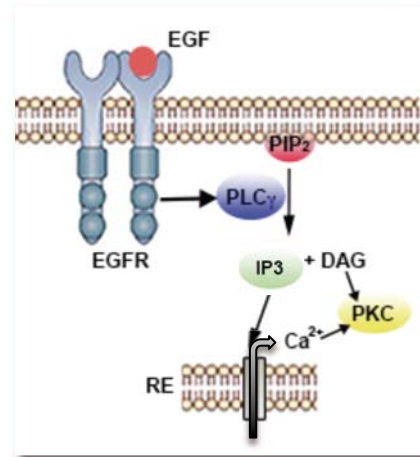


Figura 33. Regulació de la via PLC γ a través de la via dels EGFR (adaptat de www.biosignalling.com)

3.4.4. Via JAK/STAT

En la majoria de les vies activades pels EGFR es genera una accentuació de la proliferació o de la supervivència cel·lular però en el cas de la via JAK/STAT succeeix al contrari. La seva activació a través dels EGFR (Figura 34) provoca una interrupció de la proliferació cel·lular de determinades cèl·lules tumorals i una inducció apoptòtica, gràcies a les proteïnes STAT ("signal transducers and activators of transcription") que augmenten l'expressió de l'inhibidor del cicle cel·lular p21, bloquejant-lo i de la caspasa 1, proteasa implicada en el procés de l'apoptosi (Chin i altres, 1997).

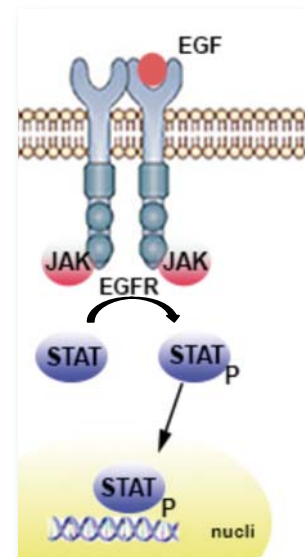


Figura 34. Regulació de la via JAK/STAT a través de la via EGFR (adaptat de www.biomedcentral.com)

3.5.- Importància dels EGFR durant el desenvolupament del càncer

Múltiples càncers humans són capaços d'utilitzar diferents mecanismes per activar notablement la via dels EGFR, ja sigui amb una accentuada producció dels seus lligands, una sobreexpressió dels receptors o una activació constitutiva d'aquests. Com a conseqüència, la via dels EGFR patirà una hiperactivació i generarà una potent proliferació cel·lular durant el desenvolupament de múltiples càncers (Taula 3).

Avui dia, hi ha diversos models de ratolins que ens permeten explorar els efectes de la via de senyalització dels EGFR durant la malaltia del càncer, generant “knockouts” dels diferents EGFR (Sibilia i Wagner, 1995; Lee i altres, 1995) o mutacions específiques (Perera i altres, 2005). Així, sistemes transgènics i determinats estudis amb ratolins que han patit un xenoempelt de diferents tumors humans (Troiani i altres, 2008) han permès avaluar el paper de la via dels EGFR i buscar potencials teràpies contra el càncer.

A l'hora d'estudiar els efectes de la via dels EGFR durant la tumorigènesi és essencial caracteritzar l'actuació dels receptors, però cal tenir en compte també la funció dels lligands, dintre dels quals el més rellevant és el TGF- α . El qual intervé en múltiples carcinomes (càncer amb origen a les cèl·lules de tipus epitelial) especialment de pulmó, ovari i colon (Modjtahedi i altres, 1994).

Analitzant els receptors, la sobreexpressió d'erbB1 es relaciona amb una hiperproliferació i freqüentment amb alteracions genètiques en tumors cerebrals (Salomon i altres, 1995). En el cas d'erbB2, múltiples càncers sobreexpressen aquest receptor (Ross i Fletcher, 1998) i el seu efecte ha sigut extensament estudiat en el càncer de mama (Karunagaran i altres, 1996). En general, el seu efecte està relacionat amb un alt percentatge de cèl·lules en fase S, que representa un avantatge per les cèl·lules tumorals per poder hiperproliferar (Ross i Fletcher, 1998). Finalment, els efectes cancerígens de la sobreexpressió d'erbB3 i 4 no es coneixen tant profundament però s'han trobat casos de co-expressió de erbB3 amb erbB2 o erbB1, o erbB4 amb erbB2 que s'associen amb tumors epitelials, com poden ser el medul·loblastoma infantil.

Aquest efecte potencialment implicat de la via dels EGFR en el càncer ha induït no només el seu propi anàlisi, si no l'estudi exhaustiu de les vies que activa "downstream" (veure apartat 3.4), ja que podrien significar un mecanisme clau per impedir la invasió tumoral, a la vegada que un descobriment de noves teràpies antimitòtiques.

MOL·LÈCULA	ORIGEN DE LA DESREGULACIÓ	TIPUS DE CÀNCER	REFERÈNCIES
LLIGANDS			
TGF- α	sobreexpressió	pròstata	Scher i altres, 1995
	sobreexpressió	pàncrees	Yamanaka i altres, 1993
	sobreexpressió	pulmó, ovari, colon	Salomon i altres, 1995
NRG1	sobreexpressió	adenocarcinoma de mama	Krane i Leder, 1996
RECEPTORS			
EGFR	sobreexpressió	de mama, coll, pròstata, fetge	Gorgoulis i altres, 1992
	sobreexpressió	glioma	Wong i altres, 1992
	mutació (supressió)	glioma, pulmó, ovari, de mama	Moscatello i altres, 1995
ErbB2	sobreexpressió	de mama, pulmó, pàncrees, colon, esòfag, endometri, cèrvix	Ross i Fletcher, 1998
ErbB3	expressió	de mama, colon, gàstric, pròstata,	Lyne i altres, 1997; Xia i altres, 1999
	sobreexpressió	càncer oral escamós	Shintani i altres, 1995
ErbB4	expressió reduïda	de mama, pròstata	Kew i altres, 2000
	expressió	medul·loblastoma infantil	Gilbertson i altres, 1997

Taula 3. Expressió dels EGFR i els seus lligands en diferents càncers (Yarden i Sliwkowski, 2001).

3.5.1.- EGFR i teràpies contra el càncer

Un dels motius pels quals els EGFR s'han convertit en elements essencials per l'estudi del càncer és la seva implicació durant la realització de teràpies dirigides contra aquesta malaltia, ja que la gran majoria d'aquests tractaments s'encarreguen de bloquejar receptors específics de factors de creixement que participen en la proliferació de les cèl·lules cancerígenes, entre ells els EGFR, amb l'objectiu de bloquejar el creixement i l'expansió del càncer (Chong i Jänne, 2013). Algunes d'aquestes teràpies dirigides que bloquegen els EGFR són:

Introducció

- **trastuzumab** (Herceptina®) aprovat per determinats tipus de càncer de mama i adenocarcinoma gàstric. En aquest cas, la teràpia consta d'un anticòs monoclonal que s'uneix al receptor HER-2, ja que es troba expressat a altes concentracions en diversos càncers, amb l'objectiu d'impedir que el receptor envii senyals que promoguin el creixement.
- **pertuzumab** (Perjeta™) és un anticòs monoclonal que s'uneix a HER-2 expressat en determinats càncers de mama, a una regió diferent a la que s'uneix trastuzumab que impedeix la heterodimerització junt amb l'EGFR.
- **lapatinib** (Tykerb®) també actua contra càncers de mama inhibint el receptor HER-2 per impedir el creixement cel·lular.
- **gefitinib** s'uneix a específics EGFR per actuar contra el càncer pulmonar.
- **erlotinib** actua de forma molt similar que gefitinib, inhibint EGFR per impedir expansió càncer de pulmó.

3.6.- Processos biològics regulats per la via EGFR

La via de senyalització dels EGFR s'ha relacionat amb múltiples processos biològics, de manera que la seva regulació és capaç de generar efectes pleiotròpics com són la regulació del cicle cel·lular, inhibició de l'apoptosi, angiogènesi, motilitat cel·lular tumoral, diferenciació, migració, invasió o metàstasis. Aquest efecte pleiotròpic es deu a la seva capacitat de governar nombroses rutes de senyalització "downstream" (veure apartat 3.4). En segon lloc, aquestes vies regulades específicament per la ruta dels EGFR poden contribuir en múltiples respostes a la vegada.

L'estudi d'aquesta via de senyalització ha sigut possible gràcies a l'extrapolació d'experiments *in vitro*, interrompent la seva regulació *in vivo* a l'afegir o bloquejar els diferents lligands i, més recentment, a l'avenç en l'enginyeria genètica, per exemple, analitzant els efectes dels seus "knockouts" or "knockdowns". Així, s'ha pogut conèixer la seva funció durant el desenvolupament de diversos organismes com *Drosophila* (Sukhanova i altres, 2011) o *C. elegans* (Liu i altres, 1999) i, més recentment, gràcies a la

generació de ratolins transgènics s'ha pogut analitzar la funció individualitzada de nombrosos lligands i receptors de la via, amb l'objectiu d'entendre el seu efecte més complex durant el desenvolupament dels mamífers (Burgess, 2008).

En termes generals, la simple possibilitat de controlar la regulació de la via dels EGFR ofereix nombroses oportunitats terapèutiques millorades en tres àrees bàsiques, essencials avui dia: el tractament contra el càncer, la reparació dels òrgans i la proliferació cel·lular.

3.6.1.- Regulació de la via dels EGFR durant la proliferació

Coneguts com a factors mitogènics, els EGF es caracteritzen per estimular la proliferació de nombrosos tipus cel·lulars, especialment fibroblasts i cèl·lules epitelials.

Diversos estudis han demostrat el paper crític de la via dels EGFR durant la neurogènesi dels mamífers (Yamada i altres, 1997). La neurogènesi és un procés essencial que cal regular acuradament, ja que aportarà al cervell de l'organisme adult la capacitat de funcionar correctament i intentar adaptar-se davant determinades situacions adverses o malalties. Els EGFR s'expressen àmpliament en el sistema nerviós, on s'hi inclouen els neuroblasts i neurones en desenvolupament; l'expressió dels EGFR assoleix un pic abans del naixement de l'organisme i decreix considerablement moments després del naixement, per acabar adquirint un nivell basal al llarg de la seva vida, aquest fet suggereix un paper regulador dels EGFR durant la neurogènesi.

En ratolins, els EGFR regulen la proliferació, junt amb la diferenciació, maduració i supervivència d'una gran varietat de neurones, de manera que ratolins transgènics on s'inactiven els EGFR generen malalties neurodegeneratives i moren al mes de vida (Wong i Guillaud, 2004). S'ha vist que la via dels EGFR actua sobre cèl·lules mitòtiques però també en neurones post-mitòtiques i diversos estudis han demostrat que tenen un efecte neuromodulador en diferents tipus de neurones. Concretament, s'ha descobert el paper crucial que afronten els EGFR durant la proliferació i diferenciació dels astròcits durant la neurogènesi, convertint-se en elements imprescindibles pel

seu correcte desenvolupament (Wong i Guillaud, 2004).

D'altra banda, estudis recents en el mol·lusc *Crassostrea gigas* han demostrat per exemple que els EGFR (*cgegfrs*) tenen una funció essencial per regular la proliferació cel·lular durant el tancament de la ferida, mitjançant l'activació de la via de les MAPK (Sun i altres, 2014).

3.6.2.- Regulació de la via dels EGFR durant la diferenciació

En determinats organismes, com el nematode *Caenorhabditis elegans* i la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* s'ha demostrat la funció primordial dels EGFR durant la regulació de diversos llinatges cel·lulars, en diferents estadis del seu desenvolupament, estimulant la seva diferenciació.

El receptor EGF de *Drosophila* (DER) juga un paper essencial en diversos estadis del seu desenvolupament, on s'hi inclou l'embriogènesi, l'oogènesi i el desenvolupament de les ales o els ulls. Nombrosos estudis apunten que durant el desenvolupament de l'ull de *Drosophila*, DER és necessari per la diferenciació de nombrosos tipus cel·lulars (Sukhanova i altres, 2011; Baonza i altres, 2001). L'estudi en determinats mutants dels efectes de l'absoluta absència de DER i de determinats elements de la via MAPK (Ras o Raf) ha demostrat que l'especificació de la majoria de les cèl·lules dels omatidis (unitats sensorials formades per cèl·lules fotoreceptores) depèn de l'activació de Ras i Raf gràcies a la via dels EGFR (Yang i Baker, 2001).

Un altre cas on la regulació de la via dels EGFR intervé en la diferenciació cel·lular és el desenvolupament de la vulva de *C. elegans*. Aquest òrgan es forma durant l'estadi larvari del nematode a partir de sis cèl·lules anomenades 'precursors cel·lulars de la vulva' (VPC); la cèl·lula que connecta el revestiment de la gònada amb les cèl·lules precursors de la vulva s'anomena cèl·lula d'anclatge, la qual secreta la proteïna LIN-3, una molècula homòloga als EGF. Aquest lligand LIN-3 és reconegut en les VPC gràcies a LET-23, un receptor de la subfamília dels EGFR. S'ha demostrat que la funció de LET-23 en les VPC és essencial per poder respondre al senyal que indueix la diferenciació de la vulva, ja que la pèrdua de funció de LET-23 implica una no inducció de la seva formació (Aroian i Sternberg, 1991).

Seguint amb l'organisme *C. elegans*, la via dels EGFR pot jugar un paper important durant la diferenciació neuronal. Per exemple, l'expressió del lligand LIN-3 induïx un estat letàrgic al nematode a l'activar el receptor que s'expressa en la neurona ALA; la coordinació de la diferenciació d'aquesta neurona i l'expressió de l'EGFR és vital durant l'activació d'aquest estat (Buskirk i Sternberg, 2010).

3.6.3.- Regulació de la via dels EGFR durant la regeneració

Com ja s'ha esmentat anteriorment, els EGFR estan àmpliament expressats en el sistema nerviós dels mamífers. Per aquest motiu, no és d'estranyar que elements de la família dels EGF estiguin freqüentment implicats en la regulació de la capacitat regenerativa neuronal.

L'activació de mTOR, un regulador de la via PI3k/Akt, promou el creixement cel·lular i induïx la regeneració axonal, de manera que si s'aplica rapamicina, un inhibidor de mTOR, es bloqueja aquesta regeneració (Gong i altres, 2006). Diversos estudis han demostrat que, després d'una lesió neuronal, la inducció de la regeneració axonal després de l'activació de mTOR és possible gràcies a l'activació dels EGFR, ja que aquesta permet la fosforilació de la via PI3k/Akt (Xu i altres, 2014).

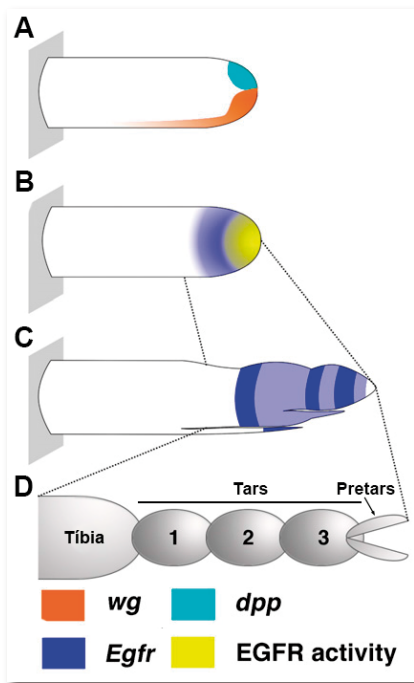
Altres organismes com el gastròpode *Lymnaea stagnalis* també augmenten l'expressió dels EGF (L-EGF) en el CNS de l'organisme adult a conseqüència d'una lesió neuronal (Hermann i altres, 2000). Alguns estudis han demostrat que una administració de L-EGF purificat durant 48h al CNS accentua considerablement la regeneració axonal de diferents tipus neuronals a la vegada. Paral·lelament, aquest efecte terapèutic dels L-EGF pot quedar antagonitzat si s'aplica un inhibidor dels EGFR selectiu. Aquests resultats suggereixen que els lligands L-EGF contribueixen favorablement a la resposta regenerativa del sistema nerviós davant una ferida (Wildering i altres, 2001).

D'altra banda, la via dels EGFR s'ha relacionat en alguns casos amb la regeneració de les extremitats de determinats organismes, com per exemple, els artròpodes. Els artròpodes són capaços de regenerar apèndixs amputats,

Introducció

com en el cas de les paneroles o els grills, els quals presenten un estadi de nimfa amb una important capacitat regenerativa.

En el cas del grill *Gryllus bimaculatus*, la via dels EGFR juga un paper important en l'establiment de l'eix proximo-distal (PD) durant la regeneració de l'extremitat (Figura 35; Nakamura i altres, 2008). L'anàlisi d'experiments que impliquen la pèrdua de funció del *Gb'EGFR* (acrònim del receptor EGF de *Gryllus bimaculatus*), a través d'experiments ARNi en animals regenerants, demostren defectes morfològics clars en les estructures distals. En conclusió, la via dels EGFR és essencial per la regeneració correcta dels tars i pretars, gràcies a la creació d'un gradient de l'activitat de la via dels EGFR en l'eix PD.



Aquesta implicació de la via dels EGFR durant l'establiment de l'eix PD de les extremitats succeeix també durant el desenvolupament de les potes de *Drosophila*, junt amb l'activació de l'expressió d'altres gens com *Distalless* (Dll) i *dachshund* (Campbell, 2002; Galindo i altres, 2002). Així, elements de la via dels EGFR actuen com a organitzadors que s'encarreguen de regular el patró PD dels tars, sent els lligands spitz i *keren* (membres de la família dels TGF- α) i Vn (neuregulina) els principals factors reguladors involucrats.

Malgrat que s'ha pogut estudiar en detall la funció dels EGFR durant l'establiment de l'eix PD en el desenvolupament de les extremitats de

Drosophila o de *Gryllus bimaculatus*, no es coneix exactament quin és el paper d'aquesta via durant l'establiment del patró PD de les extremitats dels vertebrats. Estudis recents han postulat una clara analogia entre aquesta funció distalitzant d'EGFR a *Drosophila* i la funció de la via FGF durant la regeneració de l'extremitat dels vertebrats (Nacu i Tanaka, 2011; Campbell, 2002; Martin, 1998); a més a més, els dos receptors FGFR i EGFR presenten una gran similitud (tant els FGFR com els EGFR són receptors RTK), però encara queden diverses qüestions obertes que caldria resoldre en un futur per conèixer exactament la implicació de la via dels EGFR durant la regulació del patró PD en la regeneració de les extremitats de les salamandres.

3.7.- La via dels EGFR als Plathelminths

Tal i com hem vist, múltiples estudis han permès relacionar la via de senyalització dels EGFR amb processos biològics tan importants com la proliferació i la diferenciació en un ventall enorme d'organismes.

Ara bé, la majoria d'estudis que es coneixen sobre la via dels EGFR en els platihelminths són indirectes i són molt pocs els que s'han realitzat en les planàries. Per aquest motiu, la funció concreta d'aquesta via durant la regeneració de les planàries és desconeguda.

En primer lloc, estudis específics en determinats platihelminths amb capacitat regenerativa, com ara *Stenostomum leucops* i *Microstomum lineare* (Reuter i Kuusisto, 1992) o *Diphyllbothrium dendriticum* (Gustafsson i altres, 1995) han analitzat la immunoreactivitat (IR) de diversos anticossos comercials contra alguns factors de creixement epidèrmics i receptors de vertebrats i en tots els casos s'ha observat una localització d'aquests en el sistema nerviós (Figura 36a). A més a més, en el cas de *Diphyllbothrium dendriticum* s'ha confirmat la localització específica de cèl·lules EGF-IR en regions característiques que presenten un creixement actiu, amb la presència de cèl·lules mitòtiques (Figura 36b), de manera que s'ha correlacionat la presència d'EGF-IR amb l'índex de creixement/activitat mitòtica (Gustafsson i altres, 1995).

Introducció

Altres estudis immunocitoquímics utilitzant antisèrums de mamífers contra alguns d'aquests factors en planàries, han servit per detectar immunoreactivitat (IR) en el sistema nerviós perifèric i central (Baguñà i altres, 1990), coincidint amb l'efecte mitogènic d'alguns productes neurosecretors postulat anteriorment en el sistema nerviós (Brøndsted, 1969).

S'han identificat membres dels EGFR en determinats platihelminths paràsits, com el cestode *Schistosoma mansoni*, que presenta un EGFR (SER) principalment localitzat en el teixit muscular i per aquest motiu s'ha suggerit la seva implicació durant la formació d'aquest teixit (Shoemaker i altres, 1992), o el paràsit humà *Echinococcus multilocularis* (Spiliotis i altres, 2003).

En general, es creu que la via dels EGFR podria estar conservada en els platihelminths paràsits, on jugaria un paper clau durant la interacció hoste-paràsit (Dissous i altres, 2006).

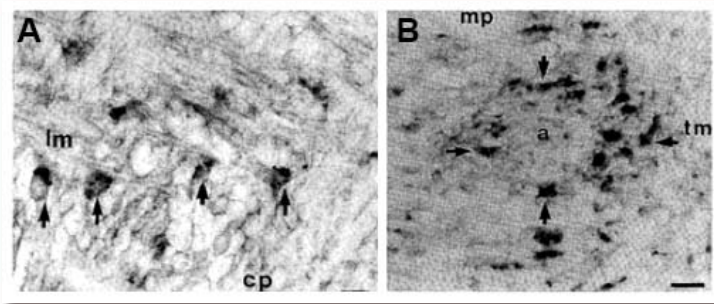


Figura 36. Immunoreactivitat de l'anti-EGF (IR-EGF) a *Diphyllobothrium dendriticum*.

A) IR-EGF en les cèl·lules nervioses (fletxes) al voltant de la capa externa muscular de la larva plerocercóide. B) IR-EGF en cèl·lules que es troben localitzades a la perifèria on tenen lloc les divisions mitòtiques (fletxes). lm: capa externa muscular, cp: parènquima cortical, mp: parènquima medullar, tm: capa muscular transversa. Barra d'escala, 25µm (adaptat de Gustafsson i altres, 1995)

A partir de diversos treballs de finals dels anys 70, s'ha postulat l'efecte proliferatiu (estimulador o inhibidor) de diversos factors de creixement (entre ells l'EGF), neuropèptids i neurotransmissors aïllats a partir de diferents vertebrats (majoritàriament mamífers) i invertebrats, durant la regeneració i la homeòstasi de les planàries (Franquinet, 1979; Saló i Baguñà, 1986; Baguñà i altres, 1989b).

En relació als neurotransmissors, múltiples treballs han demostrat la seva funció durant la regeneració de les planàries en diversos casos (Cebrià, 2007). Així, mitjançant inhibidors de la dopamina, es redueix considerablement

la regeneració d'aquests platihelminths (Franquinet, 1979). La noradrenalina i el propranolol (un antagonista β -adrenèrgic) modifiquen la taxa de la proliferació (Lenicque, 1974; Franquinet, 1979). Posteriorment s'ha demostrat que la serotonina també estimula la proliferació, mitjançant drogues anti-serotoninèrgiques que reduïen la regeneració (Franquinet i altres, 1978). Contràriament, somatostatina podria estar inhibint la proliferació (Bautz i Schilt, 1986; Hori i Kishida, 2003; Kreshchenko i altres, 2008).

S'ha suggerit també un rol important de diversos neuropèptids i factors de creixement durant la regulació de la proliferació dels neoblasts. Estudis en la planària *Girardia tigrina* han demostrat que el neuropèptid F presenta un efecte estimulador de l'activitat mitòtica dels neoblasts (Kreshchenko i altres, 2008).

D'altra banda, el subministrament de la substància P, substància K (pèptids que pertanyen a la família de les taquicinines) o d'EGF en planàries intactes *Dugesia tigrina* augmenta significativament l'índex mitòtic d'aquests organismes, sobretot en el cas de la substància K (Figura 37a; Saló i Baguñà, 1986; Baguñà i altres, 1989b).

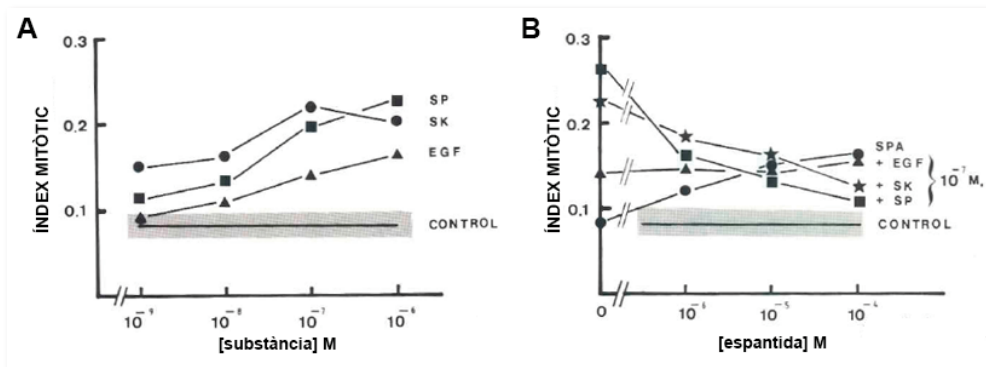


Figura 37. Efecte estimulador de la substància P, K i EGF en l'índex mitòtic en planàries intactes. A) La incubació de la substància P (SP), K (SK) i EGF durant 15 hores en planàries intactes augmenta l'índex mitòtic en comparació amb els animals control (no tractats). B) El tractament d'espantida (SPA) té un efecte inhibitori en l'índex mitòtic al coincubar-lo amb la substància P, K i EGF durant 15 hores en planàries intactes. Índex mitòtic: mitosis/100 nuclis. (adaptat de Baguñà i altres, 1989b).

S'ha comprovat que les concentracions que activen la proliferació cel·lular són molt semblants a les establertes en el cas dels mamífers. Per tal d'establir l'especificitat d'aquests elements, s'han realitzat altres experiments on els organismes s'incuben amb un antagonista de la substància P,

Introducció

anomenat *espantida*. El resultat són variables: en un tractament on es combina *espantida* amb substància P o substància K, *espantida* impedeix l'efecte d'aquests pèptids a l'augmentar l'índex mitòtic. D'altra banda, la co-incubació d'*espantida* i EGF no modifica l'efecte d'EGF durant la proliferació cel·lular (Figura 37b; Baguñà i altres, 1989b).

En conclusió, l'efecte estimulador d'aquestes substàncies semblaria estar regulat per receptors específics en cada un dels casos i s'ha presentat un model on neuropèptids, factors de creixement i neurotransmissors poden ser alliberats en grans quantitats des de diverses cèl·lules nervioses a l'espai extracel·lular. Un cop activats els seus receptors, s'accelerarien determinats senyals en les cèl·lules indiferenciades (neoblasts) que acceleren la seva divisió i com a resultat la proliferació cel·lular en aquests organismes augmentaria notablement (Figura 38; Baguñà i altres, 1989b).

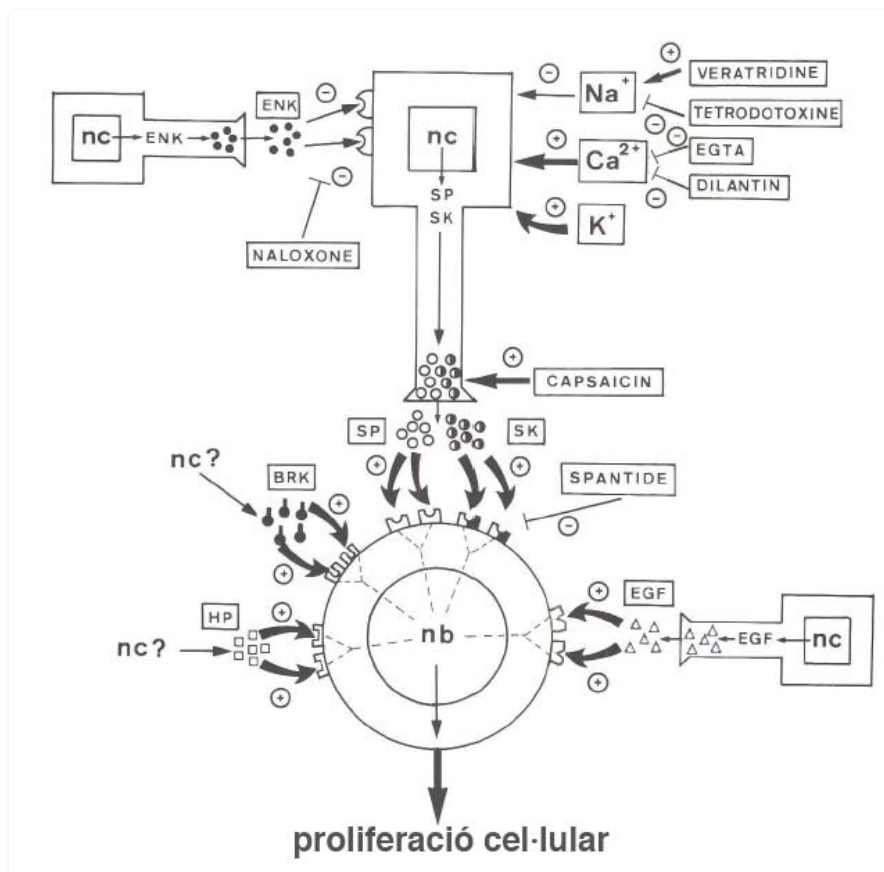


Figura 38. Diagrama dels possibles efectes i interaccions entre neuropèptids, factors de creixement i els seus receptors, cèl·lules diana (neoblasts) i cèl·lules neuronals en planàries. nb, neoblast, nc, cèl·lula neuronal, SP, substància P. SK, substància K, BRK, bradykinin, H, Hydra Peptide, EGF, factor de creixement epidèrmic (adaptat de Baguñà i altres, 1989b).

Cal tenir en compte però, que totes aquestes observacions sobre els efectes dels neurotransmissors, neuropèptids i factors de creixement durant la regulació de la proliferació es basen en estudis farmacològics indirectes. Amb l'objectiu d'ampliar el coneixement de la via específica dels EGFR en les planàries, vam prosseguir a caracteritzar diversos dels seus elements en la nostra espècie *S. mediterranea*, analitzant en més detall la seva funcionalitat durant la regeneració i la homeòstasi.

Objectius

L'**objectiu principal** d'aquesta tesis doctoral és:

- I. Caracteritzar funcionalment la via de senyalització dels EGFR durant la regeneració i la homeòstasis d'*Schmidtea mediterranea*.

Els **objectius específics** que han sorgit al llarg de la tesis són:

- I. Clonar els tres gens homòlegs als receptors dels EGF identificats a partir de cerques *in silico* sobre el genoma d'*Schmidtea mediterranea*, els quals hem anomenat *Smed-egfr-1*, *2* i *3*.

NOTA

Dels 3 EGFR identificats, durant aquesta tesis doctoral ens hem centrat a analitzar en detall exclusivament l'*Smed-egfr-3*.

- II. Analitzar el patró d'expressió d'*Smed-egfr-3* en organismes intactes i regenerants.
- III. Realitzar un estudi detallat de la funcionalitat d'*Smed-egfr-3*, mitjançant el seu silenciament gràcies a la tècnica d'interferència de l'ARN (ARNi).
- IV. Caracteritzar el fenotip morfològic obtingut al silenciar *Smed-egfr-3*, mitjançant múltiples marcadors moleculars i a través d'immunotincions amb anticossos comercials diversos.
- V. Analitzar en més detall l'efecte del silenciament d'*Smed-egfr-3* sobre possibles gens i vies de senyalització "downstream", a partir d'experiments de *Digital Gene Expression* (DGE), que permeten identificar quins gens estan "up"- o "down-regulated" en els animals *Smed-egfr-3*(ARNi) tractats respecte els control.

Objectius

- VI. Seleccionar detalladament els candidats obtinguts en aquestes llibreries gèniques, centrant-nos amb aquells relacionats amb processos biològics com neurogènesis, proliferació, diferenciació, apoptosi, càncer, tumorigènesis i sistema immunitari (processos regulats per la via dels EGFR en altres organismes).
- VII. Analitzar el patró d'expressió d'una àmplia llista d'aquests candidats seleccionats a partir del *DGE* i caracteritzar la seva funció, centrant-nos concretament amb l'*egr-4*, un membre de la família dels gens "*early growth response*", ja que el seu silenciament resulta en defectes en la diferenciació similars al fenotip obtingut en els animals *Smed-egfr-3*(ARNi) tractats.
- VIII. Estudiar l'efecte del silenciament d'*egr-4* durant la regeneració anterior, dedicant una especial atenció a la diferenciació del sistema nerviós.
- IX. Identificar quins gens estan "*up*"- o "*down-regulated*" en els animals *egr-4*(ARNi) tractats respecte els control, dissenyant llibreries gèniques mitjançant la tècnica d'*RNAseq*, amb l'objectiu de conèixer la connexió d'aquest membre de la família dels gens "*early growth response*" amb la via de senyalització dels EGFR en les planàries.

Resultats

Informe del director sobre la participació de la doctoranda i l'índex d'impacte de les publicacions

La memòria de la tesi doctoral presentada per Susanna Fraguas Garcia, titulada “Regulació de la regeneració anterior a través de la via *egfr-3/egr-4* en la planària *Schmidtea mediterranea*”, de la que sóc director, inclou 4 articles, dos d'ells en l'apartat de resultats i dos en l'apartat d'annexes. Tots els articles han estat publicats en revistes internacionals que consten en el PubMed, la base de dades més important de ciències biomèdiques. També estan incloses a la *ISI Web of Science* i en tots els casos es tracta de publicacions que han passat pel filtre d'avaluadors anònims designats pels editors de les revistes. A continuació es detallen per a cadascun dels articles els índexs d'impacte i la posició en el llistat ordenat d'especialitats corresponents (dades del *Journal Citation Reports* del *ISI Web of Science*, edició 2012), així com la contribució relativa de la Susanna Fraguas en cadascun d'ells.

Apartat “Resultats”:

La doctoranda ha estat la principal responsable de l'execució i l'anàlisi de la major part dels resultats dels articles continguts en aquest apartat. La doctoranda ha participat també activament en el disseny experimental dels treballs realitzats, en la discussió i obtenció de conclusions i en la redacció dels manuscrits.

Article 1

Susanna Fraguas, Sara Barberán i Francesc Cebrià (2011). *EGFR signalling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis*. **Developmental Biology** 354: 87-101

El treball experimental presentat en aquest manuscrit ha estat realitzat majoritàriament per la Susanna Fraguas, sota la supervisió de Francesc Cebrià. La Susanna Fraguas ha estat l'encarregada de realitzar els experiments de l'anàlisi de l'expressió dels receptors de factors de creixement epidèrmics en planàries intactes i regenerants, així com tots els estudis funcionals relacionats amb el gen *Smed-egfr-3*. La Sara Barberán va realitzar els experiments relacionats amb el gen *Smed-egfr-1*. L'escriptura del manuscrit s'ha realitzat principalment entre Susanna Fraguas i Francesc Cebrià, i en menor part per Sara Barberán.

Factor d'impacte: 3,868

Posició en l'àrea: 11/41 (Àrea *Developmental Biology*)

Article 2

Susanna Fraguas, Sara Barberán, Marta Iglesias, Gustavo Rodríguez-Esteban i Francesc Cebrià (2014). *egr-4, a target of EGFR signalling, is required for the formation of the brain primordia and head regeneration in planarians*. **Development** 141: 1835-1847

El treball experimental presentat en aquest manuscrit ha estat realitzat majoritàriament per la Susanna Fraguas, sota la supervisió de Francesc Cebrià. La Sara Barberán va realitzar alguns experiments preliminars que van donar pistes de la funció del gen *egr-4* i va dur a terme experiments inclosos en la Figura 6. El Gustavo Rodríguez-Esteban va analitzar les dades dels experiments de Digital Gene Expression per identificar gens regulats per *Smed-egfr-3* i va generar les figures: Figura Suplementària 1, Figura Suplementària 2 i Taula Suplementària 2. L'escriptura del manuscrit així com el

disseny i la producció de les figures s'ha realitzat principalment entre Susanna Fraguas i Francesc Cebrià.

Factor d'impacte: 6,208

Posició en l'àrea: 5/41 (Àrea *Developmental Biology*)

Apartat “Annexes”:

La doctoranda ha tingut un protagonisme diferent en els 2 articles inclosos en aquest apartat d'annexes, tal i com s'especificarà a continuació:

Article 3 (Annexe 4)

Josep F. Abril, Francesc Cebrià, Gustavo Rodríguez-Esteban, Thomas Horn, Susanna Fraguas, Beatriz Calvo, Kerstin Bartscherer i Emili Saló (2010). *Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of Schmidtea mediterranea*. **BMC Genomics** 11: 731

En aquest article es va generar un transcriptoma de la planària *Schmidtea mediterranea* i es van analitzar les dades generades des de diferents perspectives. La feina realitzada per la Susanna Fraguas va ser la de generar la Taula 3 on es descriuen 62 receptors de neurotransmissors, pèptids i hormones identificats en aquest transcriptoma.

Factor d'impacte: 4.397

Posició en l'àrea: 31/161 (Àrea Genetics & Heredity)

21/160 (Àrea Biotechnology & Applied Microbiology)

Article 4 (Annexe 5)

Susanna Fraguas, Sara Barberán, Begoña Ibarra, Linda Stöger i Francesc Cebrià (2012). *Regeneration of neuronal cell types in Schmidtea mediterranea: an immunohistochemical and expression study*. **The International Journal of Developmental Biology** 56: 143-153

Resultats

En aquest treball, on van contribuir diferents membres del laboratori, la Susanna Fraguas va generar la major part dels resultats presentats. La Susanna Fraguas va realitzar els experiments presentats en les Figures 1-5. L'escriptura del manuscrit així com el disseny i la producció de les figures s'ha realitzat principalment entre Susanna Fraguas i Francesc Cebrià.

Factor d'impacte: 2.614

Posició en l'àrea: 24/41 (*Àrea Developmental Biology*)

El director,

Dr. Francesc Cebrià Sánchez

Barcelona, 12 de maig de 2014

Article 1:
*“EGFR signaling regulates cell proliferation,
differentiation and morphogenesis during
planarian regeneration and homeostasis”*

Susanna Fraguas, Sara Barberán i Francesc Cebrià

Departament de Genètica, Facultat de Biologia (Universitat de Barcelona)

Developmental Biology, 354: 87-101. Juny 2011

Resum.

La via de senyalització dels EGFR regula la proliferació cel·lular, la diferenciació i la morfogènesis durant la regeneració i la homeòstasis de les planàries

En aquest article es caracteritzen tres gens homòlegs als receptors dels EGF, anomenats *Smed-egfr-1,2,3*, els quals hem identificat a partir de cerques *in silico* sobre el genoma d'*Schmidtea mediterranea*. L'anàlisi del patró d'expressió mitjançant hibridacions *in situ* mostra diferències evidents entre els tres receptors. En primer lloc, *Smed-egfr-1* està principalment expressat en el sistema digestiu, mesènquima, faringe, boca, esòfag i dèbilment en les cèl·lules pigmentàries dels ulls. D'altra banda, *Smed-egfr-2* s'expressa en el sistema digestiu però no en la faringe. Finalment, *Smed-egfr-3* s'expressa en la faringe, el marge del cap i dèbilment en el sistema nerviós, a més a més, s'expressa en el mesènquima i al voltant de les branques del sistema digestiu, patró que recorda al dels neoblasts. Addicionalment, l'expressió d'*Smed-egfr-3* en el mesènquima i al voltant de les branques de l'intestí desapareix si s'eliminen els neoblasts mitjançant la irradiació de les planàries, però no observem cap canvi en l'expressió d'*Smed-egfr-1 i 2*. Per tant, podem concloure que *Smed-egfr-3* s'expressa tant en cèl·lules diferenciades com en els neoblasts, mentre que *Smed-egfr-1 i 2* s'expressen exclusivament en cèl·lules diferenciades.

L'estudi funcional dels tres EGFR, mitjançant el seu silenciament a través de la tècnica d'interferència de l'ARN (ARNi), mostra una participació de la via dels EGFR en múltiples processos biològics durant la regeneració de les planàries i la homeòstasi. *Smed-egfr-1* és necessari per a la regeneració de les cèl·lules pigmentàries dels ulls i la faringe. A més a més, el seu silenciament ocasiona una clara hiperproliferació i la formació d'uns bonys dorsals característics, tant en animals intactes com regenerants. D'altra banda, no es manifesta cap efecte evident després de silenciar *Smed-egfr-2*. Finalment, podem concloure que *Smed-egfr-3* és necessari per la formació del blastema i per la diferenciació de determinats tipus cel·lulars, generalment neuronals.



EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis

Susanna Fraguas, Sara Barberán, Francesc Cebrià*

Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Barcelona and Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), Av. Diagonal 645, edifici annex planta 1, 08028 Barcelona, Catalunya, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received for publication 13 December 2010

Revised 14 February 2011

Accepted 23 March 2011

Available online 31 March 2011

Keywords:

Planarian
Epidermal growth factor
Signaling pathway
Cell differentiation
Regeneration

ABSTRACT

Similarly to development, the process of regeneration requires that cells accurately sense and respond to their external environment. Thus, intrinsic cues must be integrated with signals from the surrounding environment to ensure appropriate temporal and spatial regulation of tissue regeneration. Identifying the signaling pathways that control these events will not only provide insights into a fascinating biological phenomenon but may also yield new molecular targets for use in regenerative medicine. Among classical models to study regeneration, freshwater planarians represent an attractive system in which to investigate the signals that regulate cell proliferation and differentiation, as well as the proper patterning of the structures being regenerated. Recent studies in planarians have begun to define the role of conserved signaling pathways during regeneration. Here, we extend these analyses to the epidermal growth factor (EGF) receptor pathway. We report the characterization of three epidermal growth factor (EGF) receptors in the planarian *Schmidtea mediterranea*. Silencing of these genes by RNA interference (RNAi) yielded multiple defects in intact and regenerating planarians. *Smed-egfr-1(RNAi)* resulted in decreased differentiation of eye pigment cells, abnormal pharynx regeneration and maintenance, and the development of dorsal outgrowths. In contrast, *Smed-egfr-3(RNAi)* animals produced smaller blastemas associated with abnormal differentiation of certain cell types. Our results suggest important roles for the EGFR signaling in controlling cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The process of regeneration involves a complex interplay between cell proliferation, differentiation and patterning to ensure that correctly organized tissues are produced at the right time and in the right place. Since the signaling pathways that control these processes during normal development are well described, a key question is the extent to which the same pathways are involved in regeneration. Answering this question will not only provide insights into this fascinating biological phenomenon but also yield potential molecular targets for use in regenerative medicine.

Recent research has shown that pathways such as the transforming growth factor β (TGF β)/bone morphogenetic protein (BMP), Notch, Wnt/ β -catenin, Hedgehog, JAK/STAT, epidermal growth factor receptor (EGFR) and fibroblast growth factor receptor (FGFR) pathways are conserved in classical models of regeneration and may play critical roles in the regenerative process (Sánchez-Alvarado and Tsonis, 2006). One such model is the freshwater planarian, which has been the focus of increasing interest due to its remarkable regenerative capacity and a

variety of characteristics that make it suitable for experimental manipulation (Agata et al., 2003; Newmark and Sánchez-Alvarado, 2002; Reddien and Sánchez-Alvarado, 2004; Saló, 2006). Planarian regeneration depends upon neoblasts, somatic pluripotent stem cells present in adult animals (Baguña et al., 1989a; Newmark and Sánchez-Alvarado, 2000). Numerous studies have now begun to explore the role of the main signaling pathways during planarian regeneration. It has been shown, for instance, that the TGF β /BMP pathway regulates dorsoventral polarity (Molina et al., 2007; Orii and Watanabe, 2007; Reddien et al., 2007), the Wnt/ β -catenin and hedgehog pathways control anteroposterior polarity (Gurley et al., 2008; Iglesias et al., 2008; Petersen and Reddien, 2008; Rink et al., 2009; Yazawa et al., 2009) and the FGF receptor signaling pathway controls the spatial restriction of brain tissues in the head region (Cebrià et al., 2002a).

To gain further insights into the role of major signaling pathways in controlling planarian regeneration, we have begun to characterize the EGF receptor (EGFR) pathway. EGFRs are transmembrane receptors with tyrosine kinase activity that regulate multiple biological processes, including cell proliferation and differentiation. In mammals, the EGFR family comprises 4 receptors: EGFR, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4. Through the binding of different ligands from the EGF family, this pathway plays an important role in the development of the CNS (Birchmeier, 2009; Wong and Guillaud, 2004; Xian and Zhou,

* Corresponding author. Fax: +34 934034420.

E-mail address: fcebras@ub.edu (F. Cebrià).

Resultats

2004). In addition, overactivation of this pathway is common in many human cancers, which makes it an interesting therapeutic target (Burgess, 2008; Normanno et al., 2006). In *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and the platyhelminthes *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus multilocularis* a unique homologue has been isolated (Aroian et al., 1990; Livneh et al., 1985; Shoemaker et al., 1992; Spiliotis et al., 2003). Previous studies have suggested that EGF could accelerate proliferation in planarians (Baguña et al., 1989b). Here, we report the characterization of three EGFRs in the planarian *Schmidtea mediterranea*. Silencing of *Smed-egfr-1* results in decreased regeneration of eye pigment cells, abnormal pharynges and mouth openings, and development of non-lethal dorsal outgrowths. *Smed-egfr-3* silencing results in smaller blastemas and abnormal differentiation of the cephalic ganglia and certain cell types during regeneration. Taken together, our data show that the EGFR signaling pathway regulates multiple processes associated with cell differentiation and morphogenesis during planarian regeneration.

Material and methods

Animals and gene nomenclature

S. mediterranea from the clonal line BCN-10 were used for all experiments. Animals were maintained as described (Molina et al., 2007). Genes and RNAi experiments were named using the nomenclature proposed by Reddien et al. (2008).

Gene cloning and phylogenetic analysis

The amino acid sequences of EGFRs from vertebrates and invertebrates were used to carry out tblastn searches on the *S. mediterranea* genome assembly (v3.1, Washington University Sequencing Center, available at <http://www.genome.wustl.edu>). Several contigs corresponding to three different genes were isolated. Specific primers were used to amplify those sequences from cDNA. Subsequent 3' and 5' RACE yielded partial sequences for the three EGFR homologues, missing the 5' ends. Similar searches and cloning strategies were used to clone *Smed-tph* (tryptophan hydroxylase), *Smed-th* (tyrosine hydroxylase) and *Smed-AGAT1* (Eisenhoffer et al., 2008). GenBank accession numbers for the genes reported here are: *Smed-th* HM777014, *Smed-tph* HM777015, *Smed-egfr-1* HM777018, *Smed-egfr-2* HM777017 and *Smed-egfr-3* HM777016.

For phylogenetic analyses, the tyrosine kinase domain from genes belonging to different families within this superfamily of receptors were obtained from pfam (Finn et al., 2010) and aligned with ClustalW2 (Larkin et al., 2007). A neighbor-joining tree was constructed using MEGA4 software (Tamura et al., 2007).

In situ hybridization

Whole-mount in situ hybridizations were performed as previously described (Molina et al., 2007; Umesono et al., 1997) using an Intavis InsituPro hybridization robot. For fluorescence in situ, samples were fixed and developed as previously described (Cebrià et al., 2007; Pearson et al., 2009) using Tyramide Signal Amplification (Perkin Elmer) according to the manufacturer's instructions. After in situ development, some animals were fixed in 4% PFA for 1 h at RT, blocked in 1% BSA in PBSTx (PBS containing 0.3% Triton X-100) and incubated with VC-1 antibody. All samples were observed through a Leica MZ16F stereomicroscope and images were captured with a ProgRes®C3 camera (Jenoptik). Confocal laser scanning microscopy was performed with a Leica SP2. After whole-mount in situ hybridization, some samples were embedded in a gelatin/albumin mixture and solidified with glutaraldehyde before preparing 30 µm transverse sections with a vibratome (Vibratome 1000 plus). A dose of

100 Gy was used in irradiation experiments, and animals were fixed and hybridized at the indicated time points.

RNAi

Double-stranded RNAs (dsRNA) for *Smed-egfr-1*, *Smed-egfr-2* and *Smed-egfr-3* were synthesized and delivered as described elsewhere (Sánchez-Alvarado and Newmark, 1999). Control animals were injected with water or dsRNA for GFP. In experiments involving more than one round of dsRNA injection and amputation, 3–4 days elapsed between each round of injection/amputation. For experiments in intact planarians, animals were injected for 3 consecutive days, cultured for 2 weeks and then re-injected on 3 more days. All animals were injected ventrally at different pre- and post-pharyngeal positions to rule out the possibility that the defects observed were related to the wounding produced by the injection. To avoid off-target effects of RNAi and confirm the specificity of the phenotypes observed, two different, non-overlapping regions of each *Smed-egfr-1* and *Smed-egfr-3* were used to synthesize dsRNA. For each gene, both dsRNA yielded the same phenotypes. The efficiency of RNAi silencing was checked by in situ hybridization (see Fig. S1). Combinatorial RNAi between the different planarian EGFRs did not generate synergistic or additional phenotypes to those observed after single RNAi. *Smed-egfr-2* (RNAi) did not yield any phenotype.

Immunostaining

Immunostainings were carried out as described elsewhere (Cebrià and Newmark, 2005). The following antibodies were used: VC-1, specific for planarian photosensitive cells (diluted 1/15,000, Sakai et al., 2000); anti-SYNORF1, specific for synapsin and used as a pan-neural marker (diluted 1/50, Developmental Studies Hybridoma Bank); anti-SMED-βCAT2, used to label the pharyngeal epithelial cells (diluted 1/1000, Chai et al., 2010); TMUS13, specific for myosin heavy chain (diluted 1/5, Cebrià et al., 1997); AA4.3, against α-tubulin to detect the dorsal epithelial cilia (diluted 1/20, Developmental Studies Hybridoma Bank); and anti-phospho-histone H3 (H3P) to detect mitotic cells (diluted 1/1000, Millipore #04-817). Alexa 488-conjugated goat anti-mouse and Alexa 568-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies (Molecular Probes) were used at a 1/400 and 1/1000 dilutions, respectively. Samples were mounted in SlowFade® Gold antifade (Invitrogen). Confocal laser scanning microscopy was performed with a Leica TCS-SPE and a Leica SP2.

Lectin and TUNEL staining

Lectin staining was performed essentially as described in Zayas et al. (2010). Blocking was done in 2% BSA in PBSTx. When lectin staining was done in combination with immunostaining, the lectins were added together with the secondary antibodies. Nuclear counterstaining was done with DAPI (1 µg/ml) overnight at 4 °C. Apoptotic cells were labeled as previously described (Pellettieri et al., 2010). Samples were imaged with a Leica TCS-SPE confocal laser scanning microscope.

Results

Three EGFRs in *S. mediterranea*

Three contigs containing open reading frames with high homology to EGFRs were isolated by tblastn searches of the planarian genome. Sequence analysis showed that all of them contained a tyrosine kinase domain highly similar to the domain found in other members of the EGFR family (see Fig. S2). Phylogenetic analysis confirmed that the planarian genes belonged to the EGFR family (see Fig. S3). These genes were named *Smed-egfr-1*, *Smed-egfr-2* and *Smed-egfr-3*.

Smed-egfrs are expressed in different cell types

Smed-egfr-1 was mainly expressed in the gut, mesenchyme and pharynx (Figs. 1A and B). In addition, *Smed-egfr-1* was weakly expressed in the eye pigment cells (arrows in inset in Fig. 1A), mouth opening (Fig. 1C) and around the region where the base of the pharynx attaches to the body mesenchyme (arrow in Fig. 1D). *Smed-egfr-2* was expressed throughout the gut but not in the pharynx (Figs. 1E–H). Finally, *Smed-egfr-3* was expressed in the pharynx, around the head margin, very weakly in the CNS (inset in Fig. 1I), and in the mesenchyme around the gut branches, in a pattern that resembles that of the neoblasts (Figs. 1I–K). After high-dose irradiation, the neoblast pool is depleted in 1–2 days and planarians die within a few weeks as they cannot sustain normal cell turnover (Bardeen and Baetjer, 1904; Reddien et al., 2005). Twelve hours after irradiation at 100 Gy, the expression of *Smed-egfr-3* in the mesenchyme around the gut branches completely disappeared (Figs. 1L–N). Eisenhoffer et al. (2008) proposed that stem cells are depleted by 24 h post-irradiation, whereas their early progeny disappears by 48 h. The fact that *Smed-egfr-3* expression disappeared very quickly after irradiation, similarly to what happens to other neoblasts markers such as *Smedwi-1* and *Smedwi-2* (Reddien et al., 2005; Fig. S4) suggests that *Smed-egfr-3* was expressed in neoblasts. On the other hand, the expression of *Smed-egfr-3* in the pharynx (Fig. 1L), head margin and CNS (inset in Fig. 1L) remained, even 7 days after irradiation (data not shown), indicating that this gene was expressed in post-mitotic differentiated cells. In contrast, *Smed-egfr-1* and *Smed-egfr-2* expression patterns did not change after irradiation (Fig. S5), suggesting that they were expressed in differentiated cells.

Smed-egfrs expression during regeneration

During posterior regeneration (head pieces regenerating the whole body), *Smed-egfr-1* was expressed in the new differentiating pharynx and posterior gut branches from 3 to 5 days after amputation (Figs. 2A, D, G, and J). During anterior regeneration (trunk pieces regenerating a new head), *Smed-egfr-1* was first observed within the blastema at day 1 (arrowhead in Fig. 2M). Between 3 and 5 days after amputation, *Smed-egfr-1* was also detected in the regenerating anterior gut branch (arrow in Fig. 2S). At day 5 of regeneration, when the regenerated eye cups are seen in live animals, *Smed-egfr-1* was strongly expressed in the new eye pigment cells (black arrowheads in Fig. 2S and T); at this stage, the newly differentiated photosensitive cells were detected with VC-1 antibody (white arrowheads in Fig. 2T). The expression of *Smed-egfr-1* in the pigment cups decreased at later stages of regeneration and was weakly detected in intact planarians.

During both posterior (Figs. 2B, E, H, and K) and anterior (Figs. 2N, Q, U, and Y) regeneration *Smed-egfr-2* was expressed in the regenerating posterior and anterior gut branches, respectively, from early stages. Finally, a strong expression of *Smed-egfr-3* was observed in both anterior and posterior 1-day blastemas (white arrowheads in Figs. 2C and O), at a stage in which an accumulation of S-phase neoblasts below the wound has been recently reported (Wenemoser and Reddien, 2010). From that moment, *Smed-egfr-3* expression was lower but still clearly detected in the differentiating pharynx and posterior gut branches during posterior regeneration (arrows in Fig. 2L), as well as the new anterior head margin (arrowheads in Figs. 2V and Z).

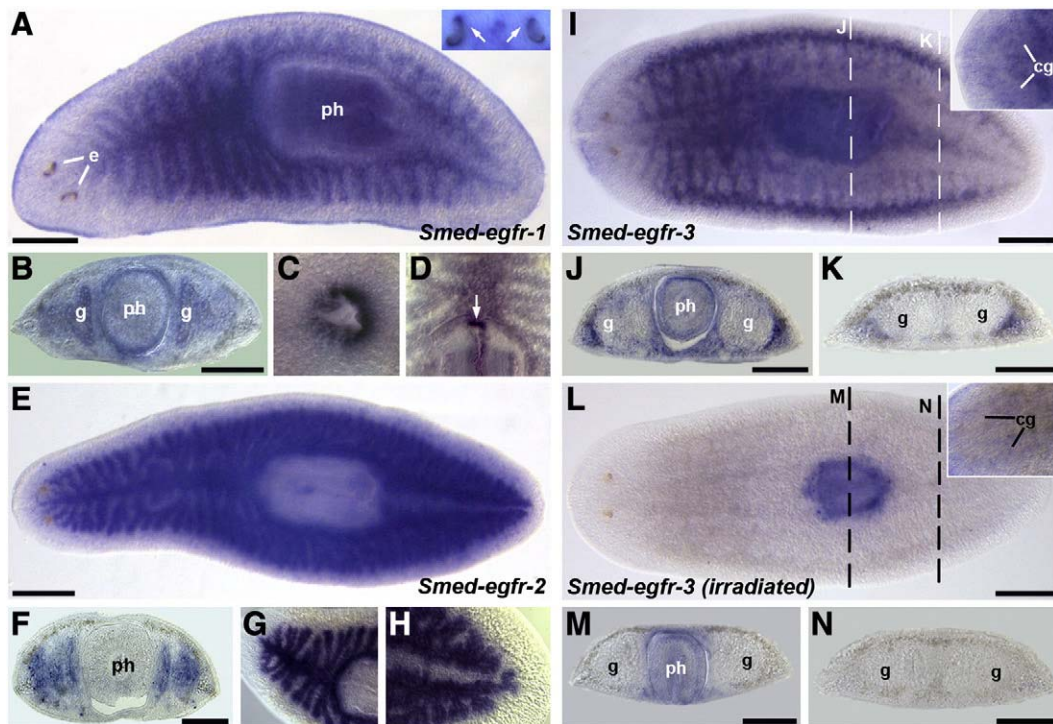


Fig. 1. Expression pattern of *Smed-egfr-1*, *Smed-egfr-2* and *Smed-egfr-3* in intact animals. (A–D) *Smed-egfr-1* is expressed throughout the mesenchyme, gut and pharynx, and in the eye pigment cells (inset in A), pharyngeal epithelia (transverse section in B), mouth opening (C) and the region where the pharynx attaches to the body mesenchyme (arrow in D). (E–H) *Smed-egfr-2* is expressed in the gut. (F) Corresponds to a transverse section. (I) *Smed-egfr-3* is expressed around the tip of the head, in the pharynx, weakly in the cephalic ganglia (inset) and in the mesenchyme around the gut branches. Dashed lines in (I) indicate the level of the transverse sections shown in (J and K). *Smed-egfr-3* is expressed around the gut branches, especially at the body lateral sides (J and K). (L) *Smed-egfr-3* expression in the mesenchyme around the gut branches is lost 12 h after irradiation at 100 Gy. Inset shows the expression in the cephalic ganglia. Dashed lines in (L) indicate the level of the transverse sections shown in (M and N). (A, C, E, G, H, I, and L) Anterior to the left. (D) Anterior to the top. e, eyes; ph, pharynx; g, gut; cg, cephalic ganglia. Scale bars, A, E, I, and L, 500 μ m; B, F, J, K, M, and N, 300 μ m.

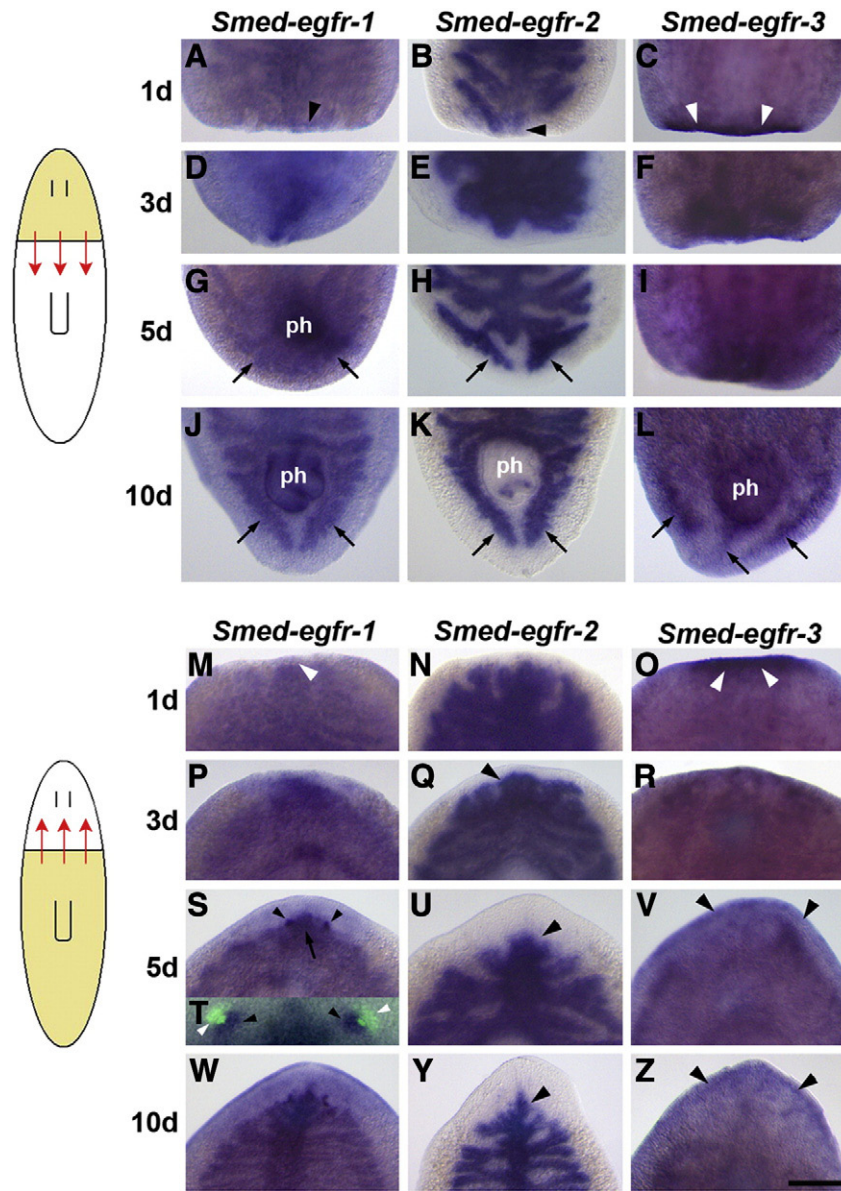


Fig. 2. Expression pattern of *Smed-egfr-1*, *Smed-egfr-2* and *Smed-egfr-3* during regeneration. Animals were cut at the prepharyngeal level (schematic drawings). (A–L) Posterior regeneration from head pieces. (M–Z) Anterior regeneration from trunk pieces. *Smed-egfr-1* is expressed in the blastema from the first day of regeneration (arrowheads in A and M). Arrows in (G, J, and S) point to expression in the regenerating gut. Black arrowheads in (S and T) point to *Smed-egfr-1* expression in eye pigment cells. White arrowheads in (T) point to the regenerating photosensitive cells after immunostaining with VC-1. *Smed-egfr-2* is expressed in the regenerating gut. Arrows in (H, K) point to the regenerating posterior gut branches. Arrowheads in (Q, U, and Y) point to the regenerating anterior gut branch. *Smed-egfr-3* is strongly upregulated within the 1-day blastemas as pointed out by white arrowheads in (C and O). Arrows in (L) point to the recovered pattern of *Smed-egfr-3* in the mesenchyme around the gut branches. Arrowheads in (V and Z) point to *Smed-egfr-3* expression at the head margin. Anterior to the top. ph, pharynx. Scale bar, 300 μ m.

Smed-egfr-1 is required for eye pigment cells regeneration

After silencing *Smed-egfr-1*, regenerating trunk pieces differentiated significantly reduced pigment-cup eyes (Figs. 3A and D). Planarian eyes contain two cell types: pigment cells that constitute the eye cups, which are visible as two dark spots in the planarian head (Fig. 3A), and photosensitive cells (green in Fig. 3B), bipolar neurons that cluster around the pigment cups and send rhabdomeric projections towards them (Okamoto et al., 2005). The defects in the pigment cups (Fig. 3D) were evident from early stages and persisted throughout the regenerative process. In order to analyze whether the defects in the eye cups were due to a decrease in the number of pigment cells, a homologue of a tryptophan hydroxylase (TPH) gene was cloned. Previous studies have shown that TPH, an enzyme

required for serotonin synthesis is expressed in the eye pigment cells of the planarian *Dugesia japonica* (Nishimura et al., 2007a). Similarly, *Smed-tpH* was expressed in eye pigment cells (red signal in Fig. 3C). A combination of *Smed-tpH* in situ and immunostaining with VC-1 clearly distinguished the two cell types (Fig. 3C). Compared to controls (Figs. 3B and G), RNAi-treated regenerating trunks generated similar numbers of photosensitive cells (67.6 ± 4.6 cells in $n = 10$ control versus 63 ± 3.31 cells in $n = 10$ RNAi-treated eyes; mean $\pm$ s.e.m.), although slightly disorganized (Figs. 3E and G). In contrast, the number of eye pigment cells was significantly reduced after *Smed-egfr-1* RNAi (16.5 ± 0.44 cells in $n = 16$ control versus 5.66 ± 0.28 cells in $n = 18$ RNAi-treated eyes; mean $\pm$ s.e.m.) (Figs. 3F and G). These results indicate that *Smed-egfr-1* is required for the proper differentiation of eye pigment cells.

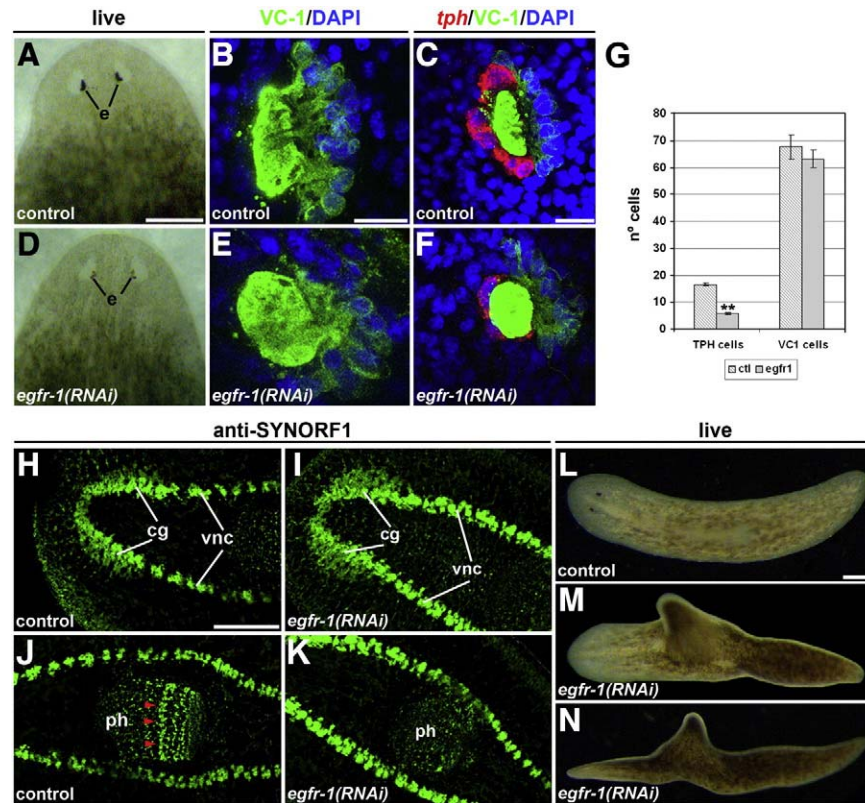


Fig. 3. *Smed-egfr-1(RNAi)* impairs eye pigment cell differentiation and induces dorsal outgrowths. (A–C) Control animals. (D–F) *Smed-egfr-1(RNAi)* animals. (A and D) Live animals, 18 days of anterior regeneration. (B and E) VC-1 immunostaining (green) and DAPI counterstaining, 8 days of regeneration. (C and F) In situ hybridization for *Smed-tph* (red) with VC-1 immunostaining (green), 10 days of regeneration. (G) Quantification of the number of *tph* and VC-1 cells in intact and *Smed-egfr-1(RNAi)* planarians, ** $p < 0.001$ (t -test). (H–K) Anti-SYNORF1 immunostaining in control (H, J) and *Smed-egfr-1(RNAi)* (I, K) anterior regenerating animals, 10 days of regeneration. (L–N) Live animals, 20 days of regeneration after two rounds of amputation. (A–F) Anterior to the top. (H–N) Anterior to the left. (N) Side view. e, eyes; cg, cephalic ganglia; vnc, ventral nerve cords; ph, pharynx. Scale bars, A, D, H, and K, 400 μ m; B, C, E, and F, 30 μ m; L–N, 500 μ m.

Smed-egfr-1 is necessary for pharynx regeneration

Immunostaining with anti-SYNORF1 (Cebrià, 2008) showed that, similarly to controls (Fig. 3H), *Smed-egfr-1* RNAi trunks regenerated apparently normal cephalic ganglia (Fig. 3I). However, the neural plexus from the original pharynxes of these trunk pieces lost its typical pattern in the RNAi-treated planarians (Fig. 3K). Control pharynxes showed a stereotypical neural plexus with a thick neural ring in their distal tips (red arrowheads in Fig. 3J). Remarkably, regenerating trunk pieces that went through two rounds of *Smed-egfr-1(RNAi)* and amputation developed dorsal outgrowths in the pharyngeal region (Figs. 3M and N and Table 1). As these outgrowths developed at a higher frequency after RNAi on intact

animals (Table 1), their nature will be discussed in the next section. In order to better analyze the function of *Smed-egfr-1* during pharynx regeneration, we analyzed the differentiation of this organ in regenerating head pieces, which must regenerate the pharynx de novo. Twenty-five days after amputation, control head pieces regenerated morphologically normal tails and pharyngeal regions (Fig. 4A); in contrast, *Smed-egfr-1(RNAi)* regenerating head pieces showed a widening and thickening of the new pharyngeal region that occasionally gave rise to small outgrowths (arrows in Fig. 4B and Table 1). Analysis with molecular markers showed morphogenetic defects in the regenerated pharynxes of those animals. First, whereas control pieces regenerated pharynxes with their stereotypical neural plexus including the distal ring (red arrowheads in Fig. 4C), *Smed-egfr-1(RNAi)* planarians regenerated smaller and more rounded pharynxes with an aberrant plexus (Fig. 4D and Table 2).

Triclad, such as *S. mediterranea*, have a plicate pharynx that can be seen as a hollow muscular cylinder inside a large pharyngeal cavity (Hyman, 1951). Different tissues are present between the outer epithelium and the internal lumen (Fig. 4G; Hyman, 1951; Bueno et al., 1997). The pharyngeal lumen connects to the lumen of the gut at the base of the pharynx (Fig. 1D). Nuclear staining with DAPI showed that, whereas in control animals the pharyngeal lumen is clearly delimited and its distal end opens into the pharyngeal cavity (arrow in Fig. 4E), pharynxes in *Smed-egfr-1(RNAi)* head pieces mainly developed as a solid mass of cells with no clear lumen (Fig. 4F). *Smed-egfr-1(RNAi)* pharynxes also had epithelial defects. Staining with anti-SMED- β CAT2, which labels the cell junctions of the inner and outer pharyngeal epithelia (Chai et al., 2010), showed that the outer epithelial cells (Fig. 4J) had a similar morphology to the cells from the distal part of the internal epithelium (yellow asterisk and inset in Fig. 4H). In contrast, the epidermal cells in the proximal region of the internal epithelium had a

Table 1

Summary of the frequency of outgrowths after *Smed-egfr-1(RNAi)* in intact and regenerating planarians.

		Intact planarians	Regenerating planarians	
			Head pieces	Trunk pieces
Control	Normal	100% (n = 129)	97.82% (n = 138)	100% (n = 147)
	Outgrowth	0% (n = 129)	0% (n = 138)	0% (n = 147)
<i>egfr-1(RNAi)</i>	Normal	16.6% (n = 175)	37.62% (n = 101)	62.9% (n = 124)
	Outgrowth	83.4% (n = 175)	62.3% (n = 101)	37.1% (n = 124)

Head and trunk pieces were analyzed between 10 and 14 days of regeneration after two rounds of *egfr-1(RNAi)*. Intact animals were analyzed at week 7 of treatment, after two rounds of *egfr-1(RNAi)* during the first and third week. 100% of intact and regenerating animals treated with *egfr-1(RNAi)* showed a remarkable decreased in eye pigment cells.

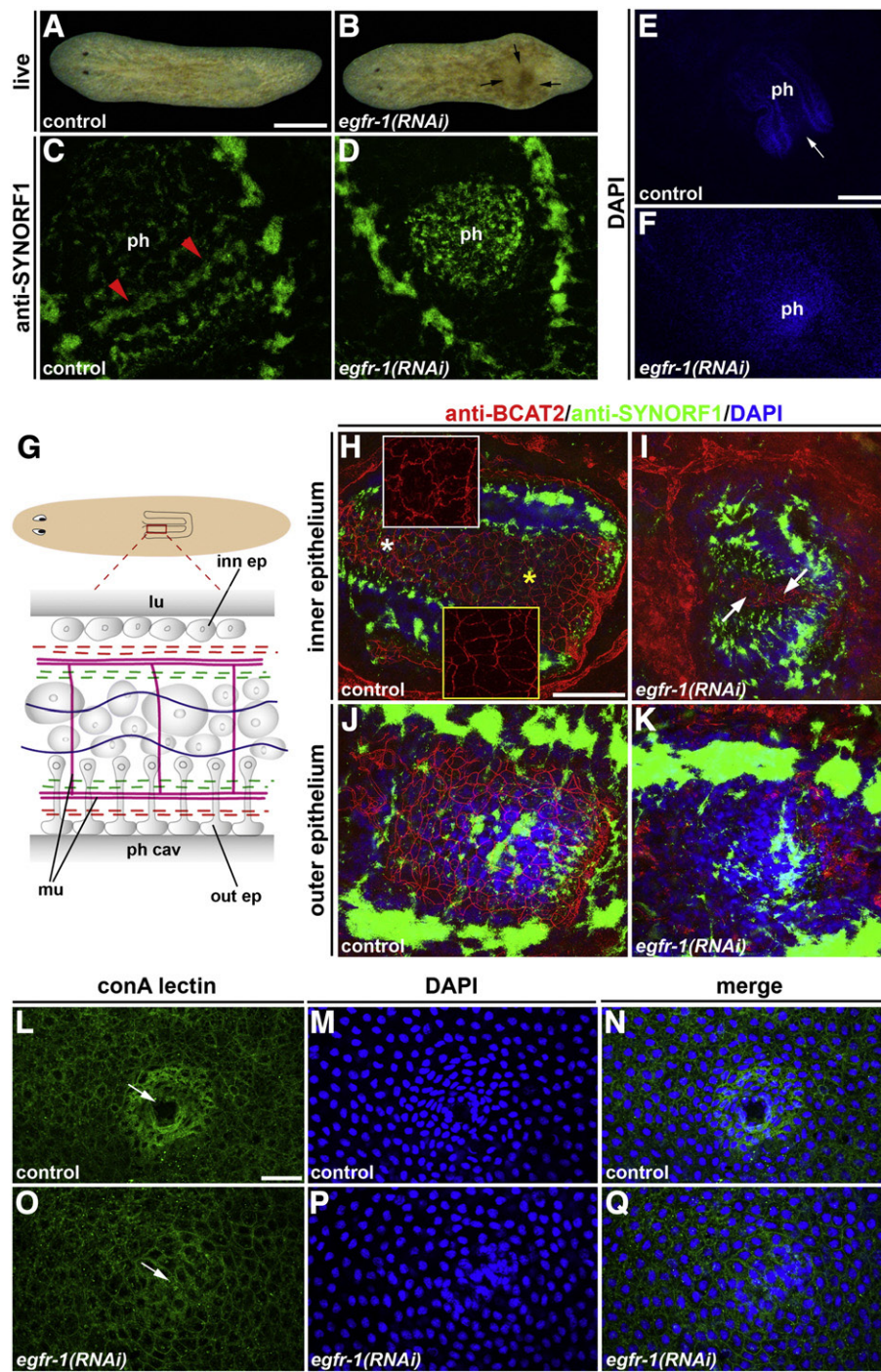


Fig. 4. *Smed-egfr-1* silencing results in defects in the regeneration of the pharynx and mouth opening. (A–B) Live animals, 25 days of regeneration. (C–D) Anti-SYNORF1 immunostaining, 13 days of regeneration. (E–F) DAPI nuclear staining, 10 days of regeneration. (G) Schematic drawing of pharynx structure (adapted from Bueno et al., 1997). Going from the pharynx cavity (ph cav) to the lumen (lu) we find the outer epithelium (out ep), subepithelial neural plexus (red discontinuous lines), muscle fibers (mu, pink), submuscular neural plexus (green discontinuous lines), mesenchyme containing different cell types, submuscular neural plexus, muscle fibers, subepithelial neural plexus and inner epithelium (inn ep). The mesenchyme is crossed by transverse muscle fibers (pink) and secretory processes (in blue). (H–K) Double anti-SMED- β CATENIN2 (red) and anti-SYNORF1 (green) immunostaining in control (H, J) and *Smed-egfr-1(RNAi)* (I, K) animals, 24 days of regeneration. Blue, DAPI staining. J and K correspond to different confocal planes of the same samples as H and I, respectively. White and yellow insets in (H) correspond to a higher magnification of the regions marked with white and yellow asterisks, respectively. (L–Q) Double ConA lectin (green) and DAPI staining of control (L–N) and *Smed-egfr-1(RNAi)* (O–Q) mouth openings, 14 days of regeneration. N and Q are merged images of L–M and O–P, respectively. Arrow in L indicates the mouth opening. Arrow in O indicates the region where the mouth should have opened. All samples correspond to regenerating head pieces. Scale bars, A–B, 500 μ m; E, F, H, and K, 150 μ m; L–Q, 30 μ m.

different morphology, with more irregular, rougher cell junctions (white asterisk and inset in Fig. 4H). After *Smed-egfr-1(RNAi)*, anti-SMED- β CAT2 did not label the outer epithelial cells (Fig. 4K). However, the inner epithelium was labeled even though the number and pattern of those epithelial cells was clearly abnormal compared to controls

(arrows in Fig. 4I). Despite all these defects in the newly differentiated pharynges, the posterior gut branches regenerated apparently normally after *Smed-egfr-1(RNAi)* (data not shown).

The pharynx evaginates through a ventral mouth opening. Compared to controls (Figs. 4L–N, n = 14/16 regenerated normal

Table 2

Summary of pharynx defects observed after *Smed-egfr-1(RNAi)* in regenerating head pieces.

	Normal pharynges with stereotypical anti-SYNORF labeling	Smaller and rounded with abnormal anti-SYNORF labeling	Very small mass of cells and no anti-SYNORF labeling
Control	97.9% (n = 47)	2.1% (n = 47)	0% (n = 47)
<i>egfr-1</i> (RNAi)	25% (n = 44)	56.8% (n = 44)	18.2% (n = 44)

Head pieces were analyzed between 12 and 25 days of regeneration after one round of *egfr-1(RNAi)*. Pharynges were labeled with anti-SYNORF antibody and DAPI for nuclear counterstaining and to reveal their general structure.

mouth openings), *Smed-egfr-1(RNAi)* head pieces regenerated smaller, disorganized mouth openings (n = 21/35), or in many cases did not regenerate an opening (Figs. 40–Q; n = 14/35). Overall, these results indicate that *Smed-egfr-1* is necessary for the regeneration of normal pharynges and mouth openings.

Dorsal outgrowths differentiate after *Smed-egfr-1* silencing

After *Smed-egfr-1* silencing, regenerating animals occasionally developed small dorsal outgrowths (Table 1). Those outgrowths were most frequently seen in intact non-regenerating animals (arrowhead in Fig. 5B and Table 1). Around 2–3 weeks after *Smed-egfr-1(RNAi)*, the pharyngeal regions became wider and slightly thicker, although no clear outgrowth was observed yet. After 4–5 weeks of treatment, the outgrowths began to develop, always dorsally above the pharyngeal region, and could reach a significant length after a few more weeks (Fig. 5B). In addition to these outgrowths, *Smed-egfr-1(RNAi)* intact planarians had reduced pigmentation of the eye cups (Fig. 5B), probably due to the inability of these animals to differentiate new eye pigment cells to sustain normal cell turnover. Despite these outgrowths, the animals did not show any sign of tissue degeneration or regression during the course of RNAi treatment.

Next, we sought to characterize those outgrowths with cell type and region-specific molecular markers. Immunostaining with anti-SYNORF1 showed that the original pharynges from *Smed-egfr-1(RNAi)* animals not only lost their normal neural pattern but were also displaced (Figs. 5C and D). Thus, rather than lying parallel along the anteroposterior (AP) body axis, they were perpendicular to it and their distal end pointed towards the developing dorsal outgrowth (Figs. 5D and G). In many cases, the pharynges appeared to enter the outgrowth (Fig. 5G). Anti-SMED- β CAT2 (Figs. 5E and F) showed that pharynges from *Smed-egfr-1(RNAi)* intact planarians were much smaller, rounded, and had a reduced lumen, and that they had the same epithelial defects as observed in regenerating head pieces. Those defects were evident before any sign of outgrowth development. In some cases, brain-like structures (arrow in Fig. 5G) and photosensitive cells (arrow in Fig. 5H) differentiated inside the outgrowths. In situ hybridizations with different markers revealed additional defects. In control animals, *Smed-sfrp-1* (Gurley et al., 2008; Petersen and Reddien, 2008) was expressed in the head tip and the most distal part of the pharynx (Fig. 5I, n = 8/8); in *Smed-egfr-1(RNAi)* planarians, its expression in the distal region of the pharynx appeared expanded (Fig. 5J, n = 5/8). Ectopic cells expressing the central marker *Smed-tcen* (Bueno et al., 1996; Iglesias et al., 2008) were detected in the distal part of the outgrowth (Fig. 5L, n = 3/5). Similarly, ectopic mechanosensory cells expressing *Smed-cintillo* (Oviedo et al., 2003) also differentiated inside the outgrowths (Fig. 5N, n = 1/3). In controls, *Smed-hoxD* was expressed in the posterior half of the animal, the mouth opening and also in the region where the base of the pharynx attaches to the body mesenchyme (arrowhead in Fig. 5P, n = 3/3). After *Smed-egfr-1(RNAi)*, the expression of *Smed-hoxD* in this region was abnormally expanded (arrowheads in Fig. 5Q, n = 4/9).

Immunostaining with anti-AA4.3 showed that the outgrowth displayed the typical stripe of cilia specific to the dorsal epithelium in control planarians (arrows in Fig. 5O).

Finally, immunostaining with the TMUS13 antibody (Cebrià et al., 1997) suggested that *Smed-egfr-1(RNAi)* animals were missing the circular muscles around the mouth opening (Figs. 5R and S). Also, the outgrowths did not have a continuous well-layered musculature underneath the epidermis, but instead individual muscle fibers and myocytes with no clear patterning differentiated inside them (Fig. 5U). Given the defects affecting the pharynx and mouth opening, we assessed whether they were still functional after long RNAi treatment. After 8 weeks of starvation, control planarians responded to food stimulus and moved quickly towards the liver paste, evaginated their pharynges and ate (see Movie 1 in the supplementary material). In contrast, *Smed-egfr-1(RNAi)* animals recognized and moved towards the food but were not capable of evaginating their pharynges (see Movie 2 in the supplementary material). Overall, our data show that *Smed-egfr-1(RNAi)* results in pharynx displacement and the development of dorsal outgrowths that have no clear AP polarity and contain a mixture of cells expressing markers for several cell types.

Hyperproliferation in *Smed-egfr-1(RNAi)* intact animals

Because EGFR signaling is generally involved in regulating cell proliferation in other animals and *Smed-egfr-1(RNAi)* resulted in significant overgrowths, we analyzed proliferation after RNAi. Whereas the proliferation rate did not significantly change after *Smed-egfr-2(RNAi)* and *Smed-egfr-3(RNAi)*, a significant increase was observed after *Smed-egfr-1* silencing (Figs. 6A–D and H). This increase was observed throughout the animal (Fig. 6B), except in the pharynx and the region anterior to the eyes where there are no neoblasts and, therefore, no proliferation. Remarkably, this increase was already evident after 2 weeks of treatment (Figs. 6E–F and H), preceding any external sign of outgrowth. As planarians were starved for the whole experiment, an expected decrease in proliferation over time was observed in control, *Smed-egfr-2(RNAi)* and *Smed-egfr-3(RNAi)* planarians (Fig. 6H). In contrast, a significantly higher and rather constant proliferation rate was observed in *Smed-egfr-1(RNAi)* animals throughout the experiment (Fig. 6H). Although proliferative cells were also detected inside the dorsal outgrowth (arrow in Fig. 6G), they were not as numerous as in the mesenchyme outside the outgrowth.

Planarians are very plastic animals, as they can grow or degrow depending on culture conditions. Growth and degrowth depend on the balance between cell proliferation and cell death (Romero and Baguña, 1991). Thus, planarians starved for several weeks will get smaller and smaller. After *Smed-egfr-1(RNAi)*, intact planarians got smaller at a faster rate than controls (Fig. 6I). After only 3 weeks of treatment, *Smed-egfr-1(RNAi)* planarians were already significantly smaller than controls, even though their mean size was the same at the beginning of the experiment (Fig. 6I). In order to check whether this faster reduction in size could be explained by an increased cell death that would compensate for the higher proliferative rate observed in the *Smed-egfr-1(RNAi)* planarians, we carried out a TUNEL assay to label apoptotic cells after 9 weeks of treatment. However, no significant increase in cell death was observed [120 ± 14.01 cells/mm² in n = 3 controls versus 169 ± 54.71 cells/mm² in n = 4 *Smed-egfr-1(RNAi)*, mean $\pm$ s.e.m].

Smed-p53 overexpression and cell lineage defects after *Smed-egfr-1(RNAi)*

A recent study has shown that similar dorsal outgrowths differentiate in the pharyngeal region of regenerating head and tail pieces, but not in intact planarians, after a partial silencing of *Smed-p53* (Pearson and Sánchez-Alvarado, 2010). In all cases, these outgrowths contain

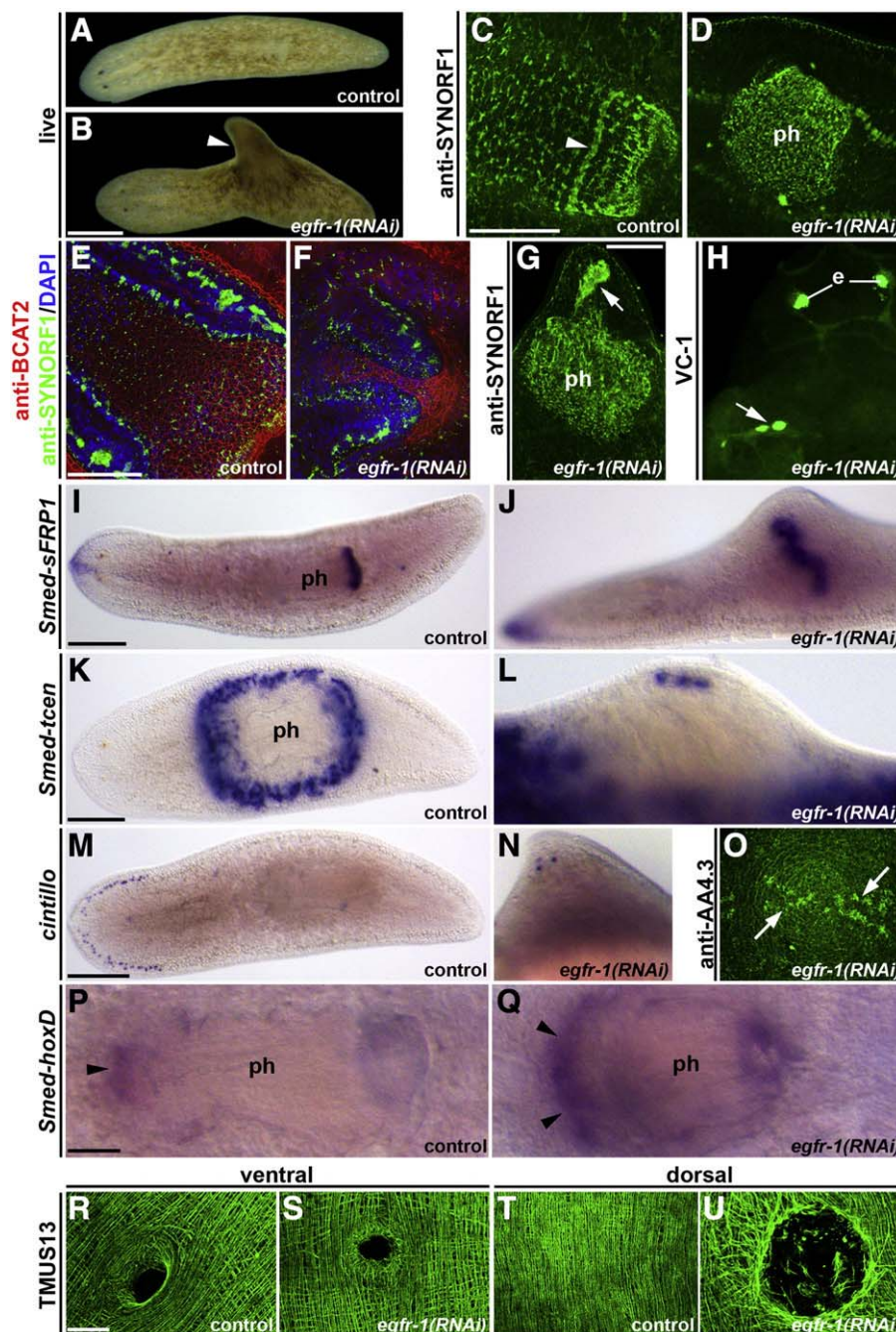


Fig. 5. Molecular characterization of the dorsal outgrowths developed after *Smed-egfr-1(RNAi)*. (A–B) Live animals, 6 weeks of RNAi. Arrowhead in B indicates a dorsal outgrowth. (C–D) Anti-SYNORF1 immunostaining, 8 weeks of RNAi. Arrowhead in (C) indicates the stereotypical neural ring in the distal part of the pharynx. In (D), the pharynx is perpendicular to the anteroposterior body axis. (E–F) Double anti-SMED-βCATENIN2 (red) and anti-SYNORF1 (green) immunostaining in control (E) and *Smed-egfr-1(RNAi)* (F) pharynges, 19 days of treatment. Nuclei were labeled with DAPI. (G) Anti-SYNORF1 immunostaining showing differentiation of brain-like tissues inside the outgrowth (arrow). (H) VC-1 immunostaining showing photosensitive cells inside the outgrowth (arrow). (I–J) *Smed-sFRP-1* expression. (K–L) *Smed-tcen* expression. (M–N) *cintillo* expression. (O) Anti-AA4.3 immunostaining to show the typical pattern of dorsal epidermal cilia in the outgrowth. Arrowheads point to the attachment region between the base of the pharynx and the body mesenchyme. (R–U) Body wall musculature immunostained with TMUS13. (R–S) Ventral mouth openings. (T–U) Equivalent dorsal regions. Disorganized myocytes and muscle fibers differentiated inside the outgrowth (U). (J, L, N) Side views. (G–Q) Eight weeks of RNAi. (R–U) Five weeks of RNAi. All samples correspond to intact non-regenerating animals. All panels except H (anterior to the top) show anterior to the left. ph, pharynx; e, eyes. Scale bars, A, B, I, K, and M, 500 μm; C, D, G, P, and Q, 200 μm; E, F, 150 μm; R–U, 30 μm.

multiple cells types. In intact planarians, *Smed-p53(RNAi)* results in an initial hyperproliferation followed by a progressive loss of mitotic cells and the death of the animals (Pearson and Sánchez-Alvarado, 2010). In contrast, *Smed-egfr-1(RNAi)* resulted in a sustained hyperproliferation during the whole RNAi treatment. Remarkably, the expression of *Smed-p53* appeared upregulated all throughout the animal after *Smed-egfr-1(RNAi)* (Fig. S6A–B). *Smed-p53* is mainly expressed in early stem cell progeny as well as in a small percentage of neoblasts (Pearson and

Sánchez-Alvarado, 2010). Using *Smedwi-1* (Reddien et al., 2005) as neoblast marker, an overexpression of this gene was also observed after *Smed-egfr-1(RNAi)* (Fig. S6C–D).

Finally, we analyzed the effects of *Smed-egfr-1(RNAi)*-driven hyperproliferation and outgrowth development on a particular cell lineage of stem cell progeny (Eisenhoffer et al., 2008). For this particular lineage, we used *Smed-NB.21.11e* as a marker of early progeny and *Smed-AGAT1* as a late progeny marker (Eisenhoffer et al., 2008). In

control intact planarians *Smed-NB.21.11e* was expressed in discrete cells all throughout the ventral side (data not shown). Dorsally, *Smed-NB.21.11e* was also expressed in discrete cells uniformly distributed in the anterior half of the animal with very few cells seen post-pharyngeally (Fig. S6E). In contrast, in *Smed-egfr-1(RNAi)* intact planarians the dorsal expression of *Smed-NB.21.11e* was mainly concentrated in the head region whereas few cells were observed pre-pharyngeally (Fig. S6F). Higher expression, though, was seen around the pharyngeal region (Fig. S6F). No differences were observed at their ventral sides (data not shown). Transverse sections showed the presence of a higher number of *Smed-NB.21.11e*-positive cells in the mesenchyme, especially around the pharynx (Fig. S6E-F). For the late progeny marker *Smed-AGAT1* a reduction in the number of positive cells

was observed at the dorsal pre-pharyngeal region (Fig. S6G-H). Finally, *Smed-AGAT1*-expressing cells were abnormally found around the digestive system of *Smed-egfr-1(RNAi)* planarians (Fig. S6H).

In summary, *Smed-egfr-1(RNAi)* results in an overexpression of *Smed-p53*, an increase of the *Smedwi-1* positive stem cell population as well as in an abnormal localization of cells expressing *Smed-NB.21.11e* and *Smed-AGAT1*, genes expressed in the non-dividing descendent cells of neoblasts in a particular lineage (Eisenhoffer et al., 2008).

Smed-egfr-3(RNAi) affects normal blastema growth

Next, we functionally characterized another EGFR homologue, *Smed-egfr-3*. After one round of *Smed-egfr-3(RNAi)* and amputation,

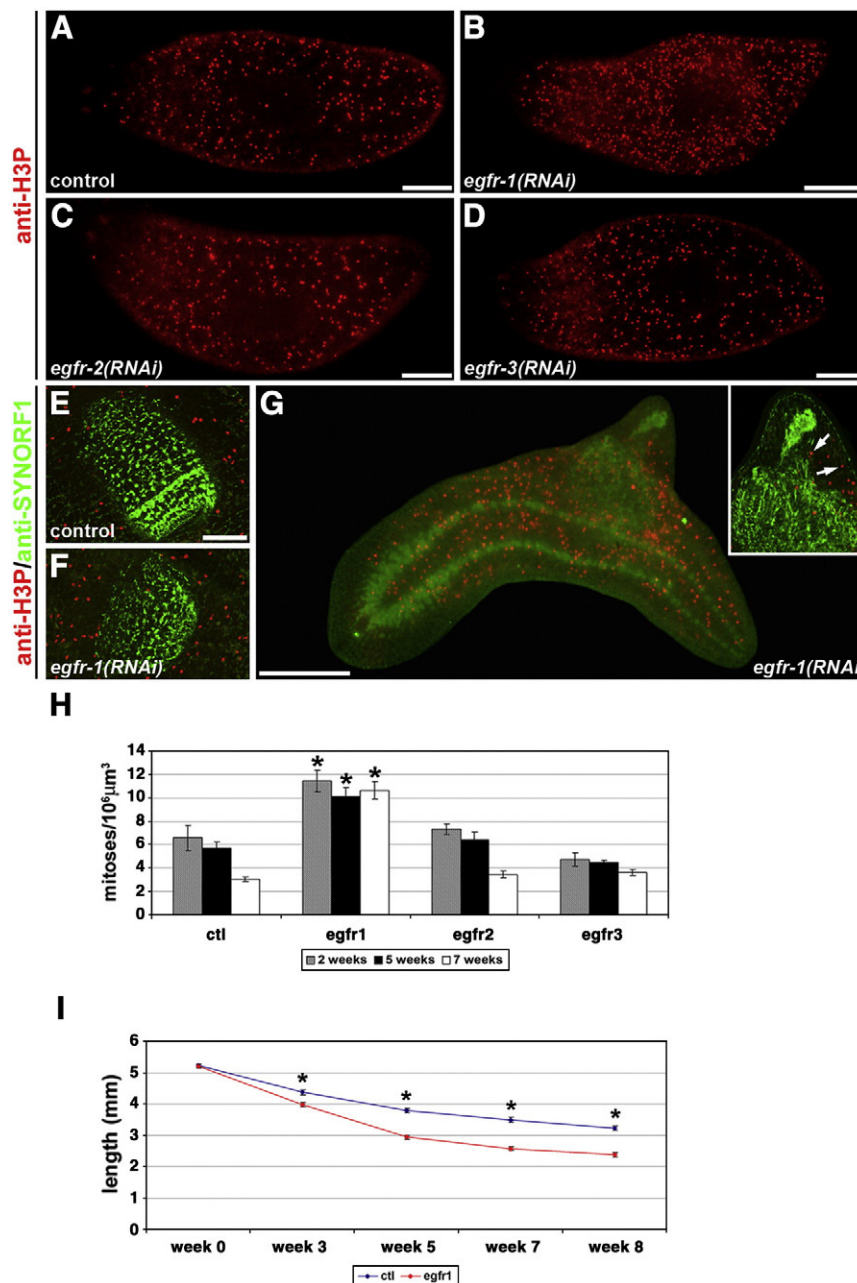


Fig. 6. Hyperproliferation and faster degrowth after *Smed-egfr-1(RNAi)*. (A-D) Anti-H3P immunostaining after 7 weeks of RNAi. (E-G) Double immunostaining with anti-SYNORF1 (in green) and anti-H3P (in red). (E-F) Two weeks of RNAi. (G) Eight weeks of RNAi. Arrows in inset indicate mitotic cells inside the outgrowth. (H) Quantification of mitotic cells in the pre-pharyngeal region of control. At least $n = 7$ samples were counted per each time point. All values correspond to mean $\pm$ s.e.m., * $p < 0.05$ (t -test). (I) Measurement of the size decrease upon starvation of control (0 and 3 weeks, $n = 60$; 5 weeks, $n = 50$; 7 and 8 weeks, $n = 35$) and *Smed-egfr-1(RNAi)* (0 and 3 weeks, $n = 80$; 5 weeks, $n = 68$; 7 and 8 weeks, $n = 53$). All values correspond to mean $\pm$ s.e.m., * $p < 0.05$ (t -test). All samples correspond to intact non-regenerating animals. Scale bars, A-D, G, 500 μ m; E and F, 200 μ m.

Results

all the treated animals regenerated normally. However, after two rounds of RNAi and amputation, both anterior and posterior blastemas were smaller than controls (Figs. 7A–C and S7). Planarian blastemas can be easily recognized in regenerating animals as the unpigmented white tissues that differentiate distal to the amputation surface. After 3 days of regeneration, control animals regenerated normal-sized blastemas (Fig. 7A, $n = 128/131$, 97.7%). However, those unpigmented anterior blastemas were significantly reduced (Fig. 7B, $n = 122/261$, 46.7%) or absent (Fig. 7C, $n = 80/261$, 30.6%) in most of the *Smed-egfr-3(RNAi)* animals. As *Smed-egfr-3* was expressed in irradiation-sensitive cells, the defects observed in blastema growth could be a consequence of problems in neoblast proliferation. However, the number of mitotic cells, detected with the anti-H3P antibody, was not significantly reduced after *Smed-egfr-3(RNAi)* (Fig. 7D–F). In contrast to other models of epimorphic regeneration such as the amphibian limb, planarian blastemas do not consist in a mass of proliferating undifferentiated cells. In planarians, upon amputation, neoblast close to the wound proliferate resulting in an accumulation of mitotic cells mainly in a narrow strip of about 300–500 μm behind the amputation plane. As

regeneration proceeds the blastema grows mainly by the entry of post-mitotic neoblasts that differentiate within it in the missing structures, whereas mitotic cells are mostly restricted to the stump region outside the blastema (Newmark and Sánchez-Alvarado, 2000; Saló and Baguña, 1984; Wenemoser and Reddien, 2010). Remarkably, the reduced 3-day blastemas from *Smed-egfr-3(RNAi)* animals always contained many more mitotic cells (Fig. 7E) compared to controls (Fig. 7D). After 5 days of regeneration, control animals differentiated new cephalic ganglia within the blastema (Fig. 7G); in those animals, mitotic cells were observed in the stump region (yellow arrow in Fig. 7G) and close to the brain (white arrow in Fig. 7G), but never anterior to it. In contrast, *Smed-egfr-3(RNAi)* animals that had reduced blastemas either differentiated small cephalic ganglia in the stump region (Fig. 7H) or the ganglia did not differentiate at all (Fig. 7I). Nevertheless, mitotic cells were abnormally located within those blastemas (arrows in Figs. 7H–I), including in front of new cephalic ganglia. Also, another stem cell marker such as *Smedwi-2* (Reddien et al., 2005) was normally present in the wound region of *Smed-egfr-3(RNAi)*-treated planarians despite their small blastemas (Fig. S8).

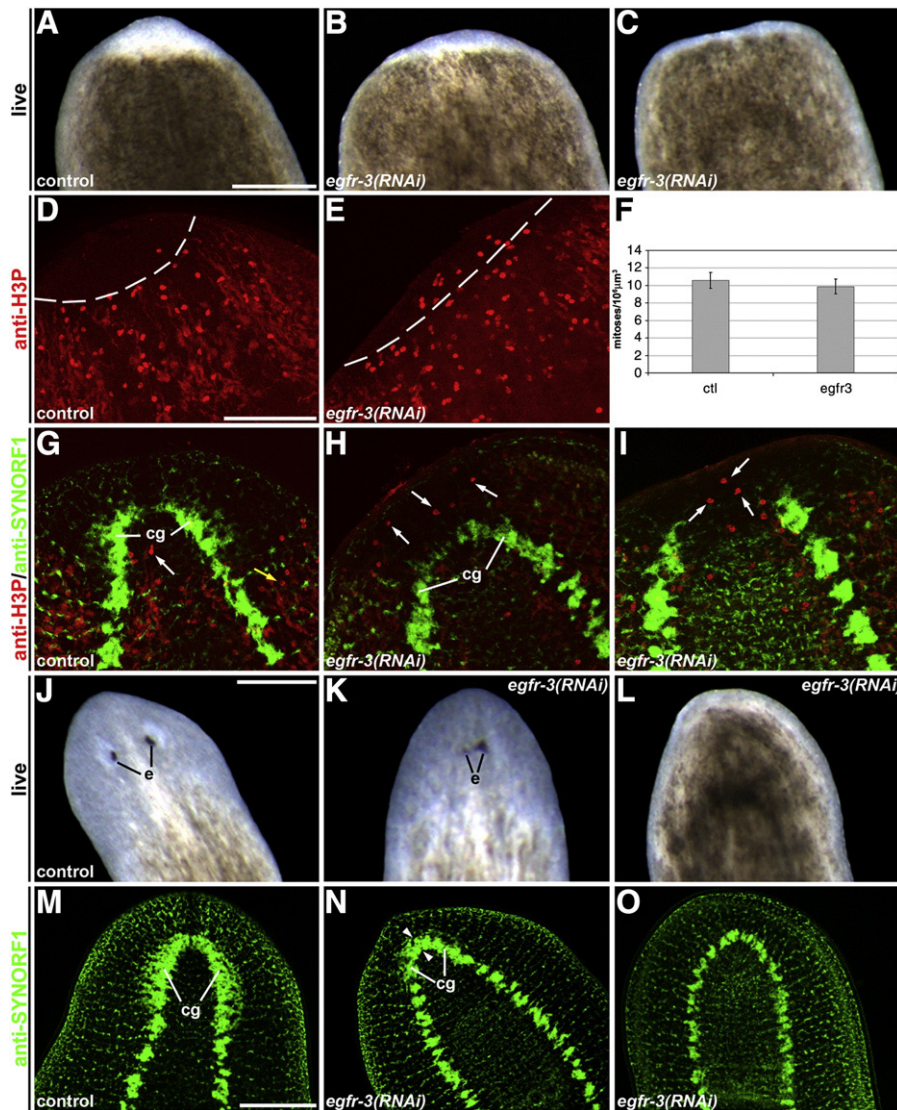


Fig. 7. Normal proliferation but abnormal blastema growth and differentiation after *Smed-egfr-3(RNAi)*. (A–C) Live animals after 3 days of regeneration. (D–F) Anti-H3P (red) reveals no defects in proliferation rate. In contrast to controls (D), mitotic cells are found within the reduced blastemas (delineated by a discontinuous white line) of *Smed-egfr-3(RNAi)* planarians (E). (F) Quantification of mitotic cells in the stump region of control (10.58 ± 0.89 , $n = 13$) and *Smed-egfr-3(RNAi)* (9.87 ± 0.83 , $n = 24$) planarians. Values correspond to mean $\pm$ s.e.m. Three days of regeneration. (G–I) Double anti-SYNORF1 (green) and H3P (red) immunostaining on 5-day regenerants. Arrows indicate mitotic cells. (J–L) Live animals after 12 days of regeneration. (M–O) Anti-SYNORF1 immunostaining after 12 days of regeneration. Scale bars, A–C, 500 μm ; D, E, G–I, 300 μm ; J–L 400 μm ; M–O, 200 μm .

After 12 days of regeneration, control animals regenerated normal anterior regions (Fig. 7J, n = 76/79, 96.2%) and cephalic ganglia (Fig. 7M). Although most *Smed-egfr-3(RNAi)* planarians recovered and regenerated normal anterior regions, many of those recovered blastemas showed morphological defects, mainly abnormal eyes that were fused or situated very close at the midline (Fig. 7K, n = 44/175, 25.1%). In these animals, the regenerated cephalic ganglia appeared smaller and with a thicker anterior commissure connecting the two ganglia (Fig. 7N). A number of *Smed-egfr-3(RNAi)* animals did not recover (Fig. 7L, n = 39/175, 22.2%) and showed more severe defects in the regeneration of their CNS (Fig. 7O). Because no abnormal phenotype was observed after one round of *Smed-egfr-3(RNAi)* and amputation, the variability observed on blastema growth after two rounds of RNAi and the fact that most of those treated animals recovered as regeneration proceeded, we carried out a third round of dsRNA injection and amputation. After this third round of RNAi, the animals showed a more severe phenotype compared to those observed after two rounds (Table S1). In addition, most of the animals never recovered and no blastema was observed even after 10 days of regeneration (Table S1). Importantly, and as it happens after two rounds of RNAi, those *Smed-egfr-3(RNAi)* animals did not display any proliferation impairment compared to controls (Fig. S9).

As *Smed-egfr-3(RNAi)* resulted in problems to differentiate normal blastemas despite those treated animals seemed to trigger a normal proliferative response, we checked whether the lack of normal blastemas could be due to an increased cell death. However, TUNEL assay showed that there was no increase in cell death in the wound region after 4 h, 13 h and 3 days of regeneration (Fig. S10).

Differentiation defects after *Smed-egfr-3(RNAi)*

As the defects observed did not seem to be caused by reduced proliferation, we assessed whether differentiation was affected after

Smed-egfr-3(RNAi) (Figs. 8 and 9). Whole-mount in situ hybridizations with neural-specific genes revealed defective CNS regeneration. Thus, after 5 days of regeneration, most animals had fused cephalic ganglia at the midline, instead of normal bilateral ones, as seen with the markers *Smed-Gpas* (Iglesias et al., submitted), which is specific to the brain lateral branches (Cebrià et al., 2002b), and *Smed-th*, which labels the dopaminergic neurons (Nishimura et al., 2007b) (compare Figs. 8A and B with 8E and F, respectively). In other cases, although the regenerated cephalic ganglia appeared bilateral, expression of these neural markers was reduced (Figs. 8I and J). In the case of *Smed-Gpas*, 3-day regenerating animals showed similar results: 4/5 control planarians regenerated normal bilateral cephalic ganglia, whereas 5/8 *Smed-egfr-3(RNAi)* planarians regenerated fused cephalic ganglia, 2/8 were normal and 1/8 did not regenerate any CNS. After 5 days of regeneration, all controls regenerated *cintillo*-expressing cells (Fig. 8C); however, *Smed-egfr-3(RNAi)* animals with substantially reduced blastemas did not differentiate any *cintillo*-expressing cells within them (Fig. 8G). On the other hand, RNAi-treated animals with small blastemas differentiated *cintillo*-expressing cells (Fig. 8K). Finally, the expression of *Smed-sFRP-1* (Gurley et al., 2008) in the head anterior tip was also significantly reduced after *Smed-egfr-3(RNAi)* (Figs. 8H and L). Regenerating planarians analyzed at 3 days of regeneration showed similar defects: 3/4 controls were normal, whereas 4/6 *Smed-egfr-3(RNAi)* planarians showed a significant reduction in *Smed-sFRP-1*-expressing cells and 2/6 showed roughly a normal pattern. Planarians treated with three rounds of *Smed-egfr-3(RNAi)* never formed a blastema and showed a complete absence of *Smed-sFRP-1* expression even after 12 days of regeneration (Fig. S9). On the other hand, no defects using the same markers were observed after silencing *Smed-egfr-3* in intact non-regenerating planarians (Fig. S11).

Differentiation of other cell types did not appear to be affected after *Smed-egfr-3(RNAi)* (Fig. 9). *Smed-mag-1* labels the marginal adhesive

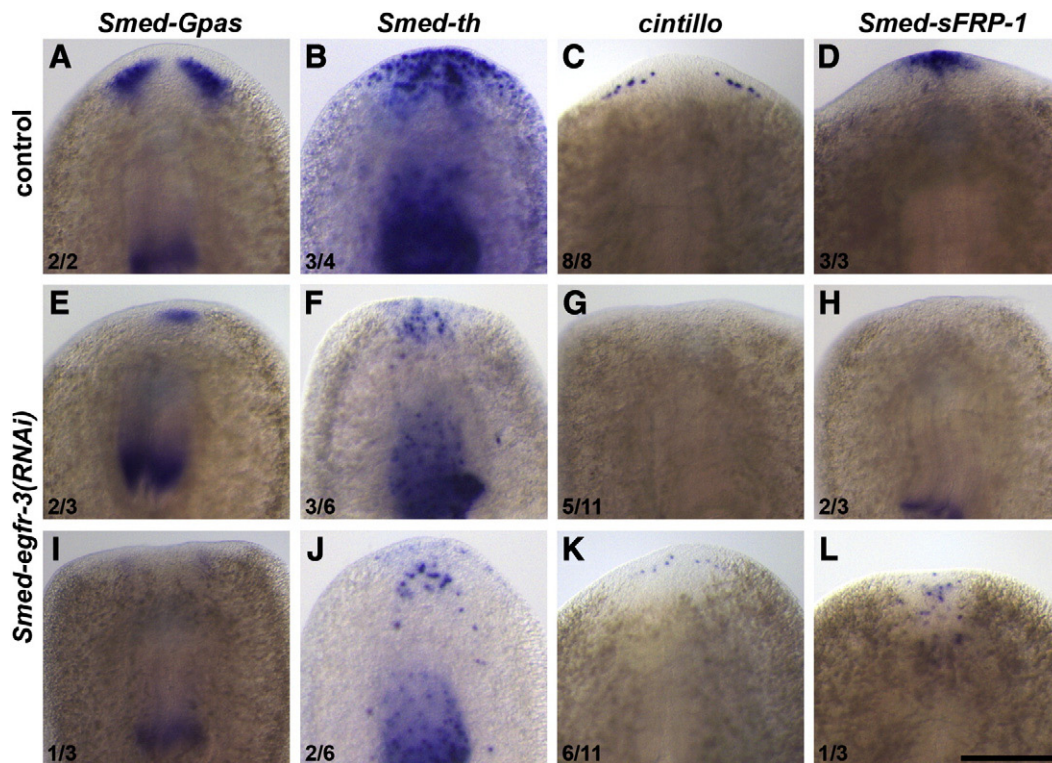


Fig. 8. Abnormal differentiation of certain cell types after *Smed-egfr-3(RNAi)*. After 5 days of regeneration, control animals regenerated normal cephalic ganglia (*Smed-Gpas* and *Smed-th*), mechanoreceptor sensory cells (*cintillo*) and anterior distal tips (*Smed-sFRP-1*). In contrast, differentiation of these cell types was affected after *Smed-egfr-3(RNAi)*. Scale bar, 300 μ m.

Resultats

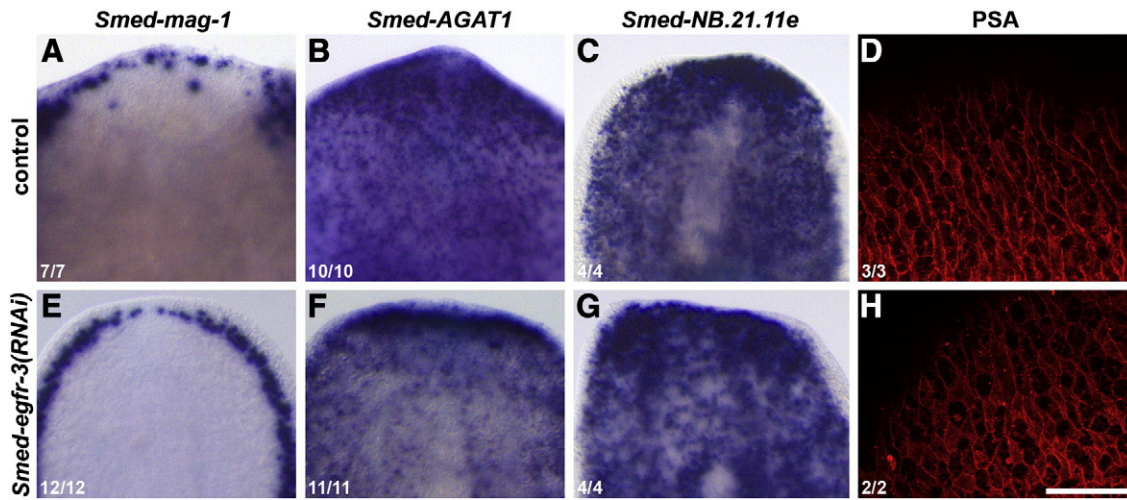


Fig. 9. Normal differentiation of certain cell types after *Smed-egfr-3(RNAi)*. After 3 days of regeneration, *Smed-egfr-3(RNAi)* planarians regenerated normal patterns of *Smed-mag-1*, *Smed-AGAT1*, *Smed-NB21.11e* and lectin PSA. Scale bars, 200 μ m for D–H, 300 μ m for all others.

gland cells throughout the body margin except in the anterior region (Sánchez-Alvarado et al., 2002; Zayas et al., 2010). Three days after amputation, *Smed-mag-1* cells differentiated below the wound epithelium in the distal part of control (Fig. 9A) and *Smed-egfr-3(RNAi)* (Fig. 9E) blastemas, regardless of their sizes. Recently, *Smed-AGAT1* and *Smed-NB.21.11e* have been described as markers of late and early neoblast progeny, respectively, in a specific cell lineage (Eisenhoffer et al., 2008). After 3 days of regeneration, many *Smed-AGAT1*- and *Smed-NB.21.11e*-expressing cells were expressed within the blastemas of both control (Figs. 9B and C) and *Smed-egfr-3(RNAi)* (Figs. 9F and G) animals. Finally, epidermal cells staining with PSA lectin did not reveal any apparent defect in the blastema epidermis after *Smed-egfr-3(RNAi)* (Fig. 9H). In summary, our data show that, whereas the differentiation of some cell types was abnormal after *Smed-egfr-3(RNAi)* that of others was normal.

Discussion

Eye pigment cells fail to regenerate after *Smed-egfr-1(RNAi)*

Planarian eyes comprise pigment cells that form the eye cups and photosensitive cells that sense light. Although the origin of both cell types is not completely clear, it has recently been proposed that they could differentiate from a common precursor in *D. japonica* (Takeda et al., 2009). At early stages of regeneration, some cells are double labeled with *DjtpH* and VC-1, whereas at later stages the lineages are completely separate (Takeda et al., 2009), suggesting a common origin. Since the final number of photosensitive cells is more than two-fold higher than that of the pigment cells, however, the precursors of the photosensitive cells, already expressing markers of mature cells, must go through additional rounds of proliferation after the lineages separate. Since *Smed-egfr-1(RNAi)* does not affect the number of photosensitive cells, *Smed-egfr-1* may be required specifically for the regeneration of the eye pigment cell lineage after its separation from a putative common precursor. *Smed-egfr-1* would be then necessary either for the differentiation of the pigment cell precursors or the proliferation of such precursors once they would separate from the photosensitive cell lineage as proposed by Takeda et al. (2009). Such a role for *Smed-egfr-1* in eye regeneration is consistent with the role of the EGFR signaling pathway in the differentiation of the different eye cell types, including pigment cells, in other systems (Freeman, 1997; Nagaraj and Banerjee, 2007).

The photosensitive cells from *Smed-egfr1(RNAi)* animals appear disorganized compared to controls, which suggests that a well-

formed eye cup could be required to regenerate a proper eye structure. This is in agreement with proposals based on the “menashi” planarian mutant (Sato et al., 2005), in which eye pigment cells do not differentiate properly resulting in abnormal patterning of the photosensitive cells (Sato et al., 2005). Consistent with this finding, a recent report has shown that whereas eye pigment cells express *Smed-tph*, the photosensitive cells express a serotonin receptor (Saló et al., 2009), suggesting that cross-talk between these cell types may be important to regulate eye patterning and/or function. Although silencing of *Smed-tph* or the serotonin receptor does not result in any apparent defect (data not shown), a similar cross-talk may exist between currently unidentified molecules that would regulate eye patterning.

Abnormal pharynx morphogenesis after *Smed-egfr-1(RNAi)*

Previous studies have suggested that the planarian pharyngeal epithelium contains two types of cells. The outer epithelium and the distal part of the inner epithelium are positive for the antibody 7D8 and are formed by “insunk” (deep) cells. In contrast, the proximal part of the inner epithelium is negative for 7D8 and consists of polymorphous cells (Ishii, 1962/1963; Ishii, 1964; Kobayashi et al., 1999). Immunohistochemistry with anti-SMED- β CAT2 revealed similar staining in the outer epithelial cells and the distal inner epithelial cells, but this differed from the pattern observed in the proximal inner epithelium (Figs. 4H and J), further supporting the existence of two types of epithelial cells. These differences have led to the proposal that the inner epithelial cells have two different origins: the proximal cells would originate in the anterior part of the pharynx rudiment in close contact with the lumen of the gut and the distal cells in an invagination of a primitive slit at the posterior end of the rudiment (Kobayashi et al., 1999). As the pharynx rudiment grows and differentiates into a mature pharynx, both types of inner epithelial cells would contact each other to generate a continuous pharyngeal lumen (Kobayashi et al., 1999). After *Smed-egfr-1(RNAi)*, the regenerated pharynges are much smaller and have a substantially reduced lumen (Figs. 4F, I and K). In parallel, anti-SMED- β CAT2 labeling is lost from the outer epithelium. Cadherin-dependent cell adhesion occurs typically through a cadherin–catenin complex (CCC) that links the membrane to the actin cytoskeleton (Gumbiner, 2005). Dynamic regulation of adhesion between epithelial cells is important to control movements such as migration, ingression or invagination. In vertebrates and *Drosophila*, EGFR associates with the CCC and may

regulate cell adhesion by phosphorylating some of its components (Dumstrei et al., 2002; Hazan and Norton, 1998; Hoschuetzky et al., 1994). Thus, for example, loss of EGFR function results in increased cell adhesion and blocks the normal invagination of the optic placode cells in *Drosophila* (Dumstrei et al., 2002). In other contexts, however, activation of EGFR signaling seems important for promoting cadherin-mediated cell adhesion (Brown et al., 2006; Jiang and Edgar, 2009). After *Smed-egfr-1(RNAi)*, planarians regenerate abnormal pharynges with reduced lumens. Therefore, it seems reasonable to suggest that the loss of SMED- β CAT2 in the junctions of the outer epithelial cells either reveals or results in adhesion defects that lead to impairment of the morphogenetic movements that are required for proper pharynx formation.

Smed-egfr-1(RNAi) and the development of dorsal outgrowths

Smed-egfr-1 silencing results in the development of dorsal outgrowths in the pharyngeal region (Table 1). Recently, low-dose *Smed-p53(RNAi)* has been reported to cause a hypomorphic phenotype characterized by the development of dorsal outgrowths in regenerating head and tail pieces, just above the region where a new pharynx forms (Pearson and Sánchez-Alvarado, 2010). In both *Smed-p53(RNAi)* and *Smed-egfr-1(RNAi)*, multiple cell types and tissues (brain, muscle, secretory cells, sensory cells, eyes, pharynx, gut and mitotic cells) are found within the outgrowths (Figs. 5 and 6; Pearson and Sánchez-Alvarado, 2010), although with no clear patterning along a putative AP axis. Also, anti- α -tubulin immunostaining suggests that there is no well-defined DV axis. These outgrowths (described as teratomas in Pearson and Sánchez-Alvarado, 2010) are not lethal in either case. However, whereas dorsal outgrowths also develop in regenerating trunk pieces and especially intact planarians after *Smed-egfr-1(RNAi)*, they do not differentiate in those contexts after low-dose *Smed-p53(RNAi)* (Pearson and Sánchez-Alvarado, 2010).

As reported previously for *Smed-p53(RNAi)* (Pearson and Sánchez-Alvarado, 2010), we did not find any difference in proliferation rate compared to controls at early stages of regeneration after *Smed-egfr-1(RNAi)*. In contrast, in intact animals there was a significant increase in the proliferation rate that was already evident 2 weeks after *Smed-egfr-1(RNAi)* (Fig. 6). Compared to normal-dose *Smed-p53(RNAi)* in intact animals, in which an initial hyperproliferation stage is followed by an almost complete loss of cell division that results in a lethal phenotype (Pearson and Sánchez-Alvarado, 2010), the hyperproliferation observed after *Smed-egfr-1(RNAi)* is maintained during the 8–9 weeks of treatment (Fig. 6). Despite the apparent restriction of the outgrowths to the region above the pharynx, hyperproliferation was apparent throughout the animal. Interestingly, hyperproliferation preceded the development of the outgrowth. During starvation, planarians degrow due to an imbalance between the number of newborn and dead cells during cell turnover (Romero and Baguñà, 1991). However, despite the significant hyperproliferation observed after *Smed-egfr-1(RNAi)* those animals degrow (in total length) much faster than controls (Fig. 6I). As this faster degrowth does not seem to be associated with an increase in cell death, one possibility is that the excess of proliferating cells might be used for the development of the outgrowths. This is further supported by the fact that animals with overall bigger outgrowths are significantly smaller than animals with overall smaller dorsal outgrowths (Table S2).

Whereas the nature and localization of these dorsal outgrowths are similar in *Smed-p53(RNAi)* and *Smed-egfr-1(RNAi)* animals, there are also some obvious differences. The most striking difference is that whereas the partial silencing of *Smed-p53* leads to the differentiation of dorsal outgrowths in regenerating head and tail pieces (Pearson and Sánchez-Alvarado, 2010), the outgrowths that develop in intact planarians after *Smed-egfr-1(RNAi)* differentiate in a context in which there is an overexpression of *Smed-p53* and a general hyperproliferation. Therefore, future experiments are necessary to

clarify the role played by *Smed-p53* in the development of these dorsal outgrowths in the different cellular and genetic backgrounds, as well as the relationship between *Smed-p53* and *Smed-egfr-1*. What it can be concluded from the data presented here is that the silencing of *Smed-egfr-1* results in an overactivation of *Smed-p53* throughout the whole animal. Some studies in other models have suggested that p53 induces compensatory proliferation leading to hyperplastic overgrowths in some situations of cellular stress or damage (Bergmann and Steller, 2010). Therefore, a similar situation could be happening in planarians after *Smed-egfr-1(RNAi)*, in which a hyperproliferation and overactivation of *Smed-p53* are observed together with dorsal overgrowths.

Finally, before the outgrowth develops, the original pharynges lose their normal pattern, and as the outgrowths grow these pharynges are displaced and seem to enter them. Further analyses should try to elucidate how this pharynx displacement is related to the development of the outgrowth. An interesting observation is that the expression of *Smed-hoxD* at the base of the pharynx is abnormally expanded after *Smed-egfr-1(RNAi)*, which might argue for a role of *Smed-hoxD* in the development of the outgrowths. In summary, *Smed-egfr-1(RNAi)* leads to a general hyperproliferation that is associated with the development of dorsal outgrowths.

Cell fate-specific defects after *Smed-egfr-3(RNAi)*

Smed-egfr-3(RNAi) results in significantly reduced blastemas, especially during the first few days of regeneration. As *Smed-egfr-3(RNAi)* blastemas seem to recover as regeneration proceeds, one possibility could be that *Smed-egfr-3* silencing affects the overall growth and differentiation rate of the blastema. However, this can be ruled out because at 3 days of regeneration, cells expressing intermediate regeneration markers such as *Smed-mag-1* (first expressed within control blastemas at 2–3 days of regeneration; Zayas et al., 2010) are found within the blastema before early markers such as *Smed-Gpas* and *Smed-sFRP-1* (normally expressed between 12 h and 1 day of regeneration) are detectable. Also, TUNEL assay appears to rule out the possibility that *Smed-egfr-3(RNAi)* results in an increased cell death by apoptosis. Therefore, our data suggest that whereas some cell types and structures (mainly neuronal) fail to differentiate normally after *Smed-egfr-3(RNAi)*, other non-neuronal types such as marginal gland cells and epidermal cells seem to differentiate normally. Recently, it has been reported that *Smed-CHD4* is required for the differentiation of a certain cell lineage (Scimone et al., 2010), as *Smed-CHD4(RNAi)* planarians fail to accumulate cells expressing the late progeny marker *Smed-AGAT1* (Eisenhoffer et al., 2008) at the wound region of regenerating animals (Scimone et al., 2010). In contrast, our results indicate that *Smed-AGAT1* cells accumulate in the wound region of *Smed-egfr-3(RNAi)* regenerating planarians (Fig. 9). Moreover, the silencing of *Smed-egfr-3* does not prevent either the accumulation of the early progeny marker NB.21.11e (Eisenhoffer et al., 2008) at the wound region (Fig. 9). Although the identity of the cells that express NB.21.11e and AGAT1 needs to be determined, their expression pattern and localization suggest that they are non-neuronal cell types.

The EGFR signaling pathway is involved in CNS development in other animals, including mammals, as it regulates the proliferation, differentiation, migration and survival of different populations of neural stem and progenitor cells (Aguirre et al., 2007; Doetsch et al., 2002; Gonzalez-Perez et al., 2009; O'Keeffe et al., 2009). The fact that *Smed-egfr-3* is weakly expressed in the CNS and that silencing leads to neuronal defects suggest an important role for this signaling pathway in planarian CNS regeneration. However, we cannot exclude the possibility that the defects observed in the fused and smaller cephalic ganglia after *Smed-egfr-3(RNAi)* are not a direct consequence of *Smed-egfr-3* loss-of-function but rather due to abnormal CNS differentiation in a much reduced blastema. Further experiments should help to address this possibility.

Resultats

Another notable observation is the presence of mitotic cells within the reduced blastemas caused by *Smed-egfr-3(RNAi)*. Recently, Wenemoser and Reddien (2010) suggested that tissue loss would induce a signal to favor differentiation of neoblast progeny near the wound. By 48 h after amputation these authors report mitotic figures within the anterior blastemas as well as a high density of *Smedwi-1*-expressing cells within them (Wenemoser and Reddien, 2010). From that moment, however, the blastema appears to be formed by cells that cease expressing *Smedwi-1* but are still positive for an antibody against the SMEDWI-1 protein; at the same time, actively cycling cells (*Smedwi-1* positive) become restricted to the base of the blastema (Wenemoser and Reddien, 2010). From these results it was proposed that from about 48 h after amputation neoblast descendants within the blastema would exit the cell cycle and would respond to differentiating signals (Wenemoser and Reddien, 2010). Thus, the presence of mitotic cells within the blastemas following *Smed-egfr-3(RNAi)* might be explained by an inability of neoblasts or their early descendants to moving past this stage in which they would exit the cell cycle and respond to putative differentiation signals. As not all cell types appear to be affected, distinct signals may regulate the differentiation of the different cell types in the blastema. *Smed-egfr-3* could thus control the differentiation of new neural cells during planarian regeneration. In other regenerating systems, it has been proposed that the nervous system is required for proper regeneration (Kumar et al., 2007; Miljkovic-Licina et al., 2007; Singer, 1952). Therefore, it is tempting to speculate that the reduced blastemas observed after *Smed-egfr-3(RNAi)* could be a consequence of abnormal neural regeneration that would affect a putative neural factor required to promote or maintain normal blastema growth.

In summary, defects in blastema growth after *Smed-egfr-3(RNAi)* do not seem to be caused by reduced neoblast proliferation (Fig. 7) or increased apoptotic cell death (Fig. S10). We cannot totally rule out that cell cycle stages other than the G2/M transition detected with the anti phospho histone H3 might be affected after *Smed-egfr-3(RNAi)*; however, our results clearly indicate that the differentiation of some cell types (mainly neuronal) is affected. Future analyses should determine the exact relationship between this failure of differentiation and the much smaller blastemas regenerated after *Smed-egfr-3(RNAi)*.

Conclusions

EGFR signaling regulates multiple intracellular target pathways affecting a wide range of biological processes. As EGFR signaling pathway is over activated in many human cancers, a lot of research is being carried out to target it for therapeutical purposes (Bianco et al., 2007; Burgess, 2008). On the other hand, in classical models of regeneration, the EGFR signaling has been shown to play different important functions. Thus, for example, it is required for the patterning of distal structures during leg regeneration in insects (Nakamura et al., 2008), for efficient liver regeneration by regulating G1-S transition during early stages (Natarajan et al., 2007), and for proper cell proliferation and migration in regenerating zebrafish (Rojas-Muñoz et al., 2009). Planarians provide an attractive framework in which to study the role of the main cell signaling pathways in regeneration and stem cell biology. Here, we report for the first time a functional characterization of EGF receptors during planarian regeneration and homeostasis. Our results indicate that EGFR signaling regulates a variety of processes during regeneration. Thus, *Smed-egfr-1* is necessary to regenerate properly eye-pigment cells and the pharynx. In addition, silencing of *Smed-egfr-1* results in hyperproliferation and development of dorsal outgrowths. On the other side, *Smed-egfr-3* is necessary for blastema growth and the differentiation of certain cell types. Because of the diversity and complexity of the phenotypes obtained, a combination of high-throughput and next-generation sequencing tools will be needed

to further dissect at molecular and mechanistic levels how the silencing of each of the planarian *Smed-egfrs* leads to the defects described here.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.ydbio.2011.03.023.

Acknowledgments

We thank the laboratories of Emili Saló and Rafael Romero for support and helpful discussions. We also thank Josep Francesc Abril for sharing bioinformatics tools, Ignacio Maeso for advice on phylogenetic analysis, Linda Stöger for cloning *Smed-AGAT1* and for establishing the lectin labeling protocol in our laboratory, Hidefumi Orii for VC-1, Teresa Adell for anti-SMED- β CAT2, R.R. for TMUS13 and María Dolores Molina, José María Martín-Durán, and David Bueno for advice on vibratome sectioning. We thank Alejandro Sánchez-Alvarado for discussion. Anti-SYNORF1 and AA4.3 monoclonal antibodies were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa. We thank Iain Patten for advice on English style in a version of the manuscript. S.F. is supported by an FPI fellowship (MICINN, Spain). S.B. is supported by an APiF fellowship (University of Barcelona). F.C. is a Ramón y Cajal Researcher (MICINN, Spain). This work was supported by grants BFU2008-00710 (MICINN, Spain) and 2009SGR1018 (AGAUR, Generalitat de Catalunya) to F.C.

References

- Agata, K., Tanaka, C., Kobayashi, C., Kato, K., Saitoh, Y., 2003. Intercalary regeneration in planarians. *Dev. Dyn.* 226, 308–316.
- Aguirre, A., Dupree, J.L., Mangin, J.M., Gallo, V., 2007. A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nat. Neurosci.* 10, 990–1002.
- Aroian, R.V., Koga, M., Mendel, J.E., Ohshima, Y., Sternberg, P.W., 1990. The let-23 gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily. *Nature* 348, 693–699.
- Baguña, J., Saló, E., Auladell, C., 1989a. Regeneration and pattern formation in planarians III. Evidence that neoblasts. Are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development* 107, 77–86.
- Baguña, J., Saló, E., Romero, R., 1989b. Effects of activators and antagonists of the neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians. *Int. J. Dev. Biol.* 33, 261–264.
- Bardeen, C.R., Baetjer, F.H., 1904. The inhibitive action of the Roentgen rays on regeneration in planarians. *J. Exp. Zool.* 1, 191–195.
- Bergmann, A., Steller, H., 2010. Apoptosis, stem cells, and regeneration. *Sci. Signal.* 3 (145), re8.
- Bianco, R., Gelardi, T., Damiano, V., Ciardiello, F., Tortora, G., 2007. Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1416–1431.
- Birchmeier, C., 2009. ErbB receptors and the development of the nervous system. *Exp. Cell Res.* 315, 611–618.
- Brown, K.E., Baonza, A., Freeman, M., 2006. Epithelial cell adhesion in the developing *Drosophila retina* is regulated by Atonal and the EGF receptor pathway. *Dev. Biol.* 300, 710–721.
- Bueno, D., Baguña, J., Romero, R., 1996. A central body region defined by a position-specific molecule in the planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*: spatial and temporal variations during regeneration. *Dev. Biol.* 178, 446–458.
- Bueno, D., Espinosa, L., Baguña, J., Romero, R., 1997. Planarian pharynx regeneration in regenerating tail fragments monitored with cell-specific monoclonal antibodies. *Dev. Genes Evol.* 206, 425–434.
- Burgess, A.W., 2008. EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors* 26, 263–274.
- Cebrià, F., 2008. Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: an immunocytochemical study. *Neurosci. Res.* 61, 375–384.
- Cebrià, F., Newmark, P.A., 2005. Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. *Development* 132, 3691–3703.
- Cebrià, F., Vispo, M., Newmark, P.A., Bueno, D., Romero, R., 1997. Myocyte differentiation and body wall musculature in the planarian *Girardia tigrina*. *Dev. Genes Evol.* 207, 306–316.
- Cebrià, F., Kobayashi, C., Umeson, Y., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Itoh, M., Taira, M., Sánchez-Alvarado, A., Agata, K., 2002a. FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature* 419, 620–624.
- Cebrià, F., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Agata, K., 2002b. Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev. Growth Differ.* 44, 135–146.
- Cebrià, F., Guo, T., Jopek, J., Newmark, P.A., 2007. Regeneration and maintenance of the planarian midline is regulated by a slit orthologue. *Dev. Biol.* 307, 394–406.
- Chai, G., Ma, C., Bao, K., Zheng, L., Wang, X., Sun, Z., Saló, E., Adell, T., Wu, W., 2010. Complete functional segregation of planarian beta-catenin-1 and -2 in mediating WNT signaling and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 285, 24120–24130.

- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36, 1021–1034.
- Dumstrei, K., Wang, F., Shy, D., Tepass, U., Hartenstein, V., 2002. Interaction between EGFR signaling and DE-cadherin during nervous system morphogenesis. *Development* 129, 3983–3994.
- Eisenhoffer, G.T., Kang, H., Sánchez-Alvarado, A., 2008. Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell* 3, 327–339.
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceri, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Bateman, A., 2010. The Pfam protein families database. *Nucl. Acids Res.* 38 (suppl 1), D211–D222.
- Freeman, M., 1997. Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development* 124, 261–270.
- Gonzalez-Perez, O., Romero-Rodriguez, R., Soriano-Navarro, M., Garica-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 2009. Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells* 27, 2032–2043.
- Gumbiner, B.M., 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 622–634.
- Gurley, K.A., Rink, J.C., Sánchez-Alvarado, A., 2008. Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science* 319, 323–327.
- Hazan, R.B., Norton, L., 1998. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273, 9078–9084.
- Hoschuetzky, H., Aberle, H., Kemler, R., 1994. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* 127, 1375–1380.
- Hyman, L.H., 1951. *The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela*. McGraw-Hill, New York.
- Iglesias, M., Gómez-Skarmeta, J.L., Saló, E., Adell, T., 2008. Silencing of *Smed-betacatenin1* generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* 135, 1215–1221.
- Ishii, S., 1962/1963. Electron microscopic observations on the planarian tissues. I. A survey of the pharynx. *Fukushima J. Med. Sci.* 9/10, 51–73.
- Ishii, S., 1964. The ultrastructure of the outer epithelium of the planarian pharynx. *Fukushima J. Med. Sci.* 11, 109–125.
- Jiang, H., Edgar, B.A., 2009. EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development* 136, 483–493.
- Kobayashi, C., Watanabe, K., Agata, K., 1999. The process of pharynx regeneration in planarians. *Dev. Biol.* 211, 27–38.
- Kumar, A., Godwin, J.W., Gates, P.B., Garza-Garcia, A.A., Brockes, J.P., 2007. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* 318, 772–777.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Livneh, E., Glazer, L., Segal, D., Schlessinger, J., Shilo, B.Z., 1985. The *Drosophila* EGF receptor gene homolog: conservation of both binding and kinase domains. *Cell* 40, 599–607.
- Miljkovic-Licina, M., Chera, S., Ghila, L., Galliot, B., 2007. Head regeneration in wild-type hydra requires de novo neurogenesis. *Development* 134, 1191–1201.
- Molina, M.D., Saló, E., Cebrià, F., 2007. The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians. *Dev. Biol.* 311, 79–94.
- Nagaraj, R., Banerjee, U., 2007. Combinatorial signaling in the specification of primary pigment cells in the *Drosophila* eye. *Development* 134, 825–831.
- Nakamura, T., Mito, T., Miyawaki, K., Ohuchi, H., Noji, S., 2008. EGFR signaling is required for re-establishing the proximodistal axis during distal leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus* nymph. *Dev. Biol.* 319, 46–55.
- Natarajan, A., Wagner, B., Sibilia, M., 2007. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 17081–17086.
- Newmark, P.A., Sánchez-Alvarado, A., 2000. Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev. Biol.* 220, 142–153.
- Newmark, P.A., Sánchez-Alvarado, A., 2002. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat. Rev. Genet.* 3, 210–219.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umehara, Y., Yoshimoto, K., Takeuchi, K., Taniguchi, T., Agata, K., 2007a. Identification and distribution of tryptophan hydroxylase (TPH)-positive neurons in the planarian *Dugesia japonica*. *Neurosci. Res.* 59, 101–106.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umehara, Y., Sano, S., Yoshimoto, K., Inden, M., Takata, K., Taniguchi, T., Shimohama, S., Agata, K., 2007b. Reconstruction of dopaminergic neural network and locomotion function in planarian regenerates. *Dev. Neurobiol.* 67, 1059–1078.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., Salomon, D.S., 2006. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366, 2–16.
- O'Keefe, G.C., Tyers, P., Aarsland, D., Dalley, J.W., Barker, R.A., Caldwell, M.A., 2009. Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 8754–8759.
- Okamoto, K., Takeuchi, K., Agata, K., 2005. Neural projections in planarian brain revealed by fluorescent dye tracing. *Zool. Sci.* 22, 535–546.
- Orii, H., Watanabe, K., 2007. Bone morphogenetic protein is required for dorso-ventral patterning in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev. Growth Differ.* 49, 345–349.
- Oviedo, N.J., Newmark, P.A., Sánchez-Alvarado, A., 2003. Allometric scaling and proportion regulation in the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev. Dyn.* 226, 326–333.
- Pearson, B.J., Sánchez-Alvarado, A., 2010. A planarian p53 homolog regulates proliferation and self-renewal in adult stem cells. *Development* 137, 213–221.
- Pearson, B.J., Eisenhoffer, G.T., Gurley, K.A., Rink, J.C., Miller, D.E., Sánchez-Alvarado, A., 2009. Formaldehyde-based whole-mount in situ hybridization method for planarians. *Dev. Dyn.* 238, 443–450.
- Pelletier, J., Fitzgerald, P., Watanabe, S., Mancuso, J., Green, D.R., Sánchez-Alvarado, A., 2010. Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev. Biol.* 338, 76–85.
- Petersen, C.P., Reddien, P.W., 2008. *Smed-betacatenin-1* is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. *Science* 319, 327–330.
- Reddien, P.W., Sánchez-Alvarado, A., 2004. Fundamentals of planarian regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 725–757.
- Reddien, P.W., Oviedo, N.J., Jennings, J.R., Jenkin, J.C., Sánchez-Alvarado, A., 2005. *SMEDWI-2* is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* 310, 1327–1330.
- Reddien, P.W., Bermange, A.L., Kicza, A.M., Sánchez, Alvarado A., 2007. BMP signaling regulates the dorsal planarian midline and is needed for asymmetric regeneration. *Development* 134, 4043–4051.
- Reddien, P.W., Newmark, P.A., Sánchez-Alvarado, A., 2008. Gene nomenclature guidelines for the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev. Dyn.* 237, 3099–3101.
- Rink, J.C., Kyle, A., Gurley, K.A., Elliott, S.A., Sánchez-Alvarado, A., 2009. Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia. *Science* 326, 1406–1410.
- Rojas-Muñoz, A., Rajadhyksha, S., Gilmour, D., van Bebber, F., Antos, C., Rodríguez Esteban, C., Nüsslein-Volhard, C., Izpisua Belmonte, J.C., 2009. *ErbB2* and *ErbB3* regulate amputation-induced proliferation and migration during vertebrate regeneration. *Dev. Biol.* 327, 177–190.
- Romero, R., Bagnà, J., 1991. Quantitative cellular analysis of growth and reproduction in freshwater planarians (Turbellaria: Tricladida). I. A cellular description of the intact organism. *Invertebr. Reprod. Dev.* 19, 157–165.
- Sakai, F., Agata, K., Orii, H., Watanabe, K., 2000. Organization and regeneration ability of spontaneous supernumerary eyes in planarians — eye regeneration field and pathway selection by optic nerves. *Zool. Sci.* 17, 375–381.
- Saló, E., 2006. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *Bioessays* 28, 546–559.
- Saló, E., Bagnà, J., 1984. Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia* (*G*) *tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 83, 63–80.
- Saló, E., Abril, J.F., Adell, T., Cebrià, F., Eckelt, K., Fernández-Taboada, E., Handberg-Thorsager, M., Iglesias, M., Molina, M.D., Rodríguez-Esteban, G., 2009. Planarian regeneration: achievements and future directions after 20 years of research. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 1317–1327.
- Sánchez-Alvarado, A., Newmark, P.A., Robb, S.M., Juste, R., 2002. The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development* 129, 5659–5665.
- Sánchez-Alvarado, A., Newmark, P.A., 1999. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 5049–5054.
- Sánchez-Alvarado, A., Tsonis, P.A., 2006. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat. Rev. Genet.* 7, 873–884.
- Sato, Y., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Hoshi, M., Negishi, S., 2005. Comparative study of eye defective worm “menashi” and regenerating wild-type in planarian, *Dugesia ryukyuensis*. *Pigment Cell Res.* 18, 86–91.
- Scimone, M.L., Meisel, J., Reddien, P.W., 2010. The *Mi-2*-like *Smed-CHD4* gene is required for stem cell differentiation in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Development* 137, 1231–1241.
- Shoemaker, C.B., Ramachandran, H., Landa, A., dos Reis, M.G., Stein, L.D., 1992. Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53, 17–32.
- Singer, M., 1952. The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity. *Q. Rev. Biol.* 27, 169–200.
- Spiliotis, M., Kroner, A., Brehm, K., 2003. Identification, molecular characterization and expression of the gene encoding the epidermal growth factor receptor orthologue from the fox-tape worm *Echinococcus multilocularis*. *Gene* 323, 57–65.
- Takeda, H., Nishimura, K., Agata, K., 2009. Planarians maintain a constant ratio of different cell types during changes in body size by using the stem cell system. *Zool. Sci.* 26, 805–813.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Umehara, Y., Watanabe, K., Agata, K., 1997. A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev. Growth Differ.* 39, 723–727.
- Wenmoser, D., Reddien, P.W., 2010. Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev. Biol.* 344, 979–991.
- Wong, R.W., Guillaud, L., 2004. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 147–156.
- Xian, C.J., Zhou, X.F., 2004. EGF family of growth factors: essential roles and functional redundancy in the nerve system. *Front. Biosci.* 9, 85–92.
- Yazawa, S., Umehara, Y., Hayashi, T., Tarui, H., Agata, K., 2009. Planarian hedgehog/patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106, 22329–22334.
- Zayas, R.M., Cebrià, F., Guo, T., Feng, J., Newmark, P.A., 2010. The use of lectins as markers for differentiated secretory cells in planarians. *Dev. Dyn.* 239, 2888–2897.

Material suplementari
Article 1

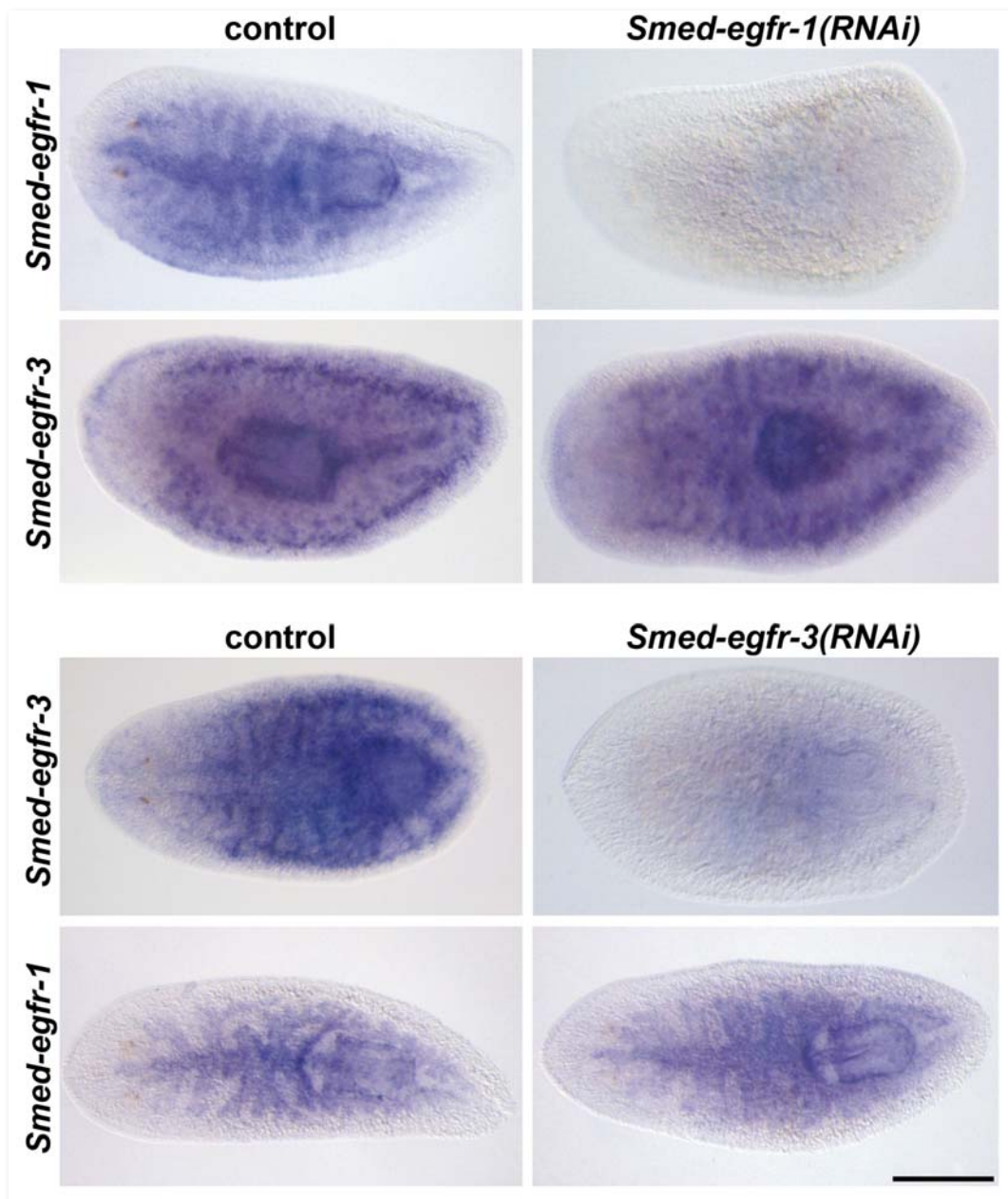


Figure S1. Efficiency of RNAi silencing. Whole-mount in situ hybridizations showing the downregulation of the endogenous expression of Smed-egfr-1 and Smed-egfr-3 after RNAi. The silencing of Smed-egfr-1 or Smed-egfr-3 did not affect the endogenous expression of Smed-egfr-3 or Smed-egfr-1, respectively. All samples are regenerating head pieces after one round of RNAi. For Smed-egfr-1(RNAi), 19 days of regeneration. For Smed-egfr-3(RNAi), 12 days of regeneration. Anterior to the left. Scale bars, 500 μ m.

Resultats

EmER	1	-----SARSNLQDNITE
SmanEGFR	1	-----VRANIEELIQE
SMED-EGFR-1	1	-----GKGIFGSGVYAGKWKLENGCFDDNSSMNSCKDSKVDVVIKV-LNHSCDQNEFMDE
SMED-EGFR-2	1	--TKPFGIGAFGAVYRGVWKEFN---KDLEKSDRDSLDVAIKVIR-ANRNIDIQEEMEE
SMED-EGFR-3	1	--SKPLGSGAFGKVYRGYWKVPR---QDNKYIN---LEVVIKVTH-NSSKGSTDEELEE
LsEGFR	1	-KGAIFGSGAFGTIVYKGIWIFH-----GENVKIPVAIKIIQEGTSPGQSTEELEE
DmEGFR	1	--GGVLGMGAFGRVYKGVWVPE-----GENVKIPVAIKELKSTGAESSEEEFIRE
HsERBB1	1	-KIKVLGSGAFGTIVYKGLWIFH-----GEKVIPVAIKELREATSPKANKEILDE
HsERBB2	1	-KVKVLGSGAFGTIVYKGIWIFD-----GENVKIPVAIKVIRENTSPKANKEILDE
HsERBB3	1	RKLKVLGSGVFGTVHKGWVIFH-----GESVKIPVCIKVIEDKSGRQSFQAVTDH
Celet-23	1	KLDKRLGAGAFGTIVAGIYYEKR-----AKNVKIPVAIKVFQTDQS--QTDEELEE

EmER	13	AKVMASVQHKNCLPLGVCLIRKMQCMVSMFVEEGSLDRYLRLHREDLNSFTLLSWAEQI
SmanEGFR	12	AKIMASVMHRHCLPLIGTCLSERHCLVSI FVELGALDRYVQHAELNSLTLLSWAEQI
SMED-EGFR-1	54	VRIMASVRHKKHCLRLGVSYKGSEKLLISSMPLGSEKYEKKNKSLTGKILLKWAQEI
SMED-EGFR-2	54	AKVMASVCHKHCLRLIGTCLKYEMPCLIXTFVELGSLDKYIRKHKSTLCLSTLLSWAEQI
SMED-EGFR-3	51	AKIMASVSHRHCLPLGVCLILEKPCLVSTVAQHGSIDKYQQNSKKISSSLKWAQEI
LsEGFR	50	ARVMGSVEHICCVRLAVCLIKYQVMLVLTQMLPHGNLLNYVRDNAQHIGSALLNWCVOI
DmEGFR	49	AYIMASEEHVNLRLAVCMSSQVMLITQMLPLGCLLDYVRNNRKIGSALLNWCVOI
HsERBB1	50	AYVMASVDNPIVCRLIGTCLLSTVQLITQMLPFGLLDYVREHKINIGSYLLNWCVOI
HsERBB2	50	AYVMAVGSPYVSRLIGTCLLSTVQLVTQMLPYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCVOI
HsERBB3	51	MLATGSLDHAHIVRLIGLCPGSSVCLVTQMLPLGSLLDHVROHRRGALGPOLLNWCVOI
Celet-23	50	ATNMFRRLRHDNLKTIIGFCVHDDGKIVTTRPLGNLQNFRLKHENLGAREQVLCYQI

EmER	73	ADGMAYLEERGIHRDLAARNVLVQRELVOITDFGLAKMLTNNET--SVVVRTGKVPPI
SmanEGFR	72	ADGMSYLEMRGIHRDLAARNVLVQTRHVQITDFGLAKMLERRDET--SVIVKAGKVPPI
SMED-EGFR-1	114	ANGMAYLENNHIIHRDLATRNVLIIYKENHVQITDFGLSKIINPNKDE---VQIFGGMVVPV
SMED-EGFR-2	114	ADGMTYLEIRGIHRDLATRNVLXLDLEIITQITDFGLAHIVQCPENKNEIVISGGQVPI
SMED-EGFR-3	111	ADGMAYLNKRGIIHRDLAARNVLVDDDNITQITDFGLARLVETDLS---VVKSGKVPPI
LsEGFR	109	ARGMAYLEERGIHRDLAARNVLVQIPNOVKITDFGLAKLLSDAIV---YQSSGGMLMPI
DmEGFR	108	AKGMSYLEERVRVHRDLAARNVLVQTPSLVKITDFGLAKLLSSDSNIT---YKAAGGKVPPI
HsERBB1	109	AKGMNYLEDRRVHRDLAARNVLVKIPQHVKITDFGLAKLLGAEKE---YHAEGGKVPPI
HsERBB2	109	AKGMSYLEDRRVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLIDETI---YHADGGKVPPI
HsERBB3	110	AKGMYYLEEHCMVHRNLAARNVLKSPSQVQVADFCVADLPPDEKQ---LYSEAKTPI
Celet-23	110	ASGMAYLEKQRRVHRDLATRNVLVKKFNHVEITDFGLSKILKHDAIS---ITKSGKVAI

EmER	131	RWLAETTLQAGIYSHKTDVWSYGVTLWEITFTFGKQPYENISTSEIKDHVMKGVRLSQPEI
SmanEGFR	130	RWLAETTLQYGIYSHKTDVWSYGVTLWEITFTFGKQPYEDVDTVLEIKDHVIKGGRLTOPDI
SMED-EGFR-1	171	RWLAETTLRDGIYSHKTDVWAYAVTLWEITFTFATVPYEFKAEIRDEIITKGTIRLRQOPDI
SMED-EGFR-2	174	RWLAETTLNGIYSHKTDVWSYGVTLWEITFTYGERPYEDDVREITSYLIQGNRLAQPEI
SMED-EGFR-3	168	RWLAETTLSATYSPATDVWAYGVTLWEITFYAKRPYEELATGEIKSLLQQGNRLCQPEI
LsEGFR	166	KWLALECIINHRIETHKSDVWSYGVTLWEITLCKKPYENVRTKDVPMLLEKGERLQOPSM
DmEGFR	165	KWLALECIIRNRVETSKSDVWAGVTLWEITFGQREHENTPAKDIPDLIEVCKKLEQPEI
HsERBB1	166	KWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTLWEIMTFGSKPYDGPASEISSLKGERLPQPI
HsERBB2	166	KWMALESILRRRETHQSDVWSYGVTLWEIMTFGAPYDGPAREIPDLLEKGERLPQPI
HsERBB3	167	KWMALESIHFGKYTHQSDVWSYGVTLWEIMTFGAEPYAGRLAEVPLLEKGERLAQPOI
Celet-23	167	KWLAETIFSKHCYTHASDVWAGVTLWEITFGQSPYQGSTDSIHNFLLKDCNRLSQPNI

EmER	191	CTIDVYMMVQCWMEIHSRPTFLELMKC-
SmanEGFR	190	CTIDVYMMVVKCWMEIYESRPTFIELMRT-
SMED-EGFR-1	231	CSLDYCTLMKCVSWDPEERPNFEYLTWT--
SMED-EGFR-2	234	CSVDLYQIMCHCWYENANDRPSFETLMSTL
SMED-EGFR-3	228	STLEVYMMIMKCVLDPPHMRPSFMELMST-
LsEGFR	226	CTIDVYMMVVKCWMLEAESRPSFRELMDE-
DmEGFR	225	CSLDYCTLLSCWHLDAAMRPTFKQLTT--
HsERBB1	226	CTIDVYMMVVKCWMIDAPSRKFRRLT---
HsERBB2	226	CTIDVYMMVVKCWMIDSECRERFRELMSE-
HsERBB3	227	CTIDVYMMVVKCWMIDENIRPTFKELANE-
Celet-23	227	CSQDLYQELLRCWMAIPKSRGFEIITYER-

Figure S2. Alignment of the protein tyrosine kinase domain of SMED-EGFRs and other EGFRs from different species. Identical amino acid residues are shaded in black; conservative substitutions, in gray. Homologous genes and abbreviations used are as follows: Em, *Echinococcus multilocularis* (AJ515524), Sman, *Schistosoma mansoni* (M86396), Ls, *Lymnaea stagnalis* (EF492516), Dm, *Drosophila melanogaster* (NM_057410), Hs, *Homo sapiens* (erbb1: NP_005219, erbb2: NP_004439, erbb3: NP_001973), Ce, *Caenorhabditis elegans* (NM_001136359).

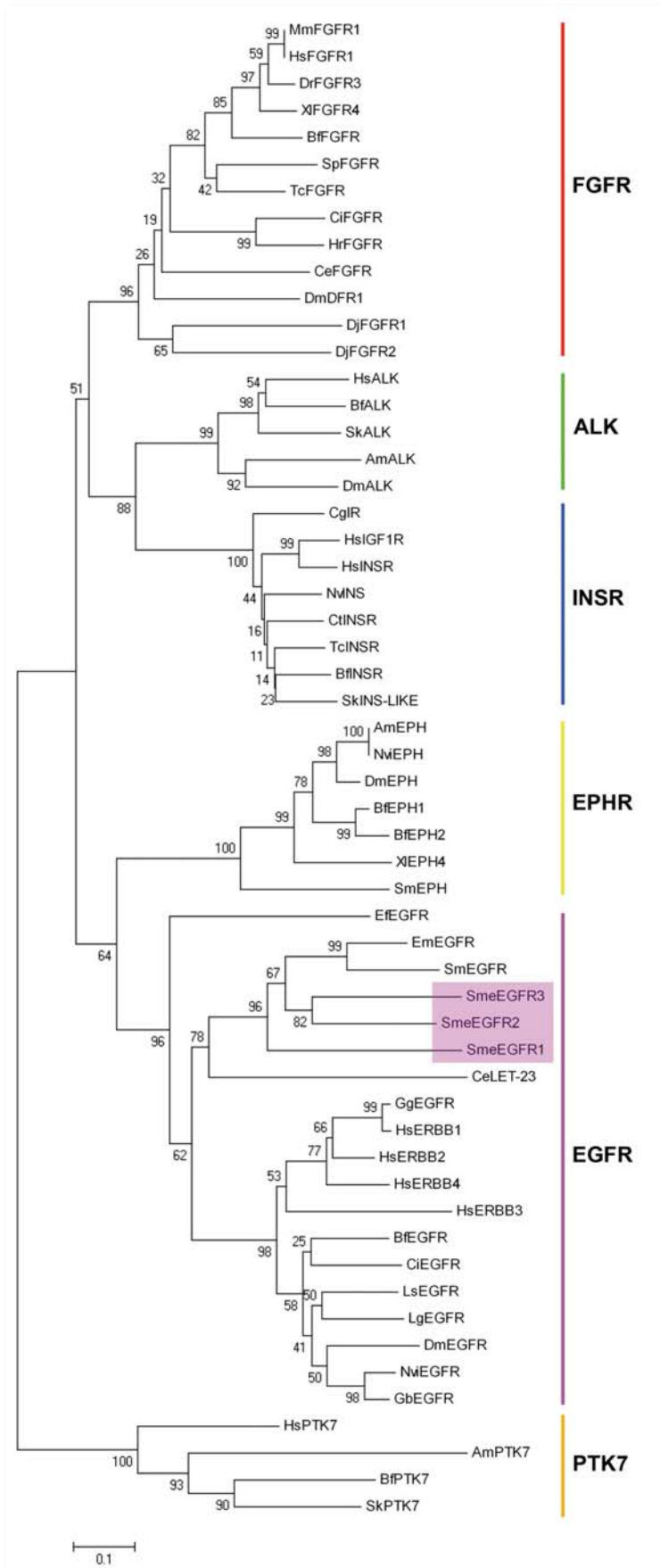


Figure S3. Phylogenetic tree of the receptor tyrosine kinase superfamily.

The relationship between SMED-EGFRs and other receptor tyrosine kinase families was inferred using neighbor-joining. The bootstrap consensus tree shown was inferred from 10,000 replicates. Only the conserved tyrosine kinase domains were used to construct the tree.

Abbreviations:

Mm, *Mus musculus*,
Hs, *Homo sapiens*,
Xl, *Xenopus laevis*,
Bf, *Branchiostoma floridae*, Sp, *Strongylocentrotus purpuratus*,
Tc, *Tribolium castaneum*, Ci, *Ciona intestinalis*,
Hr, *Halocynthia roretzi*,
Dm, *Drosophila melanogaster*,
Dj, *Dugesia japonica*,
Sk, *Saccoglossus kowalevskii*,
Am, *Apis mellifera*,
Cg, *Crassostrea gigas*,
Nv, *Nematostella vectensis*, Ct, *Capitella teleta*,
Nvi, *Nasonia vitripennis*,
EM, *Echinococcus multilocularis*,
Sm, *Schistosoma mansoni*,
Sme, *Schmidtea mediterranea*,
Ef, *Ephydatia fluviatilis*,
Ce, *Caenorhabditis elegans*,
Gg, *Gallus gallus*,
Ls, *Lymnaea stagnalis*,
Lg, *Lottia gigantea*,
Gb, *Gryllus bimaculatus*,

FGFR, fibroblast growth factor receptors, ALK, anaplastic lymphoma kinase, INSR, insulin receptors, EPHR, ephrin receptors, EGFR, epidermal growth factor receptor, PTK7, pseudo tyrosine kinase receptor 7.

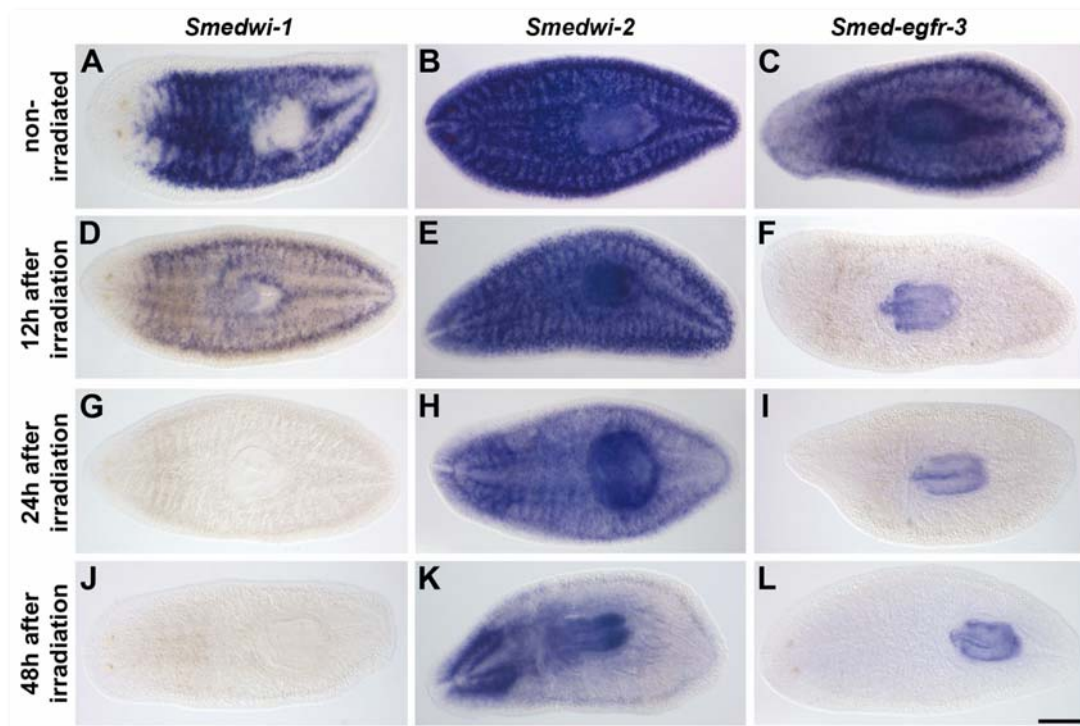


Figure S4. Expression of *Smed-egfr-3* is rapidly lost after irradiation. Expression of *Smed-egfr-3* in non-irradiated (C) and irradiated planarians (F, I, and L). Twelve hours after irradiation at 100 Gy, the expression of *Smed-egfr-3* in the mesenchyme around the gut branches is completely lost (F). The expression in the pharynx does not disappear (F, I, and L). Expression of *Smedwi-1* in non-irradiated (A) and irradiated planarians (D, G, and J). *Smedwi-1* expression is decreased 12 h after irradiation (D) and is completely lost after 24 h (G). Expression of *Smedwi-2* in non-irradiated (B) and irradiated planarians (E, H, and K). *Smedwi-2* expression in the mesenchyme is mainly lost between 24 h and 48 h (H and K). However, the expression in the CNS remains (H and K). Anterior to the left. Scale bar, 500 μ m.

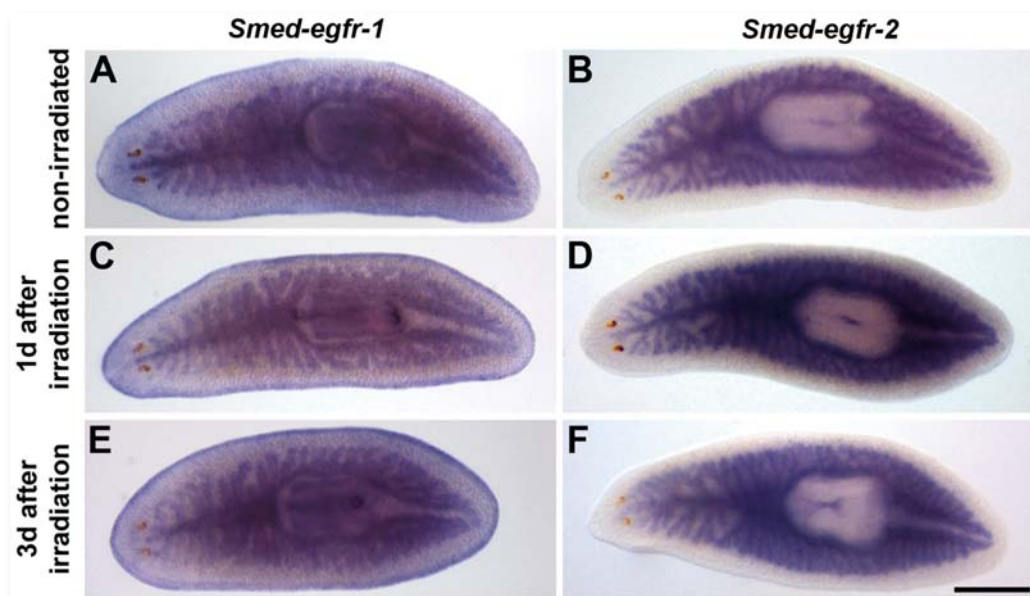


Figure S5. Expression of *Smed-egfrs* after irradiation. The expression of *Smed-egfr-1* (A, C, and E) and *Smed-egfr-2* (B, D, and F) is not downregulated neither 1 day nor 3 days after irradiation. Scale bar, 500 μ m.

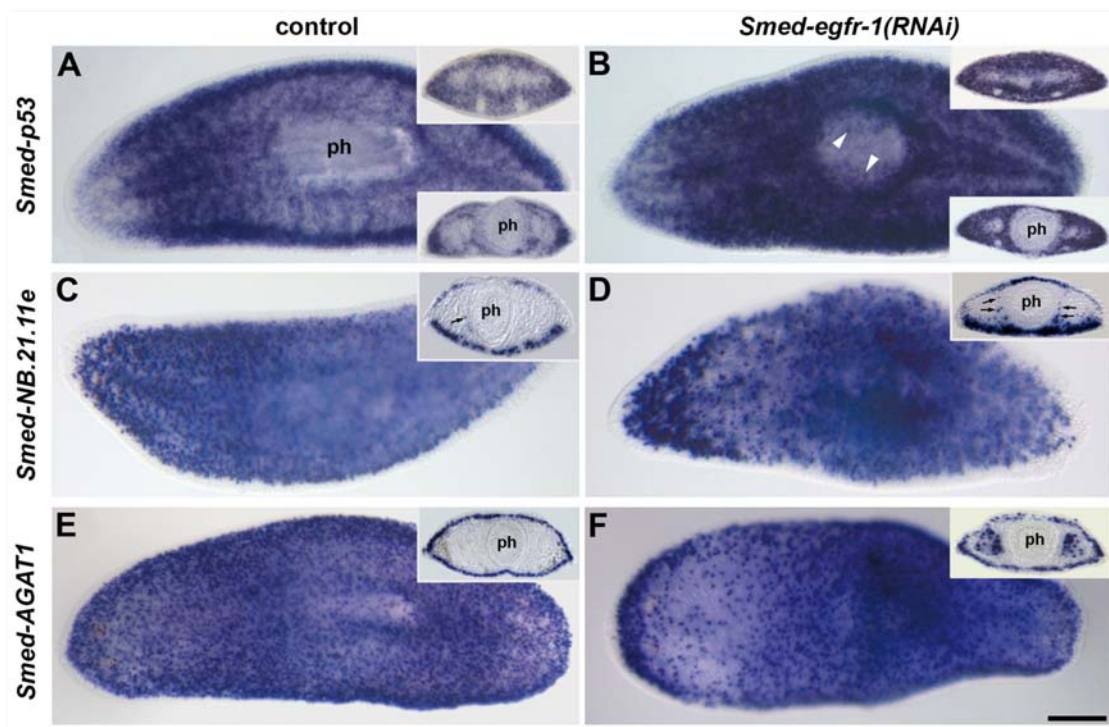


Figure S6. Silencing of *Smed-egfr-1* in intact animals results in abnormal expression of *Smed-p53*, *Smedwi-1*, *Smed-NB.21.11e* and *Smed-AGAT1* genes. (A, B) Expression of *Smed-p53* in control (A) and *Smed-egfr-1(RNAi)* (B) intact planarians after 4 weeks of treatment. The expression of *Smed-p53* is clearly upregulated all throughout the body after *Smed-egfr-1(RNAi)* in $n = 6/7$ animals. *Smed-p53*-positive cells are also seen within the outgrowths (arrowheads in B). (C and D) Expression of *Smedwi-1* in control (C) and *Smed-egfr-1(RNAi)* (D) intact planarians after 6 weeks of treatment. An increase in the number of *Smedwi-1*-expressing cells in the mesenchyme is evident (inset in D; $n = 2/2$). (E and F) Expression of *Smed-NB.21.11e* in control (E) and *Smed-egfr-1(RNAi)* (F) intact planarians after 6 weeks of treatment. After *Smed-egfr-1(RNAi)*, *Smed-NB.21.11e* expression is concentrated around the head margin (F) ($n = 7/8$), compared to the most uniform cell distribution seen in controls (E). In $n = 3/3$ animals a higher number of positive cells were seen in the mesenchyme around the pharynx (arrows in inset in F). Expression of *Smed-AGAT1* in control (G) and *Smed-egfr-1(RNAi)* (H) intact planarians after 6 weeks of treatment. After *Smed-egfr-1(RNAi)* a reduction of *Smed-AGAT1* cells in the pre-pharyngeal region was observed (H) in $n = 4/4$ animals. In $n = 2/3$ animals *Smed-AGAT1*-expressing cells were seen around the gut branches (inset in H). Insets in each panel show histological transverse sections of the corresponding panel. Anterior to the left. All panels show dorsal views. ph, pharynx. Scale bar, 500 μm .

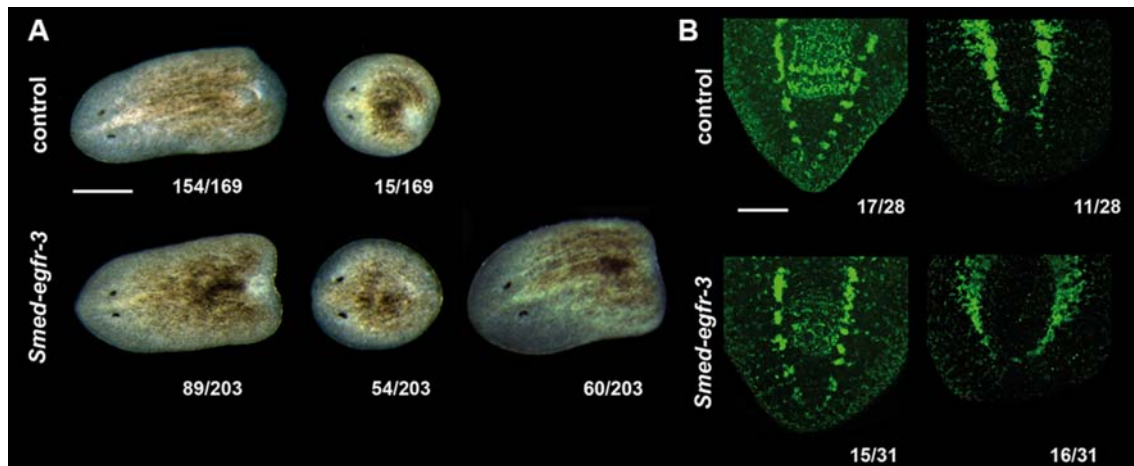


Figure S7. Effects of *Smed-egfr-3*(RNAi) on regenerating head pieces. A percentage of posterior regenerating head pieces show reduced blastemas (A) and abnormal differentiation of the ventral nerve cords revealed by anti-SYNORF1 immunostaining (B). Because after two rounds of amputation head pieces are very small, a percentage of control animals also show regeneration problems. (A) Five days of regeneration, anterior to the left. (B) Eleven days of regeneration, anterior to the top. Scale bars, A, 500 μ m; B, 200 μ m.

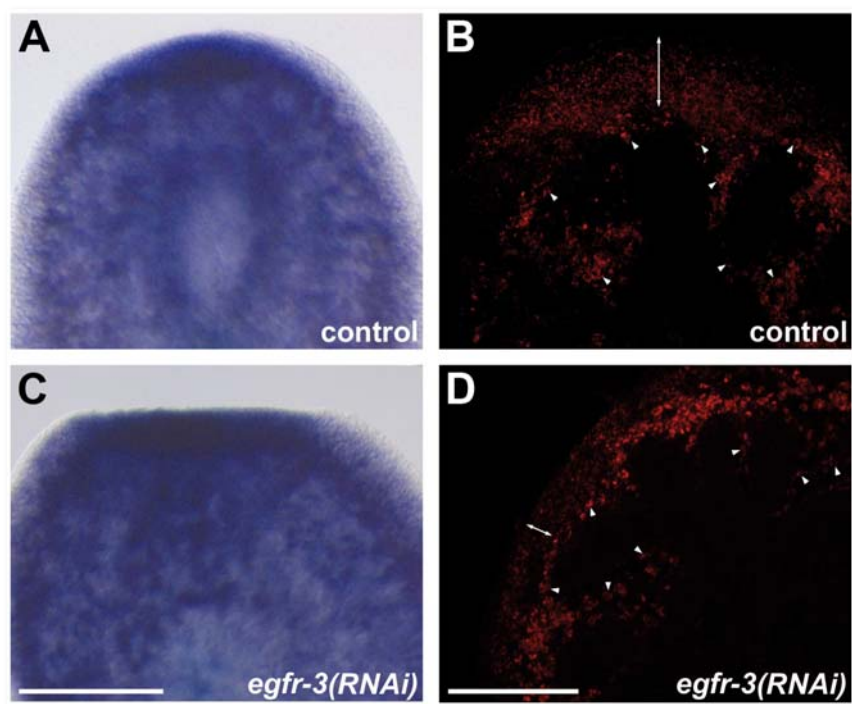


Figure S8. *Smedwi-2* is normally present after *Smed-egfr-3*(RNAi). *Smedwi-2* expression in regenerating control (A–B) and *Smed-egfr-3*(RNAi) (C–D) trunks after 3 days of regeneration. *Smedwi-2* is strongly expressed in the blastema and wound region of control (A) and *Smed-egfr-3*(RNAi) (C) animals. Despite the reduced blastema (delimited by a two-arrowed line in D) after *Smed-egfr-3*(RNAi), *Smedwi-2* positive cells are also detected around the gut branches (arrowheads in D), similarly to controls (arrowheads in B). Scale bar, 300 μ m.

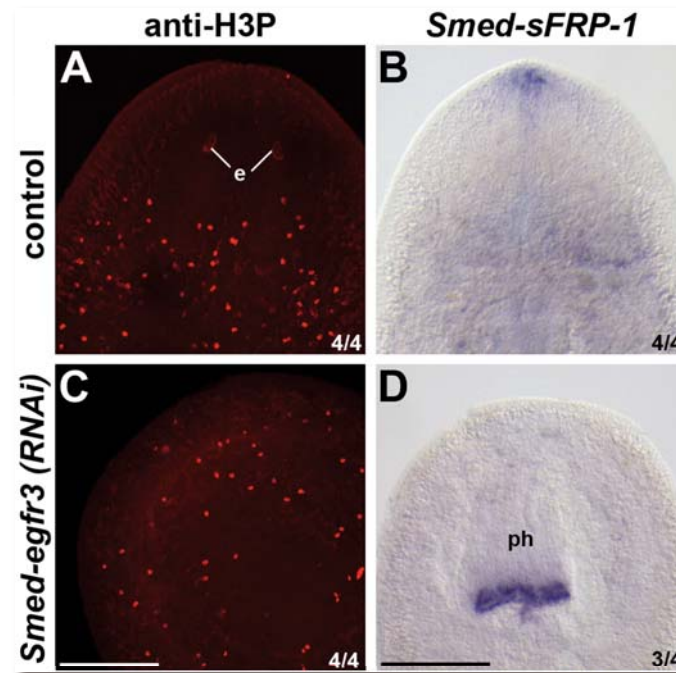


Figure S9. Regeneration defects after 3 rounds of Smed-egfr-3(RNAi). (A–B) Control animals. (C–D) Smed-egfr-3(RNAi) animals. Twelve days of regeneration after the third amputation. Control animals regenerate normal heads with a normal pattern of mitotic figures in the anterior region behind the eyes (A) and normal expression of Smed-sFRP-1 at their anterior ends (B). In contrast most of the Smed-egfr-3(RNAi) animals did not regenerate a blastema. In them, mitotic figures are present in the wound region (C) but no expression of Smed-sFRP-1 is detected (D). Anterior to the top. e, eyes, ph, pharynx. Scale bar, 300 µm.

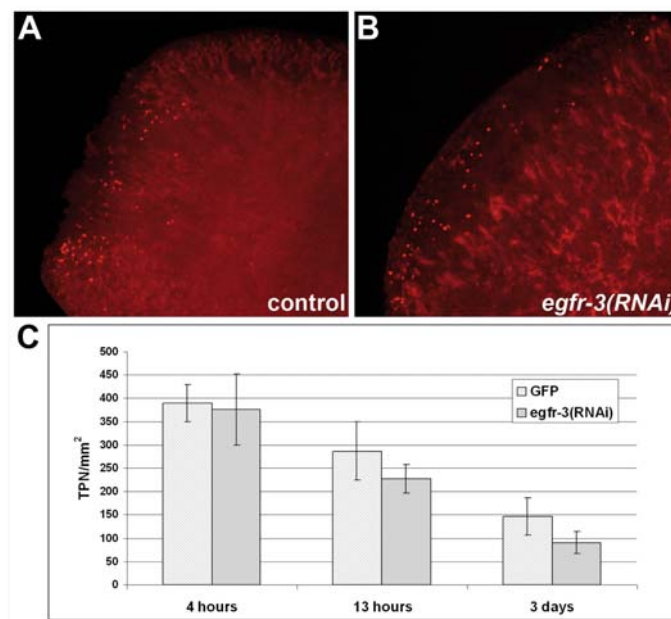


Figure S10. Smed-egfr-3(RNAi) does not result in an increase of cell death by apoptosis. (A and B) Apoptotic cells labeled with TUNEL assay in the wound region 13 h after amputation in control (A) and Smed-egfr-3(RNAi) (B) animals. (C) Quantification of the number of apoptotic cells at 4 h, 13 h and 3 days after amputation. At 4 h, 389 ± 39.6 TPN/mm² in control (n = 11) versus 376 ± 77.1 TPN/mm² in Smed-egfr-1(RNAi) (n = 14) animals. At 13 h, 287 ± 62.3 TPN/mm² in control (n = 10) versus 227 ± 31.3 TPN/mm² in Smed-egfr-1(RNAi) (n = 11) animals. At 3 days, 147 ± 40 TPN/mm² in control (n = 3) versus 90 ± 24.1 TPN/mm² in Smed-egfr-1(RNAi) (n = 7) animals. mean $\pm$ s.e.m. TPN, TUNEL positive nuclei.

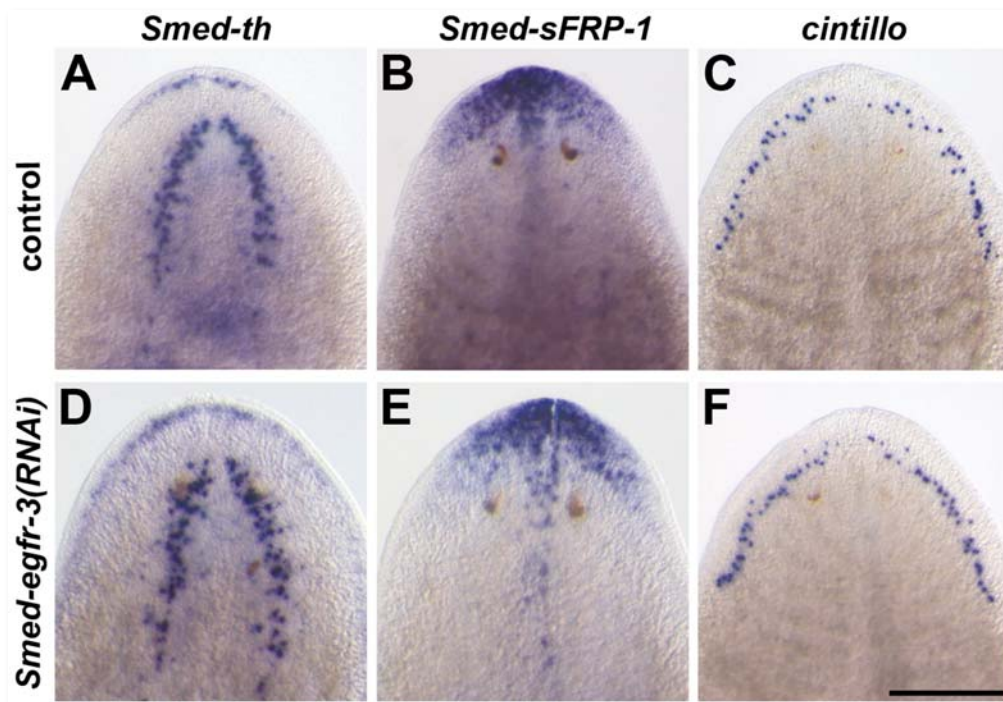


Figure S11. No defects after Smed-egfr-3(RNAi) in intact planarians. (A and D) Expression of Smed-th in control (A) and Smed-egfr-3(RNAi) (D) planarians. (B and E) Expression of Smed-sFRP-1 in control (B) and Smed-egfr-3(RNAi) (E) animals. (C, F) Expression of cintillo in control (C) and Smed-egfr-3(RNAi) (F) planarians. No significant changes were observed after 6 weeks of RNAi treatment. Scale bar, 300 μ m.

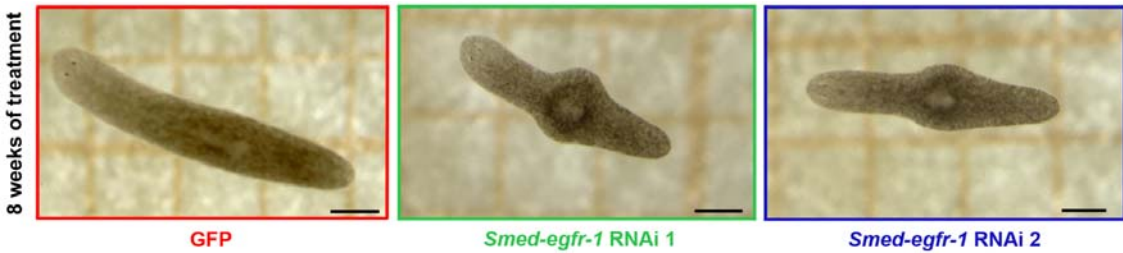
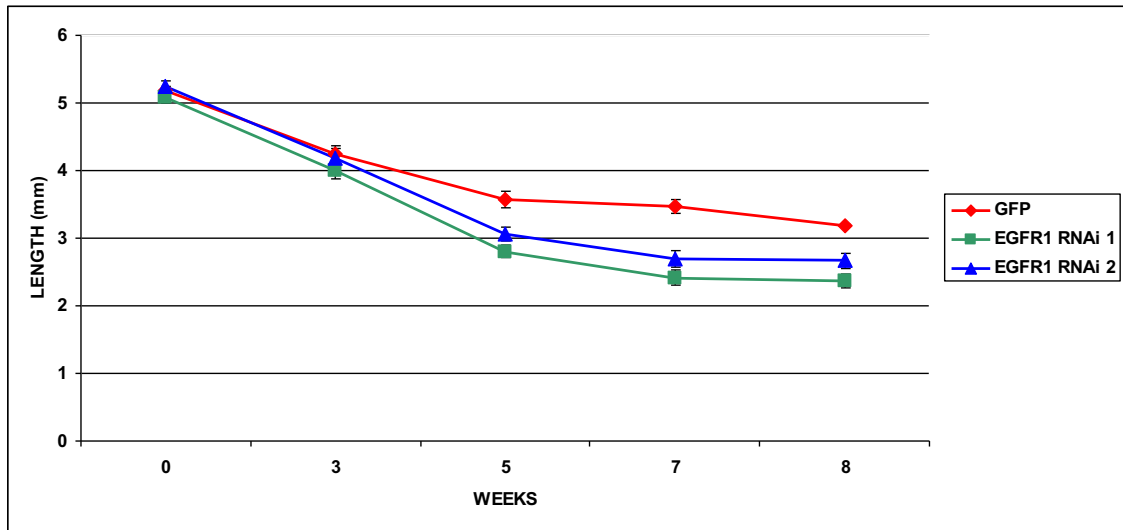
	Blastema formation	2r 4days	2r 6days	3r 4days	3r 6days	3r 10days
Control	Normal	96,55% (n=29)	96,55% (n=29)	88,50% (n=26)	100% ^a (n=26)	100% ^b (n=26)
	Small blastema			11,50% (n=26)		
	No blastema	3,45% (n=29)	3,45% (n=29)			
<i>egfr-3</i> (RNAi)	Normal	25,93% (n=27)	25,93% (n=27)	3,45% (n=29)	3,45% (n=29)	
	Small blastema	33,33% (n=27)	33,33% ^c (n=27)	31,03% (n=29)	31,03% (n=29)	38,47% ^d (n=26)
	No blastema	40,74% (n=27)	40,74% (n=27)	65,52% (n=29)	65,52% (n=29)	61,53% (n=26)

Live regenerating trunk pieces were scored for the differentiation of normal blastemas and eyes after 2 and 3 rounds (r) of dsRNA-injection and regeneration, at 4, 6 and 10 days after amputation. *a*, 1/26 no eyes, 1/26 one eye. *b*, 1/26 one eye. *c*, 4/9 normal eyes, 4/9 one eye, 1/9 irregular eyes. *d*, all had irregular eyes.

Supplementary Table 1. Summary of the regenerating defects observed in trunk pieces after 2 or 3 rounds of *Smed-egfr-3* dsRNA-injection and amputation

	GFP (n=20)	<i>egfr-1</i> RNAi 1 (n=20)	<i>egfr-1</i> RNAi 2 (n=19)
3 weeks	4,24±0,13	4,01±0,14	4,18±0,15
5 weeks	3,57±0,13	2,8±0,09	3,06±0,1
7 weeks	3,47±0,11	2,41±0,11	2,69±0,12
8 weeks	3,18±0,014	2,36±0,10	2,67±0,11

In this experiment *egfr-1* RNAi 1 yielded a stronger phenotype than *egfr-1* RNAi 2. For RNAi 1, 19 out of 20 animals developed big outgrowths. For RNAi, 13 out of 19 animals developed small outgrowths and 6 out of 19 animals developed bigger outgrowths. Overall, planarians treated with RNAi 1 developed bigger outgrowths than planarians treated with RNAi 2. After 8 weeks of treatment animals treated with *egfr-1* RNAi 1 or *egfr-1* RNAi 2 were significantly smaller than controls ($p<0,001$, *t*-test). At the same time, planarians treated with *egfr-1* RNAi 1 were significantly smaller than the ones treated with *egfr-1* RNAi 2 ($p<0,05$, *t*-test). All values correspond to mean±s.e.m. Scale bars in the bottom panels correspond to 500 μ m.



Supplementary Table 2. Measurement of length degrowth in intact planarians after *Smed-egfr-1*(RNAi)

Article 2:
*egr-4, a target of EGFR signaling, is
required for the formation of the brain
primordia and head regeneration in
planarians*

Susanna Fraguas, Sara Barberán, Marta Iglesias, Gustavo Rodríguez-Esteban i
Francesc Cebrià

Departament de Genètica, Facultat de Biologia (Universitat de Barcelona).

Development, 141(9):1835-47. 2014

Resum.

***egr-4*, un gen diana de la via de senyalització dels EGFR, és necessari per formar el primordi del cervell i la regeneració del cap en les planàries.**

Degut a la gran diversitat i complexitat de fenotips obtinguts en els diferents *Smed-egfr* després del seu silenciament (Fraguas i altres, 2011), vam decidir realitzar un anàlisi més detallat d'un d'aquests elements de la via dels EGFR, l'*Smed-egfr-3*, mitjançant noves tecnologies de seqüenciació i d'alt rendiment, concretament *Digital Gene Expression* (DGE), amb l'objectiu de desvetllar com regulen els diferents processos biològics i saber a través de quines vies de senyalització downstream els estan regulant. En aquest article es caracteritza un dels possibles gens diana d'*Smed-egfr-3*, el gen *egr-4*, obtingut a partir de les llibreries gèniques del resultat del DGE.

L'anàlisi del patró d'expressió d'*egr-4*, un membre de la família dels gens "early growth response", mitjançant tècniques d'hibridació *in situ*, revela que aquest gen s'expressa principalment en el sistema nerviós de les planàries i que s'indueix a poques hores de formar-se una ferida, en el blastema. Tot i que aquesta inducció immediata sembla independent de la via dels EGFR, passa a ser dependent d'*Smed-egfr-3* a partir del segon dia de regeneració. D'altra banda, experiments d'irradiació que eliminen en pocs dies els neoblasts no apunten a una alteració de la seva expressió, de manera que podem concloure que aquest gen s'expressa en cèl·lules diferenciades.

Estudis funcionals mitjançant la tècnica d'ARNi presenten una clara implicació d'*egr-4* durant la regeneració anterior de les planàries. Mentre que els organismes *egr-4*(ARNi) tractats no mostren una regeneració posterior afectada, el silenciament d'aquest gen si que bloqueja la regeneració del cap, manifestant blastemes tan petits que són incapaços de diferenciar un cervell funcional, en la majoria dels casos, tot i que el seu patró és correcte; altres marcadors anteriors també es mostren alterats, com succeeix al silenciar *Smed-egfr-3*. Per aquest motiu suggerim que *egr-4*(ARNi) bloqueja la regeneració anterior degut a una disfunció de la diferenciació i no a una alteració en el manteniment o la proliferació dels neoblasts. A més a més, aquest bloqueig de la regeneració anterior no implica una perturbació de

l'establiment de la polaritat AP, ja que els marcadors que determinen l'eix anterior (*Smed-follistatin*, *Smed-notum*) i posterior (*Smed-wnt1*) no presenten alteracions..

D'altra banda, analitzant simultàniament el silenciament d'*egr-4* amb elements de la via Wnt/ β -catenin (*Smed-apc-1*, *Smed- β cat1*) suggerim que la diferenciació aberrant del primordi del cervell a conseqüència dels experiments d'*egr-4*(ARNi) és dependent, en certa manera, de β -catenina. A més a més, suggerim que *egr-4* en condicions normals promou la regeneració del cap antagonitzant l'activitat de β -catenina.

Hem observat que els defectes a conseqüència del silenciament d'*egr-4* durant la regeneració són dependents del temps i/o de la presència de teixit nerviós romanent.

En conclusió, a partir dels resultats obtinguts es suggereix una possible relació dels gens de la família *egr* amb la via de senyalització dels EGFR que regula la diferenciació cel·lular durant la regeneració de les planàries i es postula una probable connexió entre la diferenciació del primordi del cervell i la correcta progressió de la regeneració del cap.

egr-4, a target of EGFR signaling, is required for the formation of the brain primordia and head regeneration in planarians

Susanna Fraguas, Sara Barberán, Marta Iglesias, Gustavo Rodríguez-Esteban and Francesc Cebrià*

ABSTRACT

During the regeneration of freshwater planarians, polarity and patterning programs play essential roles in determining whether a head or a tail regenerates at anterior or posterior-facing wounds. This decision is made very soon after amputation. The pivotal role of the Wnt/ β -catenin and Hh signaling pathways in re-establishing anterior-posterior (AP) polarity has been well documented. However, the mechanisms that control the growth and differentiation of the blastema in accordance with its AP identity are less well understood. Previous studies have described a role of *Smed-egfr-3*, a planarian epidermal growth factor receptor, in blastema growth and differentiation. Here, we identify *Smed-egr-4*, a zinc-finger transcription factor belonging to the early growth response gene family, as a putative downstream target of *Smed-egfr-3*. *Smed-egr-4* is mainly expressed in the central nervous system and its silencing inhibits anterior regeneration without affecting the regeneration of posterior regions. Single and combinatorial RNA interference to target different elements of the Wnt/ β -catenin pathway, together with expression analysis of brain- and anterior-specific markers, revealed that *Smed-egr-4*: (1) is expressed in two phases – an early *Smed-egfr-3*-independent phase and a late *Smed-egfr-3*-dependent phase; (2) is necessary for the differentiation of the brain primordia in the early stages of regeneration; and (3) that it appears to antagonize the activity of the Wnt/ β -catenin pathway to allow head regeneration. These results suggest that a conserved EGFR/*egr* pathway plays an important role in cell differentiation during planarian regeneration and indicate an association between early brain differentiation and the proper progression of head regeneration.

KEY WORDS: Planarian, Early growth response genes, Patterning

INTRODUCTION

After almost any type of amputation, freshwater planarians are capable of regenerating missing regions with the appropriate polarity. Once polarity is established, the appropriate morphogenetic and patterning programs must direct the differentiation of those blastemas into either anterior or posterior regions and their corresponding tissues and organs. Thus, cephalic ganglia develop *de novo* in decapitated planarians. The instrumental role of Wnt/ β -catenin signaling in defining head versus tail identity during planarian regeneration is well documented (Gurley et al., 2008; Iglesias et al., 2008; Petersen and Reddien, 2008). However, less is known about the genes and/or pathways that mediate

the patterning, growth and differentiation of blastemas after the re-establishment of polarity (Felix and Aboobaker, 2010).

Conserved signaling pathways play important roles in morphogenesis in all animals. One such pathway is the epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway, which regulates multiple biological processes, including cell proliferation, differentiation, apoptosis and cell survival. We have previously shown that silencing of *Smed-egfr-3*, a planarian homologue of epidermal growth factor receptors, impairs regeneration and blastema growth in these organisms, probably by disrupting cellular differentiation (Fraguas et al., 2011). Similar effects have been reported after inhibition of ERK (MAPK extracellular signal-related kinase; Tasaki et al., 2011), a gene whose expression is regulated by EGFR signaling in many organisms. In the present study, we conducted digital gene expression (DGE) analyses to identify putative target genes of *Smed-egfr-3* in order to better characterize the function of the EGFR signaling pathway during planarian regeneration. One of the isolated candidate genes that was downregulated after *egfr-3* RNAi was *Smed-egr-4* (Wenemoser et al., 2012), henceforth *egr-4*, a member of the early growth response (*egr*) gene family. *egr* genes were first characterized by their induction by nerve growth factor (Milbrandt, 1987) and other mitogens (Sukhatme et al., 1987), and are implicated in the regulation of multiple cellular processes (Calogero et al., 2004; Cole et al., 1989; Dussmann et al., 2011; Shafarenko et al., 2005; Sukhatme et al., 1988). Members of this family of zinc-finger transcription factors are considered immediate-early genes; they are rapidly induced by many environmental signals, including growth factors, hormones and neurotransmitters (Thiel and Cibelli, 2002), and are rapidly and transiently upregulated by a variety of signaling pathways, including the EGFR and MAPK/ERK signaling pathways (Aggeli et al., 2010; Cabodi et al., 2008; Kaufmann and Thiel, 2001; Ludwig et al., 2011b; Mayer et al., 2009; Tsai et al., 2000). EGFR signaling in mice stimulates the expression of *egr2* to promote cell proliferation during bone formation (Chandra et al., 2013), while EGF induces *Egr-1* expression in endothelial cells (Tsai et al., 2000).

We found that *egr-4* was mainly expressed in the central nervous system (CNS) and was rapidly induced after different types of injury. Although early *egr-4* expression after injury was independent of EGFR signaling, it became *Smed-egfr-3* dependent from the second day of regeneration. Functional analyses based on RNA interference (RNAi) revealed that *egr-4* was required for head regeneration but not for the regeneration of posterior regions. *egr-4* silencing significantly impaired the formation of anterior blastemas; these animals exhibited either small mispatterned cephalic ganglia or a total absence of new brain tissue. The differentiation of other cell types normally present in the anterior region was also altered in *egr-4*(RNAi) animals. However, the early expression of polarity determinants required for the re-establishment of anterior polarity was unaffected. Simultaneous silencing of *egr-4* and different elements of the Wnt/ β -catenin pathway revealed that *egr-4* is required for the differentiation of the brain primordia. Moreover, the results of these experiments suggest

Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona and Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Avenida Diagonal 643, Edifici Prevosti planta 1, Barcelona 08028, Spain.

*Author for correspondence (fcebrias@ub.edu)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 17 July 2013; Accepted 3 March 2014

Resultats

that *egr-4* promotes head regeneration by antagonizing the inhibitory action of the Wnt/ β -catenin pathway. Taken together, these findings identify *egr-4* as one of the first known genes necessary for the differentiation of the brain primordia during planarian regeneration. In view of these findings, we discuss how the failure to differentiate proper brain primordia may lead to the blockade of blastema growth and head regeneration.

RESULTS

DGE analyses identify *Smed-egr-4* as a putative target of *Smed-egfr-3*

We have previously demonstrated that silencing of *Smed-egfr-3*, a planarian homologue of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family, blocks regeneration, probably by disrupting cellular differentiation (Fraguas et al., 2011). To better characterize the functions of the EGFR pathway during planarian regeneration, we constructed and sequenced DGE (Digital Gene Expression) libraries to compare the transcriptomic profiles of control and *egfr-3(RNAi)* regenerating animals (supplementary material Table S1). Genes predicted to undergo up- or downregulation after *Smed-egfr-3* RNAi on days 1 and 3 post-amputation are shown in supplementary material Table S2. After applying the cut-off criteria, 680 genes were upregulated on day 1 and 2403 on day 3 in *Smed-egfr-3(RNAi)* animals. A total of 655 genes were downregulated on day 1 and 800 on day 3 in *Smed-egfr-3(RNAi)* animals (supplementary material Fig. S1). All genes that were up- and downregulated on day 3 post-amputation (2949 and 921, respectively) were annotated and assigned Gene Ontology (GO) categories (supplementary material Fig. S2). Because EGFR signaling regulates multiple downstream targets and pathways, the annotated genes fell into a wide range of GO categories. Overrepresented categories included ‘signal transduction’, ‘cell differentiation’, ‘response to stress’, ‘catabolic process’, ‘nucleotide binding’ and ‘protein kinase activity’ (supplementary material Fig. S2). To identify putative target genes of *Smed-egfr-3* that may be linked to the phenotypic defects observed after its silencing (Fraguas et al., 2011), we selected a group of genes for further characterization, based either on their proposed involvement in the EGFR pathway in other models or their role in processes such as neurogenesis, cell proliferation and differentiation, cancer and tumorigenesis, apoptosis and cell survival, and inflammation and the immune response (supplementary material Fig. S3).

Among the candidate targets that exhibited interesting RNAi phenotypes and merited further characterization was a gene displaying sequence similarity to the *early growth response* (*egr*) gene family of transcription factors (Contig_2669_90e), a well-known family of genes that are regulated by EGFR signaling in other models (Cabodi et al., 2008; Kaufmann and Thiel, 2001; Mayer et al., 2009; Tsai et al., 2000). Although several members of this family have been described in planarians (Onal et al., 2012; Sandmann et al., 2011; Wenemoser et al., 2012; Wagner et al., 2012), Contig_2669_90e was the only *egr* gene downregulated after *Smed-egfr-3* RNAi. Sequence analyses revealed that this gene corresponded to the previously annotated *egr-4* (Wenemoser et al., 2012) and phylogenetic analyses confirmed that *egr-4* belongs to this gene family (supplementary material Fig. S4).

Whole-mount *in situ* hybridization in intact planarians revealed *egr-4* expression mainly in the cephalic ganglia, with weak expression in the ventral nerve cord (vnc) and the mesenchyme (Fig. 1A). We have previously reported *Smed-egfr-3* expression in neoblasts and in the CNS (Fraguas et al., 2011). Here, we better characterized the expression of *Smed-egfr-3* by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) (Fig. 1B). Although we did not succeed in performing double FISH

of *egr-4* and *Smed-egfr-3*, their similar expression patterns (compare Fig. 1A with 1B) suggest that these genes are probably co-expressed in the CNS. Moreover, *egr-4* expression in the cephalic ganglia was strongly reduced after *Smed-egfr-3* silencing, further supporting the DGE data (Fig. 1C). To investigate whether *egr-4* expression in the mesenchyme corresponded to neoblasts we performed *in situ* hybridization on irradiated animals at different time points (supplementary material Fig. S5). Whereas *Smed-egfr-3* expression in the mesenchyme disappears 1 day after irradiation (Fraguas et al., 2011), no change in the pattern of *egr-4* expression was observed, even at 7 days after neoblast elimination (supplementary material Fig. S5), suggesting an absence of *egr-4* expression in stem cells. During anterior regeneration, *egr-4* was upregulated in the wound region from day 1 of regeneration (Fig. 1D). As regeneration progressed, *egr-4* expression became restricted mainly to the differentiating cephalic ganglia (arrowheads in Fig. 1D). By contrast, no upregulation of *egr-4* was observed during posterior regeneration at later time points (Fig. 1D). However, strong expression at earlier stages (1 h and 3 h post-amputation) was observed in both anterior and posterior blastemas. *egr-4* has been recently categorized as a W1 (wound-induced class 1) gene (Wenemoser et al., 2012). *In situ* hybridization revealed rapid upregulation of *egr-4* after a small incision (Fig. 1E), in agreement with previous reports for other planarian *egr* genes (Wenemoser et al., 2012; Sandmann et al., 2011). This strong upregulation of *egr-4* was not dependent on neoblasts (Fig. 1E') or on *Smed-egfr-3* (Fig. 1E''), as no differences were observed in irradiated or *Smed-egfr-3(RNAi)* animals.

Finally, to better characterize the dependence of *egr-4* expression on *Smed-egfr-3* during regeneration we carried out a detailed time-course analysis of *egr-4* expression after *Smed-egfr-3(RNAi)* (Fig. 1F). Normal *egr-4* expression in the wound region was observed up to day 1 of regeneration. However, by day 2, *egr-4* expression was downregulated (Fig. 1F), suggesting that *egr-4* expression becomes *Smed-egfr-3* dependent once its expression becomes restricted to the regenerating cephalic ganglia.

egr-4 is necessary for proper head regeneration and neoblast differentiation

We conducted RNAi experiments to characterize the role of *egr-4* in regeneration (see Materials and Methods). Both trunk and tail fragments regenerating a new head exhibited blastemas that were either very small or abnormally differentiated. After 8 days of regeneration, about half of the anteriorly regenerating trunks ($n=18/34$) formed normal-sized blastemas but with cyclopic eyes, and very few ($n=3/34$) regenerated small blastemas without eyes (Fig. 2A). By contrast, at the same time point, most tails ($n=30/34$) failed to properly regenerate a head. Of these 30 tails, some developed very small blastemas ($n=12/30$), whereas others appeared to only heal the wound ($n=18/30$) (Fig. 2A). These results indicate that the severity of *egr-4* RNAi varied along the anterior-posterior (AP) axis. Posterior regeneration proceeded normally (Fig. 2A), indicating that *egr-4* RNAi specifically blocked anterior regeneration.

Although *egr-4* was not expressed in neoblasts, we investigated whether these defects in regeneration were due to a non-cell-autonomous effect of *egr-4* RNAi on neoblast maintenance and/or proliferation. However, no differences in neoblast number or distribution were observed after immunostaining and *in situ* hybridization for the neoblast-specific markers anti-SMEDWI-1 antibody and *Smed-histone-2B*, respectively (Fig. 2B) (Reddien et al., 2005; Guo et al., 2006; Solana et al., 2012). Thus, neoblasts were normally found below the wound epithelium on day 3. Eight

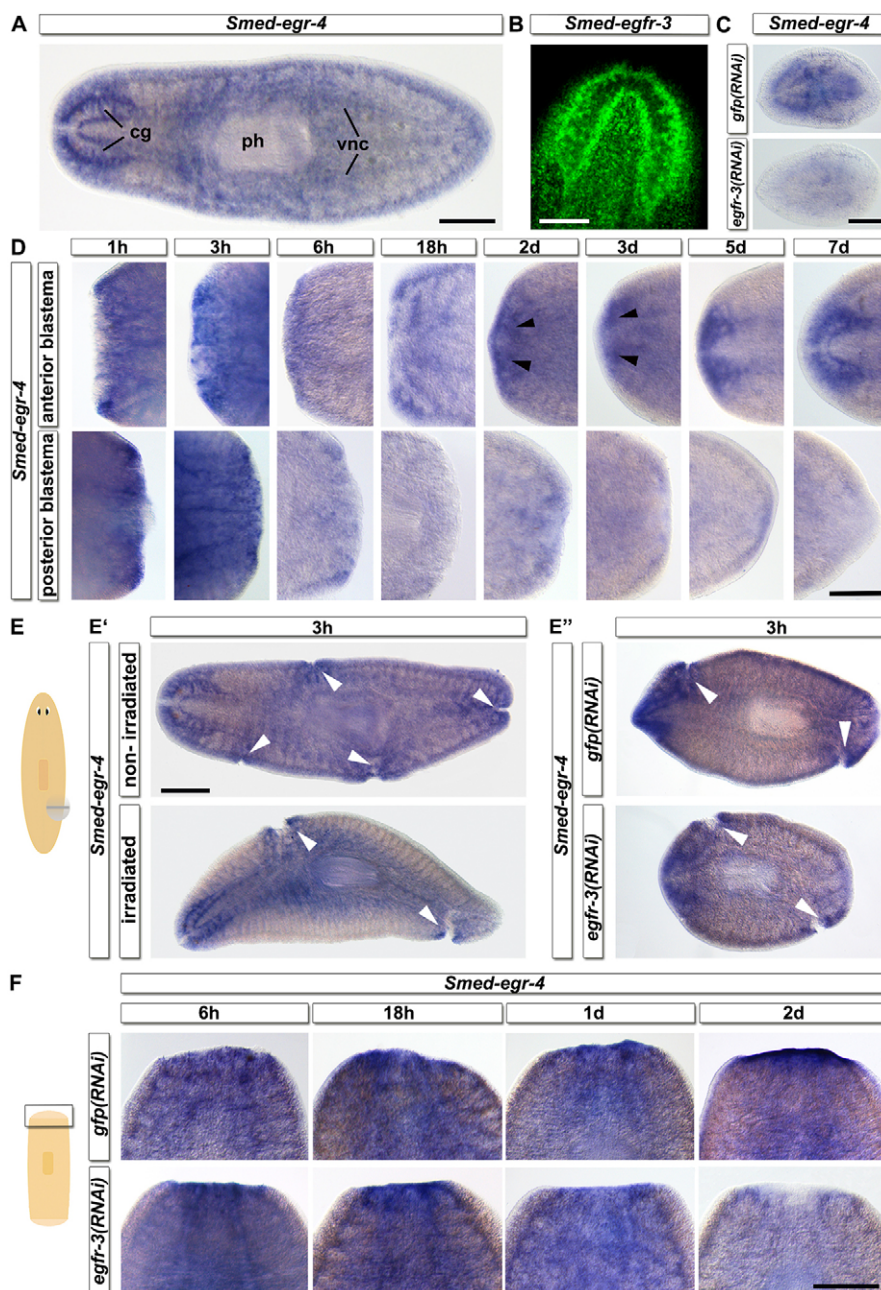


Fig. 1. *egr-4* expression pattern in intact and regenerating planarians. (A) In intact animals, *egr-4* was expressed in the cephalic ganglia (cg), ventral nerve cord (vnc) and mesenchyme. (B) *Smed-egfr-3* expression in the cephalic ganglia. (C) *egr-4* expression was downregulated after *Smed-egfr-3* silencing. These samples correspond to regenerating head fragments after 10 days of regeneration. (D) Expression of *egr-4* in anteriorly and posteriorly regenerating bipolar trunks. Arrowheads indicate the brain primordia. (E) *egr-4* was rapidly upregulated after injury. Small incisions induced *egr-4* expression after 3 h (arrowheads). This early expression was not dependent on either neoblasts (E') or *Smed-egfr-3* (E''). (F) *Smed-egfr-3* silencing resulted in the downregulation of *egr-4* expression from day 2 of regeneration. (A,C-E) Anterior towards the left. (B,F) Anterior at the top. Scale bars: 300 μ m in A,D,F; 200 μ m in B,C,E.

days after amputation, few *Smed-histone-2B*-positive cells were detected in the new head region of controls. Similarly, despite impaired blastema growth and regeneration, few *Smed-histone-2B*-expressing cells were observed after *egr-4(RNAi)*, indicating that neoblast dynamics (in terms of distribution) was unaffected.

We next used an anti-phospho-histone H3 antibody to characterize the mitotic response after *egr-4(RNAi)* in both anterior and posterior regenerating fragments (Fig. 2C). In most cases, the first mitotic peak, which is associated with injury and occurs 6 h post-amputation, was significantly attenuated when compared with controls. Interestingly, the second mitotic peak at 48 h post-amputation, which is associated with tissue loss (Wenemoser and Reddien, 2010), was significantly attenuated in anterior, but not posterior, blastemas. However, despite this decrease in the rate of proliferation, a significant number of mitoses were observed at all stages after *egr-4 RNAi* (supplementary material Fig. S6), suggesting that the severe impairment of blastema growth and regeneration in these animals was not exclusively due to

defective mitosis. Finally, we characterized neoblast progeny at different stages of differentiation using the lineage markers *Smed-NB21.11e* and *Smed-AGAT-1*, which are specific to early and late neoblast postmitotic progeny, respectively (Eisenhoffer et al., 2008). Although the early neoblast progeny were unaffected, the number of late progeny was significantly decreased after *egr-4 RNAi* (Fig. 2D). Taken together, these results indicate that *egr-4 RNAi* impairs anterior regeneration probably by affecting cell differentiation rather than neoblast pool maintenance or proliferation.

***egr-4 RNAi* impairs tissue and organ differentiation**

To further characterize these defects in regeneration, we first used the pan-neural marker anti-SYNORF-1 (Cebrià, 2008) to study CNS regeneration. Both control and *egr-4(RNAi)* head fragments regenerated normal pharynges and ventral nerve cords grew into the newly developed tails (Fig. 3A). By contrast, in anteriorly regenerating trunks, *egr-4 RNAi* generally resulted in the formation

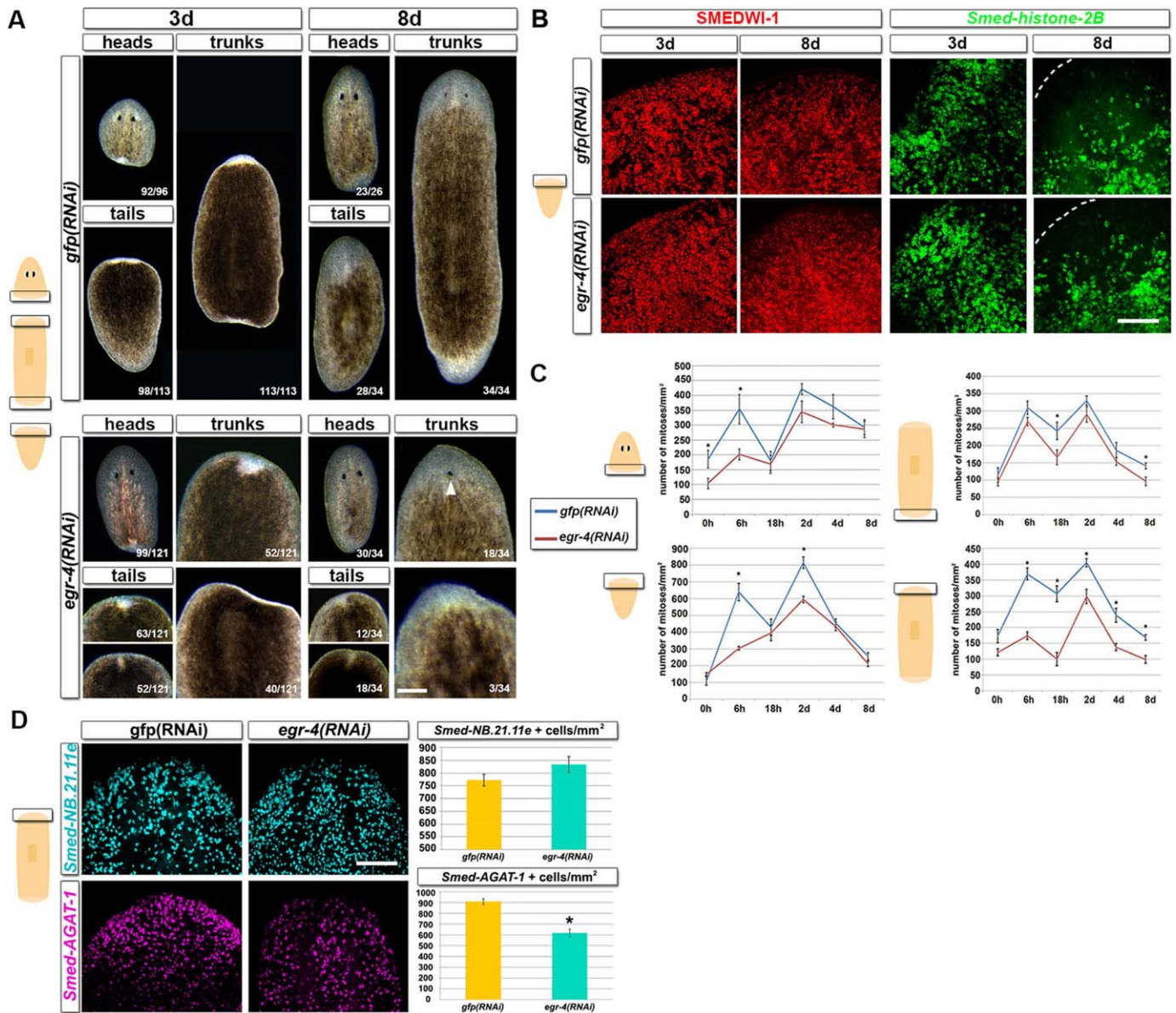


Fig. 2. Effects of *egr-4* RNAi on head regeneration and neoblast dynamics. (A) Effects of *egr-4* RNAi after 3 and 8 days (d) of regeneration in head, bipolar trunk and tail fragments. Although heads regenerated normally, most tail fragments were unable to regenerate a proper head after *egr-4* silencing. Anteriorly regenerating *egr-4(RNAi)* trunks exhibited a milder phenotype when compared with corresponding tail fragments, displaying defects mainly in head morphogenesis, as evidenced by the development of cyclopic eyes (arrowhead). (B) The impairment of head regeneration was not due to neoblast loss, as demonstrated by using anti-SMEDWI-1 immunostaining and *Smed-histone-2B* *in situ* hybridization. Dashed lines indicate the border of the anterior head. (C) Quantification of mitotic cells after *egr-4* RNAi, detected by anti-phospho-histone H3 immunostaining in head, bipolar trunk and tail fragments at different time points. Values represent the mean $\pm$ s.e.m. (Student's *t*-test, $^*P < 0.05$) of an average of 10 samples per time point and amputation level. (D) Although early neoblast progeny (*Smed-NB21.11e*-positive cells) were unaffected by *egr-4* RNAi, a significant decrease in the number of late neoblast progeny (*Smed-AGAT-1*-positive cells) was observed. Samples correspond to trunk sections after 8 days of regeneration. Values represent the mean $\pm$ s.e.m. (Student's *t*-test, $^*P < 0.05$) of an average of 10 samples per time point. All panels are oriented with the anterior towards the top. Scale bars: 200 μ m for *egr-4* (RNAi) trunks and 300 μ m for all other panels in A; 200 μ m in B,D.

of blastemas with truncated ventral nerve cords and little cephalic ganglia differentiation, whereas normal cephalic ganglia regeneration was observed in controls (Fig. 3A). We next used additional neural (Fig. 3B) and anterior (Fig. 3C) markers to better characterize the *egr-4(RNAi)* phenotype. After 5–7 days of regeneration, most *egr-4(RNAi)* trunk fragments displayed significantly smaller or near-absent cephalic ganglia after *in situ* hybridization for *Smed-gpas*, a gene specific to the brain lateral branches (Iglesias et al., 2011). Moreover, the expression of markers of distinct neuronal populations such as *Smed-tbh* (octopaminergic neurons; Fraguas et al., 2012; Nishimura

et al., 2008) and *Smed-th* (dopaminergic neurons; Fraguas et al., 2011; Nishimura et al., 2007) was significantly reduced (Fig. 3B). These markers revealed that *egr-4(RNAi)* animals developed small and aberrant cephalic ganglia. To study the patterning of these cephalic ganglia, we analyzed expression of the *otd/Otx* family gene *Smed-otxA* and the homeobox-containing gene *orthopedia Smed-otp* (Umesono et al., 1997, 1999; Iglesias et al., 2011) (Fig. 3B). *otp* is normally expressed in the most lateral region of the cephalic ganglia, whereas *otxA* is expressed more medially (Umesono et al., 1999; Iglesias et al., 2011). Although *egr-4(RNAi)* animals often displayed

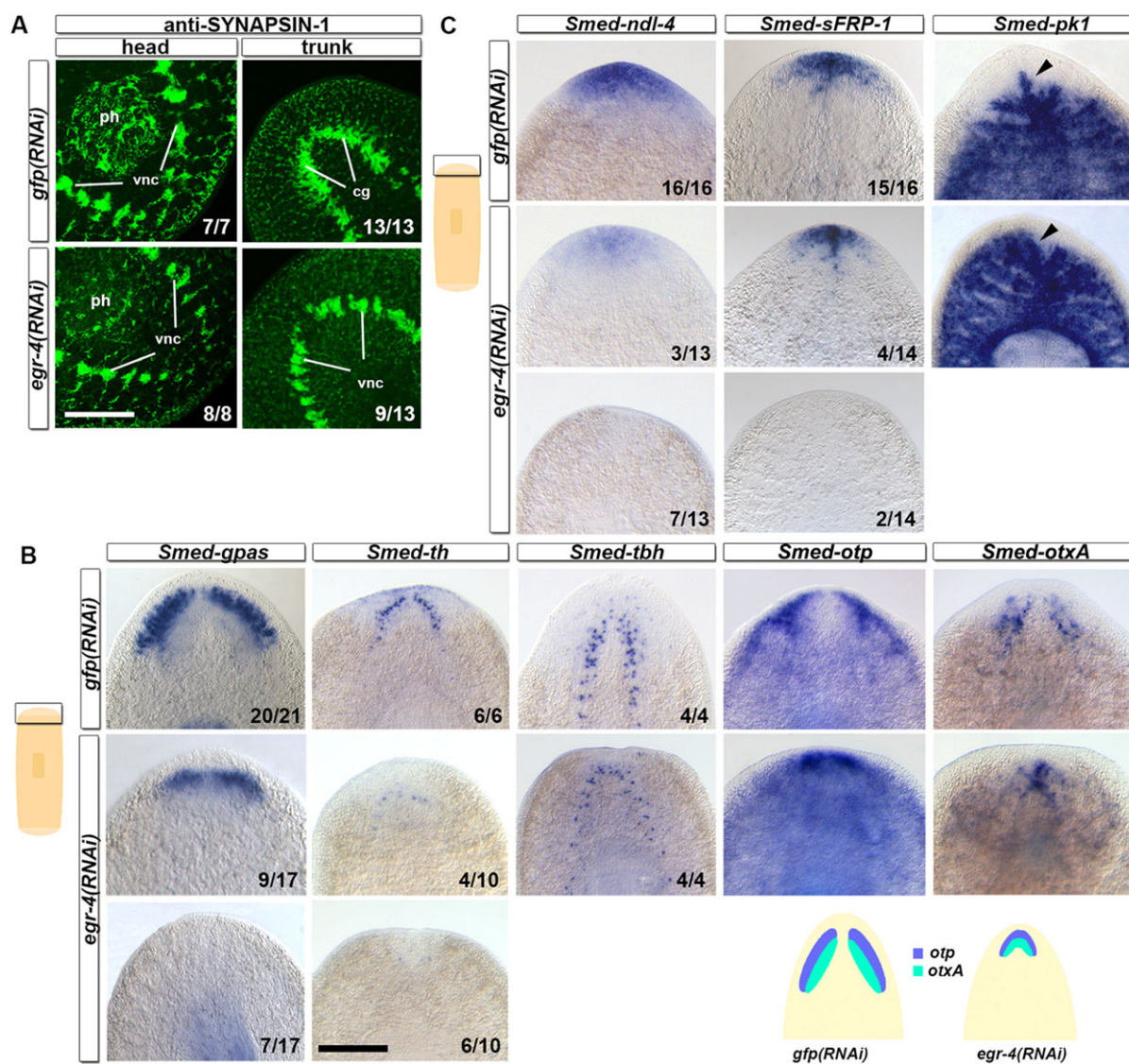


Fig. 3. Loss of brain and anterior markers after *egr-4* RNAi. (A) Whole-mount immunostaining with anti-SYNORF1 in head fragments revealed correct pharynxes with typical nervous plexus and ventral nerve cords in both control and *egr-4(RNAi)* animals. The majority of anteriorly regenerating *egr-4(RNAi)* trunks exhibited truncated ventral nerve cords with no cephalic ganglia differentiation, in contrast to the normal regeneration seen in control animals. (B) The expression of several markers of specific brain subpopulations was reduced in *egr-4(RNAi)* animals. Most of these animals regenerated small cephalic ganglia instead of normal bilateral ganglia, as evidenced by the expression of *Smed-gpas*, *Smed-th* and *Smed-tbh*. In some cases, the expression of these markers was completely abolished. However, the patterning of those small abnormal cephalic ganglia appeared not to be affected after *in situ* hybridization with the mediolateral patterning genes *Smed-otp* and *Smed-otxA*. (C) Expression of the anterior marker *ndl-4* was also significantly attenuated. By contrast, the expression of the anterior marker *sFRP-1* was normal in most *egr-4(RNAi)* animals ($n=8/14$). Finally, *egr-4(RNAi)* animals failed to correctly regenerate the anterior gut branch (arrowheads). cg, cephalic ganglia; vnc, ventral nerve cords; ph, pharynx. In A all panels are oriented with the anterior towards the top left. In B and C all panels are oriented with the anterior towards the top. Samples correspond to trunks after 5-8 days of regeneration. Scale bars: 150 μ m in head and 200 μ m in trunk fragments in A; 300 μ m in B,C.

abnormal cephalic ganglia, these distinct domains along the mediolateral axis were clearly distinguishable (Fig. 3B). Taken together, our data indicate that *egr-4* RNAi results in the development of small but well-patterned cephalic ganglia.

In addition to the aforementioned CNS defects, *egr-4(RNAi)* animals failed to properly regenerate the anterior gut branch into the blastema (Fig. 3C). Moreover, the expression of the anterior marker *Smed-ndl-4*, a FGF-receptor-like protein of the *nou-darake* family (Cebrià et al., 2002a; Rink et al., 2009), was either significantly reduced or completely absent in the majority of *egr-4(RNAi)* animals (Fig. 3C). The expression of *Smed-sFRP-1*, another anterior marker (Gurley et al., 2008; Petersen and Reddien, 2008), was not as

strongly affected. Most *egr-4(RNAi)* animals ($n=8/14$) exhibited normal *Smed-sFRP-1* expression; some ($n=4/14$) showed a very slight decrease (probably due to the smaller size of the regenerated anterior region) and the marker was completely absent in only 2 of the 14 animals (Fig. 3C). These results indicate that not all genes previously proposed as candidate anterior patterning genes (*ndl-4* and *sFRP-1*; Chen et al., 2013) respond equally to *egr-4* RNAi.

Taken together, our data confirm that *egr-4* silencing impairs the proper differentiation of several cell types and organs (CNS and gut) during anterior regeneration. However, no defects were observed after *egr-4* silencing in intact non-regenerating planarians; all CNS- and anterior-specific markers were normally expressed (supplementary

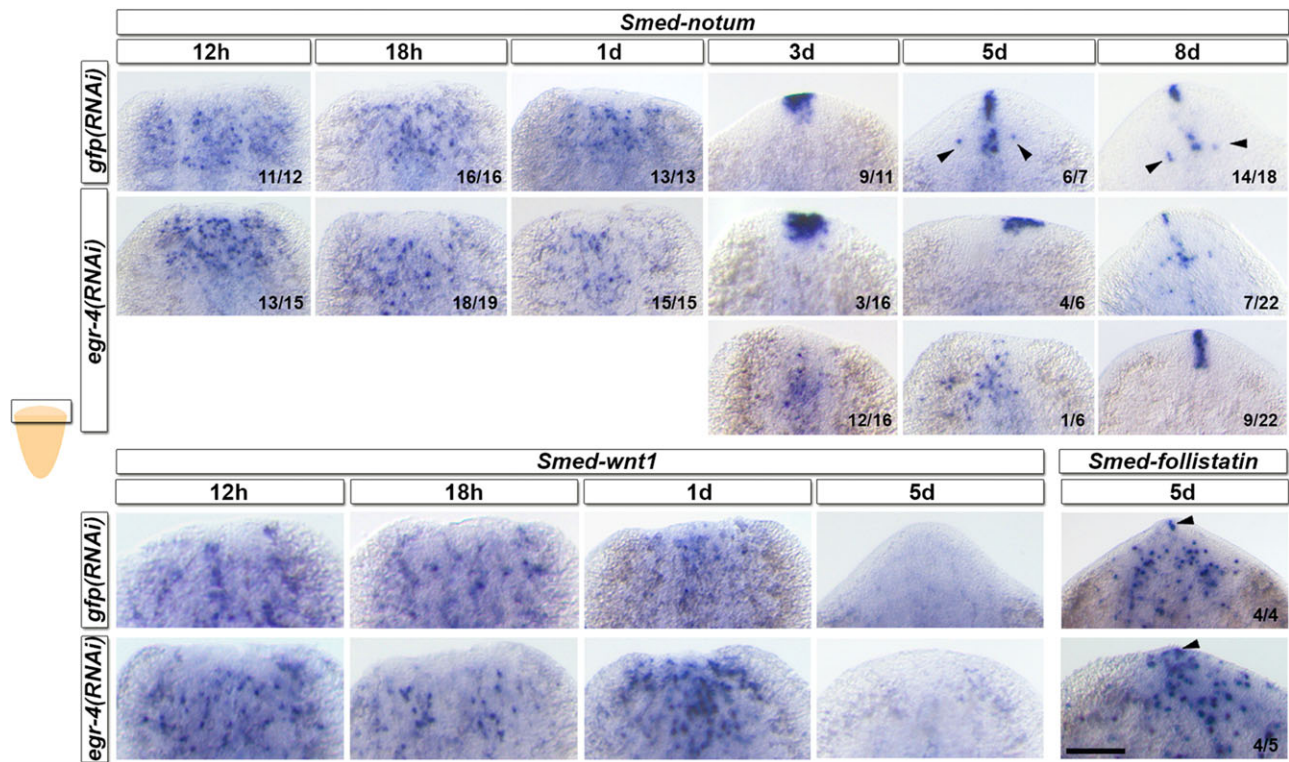


Fig. 4. The early expression of AP polarity determinants is unaffected by *egr-4* silencing. *In situ* hybridization with *Smed-notum*, *Smed-wnt1* and *Smed-follistatin* after *egr-4* RNAi in regenerating tail fragments at different time points. Although *egr-4* silencing had no effect on *Smed-notum* expression at early time points, a delay in the temporal expression of this gene was observed beginning on day 3. Arrowheads indicate *Smed-notum*-positive bilateral cells adjacent to photoreceptors. The dynamics of *Smed-wnt1* expression were unaffected by *egr-4* RNAi. After 5 days of regeneration, normal *Smed-follistatin* expression was detected in the anterior-most tip of the regenerating head (arrowheads). All panels are oriented with anterior towards the top. Scale bar: 200 μ m.

material Fig. S7A). Moreover, neoblast proliferation was unaltered in intact *egr-4(RNAi)* animals when compared with corresponding controls (supplementary material Fig. S7B).

***egr-4* RNAi disrupts head regeneration without impairing the establishment of anterior polarity**

To determine whether the impaired head regeneration observed after *egr-4* RNAi was due to defects in the establishment of anterior polarity, we analyzed the expression of the anterior polarity determinants *Smed-notum*, *Smed-wnt1* and *Smed-follistatin* (Adell et al., 2009; Gurley et al., 2010; Petersen and Reddien, 2009, 2011; Yazawa et al., 2009; Roberts-Galbraith and Newmark, 2013). Control animals exhibited three typical phases of *Smed-notum* expression (Fig. 4). At 12 h post-amputation, *Smed-notum* expression was strongly upregulated in the wound region, giving rise to a dotted pattern of discrete cells. Between 18 h and 1 day after amputation, the number of *Smed-notum*-positive cells decreased (12 h to 1 day, phase I). After 3 days of regeneration, *Smed-notum*-positive cells coalesced at the tip of the anterior blastema (phase II). Finally, between 5 and 8 days post-amputation, the expression of *Smed-notum* became restricted to a small number of cells at the tip of the new head and along the midline, and to two bilateral groups of cells (arrowheads in Fig. 4; phase III), a pattern similar to that observed in intact planarians. No differences in the pattern of *Smed-notum* expression were observed between *egr-4(RNAi)* animals and controls up to 3 days post-amputation (Fig. 4). From this stage on, however, the progression of *Smed-notum* expression appeared to be delayed or arrested in *egr-4(RNAi)* animals (Fig. 4); after 3 days of regeneration, the clustering of *Smed-notum*-positive cells at the tip of the blastema seen

in control animals was observed in only 3 out of 16 *egr-4(RNAi)* animals. By day 5 of regeneration, this clustering of *Smed-notum*-positive cells was observed in most *egr-4(RNAi)* animals. Normal *Smed-notum* expression was detected in several *egr-4(RNAi)* animals ($n=7/22$) by day 8; in others ($n=9/22$) the pattern of *Smed-notum*-positive cells was somewhere between that of phase II and III, while the remaining *egr-4(RNAi)* animals displayed no *notum* expression ($n=6/22$).

We observed no significant differences in the expression pattern of *Smed-wnt1* between controls and *egr-4(RNAi)* animals (Fig. 4). Between 12 h and 1 day post-amputation, a dotted distribution of discrete *Smed-wnt1*-expressing cells was observed in the anterior wound. By 2 days post-amputation this anterior expression had been completely lost in both controls and *egr-4(RNAi)* animals, indicating that the lack of head regeneration after *egr-4* silencing was not due to blastema posteriorization (Fig. 4). *Smed-wnt1* expression in the tip of the tail was normal in all these samples (data not shown).

Smed-follistatin and *Smed-notum* co-expression was recently demonstrated in planarians in a small cluster of cells at the tip of the head (Roberts-Galbraith and Newmark, 2013). Functional analyses suggest that *Smed-follistatin* inhibits the Activin/ActR-1/Smad2/3 signaling pathway, which represses anterior regeneration. It has been proposed that *Smed-follistatin* and *Smed-notum* cooperate to promote anterior identity, thus acting as an anterior signaling center (Roberts-Galbraith and Newmark, 2013). We found that *Smed-follistatin* expression at the tip of the regenerating head re-appeared after *egr-4* RNAi, although slightly later than in controls, as also observed for *Smed-notum* (data not shown). However, after 5 days

of regeneration most animals displayed normal *Smed-follistatin* expression at their anterior-most tips (Fig. 4).

Overall, these results suggest that the polarity determinants *Smed-notum*, *Smed-wnt1* and *Smed-follistatin* are normally expressed in the early regenerative stages during which AP polarity is established (Petersen and Reddien, 2009, 2011) and that *egr-4* silencing impairs normal head regeneration without disrupting the establishment of anterior polarity.

***egr-4* is required for the formation of the brain primordia**

As *egr-4* was highly expressed in the mature and differentiating cephalic ganglia from very early stages of regeneration, we investigated its role in the regeneration of the cephalic ganglia by simultaneously silencing *egr-4* and *Smed-apc-1*, an inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway. *apc-1* silencing results in the regeneration of a tail, rather than a head, from anterior wounds (Gurley et al., 2008). Remarkably, despite this polarity reversal, two small neuronal clusters known as ‘brain primordia’ differentiate within

these posteriorized anterior blastemas (Evans et al., 2011; Iglesias et al., 2011). These brain primordia are equivalent to what it has also been termed ‘brain rudiments’ and correspond to the initial neuronal clusters that will differentiate into the new cephalic ganglia (Cebrià et al., 2002b; Kobayashi et al., 2007; Agata and Umesono, 2008).

As previously shown, *egr-4* silencing inhibited the differentiation of normal cephalic ganglia (Fig. 5A). After *apc-1* RNAi, approximately one-third of the tails regenerated small brain primordia with a similar morphology to that described previously (Evans et al., 2011; Iglesias et al., 2011). By contrast, no brain tissues were detected in most of the double *egr-4(RNAi);apc-1(RNAi)* regenerating tails, although in very few cases the differentiation of very reduced brain primordia was observed (Fig. 5A,B). Although *in situ* hybridization revealed no brain primordia in over half of the *apc-1(RNAi)* tails, differentiation of a pharynx was observed in most cases, indicating that the regenerative process had been somehow moved forward. By contrast, in *egr-4(RNAi);apc-1(RNAi)* animals, a greater number of tails failed to regenerate any brain primordia, when compared with either

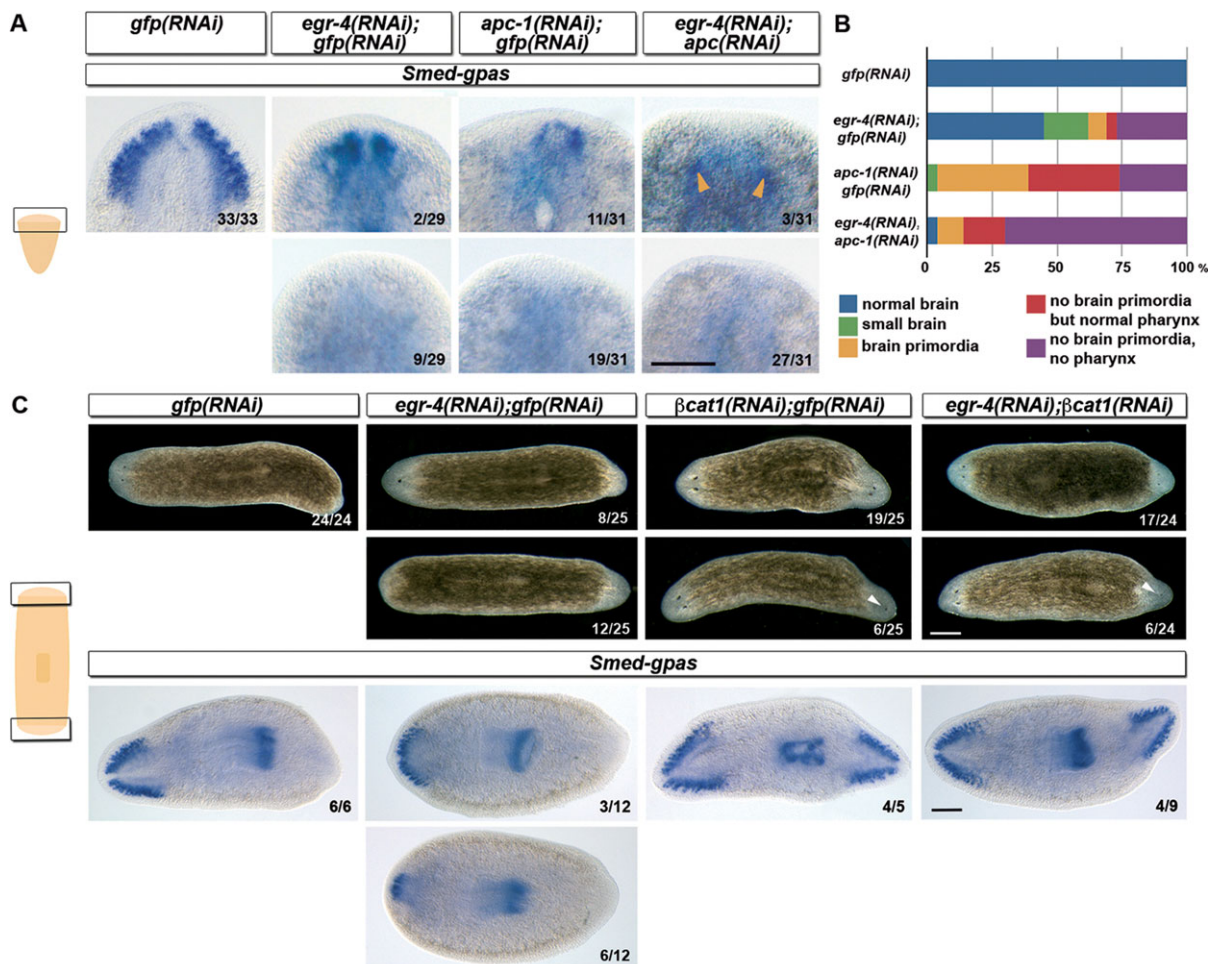


Fig. 5. *egr-4* is required for the differentiation of the brain primordia and the effects of its silencing are reversed by β cat1 RNAi. (A) *In situ* hybridization with the brain marker *Smed-gpas* in tail fragments after 7-9 days of regeneration. After *egr-4;apc-1* RNAi, most animals failed to differentiate any brain or developed very small brain primordia (arrowheads) when compared with *apc-1(RNAi)* samples. (B) Quantification of the different phenotypes obtained after individual and simultaneous silencing of *egr-4* and *apc-1*. In all cases in which a normal brain (blue) or some brain tissue (yellow and green) differentiated, a pharynx was also observed. (C) Double *egr-4;βcat1* RNAi rescued *egr-4(RNAi)* phenotypes. In live images of bipolar trunks after 7 days of regeneration following two rounds of RNAi and amputation, *egr-4* knockdown resulted in animals with cyclopic eyes or small blastemas without eyes. *βcat1(RNAi)* animals displayed the typical anteriorization of the posterior blastema; some samples displayed cyclopia in the posterior head (arrowhead). Double *egr-4(RNAi);βcat1(RNAi)* animals displayed the same phenotype as *βcat1(RNAi)* animals, with a similar percentage of cyclopic posterior heads (arrowhead). *In situ* hybridization with *Smed-gpas* revealed that most *egr-4(RNAi)* animals regenerated smaller, mispatterned brains when compared with controls. All *βcat1(RNAi)* and *egr-4(RNAi);βcat1(RNAi)* animals regenerated normal anterior brains and most regenerated normal posterior brains. All panels are oriented with the anterior towards the left. Scale bars: 200 μ m in A; 300 μ m in C.

Resultats

single *apc-1* or *egr-4* RNAi counterparts, and most of these failed to develop a normal pharynx (Fig. 5B). These results indicate that the differentiation of the brain primordia after *apc-1* RNAi requires *egr-4*.

Given that *egr-4* RNAi inhibits only anterior regeneration and the Wnt/ β -catenin pathway mediates the specification of head versus tail regeneration, we further investigated the relationship between *egr-4* and the Wnt/ β -catenin pathway suggested by our data. Although most single *egr-4(RNAi)*-treated bipolar trunks displayed either smaller anterior blastemas with cyclopia or without eyes, treatment with double *egr-4(RNAi); β cat1(RNAi)* resulted in two-headed animals with normal anterior heads and two bilateral eyes, as also observed after *β cat1* RNAi alone (Fig. 5C). The ability of *β cat1* RNAi to rescue head regeneration in *egr-4(RNAi)* animals suggests that the *egr-4(RNAi)* phenotype requires *β cat1*, and indicates that in normal physiological situations *egr-4* may antagonize β -catenin activity to allow head regeneration.

***egr-4(RNAi)*-induced defects in regeneration depend on the timing of silencing and are rescued by the presence of brain tissue**

We next sought to delimit the period during which *egr-4* is required for head regeneration. *egr-4* was silenced by dsRNA injections 24 h and 48 h after amputation. Most of the animals injected 48 h post-amputation developed normal heads and only small number

displayed defects in eye morphogenesis (Fig. 6A). By contrast, most of the animals injected 24 h post-amputation exhibited defects in the regenerated eyes (including ectopic and fused eyes; Fig. 6A). However, all of these animals regenerated normal-sized heads and brains (data not shown), in contrast to the severe impairment in head regeneration observed when *egr-4* was silenced prior to amputation (Figs 2-5). Although it is unclear exactly how long after injection RNAi begins to exert its effect, these results suggest that *egr-4* function is necessary during the first 2-3 days post-amputation, after which it may not be essential for proper head regeneration.

As this time window coincides with the development of the brain primordia (Cebrià et al., 2002b), we speculated that no phenotype is observed when *egr-4* is silenced 48 h post-amputation because the brain primordia are already formed at this stage. We thus investigated whether *egr-4* RNAi impaired head regeneration even when some brain tissue remained after amputation. Animals were injected with *egr-4* dsRNA, amputated and allowed to regenerate. As expected, no defects in head regeneration were observed after this first round of amputation (see Materials and Methods). These animals were then re-injected (beginning 5 days post-amputation) and re-amputated at two different levels: level 1, immediately posterior to the newly regenerated eyes, leaving some of the regenerated brain tissue in the stump; and level 2, which involved decapitation and the removal of all brain tissue (Fig. 6B). Animals

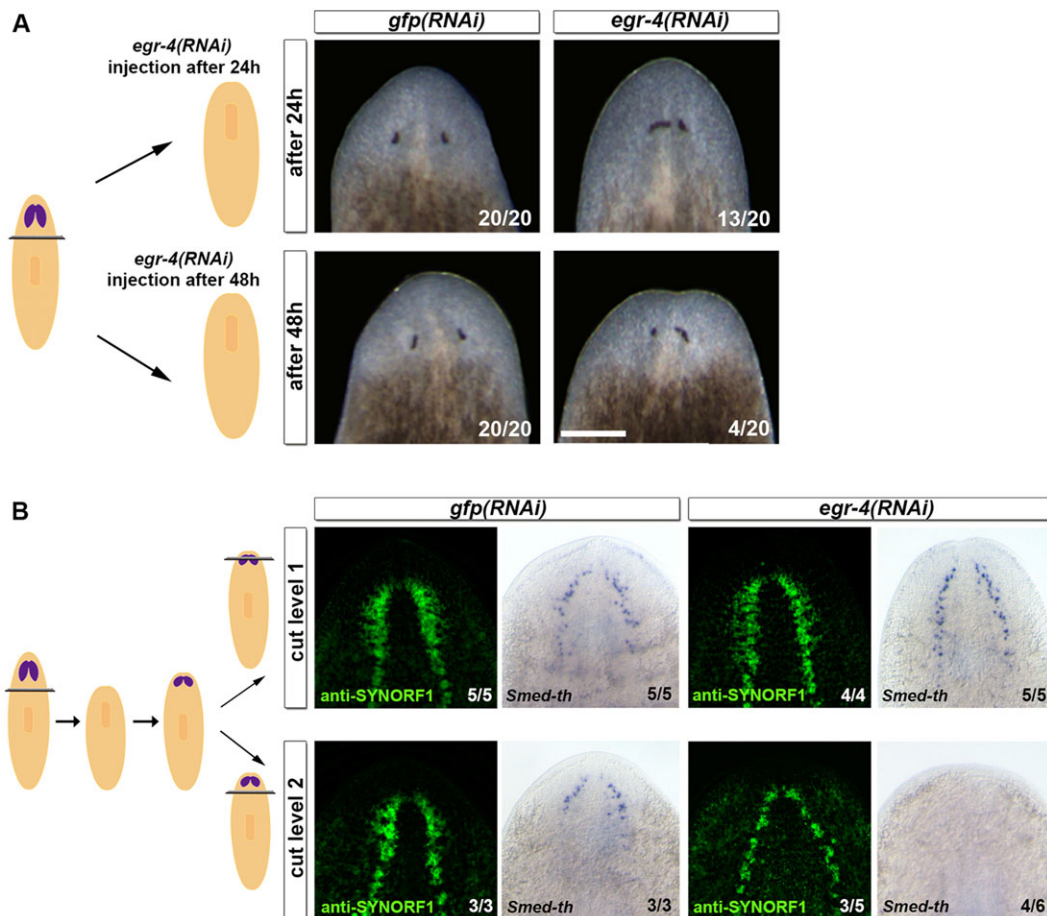


Fig. 6. The effects of *egr-4* RNAi depend on the time of the silencing and the presence of brain tissue. (A) Injection of the first dose of *egr-4* dsRNA after 24 h of regeneration resulted in defects in the newly regenerated eyes of most animals. By contrast, most animals regenerated normally when the first injection was delivered 48 h after amputation. (B) After the first round of injection and amputation, regenerating animals were re-injected and re-amputated, leaving a portion of the newly regenerated small brain (level 1) or removing all brain tissue (level 2). Analysis of the expression of the CNS markers anti-SYNORF1 and *Smed-th* revealed that the presence of brain tissue rescued head regeneration after *egr-4* RNAi. Scale bar: 200 μ m.

amputated at level 1 regenerated normally and differentiated normal brains as evidenced by anti-SYNORF-1 immunostaining and *in situ* hybridization with *Smed-th* (Fig. 6B). However, most of the decapitated fragments from level 2 amputations failed to regenerate proper heads or cephalic ganglia (Fig. 6B). Similarly, *egr-4(RNAi)* animals that were amputated sagittally along the midline regenerated properly (supplementary material Fig. S8). These results suggest that the presence of brain tissue is sufficient to rescue the blockade of head regeneration following *egr-4* RNAi.

DISCUSSION

***egr-4*, a downstream target of EGFR signaling, regulates cell differentiation in anterior blastemas**

EGFR signaling plays important roles in many biological processes by activating or inhibiting many downstream pathways, including PI3K/AKT, MAPK (mitogen-activated protein kinase), PLC γ and JAK/STAT (signal transducer and activator of transcription) (Haley and Gullick, 2009). Previous reports suggest an important role for the EGFR signaling pathway in cell differentiation during planarian regeneration and homeostasis (Fraguas et al., 2011; Rink et al., 2011). *Smed-egfr-1* regulates eye-pigment cell differentiation; *Smed-egfr-3* seems to be necessary for blastema growth and cell differentiation (Fraguas et al., 2011); and *Smed-egfr-5* is required for flame cell maintenance and regeneration, and for guiding branch extension in protonephridia (Rink et al., 2011). These observations are consistent with the demonstrated role of the EGFR signaling pathway in cell differentiation in other organisms (Jones et al., 2009; Lejard et al., 2011; Harris and Horvitz, 2011); for example, EGFR is required for the differentiation of mammary epithelial cells (Mukhopadhyay et al., 2013) and human neural progenitors (Lemcke and Kuznetsov, 2013). Here, we identify *egr-4* as a putative target of *Smed-egfr-3* (Fig. 1) that is required for anterior regeneration, likely through its regulation of neoblast differentiation.

Although *Smed-egfr-3* is expressed in neoblasts and in the CNS of planarians (Fraguas et al., 2011; Fig. 1B), we found that *egr-4* was mainly expressed in the CNS and in the mesenchyme in irradiation-insensitive cells, suggesting that *egr-4* and *Smed-egfr-3* are co-expressed in the CNS (compare Fig. 1A and 1B). Indeed, silencing of *Smed-egfr-3* resulted in marked downregulation of *egr-4* expression in the cephalic ganglia (Fig. 1C).

Like other planarian *egr* homologues, *egr-4* expression was rapidly and locally upregulated after any small incision or during regeneration. Remarkably, this effect was independent of *Smed-egfr-3* (Fig. 1E",F). However, after 2 days of regeneration, the expression of *egr-4* in the blastema became *Smed-egfr-3* dependent (Fig. 1F). These results suggest that *egr-4* is expressed in two distinct phases during regeneration, an early, *Smed-egfr-3*-independent, phase, and a subsequent phase that is controlled by EGFR signaling. These findings are supported by previous studies demonstrating that the expression of *egr* genes is regulated by the EGFR pathway in different organisms and contexts (Kaufmann and Thiel, 2002; Tsai et al., 2000; Lindzen et al., 2012).

The silencing of *egr-4* impaired head regeneration, resulting in the development of either extremely reduced blastemas or small blastemas with aberrant photoreceptors and cephalic ganglia (Figs 2 and 3). Planarian regeneration is dependent on pluripotent stem cells known as neoblasts. Specific anti-SMEDWI-1 and *Smed-histone-2B* markers revealed no differences between control and *egr-4(RNAi)* animals (Fig. 2B). We did, however, observe differences in neoblast mitotic activity between these two groups. In *egr-4(RNAi)* animals, the first, wound-related mitotic peak (at 6 h) was markedly attenuated in anterior stumps and in posterior

stumps from head sections, when compared with controls. This decrease may reflect a role of early *egr-4* expression in this initial proliferative response. Interestingly, the second mitotic peak (associated with tissue loss and appearing at 48 h) was significantly attenuated only in anterior blastemas. This decrease may be a consequence, at least in part, of the marked attenuation of the first mitotic peak. However, because the decrease in the second peak was specific to anterior regeneration, we cannot rule out a potential role of later *egr-4* expression in regulating neoblast proliferation (directly or indirectly) at this stage. A normal bimodal proliferative response was observed after *egr-4* RNAi. Together with the slight attenuation of neoblast proliferation seen during posterior regeneration and the presence of a large number of mitotic cells in anterior blastemas at all stages (supplementary material Fig. S6), these findings suggest that the severe phenotypes observed after *egr-4* silencing are not solely due to defects in proliferation. Although *egr-4* silencing had no effect on early neoblast differentiation (normal anti-SMEDWI-1 and *Smed-NB21.11e* expression was observed), it resulted in a significant decrease in late neoblast progeny (Fig. 2D), suggesting that *egr-4* RNAi impairs late neoblast differentiation.

Taken together, these results suggest that *egr-4* is expressed in two distinct phases during regeneration. Early *egr-4* expression may participate in the initial (injury-induced) proliferative response, whereas the late expression, mediated by EGFR signaling, appears to regulate cell differentiation during anterior regeneration. These data provide the first evidence of a conserved EGFR/*egr* pathway in planarians. Further experiments will be necessary to better understand the relationship between *egr-4* and *Smed-egfr-3*, and to elucidate their specific roles during anterior and posterior regeneration.

***egr-4* is required for early differentiation of the cephalic ganglia downstream of polarity determinants**

egr genes have been implicated in cell proliferation, differentiation, inflammation, apoptosis, wound healing and liver regeneration (Thiel and Cibelli, 2002; Dussmann et al., 2011). Several *egr* genes have been identified in planarians (Sandmann et al., 2011; Wagner et al., 2012; Wenemoser et al., 2012).

Many of these genes, including *egr-4*, are upregulated immediately after injury or amputation and are barely expressed (if at all) in intact planarians (Sandmann et al., 2011; Wenemoser et al., 2012). To date, no functional characterization of the injury-induced expression of planarian *egr* genes has been reported. However, given the decrease reported here in the first mitotic peak after *egr-4* RNAi and the demonstrated role of several *egr* genes in wound healing, tissue fibrosis and inflammatory responses in other models (Schmidt et al., 2008; Wu et al., 2009; Chen et al., 2006), it seems plausible that early *egr* genes expression in planarians is involved in the initial stages of regeneration.

egr-4 was also expressed in the mature and differentiating CNS (Fig. 1). Given the conserved function of *egr* genes in neural development (reviewed by O'Donovan et al., 1999; Pérez-Cadahía et al., 2011) and the severe phenotypes observed in the regenerating CNS after *egr-4* RNAi, we investigated whether this gene is required for the regeneration of cephalic ganglia in planarians. The results of double RNAi of *egr-4* and *Smed-apc-1* (Fig. 5) suggest that *egr-4* is necessary for the early differentiation of the brain primordia. However, *egr-4* was not required for the maintenance of the CNS either in intact planarians (supplementary material Fig. S7) or in regenerating sections in which brain tissue remained after amputation (Fig. 6). These findings identify *egr-4* as the first gene

Resultats

known to be involved in the initial stages of neural regeneration in planarians. This role in neural differentiation is in agreement with functions attributed to *egr* genes in other organisms. For example, *egr-1* regulates astrocyte growth through via activation of the ERK signaling cascade triggered by EGF receptors (Mayer et al., 2009; Biesiada et al., 1996). In cultured PC12 cells, p35 is essential for neurite outgrowth and is induced via the *egr-1*-mediated activation of ERK (Harada et al., 2001). Similarly, *egr-1* regulates neurite extension during development in *Xenopus* (Anelli et al., 2013), and ERK-dependent *egr-4* expression is required for the maturation of GABAergic neurons (Ludwig et al., 2011a).

The silencing of different genes required for the respecification of anterior polarity or pole formation produces phenotypes similar to those described here after *egr-4* RNAi (Petersen and Reddien, 2009, 2011; Almuedo-Castillo et al., 2012; Roberts-Galbraith and Newmark, 2013; Blassberg et al., 2013; Chen et al., 2013). It is thus possible that the regeneration defects observed after *egr-4* RNAi are due to dysregulation of the respecification of polarity, given that double *egr-4(RNAi)/β-catenin(RNAi)* rescues proper head regeneration. However, although the knockdown of polarity or pole determinants completely silences *Smed-notum* (Roberts-Galbraith and Newmark, 2013; Blassberg et al., 2013; Chen et al., 2013), the expression of *Smed-notum* and *Smed-follistatin*, genes that are required for anterior polarity (Roberts-Galbraith and Newmark, 2013; Petersen and Reddien, 2011), is upregulated and largely maintained in regenerating *egr-4(RNAi)* animals. After normal upregulation of *Smed-notum* in *egr-4(RNAi)* animals during the first 24 h of regeneration (neoblast-independent upregulation; Chen et al., 2013), the recovery of the normal expression pattern in the days that follow is delayed when compared with controls. This delay may be associated with the attenuation of the second mitotic peak induced by *egr-4(RNAi)*. By 5-8 days of regeneration, most animals exhibited *Smed-notum* expression at the tip of the blastema. Moreover, *egr-4(RNAi)* did not affect the normal expression of *Smed-follistatin* at the blastema tip. We cannot rule out the possibility that the delay in restoring *Smed-notum* and *Smed-follistatin* expression at the tip of the blastema in *egr-4* knockdowns in turn influences polarity respecification (and/or maintenance), thus giving rise to the observed defects. Nonetheless, our findings suggest that the impaired head regeneration observed after *egr-4* RNAi is caused by disruption of *egr-4*-mediated differentiation of the cephalic ganglia.

The results of the double *egr-4(RNAi)/β-catenin(RNAi)* suggest that the impairment of head and cephalic ganglia regeneration after *egr-4*

silencing is β -catenin dependent. Thus, in wild-type planarians, *egr-4* may inhibit β -catenin activity to allow head regeneration. In support of this hypothesis, defects in brain regeneration were more severe in *egr-4(RNAi);apc-1(RNAi)* animals, in which β -catenin activity is augmented. These results suggest that the effect of *egr-4* on cephalic ganglia regeneration is at least partially mediated by antagonism of the Wnt/ β -catenin pathway. Although the Wnt/ β -catenin pathway has been primarily associated with the establishment of AP polarity (Iglesias et al., 2008; Gurley et al., 2008; Petersen and Reddien, 2008), other studies suggest that this pathway may regulate the differentiation of cephalic ganglia independently of axial polarity (Iglesias et al., 2011; Blassberg et al., 2013).

Overall, our data point to *egr-4* as a unique factor that plays a key role in the differentiation of the brain primordia by antagonizing β -catenin function downstream of the polarity determinants *Smed-notum* and *Smed-wnt1*. Further experiments will be required to unravel the exact relationship between *egr-4* and Wnt/ β -catenin signaling.

The role of the cephalic ganglia in head regeneration

If *egr-4* is required for the early development of the cephalic ganglia, how does the inhibition of CNS differentiation block head regeneration? Previous studies have shown that the inhibition of *Smed-egr-3* (Fraguas et al., 2011) and ERK signaling (Tasaki et al., 2011) yields phenotypes similar to those obtained after *egr-4* RNAi: blastema growth is severely affected due to impaired cell differentiation. Tasaki and co-workers (2011) have suggested that ERK activation within the blastema is necessary for the early differentiation of an initial cohort of cells that is subsequently required to induce neoblast proliferation in the stump, and is probably necessary for the migration of neoblast progeny into the blastema, ultimately promoting blastema growth. We propose that this cohort of cells that is necessary to maintain blastema growth might be the initial brain primordia, the differentiation of which is dependent on *egr-4*. Under normal physiological situations, the brain primordia could emit some form of signal to promote neoblast proliferation in the stump and/or the migration of neoblast progeny cells into the blastema, where they subsequently differentiate. However, this mechanism may be dysregulated in *egr-4(RNAi)* animals, in which differentiation of the brain primordia is impaired (Fig. 7). Future experiments will be required to investigate this hypothesis. Further suggesting that brain cells are required for blastema growth, regenerating *egr-4(RNAi)* planarians in which some brain tissues was retained following amputation (Fig. 6; supplementary material Fig. S8) were capable of regenerating

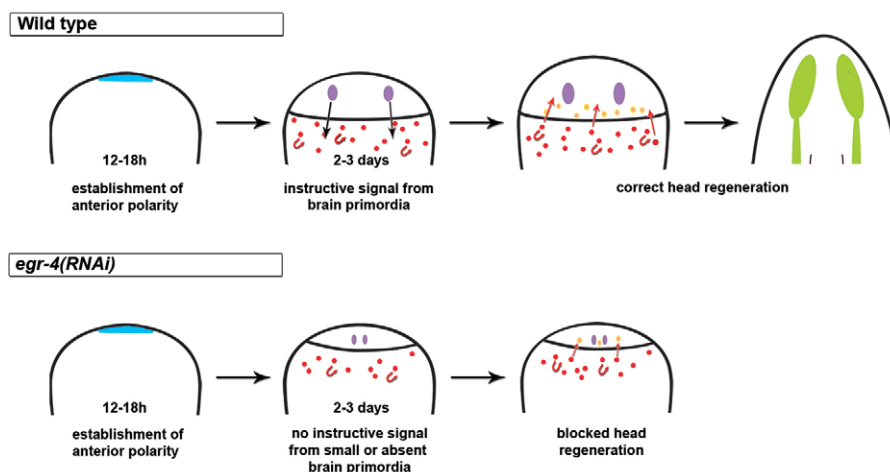


Fig. 7. Proposed model illustrating the requirement of brain primordia for head regeneration in planarians. In wild type the brain primordia would send some signal to the stump to promote the proliferation, migration or differentiation of the neoblasts to allow blastema growth and head regeneration. In the absence of a proper brain primordia after *egr-4* RNAi, the lack of such putative inducing signal would explain the inhibition of head regeneration. Blue, anterior pole; red dots, proliferating neoblasts; orange dots, differentiating neoblasts; purple dots, brain primordia; green, mature CNS.

normal heads with proper brains. Given that EGFR/ERK signaling regulates *egr* genes in several other contexts (Mayer et al., 2009; Harada et al., 2001; Tarcic et al., 2012; Mukhopadhyay et al., 2013), planarians provide a unique opportunity with which to study the function of this conserved pathway during regeneration.

A recent study proposed that during planarian regeneration neoblasts follow a default program, triggered by ERK activation, to differentiate into head tissues (Umesono et al., 2013). These authors suggest that in posterior regions the Wnt/ β -catenin pathway inhibits this ERK activation, resulting in regeneration of a tail. It will thus be of interest to analyze the relationship between *egr-4* and ERK in future studies to determine to what extent *egr-4* mediates the differentiation of head tissues after ERK activation.

Finally, the requirement of the brain primordia for blastema growth supports an evolutionarily conserved role of the nervous system in animal regeneration (Kumar et al., 2007; Kumar and Brockes, 2012; Miljkovic-Licina et al., 2007; Singer and Craven, 1948). Although several planarian studies have proposed a role of the nervous system in regeneration (Baguña et al., 1989; Cebrià and Newmark, 2007; Oviedo et al., 2010; Stéphan-Dubois and Lender, 1956), the underlying molecular basis remains unknown. Accordingly, *egr-4* may be the first identified gene linking the differentiation of the brain primordia with head regeneration in planarians.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Schmidtea mediterranea from the BCN-10 clonal line were used in all experiments. Planarians were starved for at least 1 week prior to experiments. Genes and RNAi experiments were named using the nomenclature proposed by Reddien et al. (2008).

Construction, sequencing and analysis of the DGE libraries

For the DGE experiment, total RNA from control (GFP) and *Smed-egr-3* (RNAi) planarians was extracted 1 day and 3 days after amputation using TRIzol (Invitrogen). Libraries were generated by the Skuldtch transcriptomic service (Montpellier, France). Sequence tag preparation was performed using Illumina's Digital Gene Expression Tag Profiling Kit according to the manufacturer's instructions (version 2.1B). Cluster generation was performed after applying 4 pM of each sample to the individual lanes of the Illumina 1G flowcell according to the manufacturer's instructions. Image analysis and base calling were performed using the Illumina Pipeline, from which sequence tags were obtained after purity filtering. This was followed by sorting and counting the unique tags.

Four libraries were obtained from control and *Smed-egr-3* (RNAi) animals on days 1 and 3 post-amputation (henceforth referred to as C1, C3, R1 and R3) (supplementary material Table S1). For comparison between libraries, tags with a sum of occurrences below 10 in the two compared sets or with a $P > 0.005$ were discarded. P -value determination was performed as previously described (Piquemal et al., 2002). Tags were mapped using the short sequence mapping tools SeqMap (Jiang and Wong, 2008) and MPscan (Rivals et al., 2009) against the Smed454_90edb transcriptome dataset (Abril et al., 2010). Annotation of the sequences and assignment of Gene Ontology (GO) categories was performed using the Blast2GO suite (Conesa et al., 2005).

RNAi experiments

Double-stranded RNAs (dsRNA) were delivered into the planarian digestive system for three consecutive days as previously described (Sánchez-Alvarado and Newmark, 1999). All controls were injected with GFP dsRNA. After one round of dsRNA injections and amputation all *egr-4* (RNAi) planarians regenerated well. Defective phenotypes were identified after two rounds of injections and amputation. To increase the penetrance of the phenotypes the animals were injected with dsRNA for 3 consecutive days, cultured un-cut for 5 more days, re-injected for 3 consecutive days and then amputated pre- and post-pharyngeally. All

experiments were performed following this protocol unless otherwise specified. In all figures showing a quantification of the RNAi phenotypes when the fractions do not add up to 100% the missing animals are normal, unless specified in the main text.

In situ hybridization

Gene expression analysis was carried out by whole-mount *in situ* hybridization, as previously described (Molina et al., 2007; Umesono et al., 1997; Cebrià et al., 2007; Pearson et al., 2009). All samples were observed through a Leica MZ16F stereomicroscope and images from representative organisms of each experiment were captured with a ProgRes C3 camera from Jenoptik. Confocal laser scanning microscopy was performed with a Leica SP2. A lethal dose of 100 Gy was used in irradiation experiments, and animals were fixed and hybridized at the indicated time points.

Immunohistochemistry

Immunostaining was carried out as described previously (Cebrià and Newmark, 2005). The following antibodies were used: anti-SYNORF-1, a monoclonal antibody specific for synapsin, which was used as a pan-neuronal marker (Cebrià, 2008) (1:10; Developmental Studies Hybridoma Bank); anti-SMEDWI-1 (1:1500; Guo et al., 2006; März et al., 2013); and anti-phospho-histone H3 (H3P), which was used to detect mitotic cells (1:300; Cell Signaling Technology). Alexa 488-conjugated goat anti-mouse (1:400) and Alexa 568-conjugated goat anti-rabbit (1:1000; Molecular Probes) were used as secondary antibodies. Confocal laser scanning microscopy was performed using a Leica TCS-SPE and a Leica SP2. Confocal stacks from representative organisms in each experimental condition are shown.

Acknowledgements

The authors thank Chema Martín-Durán for his help with the phylogenetic analyses and Josep Francesc Abril for providing the bioinformatics resources for analysis of the DGE data. We also thank Emili Saló and Teresa Adell for helpful comments and discussions. We thank Kerstin Bartscherer for the anti-SMEDWI-1 antibody. We thank Owen Howard for advice on English style.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

F.C., S.F., M.I. and S.B. conceived and designed the experiments. S.F., S.B. and M.I. performed the experiments. G.R.-E. and F.C. analyzed the DGE data. S.F. and F.C. wrote the paper.

Funding

S.F. is supported by an FPI fellowship (MICINN, Spain). S.B. is supported by a FI fellowship (Generalitat de Catalunya). This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (Spain) [BFU2008-00710, BFU2011-22510 and BFU2012-31701] and by Generalitat de Catalunya [2009-SGR-1018] to F.C. Deposited in PMC for immediate release.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.101345/-/DC1>

References

- Abril, J. F., Cebrià, F., Rodríguez-Esteban, G., Horn, T., Fraguas, S., Calvo, B., Bartscherer, K. and Saló, E. (2010). Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea*. *BMC Genomics* **11**, 731.
- Adell, T., Saló, E., Boutros, M. and Bartscherer, K. (2009). Smed-Evi/Wntless is required for beta-catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration. *Development* **136**, 905-910.
- Agata, K. and Umesono, Y. (2008). Brain regeneration from pluripotent stem cells in planarian. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **363**, 2071-2078.
- Aggeli, I. K., Beis, I. and Gaitanaki, C. (2010). ERKs and JNKs mediate hydrogen peroxide-induced Egr-1 expression and nuclear accumulation in H9c2 cells. *Physiol. Res.* **59**, 443-454.
- Almuedo-Castillo, M., Sureda-Gómez, M. and Adell, T. (2012). Wnt signaling in planarians: new answers to old questions. *Int. J. Dev. Biol.* **56**, 53-65.
- Anelli, T., Cardarelli, S., Ori, M., Nardi, I., Biagioni, S. and Poiana, G. (2013). 5-Hydroxytryptamine 1A and 2B serotonin receptors in neurite outgrowth: involvement of early growth response protein 1. *Dev. Neurosci.* **35**, 450-460.

Resultats

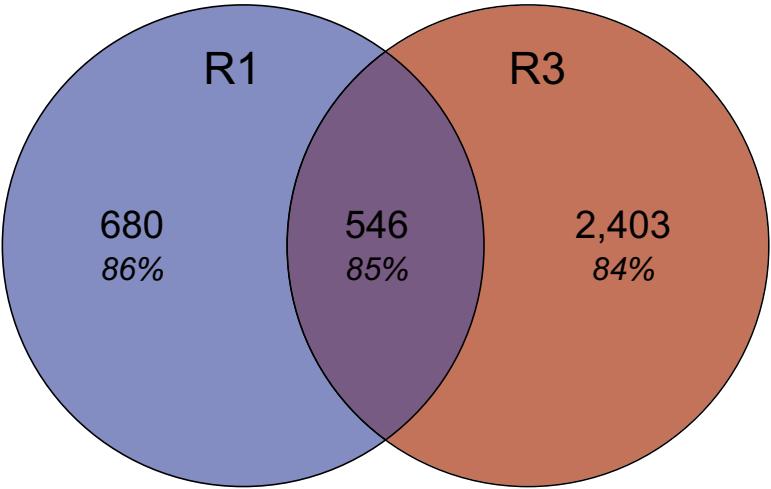
- Baguña, J., Saló, E. and Romero, R. (1989). Effects of activators and antagonists of the neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians. *Int. J. Dev. Biol.* **33**, 261-266.
- Biesiada, E., Razandi, M. and Levin, E. R. (1996). Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* **271**, 18576-18581.
- Blassberg, R. A., Felix, D. A., Tejada-Romero, B. and Aboobaker, A. A. (2013). PBX/extradenticle is required to re-establish axial structures and polarity during planarian regeneration. *Development* **140**, 730-739.
- Cabodi, S., Morello, V., Masi, A., Cicchi, R., Broggio, C., Distefano, P., Brunelli, E., Silengo, L., Pavone, F., Arcangeli, A. et al. (2008). Convergence of integrins and EGF receptor signaling via PI3K/Akt/FoxO pathway in early gene *egr-1* expression. *J. Cell. Physiol.* **218**, 294-303.
- Calogero, A., Lombardi, V., De Gregorio, G., Porcellini, A., Ucci, S., Arcella, A., Caruso, R., Gagliardi, F. M., Gulino, A., Lanzetta, G. et al. (2004). Inhibition of cell growth by EGR-1 in human primary cultures from malignant glioma. *Cancer Cell Int.* **4**, 1.
- Cebrià, F. (2008). Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: an immunocytochemical study. *Neurosci. Res.* **61**, 375-384.
- Cebrià, F. and Newmark, P. A. (2005). Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. *Development* **132**, 3691-3703.
- Cebrià, F. and Newmark, P. A. (2007). Morphogenesis defects are associated with abnormal nervous system regeneration following *roboA* RNAi in planarians. *Development* **134**, 833-837.
- Cebrià, F., Kobayashi, C., Umesono, Y., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Itoh, M., Taira, M., Sánchez Alvarado, A. et al. (2002a). FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature* **419**, 620-624.
- Cebrià, F., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T. and Agata, K. (2002b). Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev. Growth Differ.* **44**, 135-146.
- Cebrià, F., Guo, T., Jopek, J. and Newmark, P. A. (2007). Regeneration and maintenance of the planarian midline is regulated by a slit orthologue. *Dev. Biol.* **307**, 394-406.
- Chandra, A., Lan, S., Zhu, J., Siclari, V. A. and Qin, L. (2013). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling promotes proliferation and survival in osteoprogenitors by increasing early growth response 2 (EGR2) expression. *J. Biol. Chem.* **288**, 20488-20498.
- Chen, S.-J., Ning, H., Ishida, W., Sodin-Semrl, S., Takagawa, S., Mori, Y. and Varga, J. (2006). The early-immediate gene *EGR-1* is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression. *J. Biol. Chem.* **281**, 21183-21197.
- Chen, C.-C. G., Wang, I. E. and Reddien, P. W. (2013). *pbx* is required for pole and eye regeneration in planarians. *Development* **140**, 719-729.
- Cole, A. J., Saffen, D. W., Baraban, J. M. and Worley, P. F. (1989). Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* **340**, 474-476.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M. and Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674-3676.
- Dussmann, P., Pagel, J. I., Vogel, S., Magnusson, T., Zimmermann, R., Wagner, E., Schaper, W., Ogris, M. and Deindl, E. (2011). Live in vivo imaging of *Egr-1* promoter activity during neonatal development, liver regeneration and wound healing. *BMC Dev. Biol.* **11**, 28.
- Eisenhoffer, G. T., Kang, H. and Sánchez Alvarado, A. (2008). Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell* **3**, 327-339.
- Evans, D. J., Owlarn, S., Tejada-Romero, B., Chen, C. and Aboobaker, A. A. (2011). Combining classical and molecular approaches elaborates on the complexity of mechanisms underpinning anterior regeneration. *PLoS ONE* **6**, e27927.
- Felix, D. A. and Aboobaker, A. A. (2010). The TALE class homeobox gene *Smed-prep* defines the anterior compartment for head regeneration. *PLoS Genet.* **6**, e1000915.
- Fraguas, S., Barberán, S. and Cebrià, F. (2011). EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Dev. Biol.* **354**, 87-101.
- Fraguas, S., Barberán, S., Ibarra, B., Stöger, L. and Cebrià, F. (2012). Regeneration of neuronal cell types in *Schmidtea mediterranea*: an immunohistochemical and expression study. *Int. J. Dev. Biol.* **56**, 143-153.
- Guo, T., Peters, A. H. F. M. and Newmark, P. A. (2006). A Bruno-like gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Dev. Cell* **11**, 159-169.
- Gurley, K. A., Rink, J. C. and Sánchez Alvarado, A. (2008). Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science* **319**, 323-327.
- Gurley, K. A., Elliott, S. A., Simakov, O., Schmidt, H. A., Holstein, T. W. and Sánchez Alvarado, A. (2010). Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Dev. Biol.* **347**, 24-39.
- Haley, J. D. and Gullick, W. J. (2009). EGFR Signaling Networks in Cancer Therapy. New York, USA: Humana Press.
- Harada, T., Morooka, T., Ogawa, S. and Nishida, E. (2001). ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of *Egr1*. *Nat. Cell Biol.* **3**, 453-459.
- Harris, D. T. and Horvitz, H. R. (2011). MAB-10/NAB acts with LIN-29/EGR to regulate terminal differentiation and the transition from larva to adult in *C. elegans*. *Development* **138**, 4051-4062.
- Iglesias, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Saló, E. and Adell, T. (2008). Silencing of *Smed-betacatenin1* generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* **135**, 1215-1221.
- Iglesias, M., Almuedo-Castillo, M., Aboobaker, A. A. and Saló, E. (2011). Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by the Wnt/ β -catenin pathway. *Dev. Biol.* **358**, 68-78.
- Jiang, H. and Wong, W. H. (2008). SeqMap: mapping massive amount of oligonucleotides to the genome. *Bioinformatics* **24**, 2395-2396.
- Jones, J. E., Wang, L., Kropf, P. L., Duan, R. and Johnson, D. E. (2009). Src family kinase gene targets during myeloid differentiation: identification of the *EGR-1* gene as a direct target. *Leukemia* **23**, 1933-1935.
- Kaufmann, K. and Thiel, G. (2001). Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor induce expression of *Egr-1*, a zinc finger transcription factor, in human malignant glioma cells. *J. Neurol. Sci.* **189**, 83-91.
- Kaufmann, K. and Thiel, G. (2002). Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of *Egr-1*, a zinc finger transcriptional regulator. *J. Cell. Biochem.* **85**, 381-391.
- Kobayashi, C., Saito, Y., Ogawa, K. and Agata, K. (2007). Wnt signaling is required for antero-posterior patterning of the planarian brain. *Dev. Biol.* **306**, 714-724.
- Kumar, A. and Brockes, J. P. (2012). Nerve dependence in tissue, organ, and appendage regeneration. *Trends Neurosci.* **35**, 691-699.
- Kumar, A., Godwin, J. W., Gates, P. B., Garza-Garcia, A. A. and Brockes, J. P. (2007). Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* **318**, 772-777.
- Lejard, V., Blais, F., Guerquin, M.-J., Bonnet, A., Bonnin, M.-A., Havis, E., Malbouyres, M., Bidaud, C. B., Maro, G., Gilardi-Hebenstreit, P. et al. (2011). EGR1 and EGR2 involvement in vertebrate tendon differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, 5855-5867.
- Lemcke, H. and Kuznetsov, S. A. (2013). Involvement of connexin43 in the EGF/EGFR signalling during self-renewal and differentiation of neural progenitor cells. *Cell. Signal.* **25**, 2676-2684.
- Lindzen, M., Carvalho, S., Starr, A., Ben-Chetrit, N., Pradeep, C.-R., Köstler, W. J., Rabinkov, A., Lavi, S., Bacus, S. S. and Yarden, Y. (2012). A recombinant decoy comprising EGFR and ErbB-4 inhibits tumor growth and metastasis. *Oncogene* **31**, 3505-3515.
- Ludwig, A., Uvarov, P., Soni, S., Thomas-Crusells, J., Airaksinen, M. S. and Rivera, C. (2011a). Early growth response 4 mediates BDNF induction of potassium chloride cotransporter 2 transcription. *J. Neurosci.* **31**, 644-649.
- Ludwig, A., Uvarov, P., Pellegrino, C., Thomas-Crusells, J., Schuchmann, S., Saarma, M., Airaksinen, M. S. and Rivera, C. (2011b). Neurturin evokes MAPK-dependent upregulation of *Egr4* and *KCC2* in developing neurons. *Neural Plast.* **2011**, 1-8.
- März, M., Seebeck, F. and Bartscherer, K. (2013). A Pitx transcription factor controls the establishment and maintenance of the serotonergic lineage in planarians. *Development* **140**, 4499-4509.
- Mayer, S. I., Rössler, O. G., Endo, T., Charnay, P. and Thiel, G. (2009). Epidermal-growth-factor-induced proliferation of astrocytes requires *Egr* transcription factors. *J. Cell Sci.* **122**, 3340-3350.
- Milbrandt, J. (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* **238**, 797-799.
- Miljkovic-Licina, M., Chera, S., Ghila, L. and Galliot, B. (2007). Head regeneration in wild-type hydra requires de novo neurogenesis. *Development* **134**, 1191-1201.
- Molina, M. D., Saló, E. and Cebrià, F. (2007). The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians. *Dev. Biol.* **311**, 79-94.
- Mukhopadhyay, C., Zhao, X., Maroni, D., Band, V. and Naramura, M. (2013). Distinct effects of EGFR ligands on human mammary epithelial cell differentiation. *PLoS ONE* **8**, e75907.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Sano, S., Yoshimoto, K., Inden, M., Takata, K., Taniguchi, T., Shimohama, S. et al. (2007). Reconstruction of dopaminergic neural network and locomotion function in planarian regenerates. *Dev. Neurobiol.* **67**, 1059-1078.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Yoshimoto, K., Taniguchi, T. and Agata, K. (2008). Characterization of tyramine beta-hydroxylase in planarian *Dugesia japonica*: cloning and expression. *Neurochem. Int.* **53**, 184-192.
- O'Donovan, K. J., Tourtellotte, W. G., Millbrandt, J. and Baraban, J. M. (1999). The *EGR* family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci.* **22**, 167-173.

- Önal, P., Grün, D., Adamidi, C., Rybak, A., Solana, J., Mastrobuoni, G., Wang, Y., Rahn, H.-P., Chen, W., Kempa, S. et al. (2012). Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *EMBO J.* **31**, 2755-2769.
- Oviedo, N. J., Morokuma, J., Walentek, P., Kema, I. P., Gu, M. B., Ahn, J.-M., Hwang, J. S., Gojobori, T. and Levin, M. (2010). Long-range neural and gap junction protein-mediated cues control polarity during planarian regeneration. *Dev. Biol.* **339**, 188-199.
- Pearson, B. J., Eisenhoffer, G. T., Gurley, K. A., Rink, J. C., Miller, D. E. and Sánchez Alvarado, A. (2009). Formaldehyde-based whole-mount in situ hybridization method for planarians. *Dev. Dyn.* **238**, 443-450.
- Pérez-Cadahía, B., Drohic, B. and Davie, J. R. (2011). Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochem. Cell Biol.* **89**, 61-73.
- Petersen, C. P. and Reddien, P. W. (2008). Smed-betacatenin-1 is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. *Science* **319**, 327-330.
- Petersen, C. P. and Reddien, P. W. (2009). A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 17061-17066.
- Petersen, C. P. and Reddien, P. W. (2011). Polarized notum activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration. *Science* **332**, 852-855.
- Piquemal, D., Commes, T., Manchon, L., Lejeune, M., Ferraz, C., Pugnère, D., Demaille, J., Elalouf, J.-M. and Marti, J. (2002). Transcriptome analysis of monocytic leukemia cell differentiation. *Genomics* **80**, 361-371.
- Reddien, P. W., Bermange, A. L., Murfitt, K. J., Jennings, J. R. and Sánchez Alvarado, A. (2005). Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Dev. Cell* **8**, 635-649.
- Reddien, P. W., Newmark, P. A. and Sánchez-Alvarado, A. (2008). Gene nomenclature guidelines for the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev. Dyn.* **237**, 3099-3101.
- Rink, J. C., Gurley, K. A., Elliott, S. A. and Sánchez Alvarado, A. (2009). Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia. *Science* **326**, 1406-1410.
- Rink, J. C., Vu, H. T.-K. and Sánchez Alvarado, A. (2011). The maintenance and regeneration of the planarian excretory system are regulated by EGFR signaling. *Development* **138**, 3769-3780.
- Rivals, E., Salmela, L., Kiiskinen, P., Kalsi, P. and Tarhio, J. (2009). MPSCAN: fast localisation of multiple reads in genomes. *Lect. Notes BiolInform.* **5724**, 246-260.
- Roberts-Galbraith, R. H. and Newmark, P. A. (2013). Follistatin antagonizes activin signaling and acts with notum to direct planarian head regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 1363-1368.
- Sánchez-Alvarado, A. and Newmark, P. A. (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 5049-5054.
- Sandmann, T., Vogg, M. C., Owlarn, S., Boutros, M. and Bartscherer, K. (2011). The head-regeneration transcriptome of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Genome Biol.* **12**, R76.
- Schmidt, J., Stoffels, B., Moore, B. A., Chanthaphavong, R. S., Mazie, A. R., Buchholz, B. M. and Bauer, A. J. (2008). Proinflammatory role of leukocyte-derived Egr-1 in the development of murine postoperative ileus. *Gastroenterology* **135**, 926-936.
- Shafarenko, M., Liebermann, D. A. and Hoffman, B. (2005). *Egr-1* abrogates the block imparted by c-Myc on terminal M1 myeloid differentiation. *Blood* **106**, 871-878.
- Singer, M. and Craven, L. (1948). The growth and morphogenesis of the regenerating forelimb of adult Triturus following denervation at various stages of development. *J. Exp. Zool.* **108**, 279-308.
- Solana, J., Kao, D., Mihaylova, Y., Jaber-Hijazi, F., Malla, S., Wilson, R. and Aboobaker, A. (2012). Defining the molecular profile of planarian pluripotent stem cells using a combinatorial RNA-seq, RNA interference and irradiation approach. *Genome Biol.* **13**, R19.
- Stéphan-Dubois, F. and Lender, T. (1956). Corrélations humorales dans la régénération de planaires paludicoles. *Ann. des Sc. Nat. Zool.* **18**, 223-230.
- Sukhatme, V. P., Kartha, S., Toback, F. G., Taub, R., Hoover, R. G. and Tsai-Morris, C. H. (1987). A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogene Res.* **1**, 343-355.
- Sukhatme, V. P., Cao, X., Chang, L. C., Tsai-Morris, C.-H., Stamenkovich, D., Ferreira, P. C. P., Cohen, D. R., Edwards, S. A., Shows, T. B., Curran, T. et al. (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* **53**, 37-43.
- Tarcic, G., Avraham, R., Pines, G., Amit, I., Shay, T., Lu, Y., Zwang, Y., Katz, M., Ben-Chetrit, N., Jacob-Hirsch, J. et al. (2012). EGR1 and the ERK-ERF axis drive mammary cell migration in response to EGF. *FASEB J.* **26**, 1582-1592.
- Tasaki, J., Shibata, N., Nishimura, O., Itomi, K., Tabata, Y., Son, F., Suzuki, N., Araki, R., Abe, M., Agata, K. et al. (2011). ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development* **138**, 2417-2427.
- Thiel, G. and Cibelli, G. (2002). Regulation of Life and Death by the zinc finger transcription factor *egr-1*. *J. Cell. Physiol.* **193**, 287-292.
- Tsai, J. C., Liu, L., Guan, J. and Aird, W. C. (2000). The *egr-1* gene is induced by epidermal growth factor in ECV304 cells and primary endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, 1414-1424.
- Umesono, Y., Watanabe, K. and Agata, K. (1997). A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev. Growth Differ.* **39**, 723-727.
- Umesono, Y., Watanabe, K. and Agata, K. (1999). Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes. *Dev. Genes Evol.* **209**, 31-39.
- Umesono, Y., Tasaki, J., Nishimura, Y., Hrouda, M., Kawaguchi, E., Yazawa, S., Nishimura, O., Hosoda, K., Inoue, T. and Agata, K. (2013). The molecular logic for planarian regeneration along the anterior-posterior axis. *Nature* **500**, 73-76.
- Wagner, D. E., Ho, J. J. and Reddien, P. W. (2012). Genetic regulators of a pluripotent adult stem cell system in planarians identified by RNAi and clonal analysis. *Cell Stem Cell.* **10**, 299-311.
- Wenemoser, D. and Reddien, P. W. (2010). Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev. Biol.* **344**, 979-991.
- Wenemoser, D., Lapan, S. W., Wilkinson, A. W., Bell, G. W. and Reddien, P. W. (2012). A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes Dev.* **26**, 988-1002.
- Wu, M., Melichian, D. S., de la Garza, M., Gruner, K., Bhattacharyya, S., Barr, L., Nair, A., Shahrara, S., Sporn, P. H. S., Mustoe, T. A. et al. (2009). Essential roles for early growth response transcription factor *Egr-1* in tissue fibrosis and wound healing. *Am. J. Pathol.* **175**, 1041-1055.
- Yazawa, S., Umesono, Y., Hayashi, T., Tarui, H. and Agata, K. (2009). Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 22329-22334.

Material suplementari
Article 2

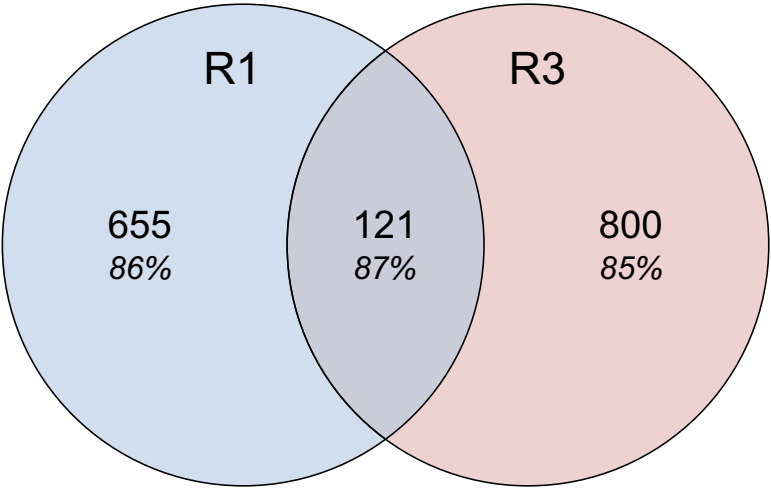
A

UP-REGULATED

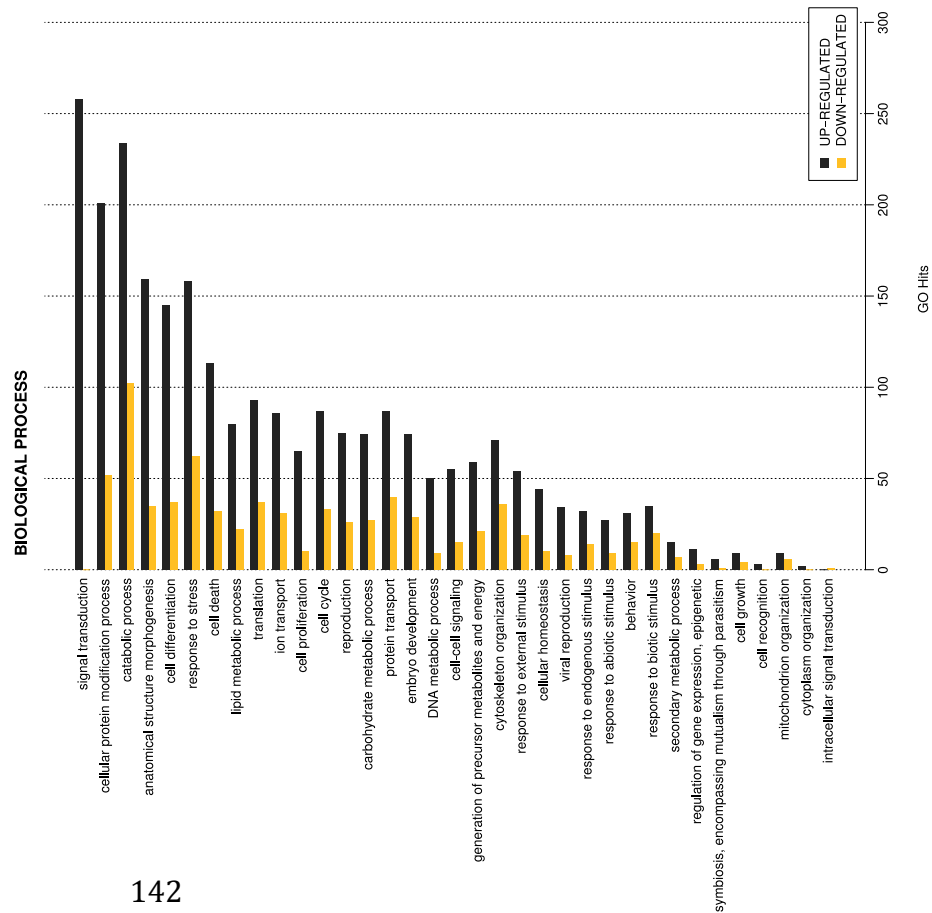
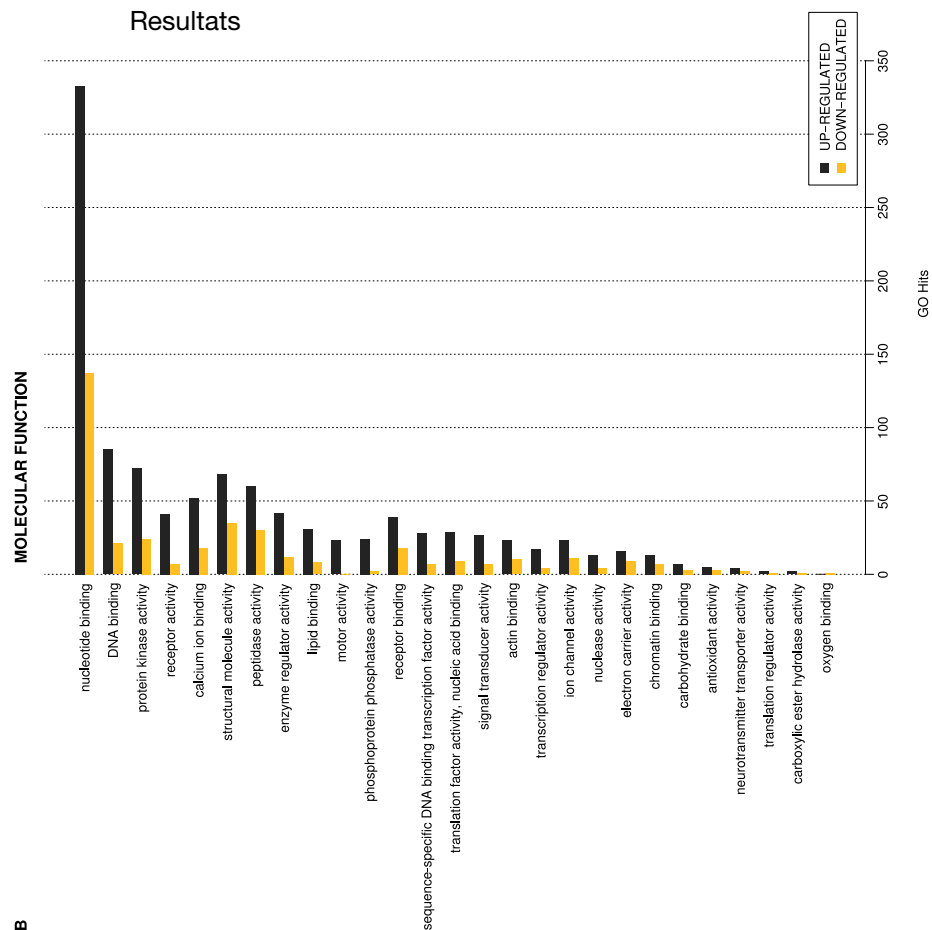


B

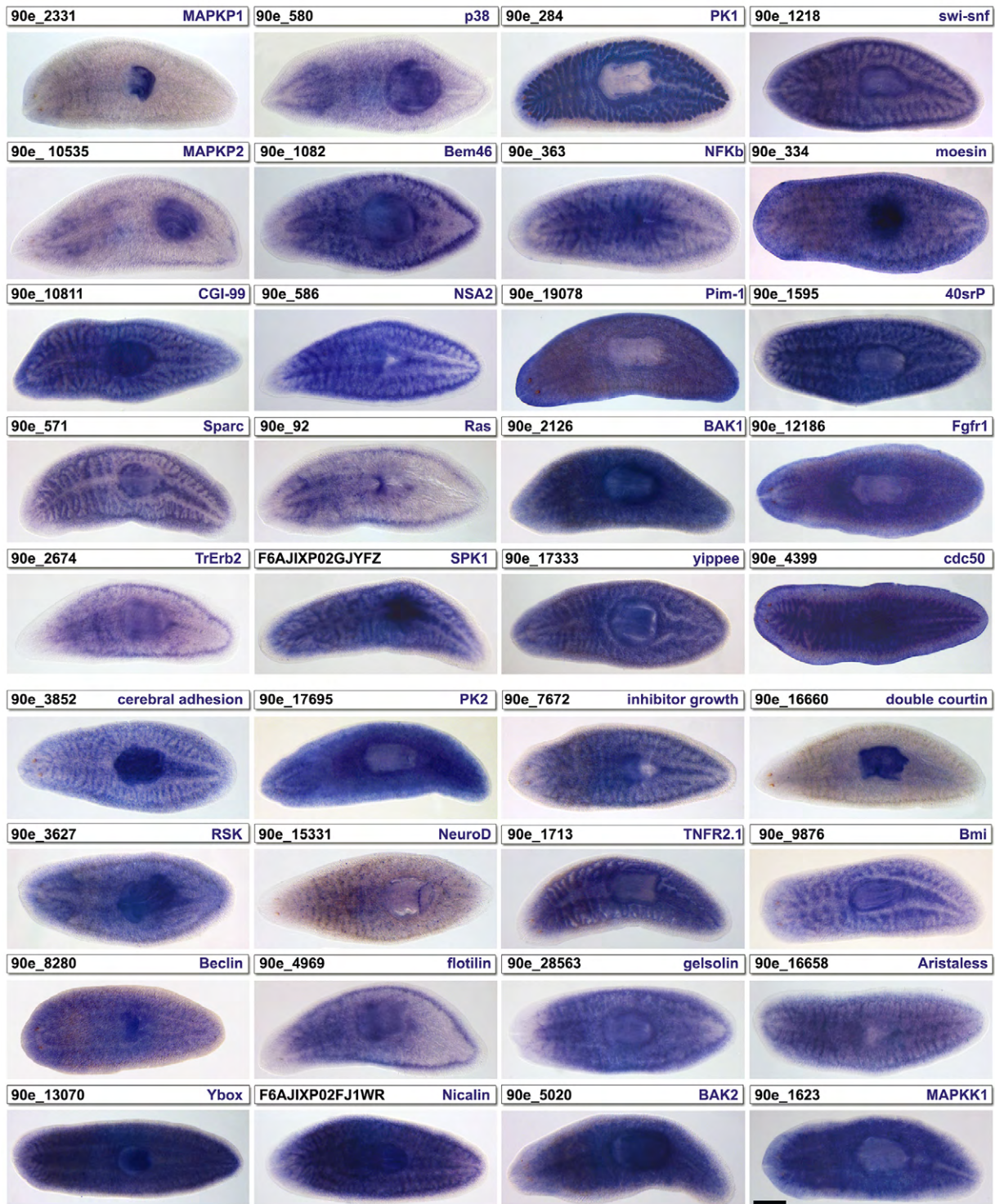
DOWN-REGULATED



Supplementary Figure 1. Venn diagrams showing sequences up- and downregulated after *Smed-egfr-3(RNAi)*. Venn diagrams summarizing the sequences up- (A) and downregulated (B) after *Smed-egfr-3(RNAi)*, as listed in Supplementary Table 2. The percentage of annotated sequences for each subset is shown in italics.v

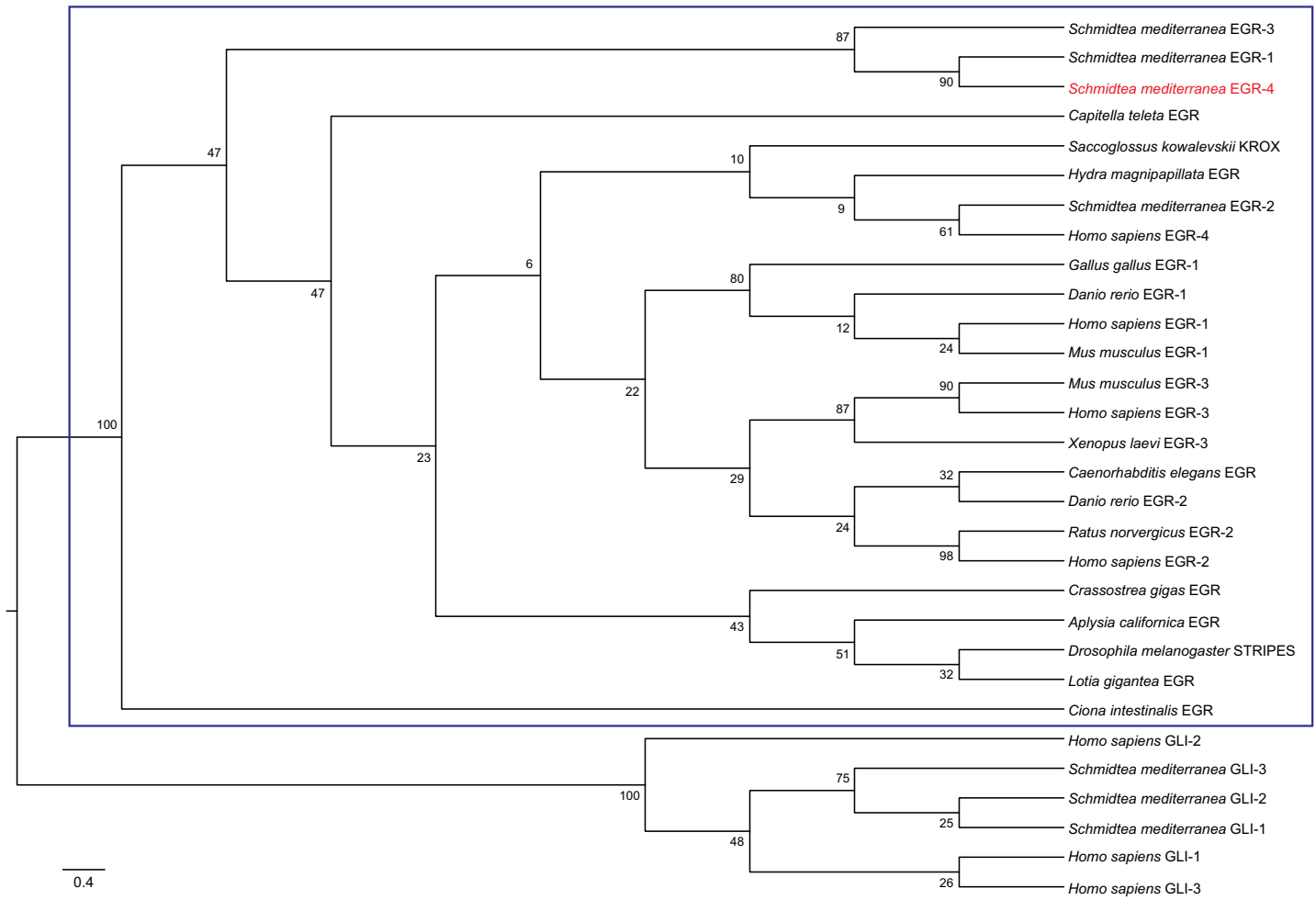


Supplementary Figure 2. Gene Ontology hits. The number of Gene Ontology (GO) hits for the level 1 categories of sequences up- and downregulated in R3 after GO-Slim annotation: (A) Biological Process, (B) Molecular Function. See Supplementary Table 2 for the list of GO IDs.v

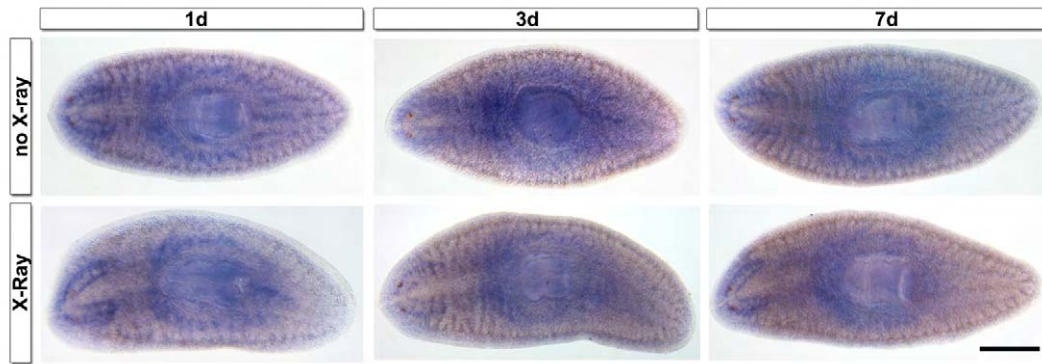


Supplementary Figure 3. (A) Expression patterns of a subset of candidate genes missregulated after *Smed-egfr-3(RNAi)*. Whole-mount *in situ* hybridization in intact animals. 90e_2331 map kinase phosphatase 1; 90e_580 p38 kinase; 90e_284 pantothenate kinase 1; 90e_1218 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 1; 90e_10535 map kinase phosphatase 2; 90e_1082 similar to Bem46; 90e_363 nuclear factor NF- κ B1; 90e_334 moesin (membrane-organizing extension spike protein); 90e_10811 CGI-99; 90e_586 TGF- β inducible nuclear protein 1; 90e_19078 Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase Pim-1; 90e_1595 40S ribosomal protein S13; 90e_571 sparc-like protein; 90e_92 RAS protein; 90e_2126 similar to BAK protein 1; 90e_12186 Fgfr1 oncogene partner; 90e_2674 transducer of ERBB2; F6AJXP02FJ1WR Tyrosine-protein kinase SPK-1; 90e_17333 protein yippee-like 5; 90e_4399 cdc50-related; 90e_3852 cerebral cell adhesion molecule related; 90e_17695 pantothenate kinase 2; 90e_7672 inhibitor of growth family member 5; 90e_16660 similar to doublecortin and CaM kinase-like 3; 90e_3627 similar to ribosomal protein S6 kinase 2; 90e_15331 neuroD; 90e_1713 tumor necrosis factor receptor-associated factor 2; 90e_9876 polycomb complex protein bmi-1; 90e_8280 similar to beclin 1; 90e_4969 flotilin 1; 90e_28563 gelsolin; 90e_16658 homeobox protein aristaless-related; 90e_13070 Ybox protein; F6AJXP02FJ1WR nicalin; 90e_5020 similar to BAK protein 2; 90e_1623 mitogen-activated protein kinase kinase 1. All panels are oriented with the anterior to the left. Scale bar: 300 μ m.

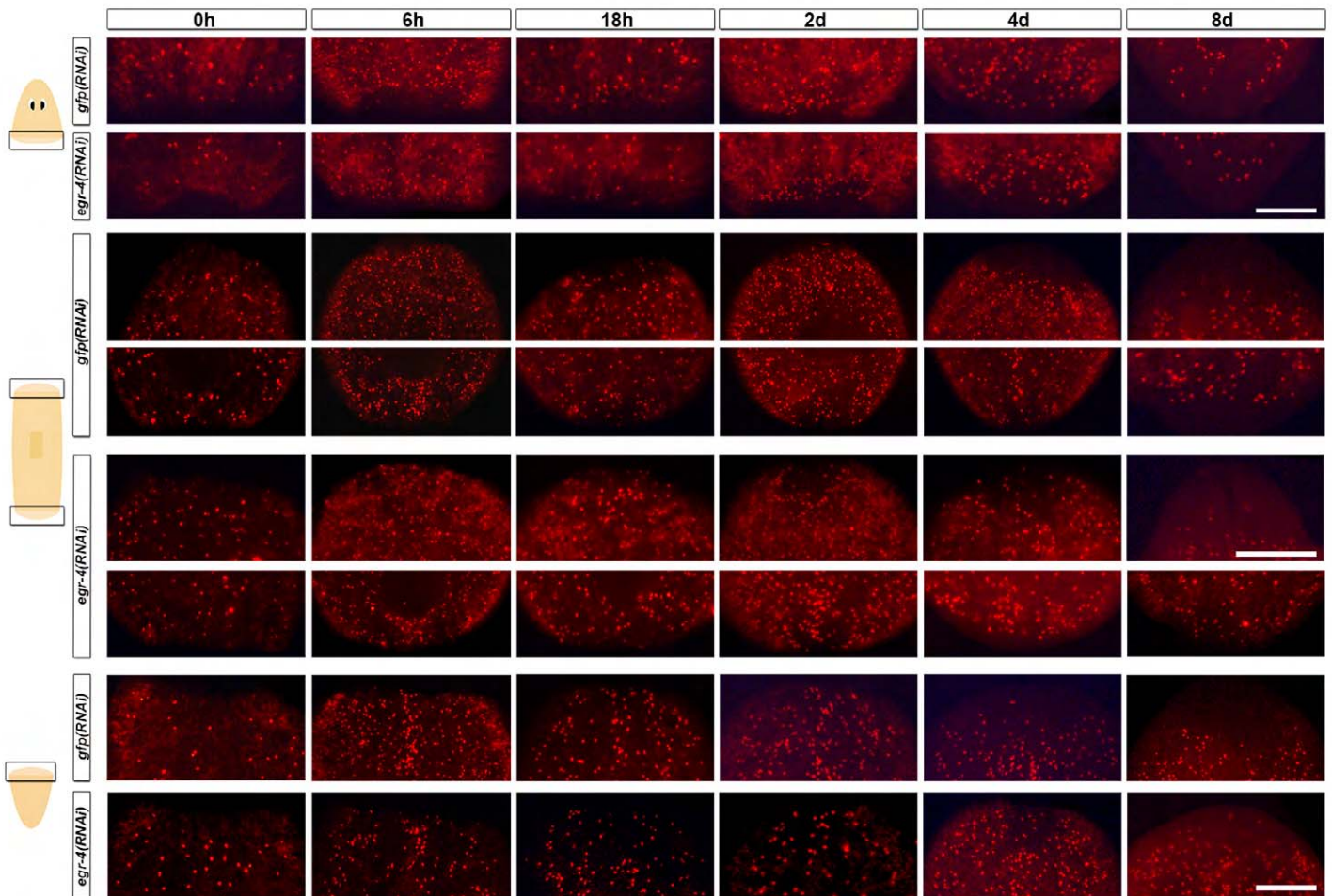
Resultats



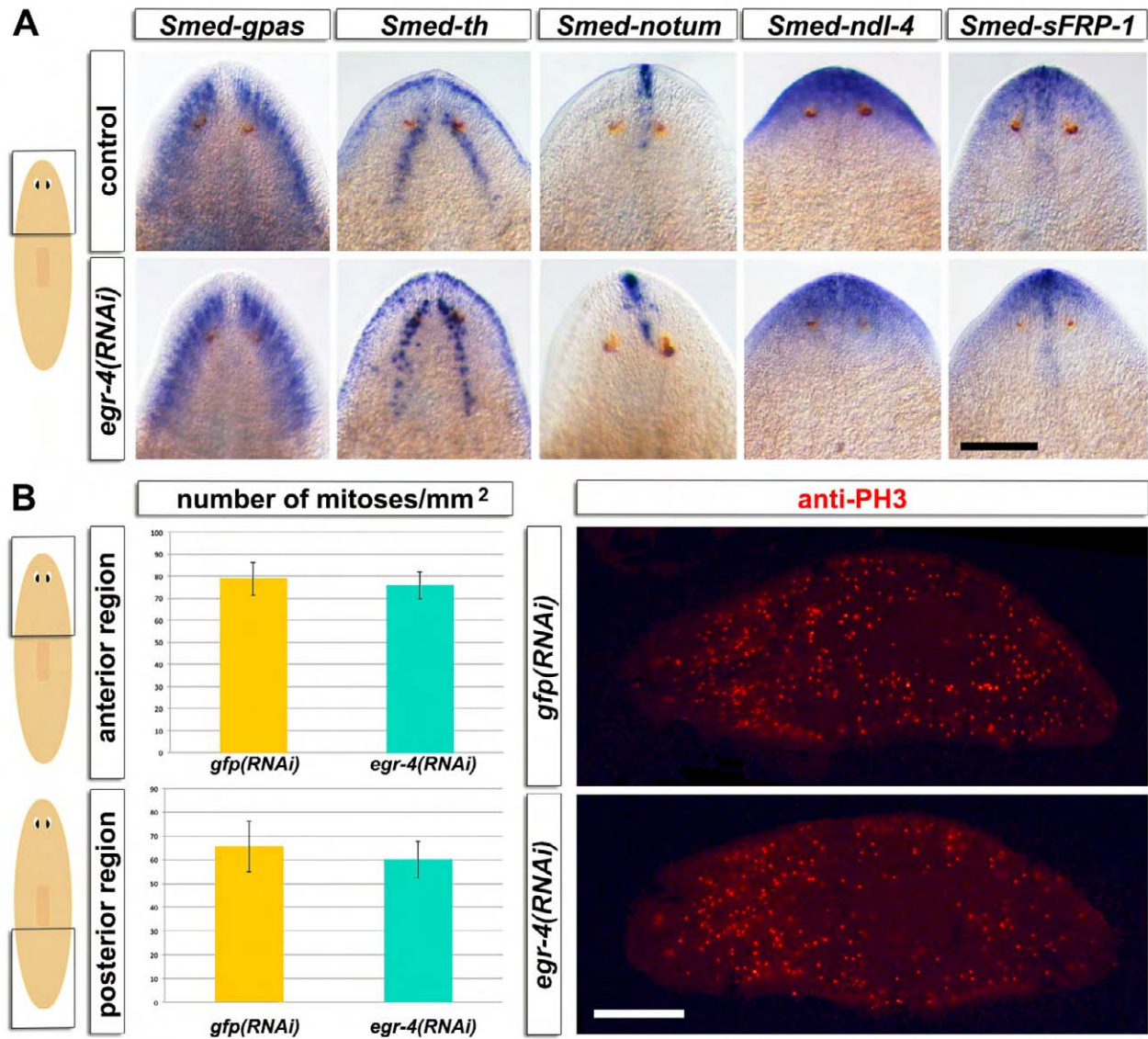
Supplementary Figure 4. Gene orthology analysis of *Schmidtea mediterranea* EGR-4. Phylogenetic analysis of the orthology of Smed-EGR-4. Amino acid alignments were made with MAFFT v7 and corrected by hand for obvious alignment errors. Gblocks, with default options for a less stringent selection, was used to remove poorly aligned regions, and the resulting trimmed alignment (the Phylyp file is available upon request) was used in RAXML 7.4.2 to infer a maximum likelihood phylogenetic tree using the LG+G amino acid substitution model (inferred with ProtTest 2.4). The tree is rooted using the closely related family of C2H2 zinc finger transcription factors GLI. One hundred replicate bootstrap values are shown for each node. The resulting tree was visualized with FigTree and edited in Adobe Illustrator CS5. Metazoan EGR transcription factors are highlighted with a blue rectangle, and *Schmidtea mediterranea* EGR-4 is highlighted in red. Accession numbers for the sequences used for the phylogenetic analysis are as follows: *Hydra magnipapillata* EGR XP_002155290; *Caenorhabditis elegans* EGR Q18250; *Drosophila melanogaster* STRIPES Q24163; *Saccoglossus kowalevskii* KROX GU076031; *Lottia gigantea* EGR scaffold 26 (Joint Genome Institute); *Capitella teleta* EGR scaffold 346 (Joint Genome Institute); *Ciona intestinalis* EGR scaffold 67 (Joint Genome Institute); *Crassostrea gigas* EGR-3 EKC38308.1; *Aplysia californica* EGR AGH32758.1; *Schmidtea mediterranea* EGR-1 AFD29624.1; *Schmidtea mediterranea* EGR-2 JX010482; *Schmidtea mediterranea* EGR-3 JX010481; *Schmidtea mediterranea* EGR-4 JX010483; *Xenopus laevis* EGR-3 XP_002932749.1; *Danio rerio* EGR-1 NM_131248; *Danio rerio* EGR-2 NP_899184.1; *Gallus gallus* EGR-1 AY034140; *Rattus norvegicus* EGR-2 NM_053633; *Mus musculus* EGR-1 NM_007913; *Mus musculus* EGR-3 NM_018781; *Homo sapiens* EGR-1 NM_001964; *Homo sapiens* EGR-2 NM_001136177; *Homo sapiens* EGR-3 NM_004430; *Homo sapiens* EGR-4 NM_001965; *Homo sapiens* GLI-1 P08151; *Homo sapiens* GLI-2 P10070; *Homo sapiens* GLI-3 P10071; *Schmidtea mediterranea* GLI-1 ACZ64514.1; *Schmidtea mediterranea* GLI-2 ACZ64515.1; *Schmidtea mediterranea* GLI-3 ACZ64516.1.



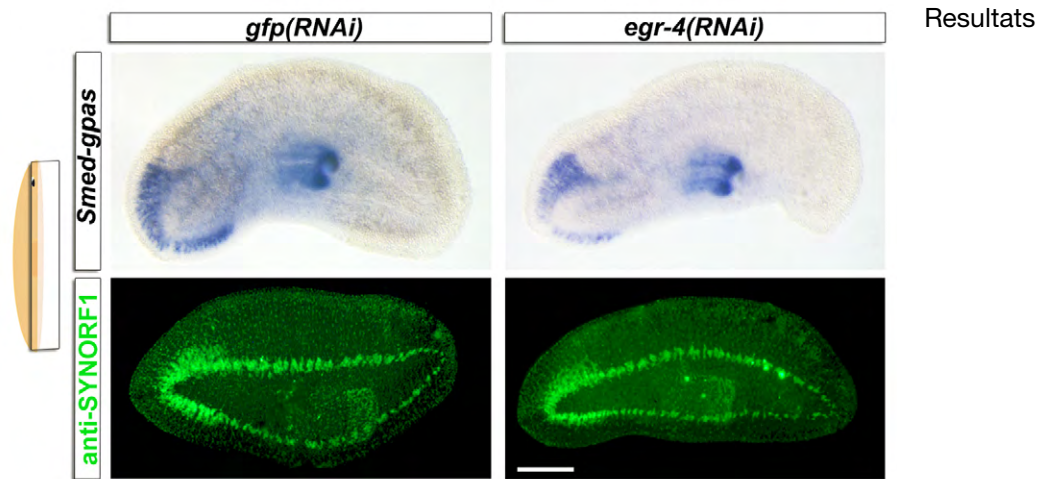
Supplementary Figure 5. Expression of *egr-4* after irradiation. No downregulation of *egr-4* expression was observed on days 1, 3 or 7 after irradiation. All panels are oriented with the anterior to the left. Scale bar: 300 μ m.



Supplementary Figure 6. Proliferative response after *egr-4(RNAi)*. Immunostaining for phospho-histone H3 at different time points. All panels are oriented with the anterior to the top. Scale bar: 150 μ m in head and tail sections, 300 μ m in trunk sections. 145



Supplementary Figure 7. *egr-4* silencing does not result in defects during homeostasis. (A) The expression of neural and anterior markers was unaffected in intact *egr-4(RNAi)* animals. **(B)** Normal mitotic response in *egr-4(RNAi)* intact animals. All samples correspond to animals treated with RNAi for 6 weeks. Scale bar: 300 μm.



Supplementary Figure 8. Normal lateral regeneration after *egr-4* RNAi. Animals amputated along the midline after *egr-4(RNAi)* regenerated a normal CNS as revealed by anti-SYNORF1 immunostaining and *in situ* hybridization for *Smed-gpas*. Scale bar: 300 μ m.

Table S1. Summary of DGE sequencing

	C1	C3	R1	R3
Total n° of sequenced tags	1,156,844	375,234	5,405,360	2,393,980
N° of distinct tags	113,391	56,371	316,945	191,981

Four DGE libraries were constructed and sequenced. Normalization of the expression was performed in tags per million according to the total number of tags in each library. C1: control planarians at 1 day of regeneration; C3: control planarians at 3 days of regeneration; R1: *Smed-egfr-3(RNAi)* planarians at 1 day of regeneration; R3: *Smed-egfr-3(RNAi)* planarians at 3 days of regeneration.

Genes upregulated after silencing Smed-egr-3 at 1 and 3 days of regeneration

CONTIG	TAG	C1	R1	R1C1	pvalue_C1 vs R1	C3	R3	R3C3	pvalue_C3 vs R3	subject_annotation	value
Contig_Planarian_90e_10087	CATGACGCTCTCATCAAGCG	7112.5	20417	2.8706	1.62E-23	2409	5433.6	2.26	5.21E-17	heat shock protein 70 [Dugesia japonica]	1e-159
Contig_Planarian_90e_1039	CATGAATTCGGATTCGTGAT	0	10685	DIV0	1.48E-198	5159	10848	2.1	8.9E-15	actin [Galaxea fascicularis]	NA
Contig_Planarian_90e_10507	CATGGGATCGGAAATGCTTT	0	8076.6	DIV0	3.4E-226	946.1	8590.7	9.07	2.9E-96	bicoid-interacting protein related [Schistosoma mansoni] gl 238658795 emb CAZ29843.1 bicoid-interacting protein related [S9e-11]	NA
Contig_Planarian_90e_15125	CATGGGATCGGAAATGCTTT	0	8076.6	DIV0	3.4E-226	946.1	8590.7	9.07	2.9E-96	unamed protein product [Tetodon nigroviridis]	2e-31
Contig_Planarian_90e_15475	CATGGGATCGGAAATGCTTT	0	3121.9	DIV0	1.67E-232	1146	7106.2	6.2	4.71E-66	60S ribosomal protein L4 [Schistosoma mansoni] gl 238662469 emb CAZ33409.1 60S ribosomal protein L4, putative [Schist. 1e-123]	2e-34
Contig_Planarian_90e_1573	CATGTGGAATGACATGCTTT	670.79	1832	2.8801	1.53E-35	495.7	2396.4	4.3	1.78E-74	TCEN protein [Schmidtea mediterranea]	0
Contig_Planarian_90e_3450	CATGTGGAATGACATGCTTT	0	1259.3	DIV0	3.84E-187	351.8	1108.6	3.15	2.29E-45	heat shock protein HSP60 [Schistosoma mansoni]	0
Contig_Planarian_90e_282	CATGTGTGAATCGGAGGAT	690.67	1579.2	2.2864	3.78E-20	450.4	1815	4.03	1.26E-48	Zk643.6 precursor [Leoptheutis salmonis]	0.002
Contig_Planarian_90e_13022	CATGTGTGAATCGGAGGAT	367.38	1242.8	3.383	3.57E-28	0	1471.6	DIV0	2.77E-219	myosin heavy chain A [Schmidtea mediterranea]	2e-22
Contig_Planarian_90e_148	CATGTGTGAATCGGAGGAT	0	855.63	DIV0	8.4E-127	394.4	2502.9	6.35	8.85E-94	PREDICTED: similar to beta-tubulin [Hydra magnipapillata]	2e-22
Contig_Planarian_90e_1138	CATGGGTCTAATGCTGCTGT	0	832.88	DIV0	3.35E-123	242.5	749.38	3.09	3.45E-30	unamed protein product [Homo sapiens]	1e-09
Contig_Planarian_90e_4432	CATGGGTCTAATGCTGCTGT	0	832.88	DIV0	3.35E-123	242.5	749.38	3.09	3.45E-30	PREDICTED: similar to Proactivator polypeptide [Taeniopogon guttata]	0.002
Contig_Planarian_90e_8108	CATGGGTCTAATGCTGCTGT	0	832.88	DIV0	3.35E-123	242.5	749.38	3.09	3.45E-30	PREDICTED: similar to surfactant B protein, putative [Ciona intestinalis]	6e-04
Contig_Planarian_90e_15289	CATGGGAATGAGTGTGCTTT	0	830.47	DIV0	6.67E-123	431.7	1579	3.66	2.52E-38	NADH dehydrogenase subunit 1 [Pagurus lucidus] gl 12025690 gb AAAF63419.2 AF150756.1 NADH dehydrogenase sub 3e-62	3e-62
Contig_Planarian_90e_18841	CATGGGAATGAGTGTGCTTT	0	763.69	DIV0	1.07E-227	279.8	647.88	2.32	5.15E-17	hypothetical protein, conserved [Eimeria tenella] gl 1092394.16 emb CAK51380.1 hypothetical protein, conserved [Eimeria tenella]	1e-101
Contig_Planarian_90e_1304	CATGACCAATGCGGATCTA	0	719.47	DIV0	3.55E-214	0	1065.2	DIV0	5.15E-168	PREDICTED: similar to establishment of cohesion 1 homolog 1 [Monodelphis domestica]	NA
Contig_Planarian_90e_16710	CATGACCAATGCGGATCTA	242.9	905.77	3.729	3.93E-45	0	1065.2	DIV0	5.15E-168	NA	NA
Contig_Planarian_90e_10760	CATGACCAATGCGGATCTA	242.9	905.77	3.729	3.93E-45	178.6	826.66	4.63	5.68E-50	SUCHCO6900 protein [Schistosoma japonicum]	5e-64
Contig_Planarian_90e_2309	CATGGGTCTGACATTTGAT	0	606.99	DIV0	1.55E-180	175.9	582.71	3.31	1.06E-50	phosphoenolpyruvate carboxylase [Schistosoma mansoni] gl 2386572.16 emb CAZ28295.1 phosphoenolpyruvate carboxy	9e-93
Contig_Planarian_90e_1122	CATGGGTCTGACATTTGAT	0	602.55	DIV0	2.47E-179	143.9	568.93	3.95	1.43E-59	AP-1 complex subunit beta-1 [Adaptor-related protein complex 1 beta-1 subunit] [Schistosoma japonicum]	1e-169
Contig_Planarian_90e_28425	CATGTGTAGACCAATGAT	0	897.38	DIV0	1.58E-174	0	1920.7	DIV0	2.09E-142	inexin7 [Dugesia japonica]	NA
Contig_Planarian_90e_1728	CATGTGTAGACCAATGAT	0	897.38	DIV0	1.58E-174	0	1920.7	DIV0	2.09E-142	NA	NA
Contig_Planarian_90e_104	CATGTGTAGACCAATGAT	0	897.38	DIV0	1.58E-174	0	1920.7	DIV0	2.09E-142	malate dehydrogenase, putative [Pediculus humanus corporis] gl 212508346 gb EEB12070.1 malate dehydrogenase, putative 2e-93	3e-30
Contig_Planarian_90e_2152	CATGGAAATGCGCAATGTT	0	565.55	DIV0	3.19E-168	146.6	614.46	4.19	1.31E-67	hypothetical protein SORBDRAFT_069024610 [Sorghum bicolor] gl 241938086 gb EES11231.1 hypothetical protein SORBIT 1e-12	1e-12
Contig_Planarian_90e_18002	CATGGAAATGCGCAATGTT	255.87	819.19	3.2016	2.66E-34	247.9	688.81	2.78	4.93E-24	SUCHCO6246 protein [Schistosoma japonicum] gl 228475202 emb CAK17895.1 40S ribosomal protein S6 [Schistosoma japonicum]	1e-68
Contig_Planarian_90e_318	CATGGAAATGCGCAATGTT	255.87	819.19	3.2016	2.66E-34	247.9	688.81	2.78	4.93E-24	ReName: Full-40S ribosomal protein S6 gl 2620237 gb AAAG060623.1 AF294917_1_1 ribosomal protein S6 [Aplysia californica] 2e-84	2e-84
Contig_Planarian_90e_23716	CATGGAAATGCGCAATGTT	0	537.43	DIV0	1.62E-159	223.9	535.93	2.39	2.23E-29	NA	NA
Contig_Planarian_90e_43	CATGGGAATGATGTTGTT	0	537.43	DIV0	1.62E-159	223.9	535.93	2.39	2.23E-29	rapunzel 4 [Danio rerio] gl 62188569 gb AAH92385.1 Zcp-113320 [Danio rerio]	2e-12
Contig_Planarian_90e_105	CATGGAAGCCACATGTTGTT	161.65	646.77	4.0011	2.01E-34	21.32	137.43	6.45	2.13E-21	chaperonin containing -complex protein 1 gamma subunit, tsg [Schistosoma mansoni] gl 238660769 emb CAZ31761.1 chst0	2e-10
Contig_Planarian_90e_27653	CATGGAAGCCACATGTTGTT	0	471.38	DIV0	1.05E-139	127.9	624.48	2.88	1.61E-26	PREDICTED: similar to Cdc42 CG12530-PA, isoform A isoform 1 [Apis mellifera]	3e-88
Contig_Planarian_90e_6922	CATGCTCGCAAGTGAATGAT	0	464.54	DIV0	6.64E-138	167.9	429.83	4.56	1.61E-26	hypothetical protein Plasmidom falciparum 3071 gl 234988890 emb CA050938.1 conserved Plasmidom membrane protein 0.037	0.037
Contig_Planarian_90e_18002	CATGCTCGCAAGTGAATGAT	0	442.15	DIV0	5.3E-131	56.3	368.84	6.29	5.06E-55	small nuclear ribonucleoprotein S-M-D3 [Schistosoma mansoni] gl 818165953 gb AAH7930.1 small nuclear ribonucleoprotein 1e-40	1e-40
Contig_Planarian_90e_453	CATGAAGCTATCAGAGAATG	393.31	813.45	2.0682	5.67E-17	359.8	812.04	2.26	3.75E-20	G117484 [Drosophila melanogaster] gl 193913196 gb EDW12063.1 G117484 [Drosophila melanogaster]	4e-25
Contig_Planarian_90e_10502	CATGAAGCTATCAGAGAATG	393.31	813.45	2.0682	5.67E-17	359.8	812.04	2.26	3.75E-20	similar to GenBank Accession Number 178668 60S ribosomal protein L5A [Schistosoma japonicum] gl 228475140 emb CAK7 1e-102	1e-102
Contig_Planarian_90e_10502	CATGCGGTTTCAATGAAGCG	0	401.82	DIV0	5.3E-119	45.31	93.99	2.07	1.06E-5	S-adenosylmethionine decarboxylase, putative [Pediculus humanus corporis] gl 212515438 gb EEB17585.1 S-adenosylmethionine decarboxylase 3e-70	3e-70
Contig_Planarian_90e_10502	CATGCGGTTTCAATGAAGCG	0	377.03	DIV0	1.67E-111	69.29	250.63	3.62	1.32E-24	phosphoenolpyruvate carboxylase, putative [Xodes scapularis] gl 15493636 gb EEC03297.1 phosphoenolpyruvate carboxylase 2e-43	2e-43
Contig_Planarian_90e_13821	CATGATCAATGCCATTTCAA	144.36	459.36	3.188	2.72E-38	234.5	724.73	3.09	2.86E-29	ribosomal protein S5 [Carosaurus guajanae]	5e-75
Contig_Planarian_90e_6802	CATGATCAATGCCATTTCAA	0	310.43	DIV0	2.02E-91	146.6	457.4	3.12	5.58E-37	PREDICTED: similar to GA19845-PA [Acyrtosiphon pisum]	1e-19
Contig_Planarian_90e_3245	CATGCTCAATGTTTCTTACT	108.05	398.27	3.6675	1.02E-38	335.8	675.86	2.01	2.26E-13	hypothetical protein [Schistosoma mansoni] gl 238661028 emb CAZ32015.1 hypothetical protein [Schistosoma mansoni]	2e-07
Contig_Planarian_90e_240	CATGCTCAATGTTTCTTACT	123.61	406.67	3.3061	1.31E-35	15.99	340.02	21.3	1.52E-79	hypothetical protein Plasmidom falciparum 3071 gl 23615617 emb CA052609.1 conserved Plasmidom protein, unknown 0.013	0.013
Contig_Planarian_90e_748	CATGCTCAATGTTTCTTACT	0	281.2	DIV0	9.85E-83	34.65	331.67	9.57	4.93E-69	hypothetical protein Trypanosoma cruzi strain CL Brenei gl 00804046 gb EAN93505.1 hypothetical protein, conserved [Tryp 1e-04	1e-115
Contig_Planarian_90e_1853	CATGCTGTTTATGAGTGGT	284.51	543.16	2.0535	2.38E-11	171.3	902.68	6.39	9.97E-18	Calbindin-32 [Schistosoma japonicum]	1e-115
Contig_Planarian_90e_575	CATGCTGTTTATGAGTGGT	95.09	368.15	3.8716	4.69E-38	18.66	267.34	14.3	1.78E-56	hypothetical protein [Schistosoma mansoni] gl 238663162 emb CAZ34087.1 expressed protein [Schistosoma mansoni]	5e-10
Contig_Planarian_90e_16994	CATGCTGTTTATGAGTGGT	0	269.73	DIV0	1.94E-79	135.9	277.78	2.04	1.91E-11	topomycin [Orientobilharzia tuketanicum]	7e-64
Contig_Planarian_90e_21805	CATGCTGTTTATGAGTGGT	0	268.62	DIV0	3.88E-79	95.94	278.2	2.9	8.44E-21	ER lumen protein retaining receptor [Schistosoma mansoni] gl 238662546 emb CAZ3481.1 ER lumen protein retaining rec 1e-24	1e-24
Contig_Planarian_90e_19257	CATGGAACCAATCCATTCGAT	199.68	450.66	2.2569	2.7E-22	133.3	312.45	2.34	8.19E-17	hypothetical protein BRA1DRAFT_115449 [Branchiostoma floridae] gl 229288942 gb EEN59633.1 hypothetical protein BRA 1e-83	1e-83
Contig_Planarian_90e_2449	CATGAATGAATATTTTATC	0	250.68	DIV0	9.45E-74	10.66	307.02	28.8	1.09E-75	actin, putative [Xodes scapularis] gl 21550737 gb EEC16870.1 actin, putative [Xodes scapularis]	2e-22
Contig_Planarian_90e_4030	CATGAATGAATATTTTATC	0	250.68	DIV0	9.45E-74	10.66	307.02	28.8	1.09E-75	apoferritin-2 [Schistosoma mansoni] gl 238662950 emb CAZ33862.1 apoferritin-2 [Schistosoma mansoni]	2e-10
Contig_Planarian_90e_4597	CATGACAGTAATAATGATGAT	0	230.88	DIV0	9.12E-68	79.95	234.34	2.83	7.39E-18	GTP-binding protein-animal [Schistosoma mansoni] gl 23865873 emb CAZ29783.1 GTP-binding protein-animal, putative [S2e-68	2e-68
Contig_Planarian_90e_5378	CATGACAGTAATAATGATGAT	0	230.88	DIV0	9.12E-68	79.95	234.34	2.83	7.39E-18	hypothetical protein TRIADRAFT_23415 [Tritoxopax adhaerens] gl 190585317 gb EDV25385.1 hypothetical protein TRIADI 9e-63	9e-63
Contig_Planarian_90e_1481	CATGATGCAACCAATGATGAT	0	217.01	DIV0	1.4E-63	26.65	272.35	10.2	2.33E-51	SUCHCO8402 protein [Schistosoma japonicum]	1e-36
Contig_Planarian_90e_8004	CATGATGCAACCAATGATGAT	0	214.97	DIV0	5.56E-63	31.98	220.97	6.81	3.88E-35	PREDICTED: similar to TFIIA [Tribolium castaneum]	5e-24
Contig_Planarian_90e_1208	CATGTTGGGCAATGAGCCAT	44.95	248.83	5.5357	1.39E-34	31.98	220.97	6.81	3.88E-35	ReName: Full-Dual serine/threonine and tyrosine protein kinase; AName: Full=Dusty protein kinase; Short=Dusty PK; AIN= 9e-44	9e-44
Contig_Planarian_90e_362	CATGTTGGGCAATGAGCCAT	165.1	366.12	2.2176	1.15E-17	37.31	95.66	2.56	1.3E-6	receptor interacting protein kinase 5 [Canis lupus familiaris] gl 75068799 gb IQ4VSM4 DUSTY_CANFA ReName: Full=Dual s 1e-21	1e-21
Contig_Planarian_90e_13839	CATGGAAGCAATGTTGTAAT	165.1	366.12	2.2176	1.15E-17	106.6	258.98	2.43	7.39E-15	coactosin-like protein [Eisenia feldia]	2e-36
Contig_Planarian_90e_1551	CATGGAAGCAATGTTGTAAT	0	200.17	DIV0	1.7E-58	106.6	258.98	2.43	7.39E-15	ubiquitin-like protein [Onchocyrnthus mykiss] gl 27450902 gb AAO14688.1 AFA510711_1 ubiquitin-like protein [Onchocyrnthus 0.003	NA
Contig_Planarian_90e_1089	CATGGAGCAATGGGGAAAT	95.09	290.08	3.0506	3.38E-23	74.62	354.64	4.75	9.79E-44	PREDICTED: hypothetical protein [Gallus gallus]	7e-55
Contig_Planarian_90e_120	CATGGAGCAATGGGGAAAT	57.92	252.34	4.3567	3.72E-29	13.33	391.4	29.4	2.19E-97	chaperonin containing -complex protein 1 epsilon subunit tpe [Schistosoma mansoni] gl 238662938 emb CAZ33851.1 chap 3e-97	3e-97
Contig_Planarian_90e_1545	CATGCTGATGATGATATTA	57.92	252.34	4.3567	3.72E-29	37.31	134.09	3.59	2.05E-13	hypothetical protein TRIADRAFT_64023 [Tritoxopax adhaerens] gl 190585331 gb EDV23901.1 hypothetical protein TRIADI 3e-25	3e-25
Contig_Planarian_90e_10646	CATGTAATGACATCACTTT	0	193.7	DIV0	1.05E-56	55.97	200.09	3.57	2.19E-19	Y-box factor-like protein [Lymnaea stagnalis]	9e-26
Contig_Planarian_90e_161	CATGTAATGACATCACTTT	0	192.22	DIV0	4.75E-56	63.96	158.31	2.48	1.2E-9	Kunitz protein 8 [Echinococcus granulosus]	5e-12
Contig_Planarian_90e_1088	CATGTGAAGCAATGGCCCAAT	151.27	342.99	2.2674	2.3E-17	53.3	319.55	6.84E-47	predicted protein [Nematostella vectensis] gl 187009599 gb A7SMW71.2 PHD_NEUVE ReName: Full=L-2-hydroxyglutarate 1e-150	1e-150	
Contig_Planarian_90e_11141	CATGTGAAGCAATGGCCCAAT	0	191.66	DIV0	4.75E-56	55.97	200.09	3.57	2.19E-19	nucleosome assembly protein [Schistosoma mansoni] gl 238658978 emb CAZ32002.1 nucleosome assembly protein, putative 3e-75	3e-75
Contig_Planarian_90e_1298	CATGGTCTGATGATGCTACT	30.25	217.93	7.2043	1.18E-35	31.98	215.96	6.75	5.78E-34	predicted protein [Nematostella vectensis] gl 156218734 gb EDC039627.1 predicted protein [Nematostella vectensis]	3e-23
Contig_Planarian_90e_19024	CATGGTCTGATGATGCTACT	0	187.41	DIV0	1.3E-54	87.95	180.03	2.05	1.0E-7	Calcium ATPase at 60A [Schistosoma japonicum]	1e-163
Contig_Planarian_90e_4646	CATGCCAATGAAGAAGCAAT	0	186.1	DIV0	2.59E-54	34.65	186.3	5.38	2.98E-25	hypothetical protein [Schistosoma mansoni] gl 238665792 emb CAZ29889.1 expressed protein [Schistosoma mansoni]	3e-19
Contig_Planarian_90e_5206	CATGCCAATGAAGAAGCAAT	39.76	217.19	5.4625	7.83E-30	61.3	124.48	2.03	1.7E-5	Ribosomal protein LP1 [Schistosoma japonicum] gl 228480970 emb CAK78900.1 Ribosomal protein LP1 [Schistosoma japon 9e-10	9e-10
Contig_Planarian_90e_4915	CATGTCATGATGCTAGTTTAT	0	164.1	DIV0	9.05E-48	87.95	359.23	4.08	5.42E-39	g99) apparatus protein 1 precursor [Gallus gallus] gl 17376694 gb Q02391 GSLG1_CHICK ReName: Full=Golgi apparatus 1 2e-96	2e-96
Contig_Planarian_90e_3161	CATGTCATGATGCTAGTTTAT	92.49	254.93	27.963	5.02E-18	29.32	305.77	10.4	1.01E-58	Universal stress protein [Schistosoma japonicum] gl 228476378 emb CAK78040.1 Universal stress protein [Schistosoma japon 3e-33	3e-33
Contig_Planarian_90e_3021	CATGGTGAATGATGATTTCT	57.92	217.19	37.498	5.53E-22	31.98	269.84	8.44	2.82E-47	SUCHCO4891 protein [Schistosoma japonicum] gl 257205868 emb CAK82585.1 hypothetical protein [Schistosoma japonica 3e-21	

Genes upregulated after silencing Smed-egfr-3 at 1 and 3 days of regeneration

predicted protein [Nematostella vectensis] gl156221425[gb EO42280.1] predicted protein [Nematostella vectensis]	3e-29
NA	NA
topocytosin [Schistosoma mansoni] gl1174756[sp P42638 TPM2_SCHMA RefName: Full=Topocytosin-2, ANName: Full=Tr, 1e-108	1e-108
glutamine synthetase bacteria [Schistosoma mansoni] gl22386587[7]emb CAZ2982.1] glutamine synthetase bacteria, putative 2e-50	2e-50
Proliferation-associated protein 2G4 [Schistosoma japonicum]	1e-106
high-affinity octapamine transporter [Lumbicris terrestris]	1e-126
unamed protein product [Podospora anserina] gl17094103[emb CAP6688.1] unamed protein product [Podospora anseri 7e-07	7e-07
PREDICTED: hypothetical protein [Rattus norvegicus]	1e-17
NA	NA
plasma membrane calcium ATPase [Pinacia lucida]	1e-118
PREDICTED: similar to LOC567151 protein [Strongyloides purpuratus] gl115937114[ref XP_001187051.1] PREDICTED 8e-47	8e-47
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 3 [Oemorus mordax]	7e-35
90 kDa heat shock protein [Dugesia japonica]	1e-153
hypothetical protein A11_05705 [Rickettsia bellii O85-389] gl157802744[gb ABV79467.1] hypothetical protein A11_05705 [S 3e-28	3e-28
hypothetical protein BRAFLDRAFT_127723 [Branchiostoma floridae] gl229266820[gb EEN57534.1] hypothetical protein BRA2e-17	2e-17
NA	NA
PREDICTED: similar to X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P), 1, soluble [Taeniopygia guttata]	6e-91
unamed protein product [Candida glabrata] gl48526492[emb CAG60116.1] unamed protein product [Candida glabrata]	5e-15
huntingtin intercalating protein 2 [Schistosoma japonicum]	3e-08
PREDICTED: similar to zygote-specific protein [Hydra magnipapillata]	1e-118
neuroendocrine protein 7b2 [Schistosoma mansoni] gl23866387[5]emb CAZ34738.1] neuroendocrine protein 7b2, putative [S 3e-28	3e-28
SJCHG09284 protein [Schistosoma japonicum] gl226471214[emb CAK70688.1] proteasome (prosome, macropain), 26S su 0	1e-124
PREDICTED: similar to serine protease, partial [Tribolium castaneum]	3e-95
NA	NA
hypothetical protein THERM_01253430 [Tetrahymena thermophila] gl189291210[gb EAR89198.1] hypothetical protein TTHe 0.011	0.011
NA	NA
PREDICTED: similar to chromatin modifying protein 4B [Monodelphis domestica]	6e-67
cytochrome c-1 [Bos taurus] gl109940069[sp P00125 CY1_BOVIN RefName: Full=Cytochrome c1, heme protein, mitochond 5e-84	5e-84
PREDICTED: similar to acetyl-CoA thioesterase [Acyrtophisoph pism]	8e-34
PREDICTED: similar to predicted protein [Hydra magnipapillata]	1e-108
PREDICTED: similar to MGC81256 protein [Gallus gallus]	1e-108
unknown [Schistosoma japonicum]	1e-124
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta, 36kDa [Taeniopygia guttata] gl224495847[sp BSFZ19IEF3_1] TAEGU 1 3e-95	3e-95
hypothetical protein FN_P_0612 [Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum ATCC 10953] gl146323168[gb EDK8418.1] 0.01	0.01
NA	NA
PREDICTED: similar to CG3083-PA [Nasonia vitripennis]	3e-63
family with sequence similarity 40, member A [Danio rerio]	1e-129
GK19681 [Drosophila willistoni] gl94158920[gb EDW73821.1] GK19681 [Drosophila willistoni]	7e-94
hypothetical protein [Schistosoma japonicum]	0.057
PREDICTED: similar to DnaJ domain-containing protein RME-8 [Gallus gallus]	8e-90
hypothetical protein [Schistosoma mansoni] gl121916497[gb EAY21277.1] hypothetical protein TVAG_166520 [Trichomoe 4e-08	4e-08
mindbott homolog 2 [Xenopus laevis] gl170284530[gb AA81083.1] Mib2 protein [Xenopus tropicalis]	3e-08
PREDICTED: similar to skelethron [Monodelphis domestica]	1e-106
stomatinal-related [Schistosoma mansoni] gl23865676[emb CAZ27843.1] stomatinal-related [Schistosoma mansoni]	1e-106
hypothetical protein [Schistosoma mansoni] gl238661316[emb CAZ32292.1] expressed protein [Schistosoma mansoni]	2e-30
PREDICTED: SH3-domain binding protein 2 [Taeniopygia guttata]	0.019
NA	NA
NA	NA
PREDICTED: similar to AGAP003004-PA [Tribolium castaneum]	NA
tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 [Oplegnathus fasciatus]	2e-09
PREDICTED: wufk30a05 [Danio rerio]	1e-05
Chain C, Complex Between Pp2a-Specific Methyltransferase Pme-1 And Pp2a Core Enzyme	2e-08
EH domain protein [Xenopus laevis] gl32364687[gb AAP0383.1] EH domain protein [Xenopus laevis]	1e-165
conserved hypothetical protein [Culex quinquefasciatus] gl167877350[gb EDS40733.1] conserved hypothetical protein [Culex 2e-31	2e-31
keratinocyte associated protein 2 [Ulopanaeus varnamei]	2e-10
Na+/K+ transporting ATPase subunit alpha [Schistosoma mansoni] gl238668141[emb CAZ29204.1] term=sodium potassium 2e-94	2e-94
NA	NA
PREDICTED: similar to LOC-95074 protein [Gallus gallus]	NA
PREDICTED: similar to ChacC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli) [Gallus gallus]	7e-20
hypothetical protein Osl_31006 [Oryza sativa Indica Group]	7e-35
MAGUK p55 subfamily member 6 [Schistosoma japonicum]	3e-04
NA	1e-115
PREDICTED: similar to cAMP-dependent protein kinase C1 [Acyrtophisoph pism]	NA
PREDICTED: similar to CG6878-PA [Strongyloides purpuratus] gl115975419[ref XP_001177430.1] PREDICTED: similar 8e-24	8e-24
SJCHG02913 protein [Schistosoma japonicum] gl226470362[emb CAK70461.1] CBF1 interacting corepressor [Schistosoma 1e-04	1e-04
RefName: Full=Asparagine-linked glycosylation protein 1, homolog gl55957672[emb CA12890.1] UTP14, U3 small nucleole 4e-98	4e-98
PREDICTED: similar to glycosyl transferase [Tribolium castaneum]	2e-56
PREDICTED: similar to Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 (Dynein intermediate chain 2, cytosolic) [DH IC-2] (Cytople 1e-148	1e-148
Mz2 protein [Onchocynchus mykiss] gl139945452[gb AAC60214.1] RB1Tm42 [Onchocynchus mykiss]	2e-31
Mapre 1 protein [Danio rerio] gl169153889[emb CAQ14783.1] microtubule-associated protein, RPIEB family, member 1, like 0	0
paramyosin [Schistosoma japonicum]	4e-17
hypothetical protein PEPICM_01644 [Parvomonas micra ATCC 33270] gl1158446843[gb EDP23838.1] hypothetical protein PE 0.002	0.002
SJCHG06101 protein [Schistosoma japonicum]	1e-106
lipase 1; sterol esterase 1; sterol esterase 2 [Schistosoma mansoni] gl238657720[emb CAZ28791.1] lipase 1; sterol esterase 1e-101	1e-101

0	425.65	DV0	3.35E-126
26.65	289.22	10.8	1.55E-55
0	126.57	DV0	1.02E-36
47.97	115.29	2.4	6.9E-7
15.99	218.88	13.7	4.32E-46
8	34.67	4.33	1.85E-5
10.66	357.98	33.6	2.55E-90
202.5	589.98	2.91	2.25E-43
202.5	589.98	2.91	2.25E-43
82.62	196.3	2.25	1.85E-17
55.97	121.97	2.18	3.91E-6
55.97	121.97	2.18	3.91E-6
15.99	299.5	18.7	2.36E-68
13.33	110.69	8.3	5.55E-20
26.65	112.37	4.22	7.35E-11
85.28	253.13	2.97	1.05E-19
47.97	144.11	3	1.24E-11
143.9	332.92	2.31	1.92E-17
53.3	312.45	5.86	6.28E-45
34.65	131.16	3.79	1.45E-13
53.3	125.31	3.82	9.93E-35
178.6	681.29	3.82	9.93E-35
10.66	170.85	16	1.77E-37
23.99	123.64	5.15	8.85E-17
10.66	143.28	13.4	7.1E-30
21.32	91.06	4.27	5.51E-12
79.95	167.66	2.02	7.91E-7
18.66	107.77	5.78	1.11E-15
47.97	190.48	3.97	2.08E-20
47.97	190.48	3.97	2.08E-20
47.97	190.48	3.97	2.08E-20
0	101.5	DV0	2.75E-29
39.98	105.68	2.65	1.00E-36
29.32	60.15	2.05	0.000363
34.65	78.53	2.27	1.32E-5
42.64	105.68	2.48	1.07E-6
8	68.09	8.61	2.5E-13
26.65	87.3	3.28	5.34E-9
63.96	154.14	2.41	4.84E-9
23.99	65.58	2.73	3.55E-6
23.99	65.58	2.73	3.55E-6
23.99	65.58	2.73	3.55E-6
10.66	121.97	11.4	2.78E-24
10.66	154.97	14.5	4.08E-33
8	73.1	9.14	1.33E-14
42.64	90.64	2.13	1.12E-5
26.65	83.96	3.15	1.88E-8
0	77.28	DV0	6.82E-24
34.65	95.66	2.76	3.97E-7
31.98	100.25	3.13	1.04E-8
8	89.39	11.2	9.12E-19
0	51.8	DV0	2.22E-16
0	51.8	DV0	2.22E-16
45.31	180.4	3.54	1.41E-15
58.63	142.86	2.44	1.51E-8
34.65	75.61	2.18	3.48E-5
13.33	133.25	10	1.23E-25
31.98	96.49	3.02	5.35E-8
21.32	78.11	3.66	2.54E-9
0	73.1	DV0	1.06E-22
2.67	165	61.8	9.18E-45
21.32	50.96	2.39	0.000164
18.66	114.45	6.13	4.49E-17
31.98	68.34	2.17	8.26E-5
0	109.86	DV0	1.16E-31
0	109.86	DV0	1.16E-31
15.99	70.59	4.41	7.95E-10
0	94.4	DV0	5.05E-29
42.64	88.56	2.28	0.000929
18.66	26.82	2.08E-8	
34.65	85.63	2.47	1.22E-6
26.65	85.63	3.21	8.14E-9

Config. Planarian, 90e 7466	CATGAGCAATCCAAATGATCC
Config. Planarian, 90e 31317	CATGCGTCCAAATGATTCATTC
Config. Planarian, 90e 13317	CATGCGTCCAAATGATTCATTC
Config. Planarian, 90e 239	CATGGGAATGAAGATCATGTT
Config. Planarian, 90e 714	CATGGTCTAATGAATCATCTTT
Config. Planarian, 90e 2198	CATGAGCAATCAATGCGCAA
FAJXP02QWQD_1	CATGATGATGCGAAGCGGTTT
Config. Planarian, 90e 151	CATGATGATGATGTCGATC
FAJXP02G6NUM	CATGATGATGATGTCGATC
Config. Planarian, 90e 2396	CATGAATGATGATGATTTTT
Config. Planarian, 90e 2096	CATGAAATGTTGGAGAAATTA
Config. Planarian, 90e 8333	CATGAAATGTTGGAGAAATTA
Config. Planarian, 90e 11566	CATGTTATTTATGAATCATTC
Config. Planarian, 90e 7703	CATGGCAATGCTATGATGAA
Config. Planarian, 90e 2061	CATGATCAATGAGTATTGATA
Config. Planarian, 90e 3359	CATGTTGAATGATGATCCT
Config. Planarian, 90e 3754	CATGATTGATGGAATGAT
FAJXP02HLS9R	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 5601	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 1502	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 302	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 10715	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 6039	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 9056	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 4802	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 1484	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 13215	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 2880	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 6095	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 32163	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 1849	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 1561	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 21940	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 5096	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 4184	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 1482	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 27312	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 2646	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 11198	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 21332	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 8579	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 3421	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 2251	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 34864	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 10327	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
FAJXP02O64F_2	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 1383	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 14701	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 5229	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 474	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 2468	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 7509	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
FAJXP02HNLJ	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 2980	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 7183	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 14018	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 292	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 6939	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 5430	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
gnlUGISnef S38606303	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 9392	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 8245	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
FAJXP02OIMP	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 2396	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 9334	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 2781	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
FAJXP02HW9BV	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 10193	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 1026	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
FAJXP02HWHU	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 8811	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 1451	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 3690	CATGTTGTTATGCGAATGGAC
Config. Planarian, 90e 1874	CATGTTGTTATGCGAATGGAC

150

[illegible]

Genes upregulated after silencing Smed-egfr-3 at 1 and 3 days of regeneration

[illegible]

Contig_Planarian_906_2081	CATGAGTGGCTGGCGTGGCGTG	13.83	43.11	3.1171	5.34E-5	10.66	33	3.1	0.000436	hypothetical protein [Schistosoma mansoni] g 24223237 emb CAV17093.1 hypothetical protein [Schistosoma mansoni] 0.000
Contig_Planarian_906_24804	CATGAGTGGATTTCTATTAAGA	24.2	53.28	2.2017	0.000362	8	40.52	5.07	8.01E-7	Guanylate kinase family protein [Brugia malayi] g 1585934253 g EDP32837.1 Guanylate kinase family protein [Brugia malayi] 0.000
Contig_Planarian_906_16161	CATGAGTGGATTTCTATTAAGA	24.2	53.28	2.2017	0.000362	8	40.52	5.07	8.01E-7	unamed protein product [Homo sapiens]
Contig_Planarian_906_1345	CATGATGAATGACGCTGATTA	20.75	48.72	2.3986	0.000232	0	37.15	DIV0	1.743E-9	AGAP00110-PA [Anopheles gambiae str. PEST] g 15701297 g EOL3A38656.2 AGAP00111-PA [Anopheles gambiae str. P4-4e-38]
Contig_Planarian_906_14878	CATGATGAATGACGCTGATTA	0	28.86	DIV0	1.86E-9	5.33	32.58	6.11	1.83E-6	predicted protein [Schistosoma mansoni] g 23865092 emb CAV17093.1 expressed protein [Schistosoma mansoni] 6e-48
Contig_Planarian_906_1693	CATGAGTACTGTGCGAGTATG	12.97	41.1	3.2236	4.03E-5	0	43.86	DIV0	5.06E-14	TNF receptor-associated factor 6 [Xenopus tropicalis]
Contig_Planarian_906_16673	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	23.34	52.17	2.2532	0.000315	2.67	17.54	6.57	0.000034	Nuclear transport factor 2 [Schistosoma japonicum]
Contig_Planarian_906_14853	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	18.38	41.4	3.249	5.93E-9	16.38	17.4	3.249	5.93E-9	hypothetical protein [Plasmodium yoelii]
Contig_Planarian_906_14853	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	18.38	41.4	3.249	5.93E-9	16.38	17.4	3.249	5.93E-9	hypothetical protein [Plasmodium yoelii]
Contig_Planarian_906_1244	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	27.66	58.66	2.0268	0.000312	2.67	27.67	0.33	2.09E-6	membrane protein 40 [S. (Schistosoma) tropicalis] g 20973734 g EOL3A38656.2 40 [S. (Schistosoma) tropicalis] 1e-35
Contig_Planarian_906_4173	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	27.66	58.66	2.0268	0.000312	2.67	27.67	0.33	2.09E-6	membrane protein 40 [S. (Schistosoma) tropicalis] g 20973734 g EOL3A38656.2 40 [S. (Schistosoma) tropicalis] 1e-35
Contig_Planarian_906_6779	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	27.66	58.66	2.0268	0.000312	2.67	27.67	0.33	2.09E-6	membrane protein 40 [S. (Schistosoma) tropicalis] g 20973734 g EOL3A38656.2 40 [S. (Schistosoma) tropicalis] 1e-35
Contig_Planarian_906_7440	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	11.24	38.85	3.4564	3.32E-5	5.33	53.89	0.1	1.68E-12	PREDICTED: similar to translational activator gap [Nasonea vitripennis]
Contig_Planarian_906_5963	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_24852	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_10734	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.87E-5	hypothetical protein LOC549635 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
Contig_Planarian_906_4785	CATGAGCGCAATCTCAAGATTC	0	27.57	DIV0	3.73E-9	2.67	23.39	8.76	3.	

Genes upregulated after silencing Smed-egr-3 at 1 and 3 days of regeneration

Conlig_Planarian_90e_7684	CATGGTCAATCATGGGAAC	0	20.54 DIV0	4.77E-7	10.66	34.25	3.21	0.000288	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus] gl 15632068 ref XP_001176532.1 PREDICTED: hypothetical 1e-149
Conlig_Planarian_90e_1956	CATGGTCAAGAAATGAATCAAC	0	20.35 DIV0	9.54E-7	23.99	60.15	2.51	3.32E-5	1-O-acylseramide synthase precursor, putative [Pediculus humanus corporis] gl 2126177 gb EEB18310.1 1-O-acylseramid-2e-82
gnlUGSnef#S38592573	CATGGTCTGCTCAATGAATTA	0	20.35 DIV0	9.54E-7	2.67	16.29	6.91	0.00185	hypothetical protein 003-32 [Okolopeura dioica] gl 42601365 pb AA521391.1 hypothetical protein 003-32 [Okolopeura dioica] 8e-05
Conlig_Planarian_90e_1880	CATGTTTGGCCCTGGCCATGAT	11.24	31.45	2.798	0.000973	8	42.19	5.27	4.77E-7
FAIUXP02GRND9_1	CATGTTTGGCCCTGGCCATGAT	11.24	31.45	2.798	0.000973	8	42.19	5.27	4.77E-7
Conlig_Planarian_90e_4666	CATGTCACAAATGATTTGGAT	0	20.17 DIV0	9.54E-7	2.67	13.33	41.77	6.42	0.00109
Conlig_Planarian_90e_234	CATGGAATGAATTTGCTATTCC	0	19.98 DIV0	9.54E-7	13.33	41.77	6.42	4.93E-5	very low density lipoprotein binding protein precursor [Schistosoma japonicum] gl 19950301 pb ACE06889.1 unknown [Schl 5e-42
Conlig_Planarian_90e_4854	CATGTTTCAATGATCGGATTC	0	19.98 DIV0	9.54E-7	2.67	13.33	41.77	6.42	4.93E-5
Conlig_Planarian_90e_160	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_1675	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_1604	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_17294	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
FAIUXP02G3V568_1	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
FAIUXP02JMYJ1	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_9479	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_11403	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_4741	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
FAIUXP02HAM75_1	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_3798	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_15765	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_14032	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_1689	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
gnlUGSnef#S38590236	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_18836	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_8861	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
FAIUXP02HOA1G	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_2702	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_2591	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
FAIUXP02J60WC	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_9249	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_11040	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_12649	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
FAIUXP02HWUWU_1	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_6512	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_8381	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_2341	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
gnlUGSnef#S38628443	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_15112	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_22871	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_13054	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
FAIUXP02G5VTA	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
gnlUGSnef#S38576651	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
FAIUXP02HL2CJ	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_3479	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_11040	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_12649	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_5085	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_12856	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_769	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_6995	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_10245	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_2986	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_16885	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_4905	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_4073	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_5876	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_6261	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_6261	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_1667	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
FAIUXP02G238T_1	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_2887	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
FAIUXP02JL2E5_2	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_1388	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_429	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_8821	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_27057	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
FAIUXP02GRHM	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_8806	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211
Conlig_Planarian_90e_18190	CATGTCATCTTTRAGATTAAT	11.24	31.08	2.798	0.000973	2.67	26.73	7.35	0.000211

Resultats

Genes upregulated after silencing Smed-egfr-3 at 1 and 3 days of regeneration

Conlig_Planarian_90e_4412	CATGGSCACGATTAAGCATTT	0	13.69	DV0	6.1E-5	hypothetical protein [Schistosoma mansoni] gi 238658745 emb CAZ28795.1 conserved hypothetical protein [Schistosoma m...
Conlig_Planarian_90e_30833	CATGGAAATGAAGATTGTTTC	8	26.73	3.34	0.000685	unknown [Schistosoma japonicum]
FAIJPX02KKNW	CATGGAAATGAAGATTGTTTC	8	26.73	3.34	0.000685	PREDICTED: similar to tubulin alpha chain - sea urchin [Paracentrotus lividus], partial [Strogylocentrotus purpuratus]
Conlig_Planarian_90e_7300	CATGSCAATGACGAGCTTGCTT	267	19.21	7.19	0.000367	PREDICTED: similar to MCS13p179 protein [Strongylocentrotus purpuratus] gi 159458632 ref XP_001186832.1 PREDICTED: sir 1e-35
Conlig_Planarian_90e_26537	CATGSAATGAGATTATTGAT	0	15.87	DV0	1.53E-5	hypothetical protein GobsL_26581 [Gemmata obscuriglobus UQM 2246]
FAIJPX02KSVT_1	CATGSAATGAATGTTGGAAAT	0	9.61	DV0	0.000977	NA
Conlig_Planarian_90e_7498	CATGSAACAAATGAATGAACG	5.33	26.32	4.94	7.91E-5	predicted protein [Nematostella vectensis] gi 156221164 gb ED042022.1 predicted protein [Nematostella vectensis]
Conlig_Planarian_90e_15036	CATGSCGCATGAATGAATGATCG	5.33	23.39	4.39	0.000366	protein kinase [Schistosoma mansoni] gi 238663501 emb CAZ34380.1 protein kinase [Schistosoma mansoni]
Conlig_Planarian_90e_10617	CATGSGATGCTTGAATTTGGAT	5.33	23.39	4.39	0.000366	Reptide: Full-Cyclin-dependent kinase-like 1; A1Name: Full=Serine/threonine-protein kinase KK(A)LR; A1Name: Full=Prot 3e-45
Conlig_Planarian_90e_11649	CATGSGTCAATCCGTTCTTGTA	0	8.37	DV0	0.00195	peptide (alatrostatin)-like receptor [Schistosoma mansoni] gi 23867819 emb CAZ23888.1 peptide (alatrostatin)-like receptor, 2e-79
Conlig_Planarian_90e_4887	CATGSCAAATGAATGACGATG	0	13.32	DV0	0.000122	NA
FAIJPX02RHE2	CATGSCAAATGAATGACGATG	3.46	16.48	4.867	0.00109	PREDICTED: similar to disrupted in bipolar disorder 1 homolog [Conia nitens/nalis]
Conlig_Planarian_90e_13509	CATGGCCATCTATTCCGCAATT	2.59	15.73	6.0734	0.00185	alpha-1,2-mannosyltransferase AL59, putative [Pediculus humanus corporis] gi 212508432 gb EEB12136.1 alpha-1,2-mann... 1e-11
Conlig_Planarian_90e_15139	CATGGCCATCTATTCCGCAATT	2.59	15.73	6.0734	0.00185	hypothetical protein [Schistosoma mansoni] gi 238666887 emb CAZ37389.1 hypothetical protein [Schistosoma mansoni]
Conlig_Planarian_90e_7950	CATGGCAATGCTCTTTCCCA	0	13.14	DV0	0.000122	DEHAZ25432p [Debanomyces henseni]
Conlig_Planarian_90e_11591	CATGGCAATGCTCTTTCCCA	5.19	18.32	3.5299	0.00401	hypothetical protein LOC236368 [Rattus norvegicus] gi 149065220 gb EDM15296.1 rCG28139 [Rattus norvegicus]
Conlig_Planarian_90e_14383	CATGGAATGAATGATCTTTTC	0	12.95	DV0	0.000122	phosphoglycolate/pyridoxal phosphate phosphatase [Schistosoma mansoni] gi 238658672 emb CAZ30700.1 phosphoglycolate-4e-61
Conlig_Planarian_90e_9422	CATGGTTAATGCTATGCGAT	0	12.95	DV0	0.000122	predicted protein [Nematostella vectensis] gi 156222967 gb ED043806.1 predicted protein [Nematostella vectensis]
FAIJPX02FOYH7	CATGCGAACAAGCTGCCAATCA	5.19	18.13	3.4933	0.00401	tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 [Branchiostoma belcheri]
Conlig_Planarian_90e_2583	CATGCGAACAAGCTGCCAATCA	5.19	18.13	3.4933	0.00401	E3 ubiquitin ligase, putative [xodes scapularis]
Conlig_Planarian_90e_11649	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	12.77	DV0	0.000122	Nucleobindin 2a [Danio rerio]
Conlig_Planarian_90e_15139	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	12.77	DV0	0.000122	PREDICTED: similar to Ankyrin repeat domain 38 [Gallus gallus]
Conlig_Planarian_90e_21573	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	12.77	DV0	0.000122	thyroidal-adenine-sensitive 1-type calcium channel [Schistosoma mansoni] gi 238662762 emb CAZ23682.1 Tetrspann-1 (Tspan-1), putative [Schisto...
Conlig_Planarian_90e_5981	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	12.77	DV0	0.000122	Thyroidal-adenine-sensitive 1-type calcium channel [Schistosoma mansoni] gi 238662762 emb CAZ23682.1 Tetrspann-1 (Tspan-1), putative [Schisto...
Conlig_Planarian_90e_9670	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	12.77	DV0	0.000122	variable lymphocyte receptor [Schistosoma mansoni] gi 238656618 emb CAZ27698.1 variable lymphocyte receptor, putative 0.048
FAIJPX02JLN07	CATGTTTATGAATGTTTTC	5.19	17.95	3.4586	0.00401	ADP-ribosylation factor [Phytophthora dimorpha]
Conlig_Planarian_90e_4713	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	12.58	DV0	0.000122	NA
Conlig_Planarian_90e_21641	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	12.58	DV0	0.000122	ADP-ribosylation factor [Phytophthora dimorpha]
FAIJPX02FOXG_1	CATGTTTATGAATGTTTTC	3.46	15.91	4.5983	0.00185	transmembrane emp24 domain-containing protein 10 [Danio rerio] gi 37744485 gb AAH59496.1 Tmed10 protein [Danio rerio] 1e-67
gnlUGShelf S38590004	CATGTTTATGAATGTTTTC	2.59	14.99	5.7876	0.00311	PREDICTED: similar to kynurenine formamidase [Apis mellifera]
Conlig_Planarian_90e_1717	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	12.21	DV0	0.000244	OTU domain-containing protein 6B, putative [Pediculus humanus corporis] gi 212506448 gb EEB10666.1 OTU domain-conta 2e-27
Conlig_Planarian_90e_5225	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	12.21	DV0	0.000244	hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2] gi 124400209 emb CAK65696.1 unnamed protein product [Paramec 4e-07
Conlig_Planarian_90e_11870	CATGTTTATGAATGTTTTC	2.59	14.62	5.6448	0.00311	hypothetical protein BRAF1DRAFT_75707 [Branchiostoma floridae] gi 229279064 gb EEN49845.1 hypothetical protein BRAF 2e-41
Conlig_Planarian_90e_18884	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	12.03	DV0	0.000244	PREDICTED: hypothetical protein [Nasonia vitripennis]
Conlig_Planarian_90e_14338	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	12.03	DV0	0.000244	PREDICTED: similar to ubiquitin specific peptidase 14 [Tribolium castaneum]
Conlig_Planarian_90e_1454	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.84	DV0	0.000244	NA
FAIJPX02JT02R_1	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.66	DV0	0.000244	hypothetical protein BRAF 3e-14
Conlig_Planarian_90e_1095	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.66	DV0	0.000244	PREDICTED: similar to Elongation of very long chain fatty acids protein [Tribolium castaneum]
Conlig_Planarian_90e_2135	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.47	DV0	0.000488	PREDICTED: similar to CG31522 CG31522-PB [Tribolium castaneum]
Conlig_Planarian_90e_32226	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.47	DV0	0.000488	adducin related protein [Schistosoma mansoni] gi 238663671 emb CAZ34541.1 adducin related protein [Schistosoma manso 1e-09
Conlig_Planarian_90e_16711	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.47	DV0	0.000488	PREDICTED: similar to Ankrd45 protein [Strongylocentrotus purpuratus] gi 115661688 ref XP_001202089.1 PREDICTED: sir 1e-23
Conlig_Planarian_90e_72972	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.47	DV0	0.000488	NA
Conlig_Planarian_90e_7895	CATGTTTATGAATGTTTTC	4.32	15.73	3.6412	0.00462	hypothetical protein BRAF1DRAFT_154456 [Branchiostoma floridae] gi 229294699 gb EEN65353.1 hypothetical protein BR2 3e-14
Conlig_Planarian_90e_11486	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.29	DV0	0.000488	PREDICTED: similar to Elongation of very long chain fatty acids protein [Tribolium castaneum]
Conlig_Planarian_90e_9156	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.29	DV0	0.000488	diphtheria toxin resistance protein 2 dph2 [Schistosoma mansoni] gi 238666045 emb CAZ36705.1 diphtheria toxin resistance pr 5e-19
Conlig_Planarian_90e_13830	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.29	DV0	0.000488	calmodulin related calcium binding protein [Schistosoma mansoni] gi 238667024 emb CAZ37417.1 calmodulin related calca 3e-25
Conlig_Planarian_90e_8732	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.1	DV0	0.000488	SJCHG09165 protein [Schistosoma japonicum]
Conlig_Planarian_90e_3744	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	11.1	DV0	0.000488	PREDICTED: similar to COP9 complex subunit 2 [Monodelphis domestica]
FAIJPX02H1MPA	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	10.92	DV0	0.000488	NA
Conlig_Planarian_90e_8429	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	10.73	DV0	0.000488	NA
Conlig_Planarian_90e_8079	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	10.73	DV0	0.000488	GK14837 [Drosophila willistoni] gi 94161215 gb EDW76116.1 GK14837 [Drosophila willistoni]
Conlig_Planarian_90e_12325	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	10.55	DV0	0.000488	Meiosis expressed protein 1 [Schistosoma japonicum]
Conlig_Planarian_90e_7378	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	10.55	DV0	0.000488	Venom allergen-like (VAL) 14 protein [Schistosoma mansoni] gi 126256502 gb ABO9815.1 venom allergen-like protein 14 [S 2e-12
Conlig_Planarian_90e_10135	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	10.36	DV0	0.000977	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus] gi 115975233 ref XP_001179109.1 PREDICTED: hypothet 2e-45
Conlig_Planarian_90e_3447	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	10.36	DV0	0.000977	nucleotide binding protein 2 (nbp 2) [Schistosoma mansoni] gi 238662690 emb CAZ33605.1 nucleotide binding protein 2 (nbp 2) 4e-15
Conlig_Planarian_90e_3447	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	10.36	DV0	0.000977	hypothetical protein [Dicyostelium discoidium AX4] gi 60475469 gb EAL73404.1 hypothetical protein DDB_G0287902 [Dicy 2e-06
Conlig_Planarian_90e_3448	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	10.36	DV0	0.000977	GM12512 [Drosophila sechellia] gi 194130868 gb EDW52911.1 GM12512 [Drosophila sechellia]
Conlig_Planarian_90e_8215	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	10.18	DV0	0.000977	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
Conlig_Planarian_90e_3477	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	9.99	DV0	0.000977	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase [Entamoeba histolytica HM-1-IMSS] gi 56472667 gb EAL50133.1 ubiquitin carboxyl-term 1e-12
Conlig_Planarian_90e_14069	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	9.99	DV0	0.000977	GM23819 [Drosophila sechellia] gi 194120813 gb EDW42856.1 GM23819 [Drosophila sechellia]
Conlig_Planarian_90e_33652	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	9.81	DV0	0.000977	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus] gi 115940632 ref XP_001190355.1 PREDICTED: hypothet 6e-05
Conlig_Planarian_90e_876	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	9.25	DV0	0.00195	hypothetical serologically defined colon cancer antigen 28 [Branchiostoma belcheri]
Conlig_Planarian_90e_891	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	9.25	DV0	0.00195	hypothetical protein BRAF1DRAFT_76431 [Branchiostoma floridae] gi 229281192 gb EEN52943.1 hypothetical protein BRAF 2e-45
FAIJPX02HSSZ7	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	9.07	DV0	0.00195	isopenitryl-phosphate delta-isomerase [xodes pacificus]
Conlig_Planarian_90e_8289	CATGTTTATGAATGTTTTC	5.33	23.24	5.49	1.82E-5	GF 18155 [Drosophila ananassae] gi 90627235 gb EDV42759.1 GF18155 [Drosophila ananassae]
FAIJPX02HHKNV	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	9.07	DV0	0.00195	hypothetical protein CLOSP0_03858 [Clostridium sporogenes ATCC_15579] gi 87737887 gb EU37689.1 hypothetical prot 0.063
Conlig_Planarian_90e_21021	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	8.86	DV0	0.00195	NA
Conlig_Planarian_90e_26022	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	8.86	DV0	0.00195	PREDICTED: similar to Secretory carrier membrane protein 2, partial [Hydra magnipapillata]
Conlig_Planarian_90e_1386	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	8.7	DV0	0.00195	hypothetical protein BRAF1DRAFT_202079 [Branchiostoma floridae] gi 229278180 gb EEN48967.1 hypothetical protein BRA 1e-102
FAIJPX02JUZM	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	8.7	DV0	0.00195	Rhesus blood group, C glycoprotein [Macaca mulatta] gi 122135009 gb Q02CR3 RHCG_MACMU RecName: Full=Ammonium 4e-05
Conlig_Planarian_90e_66	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	8.51	DV0	0.00195	Lymphocyte cytosolic protein 1 [Schistosoma japonicum]
Conlig_Planarian_90e_9296	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	8.51	DV0	0.00195	PREDICTED: similar to fimbrin/plastin [Nasonia vitripennis]
FAIJPX02H8WP9	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	8.51	DV0	0.00195	NA
Conlig_Planarian_90e_22541	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	8.33	DV0	0.00391	hypothetical protein [Schistosoma mansoni] gi 238666193 emb CAZ36840.1 expressed protein [Schistosoma mansoni] 1e-19
Conlig_Planarian_90e_5919	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	8.33	DV0	0.00391	hypothetical protein BRAF1DRAFT_88112 [Branchiostoma floridae] gi 229277380 gb EEN48176.1 hypothetical protein BRAF 9e-34
Conlig_Planarian_90e_4434	CATGTTTATGAATGTTTTC	0	10.03	DV0	0.000977	

Genes upregulated after silencing Smed-egfr-3 at 1 and 3 days of regeneration

Contig_Planarian_90e_23512	CATGCGAGCACAATGACAAA	0	8.14 DIV0	0.00391	0	34.25 DIV0	5.82E-11	putative leucyl aminopeptidase [Cionorchis sinensis]	4e-57
FAUXP0202U8	CATGCGAGCACAATGACAAA	0	8.14 DIV0	0.00391	0	34.25 DIV0	5.82E-11	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]	3e-17
Contig_Planarian_90e_6225	CATGCTCAATGTTTTTTAGATT	0	7.96 DIV0	0.00391	0	18.38 DIV0	3.81E-6	NA	NA
Contig_Planarian_90e_5820	CATGAGAAATGGAGAAAGGCC	0	7.77 DIV0	0.00391	0	23.81 DIV0	5.98E-8	hypothetical protein BRAFLDRAFT_119036[Branchiostoma floridae]	1e-72
Contig_Planarian_90e_5944	CATGGAACAGCTTAATGCGCT	0	7.77 DIV0	0.00391	5.33	21.72	4.08 0.000601	leucine rich repeat containing 40 [Salmo salar]	NA
Contig_Planarian_90e_30644	CATGATAATGTATGTATTTC	0	7.77 DIV0	0.00391	0	8.77 DIV0	0.00195	NA	1e-178
Contig_Planarian_90e_2247	CATGGAAGACAAATGAAGGTGT	0	7.77 DIV0	0.00391	0	7.52 DIV0	0.00391	Djv1 protein [Dugesia japonica]	1e-178
Contig_Planarian_90e_24089	CATGTGACAAAAGACTGAGTT	0	7.59 DIV0	0.00391	0	10.86 DIV0	0.000488	NA	NA

Genes downregulated after silencing Smed-egfr-3 at 1 and 3 days of regeneration

CONTIG	TAG	C1	R1	R1C1	value_C1 vs R1	R3	R3C3	value_C3 vs R3	subject_annotation	value
Contig_Plenarian_306_28255	CATGGTTGTAAAGGGTAACGG	1900	371.67	0.195616 9.96E-62	1479.08	22.56	0.015253	1.38E-201	hypothetical protein [Schistosoma mansoni] gl 23668051 emb CAZ33048.1 hypothetical pr-9-17	9e-17
Contig_Plenarian_306_30656	CATGGGTACTATCGAAGACG	1324.66	578.87	0.46961 8.01E-14	783.51	138.68	0.176988	5.53E-55	PREDICTED: similar to ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor isoform 4 [Canis f-3e-88	3e-88
Contig_Plenarian_306_10933	CATGGTCTACATATAAAGC	534.21	0	0.1012E-158	9863.18	451.97	0.045824	1.44E-144	endochitinase [Encephalitozoon cuniculi GB-M1] gl 19171378 emb CAD27103.1 ENDOCHIT	4e-35
Contig_Plenarian_306_1294	CATGCAACATCGATCAACATGA	513.47	0	0.26E-152	351.78	66.83	0.189977	7.02E-47	90 kDa heat shock protein [Dugesia japonica]	0
Contig_Plenarian_306_337.81	CATGCCAGCTTCAAGTATCG	810.83	0	0.416622 1.96E-22	218.53	0	0.354E-64	0	ReName: Full=60S ribosomal protein L17 [gl 114152970 gb AB152651.1 ribosomal protein L3e-72	3e-72
Contig_Plenarian_306_27206	CATGAAGATGCATCTATACG	392.45	0	0.16622 1.96E-22	511.68	75.19	0.146847	5.13E-50	glucose-regulated protein 94 [Crassostrea gigas]	0
Contig_Plenarian_306_200	CATGAGAGGATATGAAGAC	615.47	228.48	0.371228 1.12E-20	1673.82	306.6	0.183196	2.95E-57	heat shock protein 90kDa gamma subunit, PEST1 [gl 116132504 gb EAA04769.4 AGAP006959-PA	1e-11
Contig_Plenarian_306_30933	CATGAGAGGATATGAAGAC	615.47	228.48	0.371228 1.12E-20	1673.82	306.6	0.183196	2.95E-57	heat shock protein 90kDa beta, member 1 [Danio rerio] gl 3132728 gb AAFP47138.1 P04861	1e-36
Contig_Plenarian_306_3780	CATGAGAGGATATGAAGAC	615.47	228.48	0.371228 1.12E-20	1673.82	306.6	0.183196	2.95E-57	similar to NM_011967 proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 5 in Mus musc	1e-92
Contig_Plenarian_306_1555	CATGGAAGCTTTGGTGATTT	525.57	205.72	0.391423 3.74E-32	367.77	81.45	0.22147	7.53E-44	Rho-associated protein kinase 1 [Schistosoma japonicum]	1e-32
Contig_Plenarian_306_1555	CATGGAAGCTTTGGTGATTT	525.57	205.72	0.391423 3.74E-32	367.77	81.45	0.22147	7.53E-44	proteasome alpha subunit [Onchodoros nubilae]	2e-45
Contig_Plenarian_306_1555	CATGGAAGCTTTGGTGATTT	525.57	205.72	0.391423 3.74E-32	367.77	81.45	0.22147	7.53E-44	PREDICTED: similar to VATPase subunit A [Nasonia vitripennis]	0
Contig_Plenarian_306_1283	CATGGAAGCTTTGGTGATTT	291.31	0	0.999E-86	178.56	64.75	0.362623	9.37E-13	PREDICTED: similar to VATPase subunit A [Nasonia vitripennis]	0
Contig_Plenarian_306_1283	CATGGAAGCTTTGGTGATTT	291.31	0	0.999E-86	178.56	64.75	0.362623	9.37E-13	exporter of the RND superfamily-like protein [Bacillus salmoneiducens MLS10] gl 16035755 gb EEN12e-51	2e-51
Contig_Plenarian_306_2805	CATGTGCGATGCGCAATGGA	286.99	0	0.157E-84	231.83	49.71	0.12191	9.25E-42	hypothetical protein BRAFLDRAFT_120045 [Branchiostoma floridae] gl 229295750 gb EEN12e-51	2e-51
Contig_Plenarian_306_11335	CATGTGCGATGCGCAATGGA	286.99	0	0.157E-84	231.83	49.71	0.12191	9.25E-42	hypothetical protein L7 isoform B [Lysiphlebus testaceipes]	1e-74
Contig_Plenarian_306_10210	CATGTGCGATGCGCAATGGA	522.11	247.72	0.474459 2.27E-22	559.65	77.69	0.138619	7.08E-90	PREDICTED: similar to leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family) [Strongylocentrotus 0.012	0.012
Contig_Plenarian_306_698	CATGAAACATTAACCAACA	257.6	0	0.759E-76	855.47	94.82	0.11084	7.07E-77	protein NEF 1, putative [Xodes scapularis] gl 67063969 gb AAV66919.1 conserved hypothetical 5e-31	5e-31
Contig_Plenarian_306_2733	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_13696	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_560	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_26470	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_28808	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_858	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_5842	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_9608	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1293	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_30602	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_32327	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_29170	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_16285	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_10532	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_5628	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_3310	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_3657	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_7263	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_28467	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_10814	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_19422	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_32057	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_17341	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_2626	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1154	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_9823	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_5079	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_27606	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_3103	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_17651	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_5553	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_28391	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_3354	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1548	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_6409	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_27606	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_5375	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1522	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_16990	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_17953	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1209	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_9651	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_2899	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC	222.16	0	0.449E-65	178.56	0	0.299451	2.03E-16	alpha tubulin [Schistosoma mansoni] gl 238665538 emb CAZ3627.3.1 alpha tubulin, putative 0	0
Contig_Plenarian_306_1999	CATGACGCGCTCTATACC									

Genes downregulated after silencing Smed-egfr-3 at 1 and 3 days of regeneration

Contig_Plenarian_90e_6899	CATGGAGAAAGCGGTGATCGA	55.32	23.13	0.418113	0.000114,45.31	19.21	0.423988	0.000473	PREDICTED: similar to nuclear autoantigenic sperm protein [Tribolium castaneum]	3e-15
FAAIXP02JTMJ	CATGATATCTGTTTAAAGC	53.59	23.87	0.445419	0.000262,194.55	50.13	0.257672	1.22E-20	NA	NA
Contig_Plenarian_90e_2741	CATGCGCGGTACCGATAGTG	51	21.28	0.417255	0.000164,34.65	6.68	0.192765	6.13E-6	Transmembrane serine protease 8 precursor [Schistosoma japonicum]	2e-80
Contig_Plenarian_90e_1267	CATGGGTCCACGACGAGGGC	31.98	2.96	0.0925578,1.9E-7	0.000164,34.65	6.68	0.137195	2.48E-8	PREDICTED: similar to aldehyde dehydrogenase 1A2 isoform 2 [Strongylocentrotus purpuratus]	1e-138
Contig_Plenarian_90e_4048	CATGGTCTTGAAGATTGGA	48.41	19.98	0.417275	0.000278,63.96	11.7	0.182927	4.11E-10	ReName: Full-Dual serine/threonine and tyrosine protein kinase; AliName: Full-Dusty prot	5e-30
Contig_Plenarian_90e_34324	CATGTTGGGCATTTTCAACGA	41.49	13.32	0.321041,6.15E-5	0.000278,63.96	11.7	0.235147	NA	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]	4e-31
FAAIXP02FC49K	CATGTTGGGCATTTTCAACGA	41.49	13.32	0.321041,6.15E-5	0.000116,197.21	23.39	0.118605	5.98E-35	0.00462	0.00462
Contig_Plenarian_90e_11690	CATGATAGTATCCGGACAGC	44.95	16.84	0.374638	0.00036,47.97	3.76	0.357098	5.06E-5	0.00462	0.00462
Contig_Plenarian_90e_3222	CATGATAGTATCCGGACAGC	53.59	25.72	0.479684	0.000278,63.96	11.7	0.137195	2.48E-3	1-O-acetylceramide synthase precursor [Schistosoma japonicum]	4e-80
Contig_Plenarian_90e_25329	CATGGTATGGAATTTGTGA	47.54	19.98	0.420278	0.000278,63.96	11.7	0.137195	2.48E-3	1-O-acetylceramide synthase precursor [Schistosoma japonicum]	4e-80
Contig_Plenarian_90e_3852	CATGGTAAAGCGGTGAAGGA	44.09	16.65	0.373677	0.000233,47.97	22.56	0.137195	2.48E-3	0.00112	0.00112
Contig_Plenarian_90e_7079	CATGGATTTTCTAAAGATCGA	37.17	10.18	0.273877,3.68E-5	0.000233,47.97	22.56	0.165868	9.84E-8	PREDICTED: similar to Escher hydrolase C11orf54 [Acyrtosphen pium]	2e-17
Contig_Plenarian_90e_19647	CATGGATTTTCTAAAGATCGA	37.17	10.18	0.273877,3.68E-5	0.000233,47.97	22.56	0.165868	9.84E-8	SUCHC06040 protein [Schistosoma japonicum]	1e-29
Contig_Plenarian_90e_30125	CATGTAATTCATGGAACGCG	41.49	16.65	0.401302	0.000685,15.99	2.92	0.182614	NA	0.00185	0.00185
Contig_Plenarian_90e_7357	CATGTAATTCATGGAACGCG	38.03	13.69	0.359979	0.000393,357.11	14.62	0.04094	2.06E-85	unamed protein product [Tetradion nigroviridis]	6e-12
Contig_Plenarian_90e_19407	CATGGGCAAACTGGAAGAAAG	24.2	0	0.5.98E-8	0.000802,37.31	10.86	0.179961	1.91E-11	PREDICTED: similar to inorganic pyrophosphatase [Nasonia vitripennis]	5e-15
Contig_Plenarian_90e_12265	CATGGAATACCTTGTCATTGG	42.36	18.32	0.432483	0.000802,37.31	10.86	0.291075	8.03E-5	PREDICTED: similar to thyroid hormone receptor interactor 11 [Canis familiaris]	6e-29
FAAIXP02PHN29	CATGGAATACCTTGTCATTGG	40.63	16.65	0.409796	0.000802,37.31	10.86	0.37636	NA	Nuclear transport factor 2-like export factor 2 [Homo sapiens]	1e-11
Contig_Plenarian_90e_289	CATGAACATCTGCGCAGATTG	22.47	0	0.409796	0.000466,42.64	1.67	0.341132	1.67E-8	PREDICTED: hypothetical protein [Taeniopygia guttata]	2e-28
Contig_Plenarian_90e_5511	CATGAACATCTGCGCAGATTG	22.47	0	0.409796	0.000466,42.64	1.67	0.341132	1.67E-8	PREDICTED: hypothetical protein [Taeniopygia guttata]	2e-28
FAAIXP02JHA2H	CATGAACATCTGCGCAGATTG	22.47	0	0.409796	0.000466,42.64	1.67	0.341132	1.67E-8	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]	3e-19
Contig_Plenarian_90e_22443	CATGCAATATCTCAAGTCAAG	27.66	20.17	0.476157	0.002,21.32	6.68	0.156973	NA	0.00185	NA
Contig_Plenarian_90e_30459	CATGCAATATCTCAAGTCAAG	27.66	20.17	0.476157	0.002,21.32	6.68	0.156973	NA	0.00185	NA
Contig_Plenarian_90e_26664	CATGTCATATGATTTAACTG	21.61	0	0.2.38E-7	0.002,21.32	6.68	0.235147	NA	0.00462	0.00462
Contig_Plenarian_90e_3489	CATGTACAATTTATTTGGACA	39.76	18.69	0.47007	0.0024,39.98	14.2	0.355778	NA	0.00185	NA
Contig_Plenarian_90e_2596	CATGTACAATTTATTTGGACA	35.44	14.43	0.407167	0.0012,103.94	20.89	0.200981	8.85E-14	sidoflexin 123 [Schistosoma mansoni]	2e-60
Contig_Plenarian_90e_5894	CATGTACAATTTATTTGGACA	35.44	14.43	0.407167	0.0012,103.94	20.89	0.200981	8.85E-14	sidoflexin 123 [Schistosoma mansoni]	2e-60
Contig_Plenarian_90e_24919	CATGTACAATTTATTTGGACA	35.44	14.43	0.407167	0.0012,103.94	20.89	0.200981	8.85E-14	sidoflexin 123 [Schistosoma mansoni]	2e-60
Contig_Plenarian_90e_6106	CATGTACAATTTATTTGGACA	35.44	14.43	0.407167	0.0012,103.94	20.89	0.200981	8.85E-14	sidoflexin 123 [Schistosoma mansoni]	2e-60
Contig_Plenarian_90e_1412	CATGTACACACCACTCTATTGG	19.88	0	0.9.94E-7	0.0021,31.42	8.35	0.19606	NA	predicted protein [Nematostella vectensis]	6e-09
Contig_Plenarian_90e_8590	CATGTACACACCACTCTATTGG	19.88	0	0.9.94E-7	0.0021,31.42	8.35	0.19606	NA	predicted protein [Nematostella vectensis]	6e-09
Contig_Plenarian_90e_28814	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67
Contig_Plenarian_90e_14761	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67
FAAIXP02H7VPY	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67
Contig_Plenarian_90e_4939	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67
FAAIXP02HN46K	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67
Contig_Plenarian_90e_3268	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67
Contig_Plenarian_90e_27253	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67
Contig_Plenarian_90e_3155	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67
Contig_Plenarian_90e_9948	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67
gnlUGISne#F38594177	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67
Contig_Plenarian_90e_4087	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67
FAAIXP02HY8L6_1	CATGTGTGGTGAATTCGATCGC	24.2	5	0.266612	0.000221,34.65	7.94	0.229149	1.65E-5	serine-threonine protein kinase [Entamoeba dispar SAW760]	2e-67

Supplementary Table 2. Identification of sequences up- and downregulated after Smed-egfr-3(RNAi). Sequence IDs corresponding to the Smed454_90e dataset contigs up- and downregulated according to our DGE analysis, showing normalized expression values and the corresponding annotation. Expression values correspond to the mapping tag closest to the 3' end. Tag rank refers to the position of that tag relative to the 3' end of the sequence with respect to the total Nlalll sites.

Discussió

1.- Regulació del procés de la regeneració en la planària *S. mediterranea*

Des de la incorporació de les planàries en l'estudi del fenomen de la regeneració, múltiples treballs han demostrat la gran capacitat que presenten aquests platihelminths per restablir les proporcions i restaurar els teixits danyats després d'una amputació.

Tenim al nostre abast un ampli coneixement sobre diverses rutes de senyalització que controlen l'estricta procés de la regeneració en les planàries: rigorosos estudis han demostrat que, per exemple, la via *Wnt/β-catenin* juga un paper crucial durant l'establiment de la polaritat per definir si s'ha de formar exactament un cap o una cua després d'una amputació (Gurley i altres, 2008; Iglesias i altres, 2008; Petersen i Reddien, 2008). D'altra banda, avui dia encara es desconeix la funció d'algunes de les vies principals de senyalització i queden molts elements desconeguts per entendre el fenomen de la regeneració en la seva totalitat. Durant el procés de la regeneració es donen quatre processos clau: el tancament de la ferida, la formació del blastema, la diferenciació i determinació dels teixits i el restabliment de la polaritat. En aquesta tesi doctoral, gràcies a l'estudi funcional de la via dels EGFR, hem pogut analitzar en més detall aquests esdeveniments principals i estudiar la implicació d'aquesta via sobretot durant la formació del blastema i la regulació del creixement i la diferenciació de les noves estructures anteriors.

2.- La conservació de la via dels EGFR a *S. mediterranea*

Malgrat no poder identificar representants de tots els elements principals de la via dels EGFR mitjançant cerques *tblastn* en el genoma de la planària *S. mediterranea*, en el nostre laboratori hem pogut aïllar tres *contigs* que codifiquen per diferents EGFR (Fraguas i altres, 2011) i, posteriorment, s'ha identificat un més en altres grups (Rink i altres, 2011). La família dels EGFR consta d'un conjunt divers de receptors tirosina quinasa (TK), distribuïts en tot el regne animal, però aquest elevat nombre de gens EGFR en les planàries representa una expansió inusual d'aquesta família, si ho comparem amb l'únic receptor EGFR que presenten la resta d'invertebrats (Stein i Staros, 2006). Cal remarcar, però, que la presència d'un nombre elevat de gens,

Discussió

comparat amb el nombre reduït en altres invertebrats, no és una característica excepcional d'aquesta família gènica, sinó un fenomen que es dona sovint en les planàries, tal i com succeeix per la família dels *Wnt* (Almuedo-Castillo i altres, 2012) o dels *noggin* (Molina i altres, 2009).

Analitzant les seqüències dels quatre EGFR identificats, anomenats *Smed-egfr-1*, *2* i *3* (Fraguas i altres, 2011) i *Smed-egfr-5* (Rink i altres, 2011), tots contenen un domini TK intracel·lular, poc divergent comparat amb la resta de dominis TK de la família dels EGFR descrits en altres invertebrats (Figura 39). Gràcies a anàlisis filogenètics de la superfamília dels receptors TK, hem pogut confirmar que els gens identificats a *S. mediterranea* formen part de la família EGFR, i no d'una altra classe de TK. Addicionalment, hem observat que els tres *Smed-egfr* presenten altres trets característics de la família dels EGFR: un domini transmembrana i un extracel·lular (amb un domini ric en cisteïna i dominis que funcionalment permeten la unió amb el lligand respectiu).

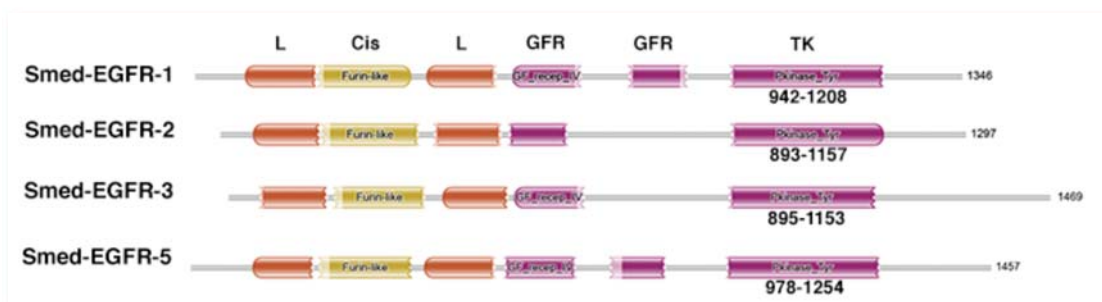


Figura 39. Estructura dels receptors Smed-EGFR en la planària *Schmidtea mediterranea*. Domini L: inclou la regió d'unió al lligand i tots els Smed-EGFR en presenten dos. Domini "Furin-like": inclou una regió rica en cisteïna. Domini GFR és el domini "Growth Factor Receptor" extracel·lular, que interacciona amb el domini "Furin-like" per regular la unió del lligand al domini L. Domini TK, presenta l'activitat enzimàtica tirosina quinasa.

Durant aquesta tesi ens hem centrat exclusivament en l'anàlisi funcional dels EGFR, concretament en la caracterització detallada d'un d'aquests, el *Smed-egfr-3*. A l'inici d'aquesta investigació va resultar impossible identificar homòlegs dels lligands EGF, mitjançant les bases de dades transcriptòmiques disponibles aleshores de *S. mediterranea*. Tot i així, estudis recents en el nostre laboratori (resultats no publicats de Sara Barberán) i en altres grups (Wenemoser i altres, 2012) han sigut capaços d'identificar, finalment, possibles lligands EGF, com *Smed-epiregulin-1* (Wenemoser i altres, 2012) i *Smed-epiregulin-2* (resultats no publicats de Sara Barberán), que s'expressen

principalment en el sistema digestiu. Tot i això, es desconeix la funció d'aquests lligands, i seria interessant caracteritzar-la en un futur. D'altra banda, durant aquesta tesi doctoral també hem identificat i caracteritzat funcionalment un altre element de la via dels EGFR a *S. mediterranea*, les proteases transmembrana *rhomboids*. Els *rhomboids* s'encarreguen d'alliberar els lligands EGF per induir la seva activació en múltiples organismes (Urban i Dickey, 2011). En el cas de *S. mediterranea*, els cinc rhomboids *Smed-rho 1*, *2*, *3*, *4* i *5* identificats presenten patrons d'expressió variables i sembla que *Smed-rho 1* i *2* i *Smed-rho 3* i *4* actuïn sinèrgicament per tal de regular alguns processos de la regeneració, tant anteriorment com posterior (veure annex 1 per una descripció detallada dels resultats obtinguts sobre els *Smed-rho*).

3. La diversitat funcional dels *Smed-egfr*

Com ja hem comentat a la introducció de la tesi, la via de senyalització dels EGFR regula diferents processos biològics i està implicada en múltiples funcions cel·lulars en altres organismes (Citri i Yarden, 2006). Amb l'objectiu d'indagar què succeeix en el cas de les planàries, hem analitzat el patró d'expressió dels diferents *Smed-egfrs* identificats en aquests platihelminths, detectant una distribució variable entre ells que podria justificar la seva possible implicació en una àmplia varietat de processos biològics durant la regeneració. El silenciament individualitzat de cada un dels gens *Smed-egfr* desencadena múltiples fenotips, afectant diferents tipus cel·lulars, depenent del cas (Fraguas i altres, 2011).

En primer lloc, *Smed-egfr-1* s'expressa en cèl·lules diferenciades, principalment en el sistema digestiu, al parènquima i a la faringe, i més dèbilment a la boca i a les cèl·lules pigmentàries dels ulls. *Smed-egfr-1* és essencial per la correcta regeneració de l'ull, perquè el seu silenciament redueix significativament el nombre de cèl·lules pigmentàries, sense afectar el nombre de les fotoreceptores, però sí la seva organització general. Aquest resultat demostra que la distribució de les cèl·lules fotoreceptores es pot trobar afectada si les cèl·lules pigmentàries no es diferencien correctament, coincidint amb estudis anteriors, on s'ha observat que el silenciament del gen

menashi causa alteracions evidents en la construcció de l'ull de les planàries després d'una amputació en presentar defectes en el desenvolupament de les cèl·lules pigmentàries (Sato i altres, 2005).

En general, aquest fenotip demostra la implicació de la via dels EGFR durant la diferenciació de certes estructures, en aquest cas concret de l'ull, com s'ha demostrat també en altres organismes, per exemple *Drosophila* (Freeman, 1997; Nagaraj i Banerjee, 2007). D'altra banda, *Smed-egfr-1* és necessari per a una correcta morfogènesi de la faringe en condicions normals, ja que en animals *Smed-egfr-1(ARNi)* regenerants s'observa la formació de faringes més petites amb lúmens reduïts. Aquests defectes podrien ser a conseqüència d'una desregulació en l'adhesió cel·lular. En altres organismes, inclosos alguns vertebrats, s'ha demostrat que la via EGFR està associada al complex caderina-catenina (CCC), que connecta la membrana al citoesquelet d'actina per tal de modular l'adhesió cel·lular i intervenir en processos com la migració o la invaginació cel·lular (Dumstrei i altres, 2002; Hazan i Norton, 1998). Per exemple, en el cas de *Drosophila*, s'ha vist que la via EGFR té un rol essencial durant la formació dels túbuls traqueals, organitzant la invaginació cel·lular (Brodu i Casanova, 2006).

A més a més, *Smed-egfr-1* juga un paper important durant la homeòstasi, ja que el seu silenciament desencadena una clara hiperproliferació en animals intactes (excepte en les regions excloses de neoblasts) associada a la formació d'uns bonys a la regió dorsal, a l'alçada de la faringe. Aquest resultat suggereix una possible funció de la via dels EGFR durant la regulació de la proliferació cel·lular de les planàries, com s'ha demostrat en altres organismes (Gómez i altres, 2013; Wang i altres, 2014).

En segon lloc, *Smed-egfr-2* s'expressa també en el sistema digestiu, però el seu silenciament no desencadena cap fenotip aparent i, al contrari del que succeeix després de silenciar *Smed-egfr-1*, la proliferació cel·lular dels animals *Smed-egfr-2(ARNi)* intactes no mostra cap diferència significativa comparada amb la que presenten els controls. Per aquest motiu, l'estudi d'aquest gen no ha sigut gaire exhaustiu (Fraguas i altres, 2011).

La variabilitat funcional dels EGFR en les planàries augmenta si tenim en

compte el *Smed-egfr-5*, identificat posteriorment i caracteritzat en un altre grup (Taula 4, Rink i altres, 2011). Aquest *Smed-egfr* s'expressa exclusivament en les cèl·lules flamígeres i juga un paper important durant el manteniment del sistema excretor i la diferenciació dels protonefridis (Rink i altres, 2011).

Malgrat que els diferents *Smed-egfr* identificats a planàries presenten una similitud compartida entre les seves seqüències (Figura 39), mostren patrons d'expressió molt diversos entre ells (Taula 4). Cal remarcar, però, que *Smed-egfr-3* és l'únic *egfr* identificat en *S. mediterranea* que s'expressa tant en cèl·lules diferenciades com en neoblasts, com explicarem en més detall en el següent apartat. Tal i com hem comentat en la introducció, estudis anteriors van postular un model on determinats neurotransmissors, neuropèptids i factors de creixement podrien estar actuant com a factors estimuladors de la proliferació i/o diferenciació dels neoblasts (Baguñà i altres, 1989b). Així doncs, la presència de *Smed-egfr-3* en les cèl·lules mare podria corroborar aquest model on la seva funció implicaria activar algun d'aquests elements encarregats de regular la biologia dels neoblasts, com discutirem a continuació.

gen	Patró expressió	Funció	Referència
<i>egfr-1</i>	sistema digestiu, parènquima, faringe, boca, cèl·lules pigmentàries dels ulls	diferenciació cèl·lules pigmentàries de l'ull, morfogènesi de la faringe, regulació de la proliferació en homeòstasi	Fraguas i altres, 2011
<i>egfr-2</i>	sistema digestiu	cap fenotip aparent	Fraguas i altres, 2011
<i>egfr-3</i>	faringe, marge del cap, sistema nerviós, neoblasts	creixement del blastema, diferenciació cèl·lules neuronals	Fraguas i altres, 2011
<i>egfr-5</i>	cèl·lules flamígeres	manteniment i regeneració del sistema excretor	Rink i altres, 2011

Taula 4. Resum dels diferents *egfr* identificats a *S. mediterranea*.

4. Estudi funcional de *Smed-egfr-3* durant la regeneració

Mitjançant hibridacions *in situ* sabem que el gen que codifica per *Smed-egfr-3* s'expressa a la faringe, al marge del cap, en el sistema nerviós i en el parènquima, exactament al voltant de les branques del sistema digestiu. Aquesta expressió al voltant de l'intestí disminueix totalment a partir de les 12 hores després de la irradiació, suggerint que aquest gen s'expressa en els

Discussió

neoblasts (Figura 40A). A més a més, mitjançant dobles hibridacions *in situ* fluorescents de *Smed-egfr-3* i un marcador específic de neoblasts (*Smedwi-2*) detectem una clara coexpressió d'aquests dos gens en el parènquima (Figura 40); en el cervell, però, només detectem senyal de *Smed-egfr-3*. Recentment, s'ha demostrat que els neoblasts constitueixen una població molecularment heterogènia (Eisenhoffer i altres, 2008; Wagner i altres, 2011). Per tant, els nostres resultats podrien indicar que determinades cèl·lules amb capacitat mitòtica presenten el receptor *Smed-egfr-3*, el qual pot estar regulant l'activació proliferativa d'aquestes cèl·lules mare, com s'ha postulat en models anteriors de la via dels EGFR en planàries (Baguñà i altres, 1989b). Tot i així, noves tècniques són necessàries per definir exactament quina subpoblació dels neoblasts expressa *Smed-egfr-3*.

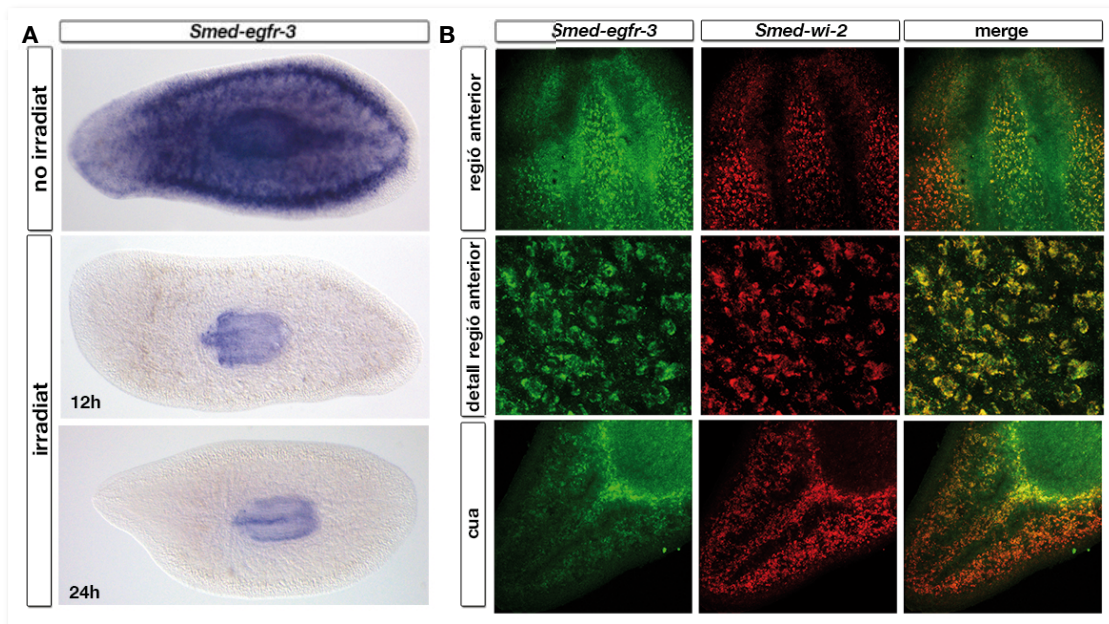


Figura 40. Patró d'expressió del gen *Smed-egfr-3*. A) *Smed-egfr-3* s'expressa a la faringe, al marge del cap, en el sistema nerviós i en els neoblasts, ja que la seva expressió disminueix considerablement transcorregudes 12 hores després del tractament d'irradiació en animals intactes. B) Dobles hibridacions *in situ* fluorescents de *Smed-egfr-3* i *Smedwi-2* demostren que una subpoblació dels neoblasts coexpressa amb el gen *Smed-egfr-3*, tant anteriorment com posterior.

Dins de la família dels EGFR identificats a *S. mediterranea*, podem afirmar a partir d'aquests resultats que *Smed-egfr-3* presenta la característica exclusiva d'expressar-se simultàniament tant en neoblasts com en cèl·lules diferenciades i de ser l'únic *egfr* expressat en el sistema nerviós. Tot i així, no

és la primera vegada que s'associen els EGFR amb les cèl·lules neuronals si tenim en compte, tal i com hem comentat en la introducció, que en alguns vertebrats (Wagner i altres, 2006) o, fins i tot, en altres platihelminths s'ha observat també una forta localització dels receptors EGFR en el sistema nerviós, com en el cas de *Microstomum lineare*, mitjançant experiments indirectes d'immunotincions d'anticossos de vertebrats (Reuter i Kuusisto, 1992). A més a més, cal destacar que en vertebrats s'ha demostrat que els EGFR es localitzen en les cèl·lules mare (neuronals), on indueixen la renovació i l'expansió de les cèl·lules precursors (Weiss i altres, 1996).

Comparada amb la de la resta d'*egfr*, la dinàmica d'expressió del gen *Smed-egfr-3* al llarg de la regeneració mostra diferències evidents: a partir del primer dia després de l'amputació, *Smed-egfr-1* i *2* s'expressen tant en el blastema anterior com en el posterior, però dèbilment, mentre que *Smed-egfr-3* mostra una elevada activació en aquestes regions properes a la ferida, durant la formació d'ambdós blastemes, que va minvant al llarg de la regeneració i acaba uniformement distribuïda en el parènquima i menys accentuada en el nou cervell. Aquesta fase inicial únicament de l'expressió de *Smed-egfr-3* concentrada en els blastemes presenta l'oportunitat de definir un paper important d'aquest receptor durant els estadis primerencs de la regeneració, imprescindible per regular la correcta diferenciació dels nous teixits, tant en els blastemes anteriors com en els posteriors.

El silenciament de *Smed-egfr-3* no implica cap defecte durant la homeòstasi. Davant l'absència de qualsevol tipus de ferida, els animals intactes *Smed-egfr-3(ARNi)* mantenen una correcta dinàmica dels neoblasts i una normal expressió de les diferents poblacions cel·lulars analitzades, entre elles diferents poblacions neuronals (Fraguas i altres, 2011). No obstant, no podem dir el mateix de la resta de *Smed-egfr* caracteritzats a planàries, ja que després del silenciament de *Smed-egfr-1*, els animals tractats no regenerants presenten una evident hiperproliferació, acompanyada de la formació d'uns bonys dorsals (Fraguas i altres, 2011). En el cas de *Smed-egfr-5*, la seva inhibició desencadena la formació d'edemes a conseqüència d'una clara disminució de les cèl·lules flamígeres en animals regenerants, però també en

intactes (Rink i altres, 2011).

A partir dels resultats obtinguts podem pensar que la clara diversitat fenotípica obtinguda pels diferents *Smed-egfr* després del seu silenciament es deu al fet que aquests receptors s'expressen en cèl·lules diferents i que, malgrat que comparteixen una mateixa estructura, és probable que cada un d'ells presenti alguna particularitat en els seus dominis més o menys específica que resulti essencial, com per exemple que cada receptor sigui més selectiu a l'hora d'activar vies de senyalització "downstream" o, fins i tot, s'uneixi a un lligand diferent. Tot i que no podem conèixer quina unió específica lligand-receptor activa la fosforilació de cada un dels EGFR en les planàries, podem afirmar com a mínim que els receptors *Smed-egfr-1*, *2* i *3* no actuen de forma sinèrgica, ja que experiments ARNi combinats entre els diferents receptors no generen fenotips addicionals als observats en els experiments individualitzats. A més a més, el silenciament de *Smed-egfr-3* no fa variar l'expressió endògena de *Smed-egfr-1* i viceversa (Fraguas i altres, 2011). Tenint en compte que l'activació de la via dels EGFR pot tenir lloc a través de la dimerització de dos receptors iguals (homodímers) o dos diferents (heterodímers) depenent del cas, aquests resultats ens permeten especular que l'activació de la via en les planàries es dona principalment mitjançant la formació d'homodímers, descartant probablement la unió de dos receptors EGFR diferents. Fins i tot en el cas de *Smed-egfr-1* i *2* que podríem pensar que actuen conjuntament al veure que ambdós receptors s'expressen en el sistema digestiu, descartaríem la formació de l'heterodímer *Smed-egfr-1/2*, al comprovar que el silenciament de *Smed-egfr-2* no resulta en cap fenotip ni el silenciament simultani *Smed-egfr1/2* implica una accentuació del fenotip observat a l'inhibir *Smed-egfr-1*. Aquest fet coincidiria amb el que succeeix en altres invertebrats, com *Drosophila* o *C. elegans*, on únicament es formen homodímers al presentar exclusivament un receptor (Stein i Staros 2006).

4.1.- Regulació del creixement del blastema a través de *Smed-egfr-3*

Després del silenciament del gen *Smed-egfr-3*, observem que els organismes tractats són incapaços d'induir un creixement normal del blastema

i regenerar correctament després d'una amputació, tant anteriorment (els troncs regenerants no són capaços de regenerar un cap de nou) com posterior (els caps regenerants diferencien uns cordons nerviosos imperfectes) (Fraguas i altres, 2011).

Sabem que en condicions normals existeix un equilibri coordinat entre l'apoptosi i les cèl·lules mare en divisió que permet el remodelatge dels teixits preexistents i una correcta regeneració de les planàries després d'una amputació (González-Estévez, 2009). Això ens porta a pensar que la formació d'aquests blastemes tan petits, o fins i tot en alguns casos absents, podria ser a conseqüència d'una desregulació d'aquest equilibri. Per aquest motiu vam creure imprescindible analitzar la mort cel·lular i la proliferació dels neoblasts després d'inhibir *Smed-egfr-3* en comparació amb els nivells que presenten els animals control.

En primer lloc, gràcies al marcatge de les cèl·lules apoptòtiques mitjançant TUNEL hem pogut analitzar la mort cel·lular d'aquests organismes (Fraguas i altres, 2011). En condicions normals es dona un pic apoptòtic localitzat en la regió propera a la ferida transcorregudes quatre hores després d'una amputació i que passats tres dies es dona un segon pic però, en aquest cas, sistèmic per tot el cos de forma uniforme (Pellettieri i altres, 2010). El silenciament del gen *Smed-egfr-3* induïx la formació d'uns blastemes reduïts i podríem pensar que és a conseqüència d'un increment en la mort cel·lular, però experiments de TUNEL descarten aquesta possibilitat ja que l'apoptosi no augmenta ni a quatre hores ni a tres dies després de l'amputació, sinó tot el contrari, sembla que disminueixi sobretot passats tres dies (Fraguas i altres, 2011). Malgrat que aquesta disminució no és estadísticament significativa, si que sembla que aquests organismes *Smed-egfr-3(ARNi)* presentin una tendència a disminuir la mort cel·lular. Aquesta disminució podria estar relacionada amb la manca del creixement del blastema, ja que en altres sistemes s'ha vist que l'apoptosi es necessària per una correcta regeneració durant els estadis inicials (Bergmann i Steller, 2010). Per exemple, a *Hydra*, la regeneració del cap després d'una amputació requereix l'activitat de la

caspasa, per induir l'apoptosi i que les cèl·lules apoptòtiques alliberin Wnt3 per induir la "proliferació compensatòria" (Galliot, 2013). En el cas de *Drosophila*, les cèl·lules apoptòtiques expressen els factors secretors *wingless* i *decapentaplegic* i s'encarreguen d'activar cascades de senyalització per una correcta "proliferació compensatòria" (Ryoo i altres, 2004). A *Xenopus*, l'activitat de la caspasa durant les primeres 24 hores després d'una amputació és indispensable per la regeneració de la cua, de manera que la inhibició de determinades caspases bloquegen la proliferació i la regeneració (Tseng i altres, 2007). En els amfibis, l'amputació també indueix l'activitat de la caspasa. En el cas dels ratolins, el tancament de la ferida i la regeneració del fetge també necessita l'activitat de les caspases; s'ha vist que la manca de les caspasa-3 i 7 impedeix la inducció dels processos regeneratius (Li i altres, 2010). En resum, en aquests sistemes sembla que l'apoptosi reguli en certa manera la proliferació per una correcta regeneració. Tot i que en el cas de les planàries encara no hi ha cap dada evident que mostri que l'apoptosi és necessària per a la seva regeneració, vam voler analitzar la proliferació en els organismes *Smed-egfr-3(ARNi)* per si es donava una situació semblant (malgrat que la lleugera disminució en l'apoptosi observada després de silenciar *Smed-egfr-3* no sembla ser significativa).

De fet, si considerem que *Smed-egfr-3* s'expressa en els neoblasts, seria probable pensar *a priori* que els defectes observats en inhibir aquest gen potser són conseqüència d'una desregulació en la dinàmica d'aquestes cèl·lules amb capacitat proliferativa. Sabem per estudis previs que el silenciament de desenes de gens indueix el desajustament dels neoblasts, donant-se en la majoria dels casos una disminució del seu nombre total o una eradicació de la seva proliferació. Tot i així, hem de tenir en compte que l'efecte del silenciament d'aquests gens poden alterar les propietats dels neoblasts de múltiples maneres (Taula 5).

En primer lloc, es pot abolir l'autorenovació dels neoblasts després del silenciament de determinats gens, reduint el nombre total de cèl·lules mare, com succeeix en inhibir *Smed-bruli-1* (Guo i altres, 2006). En el nostre cas, malgrat la incapacitat de créixer que presenten aquests blastemes, ni el

nombre de neoblasts es veu afectat, en presentar una normal expressió del marcador específic de neoblasts *Smedwi-2*, tant en animals regenerants control com *Smed-egfr-3(ARNi)*, ni la proliferació cel·lular d'aquestes cèl·lules mare a la regió pròxima de la ferida mostra cap diferència significativa, en observar un nombre de cèl·lules anti-PH3 positives igual que el dels controls (Fraguas i altres, 2011).

En segon lloc, el silenciament de determinats gens pot afectar la distribució espacial dels neoblasts. Sabem que en condicions normals una amputació indueix la divisió dels neoblasts (Saló i Baguñà, 1984) i la seva migració cap a la regió de la ferida (Dubois, 1947; Eisenhoffer i altres, 2008; Newmark i Sánchez Alvarado, 2000), on s'acumulen i formaran el blastema. Aquest teixit anirà creixent passats els dies després d'una amputació gràcies a l'entrada de neoblasts post-mitòtics que responen als senyals que indueixen la diferenciació, amb l'objectiu de formar els teixits que manquen (Saló i Baguñà, 1984; Reddien i Sánchez Alvarado, 2004; Wenemoser i Reddien, 2010) (veure apartat 2.4.3 de la introducció).

Ara bé, els animals *Smed-egfr-3(ARNi)* presenten certes aberracions en comparació amb els controls: s'observen cèl·lules mitòtiques a l'interior del blastema passats tres dies després de l'amputació (Fraguas i altres, 2011), indicant que la dinàmica d'aquestes cèl·lules mare pateix alguna desregulació. Estudis previs ja han demostrat fenotips que mostren neoblasts ectòpics a l'interior del blastema, per exemple en silenciar *Smed-smg-1*, un gen homòleg de PIKK (acrònim de "phosphoinositide 3-kinase-related kinase"). La inhibició d'aquest gen impedeix que els neoblasts restringeixin la seva proliferació a la regió pròxima a la ferida, es troben cèl·lules en mitosi a l'interior del blastema i aquest no pot créixer correctament (González-Estévez i altres, 2012).

Recentment, també s'ha demostrat a la planària *Dugesia japonica* que la via de senyalització ERK ("extracellular signal-related kinase") controla la diferenciació de les cèl·lules del blastema (Tasaki i altres, 2011), després d'observar que inhibint ERK s'obté un fenotip semblant al que s'observa en silenciar *Smed-egfr-3* amb neoblasts ectòpics en el blastema, com discutirem més endavant.

La presència anormal de neoblasts en els blastemes després de silenciar *Smed-egfr-3* suggereix un possible problema durant la diferenciació dels nous teixits. Un factor crucial per mantenir fermament l'estadi entre les cèl·lules mare i les diferenciades és una correcta regulació de la diferenciació de la descendència post-mitòtica dels neoblasts. Gràcies al descobriment de diferents marcadors específics d'aquesta descendència dels neoblasts, definim diferents categories de gens (categoria 1: neoblasts en divisió, categoria 2: descendència post-mitòtica primerenca, categoria 3: descendència post-mitòtica tardana; Eisenhoffer i altres, 2008) i sabem que la inhibició de determinats gens pertorba específicament l'estadi de transició dels neoblasts, moment en que deixen de dividir-se per passar a un estat determinat i diferenciar-se en els diferents tipus cel·lulars. Un bon exemple d'aquest fenotip és el que succeeix en silenciar el repressor de tumors *Smed-p53*, que implica l'acumulació de neoblasts mitòtics perquè és impossible la transició entre l'expressió del gens de Categoria 1 i 2 (Pearson i Sánchez Alvarado, 2010). Un altre exemple clar és el que succeeix en inhibir *Smed-CHD4* (Scimone i altres, 2010). Després de silenciar aquest gen, la descendència primerenca dels neoblasts no es veu afectada (nombre de cèl·lules que expressen *Smed-NB21.11.e* normal) però en canvi s'observa una reducció important de la descendència tardana (disminució del nombre de cèl·lules que expressen *Smed-AGAT-1*).

En el nostre cas hem caracteritzat la descendència dels neoblasts a diferents estadis de la diferenciació després d'inhibir *Smed-egfr-3*. Malgrat que els animals *Smed-egfr-3(ARNi)* són incapaços de formar blastemes de dimensions ordinàries i no poden regenerar pròpiament les noves estructures, s'observa una distribució normal dels marcadors específics de la descendència post-mitòtica primerenca dels neoblasts (*Smed-NB21.11.e*) i tardana (*Smed-AGAT-1*) (Fraguas i altres, 2011).

Per tant, aquests resultats semblen indicar que en un escenari *Smed-egfr-3(ARNi)* l'entrada dels neoblasts a diferenciar-se és possible però la diferenciació terminal per alguns tipus cel·lulars es veurà afectada, com analitzem en més detall en el següent apartat.

	Nombre cèl·lules mare			Nombre de cèl·lules en proliferació (PH3)				Diferenciació (Descendència post-mitòtica dels neoblasts			
	Normal	Disminuït	Augmentat	Normal	Disminuït	Augmentat	Ectòpic	Normal	Disminueix nombre descendència primerenca i/o tardana	Distribució ectòpica descendència primerenca i/o tardana	Augmenta nombre descendència primerenca i/o tardana
<i>Smed-ago-2</i>		X			X			X			
<i>Smed-bruli</i>		X			X						
<i>Smed-CHD4</i>			X		X				X		
<i>Smed-cip29</i>		X									
<i>Smed-eed-1</i>		X									
<i>Smed-egfr-1</i>			X			X				X	
<i>Smed-egfr-3</i>	X			X			X	X			
<i>Smed-ezh</i>		X									
<i>Smed-H2B</i>		X			X						X
<i>Smed-ilp-1</i>	X				X						
<i>Smed-innexin-11</i>		X			X						
<i>Smed-inr-1</i>	X				X						
<i>Smed-lis-1</i>		X				X					
<i>Smed-nudC</i>	X										
<i>Smed-nudE</i>		X				X					
<i>Smed-p53</i>			X			X			X		
<i>Smed-piwi-2</i>			X	X (regene rate)		X (intact)					
<i>Smed-piwi-3</i>		X									
<i>Smed-PrkC</i>											
<i>Smed-PRMT5</i>		X									
<i>Smed-PTEN-1/PTEN-2</i>			X			X					
<i>Smed-raptor</i>	X ^{35,41}	X ⁴⁰			X ^{35,40}				X		
<i>Smed-RbAP48</i>	X				X						
<i>Smed-SmB</i>		X (regenera te)	X (intact)								
<i>Smed-smg-1</i>	X (intact)		X (regenerate)		X	X (regenerate & intact)	X			X	X
<i>Smed-soxP-1</i>		X							x		
<i>Smed-sz12-1</i>		X									
<i>Smed-TOR</i>	X ^{35,41}	X ⁴⁰		X (intact ⁴¹) (fed ⁴⁰)	X (regenera tes ^{35,40,41}) (intact ⁴⁰)			X ^{35,41}	X?		
<i>Smed-vasa-1</i>		X							X?		
<i>Smed-zfp-1</i>		X							X?		

Taula 5. Efecte del silenciament de diferents gens implicats en la regulació de la biologia dels neoblasts (adaptat de Elliott i Sánchez Alvarado, 2012).

4.2.- L'activació de la diferenciació gràcies al receptor *Smed-egfr-3*

Transcorreguts cinc dies després de l'amputació (temps suficient si volem estudiar els possibles defectes dels nous teixits, tenint en compte que els primers signes de diferenciació s'observen a 2-3 dies després d'una amputació), els animals *Smed-egfr-3*(ARNi) presenten cervells molt més petits i, en la majoria de casos, fusionats en la línia mitja, comparats amb els que regeneren els organismes control, tal i com s'observa amb la immunotinció de l'anticòs contra la sinapsina (anti-SYNORF-1) o amb hibridacions *in situ* de gens específics de poblacions neuronals, com per exemple *Smed-gpas*, que s'expressa en les branques laterals del cervell. A més a més, el nombre de determinades subpoblacions neuronals es veu extremadament reduït, com per

exemple les neurones dopaminèrgiques (a través del marcador *Smed-th*). No obstant, altres tipus cel·lulars com les cèl·lules secretores marginals del cap o les epidèrmiques semblen diferenciar-se correctament. Per tant, els defectes que es produeixen durant la diferenciació semblen ser exclusius d'alguns llinatges cel·lulars i en el nostre cas el llinatge més afectat sembla ser majoritàriament el neuronal (Fraguas i altres, 2011). Aquests resultats estarien d'acord amb la funció dels EGFR en altres models durant la neurogènesi. Per exemple, en mamífers, concretament en ratolins, s'ha vist que els EGFR tenen un paper important durant la mielinització (Aguirre i altres, 2007) o durant l'estimulació de la proliferació i migració de les cèl·lules progenitores SVZ ("subventricular zone"), que es diferencien en nous oligodendròcits (González-Pérez i altres, 2009).

En resum, a partir dels nostres resultats suggerim que després d'inhibir *Smed-egfr-3* els animals són capaços d'induir la proliferació dels neoblasts i la seva migració cap a la regió del post-blastema, però un cop en el blastema, els neoblasts no són capaços de respondre a determinats senyals de diferenciació i, per tant, continuen dividint-se. Així doncs, presentem un model on se suggereix que els neoblasts requereixen la presència de determinats senyals que activen la sortida del seu estadi proliferatiu, per tal d'iniciar la diferenciació i que aquests senyals inductors poden estar regulats per determinats factors, sent *Smed-egfr-3* un d'ells (Figura 41).

Ara bé, el model que suggerim deixa obertes múltiples qüestions respecte la funció de la via dels EGFR en la biologia de les planàries i les seves cèl·lules mare en general. Per exemple, si els neoblasts són capaços de continuar dividint-se en el blastema després d'inhibir *Smed-egfr-3*, com és possible que aquest teixit freni el seu creixement? quantes divisions extra poden presentar els neoblasts després de silenciar *Smed-egfr-3*? En cas que s'indueixin aquests senyals a través de *Smed-egfr-3* per permetre la diferenciació dels neoblasts i aturar la seva divisió en el blastema, d'on venen? Quins senyals són? Són específics de la via dels EGFR? I en cas que estiguin regulats per aquesta via, quines cascades de senyalització s'activen "downstream"?

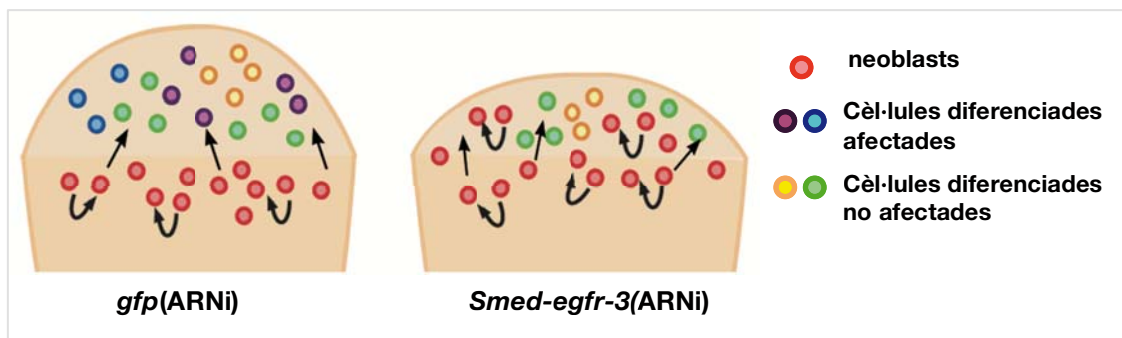


Figura 41. Model hipotètic sobre la regulació de la diferenciació dels neoblasts a partir de *Smed-egfr-3*. A) En condicions normals, després d'una amputació, els neoblasts proliferen i migren cap al blastema per diferenciar-se i formar els nous teixits. B) La inhibició de *Smed-egfr-3* altera la biologia dels neoblasts. En alguns casos, els neoblasts no són capaços d'aturar la seva divisió (continuen proliferant a l'interior del blastema) i no respondrien els senyals que indueixen la diferenciació de determinats llinatges cel·lulars.

Els nostres estudis funcionals de *Smed-egfr-1* també suggereixen una funció de la via dels EGFR durant la diferenciació, concretament de les cèl·lules pigmentàries dels ulls (Fraguas i altres, 2011), i en el cas de *Smed-egfr-5* de les cèl·lules flamígeres, necessàries per una correcta regeneració del sistema excretor (Rink i altres, 2011). Aquests resultats mantenen una concordança amb la funció que presenta la via dels EGFR durant la diferenciació cel·lular en altres sistemes (Jones i altres, 2009; Lejard i altres, 2011).

Algunes d'aquestes qüestions formulades que queden obertes es poden intentar de resoldre mitjançant l'anàlisi funcional de l'*egr-4*, identificat a partir de la utilització de tecnologies de seqüenciació massiva que tenim al nostre abast, com un possible gen diana regulat "downstream" per la via dels EGFR,

4.3.- Quines vies de senyalització regulades a partir de *Smed-egfr-3* estan implicades en l'estadi inicial de la diferenciació?

Avui dia, diverses tecnologies de seqüenciació massiva ens permeten comparar el transcriptoma dels animals on s'ha silenciat un gen d'interès (en el nostre cas, *Smed-egfr-3*) amb el dels controls. Hem utilitzat una d'aquestes eines, el DGE ("Digital Gene Expression"), per poder conèixer i quantificar l'expressió de possibles gens diana regulats (tant "up" com "down-regulated") per la via dels EGFR, mitjançant la quantificació dels ARNm presents en un

determinat moment (Velculescu i altres, 1995). Exactament, hem analitzat dos punts específics després de silenciar el nostre gen d'interès per motius concrets: “un dia post-amputació”, perquè en condicions normals s’observa un fort augment del nivell d’expressió de *Smed-egfr-3* en els blastemes (Fraguas i altres, 2011), i el segon punt seleccionat ha estat “tres dies post-amputació”, considerant que el silenciament del nostre gen està causant defectes clars durant la diferenciació i que en condicions normals, passats 2-3 dies després d’una ferida, s’inicia la diferenciació dels teixits que cal regenerar, especialment els ganglis cefàlics, que veiem afectats després de silenciar *Smed-egfr-3*. A més a més, ens hem centrat exclusivament en comparar els transcriptomes d’animals regenerants control i *Smed-egfr-3(ARNi)*, ja que el silenciament d’aquest gen no afecta la homeòstasi, com ja hem citat anteriorment

Analitzant les quatre llibreries transcriptòmiques: C1 (animals control 1 dia post-amputació), R1 (animals *Smed-egfr-3(ARNi)* 1 dia post-amputació), C3 (animals control 3 dies post-amputació) i R3 (animals *Smed-egfr-3(ARNi)* 3 dies post-amputació) obtingudes a partir dels resultats del DGE, centenars de candidats han aparegut com a possibles gens diana regulats pel receptor *Smed-egfr-3* en les planàries (Fraguas i altres, 2014). Coincidint amb la informació que tenim d’altres organismes, s’han identificat diversos membres de les principals vies de senyalització regulades per la via dels EGFR, com són la via de les MAPK, PI3k/Akt, PLC γ i JAK/ STAT (Scaltriti i Baselga, 2006; Silva, 2004; Ono i Kuwano, 2006).

Davant l’immens nombre de candidats obtinguts a partir de les llibreries del DGE, hem seleccionat un conjunt de gens per analitzar i, únicament, caracteritzar la funció d’aquells que presenten un patró d’expressió que recorda a *Smed-egfr-3* o que podrien tenir una relació amb el fenotip obtingut en silenciar aquest gen, a partir del que coneixem sobre les seves funcions en altres sistemes. De manera que ens hem centrat en gens que poden estar relacionats amb processos com la neurogènesi, la proliferació cel·lular i la diferenciació, el càncer i la tumorigènesi, l’apoptosi i la supervivència cel·lular i la inflamació i resposta immune. Hem identificat diversos gens, com ara

Smed-NSA2, *Smed-aristaless* o *Smed-cgi-99*, amb un fenotip evident després del seu silenciament. El gen *Smed-NSA2* s'expressa en els neoblasts i sembla necessari per una correcta regeneració. *Smed-cgi-99* s'expressa en el sistema nerviós, mesènquima i faringe i el seu silenciament desencadena una clara despigmentació de la regió dorsal, una hiperproliferació general i una regeneració aberrant del sistema nerviós i de les cèl·lules pigmentàries de l'ull. El gen homòleg a l'homeobox *aristaless* s'expressa en el sistema nerviós en planàries i podria jugar un paper important durant la regeneració del sistema nerviós i la diferenciació dels ulls (veure annex 2 per una descripció més detallada dels resultats). Ara bé, en aquesta tesi ens hem centrat en la caracterització funcional d'un altre dels candidats seleccionats, un membre de la família dels gens *egr* ("early growth response"), ja que el seu silenciament origina un fenotip que recorda enormement als efectes produïts després d'inhibir el gen *Smed-egfr-3* i, per tant, podria ser un bon candidat per donar un pas endavant i entendre en més detall la funció de la via dels EGFR durant la diferenciació de les noves estructures en la regeneració de les planàries.

5.- *egr-4*, un possible gen diana regulat per *Smed-egfr-3*

5.1.- Breu introducció de la família gènica dels *egr*

Els gens *egr* es consideren gens primerencs immediats (IEG, de l'acrònim de l'anglès "immediate early genes"), ja que s'activen de forma ràpida i transitòria en resposta a una gran varietat d'estímuls cel·lulars, com factors de creixement (Cao i altres, 1990), estrès (Khachigian i altres, 1997), privacitat d'oxigen (Yan i altres, 1999) o una ferida (Ouellette i altres, 1990; Bonventre i altres, 1991; Brand i altres, 1992). La seva expressió s'activa a nivell transcripcional, abans que qualsevol proteïna sigui sintetitzada, a diferència dels gens tardans, els quals s'activen únicament *a posteriori*, després de la síntesi dels productes dels gens d'expressió ràpida. La família dels *egr* està compresa per cinc membres en el cas dels vertebrats: *egr-1* (també conegut com TSI8, NGFI-A, Krox-24 o Zif268) (Milbrandt J, 1987; Herms i altres 1994), *egr-2* (també anomenat Krox-20) (Joseph i altres, 1988; Kharbanda i altres, 1991), *egr-3* (Patwardhan i altres, 1991), *egr-4* (anomenat

també NGFI-C o pAT133) (Crosby i altres, 1991) i el producte del gen del tumor de Wilms (WT-1) (Beckmann i Wilce, 1997). S'han identificat diferents homòlegs de la família dels *egr* en alguns invertebrats: dos a *Drosophila*, anomenats *klumpfuss* i *stripe* (Klein i Campos-Ortega, 1997; Brönnér i altres, 1994) i un únic *egr* a *Apis mellifera*, anomenat *AmEgr* (Ugajin i altres, 2013) i a *C. elegans*, anomenat EGRH (Clarly i Okkema, 2010).

5.2.- Estructura de les proteïnes EGR

Les proteïnes EGR estan formades per diferents dominis funcionals independents (Figura 42). La regió N-terminal és rica en serina i treonina i la C-terminal conté, a més a més, prolina.

Tots els membres de la família dels *egr* contenen un domini d'unió a l'ADN altament conservat (90% homòleg), format per tres dominis del tipus "zinc-finger" Cys₂His₂, els quals reconeixen una seqüència d'ADN de nou parells de base, rica en GC (GCG(G/T)GGGCG) i serà a través de la seva unió que podran exercir els seus efectes de transactivació (Crosby i altres, 1991; Chavrier i altres 1988). Així doncs, les divergències presents entre els diferents membres de la família dels *egr* es localitzen principalment fora del lloc d'unió a l'ADN.

La proteïna EGR-1, a més del domini d'unió a l'ADN, presenta un domini activador i un repressor (Gashler i altres, 1993). El domini repressor reconeix unes proteïnes d'unió NGFI-A (NAB) corepressores nuclears, que tenen la funció de regular negativament la funció dels *egr* (Thiel, Kaufmann i altres 2000; Svaren i altres, 1996). El lloc d'unió de les proteïnes NAB en el domini repressor està present també en els membres EGR-2 i 3, però no en l'EGR-4. S'han identificat dos proteïnes corepressores diferents, NAB1 i 2, que reprimeixen l'activitat dels EGR (Russo i altres, 1995; Svaren, 1996). Ambdues presenten dos dominis conservats, anomenats NCD1 i NCD2 (de l'acrònim NAB Conserved Domain); NCD1 s'uneix als EGR, mentre NCD2 té la funció de reprimir la transactivació. S'ha demostrat que la inactivació d'aquestes proteïnes implica un augment de l'activitat dels EGR, degut a una deficiència de la seva repressió, a diferència del cas concret d'EGR-4 que, en no

presentar el domini repressor, es mostra insensible a la inactivació de les NAB. Aquest fet reflecteix la possibilitat d'una regulació diferencial dels diferents membres de la família dels EGR (Russo i altres, 1995).

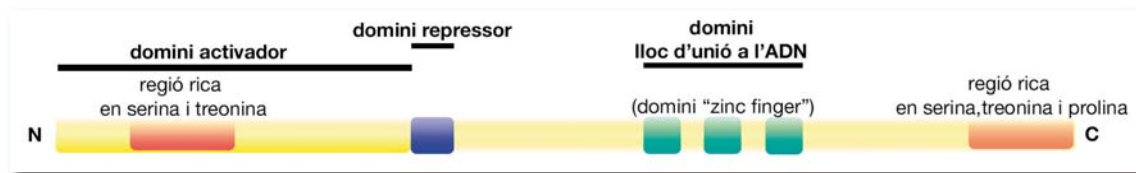


Figura 42. Dominis funcionals de la proteïna EGR-1 (adaptat de Pagel i Deindl, 2011).

5.3.- Funció dels gens *egr* en altres organismes

Els gens *egr* es van caracteritzar inicialment per la seva inducció a través de factors de creixement neuronals (Milbrandt, 1987) i altres mitògens (Sukhatme i altres, 1987). Estan implicats en la regulació de múltiples processos biològics, per aquest motiu l'expressió aberrant d'aquests factors de transcripció pot desencadenar accions pleiotròpiques (Calogero i altres, 2004; Cole i altres, 1989; Dussmann i altres, 2011; Sukhatme i altres, 1988). La seva funció ha sigut àmpliament caracteritzada en els vertebrats (Taula 6), sobretot en el cas d'*egr-1*, on s'ha vist que aquest gen s'expressa de forma variable en el cervell i la seva inducció està associada a una activitat neuronal, regulant processos tan importants com el desenvolupament del cervell o la plasticitat neuronal (Pérez-Cadahía i altres, 2011).

Gen	Funcions principals
<i>egr-1</i>	creixement, desenvolupament, diferenciació, apoptosi, vinculat amb diferents càncers, respostes inflamàtores, fibrosis
<i>egr-2</i>	mielinització nerviosa perifèrica, desenvolupament metencèfal, regulació cèl·lules T, apoptosi, tolerància immune
<i>egr-3</i>	desenvolupament sistema nerviós simpàtic, activació cèl·lules T, supervivència i proliferació
<i>egr-4</i>	funció sistema nerviós central

Taula 6. Activitats biològiques regulades pels *egr* identificats en vertebrats (adaptat de Bhattacharyya i altres, 2013).

La seva activació depèn d'una àmplia varietat de vies de senyalització, on s'hi inclouen la via dels EGFR i la MAPK/ERK (Cabodi i altres, 2008; Aggeli i altres, 2010). Per exemple, en ratolins s'ha demostrat que la via dels EGFR

Discussió

estimula l'expressió dels *egr* per promoure la proliferació cel·lular durant la formació de l'os (Chandra i altres, 2013).

5.4.- *egr* identificats a *S. mediterranea*

A través de les llibreries transcriptòmiques obtingudes del DGE, hem identificat un únic membre de la família dels *egr* a *S. mediterranea*, que es mostra “downregulated” en animals regenerants de tres dies després d'inhibir *Smed-egfr-3* (Fraguas i altres, 2014). Estudis previs han descrit altres homòlegs de la família dels *egr* a *S. mediterranea* (Onal i altres, 2012; Wenemoser i altres, 2012; Wagner i altres, 2012; Sandmann i altres, 2011), anomenats *egr-1*, 2, 3, 4 i *egr-like1* i anàlisis de la seqüència de l'*egr* identificat en les nostres llibreries demostren que correspon a l'*egr-4* descrit anteriorment (Wenemoser i altres, 2012). Malgrat que s'han identificat altres *egr* a *S. mediterranea*, la seva funció no s'ha analitzat. Únicament se sap que els gens *egr-2*, 3, 4 i *like1* es consideren gens W1, ja que presenten un pic en la seva expressió temporal en estadis primerencs de la regeneració, entre 30 minuts i 3 hores, tant en amputacions anteriors com posteriors (Figura 43A; Sandmann i altres, 2011; Wenemoser i altres, 2012; Fraguas i altres, 2014). A més a més, l'expressió d'*egr-like1* s'activa també de forma primerenca en qualsevol tipus de ferida (Figura 43B; Sandmann i altres, 2011; Wenemoser i altres, 2012). En el cas de l'*egr-1*, sabem que s'expressa en els neoblasts, ja que s'observa una forta davallada de la seva expressió després d'un tractament d'irradiació (Figura 43C; Wagner i altres, 2012).

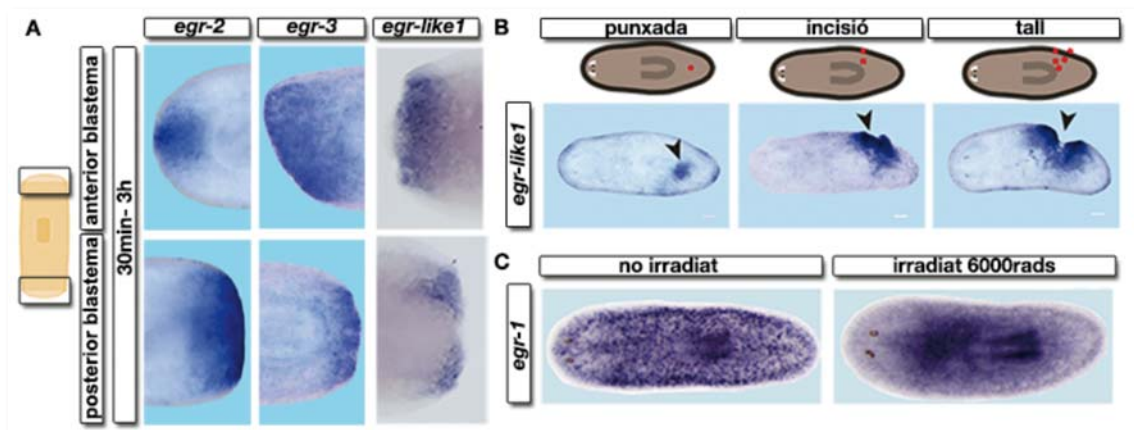


Figura 43. Patró d'expressió dels gens *egr-1*, *2*, *3* i *like1*. A) *egr-2*, *3* i *like1* s'expressen tant en blastemes anteriors com posteriors a partir de 30 min – 3 h després d'una amputació. B) L'expressió d'*egr-like1* s'activa ràpidament amb qualsevol ferida, ja sigui després d'una punxada, una incisió o un petit tall en el cos. Totes les mostres s'han fixat 3 hores després de realitzar la ferida. C) *egr-1* s'expressa tant en cèl·lules diferenciades com en neoblasts, ja que la seva expressió disminueix després de 5 dies d'un tractament d'irradiació de 6000 rads (adaptat de Wenemoser i altres, 2012; Wagner i altres, 2012; Sandmann i altres, 2011).

Tots els *egr*, junt amb l'*egr-like1*, identificats a planàries mostren els tres dominis “zinc finger” d’unió a l’ADN, amb la seqüència d’aminoàcids conservada X_2 -Cis- $X_{2,4}$ -Cis- X_{12} -His- $X_{3,4,5}$ -His, tot i que apareix alguna variació en el segon domini (X_2 -Cis- $X_{2,4}$ -Cis- X_8 -His- $X_{3,4,5}$ -His) (Figura 44). Al llarg d’aquesta tesi ens hem centrat en caracteritzar funcionalment només l'*egr-4*, ja que, com suggereixen els nostres resultats del DGE, la resta no semblarien estar regulats per la via dels EGFR.

```

egr-3                -----MVRNIQ-----KLTLLVKVIDKS-----EFDEIQTGYT    27
egr-like1            -----MVKNIQ-----KLTLPVKIDKL-----EFNEIQTGYT    27
egr-4                -----MQPCFINEIVTKIDSFIFLYCTSFMLLFEKFS-----DFDSIETGYT    45
egr-1                MILDETANDDPTDYVHNSSHNSSEFVHSHKQFENLNSIPAYNDHCGFIQNMEFNGGGYQYS    60
egr-2                -----DPVFMGYS-----SQL    11
                        :
egr-3                PLPGIHESFYLENTENWNNLKTPSPMDCRDIEFI---LIYGSDED-----    69
egr-like1            PLPGIHESFYLDNTENWSNLKTPSPMDCNLEFV---FIYESEDD-----    69
egr-4                PT-GKFGTFFKD-TSNVDNLDTPQPLEDNSEFEDFSFNYLISENRLKKCVDIHDRISNR    103
egr-1                SNNGNYSLLQQLNSDHSN---DLLQMLQNDPFIISTDCRFITDSQSQ-----    103
egr-2                SKICLDDLPIINRDNTEGPIITSQLEKPIRKT-----    45
                        .      :      .      .      .      :
egr-3                -----NKRYSTIIPDSSQSQDTSNSNKS-----    91
egr-like1            -----SNHFSTKLN-----PNTKKS-----    84
egr-4                IRQLSCTSSISCSSSQSCDTTTSVEYKISRGFNILLDEGQKNTLNTNSGTSLYISINYK    163
egr-1                -----YFHPYQQYMCRIANNFNHNVNNY-----    126
egr-2                -----KDIKTFMSWESRHSWDTSPSS-----    66
                        .      :      .      .
egr-3                -----LCVITNRCSSPLESEN---SSKSQ-----NRRVQ    116
egr-like1            -----LRIIS---SPLSEI---SEKSQ-----FRIKQ    105
egr-4                DIHPNINSVSAIQLSSPIEESSYNRRSQRPPTDNKTLRKQAHEEKAKHIIIRKPNIERN    223
egr-1                -----AIYDNSKLPILDSSQISNQTNIKLEPLHDPISITISREEKSKSGKSNQLPPDKS    181
egr-2                -----KTISYSTPRSCSSSGSIAPK-----KKQ    89
                        :      *      .      .      .      :
egr-3                FMCN--TCKKAFYRRDELKRHERIHTGERPLACNCFDKRFMRSDHLSHTHRIHTGEKPYR    174
egr-like1            FTCN--TCKKSFYRRDELKRHERIHTGERPLACHCFDKRFMRSDHLSHTVRIHTGEKPYQ    163
egr-4                FPCE--PCPAKFSRRDELKRHEKIHSGEKPLSCPYCDKCFMRSDHRTHTIRHTGEKPY    281
egr-1                FTCS--NCPSRFTKRDELKRHEKIHGTIKTLCCPYCDKTFIRSDHRTHTIRHTGEKPY    239
egr-2                FICNYCESRKRFKNSDELNRHLRVHSGIKPYTCEFCFKKFARSDDLKTHRRHTTGERPFE    149
                        * *      *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
egr-3                CNVCSRLFGRSRDERLRRHFRQNLH-----    197
egr-like1            CSYCDRLFGRSDELRLRHRIQTHL-----    186
egr-4                CDICSKRFARSDEKLRRHKRIHLKEKSKKNITHEIC-----    316
egr-1                CEICCKCFARSDETRHTRHSHKDPVRRKRKPNANNNTSNNDYTKSAIIDLDSLKSNLPL    299
egr-2                CEVCQKKFARSDEKSRHVKTHTRGRGLSR-----    178
                        * . * : *.*****: ** :
egr-3                -----
egr-like1            -----
egr-4                -----LKLMSQANMENSNNKFESKLPFHSS    340
egr-1                VQNKEPFVESYYQIHPEIFIRESLKDPSTRYNPAFDNNSLRNKDATTKSAFKIEPHIN    359
egr-2                -----ISTAPEFEPGDTQNPETEKRDKEHRSS    205

egr-3                -----
egr-like1            -----
egr-4                NTLIDLGLQI-----    350
egr-1                DAISDMTANIAKYVHFSDKSSSPSTESID    389
egr-2                DGSITYOF-----    213

```

Figura 44. Alineament de les seqüències dels diferents gens de la família *egr* identificats a *S. mediterranea*. Tots els gens *egr* identificats a planàries presenten tres dominis “zinc finger” d’unió a l’ADN (marcats en la figura amb requadres blaus).

5.5.- Patró d’expressió de l’*egr-4*

Gràcies a hibridacions *in situ* en animals intactes observem que *egr-4* s’expressa principalment en el sistema nerviós, en el cervell i més dèbilment en els cordons ventrals i en el parènquima. Aquesta expressió en el sistema nerviós coincideix amb l’expressió dels *egr* en altres organismes i recorda el patró d’expressió de *Smed-egfr-3* en el cervell (Fraguas i altres, 2011).

Malgrat que ha sigut impossible realitzar una doble *in situ* fluorescent de *Smed-egfr-3* i *egr-4*, és molt probable que aquests dos gens coexpressin (Fraguas i altres, 2014). A més a més, cal destacar que l’expressió d’*egr-4* en el gangli cefàlic disminueix notablement en silenciar *Smed-egfr-3* (Fraguas i altres, 2014). Aquest fet també corrobora les dades del DGE on es reflecteix una reducció dels nivells d’expressió d’*egr-4* després d’inhibir *Smed-egfr-3*. Així doncs, aquests resultats semblen demostrar una possible interacció d’aquests dos gens, que pot tenir un paper clau durant la morfogènesi del cervell, com ja s’ha vist en altres organismes, on l’activació d’*egr* a través de la via dels EGFR contribueix favorablement a la plasticitat neuronal (Pérez-Cadahía i altres, 2011)

A diferència del que observem en el cas de *Smed-egfr-3*, l’expressió d’*egr-4* no desapareix un dia després de la irradiació i, fins i tot, passats set dies l’expressió es mostra inalterada. Per tant, aquest gen no sembla estar expressat en els neoblasts, com *Smed-egfr-3*. Tot i que sembla que aquests dos gens coexpressin en el cervell i puguin estar interactuant, el fet que l’expressió d’*egr-4* s’expressi en les cèl·lules mare suggereix que aquests dos gens poden activar-se també independentment en diferents moments i regular processos cel·lulars diversos. A més a més, cal tenir en compte que la via dels EGFR en altres organismes regula “downstream” múltiples cascades de senyalització i gens diana.

Durant la regeneració anterior, l’expressió d’*egr-4* es veu activada a un dia com observem amb *Smed-egfr-3*, però durant la regeneració posterior, a diferència del que succeeix en el cas de *Smed-egfr-3*, la seva expressió no es

veu activada en el blastema. A mesura que els animals van regenerant, l'expressió d'*egr-4* es concentra en cèl·lules diferenciades, majoritàriament del cervell, mentre que *Smed-egfr-3* s'expressa simultàniament en cèl·lules indiferenciades.

D'altra banda, l'expressió d'*egr-4* s'indueix accentuadament a poques hores (entre una i tres) en resposta a una ferida, tant anteriorment com posterior, coincidint amb els resultats sobre altres *egr* identificats en planàries (Figura 43A; Fraguas i altres, 2014) i d'acord amb la definició general dels gens de la família dels *egr* que els descriu com “gens primerencs immediats que s'activen de forma ràpida i transitòria en resposta a una gran varietat d'estímuls”. En el nostre cas, podem afegir, a més a més, que aquesta expressió primerenca no varia després de la irradiació (per tant, és independent dels neoblasts) ni d'inhibir *Smed-egfr-3*. Ara bé, sabem pel DGE i per hibridacions in situ que els nivells d'expressió d'*egr-4* varien en silenciar *Smed-egfr-3*, per aquest motiu hem realitzat un acurat “time course” de l'expressió d'*egr-4* durant la regeneració després d'inhibir *Smed-egfr-3*, per observar exactament quan es produeix la disminució de l'expressió. Els nostres resultats indiquen que si inhibim *Smed-egfr-3*, l'expressió d'*egr-4* no disminueix fins al segon dia de regeneració, mostrant-se invariable en els estadis previs.

En resum, el conjunt de tots aquests resultats posa de manifest la presència de dues fases d'expressió del gen *egr-4*:

- En primer lloc, una fase primerenca induïda per qualsevol tipus de ferida o amputació a poques hores, independent dels neoblasts, de la regió corporal (expressió accentuada indistintament tant en ferides anteriors com posteriors) i de *Smed-egfr-3*.
- En segon lloc, es presenta una fase tardana a partir dels dos dies de regeneració, que passa a ser depenent de *Smed-egfr-3*, d'acord amb el que s'ha observat en altres organismes on la via dels EGFR regula l'expressió dels *egr* (Kaufmann i Thiel, 2002; Tsai i altres, 2000) per controlar múltiples processos biològics. Aquesta segona fase coincideix quan l'expressió d'*egr-4* es concentra en els primordis dels nous

ganglis cefàlics, durant l'etapa d'iniciació de la diferenciació de les noves estructures.

- Aquestes dues fases, una independent i una altra depenent de *Smed-egfr-3* estan d'acord amb els resultats obtinguts amb el DGE, on s'observa una disminució significativa en l'expressió d'*egr-4* després de silenciar *Smed-egfr-3* únicament a tres dies i no a un dia de regeneració.

5.6.- Caracterització funcional de l'*egr-4*

El silenciament d'*egr-4* afecta la regeneració anterior, formant uns blastemes molt petits, fenotip que recorda considerablement els defectes observats al silenciar *Smed-egfr-3*, amb la diferència que en aquest cas la regeneració posterior no es veu alterada com quan s'inhibeix el *Smed-egfr-3*. Aquest fet suggereix que aquests dos gens poden estar interactuant conjuntament d'alguna manera per regular la regeneració anterior. D'altra banda, en blastemes posteriors *Smed-egfr-3* pot modular la regeneració de les noves estructures regulant altres factors o vies (que amb els nostres resultats no podem desvetllar) però independentment de l'activació d'*egr-4*, donant suport al que succeeix en altres organismes, on la via dels EGFR regula múltiples vies de senyalització.

Tal i com observem al silenciar *Smed-egfr-3*, la formació de blastemes de dimensions reduïdes a conseqüència de la inhibició de *Smed-egr-4* no sembla afectar al nombre de neoblasts ni a la seva distribució, observant una normal expressió tant de l'anticòs anti-SMEDWI-1 com del marcador específic de neoblasts *Smed-histone-2B*. Malgrat tot, l'anàlisi de la taxa de proliferació cel·lular després d'inhibir *egr-4* mostra diferències significatives respecte els animals control: el nombre de cèl·lules en mitosi disminueix tant en blastemes anteriors (troncs i cues regenerants) com posteriors (caps regenerants) durant el primer pic (a 6 hores després de l'amputació), mentre que el segon pic (a 48 hores) només es veu alterat de forma significativa en els blastemes anteriors (en els caps regenerants tan sols es dona una lleugera disminució que no és significativa) (Figura 45A). És important remarcar que el decreixement de la

taxa de proliferació no es molt acusat, perquè continuem observant un nombre significant de cèl·lules en mitosi (Figura 45B) i una resposta proliferativa bimodal típica de les planàries. Per tant, la formació d'aquests blastemes tan petits probablement no es deu exclusivament a un problema en la proliferació, resultat que coincideix amb el que suggerim en el cas de *Smed-egfr-3*.

Cal remarcar, a més a més, que quan analitzem la diferenciació de les descendències primerenques i tardanes dels neoblasts, s'observa una notable disminució de cèl·lules postmitòtiques corresponents a la població tardana (mitjançant el marcador *Smed-AGAT-1*), mentre que la població primerenca no està afectada (expressió normal de *Smed-NB21.11e*) (Fraguas i altres, 2014).

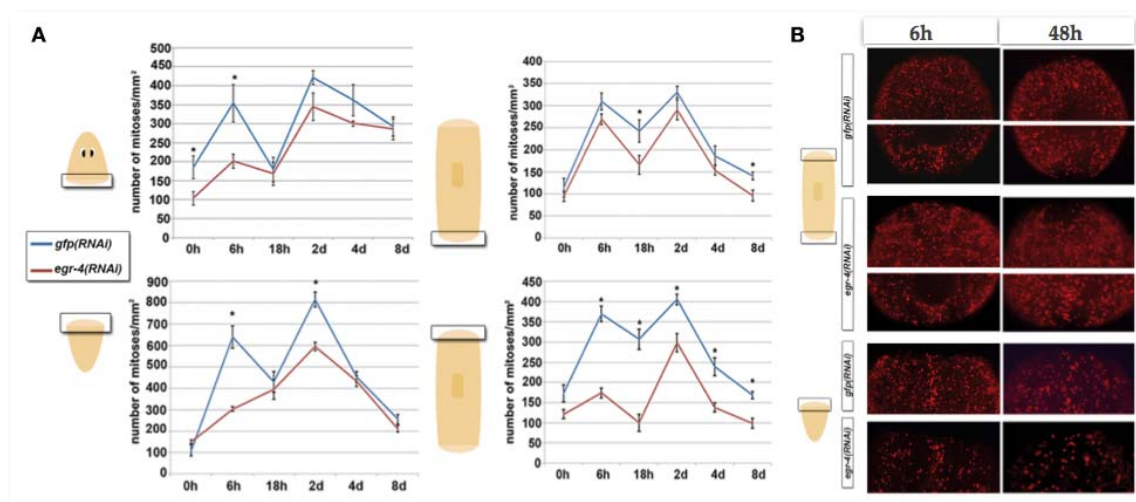


Figura 45. Dinàmica dels neoblasts després del silenciament d'*egr-4*. A) La inhibició d'*egr-4* causa una disminució significativa del primer pic mitòtic, tant en blastemes anteriors (cues i troncs regenerants) com posteriors (caps regenerants). El segon pic mitòtic decreix significativament en blastemes anteriors. B) Malgrat que es dona una disminució de l'índex mitòtic al silenciar *egr-4*, mitjançant immunotincions de l'anticòs PH3, s'observen cèl·lules en divisió en els dos pics a 6 i 48 hores.

Aquests resultats suggereixen una possible activitat diferencial d'*egr-4* en el temps. El decreixement del primer pic mitòtic en ambdós blastemes anterior i posterior sembla indicar que *egr-4* seria important en la resposta proliferativa inicial sistèmica que es dona després de l'amputació, ja sigui en blastemes anteriors com posteriors. És a dir, *egr-4* podria regular la proliferació cel·lular en estadis primerencs de la regeneració, a poques hores de l'amputació. Aquesta funció estaria relacionada amb l'expressió primerenca d'*egr-4*, independent de *Smed-egfr-3*. Ara bé, la davallada del primer pic mitòtic no explicaria per si sola el fenotip en blastemes anteriors, ja que els

posteriors regeneren bé malgrat presentar un primer pic mitòtic afectat. En altres organismes, s'ha descrit una funció important dels gens *egr* en la modulació del sistema immune (induint la diferenciació dels precursors dels limfòcits i activant les cèl·lules B i T), durant el tancament de la ferida i processos d'inflamació (Gómez-Martín i altres, 2010; Dussmann i altres, 2011). Desafortunadament, a planàries no es coneix res sobre la possible resposta inflamatòria o "immune" després d'una amputació o ferida; de la mateixa manera, es coneix ben poc sobre quins gens són necessaris per desencadenar el primer pic mitòtic. Ara bé, els nostres resultats semblen indicar que el gen *egr-4* té una funció important en aquesta resposta proliferativa inicial. Aquesta funció podria ser directa o indirecta, ja que cal remarcar que anàlisis preliminars dels resultats obtinguts del *RNA-seq* ("RNA Sequencing") a l'inhibir *egr-4* mostren diversos gens de la categoria W1 "downregulated" pel silenciament d'aquest gen a 8 hores (per analitzar en més detall aquests resultats veure annex 3). Recordem que els gens W1 s'han definit com aquells que presenten un pic màxim d'expressió entre 30 minuts i 3 hores d'una amputació en regions properes a la ferida i en diferents tipus cel·lulars, on s'hi inclouen cèl·lules subepidèrmiques, ja que actuen durant el tancament d'una ferida (Wenemoser i altres, 2012). Futurs experiments són necessaris per concloure aquesta hipòtesi i demostrar en més detall si *egr-4* presenta un paper important durant la resposta inflamatòria a una ferida i la regulació d'aquest primer pic mitòtic a partir d'aquest gen.

Pel que fa al segon pic mitòtic, aquest disminueix de manera significativa només en blastemes anteriors i no posteriors. Això implica, que malgrat que una part d'aquesta disminució pugui venir donada com a conseqüència d'un primer pic mitòtic molt menor (comparat amb els controls), ha d'haver algun efecte específic del silenciament d'*egr-4* en els blastemes anteriors, ja que aquest mateix segon pic mitòtic no està afectat de manera significativa en blastemes posteriors.

D'altra banda, *egr-4* sembla regular d'alguna manera la diferenciació cel·lular durant la regeneració anterior, a l'observar una disminució en l'expressió de les cèl·lules postmitòtiques tardanes després del seu

silenciament. Aquesta funció d'*egr-4* durant la formació de les noves estructures podria estar regulada per la via dels EGFR, concretament a través de *Smed-egfr-3*, ja que com s'ha comentat anteriorment l'expressió d'*egr-4* sembla ser depenent d'aquest a partir del segon dia de regeneració, coincidint amb els primers estadis de la diferenciació.

A partir d'hibridacions *in situ* hem vist que *egr-4* està expressat en estadis primerencs de la regeneració, majoritàriament en el SNC i principalment en el cervell. La seva inhibició marca un clar bloqueig de la diferenciació de les estructures anteriors, impedit el creixement del blastema i una correcta formació dels ganglis cefàlics. Aquests resultats coincideixen amb el que s'ha observat en estudis previs en altres organismes, on la funció de la família gènica dels *egr* juga un paper clau durant el desenvolupament del sistema nerviós (O'Donovan i altres, 1999; Pérez-Cadahía i altres, 2011).

Amb l'objectiu d'estudiar en més detall la funció que pot tenir *egr-4* durant la regeneració del cervell i analitzar la regeneració inicial dels ganglis cefàlics hem realitzat experiments d'ARNi simultanis d'*egr-4* i *Smed-apc-1*. *Smed-apc-1* és un inhibidor de la via *Wnt/β-catenin* i el seu silenciament indueix la formació d'una cua en comptes d'un cap en els blastemes anteriors (Gurley i altres, 2008). Tot i la reversibilitat de la polaritat a l'inhibir *Smed-apc-1*, en aquests blastemes anteriors apareixen dos grups de cèl·lules bilaterals que expressen marcadors del cervell i que s'assemblen al que seria al seu primordi, el qual apareix en les primeres etapes de la regeneració. Ara bé, en un context *Smed-apc-1*(ARNi), aquests primordis son incapaços de desenvolupar-se finalment en un cervell (Evans i altres, 2011; Iglesias i altres, 2011). En el nostre cas, després del silenciament simultani d'*egr-4*/*Smed-apc-1*, observem la formació d'aquests primordis del cervell en molt pocs casos. Aquests resultats suggereixen que *egr-4* és necessari per a la diferenciació d'aquests primordis en un fons *Smed-apc-1* ARNi i, conseqüentment, que tingui una funció essencial durant la diferenciació dels mateixos en una situació fisiològica normal. Curiosament, *egr-4* no sembla ser essencial durant el manteniment del cervell, ja que el seu silenciament en animals intactes no afecta la homeòstasi. De fet, fins i tot durant la regeneració, la presència de

teixit dels ganglis cefàlics rescata la inhibició d'*egr-4*. Experiments en animals regenerants on el cervell no s'amputa totalment després del silenciament d'*egr-4* sustenten aquesta hipòtesi, ja que aquests no mostren cap defecte en la regeneració anterior i formen un cervell nou totalment normal.

El requeriment del gen *egr-4* durant la diferenciació neuronal de les planàries recolza els resultats que s'han demostrat en altres organismes, per exemple a *Xenopus* on s'ha vist que els gens de la família *egr* juguen un paper clau durant el desenvolupament del cervell, concretament regulant l'extensió de les neurites a través d'*egr-1* (Anelli i altres, 2013).

La impossibilitat de formar un blastema normal amb defectes en la regeneració dels ganglis cefàlics a l'inhibir *egr-4* pot portar a pensar que aquest fenotip es deu a un desajust en l'establiment de la polaritat AP, ja que recorda en certa manera al fenotip que s'obté al silenciar determinats gens necessaris per la re-especificació d'aquest eix, com *Smed-pbx* i *Smed-follistatin* (Roberts-Galbraith i Newmark, 2013; Blassberg i altres, 2013; Chen i altres, 2013). Ara bé, els gens descrits com a determinants de la polaritat AP (*Smed-wnt1*, *Smed-notum* o *Smed-follistatin*) no presenten una expressió alterada al silenciar *egr-4* en els estadis primerencs de la regeneració, moment que té lloc el procés del restabliment de la polaritat AP (a 12-18 hores després de l'amputació). En tot cas, simplement mostren un alentiment de la seva expressió (sobretot en el cas de *Smed-notum*) en estadis més tardans. Malgrat que no es pot descartar completament que aquest alentiment afecti d'alguna manera el re-establiment de la polaritat i que això es tradueix en els efectes observats, el fet que aquests gens no estiguin afectats en els estadis en què aquesta polaritat es determina, suggereix que els efectes observats després de silenciar *egr-4* no es deuen a problemes en l'establiment de la polaritat. Per contra, podria ser que aquest alentiment en la recuperació del patró d'expressió de gens com *Smed-notum* fos deguda a la menor taxa proliferativa dels neoblasts observada després d'un ARNi d'*egr-4*.

Per altra banda, i tot i que el silenciament d'*egr-4* no sembla afectar el re-establiment de la polaritat, experiments on es silencia simultàniament *egr-4* i *β -catenin* mostren que la inhibició de *β -catenin* és capaç de rescatar la

regeneració anterior i la diferenciació dels nous ganglis cefàlics, malgrat silenciar *egr-4* a l'hora.

Aquests resultats semblen indicar, per una banda, que en condicions normals *egr-4* podria inhibir l'activitat de β -catenin per permetre la regeneració dels ganglis cefàlics (Figura 46), i estarien d'acord amb altres treballs recents que han suggerit que la via *Wnt*/ β -catenin podria regular la diferenciació d'aquests ganglis independentment de la polaritat axial (Iglesias i altres, 2011; Blassberg i altres, 2013). D'altra banda, aquests mateixos experiments suggereixen l'existència d'un element addicional X desconegut, necessari per a la diferenciació cefàlica. Futurs experiments són necessaris per entendre la relació exacta entre *egr-4* i la via *Wnt*/ β -catenin i aquest element X en aquest procés.

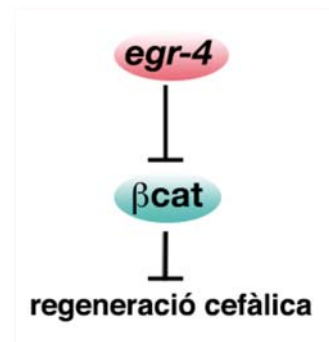


Figura 46. Model hipotètic que suggereix que *egr-4* inhibeix l'activitat de β -catenin en condicions normals per permetre la regeneració anterior.

6. Regulació de la regeneració anterior a través de la via *egfr-3/egr-4*

Davant aquests resultats ens podem plantejar com d'essencial resulta ser la diferenciació dels ganglis cefàlics, mediada per *egr-4*, per una correcta regeneració del cap. La dependència del sistema nerviós durant la regeneració es de fet una funció conservada en la filogènia, que s'ha demostrat en diversos organismes. Per exemple en les extremitats dels amfibis, estudis dels anys 50 ja van demostrar que la denervació de l'extremitat abans de la seva amputació bloqueja la regeneració (Singer, 1952). Estudis més recents han trobat la base molecular d'aquesta dependència del sistema nerviós en el cas dels tritons. Així, s'ha vist que després d'una amputació la proteïna nAG ("newt Anterior Gradient") s'activa en les cèl·lules de Schwann dels axons a prop de la ferida per promoure la regeneració; en extremitats denervades nAG no s'expressa, però l'expressió ectòpica d'aquesta proteïna en aquestes extremitats indueix l'expressió de nAG en cèl·lules glandulars sota l'epiteli de la ferida i aquests organismes recuperen la seva capacitat regenerativa (Kumar i altres 2007). L'acció de nAG ve mediada per Prod-1, una molècula específica dels tritons

(Garza-García i altres, 2010). Malgrat que en altres sistemes (peixos, equinoderms, anèl·lids, *Hydra*) s'ha postulat un paper similar pel sistema nerviós, la naturalesa exacta d'aquest putatiu factor neural inductor no es coneix (Goss, 1969; Kumar i Brockes, 2012; Miljkovic-Licina i altres, 2007),

En el cas concret de les planàries, i a partir dels nostres resultats, podríem suggerir per primera vegada que la inhibició de la diferenciació dels primordis del cervell és capaç de bloquejar la formació de la resta de les estructures anteriors. Però, quins senyals controlen aquest procés? I en el cas que *egr-4* indueixi la diferenciació dels primordis del cervell en condicions normals, qui regula la seva activació?

En primer lloc, els problemes observats durant el creixement del blastema anterior al silenciar *egr-4* recorden al fenotip obtingut a l'inhibir *Smed-egfr-3* comentat anteriorment, però també mostren certes similituds als defectes que s'obtenen al bloquejar la via ERK a planàries (Tasaki i altres, 2011). S'ha demostrat que l'activació d'ERK en el blastema és necessària en les planàries durant els estadis inicials de la diferenciació per activar un conjunt de cèl·lules essencials que indueixen la proliferació i/o migració dels neoblasts i s'ha postulat que la seva regulació es podria donar a través de la via FGFR, com s'ha vist que succeeix en els vertebrats (Tasaki i altres, 2011). A més a més, estudis més recents han anat més enllà i han proposat que durant la regeneració de les planàries, la via de senyalització ERK té un paper important durant la dinàmica de la diferenciació de les cèl·lules mare perquè formin teixits anteriors específics en l'absència de senyals de posteriorització (Umesono i altres, 2013). Així, han suggerit que en regions posteriors la via *Wnt/β-catenin* inhibeix l'activació d'ERK i com a resultat es forma una cua.

En segon lloc, ERK també està regulat per la via EGFR en diferents models i contextos. A més, també s'ha vist que la via EGFR/ERK regula els gens *egr* en diverses situacions (Mayer i altres, 2009; Tarcic i altres, 2012). Per exemple, s'ha vist una forta implicació de la via dels EGFR durant la regulació de la via MAPK/ERK (Mayer i altres, 2009; Biesiada i altres, 1996) i, de fet, a partir de les nostres llibreries del DGE, s'han obtingut múltiples elements de la via de les MAPK regulats per *Smed-egfr-3* (Ras, MAPK, MAPKKK, MAPKP,

veure annex 2 per una descripció més detallada), que sustenten la possible connexió d'aquestes dues vies en planàries durant els estadis de la diferenciació cel·lular. Per aquest motiu, a partir dels nostres resultats presentem un altre model on suggerim que, davant aquesta similitud en els fenotips, la via dels EGFR (concretament *Smed-egfr-3*) podria ser l'element "upstream" encarregat de regular l'activació d'ERK en les planàries.

D'altra banda, el model presentat per Tasaki i col·laboradors no descriu exactament quin és aquest tipus cel·lular regulat per ERK i encarregat de mantenir el creixement del blastema en condicions normals i regenerar correctament les estructures anteriors. Nosaltres proposem que aquestes cèl·lules podrien ser el primordi del cervell. Aquesta hipòtesi justificaria perquè a l'inhibir *egr-4* els organismes no són capaços de regenerar els ganglis cefàlics i com a conseqüència presenten una regeneració anterior bloquejada (Figura 47) en comparació amb els animals control. En aquest model, els primordis del cervell produirien algun senyal necessari per promoure la proliferació i/o migració i/ o diferenciació dels neoblasts per formar un blastema normal. Els defectes en la diferenciació dels primordis del cervell en un animal *egr-4(ARNi)* podrien explicar llavors els defectes observats durant la regeneració.

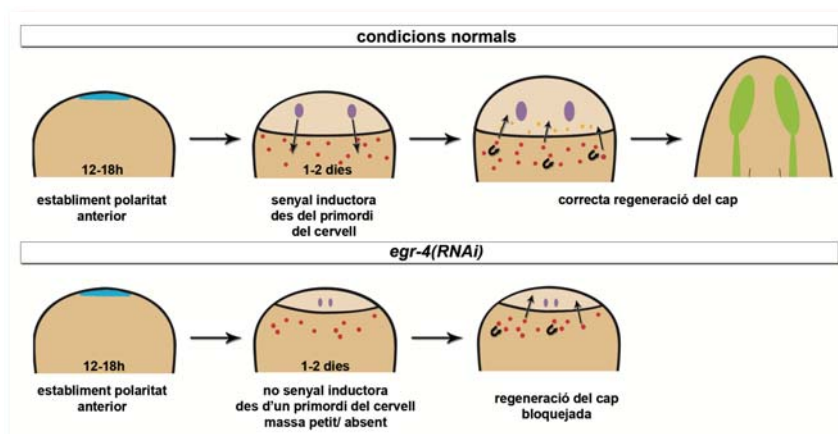


Figura 47. Model proposat que mostra la importància de la diferenciació del primordi del cervell per poder regenerar les estructures anteriors.

Gràcies als resultats obtinguts en aquesta tesi presentem un gen pioner en les planàries, sent el primer amb una funció essencial durant els estadis inicials de la regeneració neuronal a l'induir la diferenciació del primordi del cervell "downstream" de l'establiment de la polaritat. Introduïm un model que postula la importància de la diferenciació inicial del primordi del cervell per un

Discussió

correcte creixement del blastema. A partir dels nostres resultats podem afegir que aquesta inducció en la diferenciació neuronal necessària per la correcta regeneració anterior de les planàries podria estar regulada gràcies a l'activació del gen *egr-4* a través de la via EGFR, concretament *Smed-egfr-3* (Figura 48).

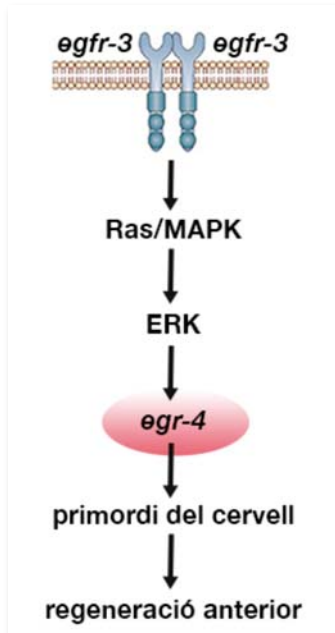


Figura 48. Esquema del model general de la inducció de la diferenciació del primordi del cervell depenent de l'activitat d'*egr-4*, activat a través de *Smed-egfr-3*.

Conclusions

Després d'analitzar els resultats obtinguts en relació a l'estudi funcional de la via *egfr-3/egr-4* durant la regulació de la regeneració anterior en la planària *S.mediterranea* es deriven les següents conclusions exposades a continuació:

- S'han identificat tres gens homòlegs de la família dels receptors tirosina quinasa EGFR a *S.mediterranea*, anomenats *Smed-egfr-1*, *Smed-egfr-2* i *Smed-egfr-3*.
- Hibridacions *in situ* demostren que els tres gens s'expressen en diferents tipus cel·lulars: *Smed-egfr-1* en el parènquima, faringe, sistema digestiu i cèl·lules pigmentàries dels ulls. *Smed-egfr-2* en el sistema digestiu. I per últim, *Smed-egfr-3* s'expressa en la faringe, sistema nerviós central, marge del cap i en els neoblasts.
- Anàlisis funcionals mitjançant experiments d'ARNi mostren implicacions importants per part de *Smed-egfr-1* i *Smed-egfr-3* durant la regeneració i homeòstasi de la planària. No s'observa cap defecte aparent al silenciar *Smed-egfr-2*.
- La inhibició de *Smed-egfr-3* resulta en un creixement reduït dels blastemes, tot i mostrar uns nivells de la proliferació i de la mort cel·lular normals, i una diferenciació alterada de determinades poblacions cel·lulars, sent la neuronal la més afectada.

En segon lloc,

- A través d'experiments de DGE hem identificat possibles gens diana regulats a través de *Smed-egfr-3*, relacionats amb les vies de senyalització de les MAPK, PI3K/Akt, PLC γ i JAK/STAT, regulades per la via dels EGFR en altres organismes.
- Un dels gens diana reconeguts a partir de l'anàlisi del DGE és l'*egr-4*, un membre de la família dels gens "early growth response".
- *egr-4* s'expressa principalment en el cervell i més dèbilment en els cordons ventrals i en el parènquima.

Conclusions

- La seva inhibició bloqueja la regeneració anterior, sense afectar la regeneració posterior.
- *egr-4* presenta dues fases d'expressió: una inicial no depenent de *Smed-egfr-3* i que pot tenir un paper en la resposta proliferativa inicial, i una tardana depenent de *Smed-egfr-3* amb una possible funció durant la neurogènesi.
- *egr-4* sembla necessari per a la diferenciació del primordi del cervell, a través d'antagonitzar la funció de β -catenin "downstream" dels determinants de la polaritat *Smed-notum* i *Smed-wnt1*.

Per últim,

- Proposem un model per explicar com la diferenciació del primordi del cervell podria ser un element crucial per mantenir i/o induir el creixement del blastema durant la regeneració anterior.
- En resum, la via *egfr-3/egr-4* sembla jugar un paper important durant els estadis inicials de la diferenciació dels ganglis cefàlics i l'activació de la regeneració del cap en les planàries *S. mediterranea*.

A partir de les conclusions extretes al finalitzar la tesi doctoral, ens formulem una sèrie de preguntes que quedarien obertes i que haurien sigut interessants de resoldre:

- Quines diferències es donen entre la regeneració anterior i/o posterior que impliquen defectes únicament en blastemes anteriors després d'inhibir *egr-4*?
- Quins senyals activen *Smed-egfr-3* per tal de regular la diferenciació de determinats llinatges cel·lulars durant la regeneració?
- Quins gens regulats per *egr-4* són importants per a la diferenciació del primordi del cervell?

Bibliografia



Abril, J.F., Cebrià, F., Rodríguez-Esteban, G., Horn, T., Fraguas, S., Calvo, B., Bartscherer, K. and Saló, E. (2010). Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea*. *BMC Genomics*. 11:731.

Adamidi, C., Wang, Y., Gruen, D., Mastrobuoni, G., You, X., Tolle, D., Dodt, M., Mackowiak, S.D., Gogol-Doering, A., Oenal, P., Rybak, A., Ross, E., Sánchez Alvarado, A., Kempa, S., Dieterich, C., Rajewsky, N. and Chen, W. (2011). De novo assembly and validation of planaria transcriptome by massive parallel sequencing and shotgun proteomics. *Genome Res*. 21:1193-200.

Adell, T., Cebrià, F. and Saló, E. (2010). Gradients in planarian regeneration and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2: a000505.

Adell, T., Saló, E., Boutros, M. and Bartscherer, K. (2009). Smed-Evi/Wntless is required for beta-catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration. *Development*. 136:905-10.

Agata, K. and Umesono, Y. (2008). Brain regeneration from pluripotent stem cells in planarian. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 363:2071-8.

Agata, K., Saito, Y. and Nakajima, E. (2007). Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Dev Growth Differ*. 49:73-8.

Agata, K., Soejima, Y., Kato, K., Kobayashi, C., Umesono, Y. and Watanabe, K. *Zoolog Sci*. (1998). Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. 15:433-40.

Aggeli, I.K., Beis, I. and Gaitanaki, C. (2010). ERKs and JNKs mediate hydrogen peroxide-induced Egr-1 expression and nuclear accumulation in H9c2 cells. *Physiol Res*. 59:443-54.

Aguirre, A., Dupree, J.L., Mangin, J.M. and Gallo, V. (2007). A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nat Neurosci*. 10:990-1002.

Almuedo-Castillo, M., Sureda-Gómez, M. and Adell, T. (2012). Wnt signaling in planarians: new answers to old questions. *Int J Dev Biol*. 56:53-65.

Almuedo-Castillo, M., Saló, E. and Adell, T. (2011). Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:2813-8.

Alroy, I. and Yarden, Y. (1997). The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett*. 410:83-6.

Anelli, T., Cardarelli, S., Ori, M., Nardi, I., Biagioni, S. and Poiana, G. (2013). 5-Hydroxytryptamine 1A and 2B Serotonin Receptors in Neurite Outgrowth: Involvement of Early Growth Response Protein 1. *Dev Neurosci*. 35:450-60.

Araújo, S.J. and Tear, G. (2003). Axon guidance mechanisms and molecules: lessons from invertebrates. *Nat Rev Neurosci*. 4:910-22.

Aroian, R.V. and Sternberg, P.W. (1991). Multiple functions of let-23, a *Caenorhabditis elegans* receptor tyrosine kinase gene required for vulval induction. *Genetics*. 128:251-67.

Asami, M., Nakatsuka, T., Hayashi, T., Kou, K., Kagawa, H. and Agata, K. (2002). Cultivation and characterization of planarian neuronal cells isolated by fluorescence activated cell sorting (FACS). *Zool Sci*. 19:1257-1265.

Bibliografia

Auger, H., Sasakura, Y., Joly, J.S. and Jeffery, W.R. (2010). Regeneration of oral siphon pigment organs in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev Biol.* 339: 374-89.

B

Baguñà, J., Romero, R., Saló, E., Collet, J., Auladell, M.C, Ribas, M., MRIutort, M., Garcia-Fernández, J., Burgaya, F. And Bueno, D. (1990). Growth, degrowth and regeneration as developmental phenomena in adult freshwater planarians. *Experimental Embriology in Aquatic Plants and animals* (H.J. Marthy, ED.) pp. 129-162. Plenum Press NATO-ASI Series.

Baguñà, J., Saló, E. and Auladell, M.C. (1989a). Regeneration and pattern formation in planarians. III. Evidence that neoblasts are totipotent stem-cells and the source of blastema cells. *Development.* 107:77-86.

Baguñà, J., Saló, E. and Romero, R. (1989b). Effects of activators and antagonists of the neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians. *Int J Dev Biol.* 33:261-6.

Baguñà, J. and Romero, R. (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth, and regeneration in the planarians *Dugesia(S)mediterranea* and *Dugesia(G)tigrina* *Hydrobiologia.* 84:181-194.

Baguñà, J. and Ballester, R. (1978). The nervous system in planarians: peripheral and gastroduermal plexuses, pharynx innervation, and the relationship between central nervous system structure and the acoelomate organization. *J.Morphol.* 155:237-252.

Baguñà, J. (1976a). Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. I. mitotic studies during growth, feeding and starvation. *J Exp Zool.* 195: 53-65.

Baguñà, J. (1976b). Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. II. Mitotic studies during regeneration, and a possible mechanism of blastema formation. *J Exp Zool.* 195: 65-80.

Baonza, A., Casci, T. and Freeman, M. (2001). A primary role for the epidermal growth factor receptor in ommatidial spacing in the *Drosophila* eye. *Curr Biol.* 11: 396-404.

Bardeen, C.R. and Baetjer, F.H. (1904). The inhibiting action of Roentgen rays on regeneration in planarians. *J Exp Zool.* 1:191-196.

Bautz, A. and Schilt, J. (1986). Somatostatin-like peptide and regeneration capacities in planarians. *Gen Comp Endocrinol.* 64:267-72.

Beane, W.S., Morokuma, J., Adams, D.S. and Levin, M. (2011). A chemical genetics approach reveals H,K-ATPase-mediated membrane voltage is required for planarian head regeneration. *Chem Biol.* 18:77-89.

Beck, C.W., Izpisua Belmonte, J.C. and Christen, B. (2009). Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. *Dev Dyn.* 238:1226-48.

Beckmann, A.M. and Wilce, P.A. (1997). Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int.* 31:477-510.

Bellairs, A. and Bryant, S.V. (1985). Autotomy and regeneration in reptiles. In: Gans C, editor. *Biology of Reptilia*. New York: John Wiley and Sons. 301-410.

- Bely, A.E. and Nyberg, K.G. (2010). Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends Ecol Evol.* 25:161-70.
- Benazzi, M., Baguñà, J., Ballester, R., Puccinelli, I. and Papa, R.D. (1975). Further Contribution to the Taxonomy of the *Dugesia lugubris-polychroa* Group with Description of *Dugesia mediterranea* n. sp. (Tricladida, Paludicola). *Bolletino di zoologia.* 42:81-89.
- Bergbold, N. and Lemberg, M.K. (2013). Emerging role of rhomboid family proteins in mammalian biology and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1828:2840-8.
- Bergmann, A. and Steller, H. (2010). Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal.* 3:re8.
- Bhattacharyya, S., Fang, F., Tourtellotte, W. and Varga, J. (2013) Egr-1: new conductor for the tissue repair orchestra directs harmony (regeneration) or cacophony (fibrosis). *J Pathol.* 229:286-97.
- Birchmeier, C. (2009). ErbB receptors and the development of the nervous system. *Exp Cell Res.* 315:611-8.
- Blassberg, R. A., Felix, D. A., Tejada-Romero, B. and Aboobaker, A. A. (2013). PBX/extradenticle is required to re-establish axial structures and polarity during planarian regeneration. *Development.* 140:730-9.
- Blythe, M.J., Kao, D., Malla, S., Rowsell, J., Wilson, R., Evans, D., Jowett, J., Hall, A., Lemay, V., Lam, S. and Aboobaker, A.A. (2010). A dual platform approach to transcript discovery for the planarian *Schmidtea mediterranea* to establish RNAseq for stem cell and regeneration biology. *PLoS One.* 5:e15617.
- Bonventre, J.V., Sukhatme, V.P., Bamberger, M., Ouellette, A.J. and Brown, D. (1991). Localization of the protein product of the immediate early growth response gene, Egr-1, in the kidney after ischemia and reperfusion. *Cell Regul.* 2:251-60.
- Bosch, T.C., Anton-Erxleben, F., Hemmrich, G. and Khalturin, K. (2010). The Hydra polyp: nothing but an active stem cell community. *Dev Growth Differ.* 52:15-25.
- Bossert, P.E., Dunn, M.P. and Thomsen, G.H. (2013). A staging system for the regeneration of a polyp from the aboral physa of the anthozoan Cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev Dyn.* 242:1320-31.
- Brand, T., Sharma, H.S., Fleischmann, K.E., Duncker, D.J., McFalls, E.O., Verdouw, P.D. and Schaper, W. (1992). Proto-oncogene expression in porcine myocardium subjected to ischemia and reperfusion. *Circ Res.* 71:1351-60.
- Brockes, J.P. and Kumar, A. (2008). Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24:525-49.
- Brockes, J.P. (1997). Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science.* 276:81-7.
- Brodu, V. and Casanova, J. (2006). The RhoGAP crossveinless-c links trachealess and EGFR signaling to cell shape remodeling in *Drosophila* tracheal invagination. *Genes Dev.* 20:1817-28.
- Brøndsted, H.V. (1969). Planarian regeneration. Pergamon, Oxford.

Bibliografia

Brönner, G., Chu-Lagraff, Q., Doe, C. Q., Cohen, B., Weigel, D., Taubert, H. and Jäckle, H. (1994). Sp1/egr-like zinc-finger protein required for endoderm specification and germ-layer formation in *Drosophila*. *Nature*. 369: 664-668.

Bublil, E.M. and Yarden, Y. (2007). The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol*. 19:124-34.

Bueno, D., Baguñà, J. and Romero, R. (1997). Cell-, tissue-, and position-specific monoclonal antibodies against the planarian *Dugesia* (*Girardia*) *tigrina*. *Histochem Cell Biol*. 107:139-49.

Burden, S. and Yarden, Y. (1997). Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*. 18:847-55.

Burgel, P.R. and Nadel, J.A. (2004). Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium *Thorax*. 59:992-996.

Burgess, A.W. (2008). EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors*. 26:263-74.

Burgess, A.W., Cho, H.S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W. and Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 12:541-52.

C

Cabodi, S., Morello, V., Masi, A., Cicchi, R. and Broggio, C., Distefano, P., Brunelli, E., Silengo, L., Pavone, F., Arcangeli, A., Turco, E., Tarone, G., Moro, L. and Defilippi, P. (2008). Convergence of integrins and EGF receptor signaling via PI3K/Akt/FoxO pathway in early gene *egr-1* expression. *J. Cell. Physiol*. 218:294-303.

Cai, J., Xu, L., Tang, H., Yang, Q., Yi, X., Fang, Y., Zhu, Y. and Wang, Z. (2014). The Role of the PTEN/PI3K/Akt Pathway on Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *Oncologist*. [Epub ahead of print]

Calogero, A., Lombardi, V., De Gregorio, G., Porcellini, A., Ucci, S., Arcella, A., Caruso, R., Gagliardi, F.M., Gulino, A., Lanzetta, G., Frati L., Mercola, D. and Ragona, G. (2004). Inhibition of cell growth by EGR-1 in human primary cultures from malignant glioma. *Cancer Cell Int*. 4:1.

Campbell, G. (2002). Distalization of the *Drosophila* leg by graded EGF-receptor activity. *Nature*. 418:781-5.

Cao, X.M., Koski, R.A., Gashler, A., McKiernan, M., Morris, C.F., Gaffney, R., Hay, R.V. and Sukhatme, V.P. (1990). Identification and characterization of the *Egr-1* gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol Cell Biol*. 10:1931-9.

Carpenter, G., Lembach, K.J., Morrison, M.M. and Cohen, S. (1975). Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J Biol Chem*. 250:4297-4304.

Carranza, S., Littlewood, D.T., Clough, K.A., Ruiz-Trillo, I., Baguñà, J. and Riutort, M. (1998). A robust molecular phylogeny of the Tricladida (Platyhelminthes: Seriata) with a discussion on morphological synapomorphies. *Proc Biol Sci*. 265:631-40.

Cebrià, F. (2008). Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: an immunocytochemical study. *Neurosci Res*. 61:375-84.

- Cebrià, F., Guo, T., Jopek, J. and Newmark, P.A. (2007). Regeneration and maintenance of the planarian midline is regulated by a slit orthologue. *Dev Biol.* 307:394-406.
- Cebrià, F. and Newmark, P.A. (2007). Morphogenesis defects are associated with abnormal nervous system regeneration following roboA RNAi in planarians. *Development.* 134:833-7.
- Cebrià, F. (2007). Regenerating the central nervous system: how easy for planarians! *Dev Genes Evol.* 217:733-48.
- Cebrià, F. and Newmark, P.A. (2005). Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. *Development.* 132:3691-703.
- Cebrià, F., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T. and Agata, K. (2002a). Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev Growth Differ.* 44: 135-46.
- Cebrià, F., Kudome, T., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T. and Agata, K. (2002b). The expression of neural-specific genes reveals the structural and molecular complexity of the planarian central nervous system. *Mech Dev.* 116:199-204.
- Cebrià, F., Kobayashi, C., Umesono, Y., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Itoh, M., Taira, M., Sánchez Alvarado, A. and Agata, K. (2002c). FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature.* 419: 620-4.
- Cebrià, F. (2000). Determinació, diferenciació i restitució del patró cel·lular a planàries d'aigua dolça. Tesi doctoral. Departament de Genètica, Universitat de Barcelona.
- Cebrià, F., Bueno, D., Reigada, S. and Romero R. (1999). Intercalary muscle cell renewal in planarian pharynx. *Dev Genes Evol.* 209:249-53.
- Cebrià, F., Vispo, M., Newmark, P., Bueno, D. and Romero, R. (1997). Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian *Girardia tigrina*. *Development Genes and Evolution.* 207:306-316.
- Citri, A. and Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7:505-516.
- Clary, L.M. and Okkema, P.G. (2010). The EGR family gene *egrh-1* functions non-autonomously in the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *C. elegans*. *Development.* 137:3129-37.
- Cohen, S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem.* 237:1555-1562.
- Cole, A. J., Saffen, D. W., Baraban, J. M. and Worley, P. F. (1989). Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* 340: 474-476.
- Collins, J.J., Hou, X., Romanova, E.V., Lambrus, B.G., Miller, C.M., Saberi, A., Sweedler, J.V. and Newmark, P.A. (2010). Genome-wide analyses reveal a role for peptide hormones in planarian germline development. *PLoS Biol.* 8:e1000509.
- Coward, S.J. (1974). Chromatoid bodies in somatic cells of the planarian: observations on their behavior during mitosis. *Anat. Rec.* 180:533-545.

Bibliografia

Cowles, M.W., Brown, D.D., Nisperos, S.V., Stanley, B.N., Pearson, B.J. and Zayas, R.M. (2013). Genome-wide analysis of the bHLH gene family in planarians identifies factors required for adult neurogenesis and neuronal regeneration. *Development*. 140:4691-702.

Crosby, S.D., Puetz, J.J., Simburger, K.S., Fahrner, T.J. and Milbrandt, J. (1991). The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol Cell Biol*. 11:3835-41.

Cummings, S.G. and Bode, H.R. (1984). Head regeneration and polarity reversal in *Hydra attenuata* can occur in the absence of DNA synthesis. *Roux's Arch. Dev. Biol*. 194:79-86.

Currie, K.W. and Pearson, B.J. (2013). Transcription factors *lhx1/5-1* and *pitx* are required for the maintenance and regeneration of serotonergic neurons in planarians. *Development*. 140:3577-88.

Curtis, W.C. and Hickman, J. (1925). Effects of X-rays and radium upon regeneration in planarians. *Anat Rec*. 34:145-146.

Ch

Chandebois, R. (1980). The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian regeneration. II- Distalization. *Dev. Growth. Differ*. 22:693-704.

Chandra, A., Lan, S., Zhu, J., Siclari, V. A., Qin, L. (2013). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling promotes proliferation and survival in osteoprogenitors by increasing early growth response 2 (EGR2) expression. *J Biol Chem*. 288, 20488-98.

Chavrier, P., Zerial, M., Lemaire, P., Almendral, J., Bravo, R. and Charnay, P. (1988). A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *EMBO J*. 7:29-35.

Chen, C.C., Wang, I.E. and Reddien, P.W. (2013). *Pbx* is required for pole and eye regeneration in planarians. *Development*. 140:719-29.

Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J.C. and Galliot, B. (2009). Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. *Dev Cell*. 17:279-89.

Child, C.M. (1941). Problems and patterns of development. University Chicago Press, Chicago. Search Google Scholar.

Child, C.M. (1903). Studies on regulation. III. Regulative destruction of zooids and parts of zooids in *Stenostoma*. *Archiv f. Entwicklungsmechanik*. 17:1–40.

Chin, Y.E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R.A. and Fu, X.Y. (1997). Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol*. 17:5328-37.

Chong, C.R. and Jänne, P.A. (2013). The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med*. 19:1389-400.

Chong, T., Stary, J.M., Wang, Y. and Newmark, P.A. (2011). Molecular markers to characterize the hermaphroditic reproductive system of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *BMC Dev Biol*. 11:69.

D

- Dahlberg, C., Auger, H., Dupont, S., Sasakura, Y., Thorndyke, M. and Joly, J.S. (2009). Refining the *Ciona intestinalis* model of central nervous system regeneration. *PLoS One*. 4:e4458.
- Dalyell, J.G. (1814). "Observations on some interesting phenomena in animal physiology, exhibited by several species of planariae". London.
- Dent, P. (2014). Crosstalk between ERK, AKT, and cell survival. *Cancer Biol Ther*. 15:245-246.
- Dinsmore, C.E. (1991). *A History of Regeneration Research. Milestones in the Evolution of a Science*. Cambridge University Press.
- Dissous, C., Khayath, N., Vicogne, J. and Capron, M. (2006). Growth factor receptors in helminth parasites: signalling and host-parasite relationships. *FEBS Lett*. 580:2968-75.
- Dumstrei, K., Wang, F., Shy, D., Tepass, U. and Hartenstein, V. (2002). Interaction between EGFR signaling and DE-cadherin during nervous system morphogenesis. *Development*. 129:3983-94.
- Dussmann, P., Pagel, J.I., Vogel, S., Magnusson, T. and Zimmermann, R. (2011). Live in vivo imaging of Egr-1 promoter activity during neonatal development, liver regeneration and wound healing. *BMC Dev Biol*. 11:28.
- Dutt, A., Canevascini, S., Froehli-Hoier, E. and Hajnal, A. (2004). EGF signal propagation during *C. elegans* vulval development mediated by ROM-1 rhomboid. *PLoS Biol*. 2:e334.

E

- Edgecombe, G.D., Giribet, G., Dunn, C.W., Hejnal, A., Kristensen, R.M., Neves, R.C., Rouse, G.W., Worsaae, K. and Sørensen, M.V. (2010). Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Organisms, Diversity & Evolution*. 11:151-172.
- Egger, B., Gschwentner, R., Hess, M.W., Nimeth, K.T., Adamski, Z., Willems, M. (2009). The caudal regeneration blastema is an accumulation of rapidly proliferating stem cells in the flatworm *Macrostomum lignano*. *BMC Developmental Biology*. 9:41.
- Eisenhoffer, G.T., Kang, H. and Sánchez Alvarado, A. (2008). Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell*. 3:327-39.
- Elliott, S.A. and Sánchez Alvarado, A. (2012). The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2:301-26.
- Evans, D.J., Owlarn, S., Tejada Romero, B., Chen, C. and Aboobaker AA. (2011). Combining classical and molecular approaches elaborates on the complexity of mechanisms underpinning anterior regeneration. *PLoS One*. 6: e27927.

F

- Fernandez-Taboada, E., Moritz, S., Zeuschner, D., Stehling, M., Scholer, H. R., Salo, E. and Gentile, L. (2010). Smed-SmB, a member of the LSm protein superfamily, is essential for chromatoid body organization and planarian stem cell proliferation. *Development* 137, 1055-1065.

Bibliografia

Forsthoefel, D.J., Park, A.E. and Newmark, P.A. (2011). Stem cell-based growth, regeneration, and remodeling of the planarian intestine. *Dev Biol.* 356:445-59.

Fraguas, S., Barberán, S., Iglesias, M., Rodríguez-Esteban, G. and Cebrià, F. (2014). *egr-4*, a target of EGFR signaling, is required for the formation of the brain primordia and head regeneration in planarians. *Development.* 141:1835-47.

Fraguas, S., Barberán, S. and Cebrià, F. (2011). EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Dev Biol.* 354: 87-101.

Franquinet, R. and Martelli, I. (1981). Effects of serotonin and catecholamines on RNA synthesis in planarias; in vitro and in vivo studies. *Cell Diff.* 10:201-209.

Franquinet, R. (1979). Role de la serotonine et des catecholamines dans la regeneration de la planarie *Polycelis tenuis*. *J Embryol Exp. Morphol.* 51:85-95.

Franquinet, R., Le Moigne, A. and Hanoune, J. (1978). The adenylate cyclase system of planaria *Polycelis tenuis*: activation by serotonin and guanine nucleotides. *Biochim Biophys Acta.* 539:88-97.

Freeman M. (2009). Rhomboids: 7 years of a new protease family. *Semin Cell Dev Biol.* 20:231-9.

Friedländer, M.R., Adamidi, C., Han, T., Lebedeva, S., Isenbarger, T.A., Hirst, M., Marra, M., Nusbaum, C., Lee, W.L., Jenkin, J.C., Sánchez Alvarado, A., Kim, J.K. and Rajewsky, N. (2009). High-resolution profiling and discovery of planarian small RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:11546-51.

G

Galindo, M.I., Bishop, S.A., Greig, S. and Couso, J.P. (2002). Leg patterning driven by proximal-distal interactions and EGFR signaling. *Science.* 297:256-9.

Galliot, B. (2013). Injury-induced asymmetric cell death as a driving force for head regeneration in *Hydra*. *Dev Genes Evol.* 223:39-52.

Galliot, B. and Chera, S. (2010). The *Hydra* model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration. *Trends Cell Biol.* 20:514-23.

Galliot, B. and Ghila, L. (2010). Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Mol Reprod Dev.* 77:837-55.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W. and Ward, C.W. (2003). The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell.* 11:495-505.

Garza-Garcia, A.A., Driscoll, P.C. and Brockes, J.P. (2010). Evidence for the local evolution of mechanisms underlying limb regeneration in salamanders. *Integr Comp Biol.* 50:528-35.

Gashler, A.L., Swaminathan, S. and Sukhatme, V.P. (1993). A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor *Egr-1*. *Mol Cell Biol.* 13:4556-71.

Gaviño, M.A. and Reddien, P.W. (2011). A Bmp/Admp regulatory circuit controls maintenance and regeneration of dorsal-ventral polarity in planarians. *Curr Biol.* 21:294-9.

- Gilbertson, R.J., Perry, R.H., Kelly, P.J., Pearson, A.D. and Lunec, J. (1997). Prognostic significance of HER2 and HER4 co-expression in childhood medulloblastoma. *Cancer Res.* 57:3272-3280.
- Giribet, G., Distel, D.L., Polz, M., Sterrer, W. and Wheeler, W.C. (2000). Triploblastic relationships with emphasis on the acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cyclophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: a combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Syst Biol.* 49:539-62.
- Gómez, G.G., Wykosky, J., Zanca, C., Furnari, F.B. and Cavenee, W.K. (2013). Therapeutic resistance in cancer: microRNA regulation of EGFR signaling networks. *Cancer Biol Med.* 10:192-205.
- Gómez-Martín, D., Díaz-Zamudio, M., Galindo-Campos, M. and Alcocer-Varela, J. (2010). Early growth response transcription factors and the modulation of immune response: implications towards autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 9:454-8.
- Gong, R., Park, C.S., Abbassi, N.R. and Tang, S.J. (2006). Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 281:18802-15.
- González-Estévez, C., Felix, D.A., Smith, M.D., Paps, J., Morley, S.J., James, V., Sharp, T.V. and Aboobaker, A.A. (2012). SMG-1 and mTORC1 act antagonistically to regulate response to injury and growth in planarians. *PLoS Genet.* 8:e1002619.
- González-Estévez C. (2009). Autophagy meets planarians. *Autophagy.* 5:290-7.
- González-Estévez, C., Felix, D.A., Aboobaker, A.A. and Saló, E. (2007). Gtdap-1 and the role of autophagy during planarian regeneration and starvation. *Autophagy.* 3:640-2.
- González-Pérez, O., Romero-Rodriguez, R., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (2009). Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells.* 27:2032-43.
- González-Sastre, A., Molina, M.D. and Saló, E. (2012). Inhibitory Smads and bone morphogenetic protein (BMP) modulate anterior photoreceptor cell number during planarian eye regeneration. *Int J Dev Biol.* 56:155-63.
- Gorgoulis, V., Aninos, D., Mikou, P., Kanavaros, P., Karameris, A., Joordanoglou, J., Rasidakis, A., Veslemes, M., Ozanne, B. and Spandidos, D.A. (1992). Expression of EGF, TGF- α and EGFR in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res.* 12:1183-1187.
- Goss, R.J. (1956). The regenerative responses of amputated limbs to delayed insertion into the body cavity. *Anat Rec.* 126:283-97
- Grogg, M.W., Call, M.K., Okamoto, M., Vergara, M.N., Del Rio-Tsonis, K. and Tsonis, P.A. (2005). BMP inhibition-driven regulation of six-3 underlies induction of newt lens regeneration. *Nature.* 438:858-62.
- Gschwind, A., Fischer, O.M. and Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 4:361-70.
- Guedelhofer, O.C. and Sánchez Alvarado, A. (2012). Planarian immobilization, partial irradiation, and tissue transplantation. *J Vis Exp.* pii:4015.
- Guo, T., Peters, A.H. and Newmark, P.A. (2006). A Bruno-like gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Dev Cell.* 11:159-69.

Bibliografia

Gurley, K.A., Elliott, S.A., Simakov, O., Schmidt, H.A., Holstein, T.W. and Sánchez Alvarado, A. (2010). Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Dev Biol.* 347:24-39.

Gurley, K. A., Rink, J. C. and Sánchez Alvarado, A. (2008). Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science* 319: 323-7.

Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y. and Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature.* 453:314-21.

Gustafsson, M., Eriksson, K. and Hyden, A. (1995). Never ending growth and a growth factor. II. Immunocytochemical evidence for the presence of epidermal growth factor in a tapeworm. *Hydrobiologia.* 305: 229-233.

H

Han, M., Yang, X., Farrington, J.E. and Muneoka, K. (2003). Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice. *Development.* 130:5123-32.

Handberg-Thorsager, M., Fernandez, E. and Salo, E. (2008). Stem cells and regeneration in planarians. *Front Biosci.* 13:6374-94.

Haass, C. and Steiner, H. (2002). Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol.* 12:556-62.

Hay, E.D. and Coward, S.J. (1975). Fine structure studies on the planarian *Dugesia*. I. Nature of the 'neoblast' and other cell types in noninjured worms. *J. Ultrastruct. Res.* 50:1-21.

Hayashi, T., Asami, M., Higuchi, S., Shibata, N. and Agata, K. (2006). Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescent-activated cell sorting. *Dev. Growth Differ.* 48:371-380.

Hazan, R.B. and Norton, L. (1998). The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 273:9078-84.

Hejnol, A., Obst, M., Stamatakis, A., Ott, M., Rouse, G.W., Edgecombe, G.D., Martinez, P., Baguña, J., Bailly, X., Jondelius, U., Wiens, M., Müller, W.E., Seaver, E., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q., Giribet, G. and Dunn, C.W. (2009). Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc Biol Sci.* 276:4261-70.

Hermann, P.M., van Kesteren, R.E., Wildering, W.C., Painter, S.D., Reno, J.M., Smith, J.S., Kumar, S.B., Geraerts, W.P., Ericsson, L.H., Smit, A.B., Bulloch, A.G. and Nagle, G.T. (2000). Neurotrophic actions of a novel molluscan epidermal growth factor. *J Neurosci.* 20:6355-64.

Herms, J., Zurmöhle, U., Schlingensiepen, R., Brysch, W. and Schlingensiepen, K.H. (1994). Developmental expression of the transcription factor *zif268* in rat brain. *Neurosci Lett.* 165:171-4.

Hirschler, J. (1914). Über die Restitutions-und Involutionen voränge bei operierten Exemplaren von *Ciona intestinalis* Flem. (Teil I) nebst Bemerkungen über den Wert des Negativen für das Potenzproblem. *Arch mikr. Anat.* 85:205-227.

Holbro, T. and Hynes, N.E. (2004). ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44:195-217.

Holstein, T.W., Hobmayer, E. and Technau, U. (2003). Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Dev Dyn.* 226:257-67.

Hori, I. (1986). Ultrastructural observations on gastrodermal regeneration in the planarian *Dugesia japonica* (Turbellaria). *Hydrobiologia.* 132:217- 222.

Hori, I. and Kishida, Y. (2003). Quantitative changes in nuclear pores and chromatoid bodies induced by neuropeptides during cell differentiation in the planarian *Dugesia japonica*. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 35:439-44.

Howng, S.L., Hsu, H.C., Cheng, T.S., Lee, Y.L., Chang, L.K., Lu, P.J. and Hong YR. (2004). A novel ninein-interaction protein, CGI-99, blocks ninein phosphorylation by GSK3 β and is highly expressed in brain tumors. *FEBS Lett.* 566:162-8.

Hyman, L.H. (1951). *The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela the acoelomate Bilatevia.* McGraw-Hill, London and New York.

Hynes, N.E. and Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 5:341-54.

1

Iglesias, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Saló, E. and Adell, T. (2008). Silencing of *Smed-betacatenin1* generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* 135:1215-21.

Iglesias, M., Almuedo-Castillo, M., Aboobaker, A. A. and Saló, E. (2011). Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by the Wnt/ β -catenin pathway. *Dev Biol.* 358:68-78.

Ingle, D.J. and Baker, B.L. (1957). Histology and regenerative capacity of liver following multiple partial hepatectomies. *Proc Soc Exp Biol Med.* 95:813-5.

Inoue, T., Kumamoto, H., Okamoto, K., Umesono, Y., Sakai, M., Sánchez Alvarado, A. and Agata, K. (2004). Morphological and functional recovery of the planarian photosensing system during head regeneration. *Zoolog Sci.* 21:275-83.

Ishizuka, H., Maezawa, T., Kawauchi, J., Nodono, H., Hirao, Y., Nishimura, O., Nakagawa, H., Sekii, K., Tasaka, K., Tarui, H., Agata, K., Hoshi, M., Kobayashi, K., Sakakibara, Y. and Matsumoto M. (2007). The *Dugesia ryukyuensis* database as a molecular resource for studying switching of the reproductive system. *Zoolog Sci.* 24:31-7.

J

Jeffery, W.R. (2012). Siphon regeneration capacity is compromised during aging in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mech Ageing Dev.* 133:629-36.

Jones, J. E., Wang, L., Kropf, P. L., Duan, R. and Johnson, D. E. (2009) Src family kinase gene targets during myeloid differentiation: identification of the EGR-1 gene as a direct target. *Leukemia* 23:1933–1935.

Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A. and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature.* 464:606-9.

Bibliografia

Joseph, L.J., Le Beau, M.M., Jamieson, G.A. Jr., Acharya, S., Shows, T.B., Rowley, J.D. and Sukhatme, V.P. (1988). Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:7164-8.

Jutten, B. and Rouschop, K.M. (2014). EGFR signaling and autophagy dependence for growth, survival, and therapy resistance. *Cell Cycle*. 13:42-51.

K

Kato, K., Orii, H., Watanabe, K. and Agata, K. (2001). Dorsal and ventral positional cues required for the onset of planarian regeneration may reside in differentiated cells. *Dev Biol*. 233:109-21.

Kaufmann, K. and Thiel, G. (2002) Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *J Cell Biochem*. 85:381-91.

Kawakami, A. (2010). Stem cell system in tissue regeneration in fish. *Dev Growth Differ*. 52:77-87.

Kawamura, K., Tachibana, M. and Sunanaga, T. (2008). Cell proliferation dynamics of somatic and germline tissues during zooidal life span in the colonial tunicate *Botryllus primigenus*. *Dev Dyn*. 237:1812-25.

Karunagaran, D., Azahar, E., Beerli, D., Chen, X., Grass-Porta, D., Ratzin, B., Seger, R., Hynes, E. and Yarden, Y. (1996). ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications in breast cancer. *EMBO J*. 15:254-264.

Kew, T.Y., Bell, J.A., Pinder, S.E., Denley, H., Srinivasan, R., Gullick, W.J., Nicholson, R.I., Blamey, R.W. and Ellis, I.O. (2000). c-ErbB4 protein expression in human breast cancer. *Br. J. Cancer*. 82:1163-1170.

Khachigian, L.M., Anderson, K.R., Halnon, N.J., Gimbrone, M.A. Jr., Resnick, N. and Collins, T. (1997). Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shear-stress-response element in the PDGF A-chain promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17:2280-6.

Kharbanda, S., Nakamura, T., Stone, R., Hass, R., Bernstein, S., Datta, R., Sukhatme, V.P. and Kufe, D. (1991). Expression of the early growth response 1 and 2 zinc finger genes during induction of monocytic differentiation. *J Clin Invest*. 88:571-7.

Kikuchi, K., Holdway, J.E., Werdich, A.A., Anderson, R.M., Fang, Y., Egnaczyk, G.F., Evans, T., Macrae, C.A., Stainier, D.Y. and Poss, K.D. (2010). Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature*. 464:601-5.

Klein, T. and Campos-Ortega, J.A. (1997). klumpfuss, a Drosophila gene encoding a member of the EGR family of transcription factors, is involved in bristle and leg development. *Development*. 124:3123-3134.

Knopf, F., Hammond, C., Chekuru, A., Kurth, T., Hans, S., Weber, C.W., Mahatma, G., Fisher, S., Brand, M., Schulte-Merker, S. and Weidinger, G. (2011). Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. *Dev Cell*. 20:713-24.

Kobayashi, C., Kobayashi, S., Orii, H., Watanabe, K. and Agata, K. (1998). Identification of two distinct muscles in the planarian *Dugesia japonica* by their expression of myosin heavy chain genes. *Zool. Sci.* pp. 855-863.

Koonin, E.V., Makarova, K.S., Rogozin, I.B., Davidovic, L., Letellier, M.C. and Pellegrini, L. (2003). The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biol.* 4:R19.

Konstantinides, N. and Averof, M. (2014). A common cellular basis for muscle regeneration in arthropods and vertebrates. *Science.* 343:788-91.

Krane, I.M. and Leder, P. (1996). NDF/hereregulin induces persistence of terminal end buds and adenocarcinomas in the mammary glands of transgenic mice. *Oncogene.* 12:1781-8.

Kreshchenko, N.D., Sedelnikov, Z., Sheiman, I.M., Reuter, M., Maule, A.G. and Gustafsson, M.K. (2008). Effects of neuropeptide F on regeneration in *Girardia tigrina* (Platyhelminthes). *Cell Tissue Res.* 331:739-50.

Kumar, A., Godwin, J.W., Gates, P.B., Garza-Garcia, A.A. and Brockes, J.P. (2007). Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science.* 318:772-7.

Kumar, A. and Brockes, J. P. (2012). Nerve dependence in tissue, organ, and appendage regeneration. *Trends Neurosci.* 35:691-9.

Kragl, M. and Tanaka, E.M. (2009). Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) limb and tail amputation. *Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot5267.

Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Schnapp, E., Epperlein, H.H. and Tanaka, E.M. (2008). Novel insights into the flexibility of cell and positional identity during urodele limb regeneration. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 73:583-92.

Krane, I.M. and Leder, P. (1996). NDF/hereregulin induces persistence of terminal end buds and adenocarcinomas in the mammary glands of transgenic mice. *Oncogene.* 12:1781-1788.

Kreshchenko, N.D., Sedelnikov, Z., Sheiman, I.M., Reuter, M., Maule, A.G. and Gustafsson, M. (2008). Effects of neuropeptide F on regeneration in *Girardia tigrina* (Platyhelminthes). *Cell Tissue Res.* 331:739-50.

L

Lambert, S., Vind-Kezunovic, D., Karvinen, S. and Gniadecki, R. (2006). Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J Invest Dermatol.* 126:954-62.

Lapan, S.W. and Reddien, P.W. (2012). Transcriptome analysis of the planarian eye identifies ovo as a specific regulator of eye regeneration. *Cell Rep.* 2:294-307.

Lapan, S.W. and Reddien, P.W. (2011). dlx and sp6-9 Control optic cup regeneration in a prototypic eye. *PLoS Genet.* 7:e1002226.

Lee, J.R., Urban, S., Garvey, C.F. and Freeman M. (2001). Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell.* 107:161-171.

Lee, K.F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.C. and Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature.* 378:394-8.

Bibliografia

Lejard, V., Blais, F., Guerquin, M. J., Bonnet, A., Bonnin, M. A., Havis, E., Malbouyres, M., Bidaud, C.B., Maro, G., Gilardi-Hebenstreit, P., Rossert, J., Ruggiero, F. and Duprez, D. (2011). EGR1 and EGR2 involvement in vertebrate tendon differentiation. *J Biol Chem.* 286, 5855-67.

Lenicque, P.M. (1974). A mechanism of action of serotonin and noradrenaline on the regeneration of the planarian worm *Dugesia tigrina*. *Acta Zool.* 55:163-168.

Levin, M. (2009) Bioelectric mechanisms in regeneration: Unique aspects and future perspectives. *Semin Cell Dev Biol.* 20:543-56.

Li, Y.Q., Zeng, A., Han, X.S., Wang, C., Li, G., Zhang, Z.C., Wang, J.Y., Qin, Y.W., Jing, Q. (2011). Argonaute-2 regulates the proliferation of adult stem cells in planarian. *Cell Res.* 21:1750-4.

Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D.R., Bedford, J.S. and Li, C.Y. (2010). Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal.* 3:ra13.

Li, M.H. (2008). Effects of nonionic and ionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity of planarian. *Chemosphere.* 70:1796-803.

Linardou, H., Dahabreh, I., Bafaloukos, D., Kosmidis, P. and Murray, S. (2009). Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 6:352-366.

Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D. and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell.* 70:431-42.

Lyne, J.C., Melhem, M.F., Finley, G.G., Wen, D., Liu, N., Deng, D.H. and Salup, R. (1997). Tissue expression of neu differentiation factor/heregulin and its receptor complex in prostate cancer and its biologic effects on prostate cancer cells in vitro. *Cancer J. Sci. Am.* 3:21-30.

M

Margolis, B., Rhee, S.G., Felder, S., Mervic, M., Lyall, R., Levitzki, A., Ullrich, A., Zilberstein, A. and Schlessinger, J. (1989). EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell.* 57:1101-7.

Martin, G.R. (1998). The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.* 12:1571-86.

Martín-Durán, J.M., Monjo, F. and Romero, R. (2012). Planarian embryology in the era of comparative developmental biology. *Int J Dev Biol.* 56:39-48.

Martín-Durán, J.M., Duocastella, M., Serra, P. and Romero, R. (2008). New method to deliver exogenous material into developing planarian embryos. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 310:668-81.

Martínez, D.E. and Bridge, D. (2012). Hydra, the everlasting embryo, confronts aging. *Int J Dev Biol.* 56:479-87.

März, M., Seebeck, F. and Bartscherer, K. (2013). A Pitx transcription factor controls the establishment and maintenance of the serotonergic lineage in planarians. *Development.* 140:4499-509.

- McKanna, J.A. (1968a). Fine structure of the protonephridial system in planaria. I. Flame cells. *Z. Zellforsch.* 92:509-523.
- McKanna, J.A. (1968b). Fine structure of the protonephridial system in planaria. II. Ductules, collecting ducts and osmoregulatory cells. *Z. Zellforsch.* 92:524-535.
- Milbrandt, J. (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science.* 238:797-9.
- Miljkovic-Licina, M., Chera, S., Ghila, L. and Galliot, B. (2007). Head regeneration in wild-type hydra requires de novo neurogenesis. *Development* 134:1191-201.
- Mineta, K., Nakazawa, M., Cebria, F., Ikeo, K., Agata, K. and Gojobori, T. (2003). Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by comparative genomics analysis of planarian ESTs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:7666-71.
- Miura, H., Yanazawa, M., Kato, K. and Kitamura, K. (1997) Expression of a novel aristaless related homeobox gene 'Arx' in the vertebrate telencephalon, diencephalon and floor plate. *Mechanisms of Development.* 65:99-109.
- Modjtahedi, H. and Dean, C. (1994). The receptor for EGF and its ligands: Expression, prognostic value and target for therapy in cancer. *Int. J. Oncol.* 4: 277- 296.
- Molina, M.D., Neto, A., Maeso, I., Gómez-Skarmeta, J.L., Saló, E. and Cebrià, F. (2011). Noggin and noggin-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians. *Curr Biol.* 21:300-5.
- Molina, M. D., Saló, E. and Cebrià, F. (2007). The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians. *Dev Biol.* 311:79-94.
- Morgan, T.H. (1901). *Regeneration.* The Macmillan Company. New York.
- Morgan, T.H. (1900). Regeneration in planarian. *Arch. Entw. Mech. Org.* 10:58-119.
- Morgan, T.H. (1898). Experimental studies of the regeneration of planaria maculata. *Archiv für Entwicklungsmechanik der organismen.* 7:364-397.
- Morrison, J.I., Löff, S., He, P. and Simon, A. (2006). Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population. *J Cell Biol.* 172:433-40.
- Morita, M., Best, J. and Noel, J. (1969). Electron microscopic studies of planarian regeneration. I. Fine structure of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. *J. Ultrastruct. Res.* 27:7-23.
- Moscatello, D. K. Holgado-Madruga, M., Godwin, A.K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P.W., Biegel, J.A., Hayes, R.L. and Wong, A.J. (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumours. *Cancer Res.* 55:5536-5539.
- Muneoka, K., Han, M. and Gardiner, D.M. (2008). Regrowing Human Limbs. *Scientific American.* 298:56-63.

N

- Nacu, E. and Tanaka, E.M. (2011). Limb regeneration: a new development?. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:409-40.

Bibliografia

- Nagaraj, R. and Banerjee, U. (2007). Combinatorial signaling in the specification of primary pigment cells in the *Drosophila* eye. *Development*. 134:825-31.
- Nakamura, T., Mito, T., Miyawaki, K., Ohuchi, H. and Noji, S. (2008). EGFR signaling is required for re-establishing the proximodistal axis during distal leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus* nymph. *Dev Biol*. 319:46-55.
- Nakazawa, M., Cebrià, F., Mineta, K., Ikeo, K., Agata, K. and Gojobori T. (2003). Search for the evolutionary origin of a brain: planarian brain characterized by microarray. *Mol Biol Evol*. 20:784-91.
- Newmark, P.A., Reddien, P.W., Cebrià, F. and Sánchez Alvarado, A. (2003). Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 Suppl 1:11861-5.
- Newmark, P.A. and Sánchez Alvarado, A. (2002). Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat Rev Genet*. 3:210-9.
- Newmark, P.A. and Sánchez Alvarado, A. (2000). Bromodeoxyuridine specially labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol*. 220:142-153.
- Nilsson Sköld, H. and Obst, M. (2011). Potential for clonal animals in longevity and ageing studies. *Biogerontology*. 12:387-96.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F. and Salomon, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 366:2-16.

O

- O'Donovan, K. J., Tourtellotte, W. G., Millbrandt, J., Baraban, J. M. (2009). The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci*. 22:167-73.
- Okamoto, K., Takeuchi, K. and Agata K. (2005). Neural projections in planarian brain revealed by fluorescent dye tracing. *Zoolog Sci*. 22:535-46.
- Onal, P., Grün, D., Adamidi, C., Rybak, A., Solana, J., Mastrobuoni, G., Wang, Y., Rahn, H. P., Chen, W., Kempa, S., Ziebold, U. and Rajewsky, N. (2012). Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *EMBO J*. 31: 2755-69.
- Ono, M. and Kuwano, M. (2006). Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res*. 12:7242-51.
- Orii, H. and Watanabe, K. (2007). Bone morphogenetic protein is required for dorso-ventral patterning in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Growth Differ*. 49:345-9.
- Orii, H., Mochii, M. and Watanabe, K. (2003). A simple "soaking method" for RNA interference in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Genes Evol*. 213:138-41.
- Orii, H., Ito, H. and Watanabe, K. (2002). Anatomy of the planarian *Dugesia japonica* I. The muscular system revealed by antisera against myosin heavy chains. *Zoolog Sci*. 19:1123-31.

Ouellette, A.J., Malt, R.A., Sukhatme, V.P. and Bonventre, J.V. (1990). Expression of two "immediate early" genes, Egr-1 and c-fos, in response to renal ischemia and during compensatory renal hypertrophy in mice. *J Clin Invest.* 85:766-71.

Oviedo, N.J., Morokuma, J., Walentek, P., Kema, I.P., Gu, M.B., Ahn, J.M., Hwang, J.S., Gojobori, T. and Levin, M. (2010). Long-range neural and gap junction protein-mediated cues control polarity during planarian regeneration. *Dev Biol.* 339:188-99.

Oviedo, N.J. and Levin, M. (2007). smedinx-11 is a planarian stem cell gap junction gene required for regeneration and homeostasis. *Development.* 134:3121-31.

Osaki, L.H., Figueiredo, P.M., Alvares, E.P. and Gama, P. (2011). EGFR is involved in control of gastric cell proliferation through activation of MAPK and Src signalling pathways in early-weaned rats. *Cell Prolif.* 44:174-82.

P

Pagel, J.I. and Deindl, E. (2011). Early growth response 1--a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades. *Indian J Biochem Biophys.* 48:226-35.

Pearson, B.J. and Alvarado, A. (2010). A planarian p53 homolog regulates proliferation and self-renewal in adult stem cell lineages. *Development.* 137:213-21.

Pedersen, K.J. (1963). Slime-secreting cells of planarians. *Ann N Y Acad Sci.* 106:424-443.

Peiris, T.H., Weckerle, F., Ozamoto, E., Ramirez, D., Davidian, D., García-Ojeda, M.E. and Oviedo, N.J. (2012). TOR signaling regulates planarian stem cells and controls localized and organismal growth. *J Cell Sci.* 125:1657-65.

Pellettieri, J., Fitzgerald, P., Watanabe, S., Mancuso, J., Green, D.R. and Sánchez Alvarado, A. (2010). Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev Biol.* 338:76-85.

Perera, R.M., Narita, Y., Furnari, F.B., Gan, H.K., Murone, C., Ahlqvist, M., Luwor, R.B., Burgess, A.W., Stockert, E., Jungbluth, A.A., Old, L.J., Caveness, W.K., Scott, A.M. and Johns, T.G. (2005). Treatment of human tumor xenografts with monoclonal antibody 806 in combination with a prototypical epidermal growth factor receptor-specific antibody generates enhanced antitumor activity. *Clin Cancer Res.* 11:6390-9.

Pérez-Cadahía, B., Drohic, B. and Davie, J. R. (2011). Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochem Cell Biol.* 89:61-73.

Pérez-González, A., Rodríguez, A., Huarte, M., Salanueva, I.J. and Nieto A. (2006). hCLE/CGI-99, a human protein that interacts with the influenza virus polymerase, is a mRNA transcription modulator. *J Mol Biol.* 362:887-900.

Petersen, C.P. and Reddien, P.W. (2011). Polarized notum activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration. *Science* 332:852-5.

Petersen, C.P. and Reddien, P.W. (2009). A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:17061-6.

Petersen, C.P. and Reddien, P.W. (2008). Smed-betacatenin-1 is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. *Science.* 319:327-30.

Bibliografia

Pickhard, A.C., Margraf, J., Knopf, A., Stark, T., Piontek, G., Beck, C., Boulesteix, A.L., Scherer, E.Q., Pigorsch, S., Schlegel, J., Arnold, W. and Reiter, R. (2011). Inhibition of radiation induced migration of human head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways. *BMC Cancer*. 11:388.

Pineda, D., Rossi, L., Batistoni, R., Salvetti, A., Marsal, M., Gremigni, V., Falleni, A., Gonzalez-Linares, J., Deri, P. and Saló, E. (2002). The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax6 independent. *Development*. 129:1423-34.

Pineda, D., Gonzalez, J., Callaerts, P., Ikeo, K., Gehring, W.J. and Salo, E. (2000). Searching for the prototypic eye genetic network: Sine oculis is essential for eye regeneration in planarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 4525-9.

Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G. and Shoyab, M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:1746-50.

Plowman, G.D., Whitney, G.S., Neubauer, M.G., Green, J.M., McDonald, V.L., Todaro, G.J. and Shoyab, M. (1990). Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:4905-9.

Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N. and Sadek, H.A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 331:1078-80.

Poss, K.D. (2010). Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet*. 11:710-22.

R

Randolph, H. (1897). Observations and experiments on regeneration in planarians. *Arch EntwMech Org* 5: 352-372.

Reddien PW. (2013). Specialized progenitors and regeneration. *Development*. 140: 951-7.

Reddien, P.W., Bermange, A.L., Kicza, A.M. and Sánchez Alvarado, A. (2007). BMP signaling regulates the dorsal planarian midline and is needed for asymmetric regeneration. *Development*. 134:4043-51.

Reddien P.W., Oviedo N.J., Jennings J.R., Jenkin J.C. and Sánchez Alvarado A. (2005). *Science*. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. 310:1327-30.

Reddien, P.W. and Sánchez Alvarado, A. (2004). Fundamentals of planarian regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:725-57.

Reisinger, E. and Kelbetz, S. (1964). Fine structure and discharge mechanism of rhabdites. *Z Wiss Mikrosk*. 65:472-508.

Reuter, M. and Gustafsson, M. (1996). Neuronal signal substances in asexual multiplication and development in flatworms. *Cell Mol Neurobiol*. 16:591-616.

Reuter, M. and Kuusisto, A. (1992). Growth factors in asexually reproducing catenulida and macrostomida (Plathelminthes)? *Zoomorphology*. 112:155-165.

Reyer, R.W. (1954). Regeneration of the lens in the amphibian eye. *Q Rev Biol*. 29:1-46.

- Riese, D.J. and Stern, D.F. (1998). Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays*. 20:41-8.
- Rieger, R., Tyler, S., Smith III, J. P. S. and Rieger, G. E. (1991). Platyhelminthes: Turbellaria. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. 3 (ed. F. W Harrison and B. J. Bogitsh), pp. 7-140. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Rink, J.C., Vu, H.T. and Sánchez Alvarado, A. (2011). The maintenance and regeneration of the planarian excretory system are regulated by EGFR signaling. *Development* 138, 3769-80.
- Rink, J.C., Gurley, K.A., Elliott, S.A. and Sánchez Alvarado, A. (2009). Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia. *Science* 326:1406-10.
- Roberts, P.J. and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 26: 3291-3310.
- Roberts-Galbraith, R.H. and Newmark, P.A. (2013). Follistatin antagonizes activin signaling and acts with notum to direct planarian head regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:1363-8.
- Romero, R. and Baguñà, J. (1991). Quantitative cellular analysis of growth and reproduction in freshwater planarians (Turbellaria; Tricladida). I. A cellular description of the intact organism. *Inv Repr Dev*. 19:157-165.
- Ross, J.S. and Fletcher, J.A. (1998). The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*. 16:413-428.
- Rouhana, L., Vieira, A.P., Roberts-Galbraith, R.H. and Newmark, P.A. (2012). PRMT5 and the role of symmetrical dimethylarginine in chromatoid bodies of planarian stem cells. *Development*. 139:1083-94.
- Rouhana, L., Shibata, N., Nishimura, O. and Agata, K. (2010). Different requirements for conserved post-transcriptional regulators in planarian regeneration and stem cell maintenance. *Dev. Biol.* 341:429-443.
- Riutort, M., Lázaro, E.M., Álvarez-Presas, M., Solà, E., Paps, J. (2012) Evolutionary history of the Tricladida and the Platyhelminthes: an up-to-date phylogenetic and systematic account. *International Journal of Developmental Biology*. Review 56:5-17.
- Russo, M.W., Sevetson, B.R. and Milbrandt, J. (1995). Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 92:6873-6877.
- Ryoo, H.D., Gorenc, T. and Steller, H. (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the jnk and the wingless signaling pathways. *Dev Cell*. 7:491-501.

S

- Sakai, F., Agata, K., Orii, H. and Watanabe, K. (2000). Organization and regeneration ability of spontaneous supernumerary eyes in planarians -eye regeneration field and pathway selection by optic nerves-. *Zoolog Sci*. 17:375-81.
- Saló, E. and Batistoni, R. (2008). Planarian eye, a simple and plastic system with great regenerative capacity. *Animal models in eye research*. ed. P.A. Tsonis Book Chapter: Elsevier.
- Saló, E. (2006). The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *Bioessays*. 28:546-59.

Bibliografia

- Saló, E., Pineda, D., Marsal, M., Gonzalez, J., Gremigni, V. and Batistoni, R. (2002). Genetic network of the eye in Platyhelminthes: expression and functional analysis of some players during planarian regeneration. *Gene*. 287:67-74.
- Saló, E. and Baguñà, J. (2002). Regeneration in planarians and other worms: New findings, new tools, and new perspectives. *J Exp Zool*. 292:528-39.
- Saló, E. and Baguñà, J. (1986). Stimulation of cellular proliferation and differentiation in the intact and regenerating planarian *Dugesia*(G) *tigrina* by the neuropeptide substance P. *J Exp Zool*. 237:129-35.
- Saló, E. and Baguñà, J. (1985). Cell movement in intact and regenerating planarians. Quantitation using chromosomal, nuclear and cytoplasmic markers. *J Embryol exp Morph*. 89:57-70.
- Saló, E. and Baguñà, J. (1984). Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia* (G) *tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *J Embryol Exp Morphol*. 83:63-80.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F. and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 19:183– 232.
- Sánchez Alvarado, A. (2006). Planarian regeneration: its end is its beginning. *Cell*. 124:241-5.
- Sánchez Alvarado, A. and Tsonis, P.A. (2006). Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet*. 7:873-84.
- Sánchez Alvarado A, Newmark PA, Robb SM, Juste R. (2002). The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development*. 129:5659-65.
- Sánchez Alvarado, A. (2000). Regeneration in the metazoans: why does it happen? *Bioessays*. 22:578-90.
- Sánchez Alvarado, A. and Newmark, P.A. (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:5049-54.
- Sánchez Alvarado, A. and Newmark, P.A. (1998). The use of planarians to dissect the molecular basis of metazoan regeneration. *Wound Repair Regen*. 6:413-20.
- Sandmann, T., Vogg, M. C., Owlarn, S., Boutros, M. and Bartscherer, K. (2011). The head-regeneration transcriptome of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Genome Biol*. 12: R76.
- Sato, Y., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Hoshi, M. and Negishi, S. (2005). Comparative study of eye defective worm 'menashi' and regenerating wild-type in planarian, *Dugesia ryukyuensis*. *Pigment Cell Res*. 18:86-91.
- Scaltriti, M. and Baselga, J. (2006). The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 12:5268-72.
- Scher, H. I., Sarkis, A., Reuter, V., Cohen, D., Netto, G., Petrylak, D., Lianes, P., Fuks, Z., Mendelsohn, J. and Cordon-Cardo, C. (1995). Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- α in the progression of prostatic neoplasms. *Clin. Cancer Res*. 1:545– 550.
- Scimone, M.L., Srivastava, M., Bell, G.W. and Reddien, P.W. (2011). A regulatory program for excretory system regeneration in planarians. *Development*. 138:4387-98.

- Scimone, M.L., Meisel, J. and Reddien, P.W. (2010). The Mi-2-like Smed-CHD4 gene is required for stem cell differentiation in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Development*. 137:1231-41.
- Shintani, S., Funayama, T., Yoshihama, Y., Alcalde, R.E. and Matsumura, T. (1995). Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 95:79-83.
- Shoemaker, C.B., Ramachandran, H., Landa, A., dos Reis, M.G. and Stein, L.D. (1992). Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor. *Mol Biochem Parasitol.* 53:17-32.
- Shuai, K. and Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 3:900-11.
- Sibilia, M. and Wagner, E.F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science.* 269:234-8.
- Silva, C.M. (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene.* 23:8017-23.
- Singer, M. (1952). The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity. *Q Rev Biol.* 27:169-200.
- Singer, M. and Craven, L. (1948). The growth and morphogenesis of the regenerating forelimb of adult *Triturus* following denervation at various stages of development. *J. Exp. Zool.* 108:279-308.
- Sobkow, L., Epperlein, H.H., Herklotz, S., Straube, W.L., Tanaka, E.M. (2006). A germline GFP transgenic axolotl and its use to track cell fate: dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration. *Dev Biol.* 290:386-97.
- Solana, J., Kao, D., Mihaylova, Y., Jaber-Hijazi, F., Malla, S., Wilson, R. and Aboobaker, A. (2012). Defining the molecular profile of planarian pluripotent stem cells using a combinatorial RNAseq, RNA interference and irradiation approach. *Genome Biol.* 13:R19.
- Solana, J., Lasko, P. and Romero, R. (2009). Spoltud-1 is a chromatoid body component required for planarian long-term stem cell self-renewal. *Dev. Biol.* 328: 410-421.
- Spallanzani, L. (1769). "Prodomo di un opera da imprimersi sopra la riproduzioni animali" (An essay on animal reproduction). Maty, M. trans. London: T.Becket & de Hondt.
- Spiliotis, M., Kroner, A. and Brehm, K. (2003). Identification, molecular characterization and expression of the gene encoding the epidermal growth factor receptor orthologue from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Gene.* 323:57-65.
- Stein, R.A. and Staros, J.V. (2006). Insights into the evolution of the ErbB receptor family and their ligands from sequence analysis. *BMC Evol Biol.* 6:79.
- Stéphan-Dubois, F. and Lender, T. (1956). Corrélations humorales dans la régénération de planaires paludicoles. *Ann. des Sc. Nat. Zool.* 18, 223-230.
- Stéphan-Dubois, F. and Wolff, E. (1947). Sur une méthode d'irradiation localisée permettant de mettre en évidence la migration des cellules de régénération chez les planaries. *Soc. Biol. Strasbourg.* 141:903-909.

Bibliografia

Sukhanova, M.J., Steele, L.J., Zhang, T., Gordon, G.M. and Du, W. (2011). RBF and Rno promote photoreceptor differentiation onset through modulating EGFR signaling in the *Drosophila* developing eye. *Dev Biol.* 359:190-8.

Sukhatme, V. P., Cao, X. M., Chang, L. C., Tsai-Morris, C. H. Stamenkovich, D., Ferreira, P. C., Cohen, D. R., Edwards, S. A., Shows, T. B. and Curran, T. (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with *c-fos* during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell.* 53: 37-43.

Sukhatme, V. P., Kartha, S., Toback, F. G., Taub, R., Hoover, R. G., Tsai-Morris, C. H. (1987). A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogene Res.* 1: 343-55.

Sun, L., Huan, P., Wang, H., Liu, F. and Liu, B. (2014). An EGFR gene of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* functions in wound healing and promotes cell proliferation. *Mol Biol Rep.* [Epub ahead of print]

Svaren, J., Sevetson, B.R., Apel, E.D., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C. and Milbrandt, J. (1996). NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol.Cell.Biol.* 16:3545–3553.

T

Takeda, H., Nishimura, K. and Agata, K. (2009). Planarians maintain a constant ratio of different cell types during changes in body size by using the stem cell system. *Zoolog Sci.* 26: 805-13.

Tarcic, G., Avraham, R., Pines, G., Amit, I., Shay, T., Lu, Y., Zwang, Y., Katz, M., Ben-Chetrit, N., Jacob-Hirsch, J., Virgilio, L., Rechavi, G., Mavrothalassitis, G., Mills, G.B., Domany, E. and Yarden, Y. (2012). EGR1 and the ERK-ERF axis drive mammary cell migration in response to EGF. *FASEB J.* 26:1582-92.

Tasaki, J., Shibata, N., Nishimura, O., Itomi, K., Tabata, Y., Son, F., Suzuki, N., Araki, R., Abe, M., Agata, K. and Umesono, Y. (2011). ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development.* 138: 2417-27.

Technau, U. and Bode, H.R. (1999). HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in *Hydra*. *Development.* 126:999-1010.

Technau, U. and Steele, R.E. (2011). Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Development.* 138:1447-58.

Thiel G, Kaufmann K, Magin A, Lietz M, Bach K, Cramer M. (2000). The human transcriptional repressor protein NAB1: expression and biological activity. *Biochim Biophys Acta.* 493:289-301.

Thomas, S.M., Coppelli, F.M., Wells, A., Gooding, W.E., Song, J., Kassis, J., Drenning, S.D. and Grandis, J.R. (2003). Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 63:5629-35.

Todd, T.J. (1823). On the process of reproduction of the members of the aquatic salamander. *Quarterly Journal of Science, Literature and Arts.* 16:84-96.

Trembley, A. (1744). Observations and experiments upon the fresh-water polypus. *Phylos. Trans. R. Soc. Lond.* 42:283-291.

Troiani, T., Schettino, C., Martinelli, E., Morgillo, F., Tortora, G. and Ciardiello, F. (2008). The use of xenograft models for the selection of cancer treatments with the EGFR as an example. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 65:200-11.

Tsai, J. C., Liu, L., Guan, J., and Aird, W. C. (2000). The *egr-1* gene is induced by epidermal growth factor in ECV304 cells and primary endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 279:1414-24.

Tseng, A.S., Adams, D.S., Qiu, D., Koustubhan, P. and Levin, M. (2007) Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 301:62–69.

Tsonis, P.A. (2000). Regeneration in vertebrates. *Dev Biol.* 221:273-84.

Tu, K.C., Pearson, B.J. and Sánchez Alvarado, A. (2012). TORC1 is required to balance cell proliferation and cell death in planarians. *Dev Biol.* 365:458-69.

U

Ugajin, A., Kunieda, T. and Kubo, T. (2013). Identification and characterization of an Egr ortholog as a neural immediate early gene in the European honeybee (*Apis mellifera* L.). *Febs Lett.* 587:3224-30.

Umesono, Y., Tasaki, J., Nishimura, Y., Hrouda, M., Kawaguchi, E., Yazawa, S., Nishimura, O., Hosoda, K., Inoue, T. and Agata, K. (2013). The molecular logic for planarian regeneration along the anterior-posterior axis. *Nature*. 500:73-6.

Umesono Y, Watanabe K, Agata K. (1999). Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes. *Dev Genes Evol.* 209:31-9.

Umesono, Y., Watanabe, K. and Agata, K. (1997). A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev Growth Differ.* 39:723-7.

Urban, S. and Dickey, S.W. (2011). The rhomboid protease family: a decade of progress on function and mechanism. *Genome Biol.* 12:231.

Urban, S. and Freeman, M. (2002). Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution. *Curr Opin Genet Dev.* 12:512-8.

Urban, S., Lee, J.R. and Freeman, M. (2001). *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell*. 107:173–182.

V

Van Buskirk, C. and Sternberg, P.W. (2010). Paired and LIM class homeodomain proteins coordinate differentiation of the *C. elegans* ALA neuron. *Development*. 137:2065-74.

Varga, M., Sass, M., Papp, D., Takács-Vellai, K., Kobolak, J., Dinnyés, A., Klionsky, D.J. and Vellai, T. (2014). Autophagy is required for zebrafish caudal fin regeneration. *Cell Death Differ.* 21:547-56.

Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*. 270:484-7.

Bibliografia

Vessey, C.J. and de la Hall, P.M. (2001). Hepatic stem cells: a review. *Pathology*. 33:130-41.

Voskoboynik, A., Soen, Y., Rinkevich, Y., Rosner, A., Ueno, H., Reshef, R., Ishizuka, K.J., Palmeri, K.J., Moiseeva, E., Rinkevich, B. and Weissman, I.L. (2008). Identification of the endostyle as a stem cell niche in a colonial chordate. *Cell Stem Cell*. 3:456-64.

Vriz, S., Reiter, S. and Galliot B3. (2014). Cell death: a program to regenerate. *Curr Top Dev Biol*. 108:121-51.

W

Wagner, D.E., Wang, I.E. and Reddien, P.W. (2011). Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science*. 332:811-6.

Wagner, B., Natarajan, A., Grünaug, S., Kroismayr, R., Wagner, E.F. and Sibilio, M. (2006). Neuronal survival depends on EGFR signaling in cortical but not midbrain astrocytes. *EMBO J*. 25:752-62.

Wagner, D.E., Ho, J.J. and Reddien, P.W. (2012). Genetic regulators of a pluripotent adult stem cell system in planarians identified by RNAi and clonal analysis. *Cell Stem Cell*. 10:299-311.

Walker, F., Kato, A., Gonez, L.J., Hibbs, M.L., Pouliot, N., Levitzki, A. and Burgess, A.W. (1998). Activation of the Ras/Mitogen-Activated protein kinase pathway by kinase-defective Epidermal Growth Factor Receptors results in cell survival but not proliferation *Mol. Cell. Biol*. 18:7192-7204.

Wang, C., Guo, X. and Xi, R. (2014). EGFR and Notch signaling respectively regulate proliferative activity and multiple cell lineage differentiation of *Drosophila* gastric stem cells. *Cell Res*. doi: 10.1038/cr.2014.27.

Wang, Y., Zayas, R.M., Guo, T. and Newmark, P.A. (2007). nanos function is essential for development and regeneration of planarian germ cells. *Proc Natl Acad Sci*. 104:5901-5906.

Wang, X., McCullough, K., Franke, T. and Nikki, J. (2000). Epidermal Growth Factor Receptor-dependent Akt Activation by Oxidative Stress Enhances Cell Survival. *Holbrook The Journal of Biological Chemistry*. 275:14624-14631.

Wasserman, J.D. and Freeman, M. (1997). Control of EGF receptor activation in *Drosophila*. *Trends Cell Biol*. 7:431-6.

Weiss, S., Reynolds, B.A., Vescovi, A.L., Morshead, C., Craig, C.G., van der Kooy, D. (1996). Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci*. 19:387-93.

Wenemoser, D., Lapan, S. W., Wilkinson, A. W., Bell, G. W. and Reddien, P. W. (2012). A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes & Dev*. 26:988-1002.

Wenemoser, D. and Reddien, P.W. (2010). Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev Biol*. 344:979-91.

White, J.A., Boffa, M.B., Jones, B. and Petkovich, M. (1994). A zebrafish retinoic acid receptor expressed in the regenerating caudal fin. *Development*. 120:1861-72.

Wildering, W.C., Hermann, P.M. and Bulloch, A.G. (2001). *Lymnaea* epidermal growth factor promotes axonal regeneration in CNS organ culture. *J Neurosci*. 21:9345-54.

Witchley, J.N., Mayer, M., Wagner, D.E., Owen, J.H. and Reddien, P.W. (2013). Muscle cells provide instructions for planarian regeneration. *Cell Rep.* 4:633-41.

Wolff, E. and Stéphan-Dubois, F. (1948). Sur la migration des cellules de régénération chez les planaires. *Rev Suisse Zool* 55: 21-227.

Wong, R.W. and Guillaud, L. (2004). The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15:147-56.

Wong, A. J. Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89:2965–2969.

Woods, I.G., Wilson, C., Friedlander, B., Chang, P., Reyes, D.K., Nix, R., Kelly, P.D., Chu, F., Postlethwait, J.H. and Talbot, W.S. (2005). The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 15:1307-14.

X

Xia, W., Lau, Y.K., Zhang, H.Z., Xiao, F.Y., Johnston, D.A., Liu, A.R., Li, L., Katz, R.L., Hung, M.C. (1999). Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin. Cancer Res.* 5:4164-4174.

Y

Yamada, M., Ikeuchi, T. and Hatanaka, H. (1997). The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol.* 51:19-37.

Yamamoto, H. and Agata, K. (2011). Optic chiasm formation in planarian I: Cooperative netrin- and robo-mediated signals are required for the early stage of optic chiasm formation. *Dev Growth Differ.* 53:300-11.

Yamanaka, Y., Friess, H., Kobrin, M.S., Buchler, M., Beger, H.G. and Korc, M. (1993). Co-expression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumour aggressiveness. *Anticancer Res.* 13:565– 569.

Yan, S.F., Lu, J., Zou, Y.S., Soh-Won, J., Cohen, D.M., Buttrick, P.M., Cooper, D.R., Steinberg, S.F., Mackman, N., Pinsky, D.J. and Stern, D.M. (1999). Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J Biol Chem.* 274:15030-40.

Yang, L. and Baker, N.E. (2001). Role of the EGFR/Ras/Raf pathway in specification of photoreceptor cells in the *Drosophila* retina. *Development.* 128:1183-91.

Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:127-37.

Yazawa, S., Umesono, Y., Hayashi, T., Tarui, H. and Agata, K. (2009). Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:22329-34.

Yin, V.P. and Poss, K.D. (2008). New regulators of vertebrate appendage regeneration. *Curr Opin Genet Dev.* 18:381-6.

Bibliografia

Yoshida-Kashikawa, M., Shibata, N., Takechi, K. and Agata, K. (2007). DjCBC-1, a conserved DEAD box RNA helicase of the RCK/p54/Me31B family, is a component of RNA-protein complexes in planarian stem cells and neurons. *Dev. Dyn.* 236:3436-3450.

Yu, L., Lee, T., Lin, N. and Wolf, M.J. (2010). Affecting Rhomboid-3 function causes a dilated heart in adult *Drosophila*. *PLoS Genet.* 6:e1000969.

Yu, X., Sharma, K.D., Takahashi, T., Iwamoto, R. and Mekada, E. (2002). Ligand-independent dimer formation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a step separable from ligand-induced EGFR signaling. *Mol Biol Cell.* 13:2547-2557.

Z

Zayas, R.M., Cebrià, F., Guo, T., Feng, J. and Newmark, P.A. (2010). The use of lectins as markers for differentiated secretory cells in planarians. *Dev Dyn.* 239:2888-97.

Zayas, R.M., Hernández, A., Habermann, B., Wang, Y., Stary, J.M., Newmark, P.A. (2005). The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: analysis of ESTs from the hermaphroditic strain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18491-6.

Zettl, M., Adrain, C., Strisovsky, K., Lastun, V., and Freeman, M. (2011). Rhomboid Family Pseudoproteases use the ER Quality Control Machinery to Regulate Intercellular Signaling. *Cell.* 145:79-91.

Zhang, H., Ma, X., Shi, T., Song, Q., Zhao, H. and Ma, D. (2010). NSA2, a novel nucleolus protein regulates cell proliferation and cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun.* 391:651-8.

Annexes

Annex 1.

Caracterització funcional de les proteases intramembrana *rhomboids*

1.- Introducció

Els *rhomboids* són la família d'enzims més gran capaç d'hidrolitzar pèptids i que es troben sovint units a la membrana de l'aparell de Golgi. Es defineixen com proteases intramembrana, del tipus serina, conservades extraordinàriament en tota l'evolució, malgrat que només s'ha caracteritzat la seva funció en alguns organismes (Taula 1; Urban i Dickey, 2011). La majoria d'espècies bacterianes codifiquen únicament un *rhomboid*, tot i que hi ha espècies que en poden codificar dos o fins i tot tres. S'han identificat també en diferents espècies d'arqueobacteris alguns membres de la família dels *rhomboids* però la gran expansió es dona en els organismes multicel·lulars i en alguns protozous paràsits. El primer membre que es va descobrir d'aquesta família es va identificar a *Drosophila* (*rhomboid-1*) a principis del segle XXI (Urban i altres, 2001). El seu estudi s'ha centrat en analitzar el seu paper regulador durant l'activació del factor de creixement *Spitz*, l'homòleg de l'EGF a *Drosophila*, al permetre el seu alliberament i així poder activar el receptor EGFR (Urban i altres, 2001). Cal destacar però que, com succeeix a la resta de proteases intramembrana, les seves funcions són diverses: control transcripcional, senyalització cel·lular, proteòlisi de les adhesines (molècules

d'adhesió) o regulació del remodelatge de la membrana mitocondrial durant la invasió de paràsits, com pot ser el *P.falciparum* de la malària (Haass i Steiner, 2002; Urban i Freeman, 2002).

<i>rhomboid</i>	espècie	substrat	funció
RHBDL2	Homo sapiens	Thrombomodulin; EphrinB1,2,3; EGF	Migració cel·lular? Cancer?
PARL	Homo sapiens, Mus musculus	PINK1, altres	Anti-apoptosis
Rhomboid-1	<i>Drosophila</i>	Spitz, Keren	Via senyalització EGFR
Rhomboid-2/Stet	<i>Drosophila</i>	Gurken	Via senyalització EGFR
Rhomboid-3/Ru	<i>Drosophila</i>	Spitz, Keren	Via senyalització EGFR
Rhomboid-4	<i>Drosophila</i>	Spitz, Keren?	Via senyalització EGFR?
Rhomboid-7	<i>Drosophila</i>	DmOpa1-like, DmPINK1	Fusió mitocondrial
CeROM1	<i>C. elegans</i>	LIN-3L	Amplificació via senyalització EGFR (vulva)
AarA	<i>P. stuartii</i>	TatA	Activació translocació twin-arginina
Pcp1	<i>S. cerevisiae</i>	Mgm1, Ccp1	Fusió membrana mitocondrial
GlpG	<i>E.coli</i>	?	?
TgROM1	<i>Toxoplasma gondii</i>	?	Creixement
TgROM2	<i>T. gondii</i>	?	?
TgROM3	<i>T.gondii</i>	?	?
TgROM4	<i>T. gondii</i>	AMA1, MIC2, MIC6	Invasió
TgROM5	<i>T.gondii</i>	AMA1, MIC2, MIC6	Invasió
EhROM1	<i>Entamoeba histolytica</i>	Lectines	Fagocitosis, evasió immune
PfROM1	<i>Plasmodium sp.</i>	AMA1?	Invasió?, Creixement
PfROM4	<i>P. falciparum</i>	EBA175, TRAP, alters adhesines	Invasió
AtRBL2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	?	?
HiGlpG	<i>H.influenzae</i>	?	?
YqgP	<i>Bacillus subtilis</i>	?	?
PA3086	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	?	?
AqRho	<i>Aquifex aeolicus</i>	?	?

Taula 1. *Rhomboids* identificats en diferents espècies i les seves possibles funcions (adaptat de Freeman, 2009).

2.- Característiques estructurals dels *rhomboids*

En general, els *rhomboids* són proteïnes enzimàtiques amb la peculiaritat d'induir un tall intramembrana gràcies a dos residus serina-histidina (Freeman, 2004). Ara bé, s'ha vist que poden presentar certes diferències estructurals, classificant-se en tres formes topològiques diferents

(Koonin i altres 2003; Figura 1). La topologia bàsica està formada per sis dominis transmembrana (forma 6TM), present principalment en bacteris i en alguns organismes eucariotes. En segon lloc, alguns organismes (on s'hi inclouen 5 del 7 *rhomboids* de *Drosophila*, humans, ratolins i més rarament alguns bacteris) presenten un domini transmembrana addicional a l'extrem C-terminal (forma 6+1TM). Per últim, els *rhomboids* presents en alguns orgànuls d'origen endosimbiòtic presenten un setè domini transmembrana, però en aquest cas a l'extrem N-terminal (1+6TM), dintre d'aquest grup els més estudiats són els presents en el mitocondri, anomenats PARL (Freeman, 2009).

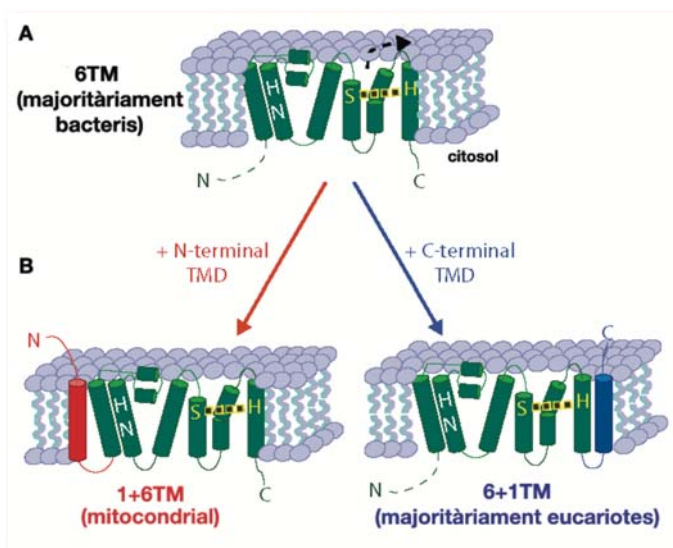


Figura 1. Formes topològiques que presenten els *rhomboids*.

(A) 6TM és la forma catalíticament activa més petita, amb 6 dominis transmembrana (TM). (B) Els *rhomboids* mitocondrials (PARL) presenten un domini TM addicional en l'extrem N-terminal (1+6TM, marcat amb vermell) i la majoria d'eucariotes el tenen en l'extrem C-terminal (6+1TM, marcat amb blau). Marcat amb groc el grup serina-histidina, important per la seva funció proteasa (adaptat de Urban i Dickey, 2011).

3.- *Rhomboids* inactius

Junt amb les tres topologies diferents que poden presentar els *rhomboids* (6TM, 6TM+1, 1+6TM) cal afegir una quarta forma estructural dins d'aquesta família, constituïda pels *rhomboids* inactius (*irho*), unes proteases altament conservades en el regne animal que impedeixen l'alliberació dels lligands EGF. Es caracteritzen per ser unes proteases estructuralment inactives perquè, tot i presentar una topologia 6+1TM com en el cas dels *rhomboids*, no tenen els residus catalítics (en la majoria de casos presenten una prolina en el lloc actiu, on hi hauria d'haver una serina). A més a més, presenten un extrem N-terminal molt extens i un "loop" més allargat entre el domini TM1 i el 2, conegut com el domini homòleg dels *irho* (IRHD) que conté 16 cisteïnes

conservades (Figura 2).

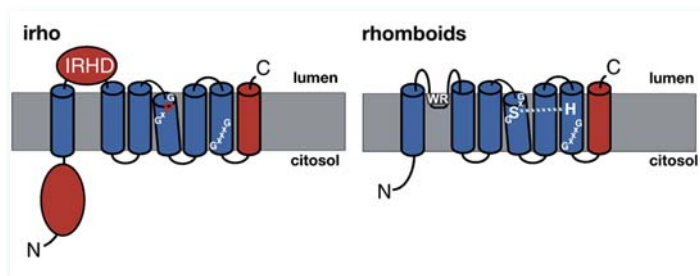


Figura 2. Estructura dels *irho* en comparació amb la dels *rhomboids*. Els *irho* es caracteritzen per la falta dels residus catalítics i per presentar un domini N terminal extens i un “loop” entre el TM1 i 2 més llarg (adaptat de Bergbold i Lemberg, 2013).

Els *irho* a *Drosophila* tenen la funció d’inactivar la via dels EGFR, degradant el lligand EGF, tot i així s’han presentat funcions oposades d’aquestes proteases, per exemple en el cas de l’*irho* homòleg dels humans on incrementa la secreció del lligand EGF. Per aquest motiu, davant d’aquestes evidents discrepàncies funcionals, cal aclarir els seu paper fisiològic en general (Urban i Dickey, 2002).

4. Activació de la via dels EGFR a través dels *rhomboids*

El mecanisme activador que presenten els *rhomboids* davant determinats factors de creixement es conserva al llarg de la evolució, des dels arqueobacteris fins als humans i s’ha descrit rigorosament en el cas de *Drosophila*. Així, s’ha demostrat que aquestes proteases intramembrana localitzades a l’aparell de Golgi, consten d’un domini activador situat a la bicapa lipídica de la membrana cel·lular, capaç d’alliberar el factor de creixement EGF mitjançant una proteòlisi intramembrana (Freeman, 2009). EGF es sintetitza inicialment com una proteïna transmembrana, que necessita ser alliberada per convertir-se en un lligand actiu (Figura 3).

Múltiples estudis han demostrat l’essencial funció dels *rhomboids* durant l’activació de la via de senyalització dels EGFR, a través de l’alliberament dels diferents lligands (Urban i Freeman, 2001; Lee i altres, 2001). A *Drosophila*, per exemple, formes mutants del *rhomboid-3* impedeixen l’alliberament de *spitz* i, com a conseqüència, apareixen determinats defectes durant el desenvolupament del cor (Yu i altres, 2010). En el cas de *C. elegans*, la pèrdua de funció d’un dels seus cinc *rhomboids* identificats, ROM-1, altera

l'activació de la via dels EGFR i impedeix un correcte desenvolupament de la vulva (Dutt i altres, 2004).

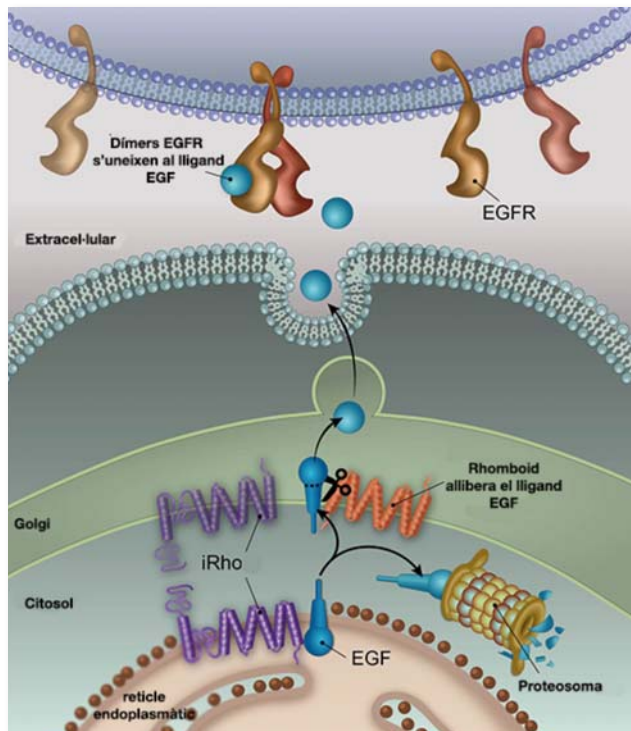


Figura 3. Esquema de l'activació del lligand EGF a través de les proteases *rhomboids*. Els *rhomboids* són essencials per alliberar el lligand EGF a l'aparell de Golgi i així activar la via dels EGFR. D'altra banda, els *irhomboids* (*irho*) impedeixen l'alliberació de l'EGF, retenint-lo al reticle endoplasmàtic (adaptat de Zettl i altres, 2011).

5.- Objectius

- Identificar possibles gens homòlegs dels *rhomboids* a *S. mediterranea*.
- Clonar i analitzar el patró d'expressió dels *rhomboids*.
- Caracteritzar la funció dels *rhomboids* identificats a *S. mediterranea*, a través d'experiments d'ARNi.

6.- *Rhomboids* identificats a planàries

Gràcies a cerques *in silico* contra el genoma de *S. mediterranea*, s'han identificat cinc gens homòlegs de la família dels *rhomboids*, els quals hem anomenat *Smed-rho-1*, 2, 3, 4 i 5. Anàlisis de les seqüències dels diferents *rhomboids* identificats a planàries, junt amb altres *rhomboids* descrits en altres espècies (*Drosophila*, *C.elegans*, *Mus musculus*), mostren la presència del domini *rhomboid* conservat en tots els casos (Figura 4).

Dro-rho-1	1	EIAIFAYDRTMPA-----QNFGLPVP	IPSDSVLVYR	PDRLQVWRFFSYMFLHANWF
Dro-rho-3	1	EVLVFLWVG-----ADPPEDSL	LVYR	PDQRLQLWRFLSYALLHASWL
Dro-rho-2	1	ELGFFVYHSVVTG-----EAAPRGPI	IPSDSMFIYR	PKRHEIWRFLFMVLHAGWL
Dro-rho-4	1	EIIMFLVDVIHFQDDPNYQDRIG--ESTSG	PAATLFIY	NPYKRYEGWRFFSYMFVHVIGIM
Celegans-1	1	QVGIFFFYWESDGGRSIWTDCAGCFVHHNHTAPGIF	IFAP	KLRGEAWRFFSYMFLHAGLN
Smed-rho-1	1	QMASFVFFYGLQLIHEDDPKNMLSW--TTGI	PRKSPLIFD	VHKRIEIRWFFSYMLTHQGYL
Smed-rho-5	1	QMASFVFFYGLQLIHEDDPKNMLSW--TTGI	PRKSPLIFD	VHKRIEIRWFFSYMLTHQGYL
Smed-rho-2	1	-----DVT	A--RTGVHLR	SPLIYSYRRIEAWRFIGYMLFHQGYI
Mice-rho-2	1	ELAVFIYYAVWKPQ---KQWITL--DTGI	LESPLTYC	PEKREEAWRFIGYMLVHAGVQ
Smed-rho-3	1	IVTTRQHCTFLRGYYPAAAFCSQVNCLEICGMLS	FYDQNR	PDQFYRFLIATFVNSSLG
Smed-rho-4	1	IITTPSHCKFMRGYFHSKYLCSQVNCLEICGMLN	FADSDIP	DQIYRLFISLFLHVGIV
Dro-rho-1	54	75HLGFNIVIQLF	FGI	PLEVMMHGTARTGV
Dro-rho-3	43	64HLGYNVLTQL	LFGVPLELVHGS	LRTGV
Dro-rho-2	52	69HLGFNVAVQL	VFG	PLEMVGSTRTACI
Dro-rho-4	59	80HLMNLI	IQIFL	GI
Celegans-1	61	82HLGNV	IIQLLV	GI
Smed-rho-1	59	92HII	FNCLIQ	LLG
Smed-rho-5	59	118HII	FNCLIQ	LLG
Smed-rho-2	39	38HLI	FNCLIQ	LLG
Mice-rho-2	54	75HIVGN	LLMQ	IVL
Smed-rho-3	61	82SLI	VTLCIQ	LS
Smed-rho-4	61	83HLA	ITVLMQ	AFFLR
Dro-rho-1	111	ALL	135AAHLANITL	NYAHMKS-----ASTQLGSVVIFVSCDLGYALYT
Dro-rho-3	100	ALL	124AAQLASLLN	NFGQMRH-----GVIQLMAVILFVFCDLGYALYS
Dro-rho-2	109	ALL	129AAHLANVLLN	YHQMRY-----GVIKLLHILFVFSDFGFAYIA
Dro-rho-4	116	ALI	140TAHIATIMN	YSEMEY-----AIVQLLAFLVFCFDTLGTSVYR
Celegans-1	118	ALI	142FAHVANVILN	WHEMPL-----RWIRVLVLFVFI
Smed-rho-1	116	ALI	152GAHF	FAIVIMNWDELQ
Smed-rho-5	115	VALI	178GAHF	FAIVIMNWDELQ
Smed-rho-2	96	ALI	98GAHF	ATVVTNWD
Mice-rho-2	111	ALM	135GGYFMNVIV	NFREMIP-----AFGIVRLLV
Smed-rho-3	118	AML	142AMTFAEFL	QSWKIVQR-----PWPVFFKFLGLGIFLFL
Smed-rho-4	75	---	97-----	-----
Dro-rho-1	152	Q-----	174-----	YFDGSFAKGPQVS
Dro-rho-3	141	R-----	163-----	ELAMHQLQTRPSV
Dro-rho-2	150	RYAGDEL	174QLGSSSEFLA	IDQATAGAVSYVAHLA
Dro-rho-4	157	---	178-----	HLTDQH-DQIGYVAHLS
Celegans-1	159	R-----	181-----	FYTND-DSVSHLAHIA
Smed-rho-1	172	R-----	206-----	LGLDIT-EQTSTASHIG
Smed-rho-5	171	RR-----	232-----	LGLDIT-EQTSTASHIG
Smed-rho-2	150	---	149-----	FSKEVP-TPIGFSAHIG
Mice-rho-2	154	R-----	176-----	FFVPANGSPV
Smed-rho-3	154	LG----	177-----	FLPFFDNYAHMS
Smed-rho-4	---	---	---	---
Dro-rho-1	195	QLIWWL	LALGVY	227CAFTVFAIVFN
Dro-rho-3	184	RPLRWL	LALGVW	216CIFSAFGIAFN
Dro-rho-2	206	QLLWWI	ALGTY	234LALVVF
Dro-rho-4	195	RILWWV	AVIVY	227FALMTTGI
Celegans-1	198	KIRYV	VCLFLY	230SAFFAT-TIIF
Smed-rho-1	211	VKLFV	VLSIY	255TGLLGF
Smed-rho-5	210	EXKLF	VVLSIY	281TGLLGFA
Smed-rho-2	189	I-----	189-----	-----
Mice-rho-2	194	DPRFWIAIAAY	226VACLLFAVFF	NIFLSPAN-----
Smed-rho-3	190	ALQKLI	ASSIN	222PKEAXEKVQL
Smed-rho-4	---	---	---	---

Figura 4. Alineament de les seqüències d'aminoàcids que contenen el domini *rhomboid* conservat dels *Smed-rho*, junt amb altres *rhomboids* identificats a *Drosophila* (*Dro-rho-1* i 2), *M. musculus* (*Mice-rho-2*) i *C. elegans* (*Celegans-1*).

7.- Patró d'expressió dels *rhomboids* a planàries

Hibridacions *in situ* en animals intactes mostren una gran variabilitat dels patrons d'expressió dels diferents *rhomboids* identificats a *S.mediterranea* (Figura 5), com resumeix la Taula 2.

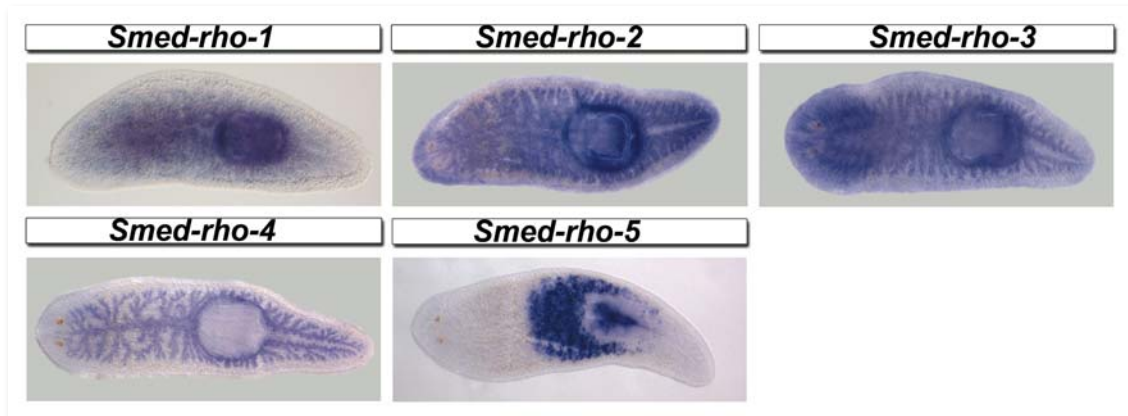


Figura 5. Patró d'expressió dels *Smed-rho-1*, *2*, *3*, *4* i *5* en animals intactes.

<i>rhomboid</i>	Patró d'expressió
<i>Smed-rho-1</i>	cavitat faríngica, faringe, sistema digestiu?
<i>Smed-rho-2</i>	cavitat faríngica, faringe, sistema digestiu
<i>Smed-rho-3</i>	cavitat faríngica, sistema digestiu, cervell
<i>Smed-rho-4</i>	sistema digestiu
<i>Smed-rho-5</i>	cèl·lules secretores, faringe

Taula 2. Resum del patró d'expressió dels *rhomboids* identificats a *S. mediterranea*.

8.- Caracterització funcional

El silenciament individualitzat de cada un dels *rhomboids* mitjançant experiments d'ARNi no mostra cap fenotip aparent en els animals vius durant la regeneració (en tots els experiments realitzats es va injectar l'ARN de doble cadena durant dues rondes, subministrant les injeccions durant 3 dies consecutius en cada una d'elles i amputant els animals finalitzada la primera i la segona ronda, com es mostra en l'esquema de la Figura 6).

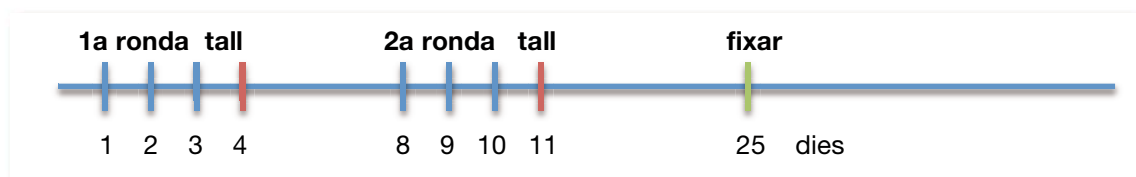


Figura 6. Esquema del protocol experimental seguit durant el silenciament dels diferents *rhomboids* mitjançant l'injecció de l'ARN de doble cadena.

D'altra banda, el silenciament simultani de determinats *rhomboids*, seguint el mateix protocol experimental (Figura 6), sembla causar defectes durant la regeneració quan s'analitzen els animals tractats. Les combinacions dobles d'ARNi realitzades són *Smed-rho-1/2* i, en segon lloc, *Smed-3/4*, escollides per la seva semblança en les seqüències aminoacídiques (Figura 4). En aquestes inhibicions simultànies, els troncs regenerants mostren en alguns casos blastemes petits i defectes durant la diferenciació de les cèl·lules pigmentàries dels ulls. D'altra banda, els caps no són capaços de regenerar i es mantenen arrodonits (Taula 3, Figura 7).

	caps regenerants	troncs regenerants
<i>gfp(ARNi)</i>	32/32 regeneren correctament	35/35 regeneren correctament
<i>Smed-rho-1/2(ARNi)</i>	16/32 regeneren correctament 16/32 no regeneren	22/35 regeneren correctament 5/35 ciclops 4/35 diferenciació aberrant dels ulls 4/35 no regeneren
<i>Smed-rho-3/4(ARNi)</i>	21/32 regeneren correctament 11/32 no regeneren	20/33 regeneren correctament 7/33 ciclops 1/33 diferenciació aberrant dels ulls 5/33 no regeneren

Taula 3. Resum de la freqüència dels defectes observats en animals regenerants al silenciar *Smed-rho1/2* i *rho-3/4*. L'anàlisi s'ha realitzat en caps i troncs de 12 dies de regeneració, després de dues rondes d'injecció de l'ARNi corresponent.

Amb l'objectiu d'analitzar en més detall l'efecte del silenciament simultani dels *Smed-rho-1/2* i *3/4*, es van analitzar possibles problemes durant la diferenciació de les noves estructures durant la regeneració d'aquests animals tractats, concretament la formació del nou sistema nerviós, mitjançant l'anticòs anti-SYNORF-1 (específic per la sinapsina i utilitzat com a marcador pan-neuronal), tant de caps com troncs regenerants (Figura 7).

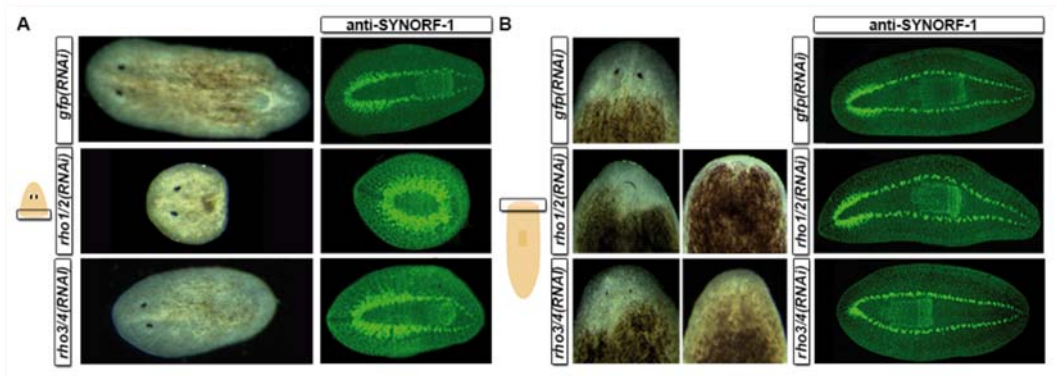


Figura 7. Efectes del silenciament simultani de *Smed-rho-1/2* i *rho-3/4*. A) Efectes de l'inhibició de *Smed-rho-1/2* i *rho-3/4* en caps regenerants. La immunotinció amb l'anticòs anti-SYNORF-1 revela una diferenciació aberrant de la faringe i els nous cordons ventrals dels caps regenerants al silenciar *Smed-rho-1/2* i faringes arrodonides en el cas de *Smed-rho-3/4*. B) Efectes del silenciament de *Smed-rho-1/2* i *rho-3/4* en troncs regenerants. La majoria de troncs regenerants son capaços de diferenciar un nou cervell com es mostra amb l'anticòs anti-SYNORF-1, en molt pocs casos observem defectes durant la diferenciació del cervell. Totes les mostres corresponen a fragments regenerants de 12 dies de regeneració.

9.- Conclusió

Malgrat que no hem pogut analitzar en més detall l'efecte dels *rhomboids* durant la regeneració de les planàries podem concloure que:

- Hem identificat cinc gens homòlegs diferents dels *rhomboids* a la nostra espècie *S. mediterranea*, els quals presenten patrons d'expressió diversos, que podrien significar una funció variable de cada un d'ells.
- El silenciament individualitzat de cada un dels *rhomboids* no sembla causar defectes aparents durant la regeneració de les planàries. D'altra banda, els *rhomboids* 1 i 2 i 3 i 4 podrien estar actuant sinèrgicament, ja que observem alguns problemes durant la regeneració tant anterior com posterior, després de la inhibició simultània dels *rhomboids* 1/2 i 3/4.
- La inhibició combinada dels *Smed-rho-1/2* i 3/4 bloqueja la regeneració de manera general, tant anterior com posterior. Impedeix la diferenciació de noves estructures anteriors, entre elles les cèl·lules pigmentàries i, menys freqüentment, neuronals.
- *S. mediterranea* presenta possibles proteases intramembrana de la família dels *rhomboids* que podrien jugar un paper important durant l'alliberació dels lligands EGF. Futurs experiments són necessaris per caracteritzar en més detall la funció d'aquestes proteases durant la regeneració de les planàries a través de la via dels EGFR.

Annex 2. Identificació i caracterització de possibles gens regulats per la via dels EGFR, mitjançant Digital Gene Expression

1. Possibles gens diana regulats pel *Smed-egfr-3*

Un dels tres gens homòlegs dels EGFR identificats a planàries, *Smed-egfr-3* s'expressa en el sistema nerviós i en els neoblasts. Experiments de silenciament d'aquest gen mitjançant la tècnica d'ARN d'interferència indiquen que *Smed-egfr-3* controla la diferenciació cel·lular i el creixement normal del blastema. Amb l'objectiu de determinar quins gens i vies de senyalització poden actuar “downstream” de *Smed-egfr-3*, hem dissenyat i seqüenciat llibreries transcriptòmiques mitjançant la tècnica “Digital Gene Expression” (DGE), per tal de comparar els perfils transcriptòmics entre els animals control i els *Smed-egfr-3*(ARNi) tractats a un i tres dies de regeneració. El resultat ha sigut la identificació de centenars de gens candidats que apareixen tant activats com inhibits depenent del cas després de silenciar *Smed-egfr-3* (Taula 1).

Les funcions anotades de molts d'aquests gens candidats estan relacionades amb múltiples vies i processos regulats per la via EGFR en altres animals model i que sustenten els nostres resultats, tal i com reflexa l'Ontologia Gènica (GO) d'aquestes seqüències.

llibreries transcriptòmiques	nombre de gens “up-regulated”	nombre de gens “down-regulated”
R1	680	655
R3	2403	800
R1/R3	546	121

Taula 1. Nombre de gens “up-regulated” o “down-regulated” en les diferents llibreries transcriptòmiques obtingudes de l’anàlisi del DGE. R1, nombre de gens “up” o “down-regulated” a un dia de regeneració després d’inhibir *Smed-egfr-3* comparat amb els organismes control; R3, nombre de gens “up” o “down-regulated” a tres dies regeneració després d’inhibir *Smed-egfr-3* comparat amb els organismes control; R1/R3, nombre de gens “up” o “down-regulated” tant a un dia com tres dies de regeneració després d’inhibir *Smed-egfr-3* comparat amb els organismes control.

Davant el gran nombre de possibles candidats obtinguts, hem procurat seguir un criteri de selecció rigorós dels gens més prometedors: ens hem centrat en aquells relacionats amb la via MAPK, via PI3K/Akt, via PLC γ o via JAK/STAT, ja que com hem explicat en el capítol 3, s’ha demostrat en diversos organismes que la via dels EGFR regula “downstream” aquestes vies de senyalització. A més a més, sabem que múltiples estudis en diversos organismes han vinculat la via dels EGFR amb processos biològics com neurogènesi, proliferació cel·lular, diferenciació, càncer i tumorigènesi, apoptosi i supervivència cel·lular o inflamació i sistema immune. Per aquest motiu, també hem seleccionat gens específics que estan relacionats amb aquests processos biològics esmentats en altres organismes, ja que podrien estar realitzant també un paper important a través de la via dels EGFR en el nostre organisme model *S. mediterranea*.

Al llarg d’aquesta tesi hem pogut analitzar alguns d’aquests gens seleccionats, mitjançant hibridacions *in situ* que demostren una expressió variable en el SNC, faringe, sistema digestiu, mesènquima i neoblasts depenent del gen (Fraguas i altres, 2014). Hem caracteritzat funcionalment diversos dels gens seleccionats mitjançant experiments d’ARNi (Taula 2), centrant-nos amb aquells que mostren algun defecte evident després del seu silenciament, com és el cas de *Smed-cgi-99*, *Smed-NSA2* i *Smed-aristaless*.

No obstant, futurs experiments són necessaris per analitzar en més detall aquests tres gens i la gran immensitat de gens obtinguts a través del DGE.

contig	gen	experiment ARNi
contig 90e_2331	MAPKP1	cap fenotip aparent
contig 90e_580	p38	cap fenotip aparent
contig 90e_284	PK1	cap fenotip aparent
contig 90e_1218	SWI-SNF	cap fenotip aparent
contig 90e_10535	MAPKP2	cap fenotip aparent
contig 90e_1082	Bem46	cap fenotip aparent
contig 90e_363	NF-K β	cap fenotip aparent
contig 90e_10811	cgi-99	hiperproliferació, despigmentació, regeneració aberrant dels ulls i del SNC.
contig 90e_586	NSA2	Inhibició de la regeneració, disminució nombre de neoblasts.
contig 90e_19078	Pim-1	cap fenotip aparent
contig 90e_1595	40srP	cap fenotip aparent
contig 90e_571	Sparc	cap fenotip aparent
contig 90e_92	Ras	cap fenotip aparent
contig 90e_2126	BAK1	cap fenotip aparent
contig 90e_12186	Fgfr1 oncogene partner	cap fenotip aparent
contig 90e_2674	TrErb2	cap fenotip aparent
F6AJXP02GJYFZ	SPK1	cap fenotip aparent
contig 90e_17333	yippee	cap fenotip aparent
contig 90e_4399	cdc50	cap fenotip aparent
contig 90e_3852	cerebral cell adhesion	cap fenotip aparent
contig 90e_17695	PK2	cap fenotip aparent
contig 90e_7672	inhibitor of growth	cap fenotip aparent
contig 90e_16660	doublecortin	cap fenotip aparent
contig 90e_3627	RSK	cap fenotip aparent
contig 90e_15331	NeuroD	cap fenotip aparent
contig 90e_1713	TNFR2.1	cap fenotip aparent
contig 90e_9876	Bmi	cap fenotip aparent
contig 90e_4969	flotillin	cap fenotip aparent
contig 90e_28563	Gelsolin	cap fenotip aparent
contig 90e_16658	Aristaless	blastemes petits, regeneració aberrant dels ulls i del SNC
F6AJXP02FJ1WR	Nicalin	cap fenotip aparent

Taula 2. Resum dels experiments d'ARNi realitzats dels gens seleccionats del DGE i els fenotips obtinguts després de la seva inhibició. MAPKP1, map kinase phosphatase 1; PK1, pantothenate kinase 1; SWI/SNF, chromatin-remodeling SWI/SNF complex; MAPKP2, map kinase phosphatase 2; Bem46, bud emergence 46; NF-kb, nuclear factor kappa b; moesin, membrane-organizing extension spike protein; CGI-99, novel protein; NSA2, Ribosome Biogenesis Protein NSA2; Pim-1, Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; 40srP, ribosomal protein 40S; SPARC, secreted protein, acidic and rich in cysteine; BAK1, Bcl-2 homologous antagonist/killer 1; TrErb2, transducer of ERBB2; SPK-1, serine/threonine- protein kinase 1; PK2, pantothenate kinase 2; inhibitor of growth, inhibitor of growth family member 5; RSK, similar to ribosomal protein S6 kinase 2; TNFR2.1, tumor necrosis factor receptor-associated factor 2.1; Bmi-1, polycomb complex protein BMI-1; aristaless, homeobox protein aristaless-related.

2.- Caracterització funcional del gen *Smed-cgi-99*

cgi-99 és un gen nou descrit com un modulador de la transcripció (Howng i altres, 2004; Pérez-González i altres, 2006); tot i que se'n desconeix la seva funció amb exactitud, s'ha vist que està altament expressat en tumors cerebrals humans i que podria presentar un rol important durant el desenvolupament del cervell i tumorigènesi, a l'observar una sobre-expressió de *cgi-99* en tumors cerebrals, comparat amb teixits del cervell normals (Howng i altres, 2004). A partir de l'anàlisi del DGE, hem identificat un gen homòleg en la planària *S. mediterranea*, el qual hem anomenat *Smed-cgi-99*.

Smed-cgi-99 s'expressa en el sistema nerviós, el mesènquima i la faringe. Després de silenciar *Smed-egfr-3*, mitjançant la tècnica d'ARNi, l'expressió d'*Smed-cgi-99* sembla que disminueixi (Figura 3), sustentant els resultats de les llibreries del DGE (C1/R1= 3,2; C3/R3=10, sent C1, planàries control després d'un dia de regeneració, R1, planàries *Smed-egfr-3*(ARNi) després d'un dia de regeneració, C3, planàries control després de tres dies de regeneració; R3, planàries *Smed-egfr-3*(ARNi) després de tres dies de regeneració).

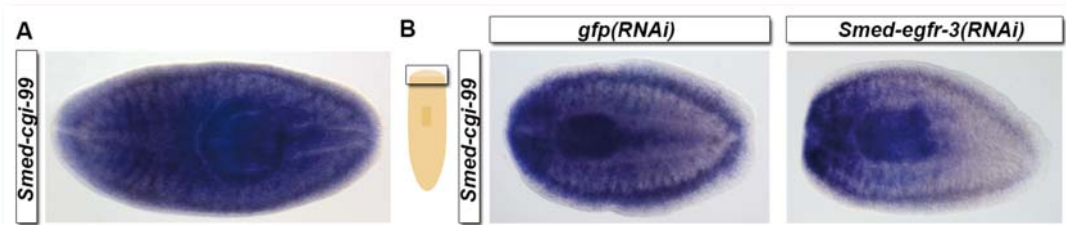


Figura 3. Patró d'expressió de *Smed-cgi-99*. A) Hibridacions *in situ* en animals intactes demostren una expressió del gen *Smed-cgi-99* en el sistema nerviós, el mesènquima i la faringe. B) Després d'inhibir *Smed-egfr-3*, l'expressió de *Smed-cgi-99* disminueix en troncs regenerants de tres dies.

El silenciament d'aquest gen causa defectes evidents durant la regeneració, formant blastemes aberrants, problemes en la diferenciació del SNC (regeneren uns ganglis cefàlics anormals, més petits i amples del normal) i de les cèl·lules fotoreceptores (diferencien uns ulls més petits i situats en regions més anteriors en relació al cervell que el què s'observa en els controls) i una hiperproliferació general al llarg del cos. A més a més, els animals *Smed-cgi-99*(ARNi) mostren una sorprenentment pèrdua de la pigmentació al llarg de

la línia mitja del blastema, que desencadena una desaparició de la distribució estereotípica dels cilis dorsals (Figura 4).

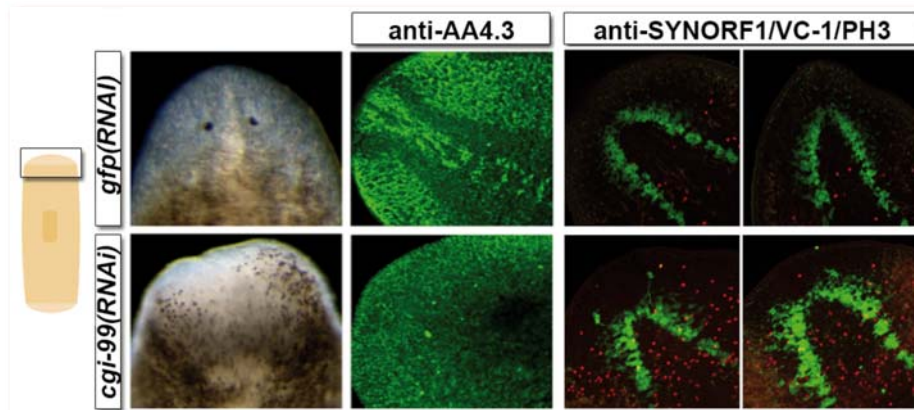


Figura 4. Efectes del silenciament del gen *Smed-cgi-99* durant la regeneració. La inhibició de *Smed-cgi-99* origina una despigmentació en la regió dorsal i una pèrdua de les cèl·lules pigmentàries dels ulls, una desaparició de la distribució dorsal dels cilis en la línia mitja (a través d'immunotincions de l'anticòs AA4.3), una regeneració aberrant del cervell i de les cèl·lules fotoreceptores dels ulls (mitjançant l'anticòs SYNORF1 i VC-1, respectivament) i una evident hiperproliferació (utilitzant l'anticòs PH3). Totes les mostres corresponen a troncs regenerants de 10 dies.

Un estudi més detallat dels defectes produïts després d'inhibir *Smed-cgi-99* mostra una disminució de determinades poblacions neuronals (Figura 5). Així, disminueixen les cèl·lules mecanorreceptores (mitjançant el marcador *cintillo*) i l'expressió de *Smed-netrin*. A més a més, com s'observa a partir de les immunotincions de l'anticòs SYNORF-1, el marcador *Smed-gpas* mostra una regeneració aberrant dels ganglis cefàlics (s'observen unes branques del cervell més petites). D'altra banda, mitjançant el marcador específic *Smed-th*, sembla que augmenti la població de les cèl·lules dopaminèrgiques.

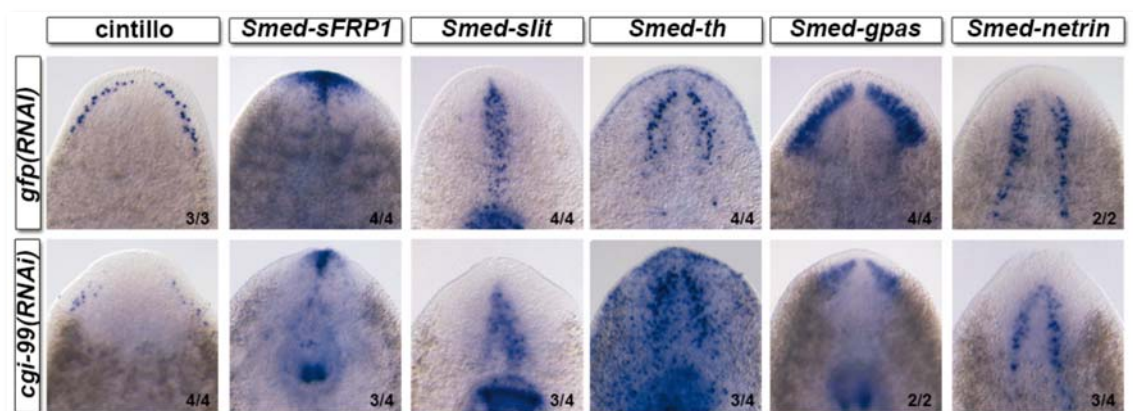


Figura 5. Regeneració anterior després del silenciament de *Smed-cgi-99*. La inhibició del gen *Smed-cgi-99* implica una lleugera disminució d'alguns marcadors anteriors (*Smed-sFRP1*) i una desorganització de la línia mitja (*Smed-slit*). S'observen també defectes durant la regeneració del sistema nerviós, disminuint les cèl·lules mecanorreceptores (mitjançant el marcador *cintillo*) i les cèl·lules que expressen *Smed-netrin*. A més a més, regeneren unes branques del cervell més petites (*Smed-gpas*). No obstant, la inhibició d'aquest gen sembla augmentar el nombre de cèl·lules dopaminèrgiques (*Smed-th*). Totes les mostres corresponen a troncs regenerants de 10 dies.

Smed-cgi-99 sembla jugar també un paper important en homeòstasi, ja que el silenciament d'aquest gen en animals intactes genera una pèrdua estricta de la pigmentació en la regió anterior i una clara hiperproliferació generalitzada. A més a més, animals intactes *Smed-cgi-99(ARNi)* presenten defectes evidents durant el manteniment de les cèl·lules pigmentàries dels ulls (aquestes disminueixen fins al punt de ser inapreciables en pocs dies) i fotoreceptores (els axons de les cèl·lules fotosensitives es projecten més perifèricament, adoptant una forma més estreta i allargada (Figura 6).

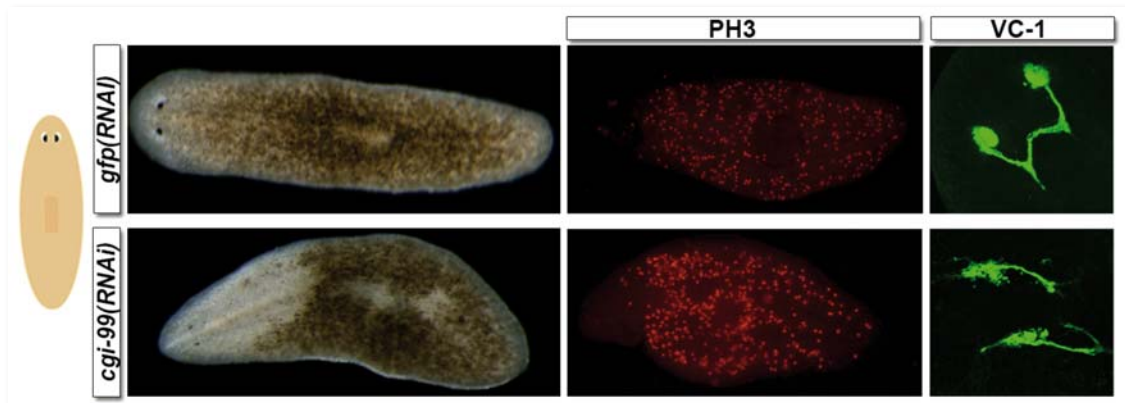


Figura 6. Defectes durant l'homeòstasi després del silenciament del gen *Smed-cgi-99*. La inhibició de *Smed-cgi-99* causa en animals intactes una despigmentació de la regió dorsal, una hiperproliferació general mitjançant l'anticòs PH3 i una desorganització de les cèl·lules fotoreceptores dels ulls (gràcies a l'anticòs VC-1). Totes les mostres corresponen a animals intactes després de quatre setmanes del silenciament de *Smed-cgi-99*.

A partir d'aquests resultats suggerim que el gen *Smed-cgi-99* podria jugar un paper important tant en la regeneració com en la homeòstasi de la planària *S. mediterranea*, regulant la proliferació de les seves cèl·lules mare i durant el desenvolupament del sistema nerviós. Ara bé, futurs experiments són necessaris per comprendre en més detall la seva funció.

3.- Caracterització funcional del gen *Smed-NSA2*

Un altre dels gens identificats amb el DGE i que dona fenotip al silenciar-lo es el gen homòleg del *NSA2* (Nop seven-associated 2), també conegut com *TINP1* (TGF β inducible nuclear protein 1) i el qual hem anomenat en el nostre organisme model *Smed-NSA2*.

En línies cel·lulars humanes, s'ha vist que aquest gen codifica per una proteïna nucleolar involucrada en la regulació del cicle cel·lular i la proliferació (Zhang i altres, 2009).

Smed-NSA2 s'expressa en el parènquima en un patró que recorda al dels neoblasts. Això es veu confirmat després d'experiments d'irradiació, ja que la seva expressió disminueix considerablement a partir del primer dia del tractament d'irradiació (Figura 6A); la seva expressió també disminueix lleugerament en troncs regenerants després d'inhibir *Smed-egfr-3* (Figura 6B), fet que sosté el resultat obtingut del DGE (C1/R1= 3; C3/R3= 24,5) i suggereix que podria ser un possible gen diana de la via dels EGFR.

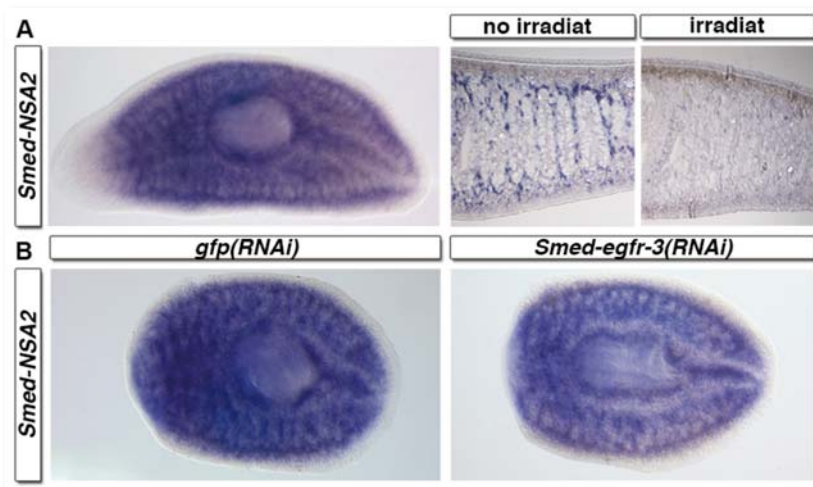


Figura 6. Patró d'expressió del gen *Smed-NSA2*. A) *Smed-NSA2* s'expressa en els neoblasts, mostrant una clara disminució de la seva expressió després d'un dia d'irradiació comparat amb organismes control no irradiats. Les mostres de l'experiment d'irradiació corresponen a talls sagitals i a imatges cedides pel Marc Van der Hofstadt. B) El silenciament de *Smed-egfr-3* causa una evident disminució de l'expressió de *Smed-NSA2*. Les mostres corresponen a troncs regenerants de quatre dies de regeneració.

El gen *Smed-NSA2* és necessari per una correcta regeneració de les planàries, ja que el seu silenciament origina defectes evidents durant la formació dels blastemes (notablement més petits o fins i tot en alguns casos absents), un bloqueig de la regeneració del SNC (cordons nerviosos truncats i

aparentment no regeneren els ganglis cefàlics) i una disminució general de la proliferació, concentrant les cèl·lules en divisió al llarg de la línia mitja, en comparació amb els organismes control que mostren una distribució típica de les cèl·lules en proliferació al llarg de tot el cos, exceptuant la regió de la faringe i en el marge del cap (les úniques zones mancades de neoblasts) (Figura 7).

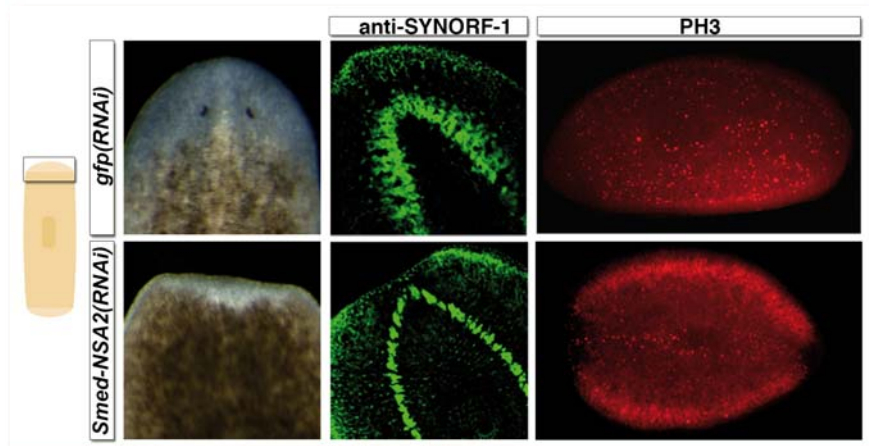


Figura 7. Caracterització funcional de *Smed-NSA2*. Animals *Smed-NSA2(RNAi)* mostren una regeneració bloquejada del sistema nerviós, mitjançant immunotincions de l'anticò anti-SYNORF1 i a través de l'anticò PH3 s'observa una clara davallada de la proliferació. Totes les mostres corresponen a troncs regenerants de 10 dies.

En conclusió, aquests resultats preliminars suggereixen un paper important de *Smed-NSA-2* en la regulació dels neoblasts.

4.- Caracterització funcional del gen *Smed-aristaless*

Un altre dels gens candidats seleccionat a partir de les llibreries del DGE és l'homòleg de l'*arx* ("aristaless related homeobox"), el qual a *S. mediterranea* hem anomenat *Smed-aristaless*.

El gen *arx* s'expressa durant el desenvolupament. La proteïna *arx* presenta dos dominis conservats, un C-pèptid (o domini aristaless) i un domini homeobox de la classe "prd-like" (Miura i altres, 1997). En altres organismes s'ha demostrat que el gen *arx* està involucrat en el desenvolupament del SNC i pot estar regulat per la via dels EGFR. Concretament, estudis sobre la regeneració de la pota del grill han demostrat que l'activitat EGF és imprescindible per induir l'activació d'*aristaless* (*Gb'al*) en el marge del

blastema, necessària per poder re-establir l'eix proximodistal durant la regeneració distal de la pota (Nakamura i altres, 2008).

En el cas concret de *S. mediterranea*, hibridacions *in situ* demostren que en animals intactes *Smed-aristaless* s'expressa en el SNC i el mesènquima (Figura 8).



Figura 8. Patró d'expressió de *Smed-aristaless* en animals intactes. *Smed-aristaless* s'expressa en el SNC i el mesènquima.

Experiments d'ARNi mostren una disminució en el creixement del blastema després del silenciament de *Smed-aristaless*. A més a més, aquests organismes tractats presenten problemes durant la regeneració del cervell i una diferenciació de les cèl·lules pigmentàries dels ulls alterada, formant quiasmes aberrants (Figura 9).

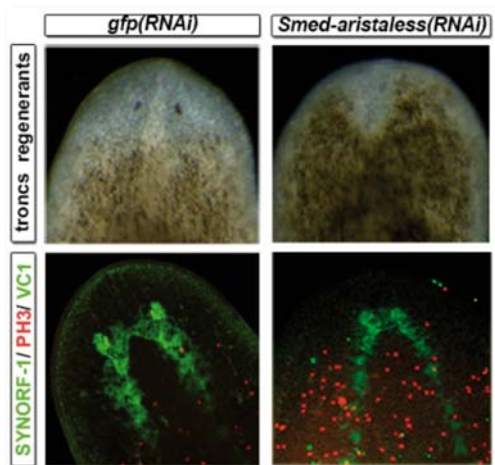


Figura 8. Caracterització funcional de *Smed-aristaless*. El silenciament de *Smed-aristaless* mitjançant experiments ARNi desencadena un creixement reduït del blastema en comparació amb els organismes control. Immunotincions després d'inhibir *Smed-aristaless* mostren problemes durant la diferenciació de les cèl·lules pigmentàries (mitjançant l'anticòs VC-1) i una regeneració anormal del sistema nerviós (a través de l'anticòs SYNORF-1). D'altra banda, la proliferació no es mostra afectada (a través de l'anticòs PH3). Totes les mostres corresponen a troncs regenerants de 10 dies.

En conclusió, resultats preliminars semblen indicar que *Smed-aristaless* podria tenir un paper important durant la regeneració anterior, la neurogènesi i la diferenciació de les cèl·lules pigmentàries dels ulls de les planàries.

Annex 3. Identificació de possibles gens diana regulats per l'*egr-4*, mitjançant l'eina transcriptòmica *RNA-seq*

1. Disseny experimental *RNA-seq*

Amb l'objectiu d'identificar possibles gens diana regulats per l'*egr-4*, després de caracteritzar la seva funció (veure Article 2), hem dissenyat una anàlisi transcriptòmica preliminar a través de l'eina *RNA-seq*, comparant les llibreries gèniques obtingudes en organismes regenerants a 8 hores, 1 dia i 2 dies control i després de silenciar l'*egr-4*. El motiu de seleccionar aquests tres punts temporals es deu a l'expressió primerenca d'aquest gen i a la seva funció en estadis inicials de la regeneració (veure Article 2). S'ha treballat únicament amb l'ARN extret de la mostra tissular corresponent a la regió prefaríngeica, per tal d'obtenir exclusivament possibles candidats involucrats en la regeneració del cap i evitar gens regulats també per *egr-4* però que actuen en altres processos (Figura 1). Aquest experiment s'ha desenvolupat durant l'estància de recerca al laboratori de la Dra. Kerstin Bartscherer, en el grup "Stem Cells and Regeneration" del "Max-Planck- Institut für molekulare Biomedizin" de Münster (Alemanya), amb l'ajuda de les doctorands Hanna Reuter i Suthira Owlarn.

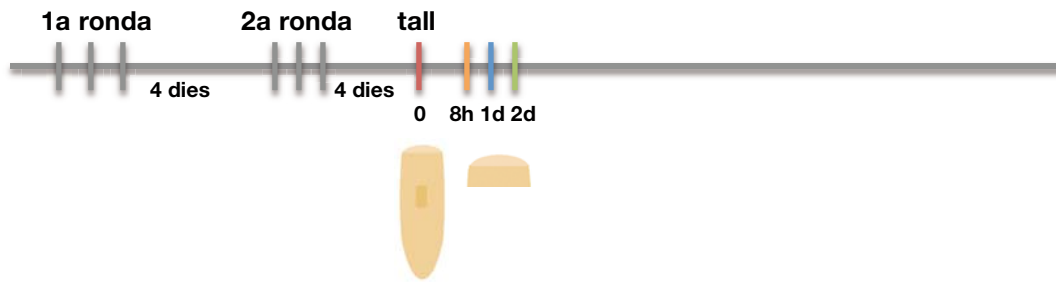


Figura 1. Protocol experimental seguit per dissenyar les llibreries gèniques del *RNA-seq* després de silenciar *egr-4*, respecte els organismes control. S'ha seleccionat únicament com a mostra tissular el blastema de la regió prefaríngeica després de 8 hores, 1 dia i 2 dies de regeneració.

2. Validació del silenciament d'*egr-4* per qPCR

Per tal de validar les mostres de l'experiment ARNi d'*egr-4* amb les quals s'obtidran les llibreries gèniques del *RNA-seq*, hem realitzat qPCR (PCR quantitativa) que demostren la correcta inhibició del gen en els tres punts seleccionats (8 hores, 1 dia i 2 dies de regeneració) respecte un punt 0 i els organismes control (Figura 2).

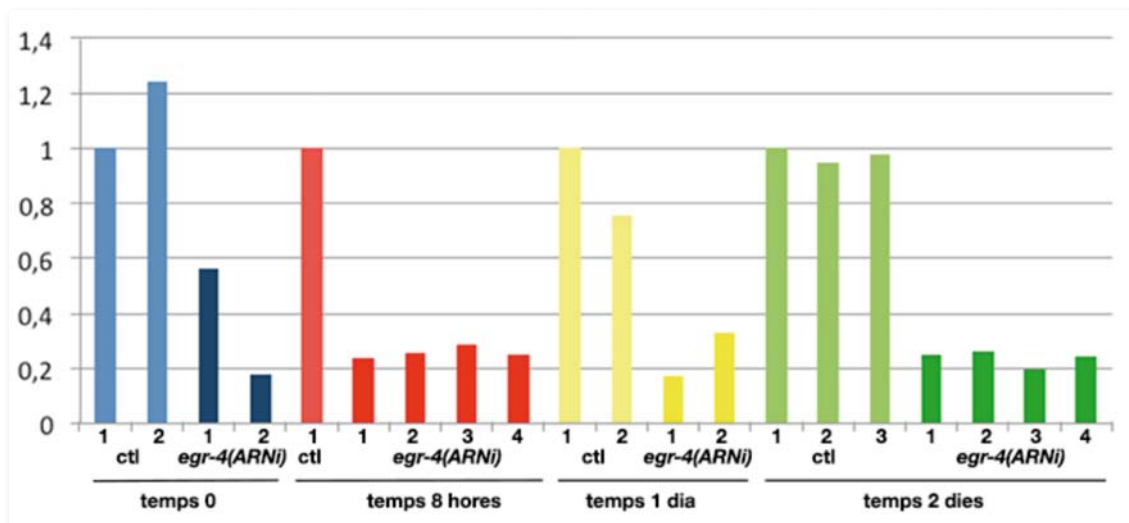


Figura 2. Validació per qPCR del silenciament d'*egr-4* a 8 hores, 1 dia i 2 dies de regeneració, respecte als organismes control (ctl) i un temps inicial zero (T0).

3. Llista de gens candidats obtinguts després de silenciar *egr-4*

A continuació, es mostren els gens significativament “downregulated” (Taula 1) i “up-regulated” (Taula2) obtinguts en l'*RNA-seq* després d'inhibir *egr-4*, en organismes regenerants a 8 hores, 1 dia i 2 dies de regeneració.

id	mostra	baseMeanA	baseMeanB	fold change	log2FoldChange	pval	padj	homology
cthl1_Trc_comp1078_c0_seq1	1d	695,1277064	230,016996	0,3308989	-1,595537585	1,10E-05	0,030669767	egr-4
	2d	525,0242277	152,724388	0,29089017	-1,781453543	1,71E-06	0,005566566	egr4
cthl1_Trc_comp10950_c0_seq1	8h	263,4353171	120,029743	0,45563269	-1,134056822	7,26E-05	0,088106503	no hit
	1d	244,7914324	114,242945	0,46669503	-1,099447984	6,74E-05	0,089151779	coiled-coil domain containing 88A
cthl1_Trc_comp11188_c0_seq1	8h	333,7236307	171,38308	0,51354793	-0,961429159	0,000855413	0,316407412	small conductance calcium-activated potassium channel
cthl1_Trc_comp11641_c0_seq1	8h	1635,524981	1010,24973	0,61769141	-0,695041824	0,000155373	0,127530225	alpha-2-macroglobulin-like protein 1
cthl1_Trc_comp11844_c0_seq1	8h	58,70903111	11,4363631	0,19479734	-2,359954123	2,45E-05	0,046291469	no hit
	1d	87,85433662	11,1975408	0,12745576	-2,971931575	1,74E-07	0,001507899	heme-transporter?
cthl1_Trc_comp13329_c0_seq1	1d	184,1591495	104,968272	0,56998673	-0,810999756	0,000590709	0,334040657	suppressor of cytokine signaling 2 (e-value baix)
	2d	133,8408766	66,9723932	0,50001461	-0,999957856	1,38E-05	0,024497413	
cthl1_Trc_comp1352_c1_seq1	8h	3144,686177	1223,2906	0,38900244	-1,362148883	0,000650598	0,277580031	prosaposin
cthl1_Trc_comp13682_c0_seq1	1d	102,9292286	48,2937315	0,46919356	-1,091744874	0,000122614	0,132735988	transposase
cthl1_Trc_comp1411_c1_seq1	8h	370,7869822	213,291507	0,57524001	-0,797764072	0,000462935	0,227986308	glypican-1 (Sned) (wound paper by Peter)
cthl1_Trc_comp14914_c0_seq1	2d	412,3475339	198,249912	0,48078355	-1,056540551	3,97E-05	0,047404202	ndk4
cthl1_Trc_comp19649_c0_seq1	8h	164,8985041	69,5521314	0,42178752	-1,245411679	0,000394068	0,214951478	importin alpha 4
cthl1_Trc_comp21811_c0_seq2	8h	21,2342309	2,84129885	0,13380748	-2,901769369	0,000484802	0,233419926	general transcription factor IIH subunit 5
	1d	19,80081794	3,36285679	0,16983424	-2,55780078	0,00237981	0,694689596	
cthl1_Trc_comp22872_c0_seq1	2d	90,39581792	25,215062	0,27894058	-1,841970259	1,66E-05	0,027368398	high affinity cationic amino acid transporter 1
cthl1_Trc_comp22907_c0_seq1	1d	21,16757198	2,08280315	0,09839594	-3,345257395	2,55E-05	0,05291533	transmembrane protein 216
cthl1_Trc_comp24334_c0_seq1	2d	302,0421149	164,91382	0,54599611	-0,87303742	2,56E-05	0,036854487	P2X purinoceptor 4 [Schistosoma
cthl1_Trc_comp25062_c0_seq1	1d	28,13586772	6,02773009	0,21423651	-2,222723734	0,000131061	0,139501554	no hit
	2d	17,98174774	4,4381333	0,24712911	-2,01666313	0,000384436	0,233370059	
cthl1_Trc_comp3763_c1_seq1	1d	64,29713652	28,1717606	0,43814954	-1,190504758	0,000412503	0,281278701	zinc finger protein 229?????
cthl1_Trc_comp5028_c0_seq1	8h	348,2507298	203,248452	0,58362678	-0,776882011	0,000303368	0,192246371	phospholipase A
cthl1_Trc_comp5313_c0_seq1	2d	1136,500152	534,20559	0,47004445	-1,089130899	2,34E-06	0,006628544	low density lipoprotein receptor related-2 (wound paper from Peter)
cthl1_Trc_comp68474_c0_seq1	1d	25,26783409	4,39185932	0,17381226	-2,524398257	0,000296784	0,237647584	pre-mRNA-splicing factor SPF27-like??
	2d	14,45076058	2,83510479	0,1961907	-2,349671461	0,00062302	0,307740137	
cthl1_Trc_comp6990_c0_seq1	2d	1881,418288	838,134975	0,4454804	-1,166566131	0,000350957	0,220408773	protein kinase domain (MAPK)
cthl1_Trc_comp7167_c0_seq1	8h	836,0695636	529,843165	0,63373096	-0,658057601	0,000993131	0,346526467	RPE-spondin
cthl1_Trc_comp7445_c0_seq1	8h	1787,805761	954,524062	0,53390815	-0,90533653	0,000781139	0,301416873	granulin
cthl1_Trc_comp9591_c0_seq1	8h	10,95808963	0,41052111	0,03746284	-4,73839608	8,21E-05	0,095665879	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 4 [Mus musculus] (Ost4 superfamily)
	1d	31,44807562	0,41656063	0,01324598	-6,238301433	1,33E-08	0,000215307	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 4
cthl1_Trc_comp9732_c0_seq1	8h	258,7568315	146,083122	0,56455755	-0,824807451	0,000279817	0,181321223	tubby
	1d	249,5324904	155,22332	0,62205655	-0,684882361	0,001365564	0,520470552	
cthl1_Trc_comp9732_c0_seq1	2d	268,0008338	163,656665	0,6106573	-0,711565129	0,001000709	0,42098233	
cthl1_Trc_minimus_contig1290	1d	12,56983745	0,83312126	0,0662794	-3,915295689	0,000317769	0,245808496	Janus kinase and microtubule interacting protein 1-like (Saccoglossus kowalevskii) ????
cthl1_Trc_comp29610_c0_seq1	8h	27,60094845	4,0663924	0,147328	-2,7628965	0,00038147	0,212844103	

Taula 1. Gens “downregulated” després d’inhibir *egr-4* en organismes regenerants de 8 hores, 1 dia o 2 dies, depenent del cas.

id	mostra	baseMean	baseMeanA	baseMeanB	foldChange	log2FoldChange	pval	padj	
cth1_Trc_comp1015_c0_seq1	8h	334,316215	231,426383	437,206047	1,8891798	0,91776001	6,23E-05	0,07894847	pim-3, partial [Schmidtea mediterranea] [PIM family of oncogenic serine/threonine kinases regulates tumour cell proliferation]
	1d	276,348398	211,297609	341,399186	1,61572669	0,69218318	0,00308407	0,7893851	
	2d	307,472288	215,970073	398,974503	1,84736013	0,88546514	7,60E-05	0,07338622	serine/threonine-protein kinase pim-3-like
cth1_Trc_comp10211_c0_seq1	1d	673,080298	515,429399	830,731196	1,61712645	0,68860691	0,00042671	0,28649058	Coiled-coil domain-containing protein Cborf97
cth1_Trc_comp1035_c0_seq1	2d	236,835877	175,988512	297,683242	1,69149247	0,68829675	0,00023517	0,17230486	TNF receptor-associated factor 2 1
cth1_Trc_comp10379_c0_seq1	8h	286,12578	150,108945	422,142616	2,81224158	1,49172053	2,00E-09	0,00011223	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2 [Harpegnathos saltator]
cth1_Trc_comp10379_c0_seq1	1d	294,167896	142,947174	445,388619	3,11575673	1,63958259	7,17E-12	3,49E-07	dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 4 (or 2)
cth1_Trc_comp10379_c0_seq1	2d	205,333487	139,147181	271,519793	1,95131364	0,96444569	4,69E-05	0,05157501	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2
cth1_Trc_comp1048_c0_seq2	8h	596,949995	454,115867	739,784123	1,62906469	0,70404389	0,0002843	0,18285301	hypothetical protein
	1d	575,105913	438,052187	712,159639	1,62574154	0,70109792	0,00034303	0,25676456	predicted protein
	2d	453,72454	323,657451	583,79163	1,80373302	0,85098581	1,20E-05	0,02293768	predicted protein
cth1_Trc_comp10755_c0_seq1	8h	240,333972	172,20963	308,458313	1,79117923	0,84090971	0,00032889	0,19961505	TNF receptor-associated factor 5-like
cth1_Trc_comp10777_c0_seq1	2d	857,862815	564,120223	1151,60541	2,04141841	1,02957191	4,23E-08	0,00036262	tyrosine kinase (PTK7)
cth1_Trc_comp1096_c0_seq1	8h	5132,8637	3689,28635	6576,44104	1,7825781	0,83396529	2,93E-06	0,01203639	rootletin
	1d	4163,76826	3292,22361	5035,31291	1,52945653	0,61301911	0,00063626	0,34501005	rootletin
	2d	4342,45934	2873,209	5811,70968	2,0227243	1,01629969	2,32E-08	0,00025493	
cth1_Trc_comp1150_c0_seq1	8h	271,258207	191,196311	351,320102	1,83748368	0,87773144	5,20E-05	0,06982432	spermatogenesis-associated serine-rich protein 1
	1d	243,555416	177,841983	309,268848	1,73900922	0,79826558	0,00028341	0,23336523	similar to Spermatogenesis-associated serine-rich protein 1 (Clona
	2d	190,087201	133,732637	246,441764	1,84279448	0,88189518	3,72E-05	0,04542054	spermatogenesis associated, serine-rich 1-like
cth1_Trc_comp1179_c0_seq1	8h	533,134615	415,01471	651,254519	1,56923237	0,650059	0,00076576	0,30141687	dynein heavy chain [Schistosoma
cth1_Trc_comp11815_c0_seq1	2d	290,484734	218,926843	362,042625	1,65371509	0,7257107	0,00032011	0,20694672	Coiled-coil domain-containing protein 169
cth1_Trc_comp11905_c0_seq1	2d	165,762716	106,153826	225,371606	2,12306626	1,0861494	1,32E-06	0,00483652	guanylate cyclase soluble subunit beta-2-like
cth1_Trc_comp1203_c0_seq1	8h	1304,00124	873,011404	1734,99108	1,98736359	0,95085584	2,28E-07	0,00218146	ferritin
	1d	952,643826	611,490626	1293,79703	2,11580844	1,08120901	1,48E-08	0,00021531	ferritin
	2d	765,574751	487,78441	1043,36509	2,13898819	1,09692852	3,44E-09	8,67E-05	ferritin
cth1_Trc_comp12344_c0_seq1	2d	158,827899	118,481356	199,174442	1,68106147	0,74937248	0,00068247	0,3298886	kyureninase
cth1_Trc_comp12538_c0_seq1	8h	477,973241	356,812281	599,134202	1,67912999	0,74771392	0,00016027	0,13030805	hypothetical protein. BAR superfamily domain;
cth1_Trc_comp12617_c0_seq1	8h	149,147801	109,075414	189,220187	1,73476478	0,79474006	0,00055481	0,25299526	Monoglyceride lipase
cth1_Trc_comp12741_c0_seq1	2d	349,612989	263,313681	435,912296	1,6554867	0,72725542	0,0002524	0,18041922	ANKUB1 (ankyrin repeat and ubiquitin domain-containing 1)
cth1_Trc_comp12982_c0_seq1	2d	169,100364	125,450553	212,750175	1,6958887	0,76204149	0,00046963	0,25595173	hypothetical protein
cth1_Trc_comp13015_c0_seq2	8h	94,8423582	63,6682952	126,016421	1,97926489	0,9849647	0,00010922	0,10945763	hypothetical protein
	1d	81,6184232	78,0180072	85,2188391	1,09229705	0,12736525	0,63838868	1	
	2d	57,9110731	35,4103801	80,4117661	2,7085295	1,18323429	1,68E-05	0,0273684	hypothetical protein
cth1_Trc_comp13034_c0_seq1	2d	55,9550943	37,222262	74,6879263	2,0653915	1,00470931	0,00060295	0,30121584	hypothetical protein
cth1_Trc_comp13078_c0_seq1	8h	232,76127	160,280774	305,241767	1,90441909	0,929351	2,81E-05	0,04840279	coiled-coil domain-containing protein 96
	1d	49,2624849	42,7387206	55,7862492	1,3052859	0,38436583	0,26995036	1	
	2d	158,44003	115,3313	201,548761	1,74756341	0,80534481	0,000304	0,20403452	coiled-coil domain containing 96

id	mostra	baseMean	baseMeanA	baseMeanB	foldChange	log2FoldChange	pval	padj	
cth1_Trc_comp13288_c0_seq1	8h	399,980193	265,603793	534,355594	2,01185604	1,00852707	1,01E-06	0,00611587	
	1d	390,11513	248,125139	532,105121	2,14450306	1,10064338	5,37E-08	0,00066944	SMC-domain protein (bacterial contamination?)
	2d	348,474731	242,117934	454,831529	1,87855365	0,90962322	5,23E-06	0,01210762	
cth1_Trc_comp13398_c0_seq1	2d	204,964092	153,783496	256,144688	1,66561884	0,73605829	0,00072079	0,33889711	nicotinic acetylcholine receptor alpha 2 subunit [Bombyx mori]
cth1_Trc_comp1360_c1_seq1	8h	3518,53123	2817,01897	4220,04349	1,49805292	0,58308859	0,00166393	0,47328156	
	1d	2865,56762	2233,83377	3497,28146	1,56558209	0,64669916	0,00045156	0,2933811	hypothetical protein [Peter's wound paper]
	2d	2779,47639	2013,63266	3545,32012	1,76065883	0,81611538	6,66E-06	0,01395762	hypothetical protein
cth1_Trc_comp13722_c0_seq1	8h	27,482479	9,70766436	45,2572937	4,66201673	2,22095418	4,69E-05	0,06625002	TNF receptor-associated factor-2-like protein A [Dugesia japonica]
cth1_Trc_comp13722_c0_seq2	8h	38,6973725	15,7683651	61,6263798	3,90822888	1,96651496	9,07E-05	0,09775471	TNF receptor-associated factor-2-like protein A
cth1_Trc_comp13766_c0_seq1	2d	668,138613	521,33652	814,940707	1,56317594	0,64448017	0,00068662	0,3298886	NACHT and WD repeat domain-containing protein 1; Leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein
cth1_Trc_comp14171_c0_seq1	8h	277,230974	188,363086	366,098862	1,94358072	0,95871703	5,53E-06	0,01763974	protein FAM47E-like
	1d	251,951356	200,760787	303,141926	1,50996582	0,59451589	0,0048198	1	
	2d	235,022397	168,296108	301,748687	1,79296295	0,84234568	5,71E-05	0,0583701	hypothetical protein
cth1_Trc_comp1431_c0_seq1	2d	781,780562	595,641879	967,919246	1,625002	0,7004415	0,00020425	0,15349043	F-box and WD repeat domain containing 7-like????
cth1_Trc_comp1432_c0_seq1	2d	231,776768	172,136352	291,417185	1,69294389	0,75953416	0,00068396	0,3298886	hypothetical protein
cth1_Trc_comp14579_c0_seq1	8h	126,374747	80,6870856	172,062408	2,13246527	1,09252225	7,01E-06	0,02014044	synaptotagmin
	1d	148,527386	102,591715	194,463057	1,89550449	0,92258188	0,00013328	0,14015549	synaptotagmin 7
	2d	119,152273	97,0536662	141,250879	1,45538942	0,54140523	0,01899054	1	
cth1_Trc_comp14854_c0_seq1	2d	25,7992847	14,8007667	36,7978028	2,48620922	1,31394771	0,00017972	0,14081659	adenyllyltransferase and sulfurtransferase MOC53-like
cth1_Trc_comp1505_c0_seq1	8h	2193,29743	1784,27115	2602,32372	1,45847996	0,54446557	0,00270056	0,60927961	
	1d	2048,86494	1605,02919	2492,7007	1,5530563	0,63511013	0,00052948	0,32543157	
	2d	1736,6122	1296,75513	2176,46927	1,6783965	0,74708358	3,65E-05	0,04529787	PREDICTED: EF-hand domain-containing protein 1
cth1_Trc_comp1508_c0_seq1	2d	978,365451	735,705552	1221,02535	1,65966581	0,73089277	0,00018098	0,14081659	caveolin-3
cth1_Trc_comp15310_c0_seq1	8h	98,4488744	62,4350687	134,46268	2,1536403	1,10677731	1,56E-05	0,03638051	hypothetical protein
cth1_Trc_comp15767_c0_seq1	2d	197,157594	145,694697	248,620491	1,70644845	0,77099684	0,00033796	0,21531972	epithelial cell-transforming sequence 2 oncogene-like and F-box only protein 16-like (2 genes in the same contig)
cth1_Trc_comp158_c0_seq1	2d	1208,12384	887,804415	1528,44326	1,72159908	0,78374921	2,00E-05	0,03080242	alpha-galactosidase A
cth1_Trc_comp158_c2_seq1	8h	2202,36358	1957,62109	2447,10606	1,25004071	0,32197508	0,05708862	1	
	1d	2234,06005	1700,61838	2767,50172	1,62735024	0,70252478	0,00014036	0,144412165	alpha-N-acetylgalactosaminidase
	2d	2438,97145	1741,73555	3136,20735	1,800622	0,84849535	1,90E-06	0,00574996	alpha-N-acetylgalactosaminidase precursor
cth1_Trc_comp15991_c0_seq1	2d	88,4384698	60,7577198	116,11922	1,91118462	0,93446715	0,00053416	0,27955534	sodium-dependent glucose transporter 1
cth1_Trc_comp1625_c1_seq1	1d	370,470622	177,169355	463,77189	2,61677555	1,38828629	2,62E-05	0,05320448	troponin I
cth1_Trc_comp1630_c1_seq1	8h	1683,77333	1100,8297	2266,71695	2,05909865	1,04201295	6,45E-07	0,00427603	SCO-spondin precursor
	1d	1593,2427	1346,86713	1839,61828	1,36584986	0,4497989	0,03532277	1	
	2d	1079,55804	669,692916	1489,42316	2,22403899	1,15318208	5,23E-08	0,00038329	SCO-spondin

id	mostra	baseMean	baseMeanA	baseMeanB	foldChange	logFoldChange	pval	padj	
cth1_Trc_comp16543_c0_seq1	8h	99.9242581	68.1105786	131.737838	1.93417303	0.95171686	0.00038622	0.2128441	Ggii-associated plant pathogenesis-related protein 1; venom allergen-like (VAL) 11 protein
cth1_Trc_comp16708_c0_seq1	8h	294.633554	215.378359	373.888749	1.73586247	0.79573576	0.00012523	0.1136005	x-ray radiation resistance-associated protein 1 XRR41
	1d	278.52198	209.815428	347.228532	1.65492373	0.72676473	0.00070195	0.36907537	
cth1_Trc_comp1676_c0_seq1	2d	253.503349	188.056719	318.949579	1.6963075	0.76216233	0.0002442	0.174441	x-ray radiation resistance-associated protein 1
	8h	533.132761	388.953005	681.312536	1.75165767	0.80872086	2.39E-05	0.04629147	hypothetical protein; trichohyalin; coiled-coil domain-containing protein 173
	1d	503.942758	380.629419	627.250508	1.64794172	0.72066522	0.00031824	0.2458085	Trichohyalin (Scleroform); Uncharacterized protein C2orf77
	2d	432.448632	321.609441	543.287824	1.68977822	0.75646695	0.00011184	0.09932573	hypothetical protein
cth1_Trc_comp1696_c0_seq1	2d	542.476504	368.345813	716.606795	1.94547289	0.9601188	2.45E-05	0.03595703	glutathione transferase zeta 1; Probable maleylacetate isomerase 2
cth1_Trc_comp17104_c0_seq1	8h	75.600684	43.8942337	107.307134	2.44467496	1.28964265	0.00019566	0.14290138	TNF receptor-associated factor-2-like protein 8 (Dugaia japonica)
	1d	35.2776391	18.9594334	51.5958448	2.72138116	1.44433904	7.67E-05	0.09226324	phospholipase A2 (enzyme induced by inflammatory conditions)
cth1_Trc_comp18163_c0_seq1	8h	803.315887	577.176262	1029.45551	1.7830681	0.83479761	7.92E-06	0.02132237	doublecortin domain-containing protein 2; DCC2 is one of the candidate susceptibility genes for dyslexia. It belongs to the superfamily of doublecortin domain co
cth1_Trc_comp197_c0_seq1	1d	730.712462	620.056529	841.368395	1.35692208	0.44033788	0.02296103	1	
	2d	637.564181	466.226269	806.902093	1.72311658	0.78518775	3.56E-05	0.04529787	doublecortin domain-containing protein 2
cth1_Trc_comp2035_c0_seq1	8h	185.916085	135.014489	236.817682	1.7540168	0.81066257	0.00047377	0.23199592	Spermatogenesis-associated protein 4
cth1_Trc_comp20862_c0_seq1	2d	58.2446428	35.0139854	81.4753001	2.32693591	1.21843148	2.39E-05	0.03556693	snc domain (chromosome segregation protein)
cth1_Trc_comp2122_c0_seq1	2d	1405.8112	1050.14414	1761.7827	1.67786808	0.74619931	3.37E-05	0.04495152	Deoxyribonuclease II family protein; Cell-death-related nuclease 7
cth1_Trc_comp23192_c0_seq1	1d	23.1506639	10.2335397	36.0671882	3.52409087	1.81738171	3.78E-05	0.06421973	Cytosolic purine 5-nucleotidase
cth1_Trc_comp2339_c0_seq1	8h	338.576444	229.231549	447.921339	1.95401262	0.96643978	1.87E-06	0.00862732	protein SPATIAL-like
	1d	303.220768	222.588254	395.853382	1.77841048	0.83058835	5.29E-05	0.08009841	SPATIAL Stomal Protein Associated with Thymii and Lymph-node (neurogenesis, T-cell, sperm)
	2d	279.216978	181.969542	376.464414	2.0683202	1.04881651	3.26E-07	0.00168514	SPATIAL-like
cth1_Trc_comp2627_c0_seq1	8h	560.35671	421.62557	699.08785	1.65807745	0.7295114	0.00022556	0.15502966	hypothetical protein; DUF3695 domain
	1d	517.383035	403.648517	631.117553	1.56333245	0.64480916	0.00103142	0.45697343	
cth1_Trc_comp2657_c0_seq1	2d	408.174817	299.213232	517.136402	1.72832063	0.78937088	4.30E-05	0.04845681	hypothetical protein
	8h	320.271638	221.351946	419.191331	1.89377748	0.92126682	3.99E-06	0.01433063	cysteine dioxygenase
	1d	387.013255	308.099926	465.926584	1.51258802	0.59670431	0.00434321	0.84145303	
	2d	465.429433	325.600767	605.258099	1.85889642	0.89444638	4.37E-06	0.0110267	cysteine dioxygenase
cth1_Trc_comp2713_c0_seq1	8h	2813.3904	2053.58714	3573.19365	1.7997664	0.79906794	0.00042773	0.22615693	Tyrosine aminotransferase
cth1_Trc_comp279_c2_seq1	8h	7092.58426	5152.95463	9032.17389	1.75280095	0.80966217	3.36E-06	0.01298517	lectin 1; macrophage mannose receptor 1-like
	1d	7132.44256	5844.41721	8420.4679	1.44077118	0.52684123	0.00381969	0.88602	
	2d	6996.37581	5190.28479	8802.46682	1.6955064	0.76209418	1.94E-05	0.03046513	lectin 2a (Girardia tigrina)
cth1_Trc_comp2794_c0_seq1	8h	325.212045	249.398741	409.02535	1.64004577	0.71373608	0.00050951	0.2386496	Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor
	1d	257.704083	209.405485	306.00268	1.46129257	0.54724506	0.00910413	1	
cth1_Trc_comp2799_c0_seq1	2d	248.536193	187.583011	309.489376	1.64987957	0.72236072	0.00045679	0.25320665	lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor
	8h	124.932624	106.155076	143.710572	1.35377957	0.43699285	0.17570062	1	
	1d	78.9870282	42.335144	115.638912	2.73151102	1.44969925	0.00039296	0.27438184	asparagine synthetase
	2d	146.573181	81.7328022	211.413561	2.5864276	1.37108082	0.00045148	0.25283547	asparagine synthetase
cth1_Trc_comp2856_c0_seq1	8h	1203.22119	790.733479	1615.70891	2.04330403	1.03090388	2.66E-05	0.04771327	transposon Ty3-G gap-Pol polyprotein
cth1_Trc_comp3027_c0_seq1	8h	2642.06419	2085.92397	3198.20442	1.53333154	0.61657558	0.00072517	0.29480296	calmodulin
	1d	2258.7148	1775.23025	2742.19935	1.54470067	0.6273273	0.0006261	0.34503005	
	2d	2115.35019	1765.43255	2465.46784	1.3964101	0.4817227	0.00710111	1	

id	baseMean	baseMeanA	baseMeanB	foldChange	log2FoldChange	pval	padj	
cth1_Trc_comp3074_c0_seq1	47,3523956	29,4290089	65,2757813	2,21807603	1,14930882	0,00070601	0,29023594	NAD dependent epimerase/dehydratase; Cell wall integrity and stress response component 1 precursor [Schistosoma
1d	39,7507456	23,0724282	56,4290629	2,44573576	1,29026854	0,00044642	0,29296433	NAD dependent epimerase/dehydratase [Schistosoma mansoni]; Cell wall integrity and stress response component 1 precursor
2d	26,4387471	19,1322746	33,7452197	1,76378504	0,81867474	0,02046742	1	
cth1_Trc_comp3134_c0_seq1	821,267998	635,158668	1007,37733	1,58602469	0,66541523	0,00045911	0,22740047	tektin 3
1d	695,370846	549,47249	841,269203	1,53104881	0,61452028	0,00117591	0,49107375	
2d	657,074637	475,006366	839,142907	1,76659297	0,82096968	1,39E-05	0,02448741	tektin 3
cth1_Trc_comp3208_c0_seq1	303,948133	223,335665	384,560601	1,77189516	0,7839973	0,00011408	0,10029886	hypothetical protein
2d	1398,91261	1022,03459	1775,79063	1,7375054	0,79701746	1,36E-05	0,02448741	choline dehydrogenase, mitochondrial-like
cth1_Trc_comp3314_c0_seq1	182,957283	137,061454	228,853112	1,66971169	0,73959902	0,00078341	0,30141687	hematopoietic lineage cell specific protein [Schistosoma mansoni]; drebrin-like; comp345_c1_seq1; drebrin-like
8h	376,980977	272,513749	481,448204	1,76669326	0,82105158	0,00011611	0,11184521	acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial precursor [Homo
1d	331,078225	250,730488	411,425962	1,64090919	0,7144954	0,00127167	0,50253678	
2d	370,793862	267,161656	474,426068	1,77580149	0,82847032	0,00010541	0,09804172	acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial precursor
cth1_Trc_comp3542_c0_seq1	1272,02956	993,232942	1550,82618	1,56139221	0,64283297	0,00044793	0,25245566	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 4-like
8h	830,321233	652,370004	1008,27246	1,54553507	0,62812319	0,00093551	0,33316648	
1d	816,001513	634,17221	997,830816	1,57343826	0,65392057	0,00077651	0,37300445	
2d	773,159692	525,766444	1020,55294	1,9410766	0,95685705	4,20E-07	0,00184798	hypothetical protein
cth1_Trc_comp3839_c0_seq1	265,974076	193,726401	338,221751	1,7458733	0,80394887	9,31E-05	0,08801565	thrombospondin type 3 repeat family protein; endoplasmic [Schistosoma
8h	101,411574	45,2936477	157,5295	3,47796011	1,79824139	3,91E-09	0,00011223	ankyrin repeat protein [BCL-3 Peter's wound paper]
1d	139,142202	93,2807552	185,003649	1,98329922	0,98790236	0,00054711	0,32829981	
2d	83,7777693	74,3594788	93,1960598	1,25331782	0,3257523	0,26795417	1	
cth1_Trc_comp4097_c0_seq2	1233,95336	938,831769	1529,07495	1,62869962	0,70372055	0,00019203	0,17458657	peptidase inhibitor 16 isoform 3
1d	1040,60464	701,623521	1379,58577	1,96677639	0,97546613	1,32E-07	0,00083209	radial spoke head protein 3 homolog [Strongy
8h	1578,52044	1158,47241	1998,56846	1,72517571	0,78674331	0,00052222	0,27692719	peptidase inhibitor 16
2d	555,950279	468,59829	643,302267	1,37282248	0,45714508	0,02101677	1	intermediate filament b [Dugesia
cth1_Trc_comp4164_c0_seq1	516,395618	397,152226	635,638977	1,6004919	0,67851538	0,00051827	0,32543157	
1d	478,385453	350,33314	606,437767	1,73103169	0,79163214	4,05E-05	0,04752328	acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial precursor
8h	289,588125	216,6815	362,494749	1,67293816	0,74238412	0,00047712	0,232321915	ankyrin and armadillo repeat containing protein
1d	207,236926	187,687078	226,786773	1,20832385	0,27300717	0,18410497	1	Major facilitator superfamily MFS_1
2d	186,634473	134,571815	238,697131	1,77375779	0,82680495	0,00012349	0,10644655	monocarboxylate transporter 5
cth1_Trc_comp4210_c0_seq1	1723,82165	1385,11416	2062,52914	1,48906798	0,57440962	0,00127637	0,40442216	
1d	1756,57981	1464,49867	2048,66095	1,39888208	0,48427436	0,01182285	1	
2d	1523,52961	1105,06982	1941,9894	1,75734543	0,8133978	8,80E-06	0,01757649	centrosome protein 4-like
cth1_Trc_comp4285_c0_seq1	412,568973	324,576404	500,561543	1,54219942	0,62498933	0,00135553	0,42023363	
1d	335,196371	255,187362	415,205379	1,6270609	0,70226825	0,00066122	0,35573506	
2d	324,401301	241,597837	407,204765	1,68546528	0,75314691	0,00013961	0,11690542	protein phosphatase 1 regulatory subunit 32
cth1_Trc_comp4293_c0_seq1	280,382238	199,181346	361,58313	1,81534635	0,86024483	4,47E-05	0,06422887	halomucin; hypothetical protein
1d	265,988422	185,807687	346,169158	1,86305078	0,897667	2,23E-05	0,04792556	hypothetical protein; halomucin
2d	267,348605	189,90162	344,79559	1,81565376	0,86048911	4,20E-05	0,04798242	hypothetical protein
cth1_Trc_comp4399_c0_seq1	223,798073	167,791473	279,804672	1,667575065	0,73775065	0,00044669	0,25245566	uncharacterized protein

id	mostra	baseMean	baseMeanA	baseMeanB	foldChange	log2FoldChange	pval	padj	
cth1_Trc_comp4453_c0_seq1	8h	759,105355	513,052961	1005,15775	1,95916957	0,97024227	1,99E-05	0,04178272	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1
1d		652,813274	489,422874	816,203674	1,667686	0,73784768	0,00137154	0,52047542	
2d		658,34058	422,731747	893,949412	2,11469666	1,08045073	1,86E-06	0,00574996	golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1 [SCP-like extracellular protein]
cth1_Trc_comp4578_c0_seq1	8h	1205,88632	875,876586	1535,89605	1,75355304	0,81028207	7,02E-05	0,08647797	
1d		1274,17784	900,285671	1648,07001	1,83060784	0,87232277	6,02E-05	0,08471103	
2d		1776,15027	1034,56878	2517,73177	2,43360502	1,28309503	2,32E-09		dscam...e-value not really significant
cth1_Trc_comp4603_c0_seq1	8h	197,958598	131,901605	264,015592	2,00161016	1,00116102	0,00026191	0,17363161	hypothetical protein
1d		170,327362	119,490268	221,164456	1,85089932	0,88822642	0,00221945	0,67244131	
2d		136,800233	77,4786085	196,121859	2,53130332	1,33988039	2,31E-06	0,00662854	hypothetical protein
cth1_Trc_comp4622_c0_seq1	2d	115,933894	82,0828083	149,78498	1,82480331	0,86774097	0,00023181	0,17127173	ankyrin-1-like
cth1_Trc_comp4683_c0_seq1	2d	835,921788	638,812153	1033,03142	1,61711298	0,69342048	0,00020082	0,15221566	coiled-coil domain-containing protein 151
cth1_Trc_comp4698_c0_seq1	8h	304,856835	224,123296	385,590373	1,72043861	0,78277642	0,00029716	0,1897078	hypothetical protein
2d		396,72465	291,572856	501,876444	1,72127286	0,78347582	5,84E-05	0,05864321	hypothetical protein
cth1_Trc_comp5096_c0_seq1	8h	1711,00869	1313,5915	2108,42588	1,6050849	0,68264961	0,00025393	0,17097656	PREDICTED: succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial-like [Cavia
8h		2543,31168	1868,74503	3217,87832	1,72194616	0,78404003	0,0003591	0,20384964	3-oxoacid CoA transferase 1 [Taeniopygia
2d		234,191616	155,165965	313,217266	2,01859516	1,0133516	0,00055016	0,28394143	hypothetical protein
cth1_Trc_comp5112_c0_seq1	8h	986,481655	772,874592	1200,08872	1,55275996	0,63483482	0,00105567	0,35887443	
1d		990,255318	754,433833	1226,0768	1,62516148	0,70058307	0,00018402	0,17087105	SAM domain and HD domain-containing protein 1
2d		4,1945507	4,95420602	3,43489537	0,69332914	-0,5283877	0,54092771	1	
cth1_Trc_comp5170_c0_seq1	8h	41,0974942	22,30127	59,8937184	2,68566401	1,42527883	9,67E-05	0,10044676	no hit. GO Kerstin: PREDICTED: epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1-like [Amphimedon]??
cth1_Trc_comp5279_c0_seq1	8h	453,394008	287,004211	619,783804	2,15949376	1,11069315	0,00017964	0,13580746	TNF receptor-associated factor 2 [Danio
1d		423,442542	257,779979	589,105106	2,28530202	1,19238484	4,21E-05	0,06934472	TNF receptor-associated factor 2
2d		343,942484	230,273937	457,611032	1,98724631	0,9907707	0,00060639	0,30121584	TNF receptor-associated factor 2 [Danio
cth1_Trc_comp5280_c0_seq1	8h	237,18106	169,83141	304,530711	1,79313538	0,84248442	5,27E-05	0,06982432	WW domain-containing transcription regulator protein 1
1d		254,786639	198,202402	311,370876	1,57097428	0,65165956	0,00248584	0,70861541	
2d		285,338208	213,978276	356,69814	1,66698296	0,73723935	0,0002963	0,20194879	WW domain containing transcription regulator 1
cth1_Trc_comp5381_c0_seq1	8h	371,191854	279,605972	462,777736	1,65510677	0,72692429	0,00034977	0,20138465	IQ domain-containing protein E-like
cth1_Trc_comp5440_c0_seq1	8h	1673,16137	1208,11369	2138,20904	1,76987403	0,82364668	0,00033823	0,20138465	E3 ubiquitin-protein ligase MIB1
cth1_Trc_comp5599_c0_seq1	8h	1183,003	807,675555	1558,32945	1,32939379	0,9481507	1,80E-07	0,00194294	coiled-coil domain-containing protein 11 [Danio rerio]; trichoplein keratin filament-binding protein
1d		1123,27446	787,177801	1459,37111	1,85392819	0,89058536	2,81E-06	0,01440794	coiled-coil domain-containing protein 11-like [Saccoglossu
2d		1048,86225	702,344635	1395,37986	1,98674524	0,99040689	1,02E-07	0,00068811	coiled-coil domain containing 11 [Xenopus
cth1_Trc_comp5666_c0_seq1	2d	921,80625	698,008942	1145,60356	1,64124482	0,71479045	0,00010605	0,09804172	endoplasmic reticulum protein
cth1_Trc_comp5715_c0_seq1	2d	1001,87515	761,617923	1242,13238	1,63091275	0,7056796	0,00011014	0,0909075	endoglycosylase
cth1_Trc_comp5744_c0_seq1	2d	865,318643	676,556605	1054,08068	1,55800812	0,63970275	0,00063096	0,30992035	WD repeat-containing protein 52 [Mus]
cth1_Trc_comp5796_c0_seq1	8h	310,041519	205,303922	414,779115	1,01458206	1,01458206	4,30E-07	0,00359671	SAM domain and HD domain-containing protein 1
1d		296,093441	197,37375	394,813133	2,00033253	1,00023985	2,20E-06	0,01280992	samhd1
2d		339,937845	204,771575	475,159934	2,32107162	1,21479104	1,90E-09	8,67E-05	SAM domain and HD domain-containing protein 1
cth1_Trc_comp5850_c1_seq1	2d	1160,74345	914,962998	1406,5239	1,53724675	0,62034876	0,00053308	0,27955534	granulin

id	mostra	baseMean	baseMeanA	baseMeanB	foldChange	log2FoldChange	pval	padj	
cth1_Trc_comp5927_c0_seq1	8h	373,912284	283,340049	464,484519	1,63931827	0,71309598	0,00059055	0,26235101	DPY30 domain containing 1
	1d	301,167134	232,114934	370,219334	1,59498283	0,67354089	0,00123586	0,50170923	
	2d	241,767606	168,108461	315,426751	1,87632882	0,90791268	8,19E-06	0,01675604	Dydc1; DPY30 domain-containing protein 1-like
cth1_Trc_comp5943_c0_seq1	8h	15232,2361	13047,3992	17417,073	1,33490765	0,41673994	0,02210324	1	
	1d	12692,7598	9536,20514	15849,3144	1,66201483	0,73293326	3,82E-05	0,06421973	leucine aminopeptidase 1
	2d	13509,3463	9105,06344	17913,6292	1,96743596	0,97631667	4,54E-08	0,00036262	peptidase M17 precursor
cth1_Trc_comp6211_c0_seq1	2d	603,072905	455,9746	750,171211	1,64520394	0,71826644	0,00014565	0,12080787	coiled-coil domain-containing protein
cth1_Trc_comp6224_c0_seq1	8h	569,32239	420,724718	717,920063	1,70638908	0,77094664	9,93E-05	0,10192786	SPATIAL-like
	1d	524,864156	385,517735	664,210577	1,72290537	0,78484347	7,23E-05	0,08943538	
	2d	436,319226	335,027739	537,610713	1,60467523	0,68228134	0,00040437	0,24185924	SPATIAL-like
cth1_Trc_comp6238_c0_seq1	8h	1083,15495	765,670018	1400,63989	1,82929964	0,87129141	2,62E-06	0,01130038	
	1d	1045,26813	744,997113	1345,53916	1,80609982	0,85287763	3,98E-06	0,01736461	
	2d	887,791332	566,00105	1209,58161	2,13706603	1,09563148	4,41E-09	8,67E-05	chloride channel calcium activated
cth1_Trc_comp6351_c1_seq1	8h	229,4472	102,93564	355,958761	3,4580711	1,78996753	0,0002263	0,15502966	TNF receptor-associated factor-2-like protein A [Dugesia
cth1_Trc_comp6380_c0_seq1	8h	243,841325	159,109423	328,573227	2,06507711	1,04619565	4,59E-07	0,000359671	SAM domain and HD domain-containing protein 1-like
	1d	240,72744	163,407887	318,046993	1,94633808	0,96076233	8,37E-06	0,02610192	
	2d	272,279212	186,360809	358,197616	1,92206515	0,94265724	4,51E-06	0,0110267	SAM domain and HD domain-containing protein 1
cth1_Trc_comp6446_c0_seq1	2d	848,014304	650,320152	1045,70846	1,60799024	0,68525865	0,00040024	0,24102865	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B [Ascaris
cth1_Trc_comp6558_c0_seq1	8h	773,174973	594,965234	951,384712	1,59905934	0,67722347	0,00022269	0,15502966	coiled-coil domain-containing protein 40-like [Xenopus
	1d	662,731323	524,909115	800,55353	1,52512789	0,60893022	0,00200645	0,64129524	
	2d	610,945963	446,880079	775,011847	1,73427253	0,79433063	3,28E-05	0,04463015	coiled-coil domain-containing protein 40-like [Xenopus
cth1_Trc_comp6585_c0_seq1	8h	700,000975	550,221745	849,780206	1,54443225	0,62707658	0,00090544	0,32514348	
	1d	672,7625	541,810068	803,714932	1,4833887	0,56889568	0,00323425	0,8151938	
	2d	581,053244	453,8591	708,247387	1,56050057	0,64200889	0,00070092	0,33311871	coiled-coil domain containing 65
cth1_Trc_comp6587_c0_seq1	1d	617,489204	457,327636	777,65073	1,70042375	0,76589431	9,49E-05	0,11041082	TNF receptor associated factor-2, partial [Schmidtea
cth1_Trc_comp6610_c0_seq1	2d	289,276913	220,085102	358,468725	1,62877324	0,70378577	0,00041521	0,24666664	hypothetical protein
cth1_Trc_comp6624_c0_seq1	2d	691,413067	259,954877	1122,87126	4,31948525	2,1108594	0,00030383	0,20403452	phenyl alanine hydroxylase
cth1_Trc_comp6866_c1_seq1	8h	1784,64121	1297,50796	2271,77446	1,75087517	0,80807623	0,00035952	0,20384964	dynein heavy chain
	8h	1459,97988	1072,95713	1847,00263	1,72141326	0,78359348	8,60E-05	0,0962721	hypothetical protein
	1d	1380,18107	940,777223	1819,58492	1,93412943	0,95168434	4,69E-06	0,01883839	hypothetical protein
	2d	1430,46015	929,621053	1931,29925	2,07751238	1,05485708	3,20E-07	0,00168514	hypothetical protein
cth1_Trc_comp7136_c0_seq1	2d	408,055141	311,836648	504,273635	1,61710831	0,69341631	0,00038008	0,23337006	serine/threonine-protein kinase Nek11 isoform 1 [Homo;
cth1_Trc_comp7154_c0_seq1	8h	952,529565	723,201556	1181,85757	1,6342022	0,7085865	0,00012836	0,1140476	similar to meiosis-specific nuclear structural protein 1
	1d	891,127815	737,626808	1044,62882	1,41620235	0,50202742	0,0100618	1	
	2d	767,260239	579,57816	954,942318	1,64765062	0,72041036	0,0001271	0,10849793	similar to meiosis-specific nuclear structural protein 1
cth1_Trc_comp7213_c0_seq1	8h	11,7228719	3,88306574	19,5626781	5,03794665	2,33283585	0,0001532	0,19550949	apoptosis inhibitor 2; Baculoviral IAP repeat-containing protein 7
cth1_Trc_comp7294_c0_seq1	8h	879,505199	684,430535	1074,57986	1,57003496	0,65079668	0,00075868	0,30141687	zinc carboxypeptidase
	1d	1303,25255	1005,29885	1601,20625	1,59276643	0,67153472	0,00034891	0,25807576	carboxypeptidase
	2d	1218,43424	1048,09322	1388,77526	1,32504937	0,40604611	0,02711337	1	

id	mostra	baseMean	baseMeanA	baseMeanB	foldChange	log2FoldChange	pval	padj	
cthl1_Trc_comp7297_c0_seq1	8h	26.9237068	8.57071052	45.276703	5.28272457	2.40128219	8.55E-05	0.0962721	NLR family, apoptosis inhibitory protein (not significant hit)
cthl1_Trc_comp7346_c0_seq1	8h	943.759782	729.262257	1.158.25731	1.58825895	0.66744615	0.00030917	0.138083	axonal protein 66.0
1d	847.136935	629.448684	1064.82319	1.69167911	0.75845593	7.09E-05	0.08943538		Colled-coil domain-containing protein 63 [Crassostrea
2d	667.875496	494.807727	1.69593543	1.69593543	0.76514044	5.00E-05	0.0530037		axonal p66 O-like [Saccolossus
cthl1_Trc_comp7373_c0_seq1	1d	1124.57495	953.840598	1495.30931	1.56767211	0.64862384	0.0004269	0.29271482	spem flagellar protein 2 isoform 1
cthl1_Trc_comp7391_c0_seq1	8h	330.351968	240.539212	420.164723	1.74676187	0.80468294	0.0006766	0.7183186	Spem-associated antigen 8
1d	291.633301	226.573089	356.693513	1.57429779	0.65470846	0.00656502	1		1
2d	240.97345	172.457524	309.48976	1.7945882	0.84364881	0.00030711	0.20456165		spem associated antigen 8
cthl1_Trc_comp7402_c0_seq1	1d	288.73904	219.361895	358.116485	1.63253597	0.70711478	0.00043401	0.2545566	Sorting neddin-18 [Schistosoma]
cthl1_Trc_comp7439_c0_seq1	8h	1122.8255	804.684062	1440.96694	1.79072385	0.84054288	1.91E-05	0.04123728	ribc1: RIB43A-like with coiled-coils protein 2-like
1d	956.201297	695.434956	1216.96764	1.7499374	0.80730331	4.71E-05	0.07480747		ribc1: RIB43A-like with coiled-coils protein 2
2d	789.616857	561.94078	1017.29293	1.81032054	0.85624516	1.23E-05	0.02307519		RIB43A domain with coiled-coils 1; ribc1
cthl1_Trc_comp7558_c0_seq1	2d	1395.3337	1017.42057	1773.22683	1.74286512	0.80146093	1.03E-05	0.02012655	peroxidase
cthl1_Trc_comp7569_c0_seq1	8h	392.223336	262.73505	521.711622	1.9856948	0.9894339	8.76E-05	0.09683788	ADP-ribosylation factor-like
1d	446.797288	327.300546	566.294031	1.7301958	0.79093531	0.00000196	0.48847033		ADP-ribosylation factor 1
2d	359.902016	257.317188	462.486844	1.79734144	0.8458645	0.00044514	0.25245566		ADP-ribosylation factor 1
cthl1_Trc_comp7824_c0_seq1	8h	100.789997	66.9038101	134.676783	2.01298226	1.00933446	0.00061117	0.26737721	calmodulin
1d	89.293013	59.575777	118.941026	1.99640589	0.99740507	0.00052214	0.32543157		calmodulin
2d	87.9006868	57.317782	118.489595	2.06745627	1.04785681	0.0001745	0.1382196		calmodulin
cthl1_Trc_comp785_c1_seq1	8h	1087.13494	918.122785	1256.14709	1.36816896	0.4524464	0.01560007	1	1
1d	1073.06012	840.665097	1305.45515	1.52288373	0.63494981	0.00075524	0.38154915		EF-hand calcium-binding domain-containing protein 6; calmodulin
2d	900.252547	645.967265	1154.54383	1.78732672	0.83780338	6.67E-06	0.01395762		1
cthl1_Trc_comp7855_c0_seq1	8h	752.304323	620.070012	884.538835	1.42651413	0.51249404	1.51E-02	0.08362965	bestrophin (anion channel) [Best1: improve intracellular Ca(2+) signaling] [Best1: has been proposed to form Ca(2+)-activated Cl(-) channels in epithelial cells]
1d	752.324595	551.178325	953.470864	1.72087728	0.7905697	5.75E-05	0.33311871		calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1
2d	559.685799	435.97861	683.93737	1.56749642	0.6846215	0.00069886	0.00069886		Deleted in lung and esophageal cancer protein 1; chloride channel calcium-activated (2 genes on acontig)
cthl1_Trc_comp786_c0_seq1	8h	850.658677	623.78913	1077.52823	1.7273918	0.78859534	3.82E-05	0.5875083	Deleted in lung and esophageal cancer protein 1; chloride channel calcium-activated (2 genes on acontig)
1d	730.45262	553.544887	906.945638	1.63843197	0.71231577	0.00017269	0.6383153		Rhabdoid tumor deletion region protein 1-like
2d	651.326841	485.434876	817.218006	1.66347774	0.75144464	5.87E-05	0.65864321		Rhabdoid tumor deletion region protein 1 [Schistosoma]
cthl1_Trc_comp7874_c0_seq1	8h	1439.40664	1110.43997	1768.3733	1.59249788	0.67129145	0.00022505	0.15502966	Rhabdoid tumor deletion region protein 1 [Schistosoma]
1d	1315.41928	1068.22923	1562.60933	1.46280338	0.54873587	0.00331734	0.32490166		growth arrest-specific 8 [Xenopus]
2d	1163.32681	888.637953	1438.01566	1.61822445	0.69441172	0.00017236	0.13776991		growth arrest-specific protein 8
cthl1_Trc_comp7962_c0_seq1	8h	127.79321	1003.88373	1551.98046	1.54097632	0.62851822	0.00051921	0.24187658	coiled-coil domain-containing protein 19
1d	1158.79741	913.982644	1403.61217	1.53570987	0.61890568	0.00059832	0.46185562		coiled-coil domain-containing protein 19 [Schistosoma]
2d	983.73801	732.491553	1234.96447	1.68597776	0.75358551	4.93E-05	0.05281681		Coiled-coil domain-containing protein 19 [Schistosoma]
cthl1_Trc_comp7977_c0_seq1	8h	115.69334	69.4573766	160.881291	2.31625925	1.21179674	4.93E-06	0.01700146	NAD dependent epimerase/dehydratase
1d	124.728832	85.740126	163.717538	1.9094623	0.93316644	0.00016993	0.16298494		NAD dependent epimerase/dehydratase
2d	82.6321044	64.7624158	100.501793	1.55185368	0.63399253	0.012731	1		1
cthl1_Trc_comp8033_c0_seq1	8h	247.955667	200.887897	295.043437	1.4686969	0.55453672	0.00583243	0.84481	
1d	334.584417	253.604888	416.363946	1.64178202	0.7152626	0.00170891	0.38954652		
2d	375.563852	276.812839	474.314864	1.71348578	0.77693422	0.0003148	0.20694672		Notilin-2 [Schistosoma mansoni]
cthl1_Trc_comp8056_c0_seq1	8h	2662.52737	2119.46635	3205.58839	1.51245071	0.59688813	0.00075542	0.30020346	polyamine modulated factor 1 binding protein
1d	2979.72456	2455.94849	3503.50063	1.43653669	0.51251685	0.00541069	1		1
2d	2534.5019	1747.72886	3321.27094	1.90033101	0.92625073	3.82E-07	0.00184798		Hypothetical protein

id	mostra	baseMean	baseMeanA	baseMeanB	foldChange	log2FoldChange	pval	padj	
cthl1_Trc_comp8234_c0_seq1	8h	1180.04824	1010.02467	1349.67182	1.33574709	0.41764688	0.02223474	1	
	1d	998.402263	777.639443	1224.16508	1.58439389	0.00034419	0.25676456		leukotriene A4 hydrolase (M01 family) [Schistosoma mansoni]
	2d	1042.68565	766.786516	1318.58478	1.71962437	0.78209346	2.35E-05		leukotriene A4 hydrolase
cthl1_Trc_comp8400_c0_seq1	8h	207.995481	98.7729151	317.218046	3.21158939	1.68328745	7.62E-06	0.0211729	gap-pol polypeptide
	8h	1646.16902	1278.09263	2014.24541	1.57597764	0.65624707	0.00034472	0.20138465	cytochrome P450 1A1
cthl1_Trc_comp8457_c0_seq1	1d	139.217389	97.2464917	181.188287	1.86318584	0.89777158	0.00013492	0.14018966	PREDICTED: UPF0602 protein C1orf47 homolog [Strongylo, hypothetical protein]
cthl1_Trc_comp8607_c0_seq1	2d	409.426788	286.643937	532.20964	1.85669247	0.89773488	4.67E-06	0.01110086	3-oxoacyl-acyl-carrier-protein reductase
cthl1_Trc_comp8621_c0_seq1	2d	823.647324	632.879604	1014.41504	1.60285627	0.80864507	0.00027068	0.18739077	sperm surface protein Sp17-like
	1d	248.613059	170.376183	326.849936	1.91840157	0.93990474	0.00012185	0.13273599	UPF0573 protein C2orf70-like protein A [Crassostrea assembled with gag-pol polypeptide]
cthl1_Trc_comp8839_c0_seq1	8h	253.537035	190.567079	316.506991	1.66086919	0.73193845	0.0004848	0.23341993	Ankyrin repeat domain-containing protein 60
cthl1_Trc_comp8847_c0_seq1	8h	135.45961	66.0942311	204.81999	3.09867432	1.63165113	1.32E-06	0.00670842	hypothetical protein
cthl1_Trc_comp8898_c0_seq1	8h	61.1469419	41.1744798	81.12436	1.97025829	0.97838477	0.00079326	0.30325159	noggin-like protein 2 [Schmidtia]
	1d	57.6800716	39.2919872	76.088156	1.93597121	0.9530575	0.00159403	0.5678727	noggin-like protein 2
	2d	80.9971036	38.8949788	123.099228	3.16491312	1.6621659	4.93E-09	8.67E-05	noggin-like protein 2
cthl1_Trc_comp8922_c0_seq1	8h	603.074655	471.63434	734.514971	1.5573823	0.6391313	0.00058932	0.26235101	Tyrosine-protein kinase SPK-1, spk-1 protein [Girardia tigrina]
cthl1_Trc_comp9044_c0_seq1	8h	1402.24934	1007.32899	1797.16969	1.78409409	0.83519171	5.20E-06	0.01724539	coiled-coil domain containing 147
	1d	1395.68466	1075.55417	1765.81515	1.72181558	0.78393063	3.03E-05	0.0575635	similar to coiled-coil domain containing 147
	2d	1170.25875	774.880316	1565.83718	2.02048903	1.01470452	4.30E-08	0.00036262	coiled-coil domain-containing protein 147
cthl1_Trc_comp9165_c0_seq1	8h	877.384078	677.321113	1077.44704	1.59074776	0.66970509	0.00045221	0.22740047	Radial spoke head 1 homolog
cthl1_Trc_comp9212_c0_seq1	2d	158.710786	114.840036	202.581536	1.76403233	0.818877	0.00019522	0.1492585	IQ and AAA domain-containing protein 1
cthl1_Trc_comp924_c0_seq1	2d	1089.81594	849.955908	1329.67597	1.56440583	0.64561481	0.00047895	0.2583484	aquaporin
cthl1_Trc_comp928_c0_seq1	8h	371.576065	236.629788	506.522341	2.1405688	1.0979942	0.00014876	0.12531649	hypothetical protein
	1d	353.794939	221.005779	486.584099	2.20168043	1.13860508	6.64E-05	0.08915178	
	2d	264.824501	186.115496	343.533505	1.84580819	0.88425264	0.00188634	0.60091598	
cthl1_Trc_comp9300_c0_seq1	8h	48399.4282	36815.9754	59982.8809	1.6292623	0.70421889	3.75E-05	0.05875083	myosin heavy chain A (Sned)
	1d	39023.9616	32703.5599	45344.3634	1.38652684	0.47147554	0.0077521	1	
	2d	38107.0869	25343.0547	50861.1192	2.00690563	1.00497278	1.99E-08	0.00025013	myosin heavy chain
cthl1_Trc_comp9450_c0_seq1	2d	785.58136	607.938482	963.224238	1.5844107	0.66394635	0.00038487	0.23337006	
cthl1_Trc_comp9509_c0_seq1	2d	761.284636	587.473673	935.095598	1.59172341	0.67058966	0.00034595	0.21882803	tektin 1
cthl1_Trc_comp9561_c0_seq1	8h	314.386435	241.404547	387.368323	1.60464386	0.68225313	0.0017164	0.483419	
	1d	246.177034	174.442214	317.91855	1.82244795	0.86587761	6.45E-05	0.08915178	domain CAP_ED, effector domain of the CAP family of transcription factors; members include CAP (or cAMP receptor protein (CRP))....
	2d	214.812378	151.807462	277.817595	1.83006909	0.87189812	3.64E-05	0.04529787	predicted protein, CAP-ED domain (cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II-like)
cthl1_Trc_minimus_contig320	8h	264.136212	200.510845	327.761579	1.63463267	0.70896647	0.00070344	0.29023594	jagged-2??? No trobo seq
	1d	227.963381	181.91678	274.009983	1.50623809	0.59094984	0.00553085	1	
	2d	215.851125	152.172631	279.52962	1.83692441	0.87729226	2.98E-05	0.04164888	jagged2
cthl1_Trc_minimus_contig683	1d	213.626561	284.380336	142.872786	0.50240037	-0.9930906	0.00016404	0.16086855	GDP-fucose transporter 1
cthl1_Trc_minimus_contig970	8h	111.303782	76.6114745	145.99609	1.90566871	0.93029734	0.00032123	0.19634634	ADP-ribosylation factor-like protein 6-like
cthl1_Trc_comp1442_c0_seq1	1d	1562.67839	1201.4149	1923.94188	1.60139672	0.67933075	0.0001756	0.16479848	octadecalin
cthl1_Trc_comp7060_c0_seq1	2d	2835.80739	2228.08837	3443.151642	1.54550262	0.6280761	0.00049712	0.2665124	threonine synthase-like 2

Taula 2. Gens “up-regulated” després d’inhibir *egr-4* en organismes regenerants de 8 hores, 1 dia o 2 dies, depenent del cas.

Cal remarcar que l'anàlisi dels resultats obtinguts a partir del *RNA-seq* després d'inhibir *egr-4* és preliminar. Futurs experiments són necessaris per seleccionar en més detall i caracteritzar funcionalment els possibles gens candidats regulats a través de l'*egr-4*.

Annex 4. Article 3.
*Smed454 dataset: unravelling the
transcriptome of Schmidtea mediterranea*

Josep F Abril, Francesc Cebrià, Gustavo Rodríguez-Esteban, Thomas Horn,
Susanna Fraguas, Beatriz Calvo, Kerstin Bartscherer i Emili Saló
Departament de Genètica, Facultat de Biologia (Universitat de Barcelona)

BMC Genomics. 11: 731. 2010

Resum:**La base de dades *Smed454*: resolent el transcriptoma de *Schmidtea mediterranea***

Les planàries d'aigua dolça són un model atractiu per estudiar la regeneració i les cèl·lules mare, i s'han convertit en un organisme clau per la medicina regenerativa. Gràcies a la possibilitat de seqüenciar el seu genoma i les noves tecnologies d'alt rendiment que tenim avui dia al nostre abast, el seu interès ha anat en augment. D'altra banda, si volem continuar utilitzant les planàries com a model per estudiar el procés de la regeneració, primer és essencial una descripció detallada del seu transcriptoma.

Amb l'objectiu de completar i millorar les anotacions genòmiques que tenim actualment de *Schmidtea mediterranea*, hem utilitzat la tecnologia de piroseqüenciació 454 (una eina més ràpida que el mètode Sanger) per analitzar el seu transcriptoma. A través a la seqüenciació 454 s'han pogut ensamblar 598.435 "454-reads", d'una llargada de 327 parells de base de mitjana. Amb les dades obtingudes presentem milions de nous *contigs* no identificats fins ara.

Gràcies a l'anàlisi de les dades obtingudes del 454 mitjançant el projecte d'Ontologia Gènica (GO), observem possibles gens homòlegs que pertanyen a diverses famílies gèniques, com per exemple receptors de neurotransmissors i hormones, gens "homeobox" o gens relacionats amb la diferenciació de les cèl·lules dels ulls, que juguen un paper important durant la regeneració d'altres organismes model però de les quals encara se'n té molt poca informació en les planàries.



Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea*

Abril *et al.*

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea*

Josep F Abril^{1,2†}, Francesc Cebrià^{1,2†}, Gustavo Rodríguez-Esteban^{1,2}, Thomas Horn³, Susanna Fraguas^{1,2}, Beatriz Calvo^{1,2}, Kerstin Bartscherer⁴, Emili Saló^{1,2*}

Abstract

Background: Freshwater planarians are an attractive model for regeneration and stem cell research and have become a promising tool in the field of regenerative medicine. With the availability of a sequenced planarian genome, the recent application of modern genetic and high-throughput tools has resulted in revitalized interest in these animals, long known for their amazing regenerative capabilities, which enable them to regrow even a new head after decapitation. However, a detailed description of the planarian transcriptome is essential for future investigation into regenerative processes using planarians as a model system.

Results: In order to complement and improve existing gene annotations, we used a 454 pyrosequencing approach to analyze the transcriptome of the planarian species *Schmidtea mediterranea*. Altogether, 598,435 454-sequencing reads, with an average length of 327 bp, were assembled together with the ~10,000 sequences of the *S. mediterranea* UniGene set using different similarity cutoffs. The assembly was then mapped onto the current genome data. Remarkably, our Smed454 dataset contains more than 3 million novel transcribed nucleotides sequenced for the first time. A descriptive analysis of planarian splice sites was conducted on those Smed454 contigs that mapped univocally to the current genome assembly. Sequence analysis allowed us to identify genes encoding putative proteins with defined structural properties, such as transmembrane domains. Moreover, we annotated the Smed454 dataset using Gene Ontology, and identified putative homologues of several gene families that may play a key role during regeneration, such as neurotransmitter and hormone receptors, homeobox-containing genes, and genes related to eye function.

Conclusions: We report the first planarian transcript dataset, Smed454, as an open resource tool that can be accessed via a web interface. Smed454 contains significant novel sequence information about most expressed genes of *S. mediterranea*. Analysis of the annotated data promises to contribute to identification of gene families poorly characterized at a functional level. The Smed454 transcriptome data will assist in the molecular characterization of *S. mediterranea* as a model organism, which will be useful to a broad scientific community.

Background

One of the challenges that medical research must address in the near future is to understand why some animals are able to regenerate complex structures, including eyes and even whole bodies, from small body fragments, while others are not. With the recent emergence of the field of regenerative medicine, the future

biomedical ramifications of the study of animal regeneration are obvious.

Freshwater planarians are a classic model for studying the fascinating process of regeneration [1-4] because they are capable of re-building a complete organism from almost any small body fragment. This is made possible by a unique population of adult somatic stem cells called neoblasts. During regeneration and constant homeostatic cell turnover, neoblasts differentiate into all cell types, including germ cells in sexual species [5,6]. In recent years, several studies have begun to unravel the mechanisms by which regeneration is regulated at the molecular level. For example, different genes have been

* Correspondence: esalo@ub.edu

† Contributed equally

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona (UB), Av. Diagonal 645, edifici annex, planta 1, 08028, Barcelona, Catalunya, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

shown to play pivotal roles in axon guidance and neurogenesis [7], the regulation of neoblast proliferation and differentiation [8,9], and the re-establishment and maintenance of the anteroposterior (AP) and dorsoventral (DV) body axes [10]. *Schmidtea mediterranea* and *Dugesia japonica* are the two planarian species most often used in regeneration studies. There are about 78,000 ESTs (Expressed Sequence Tags) for *S. mediterranea* in NCBI generated in different projects [11,12]. Those sequences were clustered to produce a set of 10,000 putative mRNAs which are available from the NCBI Unigene database [13]. The *S. mediterranea* genome has also been sequenced and assembled [14] at the Genome Sequencing Center at Washington University in St. Louis (WUSL, USA) after approval of a white paper [15]. However, because of this genome's internal complexity (67% A+T, [16]) and the lack of a BAC library, its completeness and assembly still needs improvement. A step towards this end was taken when the *S. mediterranea* genome and EST information were integrated and approximately 30,000 genes were predicted using an annotation pipeline called MAKER [16]. Those gene models, together with ~9,000 mRNAs generated using next-generation sequencing technology, were mapped on the planarian genome and used to improve the assembly [17]. The current assembly contains 43,673 contigs. These are accessible, together with the MAKER annotation data, in the *S. mediterranea* genome database (SmedGD; [17]).

In order to expand our knowledge of the planarian transcriptome and to provide a new tool that can be used to improve the *S. mediterranea* genome annotation, we generated a new transcriptome dataset using 454 pyrosequencing technology [18]. The Smed454 dataset can be freely accessed via a website, and the complete sequence data can be downloaded by anyone from there. Mapping of the Smed454 ESTs onto the genome scaffolds shows that the Smed454 dataset contains more than 3 million nucleotides sequenced *de novo*. In addition, this mapping extends and connects currently fragmented genomic contigs. Finally, GO annotation of the Smed454 dataset assigns candidate functions to those sequences and facilitates their grouping into distinct gene families. In this way, whole gene families can be analyzed for putative roles in planarian regeneration. Thus we are confident that the Smed454 dataset will improve our understanding of how planarian regeneration works at the molecular level.

Results and Discussion

Construction and sequencing of the Smed454 dataset

In order to obtain the most representative set of planarian genes expressed under different physiological conditions, total RNA was isolated from a mixture of non-irradiated

and irradiated intact and regenerating planarians (see Methods). We used planarians regenerating both head and tail to identify the genes specifically expressed in a tissue-specific manner. Similarly, planarians at different stages of regeneration were used in order to isolate genes with different temporal expression profiles. Irradiation destroys planarian neoblasts within 1-2 days, and the animals die within a few weeks because they cannot sustain normal cell turnover. By including irradiated animals, potential transcripts specifically expressed under those conditions will be contained in the 454 dataset.

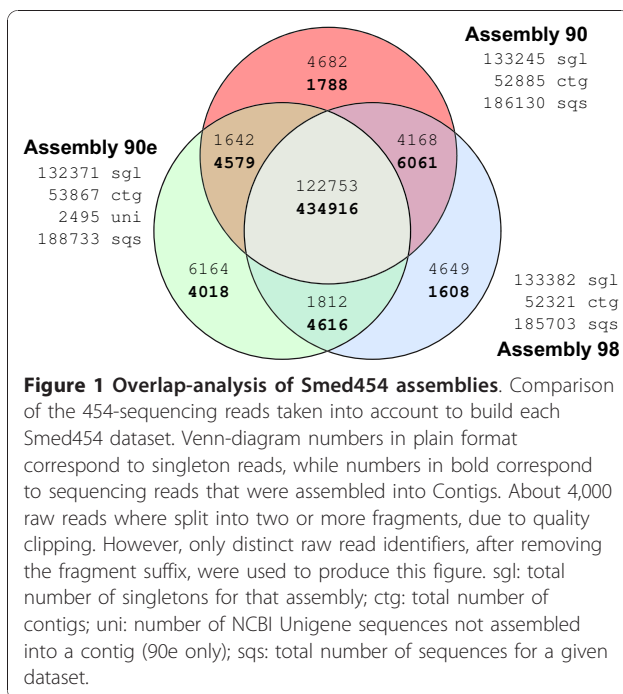
Using 454 pyrosequencing, 601,439 sequencing reads with an average length of 327 bp were obtained. After sequence cleaning to remove vector contamination, the remaining 598,435 sequences were assembled using different cut-off values for sequence similarity (90%, 95% and 98%). In addition, our 454 sequence reads were assembled together with the ~10,000 *S. mediterranea* UniGene set available at NCBI, using the 90% similarity criteria. This last set, which was used in most of the analyses reported, is referred to as the **90e** set. Table 1 summarizes the number of contigs and singletons obtained in each of those assemblies. The similarities between the three assemblies (**90**, **98** and **90e**) are illustrated in Figure 1 a Venn diagram which shows that 72.68% of the raw sequencing reads were integrated into contigs common to all three assemblies, and 20.51% of the sequencing reads make up a shared pool of single sequencing reads (singletons). Therefore, differences between the assemblies can be explained by differential inclusion corresponding to 6.81% of the sequencing reads.

Average GC content and sequence length and their respective distributions were similar for all three assemblies (Table 1 and Figure 2). GC content is distributed around 35%, the expected value for coding sequences in this species. The **90e** length distribution shape was slightly shifted towards larger sequences. This shift was mainly due to a set of long sequences (>800 bp) from

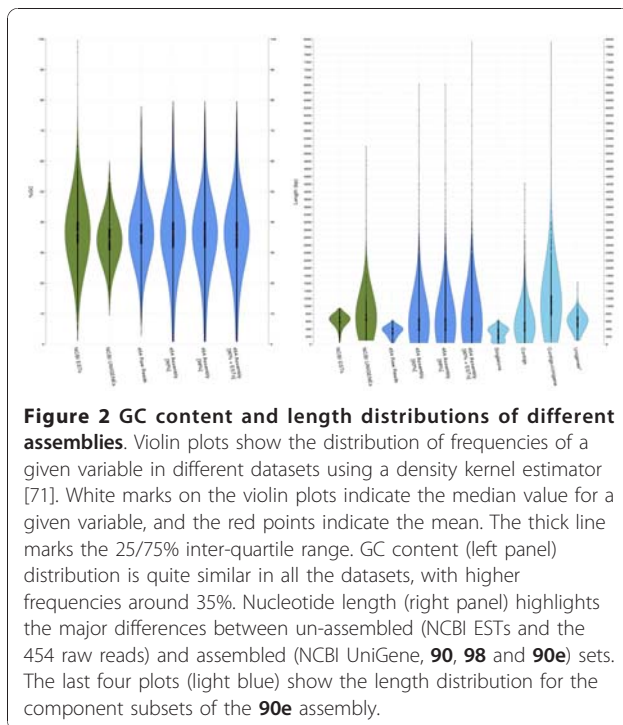
Table 1 Summary of sequence statistics for each assembly.

SET	Contigs	Singletons	TOTAL SEQs	GC%	LENGTHs [min/median/max/ avg]			
90	52,885	137,213	190,098	35.130	20	354	6812	355.78
95	52,501	137,077	189,578	—	—	—	—	—
98	52,321	137,353	189,674	35.127	20	354	6812	355.82
90e	53,867	138,766	192,633	35.108	20	358	7918	364.81

Set names are related to the corresponding homology level cutoff value (90e stands for 90% similarity including the set of NCBI Unigene ESTs). Contigs are the result of at least two sequencing reads, and singletons of only one read. GC content is the average value for all sequences. Sequence lengths are shown as minimum, median, maximum and average values in nucleotides for each set.



the NCBI Unigene ESTs included in this assembly. This causal relationship was evident in the comparison of the following four subsets of sequences from the **90e** set (lightblue violin plots on Figure 2 right panel): singletons (136,271), contigs that do not contain UniGene ESTs (46,958), contigs including UniGene ESTs (6,909),

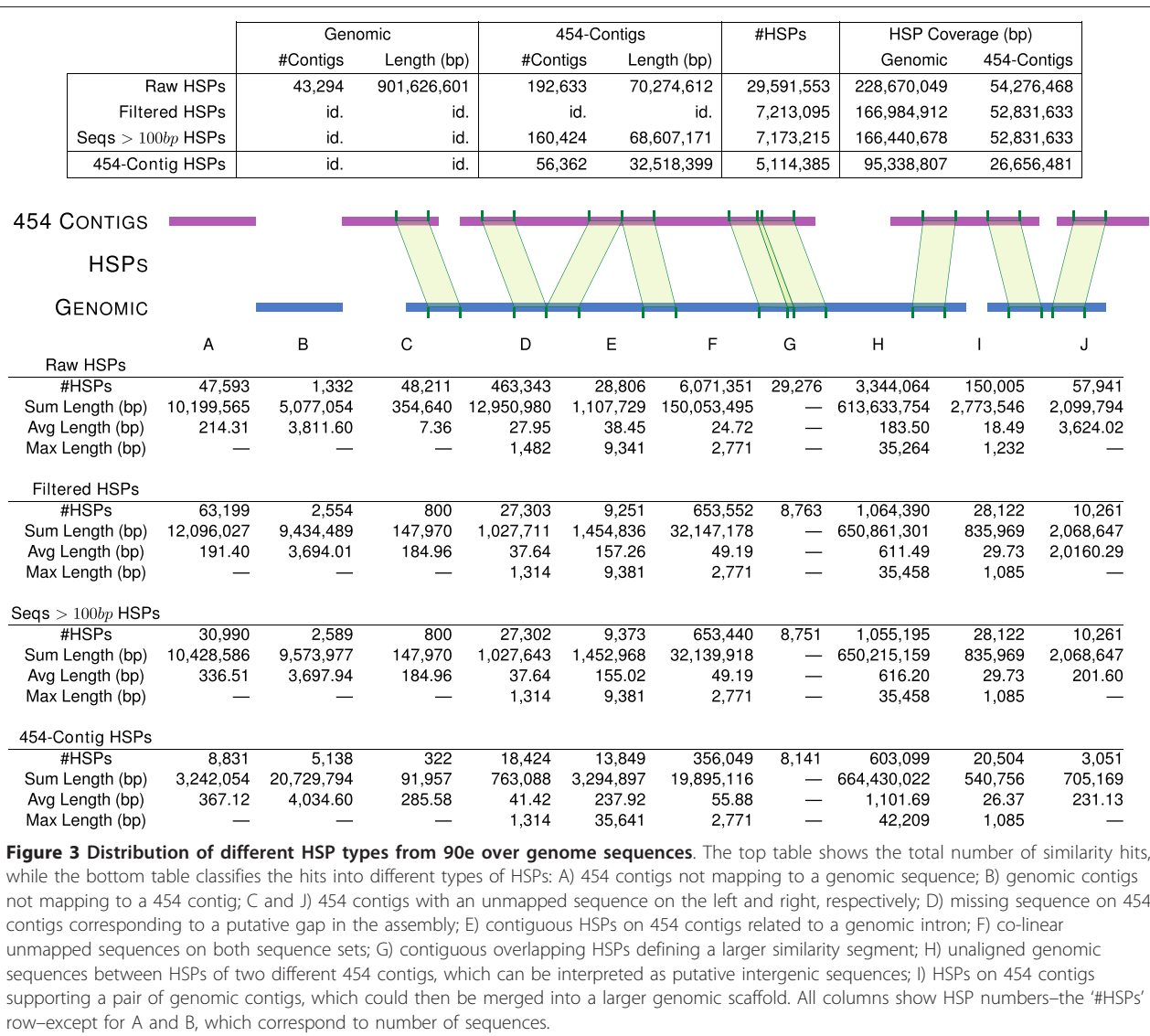


and finally, Unigene ESTs not assembled into a contig (2,495).

Mapping the 90e assembly onto the genome

The **90e** assembly (192,633 sequences, 70,274,612 bases in total, average length of 365 bp per sequence) was aligned to scaffolds from the *S. mediterranea* WUSL genome assembly, version 3.1 [14] (43,294 sequences, 901,626,601 bases in total, average length of 20,8 kilobases per scaffold). Figure 3 shows all possible high-scoring segment pair (HSP) relationships between those two sequence sets. From almost 30 million initial HSPs, around 7 million were selected using a combination of thresholds, as described in the Methods section. Discarding singleton sequences in a second round of filtering further reduced the number of HSPs to 5 million, and HSP coverage dropped from 25.36% and 77.24%, for scaffolds and **90e** respectively, to 10.57% and 37.93%. However, when the total nucleotide length was considered only for the contigs (56,363 sequences, 32,518,399 bases in total, with an average of 577 bp per sequence), HSP coverage for **90e** rose to 81.97%. This means that most of the significant HSP hits are retained after the second round of filtering. In total, 8,831 contigs from **90e** did not map to the genomic contigs (3,242,054 bp that are completely novel and also transcribed, see column A in Figure 3). Conversely, 5,138 genomic contigs did not match a sequence from **90e** (column B). Of the **90e** contigs, 322 extended a genomic sequence from the left (column C) and 3,051 from the right (column J). The largest intergenic distance was 42,209 bp, with an average value of 1,102 bp (column H). The largest intron was estimated to be about 9,300 bp, the average length being 238 bp (column E). Finally, there were 20,504 HSPs connecting different genomic sequences via 8,604 different **90e** contigs (column I). Of the 8,831 **90e** contigs not found on the genome, 3,480 had a BLAST hit to the NCBI NR protein database (39.41%), and, of those, 2,401 had a hit to a protein with GO annotation (27.19%). After discarding abundant actin-like sequences (1,503), ATP/ADP transporter proteins (722) and sequences matching bacterial, protozoan or fungal genes (1,234), 71 **90e** contigs remained as new sequences not mapping on the genome (see Additional File 1).

In order to validate exonic structures, 6,226 **90e** contigs mapping 1-to-1 over genome sequences were selected. After re-aligning the **90e**/genomic sequence pairs, 4,739 contained at least one putative intron (see the corresponding splice sites boundaries in Additional File 2). In total 8,609 introns were retrieved from the genomic contigs. Figure 4 shows the number of introns per **90e** contig, as well as the length distribution for those introns. Pictograms summarize the nucleotide frequencies for the donor and acceptor splice sites, both



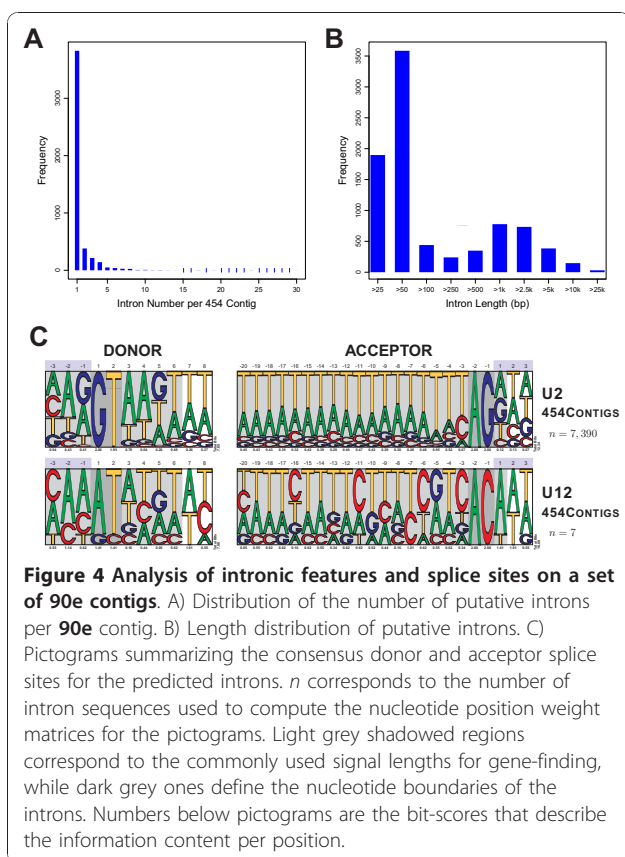
for the U2 (canonical) and U12 (non-cannonical) introns. The splice sites patterns resemble those from other metazoan [19], taking into account that the genome of *S.mediterranea* is A/T-rich [16].

Also, 50 randomly picked **90e** contigs that either mapped or did not map to the genome were validated by RT-PCR (see Additional File 3 containing a list of the selected **90e** contigs, as well as information on the primers used to amplify them). Additionally, 20 out of those 50 genes were further validated by sequencing. Finally, to further confirm the quality and coverage of the sequences from the **90e** dataset, the *S. mediterranea* genes already annotated in NCBI GenBank [20] were compared with those sequences. After discarding 18 S and 28 S ribosomal RNA genes and alpha-tubulins, 124 known genes were aligned to the **90e** sequences. In total, 108 of these genes

had at least one significant similarity hit with one **90e** sequence, and two matched 5 sequences from **90e**. On average, the known genes had co-linear similarity hits against 1.32 different Smed454 sequences. Minimum and average similarities were 8.35% and 85.34% respectively, and 71 sequences had more than 95% similarity. Mean coverage dropped to 77.63% when each hit was considered separately. A summary of these similarity analyses is shown in Additional File 4.

Browsing the Smed454 dataset

In order to make the Smed454 dataset useful and accessible to the planarian and non-planarian communities, a public database is available via web [21]. The web site allows users to view contig assemblies along with their read alignments, and to perform BLAST searches against assembled



sequences. The BLAST option in the home page menu (1 in Figure 5) allows the user to BLAST sequences of interest against the **90**, **98**, and **90e** databases (1.2 in Figure 5). Both nucleotide (BLASTN) and protein (BLASTP) searches can be performed (1.1 in Figure 5). Clicking on the Search button (1.3 in Figure 5) brings up a new window displaying a list of hits. When a score value is selected (1.4 in Figure 5), the alignment between the query sequence and the Smed454 hit is shown. The site also offers the option of downloading Smed454 sequences of interest (1.5 in Figure 5). The contig or singleton accession number can be browsed directly from the main home page (2 in Figure 5). When the user searches for a specific contig, a new window appears showing the alignment of all the sequencing reads assembled in that contig. At the bottom of that window, the result of a pre-computed BLAST on the contig consensus sequence is displayed. When a contig, singleton or read name is selected (2.1 in Figure 5), a new window will display the requested sequence. All raw and assembled sequence data are available from that web site too.

Functional annotation of 90e sequences

In order to characterize the gene families that can be found on Smed454, we annotated the three datasets; we will focus on **90e** dataset here. In total, 42.42% of the

sequences had a similarity hit with at least one protein sequence in the NCBI NR protein database [20]. Of these, almost two-thirds had 250 or more hits (see Figure 6), but the BLASTX output was limited to a maximum of 250 hits per **90e** sequence owing to the large number of HSPs reported by BLAST for some of them. The Gene Ontology (GO) [22] database was used to computationally annotate all the sequences (see Additional File 5 for **90**, **98**, and **90e** datasets) by mapping onto them the functional codes already assigned to known proteins from NCBI NR. Many of these sequence hits matched to a short ATP-binding domain, in most cases corresponding to proteins of the actins family. Consequently, that functional class, which was also anomalously over-represented, was discarded from the total number of annotations for the **90e** set, as shown in Table 2.

Among the most abundant GO annotations at the biological process level, leaving aside metabolism-related features, 'response to stress' was found for 1,070 sequences (6.58%). This finding was expected because the original biological sample was a mixture of intact and regenerating planarians, both normal and irradiated. 'Regulation of biological process' was in the same range, with 1,012 sequences (6.22%). At the GO molecular function level, 'binding' was the most common annotation, although where possible a more specific annotation was provided by drilling down to the 2nd level child annotations on the GO graph. It is interesting to find, among others, 3 'selenium binding' activities, since it has been reported that selenium may play an important role in cancer prevention, immune system function, male fertility, cardiovascular and muscle disorders, and prevention and control of the ageing process [23]. Finding selenium-binding proteins would be evidence of the presence of selenoproteins, which are thought to be responsible for most of the biomedical effects of selenium across eukaryota [24]. When looking at the cellular component level and discarding many of the 'intracellular organelles' due to their co-occurrence with 'nucleotide binding', there are a notably large number of 'protein complexes', 2,918 sequences (40.79%). With 819 sequences (11.45%), another important term on this level is 'vesicle', which correlates with secretory functions, apoptosis, and autophagy.

To prove the usefulness of the Smed454 dataset, we performed several searches on specific groups and gene families for which only scant data has been reported to date in planarians. Planarians are mainly known for their remarkable regenerative capabilities, which depend upon the presence of stem cells named neoblasts. Because of the unique properties of these cells, some studies have used a microarray-based strategy to detect neoblast-specific genes [25,26]. In our Smed454 dataset we were able to identify, in addition to known neoblast

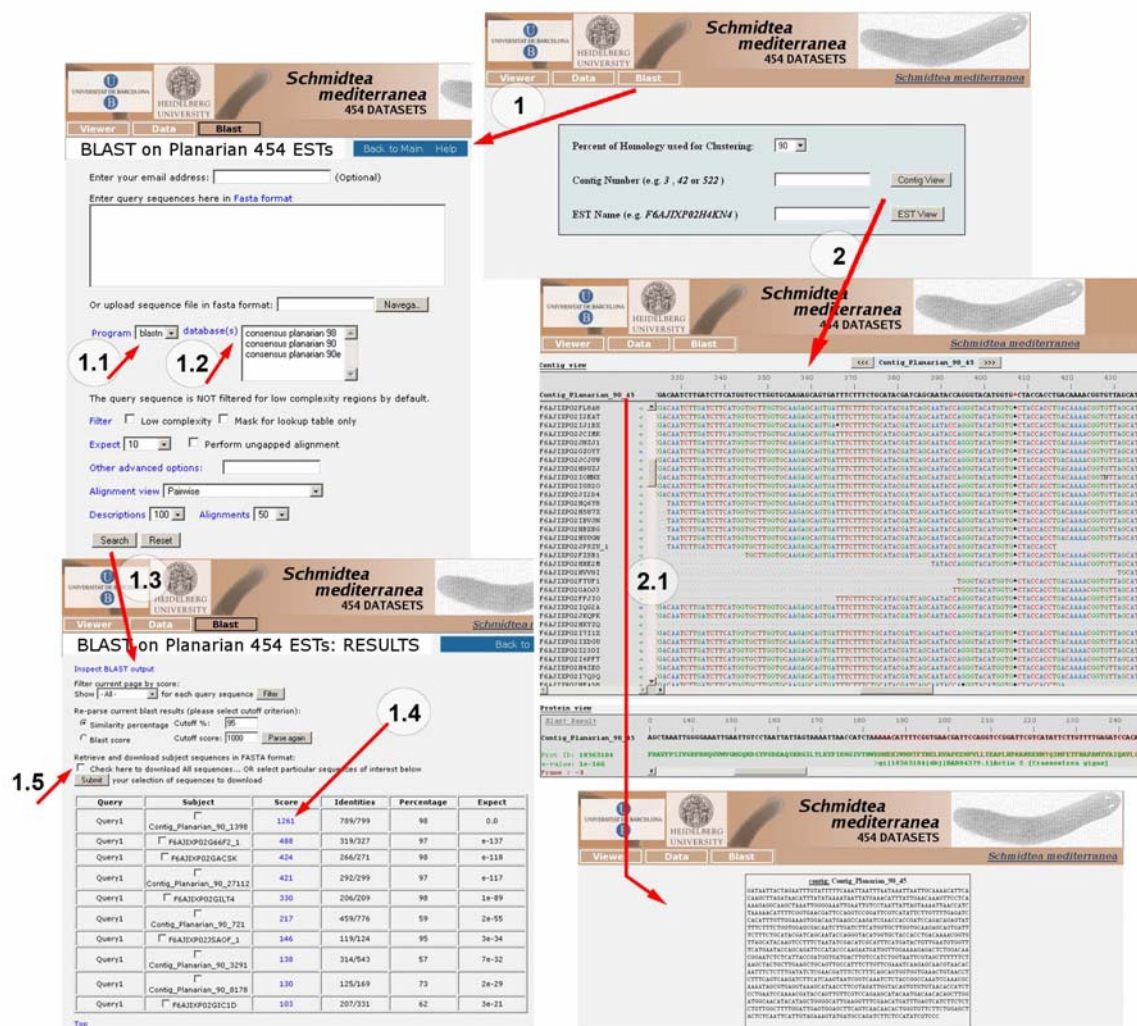
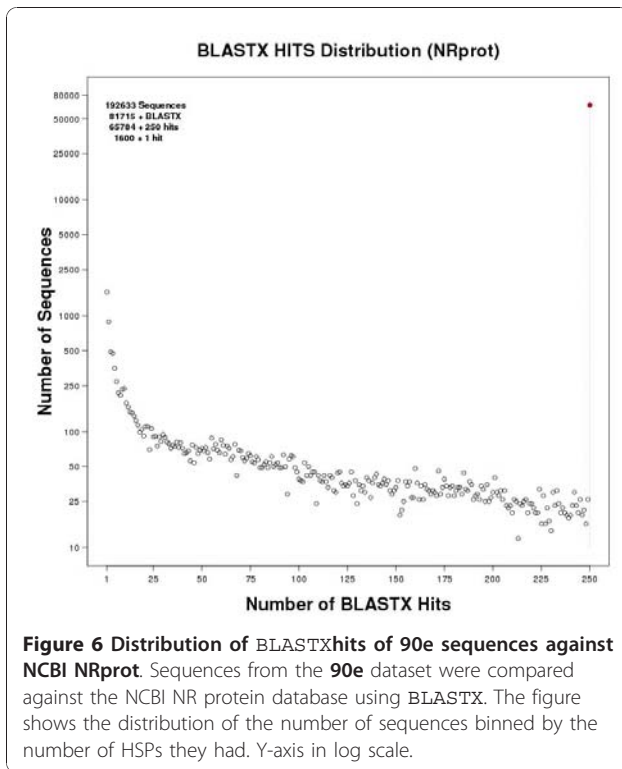


Figure 5 The content of the Smed454 web site. Screenshots of the pages that facilitate access to the three sequence assemblies (90, 98 and 90e), including the page displaying alignments of raw reads. A BLAST interface, adapted from NCBI's toolkit, is also available for querying the sequences from the datasets. The web site is available at <http://planarian.bio.uib.es/datasets/454/>.

markers such as piwis, histones, bruli, vasa or tudor, several other genes annotated as involved in cell cycle or DNA damage and repair (Additional File 6). Within these gene set we find many cyclins and cell cycle division-related genes but also genes related to replication and chromosome maintenance. Finally, genes related to stress response and DNA damage were also identified, probably owing to the use of irradiated animals in the generation of the Smed454 dataset. In addition to these neoblast-related genes we were able to identify large collections of much less well-characterized families in planarians, such as neurotransmitter, peptide and hormone receptors, homeobox domain-containing genes, and genes related to eye function in other animals.

Prediction of planarian transmembrane proteins

Transmembrane (TM) proteins regulate a number of biological processes ranging from catalytic processes in intracellular and extracellular transport to cell-to-cell communication. TM proteins have become particularly interesting as many of them are key initiators of signal transduction pathways, and they can be easily manipulated by small molecule- or antibody-based drugs. To identify putative TM proteins from the planarian transcriptome, we mined the 454 dataset for putative TM protein-encoding messages (see Methods). Considering only the proteins that at least two applications predicted would contain one or more transmembrane domains, resulted in a list of 8,597 predicted transmembrane



proteins (see Figure 7a), which represents 15,3% of the complete protein database. Protein-BLAST searches were then used to align sequences to each other, and redundant sequences were removed from the predicted transmembrane set. The resulting database contained 4,663 sequences. Functional categorization using the UFO web-server [27] allowed us to assign PFAM protein families to 1,474 of the sequences and gene ontology classifications to 2,464. The top ten PFAM domains (~33% of all assignments) included, for example, the classifications for ‘major facilitator superfamily’ (a ubiquitous transporter family), ‘7 transmembrane receptor (rhodopsin family)’ and ‘ion transport protein’ (see Figure 7b). The top ten gene ontology profiles (~49% of all assignments) included ‘membrane’ (cellular component), ‘transport’, and ‘G-protein coupled receptor protein signalling pathway’ (both biological processes, see Figure 7c). The enrichment of our database with proteins that have a predicted function in transport and receptor signalling supports the reliability of our approach. A complete list of the 4,663 predicted transmembrane proteins, the number of predicted transmembrane domains, predicted topology, and functional categorizations (PFAM and GO) are shown in Additional File 7.

Neurotransmitter and hormone receptors in *Schmidtea mediterranea*

Despite our growing knowledge about how planarian neoblasts are regulated at the molecular level [9,25,26,28-31],

we are still far from characterizing the complete repertoire of factors that control neoblast biology. Receptors for neurotransmitters, peptides and hormones are among the candidates for a role in the regulation of neoblast proliferation, differentiation and migration. In planarians, some of the data suggest that molecules such as dopamine [32,33], serotonin [34], substance P [35], somatostatin [36] and FMRFamide [37] can accelerate or delay the regeneration rate, probably by regulating neoblast proliferation and/or differentiation. A model has been proposed in which neoblasts express receptors for some of these factors, which in turn regulate the fate of these cells [35]. We found 288 contigs and singletons in the annotated Smed454 dataset with significant homology to neurotransmitter and hormone receptors (Table 3 and Additional File 8), providing a list of potentially interesting candidates.

Homeobox-containing sequences in *Schmidtea mediterranea*

Since the first homeobox-containing genes were characterized in planarians [38], a large number of Hox and ParaHox genes that could be accommodated into the classical series of paralogous groups from Plhox1 to Plhox-9 and Xlox to cad/Cdx [39,40] have been described. Some of them show a differentially axial nested expression; while others are ubiquitously expressed [41-43]. Most of this work has been done in the planarians *Girardia tigrina* and *Dugesia japonica*. Recently, the first expression of an *S. mediterranea* Hox gene has been reported [44]. We identified 50 contigs and singletons with significant sequence similarity to homeobox gene sequences in the annotated Smed545 dataset (Table 4), including Hox genes and homeobox-containing genes, some already characterized in other planarian species.

Eye genes in *Schmidtea mediterranea*

The structural simplicity of the planarian eye in conjunction with the regenerative abilities of these organisms provides a unique system for dissecting the genetic mechanisms that allow a simple visual structure to be built [45,46]. Despite great morphological differences, there is evidence that the early morphogenesis of animal eyes requires the regulatory activity of *Pax6*, *Sine oculis* (*Six*), *Eyes absent* (*Eya*) and *Dachshund* (*Dach*), a gene network known as the retinal determination gene network (RDGN) [47-50]. Most of the genetic elements of the RDGN have been characterized in planarians [51-54]. In addition, the following planarian genes have been identified as being involved in eye regeneration: *Djeje53*, *Dj1020HH* [55]; *Smed-netR*, *Smed-netrin2* [56]; *Gt/Smed/Dj ops* [46,57]; *Djsnap-25* [58]; and *Smednos* [59]. In order to characterize new *S. mediterranea* eye network genes, we analyzed the Smed454 annotated

Table 2 Gene Ontology annotation for 90e set sequences.

GO	Molecular Function	Count	Freq %	GO	Biological Process	Count	Freq %	GO	Cellular Component	Count	Freq %
GO:0000166	nucleotide binding	54,823	—	—	—	—	—	GO:0043229	intracellular organelle	60,817	—
—	unannotated	9,709	—	—	unannotated	62,834	—	—	unannotated	11,131	—
GO:0016787	hydrolase activity	5,197	35.669	GO:0043170	macromolecule metabolic process	5,793	35.610	GO:0043234	protein complex	2,918	40.788
GO:0016740	transferase activity	2,030	13.933	GO:0022607	cellular component assembly	2,182	13.413	GO:0044424	intracellular part	2,314	32.346
GO:0043167	ion binding	1,323	9.080	GO:0006810	transport	1,213	7.456	GO:0031982	vesicle	819	11.448
GO:0003735	structural constituent of ribosome	874	5.999	GO:0006950	response to stress	1,070	6.577	GO:0044425	membrane part	469	6.556
GO:0005488	binding	761	5.223	GO:0050789	regulation of biological process	1,012	6.221	GO:0016020	membrane	210	2.935
GO:0016491	oxidoreductase activity	703	4.825	GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	722	4.438	GO:0005622	intracellular	111	1.552
GO:0022857	transmembrane transporter activity	678	4.653	GO:0048869	cellular developmental process	655	4.026	GO:0044446	intracellular organelle part	91	1.272
GO:0030235	nitric-oxide synthase regulator activity	597	4.097	GO:0065009	regulation of molecular function	622	3.823	GO:0005576	extracellular region	63	0.881
GO:0043176	amine binding	580	3.981	GO:0009056	catabolic process	507	3.117	GO:0045211	postsynaptic membrane	21	0.294
GO:0005515	protein binding	532	3.651	GO:0044419	interspecies interaction between organisms	280	1.721	GO:0044420	extracellular matrix part	19	0.266
GO:0003676	nucleic acid binding	401	2.752	GO:0055114	oxidation reduction	236	1.451	GO:0043233	organelle lumen	18	0.252
GO:0005215	transporter activity	387	2.656	GO:0065008	regulation of biological quality	206	1.266	GO:0031012	extracellular matrix	16	0.224
GO:0016829	lyase activity	71	0.487	GO:0048856	anatomical structure development	193	1.186	GO:0042597	periplasmic space	15	0.210
GO:0016853	isomerase activity	55	0.377	GO:0051649	establishment of localization in cell	183	1.125	GO:0000267	cell fraction	15	0.210
GO:0048037	cofactor binding	52	0.357	GO:0044237	cellular metabolic process	182	1.119	GO:0044462	external encapsulating structure part	11	0.154
GO:0016874	ligase activity	49	0.336	GO:0023060	signal transmission	150	0.922	GO:0031975	envelope	8	0.112
GO:0004871	signal transducer activity	45	0.309	GO:0048870	cell motility	141	0.867	GO:0005615	extracellular space	7	0.098
GO:0003824	catalytic activity	32	0.220	GO:0008152	metabolic process	139	0.854	GO:0009986	cell surface	6	0.084
GO:0060589	nucleoside-triphosphatase regulator activity	32	0.220	GO:0023033	signaling pathway	107	0.658	GO:0043204	perikaryon	5	0.070
GO:0042277	peptide binding	28	0.192	GO:0044238	primary metabolic process	83	0.510	GO:0030427	site of polarized growth	4	0.056
GO:0022892	substrate-specific transporter activity	22	0.151	GO:0042221	response to chemical stimulus	69	0.424	GO:0042995	cell projection	3	0.042
GO:0019208	phosphatase regulator activity	12	0.082	GO:0006996	organelle organization	47	0.289	GO:0030312	external encapsulating structure	2	0.028
GO:0003712	transcription cofactor activity	12	0.082	GO:0007017	microtubule-based process	42	0.258	GO:0031594	neuromuscular junction	2	0.028
GO:0019207	kinase regulator activity	11	0.075	GO:0044281	small molecule metabolic process	39	0.240	GO:0045177	apical part of cell	2	0.028
GO:0008289	lipid binding	9	0.062	GO:0051301	cell division	37	0.227	GO:0019028	viral capsid	1	0.014

Annex 4

Table 2 Gene Ontology annotation for 90e set sequences. (Continued)

GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	8	0.055	GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	35	0.215	GO:0031252	cell leading edge	1	0.014
GO:0050840	extracellular matrix binding	6	0.041	GO:0019637	organophosphate metabolic process	34	0.209	GO:0044217	other organism part	1	0.014
GO:0061134	peptidase regulator activity	6	0.041	GO:0045184	establishment of protein localization	34	0.209	GO:0044297	cell body	1	0.014
GO:0030246	carbohydrate binding	6	0.041	GO:0009628	response to abiotic stimulus	23	0.141	GO:0044463	cell projection part	1	0.014
GO:0016248	channel inhibitor activity	5	0.034	GO:0019748	secondary metabolic process	21	0.129	TOTAL		7,154	
GO:0003702	RNA polymerase II transcription factor activity	5	0.034	GO:0009058	biosynthetic process	21	0.129				
GO:0005198	structural molecule activity	4	0.027	GO:0007155	cell adhesion	18	0.111				
GO:0016986	transcription initiation factor activity	4	0.027	GO:0061024	membrane organization	16	0.098				
GO:0042165	neurotransmitter binding	4	0.027	GO:0007275	multicellular organismal development	16	0.098				
GO:0003682	chromatin binding	3	0.021	GO:0016192	vesicle-mediated transport	12	0.074				
GO:0008430	selenium binding	3	0.021	GO:0043062	extracellular structure organization	10	0.061				
GO:0030234	enzyme regulator activity	2	0.014	GO:0034330	cell junction organization	9	0.055				
GO:0030528	transcription regulator activity	2	0.014	GO:0048609	reproductive process in a multicellular organism	9	0.055				
GO:0009055	electron carrier activity	2	0.014	GO:0007154	cell communication	8	0.049				
GO:0017056	structural constituent of nuclear pore	2	0.014	GO:0003008	system process	7	0.043				
GO:0017080	sodium channel regulator activity	2	0.014	GO:0016049	cell growth	7	0.043				
GO:0001871	pattern binding	2	0.014	GO:0016458	gene silencing	6	0.037				
GO:0019239	deaminase activity	2	0.014	GO:0008219	cell death	5	0.031				
GO:0043021	ribonucleoprotein binding	2	0.014	GO:0033036	macromolecule localization	4	0.025				
GO:0008538	proteasome activator activity	2	0.014	GO:0048610	reproductive cellular process	4	0.025				
GO:0030337	DNA polymerase processivity factor activity	1	0.007	GO:0051236	establishment of RNA localization	4	0.025				
GO:0031406	carboxylic acid binding	1	0.007	GO:0071684	organism emergence from protective structure	4	0.025				
GO:0042562	hormone binding	1	0.007	GO:0006955	immune response	4	0.025				
GO:0046906	tetrapyrrole binding	1	0.007	GO:0007049	cell cycle	4	0.025				
GO:0051540	metal cluster binding	1	0.007	GO:0009405	pathogenesis	4	0.025				
TOTAL		14,570		GO:0009607	response to biotic stimulus	4	0.025				
				GO:0009791	post-embryonic development	4	0.025				

Table 2 Gene Ontology annotation for 90e set sequences. (Continued)

GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	4	0.025
GO:0009790	embryonic development	3	0.018
GO:0015976	carbon utilization	2	0.012
GO:0032506	cytokinetic process	2	0.012
GO:0045103	intermediate filament-based process	2	0.012
GO:0070882	cellular cell wall organization or biogenesis	2	0.012
GO:0006413	translational initiation	2	0.012
GO:0009566	fertilization	2	0.012
GO:0001906	cell killing	1	0.006
GO:0043473	pigmentation	1	0.006
GO:0009987	cellular process	1	0.006
GO:0022402	cell cycle process	1	0.006
GO:0022411	cellular component disassembly	1	0.006
GO:0022415	viral reproductive process	1	0.006
GO:0023061	signal release	1	0.006
GO:0030030	cell projection organization	1	0.006
GO:0051606	detection of stimulus	1	0.006
GO:0000746	conjugation	1	0.006
GO:0007163	establishment or maintenance of cell polarity	1	0.006
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	1	0.006
TOTAL		16,268	

The most probable GO code in the three ontology categories—molecular function, biological process and cellular component— for each sequence in the 90e data set was selected. For simplicity, only level one and two codes are shown here in order.

dataset and found a collection of genes, ranging from transcription factors to eye-realizator genes, which have been implicated in eye development in other systems. These are good candidates for expanding our knowledge about the genetic network responsible for planarian eye regeneration (Table 5 and Additional File 9).

Conclusions

The inherent complexity of the planarian genome and methodological difficulties initially prevented the complete genome assembly of *S. mediterranea*. High-throughput sequencing technologies are now well established and help molecular biologists to unravel the molecular components of organisms. We present a 454 sequencing dataset that can be used to decipher the transcriptome of the planarian *S. mediterranea*, an organism that has great potential for the study of regeneration processes.

We obtained more than half a million sequencing reads and assembled them into different datasets using a number of different similarity thresholds. The complete dataset has been made publicly available via web [21]. About 50,000 contigs in one of those sets (**90e**) were mapped against the most up-to-date genome scaffolds and to the set of known proteins from NCBI NR. Interestingly, we found a large number of transcribed sequences not covered by the genome sequence (more than 3 Mbp). The novel 454 contigs will allow us to extend current genomic sequences and connect up to 8,000 pairs of genome scaffolds. Furthermore, a preliminary analysis of the planarian splice sites was made on a collection of 454 contigs mapped univocally to the genome. Annotation of the sequences yielded a number of gene candidates in different functional categories that will be useful for further experimental studies. However,

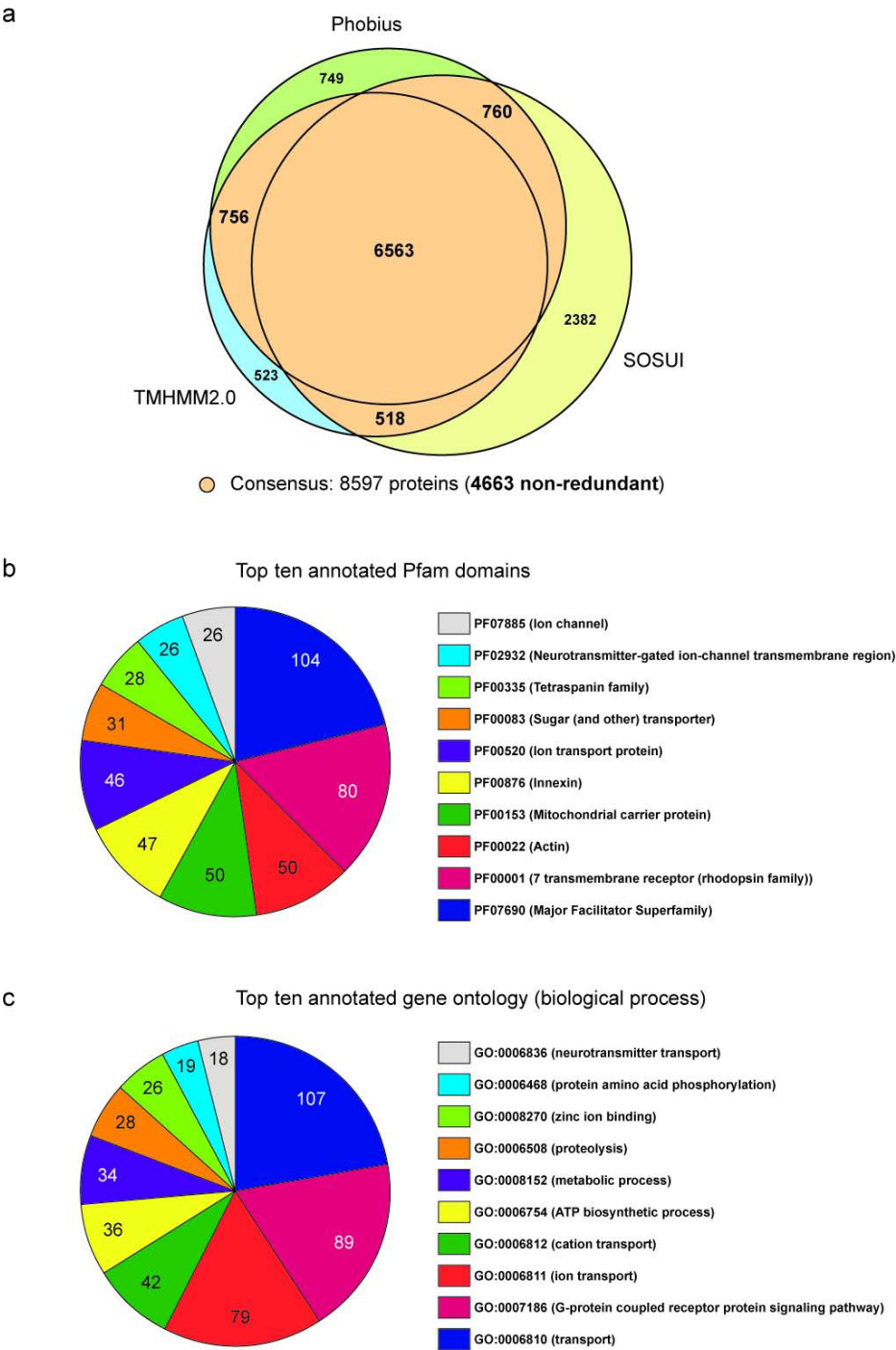


Figure 7 Prediction of planarian transmembrane proteins and functional annotations. A) Venn-diagram showing the overlap between predictions of transmembrane proteins generated by the Phobius, TMHMM2.0 and SOSUI programs for a set of 56,362 protein sequences translated from planarian ESTs. Only proteins predicted to contain one or more transmembrane domains by at least two programs (colored orange, 8,597 proteins, of which 4,663 are non-redundant) were considered for further analysis. B) Top ten PFAM domains and C) gene ontologies (biological process) for the 4,663 non-redundant transmembrane-proteins predicted. The figures indicate the number of proteins contained in a given annotation group.

Table 3 List of neurotransmitter, peptide and hormone receptor sequence candidates.

ID	BLASTX HIT	ACCESSION NUMBER	E-VALUE
90_1623	adiponectin receptor (Schistosoma mansoni)	XP_002577010.1	2,00E-103
90_11706	allatostatin receptor, putative (Ixodes scapularis)	XP_002414997.1	2,00E-18
90_9653	amine GPCR (Schistosoma mansoni)	XP_002576533.1	8,00E-25
P02IKPED	atrial natriuretic peptide receptor (Aedes aegypti)	XP_001652228.1	7,00E-28
P02HWID8	beta adrenergic receptor (Aedes aegypti)	XP_001651714.1	2,00E-18
90_17484	similar to bombesin-like peptide receptor (Ornithorhynchus anatinus)	XP_001514235.1	2,00E-12
90_19322	C1A receptor, putative (Ixodes scapularis)	XP_002405845.1	4,00E-04
90_4815	calcitonin receptor, isoform CRA_d (Rattus norvegicus)	AAA65964.1	3,00E-50
90_20672	cardioexcitatory receptor (Lymnaea stagnalis)	AAB92258.1	6,00E-11
90_6224	class b secretin-like g-protein coupled receptor GPRmth5 (Pediculus humanus)	XP_002427184.1	2,00E-10
P02IJJB4	similar to putative diuretic hormone receptor II (Nasonia vitripennis)	XP_001606711.1	4,00E-22
90_7506	type I dopamine receptor (Panulirus interruptus)	ABB87183.1	8,00E-69
90_6802	dopamine receptor type D2 (Apis mellifera)	NP_001011567.1	2,00E-27
90_8536	dro/myosuppressin receptor (Schistosoma mansoni)	XP_002570000.1	7,00E-26
90_9052	FMRamide receptor (Culex quinquefasciatus)	XP_001849293.1	2,00E-17
P02GUXTP	similar to galanin receptor type I (Danio rerio)	XP_690480.1	3,00E-06
90_6830	glutamate receptor kainate (Schistosoma mansoni)	XP_002576035.1	3,00E-70
P02GLFYW	glutamate receptor NMDA (Schistosoma mansoni)	XP_002572261.1	3,00E-21
90_15092	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1b (Danio rerio)	NP_991293.1	5,00E-78
90_13524	metabotropic glutamate receptor (Schistosoma mansoni)	XP_002572726.1	1,00E-12
90_18656	gonadotropin-releasing hormone receptor type I (Capra hircus)	ABL76162.1	7,00E-04
90_4098	growth hormone secretagogue receptor (Schistosoma mansoni)	XP_002569813.1	7,00E-36
90_976	growth hormone-inducible transmembrane protein (Osmerus mordax)	AC008873.1	2,00E-51
90_6465	putative insulin receptor (Echinococcus multilocularis)	CAD30260.1	6,00E-61
90_7253	lung seven transmembrane receptor (Culex quinquefasciatus)	XP_001868443.1	1,00E-68
90_17047	metabotropic GABA-B receptor subtype, putative (Ixodes scapularis)	XP_002406087.1	4,00E-21
90_6512	natriuretic peptide receptor (Xenopus laevis)	NP_001083703.1	4,00E-158
90_12800	muscarinic acetylcholine (GAR) receptor (Schistosoma mansoni)	XP_002575679.1	2,00E-39
90_1507	Nicotinic acetylcholine receptor alpha 1 subunit (Aplysia californica)	AF467898_1	3,00E-44
90_223	neuroendocrine protein 7b2 (Schistosoma mansoni)	XP_002578500.1	6,00E-25
90_6302	similar to neuromedin U receptor 2 (Strongylocentrotus purpuratus)	XP_001200425.1	4,00E-27
90_29452	neuropeptide FF receptor 2 isoform 3 (Homo sapiens)	NP_001138228.1	2,00E-09
90_6772	neuropeptide F-like receptor (Schistosoma mansoni)	XP_002573542.1	1,00E-28
90_5995	neuropeptide Y receptor Y7 (Oncorhynchus mykiss)	ABB54774.1	9,00E-18
90_25975	octopamine receptor (Aplysia californica)	AAF37686.1	1,00E-25
90_8498	odorant receptor (Tetraodon nigroviridis)	CAG08888.1	6,00E-05
90_5999	similar to olfactory receptor 355 (Bos taurus)	XP_610381.4	1,00E-05
90_2541	P2Y purinergic receptor (Meleagris gallopavo)	AAA18784.1	2,00E-04
90_8537	P2X receptor subunit (Schistosoma mansoni)	XP_002580774.1	1,00E-72
90_19040	pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor (Oncorhynchus mykiss)	NP_001118113.1	1,00E-08
90_28219	parathyroid hormone 2 receptor (Danio rerio)	AAI62580.1	3,00E-11
90_6836	peptide (allatostatin)-like receptor (Schistosoma mansoni)	XP_002572656.1	2,00E-66
90_7984	peptide (allatostatin/somatostatin)-like receptor (Schistosoma mansoni)	XP_002575539.1	2,00E-32
90_10769	progesterone receptor membrane component 1 (Danio rerio)	NP_001007393.1	7,00E-04
90_5450	progesterone receptor membrane component 1 (Oryzias latipes)	BAE47967.1	2,00E-28
P02GZGVI	prolactin releasing hormone receptor (Homo sapiens)	BAG36078.1	2,00E-06
P02I1U9K	pyrokinin-like receptor (Dermacentor variabilis)	ACC99623.1	2,00E-11
90_10680	Rhodopsin-like GPCR superfamily, domain-containing protein (Schistosoma japonicum)	CAX73015.1	6,00E-37
90_2955	rhodopsin-like orphan GPCR (Schistosoma mansoni)	XP_002579928.1	2,00E-42
90_27829	ryanodine receptor 44F (Schistosoma japonicum)	CAX69439.1	8,00E-16
90_14326	serotonin receptor-like planarian receptor 1 (Dugesia japonica)	BAA22404.1	3,00E-54

Table 3 List of neurotransmitter, peptide and hormone receptor sequence candidates. (Continued)

90_15981	serotonin receptor 7 (<i>Dugesia japonica</i>)	BAI44327.1	2,00E-14
90_11349	sex peptide receptor (<i>Tribolium castaneum</i>)	NP_001106940.1	5,00E-25
P02HBR62	SIFamide receptor (<i>Apis mellifera</i>)	NP_001106756.1	9,00E-10
90_19415	parathyroid hormone-related peptide receptor precursor (<i>Tribolium castaneum</i>)	XP_969953.1	7,00E-20
P02FKOY5	parathyroid hormone receptor 2, isoform CRA_c (<i>Mus musculus</i>)	EDL00229.1	3,00E-07
90_1140	somatostatin receptor (<i>Culex quinquefasciatus</i>)	XP_001859671.1	7,00E-43
P02JZNRD	tachykinin receptor 1 (<i>Mus musculus</i>)	NP_033339.2	2,00E-06
P02FL51R	thyroid hormone receptor (<i>Schistosoma mansoni</i>)	XP_002573733.1	2,00E-23
P02FHDMB	thyroid stimulating hormone receptor precursor (<i>Canis lupus familiares</i>)	NP_001003285.1	5,00E-04
90_3545	thyrotropin-releasing hormone receptor 1 (<i>Catostomus commersonii</i>)	AAG31763.1	2,00E-51
90_26294	tyramine receptor (<i>Bombyx mori</i>)	BAD11157.1	1,00E-11

many of the novel contigs have no similarity to known proteins and will require further validation if we want to understand the transcriptional inventory of the planarian at a functional level. We also provided a preliminary gene annotation for *S. mediterranea*, focusing our rankings on four different gene families; these serve as applied examples of the usefulness of this new sequence resource.

Methods

Animals and RNA isolation

Schmidtea mediterranea from the BCN-10 clonal line were used. Animals were starved one week prior to experiments and irradiated at a lethal dose of 100Gy. Total RNA was isolated from a mixed sample of planarians that contained non-irradiated intact and regenerating planarians (1, 3, 5 and 7 days of regeneration) as well as irradiated intact and regenerating animals (1, 3, 5 and 7 days of regeneration). RNA was extracted with TRIzol® (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

cDNA library construction and 454 sequencing

First, 5 µg of total RNA was used to construct a cDNA library. RNA quality was assessed in a Bioanalyzer 2100 (Agilent-Bonsai Technologies). 5 µg of full-length double-stranded cDNA was then processed by the standard Genome Sequencer library-preparation method using the 454 DNA Library Preparation Kit (Titanium chemistry) to generate single-stranded DNA ready for emulsion PCR (emPCR™). The cDNA library was then nebulized according to the fragmentation process used in the standard Genome Sequencer shotgun library preparation procedure. The cDNA library was sequenced according to GS FLX technology (454/Roche). Reads were assembled by MIRA[60] version 3 using enhanced 454 parameters.

Mapping to genomic and functional annotation

BLAT[61] was used with default parameters to map the Smed454 90e dataset on the *S. mediterranea* draft genome

assembly v3.1 [14] since the 454 sequences should be very similar to the corresponding genomic sequences, except for the lack of introns. Perl scripts were developed to classify all HSPs into the categories shown in Figure 3. 90e contigs having two or more collinear HSPs covering more than 100bp of the contig, and for which HSPs had more than 90% identity to the genomic contigs and length of the HSP larger than 50 bp, were chosen as 1-to-1 matches to genome. Once the sequences of the 90e/genomic contig pairs were retrieved, exonerate[62] was used to refine the alignments over the splice sites (using as parameters model = est2genome and bestn = 10). Perl scripts were used to retrieve the splice sites coordinates from exonerate output, as well as the sequences from genomic contigs. After clipping the donor and acceptor splice sites for each intron, nucleotide frequencies were computed and the corresponding position weight matrices for U2/U12 sites were drawn as pictograms using compi[19]. Known *S. mediterranea* genes were compared with contigs from 90e using BLASTN[63] with the following cut-offs: e-value = 0.001, identity score > 80%, HSP length > 50 bp.

GO functional annotation was computed on the BLASTX[63] results of the three assembly datasets (90, 98, and 90e) against all proteins from NCBI NR. BLASTX parameters were set to e-value = 10e-25 and maximum number of descriptions and alignments to report = 250, which produced around 26 million HSPs for each set. After that, only HSPs with a minimum length of 80 bp and a similarity score of at least 80% were considered. GO annotation was performed on those HSPs using the e-value selection criteria and supporting sequences described for Blast2GO[64]. Further Perl scripts were used to summarize the data shown in Table 2 and Additional File 3.

RT-PCR

In order to validate the expression of a random subset of novel 454 transcripts, RT-PCRs were performed on planarian cDNA generated with Superscript III (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Additional File

Table 4 Complete list of homeobox-containing gene sequence candidates.

ID	BLASTX HIT	ACCESSION NUMBER	E-VALUE
F6AJXP02J3PG4	arrowhead [Schistosoma mansoni]	XP_002575389	6,00E-09
90_9219	barh homeobox protein [Schistosoma mansoni]	XP_002571667	9,00E-26
F6AJXP02J2YIH	brain-specific homeobox [Tribolium castaneum]	EFA05724	5,00E-05
90_23337	cut, isoform C [Drosophila melanogaster]	NP_001138174	3,00E-18
F6AJXP02HF7ZO	cut, isoform C [Drosophila melanogaster]	NP_001138174	2,00E-10
90_8368	Cut-like homeobox 1 [Mus musculus]	AAH14289	2,00E-23
90_3019	distalless, Dlx-1 [Platynereis dumerilii]	CAJ38799	8,00E-07
90_14605	DjotxB [Dugesia japonica]	BAF80446	4,00E-65
F6AJXP02FICZL	Eye absent protein [Dugesia japonica]	CAD89530	1,00E-74
F6AJXP02IV6Y0	gsx family homeobox protein [Schistosoma mansoni]	XP_002574396	3,00E-12
90_24312	H6-like-homeobox [Drosophila melanogaster]	NP_732244	2,00E-15
90_8293	homeobox protein distal-less dlx [Schistosoma mansoni]	XP_002574393	4,00E-07
F6AJXP02JJ1QK	Homeobox protein DTH-2 [Girardia tigrina]	Q00401	3,00E-40
90_8753	homeobox prox 1 [Danio rerio]	NP_956564	5,00E-19
90_12057	homeodomain protein Tlx [Capitella teleta]	ACH89436	1,00E-23
90_8083	Hox class homeodomain protein AbdBa Hox protein [Schmidtea mediterranea].	ABW79872	1,00E-26
90_7618	Hox class homeodomain protein DjAbd-Ba [Dugesia japonica]	BAB41079	2,00E-16
90_6369	Hox class homeodomain protein DjAbd-Bb [Dugesia japonica]	BAB41078	1,00E-108
F6AJXP02ILMDY	Hox class homeodomain protein DjAbd-Bb [Dugesia japonica]	BAB41078	3,00E-33
F6AJXP02HN15J_2	Hypothetical protein CBG18604 [Caenorhabditis briggsae]	XP_002638395	7,00E-05
90_28860	ladybird homeobox corepressor 1-like protein [Mus musculus]	NP_001103213 XP_001479028	8,00E-33
90_6629	lim domain binding protein [Schistosoma mansoni]	XP_002576324	6,00E-05
F6AJXP02GEYYP	lim domain homeobox 3/4 transcription factor [Saccoglossus kowalevskii]	NP_001158395	4,00E-23
90_10783	lim homeobox protein [Schistosoma mansoni]	XP_002579046	2,00E-13
90_11027	lim homeobox protein [Schistosoma mansoni]	XP_002579046	1,00E-26
90_10828	LIM homeobox transcription factor 1 alpha [Mus musculus]	EDL39177	2,00E-14
90_13775	LIM motif-containing protein kinase 1 [Schistosoma japonicum]	CAX72746	2,00E-11
90_9432	LIM-homeodomain protein AmphiLim1/5 [Branchiostoma floridae]	ABD59002	5,00E-05
90_8762	LIM-homeodomain transcription factor islet [Branchiostoma floridae]	AAF34717	2,00E-15
90_6339	Nk1 protein [Platynereis dumerilii]	CAJ38797	1,00E-11
F6AJXP02G077U	paired-like homeobox 2a [Danio rerio]	NP_996953	5,00E-16
90_6703	phtf [Drosophila melanogaster]	NP_610232	2,00E-55
90_25126	PLOX2-Dj [Dugesia japonica]	BAA77402	2,00E-42
90_21567	PLOX4-Dj [Dugesia japonica]	BAA77404	2,00E-21
90_23010	PLOX5-Dj [Dugesia japonica]	BAA77405	6,00E-22
F6AJXP02IVOTI	PLOX5-Dj [Dugesia japonica]	BAA77405	1,00E-17
90_21710	pre-B-cell leukemia transcription factor 1 2 3 4 (pbx) [Schistosoma mansoni]	XP_002572195	2,00E-27
90_3405	PREDICTED: similar to UBX domain protein 4 [Hydra magnipapillata]	XP_002162754	2,00E-06
F6AJXP02HI24E	PREP homeodomain-like protein [Schmidtea mediterranea]	ADB54565	2,00E-47
F6AJXP02JSRJD	PREP homeodomain-like protein [Schmidtea mediterranea]	ADB54565	1,00E-32
F6AJXP02GVFDM	prospero-like protein [Schistosoma mansoni]	XP_002578694	1,00E-21
F6AJXP02IUJ5Q	prospero-like protein [Schistosoma mansoni]	XP_002578694	4,00E-25
F6AJXP02HZIDG	short stature homeobox protein 2 isoform c [Homo sapiens]	NP_001157150	5,00E-08
90_7545	SIX homeobox 2 [Gallus gallus]	NP_001038160	7,00E-36
F6AJXP02HBGHT	SJCHGC06100 protein [Schistosoma japonicum]	AAW24487	6,00E-11
90_3395	UBX domain containing 8, isoform CRA_d [Mus musculus]	EDL41153	3,00E-14
90_1176	UBX domain-containing protein 4 [Mus musculus]	NP_080666	1,00E-06
90_2625	ubx6(yeast)-related [Schistosoma mansoni]	XP_002576054	2,00E-16
90_24438	visual system homeobox protein [Tribolium castaneum]	CAX64460	9,00E-23
F6AJXP02G5JJX_1	Zn finger homeodomain 2 [Tribolium castaneum]	EFA01350	1,00E-05

Table 5 List of eye-related gene sequence candidates.

ID	BLASTX HIT	ACCESSION Nr.	E-VALUE
90_7233	abl interactor 2 [Schistosoma japonicum]	CAX69750.1	6.00E-019
90_4001	adaptor-related protein complex [Schistosoma mansoni]	XP_002574891.1	3.00E-072
90_30923	arginine/serine-rich splicing factor [Schistosoma mansoni]	XP_002574990.1	2.00E-026
90_482	ATPase protein [Schistosoma japonicum]	AAW26203.1	3.00E-049
90_3152	beta-catenin-like protein 2 [Schmidtea mediterranea]	ABW79874.1	0
90_12909	BMP [Schmidtea mediterranea]	ABV04322.1	3.00E-090
90_120	cat eye syndrome protein [Schistosoma japonicum]	AAX27345.2	4.00E-035
P02FKNEB	CaTALase family member (ctl-2) [Caenorhabditis elegans]	NP_001022473.1	1.00E-029
90_205	Chaperonin Containing TCP-1 family member (cct-3) [Caenorhabditis elegans]	NP_494218.2	1.00E-090
C90_6158	disks large homolog 1 isoform 1 [Homo sapiens]	NP_001091894.1	2.00E-027
P02GJNCV	extradenticle 1 protein [Schistosoma japonicum]	AAW24487.1	3.00E-013
P02JK4Z_2	eye53 [Dugesia japonica]	BAD20650.1	6.00E-016
90_8483	eyes absent protein [Dugesia japonica]	CAD89531.1	2.00E-064
90_651f	ascin protein [Schistosoma japonicum]	XP_002574990.1	5.00E-045
90_14368	heat shock protein 70 [Lumbricus terrestris]	ACB77918.1	4.00E-038
90_9533	Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2 [Danio rerio]	AAH45453.1	1.00E-042
90_6564	histone-lysine n-methyltransferase suv9 [Schistosoma mansoni]	XP_002574171.1	3.00E-061
90_15456	homeodomain protein NK4 [Platynereis dumerilii]	ABQ10640.1	8.00E-023
90_12892	homeotic protein six3-alpha [Mus musculus]	S74256	1.00E-082
90_325	importin-7 [Culex quinquefasciatus]	XP_001843364.1	2.00E-147
90_4360	intraflagellar transport 57 homolog [Xenopus (Silurana) tropicalis]	NP_001016561.1	1.00E-044
90_11027	lim homeobox protein [Schistosoma mansoni]	XP_002579046.1	5.00E-027
90_8432	lozenge [Schistosoma mansoni]	XP_002580418.1	8.00E-032
90_8924	Male ABnormal family member (mab-21) [Caenorhabditis elegans]	NP_497940.2	1.00E-046
P02HSHWR	mothers against decapentaplegic homolog 4 [Mus musculus]	NP_032566.2	5.00E-018
90_5640	muscleblind-like protein [Schistosoma mansoni]	XP_002575346.1	3.00E-025
P02FOEF6	neurogenic differentiation [Platynereis dumerilii]	CAQ57533.1	2.00E-012
P02GMLJM	nuclear transcription factor X-box binding 1 (nfx1) [Schistosoma bovis]	XP_002577564.1	5.00E-014
90_828	phenylalanine hydroxylase [Caenorhabditis elegans]	AAD31643.1	2.00E-145
90_2925	protein [Schistosoma japonicum]	AAW24487.1	4.00E-126
90_7228	protein kinase [Schistosoma mansoni]	XP_002576342.1	2.00E-077
90_2256	Protein pob [Schistosoma japonicum]	CAX75988.1	4.00E-089
90_4436	Rab-protein 6 [Drosophila melanogaster]	NP_477172.1	8.00E-085
P02GENUT_1	retinaldehyde dehydrogenase 1 [Eleutherodactylus coqui]	ACE74542.1	8.00E-008
90_11988	runt protein [Branchiostoma lanceolatum]	AAN08565.1	4.00E-017
P02FN7BT	Septin-7 (CDC10 protein homolog) [Schistosoma japonicum]	CAX83064.1	3.00E-012
90_3747	serine/threonine protein kinase [Schistosoma mansoni]	XP_002580180.1	9.00E-094
P02FICZL	six1-2 protein [Dugesia japonica]	CAD89530.1	8.00E-86
P02IZDJZ_1	SRY-related HMG box B protein [Platynereis dumerilii]	CAY12631.1	3.00E-028
P02HE4J6	strabismus protein CBR-VANG-1 [Platynereis dumerilii]	CAJ26300.1	1.00E-006
90_9483	tetratricopeptide repeat protein 10 tpr10 [Schistosoma mansoni]	XP_002573898.1	4.00E-048
90_16088	tyrosine kinase [Schistosoma mansoni]	XP_002576978.1	2.00E-031
90_11388	ubiquitin conjugating enzyme E2 [Schistosoma mansoni]	XP_002578016.1	3.00E-053
90_1263	vacuolar ATP synthase proteolipid subunit 1 2 3 [Schistosoma japonicum]	XP_002571892.1	9.00E-049
90_12567	vermilion [Drosophila ananassae]	XP_001963597.1	2.00E-012
90_5500	white pigment protein [Drosophila melanogaster]	CAA26716.2	2.00E-020
90_13309	YY1 transcription factor [Schistosoma japonicum]	CAX73893.1	5.00E-049
90_10118	zinc finger protein 42 homolog [Homo sapiens]	NP_777560.2	6.00E-031
90_9460	14-3-3 zeta isoform [Schistosoma bovis]	AAT39382.1	2.00E-023
P02ILIK3	52-kD bracketing protein [Drosophila melanogaster]	CAA44483.1	1.00E-016

3 includes a list of the contigs validated and the primers used for each of them.

Prediction of transmembrane proteins from ESTs

A total of 53,867 assembled ESTs (90e database) and 2,495 additional mRNAs were translated into all six reading frames using the 'transeq' program from the EMBOSS package [65]. The longest open reading frame for each EST/mRNA was then extracted and used as a protein database (containing 56,362 protein sequences overall) for the prediction of membrane-spanning proteins. We followed an approach described by Almen et al. [66] basing our analysis on consensus predictions of alpha-helices and using three applications: Phobius[67], TMHMM2.0[68], and SOSUI[69]. Phobius and TMHMM2.0 both use hidden Markov models based on different training sets to predict membrane topology. SOSUI evaluates proteins for their hydrophobic and amphiphilic properties to make its predictions. The use of all three programs should improve prediction accuracy. We first ran Phobius, which can predict both transmembrane helices and signal peptides. Signal peptide sequences are similar to transmembrane segments owing to their hydrophobic nature [70]. To avoid false positive predictions, we excluded signal peptides before running TMHMM2.0 and SOSUI.

Additional material

Additional file 1: GO annotation for 90e contigs not mapping onto the WUSL 3.1 genome assembly. 8,831 90e contigs were not found in the genome. 3,480 had a BLASTX hit to a sequence of NCBI NRprot; yet only 2,401 had a hit to a protein functionally annotated in the GO database. This file contains the description of the best HSP for 71 of those annotated contigs, after filtering out as described above. (Header: CONTIG ID = Smed454 sequence identifier, E-VALUE = BLASTX HSP E-value, ALN_SCORE = HSP alignment score, IDENTITIES = number of identical amino acids, POSITIVES = number of similar amino acids, SEQUENCE ID = Protein sequence identifier, ACCESSION NUMBER = Protein sequence full accession number, SEQUENCE DESCRIPTION = Full protein GenBank description).

Additional file 2: Splice sites for a subset of Smed454 sequences mapped onto the *Schmidtea mediterranea* genome. (Header: GID = Genomic contig IDentifier from WUSLv3.1 genome assembly—including the start and end nucleotide coordinates for the complete match—, CIG=90e contig IDentifier, INTNUM = Intron number within the 90e contig, EXO = splice signals found by exonerate, ORI = sequence orientation—here -1 means that the match was found on the reverse strand of the genomic contig—, CEXO = corrected splice site signals after reverse complementing the genomic sequence when required, ILEN = Intron length in bp, IORI = Intron start—relative to the match coordinates—, IEND = Intron end—relative to the match coordinates—, STRAND, SSSEQ = Splice sites sequences—where a point separates three nucleotides from the 5' and 3' exons, and the three dots in the middle denote intron sequence not shown for clarity—).

Additional file 3: List of 90e transcripts validated by RT-PCR.

(Header: # = Number, CONTIG=90e contig ID, PRIMER_FORWARD = 5' to 3' sequence of the forward primer used, REVERSE_FORWARD = 5' to 3' sequence of the reverse primer used, AMPLICON SIZE = Size amplified in bp, SET = refers to the subset of origin of the 90e contig: no hit genome, hit genome, - blast (no BLASTX hit), +blast (BLASTX hit)).

Additional file 4: Smed454 sequences matching known *Schmidtea mediterranea* genes.

(Header: ACCESSION NUMBER = Known gene sequence identifier as target, NAME = Description for that sequence, LENGTH = Nucleotide length for that sequence, A&T CONTENT = Sequence composition, 454 90e CONTIG/SINGLETON = Smed454 sequence identifier as query, LENGTH = Nucleotide sequence length for this sequence, ALIGNMENT LENGTH = HSP length, START = Start nucleotide of alignment on target, END = Final nucleotide of alignment on target, IDENTITY = Identity score, BITS SCORE = Alignment bit score, E-VALUE = HSP BLAST e-value, HIT LENGTH = Un-gapped length of the alignment on the target, %COVERAGE = Sum of co-linear HSPs on target coordinates divided by the total length of the target, #SEQs = Number of co-linear HSPs considered, avg%COV = The coverage divided by the number of co-linear HSPs).

Additional file 5: Gene Ontology for all three Smed454 sets: 90, 98 and 90e.

Level one and two GO codes are shown in order to simplify the listings. Although there are small changes in GO frequencies, annotation is consistent throughout all three sets. (Header: GO = Gene Ontology unique identifier, Count = Number of sequences with a given GO annotation, Freq% = Frequencies for every GO annotation. The total shown does not include the un-annotated and over-represented features, that is, the first two rows on each table).

Additional file 6: List of cell cycle, cell division, DNA repair or DNA damage candidates.

Short list of candidates annotated as genes involved in cell cycle, cell division, DNA repair or DNA damage. (Header: ID = Smed454 sequence identifier, BLASTX HIT = Description of the best sequence hit, ACCESSION NUMBER = Sequence identifier of the best sequence hit, E-VALUE = BLASTX e-value for that sequence hit).

Additional file 7: Summary report for the consensus set of 4,663 predicted transmembrane proteins including functional annotations.

(Header: Sequence_ID = Protein sequence identifier, Sequence_AA = Amino acid sequence, Length[aa] = Length of amino acid sequence, Phobius_TM = Phobius prediction of number of transmembrane domains, Phobius_SP = Phobius prediction of signal peptide, Phobius_Top = Phobius prediction of membrane topology, TMHMM_TM = TMHMM2.0 prediction of number of transmembrane domains, TMHMM_Top = TMHMMv2.0 prediction of membrane topology, SOSUI_TM = SOSUI prediction of number of transmembrane domains, SOSUI_Top = SOSUI prediction of membrane topology, UFO_PFAM = UFO annotation of Pfam protein families, UFO_GO = UFO annotation of gene ontologies).

Additional file 8: List of neurotransmitter, peptide and hormone receptor sequence candidates.

Complete complement of Smed454 dataset contigs and singletons showing homology to neurotransmitter and hormone receptors, totalling 287 sequences. (Header: ID = Smed454 sequence identifier, BLASTX HIT = Description of the best sequence hit, ACCESSION NUMBER = Sequence identifier of the best sequence hit, E-VALUE = BLASTX e-value for that sequence hit).

Additional file 9: List of eye-related gene sequence candidates.

Complete complement of Smed454 dataset contigs and singletons showing homology to eye-related genes, totalling 95 sequences. (Header: ID = Smed454 sequence identifier, BLASTX HIT = Description of the best sequence hit, ACCESSION NUMBER = Sequence identifier of the best sequence hit, E-VALUE = BLASTX e-value for that sequence hit).

Abbreviations

bp: base pairs (nucleotide length unit); EST: Expressed Sequence Tag; GC%: percent of guanine+cytosine sequence content; HSP: High-scoring Segment Pair; GO: Gene Ontology; WUSL: Washington University in St Louis; TM: transmembrane; RDGN: retinal determination gene network; Gy: gray.

Acknowledgements

Genomic sequence data was produced by the Washington University Genome Sequencing Center in St. Louis. DNA library construction, 454 pyrosequencing and the contig browser were generated by Skuldtech (Montpellier, France). We thank Ann King for language revision and editorial advice, and Franziska Konert for technical assistance. SF and GRE are

supported by FPI fellowships, and BC is supported by an FPU fellowship (both MICINN, Spain). TH is supported by a fellowship of the Studienstiftung des deutschen Volkes. FC is a Ramón y Cajal researcher (MICINN, Spain). This work was funded by grants BFU2008-01544 (MICINN) to ES, BFU2008-00710 (MICINN) to FC, BFU2009-09102(MICINN) to JFA, and 2009SGR1018 (AGAUR) to ES and FC. Finally, KB. was funded by a FRONTIER grant from the University of Heidelberg DFG Excellence Initiative.

Author details

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona (UB), Av. Diagonal 645, edifici annex, planta 1, 08028, Barcelona, Catalunya, Spain. ²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Av. Diagonal 645, edifici annex, planta 1, 08028, Barcelona, Catalunya, Spain. ³Division of Signaling and Functional Genomics German Cancer Research Center (DKFZ), Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg, Germany. ⁴Max Planck Research Group Stem Cells and Regeneration Max-Planck-Institute for Molecular Biomedicine, Von-Esmarch-Strasse 54, 48149 Muenster, Germany.

Authors' contributions

JFA performed the computational analyses on the assemblies, the GO characterization, the mapping into the genome and the analysis of spliced sites, and prepared all the corresponding figures and tables. GRE analyzed the coverage of known annotated genes and generated the corresponding table. TH performed the sequence analysis of planarian transmembrane proteins, generated the corresponding figure and table and designed primers for RT-PCRs. GRE, SF, FC and KB designed the primers and performed the RT-PCRs. FC and SF analyzed the annotated data to characterize the neurotransmitter, peptide and hormone receptors and prepared the corresponding tables. ES and BC analyzed the annotated data to characterize homeobox-containing and eye-related genes and prepared the corresponding tables. JFA, KB, FC and ES conceived of the study, participated in its design and coordination, and helped draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 31 August 2010 Accepted: 31 December 2010

Published: 31 December 2010

References

- Agata K, Tanaka T, Kobayashi C, Kato K, Saitoh Y: Intercalary regeneration in planarians. *Dev Dyn* 2003, **226**(2):308-316.
- Newmark PA, Sánchez Alvarado A: Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat Rev Genet* 2002, **3**(3):210-219.
- Reddien PW, Sánchez-Alvarado A: Fundamentals of planarian regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, **20**:725-757.
- Saló E: The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *Bioessays* 2006, **28**(5):546-559.
- Baguña J, Saló E, Auladell C: Regeneration and pattern formation in planarians. III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development* 1989, **107**:77-86.
- Newmark PA, Sánchez-Alvarado A: Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol* 2000, **220**(2):142-153.
- Cebrià F: Regenerating the central nervous system: how easy for planarians! *Dev Genes Evol* 2007, **217**(11-12):733-748.
- Scimone ML, Meisel J, Reddien PW: The Mi-2-like Smed-CHD4 gene is required for stem cell differentiation in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Development* 2010, **137**(8):1231-1241.
- Fernández-Taboada E, Moritz S, Zeuschner D, Stehling M, Scholer HR, Saló E, Gentile L: Smed-SmB, a member of the LSM protein superfamily, is essential for chromatoid body organization and planarian stem cell proliferation. *Development* 2010, **137**(7):1055-1065.
- Forsthoefel DJ, Newmark PA: Emerging patterns in planarian regeneration. *Curr Opin Genet Dev* 2009, **19**(4):412-420.
- Sánchez-Alvarado A, Newmark PA, Robb SM, Juste R: The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development* 2002, **129**(24):5659-5665.
- Zayas RM, Hernandez A, Habermann B, Wang Y, Stary JM, Newmark PA: The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: analysis of ESTs from the hermaphroditic strain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**(51):18491-18496.
- Pontius JU, Wagner L, Schuler GD: UniGene: a unified view of the transcriptome. In *The NCBI Handbook* Edited by: Information NCBF. Bethesda (MD) 2003.
- Schmidtea mediterranea* genome sequencing project. [http://genome.wustl.edu/genomes/view/schmidtea_mediterranea/].
- Proposal for the Sequencing of a New Target Genome: White Paper for a Planarian Genome Project. [http://genome.wustl.edu/images/uploads/Whitepaper/Schmidtea_mediterranea_WP.pdf].
- Cantarel BL, Korf I, Robb SM, Parra G, Ross E, Moore B, Holt C, Sánchez-Alvarado A, Yandell M: MAKER: an easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes. *Genome Res* 2008, **18**(1):188-196.
- Robb SM, Ross E, Sánchez-Alvarado A: SmedGD: the *Schmidtea mediterranea* genome database. *Nucleic Acids Res* 2008, **36** Database: D599-606.
- Emrich SJ, Barbazuk WB, Li L, Schnable PS: Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Res* 2007, **17**(1):69-73.
- Abril JF, Castelo R, Guigo R: Comparison of splice sites in mammals and chicken. *Genome Res* 2005, **15**(1):111-119.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW: GenBank. *Nucleic Acids Res* 2009, **37** Database: D26-31.
- Smed454 datasets web site. [http://planarian.bio.ub.es/datasets/454/].
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al: Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000, **25**(1):25-29.
- Hatfield DL: Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2001.
- Castellano S, Novoselov SV, Kryukov GV, Lescure A, Blanco E, Krol A, Gladyshev VN, Guigo R: Reconsidering the evolution of eukaryotic selenoproteins: a novel nonmammalian family with scattered phylogenetic distribution. *EMBO Rep* 2004, **5**(1):71-77.
- Eisenhoffer GT, Kang H, Sánchez-Alvarado A: Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell* 2008, **3**(3):327-339.
- Rossi L, Salvetti A, Marincola FM, Lena A, Deri P, Mannini L, Batistoni R, Wang E, Gremigni V: Deciphering the molecular machinery of stem cells: a look at the neoblast gene expression profile. *Genome Biol* 2007, **8**(4):R62.
- Meinicke P: UFO: a web server for ultra-fast functional profiling of whole genome protein sequences. *BMC Genomics* 2009, **10**:409.
- Bonuccelli L, Rossi L, Lena A, Scarcelli V, Rainaldi G, Evangelista M, Iacopetti P, Gremigni V, Salvetti A: An RbAp48-like gene regulates adult stem cells in planarians. *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 5):690-698.
- Guo T, Peters AH, Newmark PA: A Bruno-like gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Dev Cell* 2006, **11**(2):159-169.
- Pearson BJ, Sánchez-Alvarado A: A planarian p53 homolog regulates proliferation and self-renewal in adult stem cell lineages. *Development* 2010, **137**(2):213-221.
- Reddien PW, Oviedo NJ, Jennings JR, Jenkin JC, Sánchez-Alvarado A: SmedWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* 2005, **310**(5752):1327-1330.
- Franquinet R: [The role of serotonin and catecholamines in the regeneration of the Planaria *Polycelis tenuis*]. *J Embryol Exp Morphol* 1979, **51**:85-95.
- Franquinet R, Martelly I: Effects of serotonin and catecholamines on RNA synthesis in planarians; in vitro and in vivo studies. *Cell Differ* 1981, **10**(4):201-209.
- Franquinet R, Le Moigne A, Hanoune J: The adenylate cyclase system of planaria *Polycelis tenuis*: activation by serotonin and guanine nucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1978, **539**(1):88-97.
- Baguña J, Saló E, Romero R: Effects of activators and antagonists of the neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians. *Int J Dev Biol* 1989, **33**(2):261-266.
- Bautz A, Schilt J: Somatostatin-like peptide and regeneration capacities in planarians. *Gen Comp Endocrinol* 1986, **64**(2):267-272.
- Kreshchenko ND: Functions of flatworm neuropeptides NPF, GYIRF and FMRF in course of pharyngeal regeneration of anterior body fragments of planarian, *Girardia tigrina*. *Acta Biol Hung* 2008, **59**(Suppl):199-207.
- García-Fernández J, Baguña J, Saló E: Planarian homeobox genes: cloning, sequence analysis, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, **88**(16):7338-7342.

39. Saló E, Baguña J: **Regeneration in planarians and other worms: New findings, new tools, and new perspectives.** *J Exp Zool* 2002, **292**(6):528-539.
40. Saló E, Tauler J, Jiménez E, Bayasas JR, González J, García-Fernández J, Baguña J: **Hox and parahox genes in flatworms: characterization and expression.** *Amer Zool* 2001, **41**:652-663.
41. Bayasas JR, Castillo E, Saló E: **Platyhelminthes have a hox code differentially activated during regeneration, with genes closely related to those of spiralian protostomes.** *Dev Genes Evol* 1998, **208**(8):467-473.
42. Nogi T, Watanabe K: **Position-specific and non-colinear expression of the planarian posterior (Abdominal-B-like) gene.** *Dev Growth Differ* 2001, **43**(2):177-184.
43. Orii H, Kato K, Umesono Y, Sakurai T, Agata K, Watanabe K: **The planarian HOM/HOX homeobox genes (Plox) expressed along the anteroposterior axis.** *Dev Biol* 1999, **210**(2):456-468.
44. Iglesias M, Gómez-Skarmeta JL, Saló E, Adell T: **Silencing of *Smed-betacatenin1* generates radial-like hypercephalized planarians.** *Development* 2008, **135**(7):1215-1221.
45. Saló E, Batistoni R: **The planarian eye: a simple and plastic system with great regenerative capacity.** *Animal models in eye research* Tsonis PA: Academic Press; 2008, 15-26.
46. Saló E, Pineda D, Marsal M, González J, Gremigni V, Batistoni R: **Genetic network of the eye in Platyhelminthes: expression and functional analysis of some players during planarian regeneration.** *Gene* 2002, **287**:67-74.
47. Gehring WJ: **New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors.** *J Hered* 2005, **96**(3):171-184.
48. Gehring WJ, Ikeo K: **Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution.** *Trends Genet* 1999, **15**(9):371-377.
49. Silver SJ, Rebay I: **Signaling circuitries in development: insights from the retinal determination gene network.** *Development* 2005, **132**(1):3-13.
50. Treisman JE: **A conserved blueprint for the eye?** *Bioessays* 1999, **21**(10):843-850.
51. Mannini L, Rossi L, Deri P, Gremigni V, Salvetti A, Saló E, Batistoni R: **Djeyes absent (Djeya) controls prototypic planarian eye regeneration by cooperating with the transcription factor Djsix-1.** *Dev Biol* 2004, **269**(2):346-359.
52. Pineda D, González J, Callaerts P, Ikeo K, Gehring WJ, Saló E: **Searching for the prototypic eye genetic network: Sine oculis is essential for eye regeneration in planarians.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**(9):4525-4529.
53. Pineda D, González J, Marsal M, Saló E: **Evolutionary conservation of the initial eye genetic pathway in planarians.** *Belg J Zool* 2001, **131**:77-82.
54. Pineda D, Rossi L, Batistoni R, Salvetti A, Marsal M, Gremigni V, Falleni A, González-Linares J, Deri P, Saló E: **The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax6 independent.** *Development* 2002, **129**(6):1423-1434.
55. Inoue T, Kumamoto H, Okamoto K, Umesono Y, Sakai M, Sánchez-Alvarado A, Agata K: **Morphological and functional recovery of the planarian photosensing system during head regeneration.** *Zoolog Sci* 2004, **21**(3):275-283.
56. Cebrià F, Newmark PA: **Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture.** *Development* 2005, **132**(16):3691-3703.
57. Sánchez Alvarado A, Newmark PA: **Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**(9):5049-5054.
58. Takano T, Pulvers JN, Inoue T, Tarui H, Sakamoto H, Agata K, Umesono Y: **Regeneration-dependent conditional gene knockdown (Readyknock) in planarian: Demonstration of requirement for Djsnap-25 expression in the brain for negative phototactic behavior.** *Dev Growth Differ* 2007, **49**(5):383-394.
59. Handberg-Thorsager M, Saló E: **The planarian nanos-like gene *Smednos* is expressed in germline and eye precursor cells during development and regeneration.** *Dev Genes Evol* 2007, **217**(5):403-411.
60. Chevreux B: **MIRA: An automated genome and EST assembler.** Duisburg: Heidelberg; 2005.
61. Kent WJ: **BLAT—the BLAST-like alignment tool.** *Genome Res* 2002, **12**(4):656-664.
62. **exonerate: A generic tool for sequence alignment.** [http://www.ebi.ac.uk/~guy/exonerate/].
63. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *J Mol Biol* 1990, **215**(3):403-410.
64. Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A: **High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(10):3420-3435.
65. Rice P, Longden I, Bleasby A: **EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite.** *Trends Genet* 2000, **16**(6):276-277.
66. Almen MS, Nordstrom KJ, Fredriksson R, Schioth HB: **Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin.** *BMC Biol* 2009, **7**:50.
67. Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL: **Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35** Web Server: W429-432.
68. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL: **Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes.** *J Mol Biol* 2001, **305**(3):567-580.
69. Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S: **SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins.** *Bioinformatics* 1998, **14**(4):378-379.
70. Ahrm M, Litou ZI, Fang R, Al-Tawallbeh G: **Estimation of membrane proteins in the human proteome.** *In Silico Biol* 2006, **6**(5):379-386.
71. Hintze JL, Nelson RD: **Violin plots: a box plot-density trace synergism.** *The American Statistician* 1998, **52**(2):181-184.

doi:10.1186/1471-2164-11-731

Cite this article as: Abril et al.: *Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea*.* *BMC Genomics* 2010 **11**:731.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANNEX 5. Article 4.
*Regeneration of neuronal cell types
in Schmidtea mediterranea:
an immunohistochemical and
expression study*

Susanna Fraguas, Sara Barberán, Begoña Ibarra, Linda Stöger,
Francesc Cebrià

Departament de Genètica, Facultat de Biologia (Universitat de Barcelona)

The International Journal of Developmental Biology 56(1-3):143-53. 2012

Resum.

La regeneració de les cèl·lules neuronals a *Schmidtea mediterranea*: Estudi immunohistoquímic i d'expressió gènica

Les planàries d'aigua dolça són organismes excepcionals capaços de regenerar el sistema nerviós central (SNC) en la seva totalitat a partir de qualsevol fragment del seu cos, per petit que sigui, en pocs dies. El SNC de les planàries està constituït per un parell de ganglis cefàlics anteriors i dos cordons ventrals longitudinals que s'estenen al llarg de tot el cos.

Estudis previs sobre la regeneració del SNC de les planàries han utilitzat la majoria de les vegades marcadors pan-neuronals, que ens aporten únicament una visió general del procés. Treballs més recents han començat a caracteritzar gens que són necessaris per la regeneració del SNC.

Amb l'objectiu d'obtenir una descripció més detallada de la regeneració neuronal de les planàries, en aquest estudi hem monitoritzat la regeneració neuronal de diferents poblacions neuronals, marcant-les amb anticossos contra serotonina, allatostatina, neuropèptid F, GYRFamida i FMRFamida. A més a més, caracteritzem la regeneració de dues poblacions neuronals específiques, les cèl·lules dopaminèrgiques i les octopaminèrgiques, mitjançant hibridacions *in situ*. Finalment, caracteritzem el patró d'expressió d'un conjunt de receptors de determinats neurotransmissors, neuropèptids i hormones, els quals s'ha suggerit que juguen un paper important durant la regeneració neuronal.

En resum, amb les dades obtingudes d'aquest treball podem aportar una descripció més acurada dels processos cel·lulars que transcorren durant la regeneració anterior i posterior del SNC de les planàries.

Regeneration of neuronal cell types in *Schmidtea mediterranea*: an immunohistochemical and expression study

SUSANNA FRAGUAS, SARA BARBERÁN, BEGOÑA IBARRA, LINDA STÖGER and FRANCESC CEBRIÀ*

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona and
Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT Freshwater planarians are unique in their ability to regenerate a complete Central Nervous System (CNS) from almost any small piece of their body in just a few days. The planarian CNS contains a pair of anterior cephalic ganglia lying on top of two ventral nerve cords that extend along the length of the animal. Studies of planarian CNS regeneration have generally used pan-neural markers, which provide only a general overview of the process. Nevertheless, some reports have started to characterize the genes that are required for this process. In this study, to obtain a more detailed description of planarian neural regeneration, we monitored the regeneration of neuronal populations specifically labelled with antibodies against serotonin, allatostatin, neuropeptide F, GYRFamide and FMRFamide. We also characterized the regeneration of dopaminergic and octopaminergic cell populations by *in situ* hybridization. Finally, we characterized the expression pattern of a set of receptors for neurotransmitters, neuropeptides and hormones that are suggested to play a role in the regeneration process itself. Together, these data provide a more detailed description of the cellular events occurring during anterior and posterior CNS regeneration in planarians and provide the foundations for future mechanistic studies into the regeneration process in this important model system.

KEY WORDS: *planaria*, *regeneration*, *nervous system*, *neurotransmitter*, *neuronal cell type*

Introduction

In contrast to most model organisms, including those with some regenerative capabilities, freshwater planarians are unique in their capacity to regenerate an organized and functional Central Nervous System (CNS) *de novo* from a small body piece within just a few days (reviewed in Cebrià, 2007; Agata and Umesono, 2008). The planarian CNS is mainly formed by an anterior brain and a pair of ventral nerve cords (VNC) that run from the head to the tip of the tail and are interconnected by transverse commissures. The brain consists of two lobed arch-shaped cephalic ganglia connected by a single anterior commissure and can be structurally divided into a central spongy region (neuropil) and several lateral branches that project towards the periphery of the head (Agata *et al.*, 1998; Cebrià *et al.*, 2002a). Although at first glance the planarian CNS seems morphologically simple, it exhibits substantial molecular, cellular and genetic complexity. Initial studies by Umesono *et al.*, (1997, 1999) showed that *otd/Otx*-related homeobox genes are conserved in *Dugesia japonica* and are expressed in distinct non-overlapping domains within the cephalic ganglia: *DjotxA* is

expressed in the medial region of the cephalic ganglia, *DjotxB* labels the central spongy region and *Djotp* is detected in the lateral branches that project towards the periphery of the head (Umesono *et al.*, 1999). Subsequent studies showed that the planarian CNS can be further compartmentalized based on the expression of a set of neural-specific genes (Cebrià *et al.*, 2002b). Moreover, since planarian neural genes display a high level of conservation and similarity with their homologues in vertebrates, planarians are also a suitable model in which to study the evolutionary history of the CNS (Mineta *et al.*, 2003).

Although several genes are now known to be required for proper regeneration of the planarian CNS (Cebrià and Newmark 2005, 2007; Cebrià *et al.*, 2007; Fusaoka *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 2008; Inoue *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2007), we are still far away from fully understanding how the nervous system is reconstructed after amputation. During regeneration, newly formed neurons differentiate from pluripotent stem cells called neoblasts (Baguña *et*

Abbreviations used in this paper: 5F10, allatostatin; 5-HT, serotonin; CNS, Central Nervous System; NPF, neuropeptide F; VNC, ventral nerve cord.

*Address correspondence to: Francesc Cebrià. Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Av. Diagonal 643, Edifici annex planta 1, 08028 Barcelona, Catalunya, Spain. Tel: +34-93-403-5301. Fax: +34-93-403-4420. e-mail: fcebrias@ub.edu - web: <http://www.ub.edu/planaria>

al., 1989a; Wagner *et al.*, 2011). However, many questions are still unresolved, such as how neoblasts become committed to a neural cell fate, how the new neurons are organized to form a properly patterned brain, and how the newly regenerated brain is integrated into the pre-existing nervous system. In order to address some of these questions, a large set of specific markers for distinct neuronal populations will be required. Recently, several neuronal subpopulations have been characterized immunohistochemically in the model species *Schmidtea mediterranea* (Cebrià, 2008). However, that study focused on intact non-regenerating planarians. Here, we use the same antibodies to analyze how different neuronal cell types appear during regeneration of the anterior (differentiation of the new cephalic ganglia and growth of the truncated nerve cords) and posterior (growth of the truncated nerve cords) CNS. In addition, we characterize the regeneration of dopaminergic and octopaminergic neurons by *in situ* hybridization. The markers used here correspond to a classical neurotransmitter (serotonin), neuropeptides (neuropeptide F, FMRFamide, GYRFamide, allatostatin) and enzymes required for the synthesis of neurotransmitters such as dopamine or octopamine. Although there is not much information about the role these neurotransmitters and neuropeptides could play during planarian regeneration some papers have suggested that: serotonin may promote neoblast proliferation and regeneration (Franquinet 1979; Franquinet and Le Moigne, 1979), dopaminergic neurons may have a function in planarian locomotion (Nishimura *et al.*, 2007b), and NPF and FMRFamide may be important to promote the regeneration of the pharynx (Kreshchenko, 2008; Kreshchenko *et al.*, 2008). Finally, to begin to address the pro-

posed role of some of these factors in the regenerative process (Baguña *et al.*, 1989b; Cebrià, 2007), we have characterized the expression pattern of putative receptors for neurotransmitters, peptides and hormones in *S. mediterranea* (Abril *et al.*, 2010) in intact and regenerating planarians.

Results

General structure of the Central Nervous System in *S. mediterranea*

Planarian cephalic ganglia contain a central neuropil surrounded by most of the neuronal cell bodies (Agata *et al.*, 1998; Cebrià, 2008; Okamoto *et al.*, 2005). Immunohistochemistry with antibodies against Neuropeptide F (NPF; Maule *et al.*, 1992) and FMRFamide labelled the neuropil and also individual cells at specific locations within it (Fig. 1). Scattered tear-shaped neurons were observed in the dorsal region of the cephalic ganglia following anti-NPF immunostaining in intact animals (Fig. 1 A,D). The central neuropil was seen with its typical spongy structure (Fig. 1 B,E). In addition, NPF-positive cells with long processes were observed along the medial region of the cephalic ganglia (arrowheads in Fig. 1B). The anti-NPF antibody also labelled the ventral nerve cords (VNCs) all along the body (Fig. 1 G,H,I). Ganglia-like knots were observed along the VNCs (arrowheads in Fig. 1 G,H). From these ganglia, lateral processes projected towards the body margin (arrows in Fig. 1G) and transverse commissures connected both nerve cords (arrows in Fig. 1H). After anti-NPF immunostaining the ganglia-like knots along the VNCs appeared to be connected by individual axon bundles (arrows in Fig. 1I).

Immunostaining with an anti-FMRFamide antibody showed a similar pattern to that described for the anti-NPF antibody. Thus, FMRFamide-positive cells were observed in the dorsal region of the cephalic ganglia (Fig. 1J) as well as along the medial part of the central neuropil (arrowheads in Fig. 1K). This anti-FMRFamide

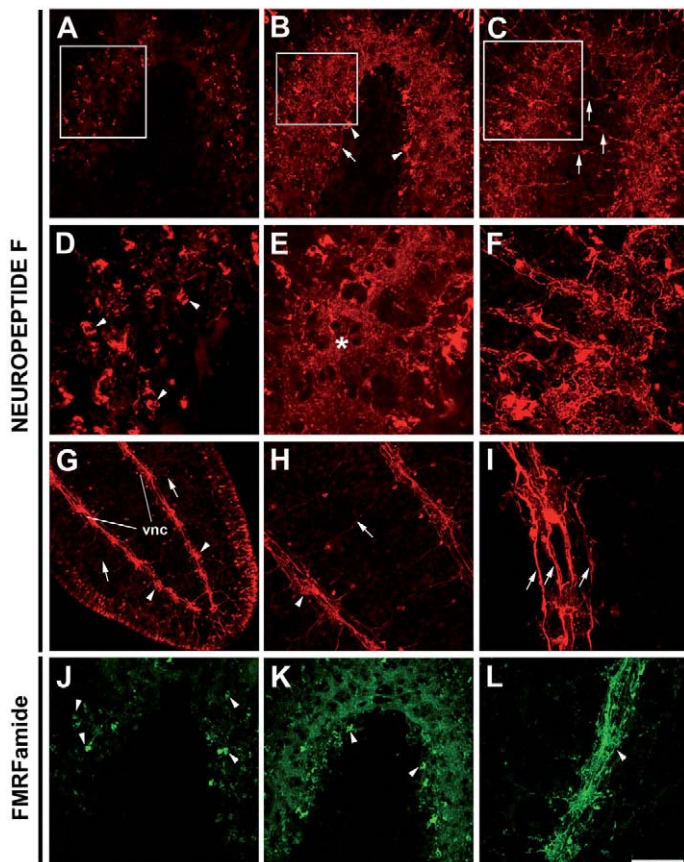
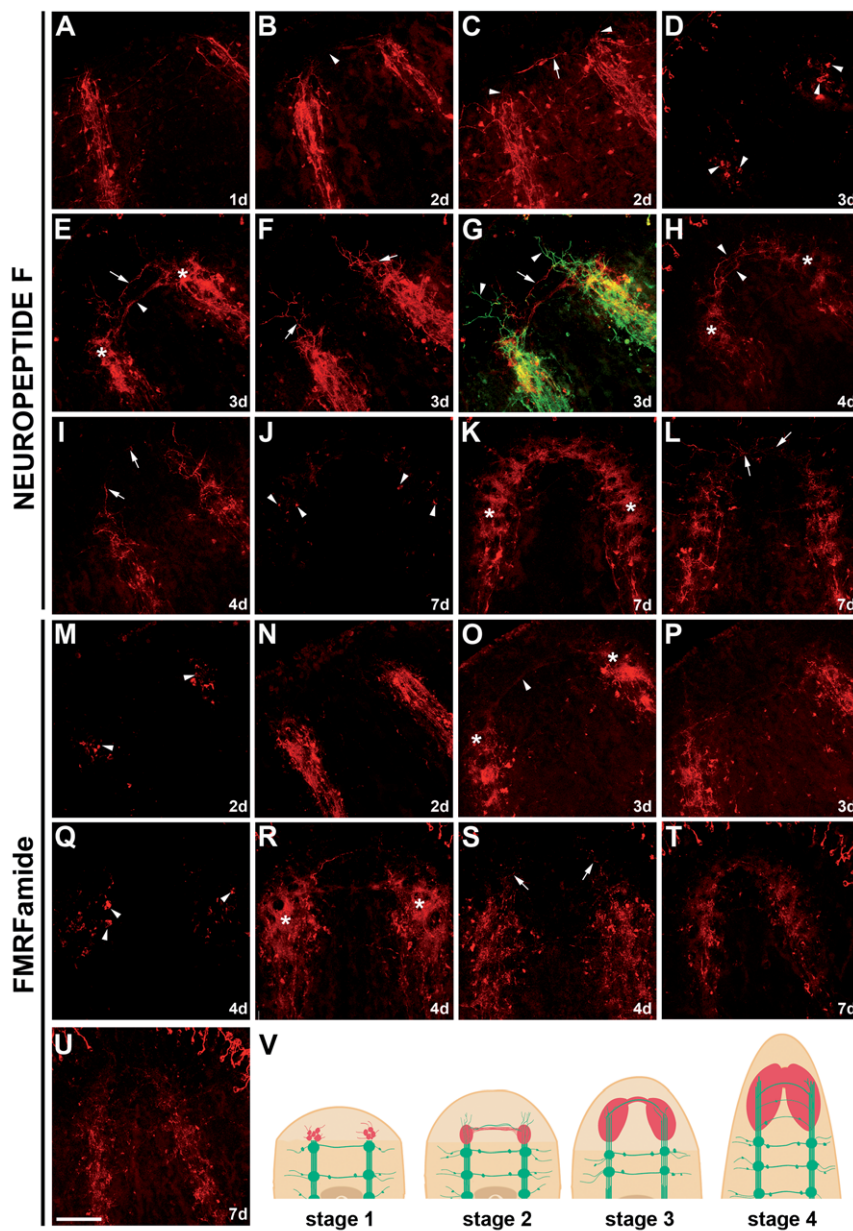


Fig. 1. General structure of the *Schmidtea mediterranea* Central Nervous System. Whole-mount immunohistochemistry of the planarian central nervous system with anti-NPF (A-I) and anti-FMRFamide (J-L) antibodies. (A-C) Projections of different confocal planes of the same sample, going from dorsal (A) to ventral (C). (A) Dorsal-most region of the cephalic ganglia. (B) Central neuropil. Arrowheads point to individual cells along the medial region. Arrow points to fibres projecting from these cells. (C) Anterior ventral nerve cords below the cephalic ganglia. Arrows indicate the transverse commissures connecting left and right cords. (D-F) Higher magnifications of boxed areas in (A-C), respectively. Arrowheads in (D) point to individual dorsal cells. Asterisk in (E) marks the central neuropil with its characteristic spongy structure. (G,H) Posterior ventral nerve cords (vnc). Arrowheads in (G,H) point to the ganglia-like knots distributed along the nerve cords. Arrows in (G,H) point to lateral projections and transverse commissures connecting left and right nerve cords, respectively. The signal observed along the body margin in (G) corresponds to un-specific background staining. (I) Detailed view of the individual axon bundles (arrows) that connect the ganglia-like knots along the nerve cords. (J,K) Projections of different confocal planes of the same sample, going from dorsal (J) to ventral (K). (J) Arrowheads point to individual cells on the dorsal-most region of the cephalic ganglia. (K) Central spongy neuropil. Arrowheads point to cells in the medial region. (L) Ventral nerve cord constituted by more compacted axon bundles (arrowhead) compared to the anti-NPF pattern. In (A-F, I-K) anterior is to the top; in (G,H) anterior is to the top left; in (L) anterior is to the top right. Scale bars, A,B,C,J,K,H,L, 100 μ m; G, 200 μ m; D,E,F,I, 50 μ m.



Ventral nerve cords below them. (Q-S) Projections of different confocal planes of the same sample at 3 days of regeneration, going from dorsal (Q) to ventral (S). (Q) Dorsal FMRamide-positive cells (arrowheads). (R) Regenerated cephalic ganglia (asterisks). (S) Arrows point to fibres sprouting from the ventral nerve cords. (T,U) Projections of different confocal planes of the same sample at 3 days of regeneration, going from dorsal (T) to ventral (U). (T) Cephalic ganglia. (U) Ventral nerve cords. (V) Schematic model of the regeneration of the anterior central nervous system. Cephalic ganglia are represented in red and ventral nerve cords in green. Stage 1: 1-2 days of regeneration; stage 2: 2-3 days of regeneration; stage 3: 4 days of regeneration; stage 4: 7 days of regeneration. In (A-I, M-P) anterior is to the top left; in (K,L, Q-U) anterior is to the top. Scale bar, 100 μ m.

antibody also labelled the VNCs; however, unlike with anti-NPF, the axon bundles connecting the ganglia-like knots appeared much more compact (arrowhead in Fig. 1L).

Immunohistochemistry with anti-NPF and anti-FMRamide during regeneration of the anterior Central Nervous System

Recently, several neuronal subpopulations have been described in the most commonly used planarian species, *S. mediterranea* and *D. japonica* (Cebrià, 2008; Nishimura *et al.*, 2007a, 2007b, 2008a, 2008b; Fraguas *et al.*, 2011). In the case of *D. japonica*,

those studies included the characterization of distinct neuronal subpopulations in intact animals as well as how they re-appear during regeneration (Nishimura *et al.*, 2007b, 2008c). However, while several specific neuronal types have been characterized in intact *S. mediterranea* (Cebrià, 2008; Collins *et al.*, 2010), less information is available on how these cell types regenerate. In order to bridge this gap in information, we performed immunohistochemistry with several antibodies at different stages of regeneration (Figs. 2, 3, 4).

Anti-NPF immunostaining revealed truncated VNCs in the stump region after 1 day of regeneration (Fig. 2A). Two days after cutting,

thin transverse processes probably connecting the developing dorsal cephalic ganglia were observed (arrowheads in Fig. 2B). At this stage, the nerve cords below the new cephalic ganglia extended some processes anteriorly (arrowheads in Fig. 2C) and transverse commissures connected them at their most anterior end (arrow in Fig. 2C). At day 3 of regeneration, clusters of NPF-positive cells appeared in the dorsal region of the regenerating cephalic ganglia (arrowheads in Fig. 2D) and the spongy structure of the new neuropil could be distinguished (asterisks in Fig. 2E). At this stage, a relatively thick commissure connected the cephalic ganglia (arrowhead in Fig. 2E). In addition, sprouts from the truncated VNCs were evident at this stage (arrows in Fig. 2F). In fact, axonal processes from these ventral cords extended anteriorly beyond the growing cephalic ganglia (arrowheads in Fig. 2G). Some of these processes actually turned to cross the midline in more dorsal regions (arrows in Fig. 2 E,G). At 4 days of regeneration, the new cephalic ganglia showed its typical spongy structure and bilobed organization (asterisks in Fig. 2H); the two halves were clearly connected by a transverse commissure (indicated by arrowheads in Fig. 2H). The regenerated VNCs were also evident below the cephalic ganglia (Fig. 2I). As seen at 3 days of regeneration, some

of the axonal processes from the VNCs projected contralaterally over the anterior commissure that connects the two halves of the brain (arrows in Fig. 2I). Finally, after 7 days of regeneration the cephalic ganglia showed a pattern clearly resembling that of the intact ganglia before amputation. Individual NPF-expressing cells were found in the dorsal region of the brain (arrowheads in Fig. 2J). The central neuropil, and the VNCs below it, appeared fully regenerated (asterisks in Fig. 2K). Thin axonal processes continued to extend from the regenerated VNCs at the level of the anterior commissure (arrows in Fig. 2L).

The dynamics of regeneration of the anterior CNS seen with an anti-FMRamide antibody is similar to the one observed with anti-NPF, although slightly delayed (Fig. 2 M-U). At 2 days of regeneration, an accumulation of FMRamide-positive cells (arrowheads in Fig. 2M) was detected dorsal to the truncated nerve cords (Fig. 2N). At this stage, however, no commissures or axonal processes were observed connecting the left and right halves of the CNS. Three days after amputation, new spongy cephalic ganglia (asterisks in Fig. 2O) appeared connected by a commissure (arrowhead in Fig. 2O). Regenerated VNCs were seen below these cephalic ganglia (Fig. 2P). At 4 days of regeneration, the number

of dorsal positive cells increased (arrowheads in Fig. 2Q), the spongy structure of the regenerated neuropil was more evident (asterisks in Fig. 2R) and thin axonal processes from the regenerating VNCs extended quite anteriorly (arrows in Fig. 2S). Finally, at 7 days of regeneration the new cephalic ganglia (Fig. 2T) and VNCs (Fig. 2U) below them showed a fully differentiated pattern.

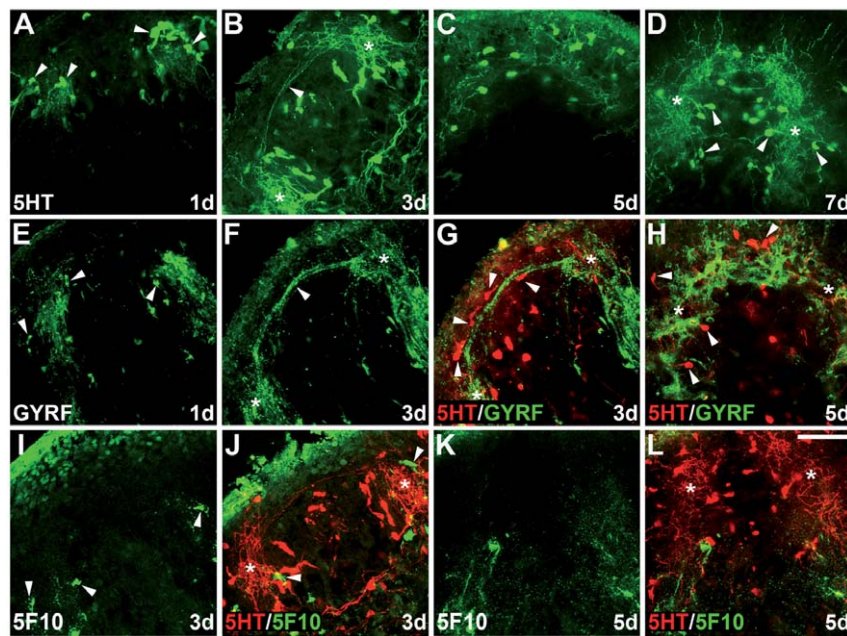


Fig. 3. Regeneration of the anterior Central Nervous System. (A-H) Anti-5-HT immunostaining. All samples correspond to trunk fragments regenerating a new head. **(A)** Arrowheads point to 5-HT-positive cells at the level of the truncated nervous system at day 1 of regeneration. **(B)** At day 3, a thin fibre (arrowhead) connects the developing cephalic ganglia (asterisks). **(C)** Five days of regeneration. **(D)** Seven-day regenerated cephalic ganglia with a central neuropil (asterisks) and peripheral cell bodies (arrowheads). **(E-H)** Anti-GYRFamide immunostaining. **(E)** Arrowheads point to GYRFamide-positive cells at the level of the truncated nervous system at day 1 of regeneration. **(F)** Developing cephalic ganglia (asterisks) connected by a thin commissure (arrowhead in F) at day 3 of regeneration. **(G)** Double immunostaining with anti-5-HT (in red). Arrowheads point to 5-HT-positive cells. Asterisks point to the cephalic ganglia. **(H)** Double immunostaining with anti-5-HT (in red) at day 5 of regeneration. Arrowheads indicate 5-HT-positive cells surrounding the central neuropil (asterisks). **(I-L)** Anti-5F10 (allatostatin) immunostaining. **(J,L)** Double immunostaining with anti-5-HT (in red). Arrowheads in (I,J) point to 5F10-positive cells. Asterisks in (J, L) mark the developing cephalic ganglia. In (A,B,F,G,I,J) anterior is to the top left; in (C,D,E,H,K,L) anterior is to the top. Scale bar, 100 μ m.

Dynamics of regeneration of cell populations labelled by anti-5-HT, anti-GYRFamide and anti-allatostatin in the anterior Central Nervous System

Recently, antibodies against GYRFamide, serotonin (5-HT) and allatostatin (5F10) were found to label distinct neuronal subpopulations in non-overlapping cells in the intact planarian CNS (Cebrià, 2008). Here, we addressed how these different cell types re-appeared during regeneration. At day 1 of regeneration, 5-HT-positive cells were seen at the level of the truncated nerve cords (arrowheads in Fig. 3A). After 3 days, bundles of axonal processes were observed at the level of the differentiating cephalic ganglia (asterisks in Fig. 3 B,G). A few thin processes also connected the left and right sides (arrowhead in Fig. 3B). Five days after amputation, 5-HT-positive cells and thin processes gave rise to the typical arch-shaped brain (Fig. 3 C,H). Finally, at day 7 of regeneration, the pattern of serotonergic neurons in the new cephalic ganglia (Fig. 3D) resembled the one in intact planarians, with most cell bodies (arrowheads in Fig. 3D) surrounding the central neuropil (asterisks in Fig. 3D).

At day 1 of regeneration, some GYRFamide-positive cells were also observed close to the amputation plane of the truncated VNCs (arrowheads in Fig. 3E). Three days after amputation, an anterior commissure (arrowhead in Fig. 3F) connected the two new cephalic ganglia (asterisks in Fig. 3F).

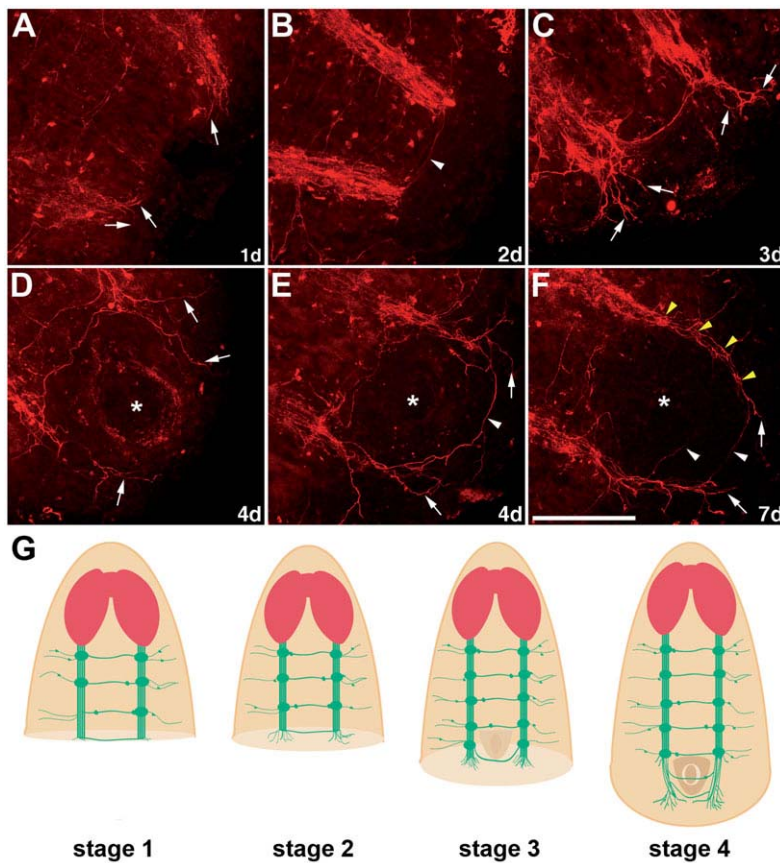


Fig. 4. Regeneration of the posterior Central Nervous System. (A-F) Anti-NPF immunostaining. All samples correspond to head fragments regenerating a new posterior region. (A) Arrows point to thin fibres sprouting from the amputated nerve cords; day 1 of regeneration. (B) Transverse commissure (arrowhead) connecting the two ventral nerve cords at day 2 of regeneration. (C) Arrows point to fibres sprouting posteriorly; 3 days of regeneration. (D) A new pharynx (asterisk) develops and long longitudinal fibres sprout from the nerve cords (arrows). (E) These long sprouts form transverse commissures (arrowhead) posterior to the regenerated pharynx (asterisk) and keep growing towards the tail end (arrows). (F) As regeneration proceeds, new transverse commissures (arrowheads) form posterior to the pharynx (asterisk). Arrows point to thin sprouts towards the tail end. Yellow arrowheads point to the differentiating new ganglia-like knots distributed along the regenerated ventral nerve cord. (G) Schematic model of the regeneration of the posterior central nervous system. Cephalic ganglia are represented in red and ventral nerve cords in green. Stage 1: 2 days of regeneration; stage 2: 3 days of regeneration; stage 3: 4 days of regeneration; stage 4: 7 days of regeneration. In all panels anterior is to the top left. Scale bar, 200 μ m.

5-HT-positive cells (arrowheads in Fig. 3G) were often seen along this anti-GYRFamide-labelled commissure (arrowhead in Fig. 3F). Finally, by day 5 the central neuropil, labelled with the anti-GYRFamide antibody, had already regenerated its normal spongy structure (asterisks in Fig. 3H). 5-HT-positive cells (arrowheads in Fig. 3H) were also detected around it.

Allatostatin-positive cells were stained with the antibody anti-5F10, which in intact planarians labels individual cells in the VNCs (Cebria 2008). During regeneration, the first cells detected with this marker appear relatively late, at day 3 after amputation (arrowheads in Fig. 3I), and become restricted to the most proximal part of the truncated VNC, as seen after double immunostaining with the anti-5-HT antibody (Fig. 3J,L).

Regeneration of the posterior nerve cords

After transverse amputation at the pre-pharyngeal level, the resulting head piece containing the original cephalic ganglia will regenerate the whole posterior body, including a new central pharynx. In order to study how the truncated nerve cords regenerate into the newly differentiated posterior regions we used the anti-NPF antibody (Fig. 4). At day 1 of regeneration, the nerve cords appeared truncated at the wound site, although fine processes sprouted from them (arrows in Fig. 4A). After 2 days of regeneration, a newly formed transverse commissure already connected the two VNCs (arrowhead in Fig. 4B). During the following 2 days, long axonal processes grow

posteriorly from the nerve cords (arrows in Fig. 4C,D). At this stage a pharynx rudiment (asterisk in Fig. 4D) appears at the boundary of the blastema and stump region. Around 4 days after amputation, fine processes connected the two nerve cords (arrowhead in Fig. 4E) posterior to the differentiating pharynx (asterisk in Fig. 4E). In addition, neural sprouts projected more posteriorly (arrows in Fig. 4E). Finally, at day 7 of regeneration, additional transverse commissures connected the nerve cords (arrowheads in Fig. 4F) posterior to the pharynx (asterisk in Fig. 4F) and fine processes kept growing towards the tail tip (arrows in Fig. 4F). At this stage, small ganglia-like knots were seen along the regenerated nerve cord (yellow arrowheads in Fig. 4F).

CNS regeneration in irradiated planarians

In order to determine how the CNS responds to amputation in the absence of neoblasts we analyzed neural regeneration in

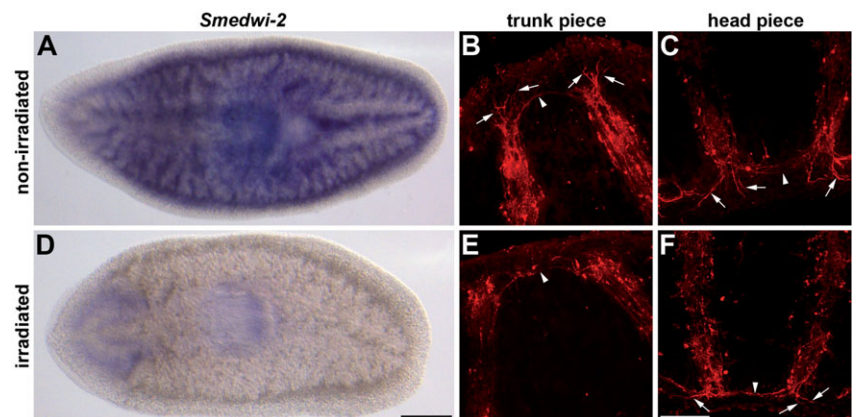


Fig. 5. Effects of irradiation on CNS regeneration (A,D). Whole mount in situ hybridizations for Smedwi-2 in non-irradiated (A) and irradiated (D) planarians. The signal in the neoblasts of the mesenchyme completely disappeared two days after irradiation (D). Anti-NPF immunostainings on non-irradiated (B,C) and irradiated (E,F) planarians at two days of regeneration. Irradiated head pieces regenerated normally (F). Irradiated trunk pieces (E) showed abnormal regeneration compared to controls (B). In (A,D) anterior to the left; in the other panels, anterior to the top. Scale bars, (A,D) 0.5 mm; (B,C,E,F) 100 μ m.

irradiated planarians. Whole-mount *in situ* hybridizations with the neoblast marker *Smedwi-2* (Reddien *et al.*, 2005) showed that two days after irradiation neoblasts had been already eliminated (Fig. 5 A,D). At that stage, the irradiated planarians were decapitated and allowed to regenerate for two days. Immunostainings with the anti-NPF antibody revealed that all irradiated head pieces ($n=5$) were able to regenerate their posterior nervous system. Thus, a transverse commissure connecting the two VNCs was evident (arrowhead in Fig. 5F). Moreover, fine processes sprouted from the truncated cords (arrows in Fig. 5F), resembling very much what happened in non-irradiated regenerating head pieces (Fig. 5C). On the other hand, in irradiated trunk pieces regenerating new anterior regions a different situation was observed compared to controls (Fig. 5 B,E). All non-irradiated planarians ($n=5$) showed a developing anterior commissure connecting the two halves of the bilateral CNS (arrowhead in Fig. 5B). Also, fine processes extended anteriorly from the truncated nerve cords (arrows in Fig. 5B). In contrast, in none of the irradiated trunk pieces ($n=5$) similar sprouts from the VNCs were observed (Fig. 5E). However, a fine commissure connecting both sides of the CNS was observed in 3 out of 5 samples (arrowhead in Fig. 5E).

Distinct neuronal subpopulations detected by specific gene expression

In addition to using different antibodies to characterize distinct neuronal subpopulations, we characterized two more neuronal cell types in *S. mediterranea* based on the expression of specific genes labelling dopaminergic and octopaminergic neurons (Fig. 6). Recently, these cell types were characterized in the planarian *D. japonica* through the identification of the *DjTH* (Nishimura *et al.*, 2007b) and *DjTBH* (Nishimura *et al.*, 2008a) genes, which encode tyrosine hydroxylase and tyramine β -hydroxylase, re-

spectively. Tyrosine hydroxylase is an enzyme required in the dopamine synthesis pathway, which is highly conserved in both vertebrate and invertebrate organisms. Tyramine β -hydroxylase is involved in the synthesis of octopamine, which is known to act as a neurohormone, neurotransmitter or neuromodulator in several invertebrates (Roeder, 1999).

After cloning the respective homologues *Smed-th* and *Smed-tbh* in *S. mediterranea*, their expression patterns were determined by whole-mount *in situ* hybridization. In intact planarians, *Smed-th* was observed in isolated cells within the cephalic ganglia and along the nerve cords (Fig. 6 A-D) as well as at the tip of the head (Fig. 6A) and in the pharynx (Fig. 6A,D). Fluorescent *in situ* hybridizations showed a small number of *Smed-th* positive cells distributed as two narrow lines of cells on the dorsal side of the cephalic ganglia (Fig. 6B). In contrast, a larger number of *Smed-th* cells were found throughout the ventral side of the brain (Fig. 6C). Very few *Smed-th*-expressing cells were detected in the VNCs (arrowheads in Fig. 6D). During anterior regeneration (Figs. 6 E-H), *Smed-th*-expressing cells were first detected within the blastema 2 days after amputation (Fig. 6E). At 3 days of regeneration, a large number of *Smed-th* cells were detected in the developing cephalic ganglia and the periphery of the head (Fig. 6F). Finally, at 7 days after amputation, when a new anterior region and cephalic ganglia have completely regenerated, the pattern of *Smed-th* (Figs. 6G-H) resembled that of an intact planarian.

Smed-tbh was also expressed in isolated cells throughout the CNS in intact planarians (Fig. 6I). However, unlike *Smed-th*, *Smed-tbh* was not expressed at the head tip, its expression within the pharynx was also reduced (Fig. 6I) and it was expressed in a larger number of cells along the VNC (arrows in Fig. 6 I,L). At the level of the cephalic ganglia, *Smed-tbh*-positive cell populations were found dorsally (Fig. 6J) and ventrally (Fig. 6K). Compared

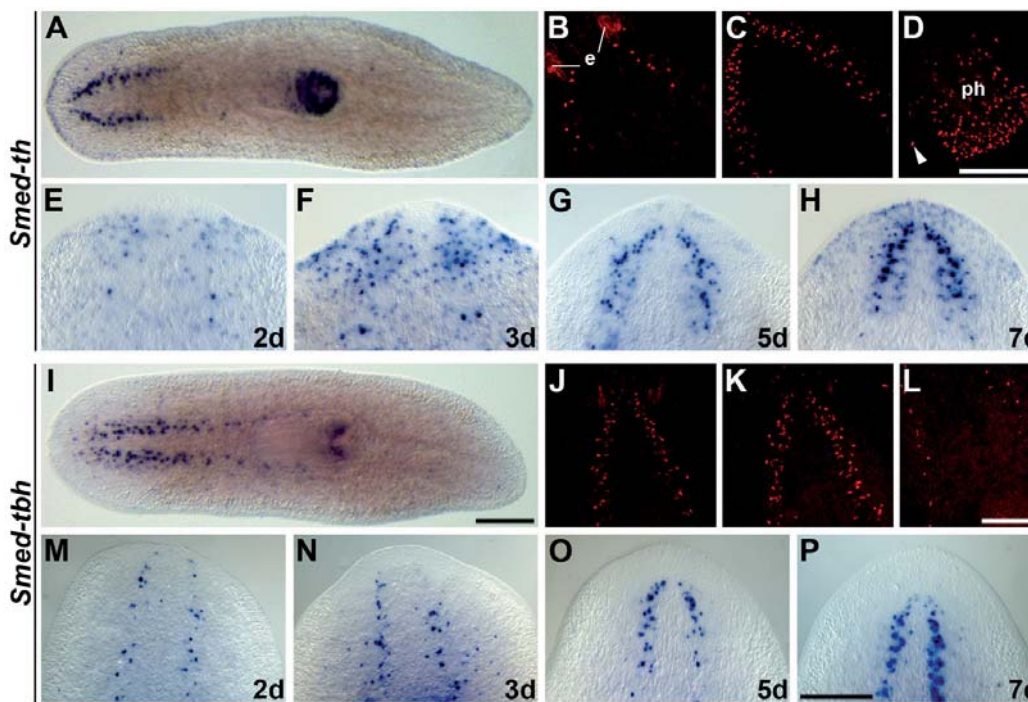


Fig. 6. Regeneration of dopaminergic and octopaminergic cell populations.

Whole-mount *in situ* hybridizations for *Smed-th* (A-H) and *Smed-tbh* (I-L). (A-D) *Smed-th* expression in intact animals. (B,C) Correspond to different confocal planes of the same sample, with (B) showing the dorsal side of the brain and (C) the ventral one. (D) Individual cells within the pharynx. Arrowheads point to cells along the ventral nerve cord. (E-H) Time-course of the expression pattern of *Smed-th* during anterior regeneration. (I-L) *Smed-tbh* expression in intact planarians. (J,K) Correspond to different confocal planes of the same sample, with (J) showing the dorsal side of the brain and (K) the ventral one. (L) Individual cells expressing *Smed-tbh* along the ventral nerve cord. (M-P) Time-course of the expression pattern of *Smed-tbh* during anterior regeneration. e, eyes; ph, pharynx. In (A, I) anterior is to the left;

in (B-D) anterior is to the top left; in the remaining panels, anterior is to the top. Days of regeneration are indicated in panels (E-H) and (M-P). GenBank accession number of *Smed-tbh* is JN400361. Scale bars, (A, I) 0.5 mm; (E-H, M-P) 400 μ m; (B-D) 200 μ m; (J-L) 200 μ m.

TABLE 1

**LIST OF CLASSICAL NEUROTRANSMITTER, NEUROPEPTIDE AND HORMONE RECEPTORS
CHARACTERIZED BY *IN SITU* HYBRIDIZATION**

ID number	Homologue	Reference	e-value
90_6802	Dopamine receptor type D2 (<i>Apis mellifera</i>)	NP_001011567.1	2e-27
90_9109	Serotonin receptor-like planarian receptor 4 (<i>Dugesia japonica</i>)	BAA22403.1	1e-172
90_24753	Peptide (allatostatin)-like receptor (<i>Schistosoma mansoni</i>)	XP_002572656.1	1e-29
v31.011509	FMRFamide receptor (<i>Culex quinquefasciatus</i>)	XP_001849293.1	1e-27
90_4293	PREDICTED: similar to opioid growth factor receptor (OGFr) (<i>Canis familiaris</i>)	XP_543089.2	3e-31
<i>Smed-crfr-1</i>	Corticotropin-releasing factor receptor 1 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	NP_01156587.1	4e-11
v31.025532	P2X receptor subunit (<i>S. mansoni</i>)	XP_002580774.1	3e-149
v31.003738	P2X receptor subunit (AJ703803) (<i>S. mansoni</i>)	XP_002581076.1	8e-104
v31.027621	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4b (<i>Danio rerio</i>)	NP_001119914.1	2e-59
v31.014493	P2X receptor (<i>Rhipicephalus microplus</i>)	AD064254.1	2e-69
90_9246	PREDICTED: neuromedin-B receptor-like (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)	XP_001947155.1	5e-09
90_6303	Similar to neuromedin B receptor (<i>Bos taurus</i>)	XP_589356.2	6e-25
90_28219	Parathyroid hormone 2 receptor	AAI62580.1	3e-11
90_976	Growth hormone-inducible transmembrane protein (<i>Osmerus mordax</i>)	AC008873.1	2e-51
90_29452	Neuropeptide FF receptor 2 isoform 3 (<i>Homo sapiens</i>)	NP_001138228.1	2e-09
F6AJXP02FL51R	Thyroid hormone receptor (<i>S. mansoni</i>)	XP_002573733.1	2e-23
90_21910	Thyroid hormone receptor interactor 11 (<i>M. musculus</i>)	AAI58099.1	1e-06
90_19836	Adiponectin receptor 2 (<i>Schistosoma japonicum</i>)	CAX69605.1	2e-10
90_4098	Growth hormone secretagogue receptor (<i>S. mansoni</i>)	XP_002569813.1	7e-36
90_11206	Thyrotropin-releasing hormone receptor 3 (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	BAI65850.1	7e-26
F6AJXP02F584O	Somatostatin receptor, putative (<i>Aedes aegypti</i>)	XP_001656764.1	9e-14
F6AJXP02G737D	Putative neuropeptide receptor NPR1 (<i>Girardia tigrina</i>)	AF329279.1	7e-41
90_6836	Peptide (allatostatin)-like receptor (<i>S. mansoni</i>)	XP_002572656.1	4e-97

ID numbers starting with 90_ or F6AJXP02 correspond to sequences from the Smed454 dataset (Abril *et al.*, 2010), ID numbers starting with v31. refer to sequences from the SmedGD dataset (Robb *et al.*, 2008), and *Smed-crfr-1* corresponds to a sequence directly cloned in this study.

to *Smed-th*-positive cells (Fig. 6A), *Smed-tbh*-expressing cells (Fig. 6I) appeared in more medial regions. Finally, during anterior regeneration, the first *Smed-tbh* cells within the blastema were detected by day 2 (Fig. 6M). In the following days, a neural network of octopamine-expressing cells became reorganized and a proper brain had differentiated 7 days after amputation (Fig. 6P).

Characterization of neurotransmitter, peptide and hormone receptors

Several studies have suggested that the nervous system may play an important role in regulating the regenerative process in planarians (reviewed in Cebrià, 2007), amphibians (Kumar *et al.*, 2007) and *Hydra* (Miljkovic-Licina *et al.*, 2007; Galliot *et al.*, 2009). In the case of planarians, Baguña *et al.*, (1989a) proposed a model in which neoblasts would express receptors for secreted ligands such as growth factors, neuropeptides and classical neurotransmitters that would modulate the behaviour of those neoblasts (Franquinet, 1979; Franquinet *et al.*, 1978; Bautz and Schilt, 1986; Kreshchenko, 2008). As a first step towards validating this model, we identified 288 annotated sequences in the Smed454 dataset with significant homology to neurotransmitter, neuropeptide and hormone receptors (Abril *et al.*, 2010). A subset of those genes (Table 1) was selected and their expression patterns were analyzed by *in situ* hybridization. As shown in Fig. 7, a variety of expression patterns was obtained. Some receptors, such as those for dopamine, serotonin, allatostatin, FMRFamide, opioid growth factor, somatostatin and neuropeptides were mainly expressed within the planarian CNS. Other genes showed a more ubiquitous expression that included the CNS and the mesenchyme. These included receptors for corticotropin-releasing factor, purinergic P2X, growth hormone-inducible transmembrane protein, neuropeptide

FF, thyroid hormone, thyroid hormone receptor interactor 11 and thyrotropin-releasing hormone. Finally, we also analyzed the expression of some of these genes during regeneration (Fig. 8). The expression of dopamine and serotonin receptors was evident within the blastema at 3 days of regeneration (arrowheads in Fig. 8E-F), whereas the neuropeptide FF receptor was first seen within the blastema at day 5 (arrowhead in Fig. 8K). A homologue of the thyroid hormone receptor interactor 11 was upregulated within the regenerative blastema from the first day of regeneration (arrowheads in Fig. 8 D,H). Future experiments should help elucidating if any of these receptors are expressed in neoblasts or committed precursor cells (Cebrià, 2007). Also, further RNAi-based functional analyses should help to elucidate the function of these and other receptor homologues during planarian regeneration.

Discussion

Understanding how planarians regenerate a complete, functional CNS in just few days may provide insights into how to improve the poor regenerative capabilities shown by most animals, including mammals, and help to develop strategies to treat neurodegenerative diseases (Gentile *et al.*, 2011). This understanding cannot be gained, however, without a clear topographical map of the distinct neuronal types within the planarian CNS. *S. mediterranea* is one of the main species used in planarian research. Recent studies have identified distinct neuronal populations based on immunohistochemistry with antibodies against some classical neurotransmitters and neuropeptides (Cebrià, 2008) and the characterization of the expression patterns of a large collection of genes coding for neuropeptides (Collins *et al.*, 2010) in *S. mediterranea*. In this study, some of these markers and new ones have been used to

characterize how the planarian CNS regenerates.

During anterior regeneration, planarians have to make a new brain at the same time that the truncated VNCs grow into the blastema, below the differentiating cephalic ganglia. Reuter *et al.*, (1996) studied the regeneration of the CNS in the planarian *Dugesia tigrina* using anti-5-HT and anti-NPF antibodies. They proposed that the regeneration of the new cephalic ganglia involves two main steps. First, processes from the truncated VNC sprout anteriorly

and bend contralaterally, crossing the midline and defining the position of the arch-shaped commissure that will connect the left and right cephalic ganglia (1-2 days of regeneration). In a second stage, new neurons would differentiate in front of this commissure and their fibres would fasciculate with the existing ones, allowing the growth of the neuropil (3-5 days of regeneration) (Reuter *et al.*, 1996). More recently, it has been proposed that the primordia of the new cephalic ganglia appear within the blastema at day 1 of regeneration before any axonal sprouting from the truncated VNCs is observed (Cebrià *et al.*, 2002a; Agata and Umesono, 2008). Later on, fibres sprouting from those VNCs would enter the blastema and somehow connect with the developing cephalic ganglia. However, in the absence of specific markers for the cell bodies and axonal fibres of individual neurons from either the brain or the VNC, it is difficult to understand the temporal and spatial dynamics of the reconstruction of these closely connected structures during regeneration.

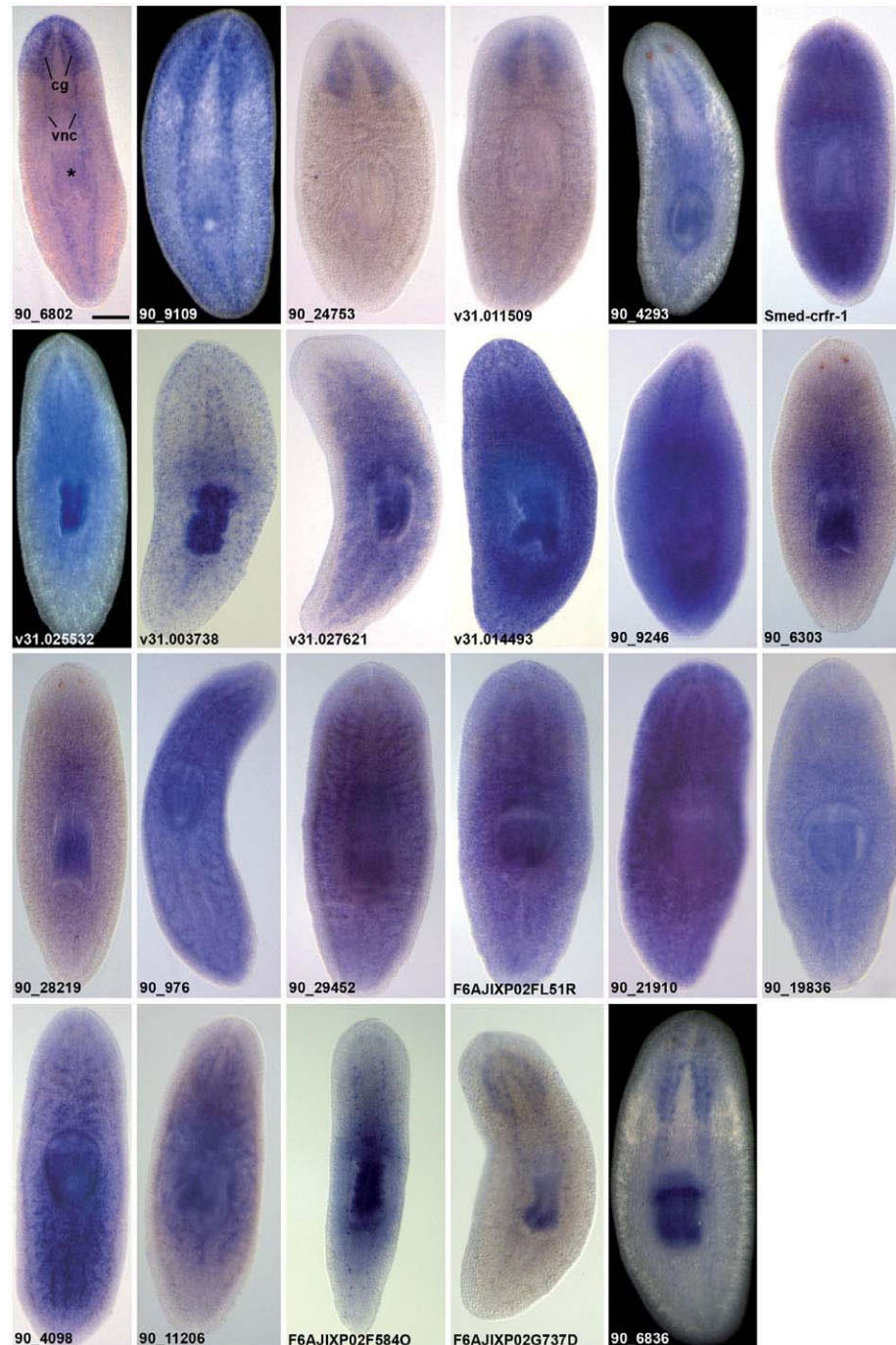


Fig. 7. Expression patterns of neurotransmitter, neuropeptide and hormone receptors in intact planarians. Whole-mount in situ hybridizations for the receptors described in Table 1. cg, cephalic ganglia; vnc, ventral nerve cords; *, pharynx. In all panels anterior is to the top. GenBank accession number for Smed-crfr-1 is JN400362. Scale bar, 0.5 mm.

Taking into account those previous models and the results obtained here, an updated proposal for planarian anterior CNS regeneration is summarized in Fig. 2V. At day 1 of regeneration, an accumulation of positive cells for 5-HT and GYRFamide is detected around the ends of the truncated VNC (Fig. 3 A,E). Positive cells for NPF and FMRFamide are observed at the same location by day 2-3 of regeneration (Fig. 2D; M). This agrees with previous observations in *D. tigrina* in which 5-HT-positive cells were also seen around the cut ends of the VNC (Reuter *et al.*, 1996). Around 2-3 days of regeneration, two types of commissures connecting the left and right CNS are observed. A relatively thick commissure is seen with antibodies against NPF (arrowhead in Fig. 2E), FMRFamide (arrowhead in Fig. 2O), 5-HT (arrowhead in Fig. 3B) and GYRFamide (arrowhead in Fig. 3F) in a more dorsal region, where the primordia of the cephalic ganglia are being formed. Because of its position and the fact that it apparently projects from the new brain primordia, this commissure would correspond to the anterior commissure connecting the left and right cephalic ganglia in adult planarians. Immunohistochemistry with the anti-NPF antibody also uncovers fine fibres connecting the left and right sides of the CNS. These fibres (arrows in Fig. 2 E,G,I) appear close to the brain commissure and seems to originate from sprouts from the VNCs that project beyond the developing cephalic ganglia and then bend contralaterally (arrows in Fig. 2 G,I). Interestingly, in the intact CNS of model species such as *S. mediterranea* and *D. japonica*, the VNCs below the brain never pass above it (Agata *et al.*, 1998; Cebrià 2008). However, during

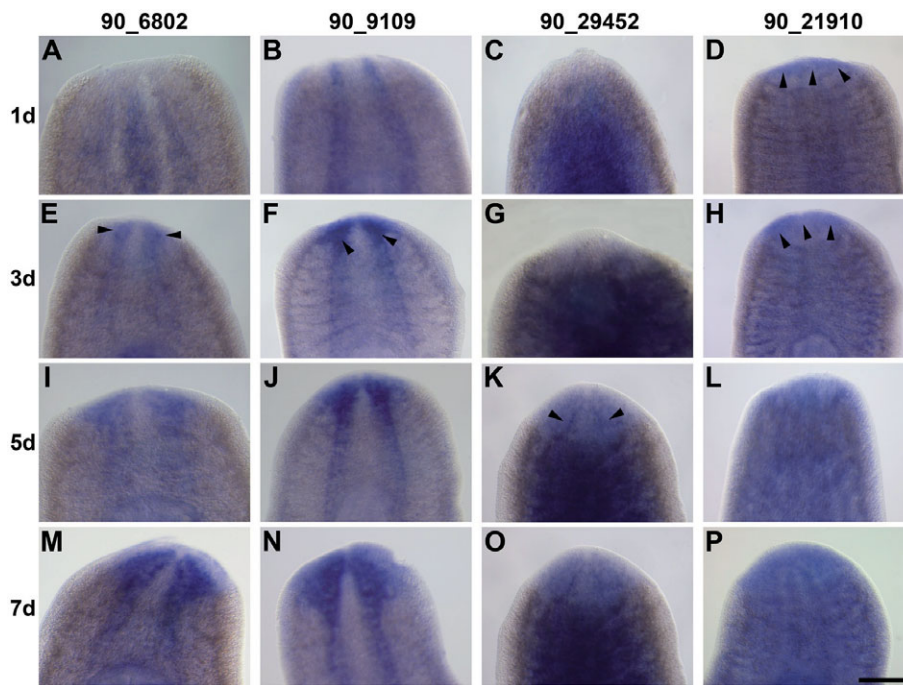


Fig. 8. Expression patterns of neurotransmitter, neuropeptide and hormone receptors during anterior regeneration. Time-course of the expression of dopamine receptor (90_6802), serotonin receptor (90_9109), neuropeptide FF receptor (90_29452) and thyroid hormone receptor interactor 11 (90_21910) during regeneration of a new head. Days of regeneration are indicated in the left column. In all panels, anterior is to the top. Scale bar, 400 μ m.

regeneration, NPF-positive fibres sprouting from the VNCs clearly reach regions more anterior to the developing cephalic ganglia. As regeneration proceeds, those transverse fibres appear to project along the anterior commissure (arrows in Fig. 2I). Further analyses should try to elucidate whether those transverse fibres from the VNCs have a role during regeneration, such as defining the borders of the brain commissure. Also, at day 3 of regeneration, 5-HT-expressing cells are seen all along the brain commissure labelled with the anti-GYRFamide antibody (arrowheads in Fig. 3G). This is in agreement with previous observations in *D. tigrina* (Reuter *et al.*, 1996). Taken together, even though previous studies suggested that the first neuropil stems from fibres emerging from the ends of the truncated nerve cords (Reuter *et al.*, 1996), the data presented here suggest that the anterior commissure would originate also from fibres sprouting from the brain primordia at very early stages of regeneration. However, definitive proof will not come until we are able to unambiguously distinguish between the fibres sprouting from cells of the VNCs and the cephalic ganglia.

The dynamics of CNS regeneration is clearer during posterior regeneration, as only the VNCs are involved. As summarized in Fig. 4G, at 2 days of regeneration, the truncated nerve cords become connected by a transverse commissure. Next, fibres sprouting from those cut ends of the nerve cords project posteriorly a long distance (arrows in Fig. 4 C-D) before sending out a new transverse commissure. This new commissure always appears posterior to the new pharynx (asterisks in Fig. 4 D-E) that develops at the border of the blastema/stump. From that stage, the nerve cords appear to grow from additional sprouts towards the posterior end (arrows in Fig. 4 E-F) and transverse commissures (arrowheads in Fig. 4 E-F) also develop in an anterior-to-posterior direction.

Remarkably, posterior regeneration of the VNCs is not blocked after irradiation (Fig. 5F), suggesting that either those early stages of neural regeneration depend on sprouts extending directly from the truncated axons of the VNC neural cells or they depend on the presence of post-mitotic neural precursors that can initiate

the regeneration process. Further studies using specific markers not yet available should help determining the origin of this regenerated posterior CNS. In contrast, anterior neural regeneration is clearly affected after irradiation. Thus, no sprouts from the truncated VNCs extend anteriorly and only in 3 out of 5 samples did some fine processes from a transverse commissure. This raises the question of why there are no sprouts extending from the amputated nerve cords. One possibility could be that different signals function during anterior and posterior regeneration to promote neural regeneration. Our results suggest that in the

case of anterior regeneration such signals would depend on the presence of neoblasts or their descendants.

In summary, we have characterized the regeneration of the planarian CNS at the cellular level through labelling with distinct specific antibodies. Also, we have described novel markers for specific neuronal populations in *S. mediterranea* that can be useful not only to study regeneration *per se* but also to characterize future RNAi phenotypes. The combined study of these neuronal factors and their receptors should help to better understand neural regeneration and to characterize the function of additional neurotransmitters, peptides and hormones during planarian regeneration.

Materials and Methods

Planarians and culture conditions

S. mediterranea from the clonal line BCN-10 were used for all experiments. Animals were maintained at 20°C in a 1:1 (v/v) mixture of distilled water and tap water treated with AquaSafe (TetraAqua). Planarians were fed with beef liver and starved for at least 1 week before experiments. For irradiation experiments planarians were irradiated at a dose of 100 Gy and amputated two days later to be sure that all the neoblasts had been eliminated.

Whole-mount immunohistochemistry

Depending on the primary antibody used, animals were fixed in two ways: for anti-5HT, anti-GYRFamide and anti-allatostatin (5F10) antibodies, animals were fixed with 4% paraformaldehyde as previously described (Cebrià, 2008), and for anti-neuropeptide F and FMRFamide, animals were killed in 5% NAC (N-acetyl cysteine) in PBS for 8 min at room temperature (RT) and fixed in 4% formalin in PBTx (PBS + 0.3% Triton X-100) for 30 min at RT (as described in Pearson *et al.*, 2009). After that, samples were treated in 50% MeOH in PBTx for 10 min at RT, 100% MeOH for 10 min at RT and stored at least 2 hours in MeOH at -20°C. Samples were then bleached and the protocol continued as described previously (Cebrià, 2008). Primary antibodies were used at the following dilutions: 5-HT (Sigma, ref. S5545), 1:1,000; GYRFamide (Johnston *et al.*, 1996), 1:1000; 5F10 (Developmental Studies Hybridoma Bank), 1:2; neuropeptide F (Maule *et*

al., 1992), 1:1000; and FMRFamide (DiaSorin, ref. 20091), 1:500. Alexa 488-conjugated goat anti-mouse and Alexa 568-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies (Molecular Probes) were used at a 1:400 and 1:1000 dilutions, respectively. Samples were mounted in SlowFade® Gold antifade reagent (Invitrogen). Confocal laser scanning microscopy was performed with Leica TCS-SPE and a Leica SP2 microscopes and then images were processed using Image J 1.43m.

Whole-mount in situ hybridization

Specific primers were used to amplify the genes used in this study from cDNA. Whole-mount *in situ* hybridizations were performed as previously described (Umesono *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 2007) using an Intavis InsituPro hybridization robot. For fluorescence *in situ* hybridization with *Smed-th* and *Smed-tbh* riboprobes, samples were developed as previously described (Cebrià *et al.*, 2007; Pearson *et al.*, 2009) using Tyramide Signal Amplification (Perkin Elmer) according to the manufacturer's instructions. All samples were observed through a Leica MZ16F stereomicroscope and images from representative organisms for each experiment were captured with a ProgRes®C3 camera (Jenoptik). Confocal laser scanning microscopy was performed with Leica SP2 and SPE microscopes.

Acknowledgements

We would like to thank Aaron C. Maule for the anti-NPF and anti-GYRFamide antibodies. Anti-5F10 (anti-allatostatin) monoclonal antibody was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa. We thank Iain Patten for advice on English style in a version of the manuscript. S.F. is supported by an FPI fellowship (MICINN, Spain). S.B. is supported by an APIF fellowship (University of Barcelona). F.C. is a Ramón y Cajal Researcher (MICINN, Spain). This work was supported by grants BFU2008-00710 (MICINN, Spain) and 2009SGR1018 (AGAUR, Generalitat de Catalunya) to F.C.

References

- ABRIL, J. F., CEBRIÀ, F., RODRIGUEZ-ESTEBAN, G., HORN, T., FRAGUAS, S., CALVO, B., BARTSCHERER, K. and SALO, E. (2010). Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea*. *BMC Genomics* 11: 731.
- AGATA, K., SOEJIMA, Y., KATO, K., KOBAYASHI, C., UMESONO, Y. and WATANABE, K. (1998). Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. *Zoolog Sci* 15: 433-440.
- AGATA, K. and UMESONO, Y. (2008). Brain regeneration from pluripotent stem cells in planarian. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 2071-2078.
- BAGUÑÀ, J., SALÓ, E. and AULADELL, C. (1989a). Regeneration and pattern formation in planarians. III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development* 107: 77-86.
- BAGUÑÀ, J., SALO, E. and ROMERO, R. (1989b). Effects of activators and antagonists of the neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians. *Int J Dev Biol* 33: 261-266.
- BAUTZ, A. and SCHILT, J. (1986). Somatostatin-like peptide and regeneration capacities in planarians. *Gen Comp Endocrinol* 64: 267-272.
- CEBRIÀ, F., NAKAZAWA, M., MINETA, K., IKEO, K., GOJOBORI, T. and AGATA, K. (2002a). Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev Growth Differ* 44: 135-146.
- CEBRIÀ, F., KUDOME, T., NAKAZAWA, M., MINETA, K., IKEO, K., GOJOBORI, T. and AGATA, K. (2002b). The expression of neural-specific genes reveals the structural and molecular complexity of the planarian central nervous system. *Mech Dev* 116: 199-204.
- CEBRIÀ, F. (2007). Regenerating the central nervous system: how easy for planarians! *Dev Genes Evol* 217: 733-748.
- CEBRIÀ, F., GUO, T., JOPEK, J. and NEWMARK, P. A. (2007). Regeneration and maintenance of the planarian midline is regulated by a slit orthologue. *Dev Biol* 307: 394-406.
- CEBRIÀ, F. (2008). Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: an immunocytochemical study. *Neurosci Res* 61: 375-384.
- CEBRIÀ, F. and NEWMARK, P. A. (2005). Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. *Development* 132: 3691-3703.
- CEBRIÀ, F. and NEWMARK, P. A. (2007). Morphogenesis defects are associated with abnormal nervous system regeneration following roboA RNAi in planarians. *Development* 134: 833-837.
- COLLINS, J. J., 3rd, HOU, X., ROMANOVA, E. V., LAMBRUS, B. G., MILLER, C. M., SABERI, A., SWEEDLER, J. V. and NEWMARK, P. A. (2010). Genome-wide analyses reveal a role for peptide hormones in planarian germline development. *PLoS Biol* 8: e1000509.
- FRAGUAS, S., BARBERAN, S. and CEBRIÀ, F. (2011). EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Dev Biol* 354: 87-101.
- FRANQUINET, R., LE MOIGNE, A. and HANOUNE, J. (1978). The adenylate cyclase system of planaria *Polycelis tenuis*: activation by serotonin and guanine nucleotides. *Biochim Biophys Acta* 539: 88-97.
- FRANQUINET, R. (1979). The role of serotonin and catecholamines in the regeneration of the planaria *Polycelis tenuis*. *J Embryol Exp Morphol* 51: 85-95.
- FRANQUINET, R. and LE MOIGNE, A. (1979). Relation entre les variations des taux de sérotonine et d'AMP cyclique au cours de la régénération d'une planaire. *Biol. Cell* 34: 71-76.
- FUSAOKA, E., INOUE, T., MINETA, K., AGATA, K. and TAKEUCHI, K. (2006). Structure and function of primitive immunoglobulin superfamily neural cell adhesion molecules: a lesson from studies on planarian. *Genes to Cells* 11: 541-555.
- GALLIOT, B., QUIQUAND, M., GHILA, L., de ROSA, R., MILJKOVIC-LICINA, M. and CHERA, S. (2009). Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Dev Biol* 332: 2-24.
- GENTILE, L., CEBRIÀ, F. and BARTSCHERER, K. (2011). The planarian flatworm: an *in vivo* model for stem cell biology and nervous system regeneration. *Dis Model Mech* 4: 12-19.
- HIGUCHI, S., HAYASHI, T., TARUI, H., NISHIMURA, O., NISHIMURA, K., SHIBATA, N., SAKAMOTO, H. and AGATA, K. (2008). Expression and functional analysis of musashi-like genes in planarian CNS regeneration. *Mech Dev* 125: 631-645.
- INOUE, T., HAYASHI, T., TAKECHI, K. and AGATA, K. (2007). Clathrin-mediated endocytic signals are required for the regeneration of, as well as homeostasis in, the planarian CNS. *Development* 134: 1679-1689.
- JOHNSTON, R. N., SHAW, C., HALTON, D. W., VERHAERT, P., BLAIR, K. L., BRENNAN, G. P., PRICE, D. A. and ANDERSON, P. A. V. (1996). Isolation, localization and bioactivity of the FMRFamide-related neuropeptide GYRFamide and YIRFamide from the marine turbellarian *Bdelloura candida*. *J Neurochem* 67: 814-821.
- KOBAYASHI, C., SAITO, Y., OGAWA, K. and AGATA, K. (2007). Wnt signaling is required for antero-posterior patterning of the planarian brain. *Dev Biol* 306: 714-724.
- KRESHCHENKO, N. D. (2008). Functions of flatworm neuropeptides NPF, GYIRF and FMRF in course of pharyngeal regeneration of anterior body fragments of planarian, *Girardia tigrina*. *Acta Biol Hung* 59(Suppl): 199-207.
- KRESHCHENKO, N. D., SEDELNIKOV, Z., SHEIMAN, I. M., REUTER, M., MAULE, A. G., GUSTAFSSON, M. K. (2008). Effects of neuropeptide F on regeneration in *Girardia tigrina* (Platyhelminthes). *Cell Tissue Res* 331: 739-750.
- KUMAR, A., GODWIN, J. W., GATES, P. B., GARZA-GARCIA, A. A. and BROCKES, J. P. (2007). Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* 318: 772-777.
- MAULE, A. G., SHAW, C., HALTON, D. W., BRENNAN, G. P., JOHNSTON, C. F. and MOORE, S. (1992). Neuropeptide F (*Moniezia expansa*): localization and characterization using specific antisera. *Parasitology* 105: 505-512.
- MILJKOVIC-LICINA, M., CHERA, S., GHILA, L., GALLIOT, B. (2007) Head regeneration in wild-type hydra requires de novo neurogenesis. *Development* 134: 1191-1201.
- MINETA, K., NAKAZAWA, M., CEBRIÀ, F., IKEO, K., AGATA, K. and GOJOBORI, T. (2003). Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by comparative genomics analysis of planarian ESTs. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7666-7671.
- MOLINA, M. D., SALÓ, E. and CEBRIÀ, F. (2007). The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating planarians. *Dev Biol* 311: 79-94.
- NISHIMURA, K., KITAMURA, Y., INOUE, T., UMESONO, Y., YOSHIMOTO, K., TAKEUCHI, K., TANIGUCHI, T. and AGATA, K. (2007a). Identification and distribution of tryptophan hydroxylase (TPH)-positive neurons in the planarian *Dugesia japonica*. *Neurosci Res* 59: 101-106.
- NISHIMURA, K., KITAMURA, Y., INOUE, T., UMESONO, Y., SANO, S., YOSHIMOTO,

- K., INDEN, M., TAKATA, K., TANIGUCHI, T., SHIMOHAMA, S., AGATA, K. (2007b). Reconstruction of dopaminergic neural network and locomotion function in planarian regenerates. *Dev Neurobiol* 67: 1059-1078.
- NISHIMURA, K., KITAMURA, Y., INOUE, T., UMESONO, Y., YOSHIMOTO, K., TANIGUCHI, T. and AGATA, K. (2008a). Characterization of tyramine beta-hydroxylase in planarian *Dugesia japonica*: cloning and expression. *Neurochem Int* 53: 184-192.
- NISHIMURA, K., KITAMURA, Y., UMESONO, Y., TAKEUCHI, K., TAKATA, K., TANIGUCHI, T. and AGATA, K. (2008b). Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience* 153: 1103-1114.
- NISHIMURA, K., KITAMURA, Y., AGATA, K. (2008c). Molecular mechanism of brain regeneration and reconstruction of dopaminergic neural network in planarians. *Brain Nerve* 60: 307-317.
- OKAMOTO, K., TAKEUCHI, K. and AGATA, K. (2005). Neural projections in planarian brain revealed by fluorescent dye tracing. *Zoolog Sci* 22: 535-546.
- PEARSON, B.J., EISENHOFER, G.T., GURLEY, K.A., RINK, J.C., MILLER, D.E. and SÁNCHEZ-ALVARADO, A. (2009). Formaldehyde-based whole-mount in situ hybridization method for planarians. *Dev Dyn* 238: 443-450.
- ROEDER, T. (1999). Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol* 59: 533-561.
- REDDIEN, P.W., OVIEDO, N.J., JENNINGS, J.R., JENKIN, J.C. and SÁNCHEZ-ALVARADO, A. (2005). SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* 310: 1327-1330.
- REUTER, M., SHEIMAN, I.M., GUSTAFSSON, M.K.S., HALTON, D.W., MAULE, A.G., SHAW, C. (1996). Development of the nervous system in *Dugesia tigrina* during regeneration after fission and decapitation. *Invert. Reprod. Dev.* 29: 199-211.
- UMESONO, Y., WATANABE, K. and AGATA, K. (1997). A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev Growth Differ* 39: 723-727.
- UMESONO, Y., WATANABE, K. and AGATA, K. (1999). Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes. *Dev Genes Evol* 209: 31-39.
- WAGNER, D. E., WANG, I. E. and REDDIEN, P. W. (2011). Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* 332: 811-816.

Further Related Reading, published previously in the *Int. J. Dev. Biol.*

Diverse miRNA spatial expression patterns suggest important roles in homeostasis and regeneration in planarians

Cristina González-Estévez, Varvara Arseni, Roshana S. Thambyrajah, Daniel A. Felix and A. Aziz Aboobaker
Int. J. Dev. Biol. (2009) 53: 493-505

Planarian regeneration: achievements and future directions after 20 years of research

Emili Saló, Josep F. Abril, Teresa Adell, Francesc Cebriá, Kay Eckelt, Enrique Fernández-Taboada, Mette Handberg-Thorsager, Marta Iglesias, M Dolores Molina and Gustavo Rodríguez-Esteban
Int. J. Dev. Biol. (2009) 53: 1317-1327

Two msh/msx-related genes, *Djmsh1* and *Djmsh2*, contribute to the early blastema growth during planarian head regeneration

Linda Mannini, Paolo Deri, Vittorio Gremigni, Leonardo Rossi, Alessandra Salvetti and Renata Batistoni
Int. J. Dev. Biol. (2008) 52: 943-952

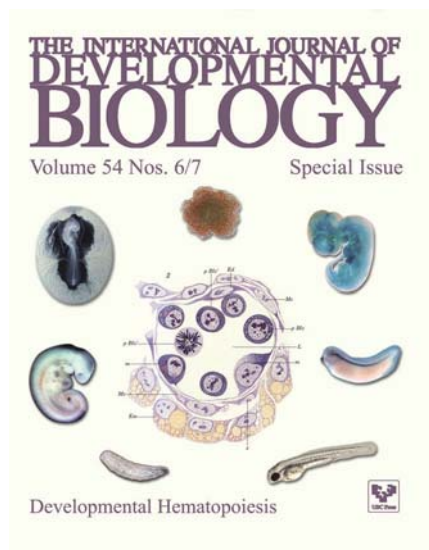
Expression of *DjXnp*, a novel member of the SNF2-like ATP-dependent chromatin remodelling genes, in intact and regenerating planarians

Leonardo Rossi, Paolo Deri, Ilaria Andreoli, Vittorio Gremigni, Alessandra Salvetti and Renata Batistoni
Int. J. Dev. Biol. (2003) 47: 293-298

Planarian pharynx regeneration revealed by the expression of myosin heavy chain-A

Tomoko Sakai, Kentaro Kato, Kenji Watanabe and Hidefumi Oori
Int. J. Dev. Biol. (2002) 46: 329-332

5 yr ISI Impact Factor (2010) = 2.961



Agraïments

"L'eternitat és molt avorrida,
sobretot al final"
Woody Allen

La millor manera d'acabar aquesta tesi és agraint a totes aquelles persones que han ajudat a que això sigui possible. La gent que em coneix sap que no sóc de les que li agrada expressar els seus sentiments obertament i que fins i tot puc ser una mica freda (per alguns, alias Susanna Thatcher), per això no m'excediré.

Cinc anys enrere, quan entrava al laboratori, no m'imaginava els canvis que suposaria fer la tesi, no només científicament parlant, sinó també a nivell personal, gràcies a tota la gent que he anat coneixent al llarg d'aquests anys. M'emporto molts bons records, viatges i moments que no oblidaré mai. Per mi, i sempre ho he dit, sou molt més que companys de feina, sou les persones amb les quals passo més hores del dia i heu passat a ser uns dels meus millors amics, que espero poder mantenir tot i deixar algun dia les planàries. Aquest últim any ha sigut un any de canvis, un final d'una etapa important i sé que sense la Sara, la Maria, la Bea o el Sisco al meu costat no hagués estat el mateix. Tot i no tenir-vos tan a prop, el suport rebut pràcticament a diari via e-mail del Chema o el Champi, o els missatges de la Marta, la Loli i la Noe en els moments de més nervis per animar-me, m'han ajudat més del que us penseu. I òbviament, el dia a dia amb tota la gent del meu grup, dels Emilis, dels Jordis i dels Rafas. Heu creat durant aquests cinc anys un ambient al lab que sé que serà impossible de trobar en qualsevol altre laboratori.

A la Mariona i al Jordi (i a la "Beleeeen"), que han estat al meu costat des del primer dia de la carrera i encara ara, amb la Mariona a Suïssa i el Jordi aquests últims mesos perdut per la Índia i les muntanyes del Nepal. No hi ha distàncies que no puguin superar els nostres whatsapp, simplement per posar-nos al dia o riure una estona tontament amb APMismes o entrant amb bucle traduint refranys catalans a l'anglès ("one day is one day", "the house through the window",...). Ja sabeu que us estimo però no vull momento soap, la iron lady no plora.

A la meua família i germans, sense ells no estaria aquí. M'han demostrat el seu suport amb cada una de les meves decisions, fins al punt de plantar préssecs transgènics a casa o venir al laboratori per fer-me una visita i conèixer (i tallar) les planàries. I també a tot el clan Vall-llovera, els que considero com la meua família.

El que li he d'agrar al Gerard, i no només pel que ha fet aquests mesos llegint-se la tesi sencera, passant el corrector Vall-llovera (això no existeix en català! Posa punts! No entenc el que vols dir...), no cabria en aquest full, però per això ja tindrà els vots d'aquí uns mesets... He tingut la sort de tenir-te al meu costat en els moments més importants de la meua vida, sobretot aquest últim any de canvis, amb el final d'una etapa meua, l'inici d'una per part teua i el pas que farem d'aquí poc els dos, faran que el 2014 ens quedi marcat per sempre.

Per últim, òbviament tota aquesta feina feta no hagués estat possible sense el Francesc. Des del primer dia m'ha ajudat incondicionalment i el seu suport ha fet que no només aprengui moltíssim, sinó que gaudeixi amb el meu projecte tots aquests anys.

