

Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

**CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL D'ELEMENTS
CONSERVATS DE LA VIA WNT EN LA
REGENERACIÓ CEFÀLICA DE PLANÀRIES**

Maria Marsal Terés
Barcelona, 2005

Memòria presentada per **Maria Marsal Terés** per optar al grau de **Doctor en Biologia**

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció del doctor Emili Saló i Boix al Departament de Genètica, UB, dins del Programa de Genètica, bienni 2000-2002

El director,

L'autora,

Dr.Emili Saló i Boix

Maria Marsal Terés

Barcelona, febrer de 2005

**Als meus pares
A la Glòria**

Bé, doncs finalment hem arribat a aquest punt. Sabia que quan arribaria als agraïments de la tesi voldria dir que això estava tocant al seu final. La primera sensació que tinc doncs és la d'alegria i satisfacció perquè, millor o pitjor, ja la tenim escrita. I tothom diu que els agraïments és una de les parts més difícils... Sempre amb por de deixar-te algú, de no acabar d'expressar ben bé el que penses...Per això, d'entrada, llenço un GRÀCIES ben general, perquè això ho resumeix tot i perquè les persones que d'una o d'altra forma han estat al meu costat durant aquests anys en el fons ja ho saben.

En primer lloc, a l'Emili, per haver confiat en mi i per recolzar-me en tot moment. Hem patit, però ho hem aconseguit! Gràcies per transmetre'm la teva constància i el teu amor a la ciència. Ja no només a nivell de feina, sinó a nivell personal, ets el millor jefe que podia tenir. I a tots els seus nens, els actuals i els antics: a la Mette, dins i fora del Departament, per la calma i paciència que m'ha transmès i per saber escoltar-me. A la Cris amb qui hem recorregut plegades tota la trajectòria des de que vam començar (aquells estius fent *in situs...*), et trobaré a faltar. Al Kike, per estar sempre, sempre al meu costat, siguin quines siguin les circumstàncies. Al Roger, el melenut del grup, gràcies pels teus cants i per la teva ajuda especialment en el camp de la Informàtica on encara continuo sent una petarda...A Javi, sabes que te he echado mucho de menos estos últimos meses? A Loli porque estuviste justo allí en los días peores y porque tú vales mucho, gracias por tu apoyo y tus ideas. A tots els guiris que han entrat i sortit, tots ens han deixat una miqueta del seu país i d'ells mateixos, el Tostada, la Martina, la Karina, la Ulla...Thanks to all of you. Specially to Coll, un soplo de aire fresco, sé que pronto volverás y comeremos churros con chocolate, iremos al cine y me enseñarás a hacer Breakdance. Thanks to share with me nice moments. Gracias a Chris alemana, con tu alegría eres capaz de cambiar las cosas! Thanks to Felix as well, nice to have you with us. I, és clar, Eva, de tu no me n'oblido (Liebe ohne ende..., jo també)! Ni dels que ja no recordo tant perquè quasi bé ja no vam coincidir...el Jordi Tauler, el Jose... gràcies però pel precedent de la feina feta al nostre grup. I de tu, David, podria parlar de tu ara, amb els planariòlegs, o amb els de Rocafort family, o amb aquell tipus d'amics que només es compta amb una sola mà (te n'adones que hem compartit i compartim tantes facetes diferents que et podria esmentar i fer-te una dedicatòria a tot arreu? Ja hi tornaré més avall).

Continuem amb el Departament... els altres planariòlegs, la Juani, qué te voy a contar, tantas horas compartidas codo a codo escribiendo las dos tesis en paralelo...Ánimo, recuerda que esto hay que celebrarlo juntas! al Miquel capullot, per la teva companyia

aquests matins últims ben d'hora al lab i el teu recolzament encara que jo mossegués...Al Diesel por compartir charlas y preocupaciones, al Albertito i el Sisco i al Rafa, el jefe de tots ells, pel teu bon caràcter i per tenir sempre una paraula amable. I els alterEpi: l'Anna, quantes coses compartides fora i dins del lab...!! als més carinyosos, el Josepet i la Senda, perquè mai deixem de fer excursions, d'anar al Razz i de fer soparillos...que amb vosaltres es pot fer tot! (i també a tu Hugo, fa poquet que ens coneixem però "we don't play guitar!"; y a Nacho también, llegará el día que no me rinda i continúe de fiesta como antes...!!), a l'Èlia (ànim et falta poquet!) i als més nous, el Salvatore, el Champi i el Ferran, i al Jordi, el seu jefe. Als mosqueros: al Flor i la Montse, a les súper-nenes, especialment a la Marta i la Cris, per les xerrades i els consells, a la Mire, la Isabel, l'Astrid. Al Manel, gràcies per deixar-me robar-te anticossos i la lupa a estonetes, a l'Adrià, l'olotí més maco que he conegut, sempre tens un somriure a la cara. I a tu, Sergi, sempre serem bons amics (ja portem 8-9? anys!).

Al Pere, perquè tot i que no vaig aconseguir clonar la β -catenina de planàries, vaig passar bones estones amb tu fent experiments, gràcies pels consells; gràcies també als seus estudiants: al Lasse i la Irene. Al Jaume pels consells per la tesi i pels teus seminaris que m'agraden. Als altres titis de mosques: el Lluís, el Francesc (gràcies pels ànims) i la Marta. A l'altra Marta de fil-mol i als seus nens, la Mercè i la Martona, però especialment a en Paps (si em quedessin forces i espai escriuria tota una pàgina dedicada a tu, per tot el que m'has ajudat amb els arbres i alineaments, no t'ho pots ni imaginar; però també pels consells i les xerrades, ens devem un cafè, per cert!). A tots els titis de dalt, sobretot a la Neus, per aquelles estones compartides al bus entre d'altres, a la Gemma, al Ricard i a la Lluïsa, a la Roser, i a tots els seus nens: la Laura Godoy (mai oblidaré aquella nit, encara durant la carrera, quan estudiàvem entre crispeta i crispeta!) i el Jordi Domènech, la Laura Tio, la Mariona, la Roser, el Jon, la Diana, l'Anna Bosch (vam començar al cole i encara continuem plegades, i per molts anys...!!!) l'Esther i el Miquel (ho havia de dir: perdona per la meva insistència en segons quins temes musicals però espero que continuem compartint cada dia més coses!); a l'Anna Díaz, pels cafès acompanyats de tantes cosetes que ens expliquem, al Raül (llàstima que no compartíssim laboratori per disfrutar de la música que posaríem plegats, que sé que també t'agrada tant!), al Víctor pollito, perquè també em fas riure molt. A l'Olga, què guai que tornis a ser al Departament, i a als que d'una manera o una altra em van ajudar quan jo començava, la Sara, la Rebe (visca la Canonja!), el Christian i l'Eva Paloma. Als nostres colgues d'Evo, a tots els titis i tots els doctorands, gràcies

sobretot a l'Úrsula por hacerme más fáciles las prácticas de Ove y por tu alegría, i también gracias a ti, Michael. Un gracias muy especial a Mari, porque sin ti este departamento no funcionaría, y también por saber escucharme y darme ánimos en momentos de bajón. I també a les secres, l'Àfrica, la Roser i la Rosa per la vostra eficiència i ajuda, sobretot al final de la tesi.

A tots els membres del tribunal de la meva tesi, gràcies per llegir-vos-la i acceptar ser membres del tribunal. Thanks to all the people I met in Darmstadt, specially to Thomas (I hope I can join you in Heidelberg for a post-doc!), Uli; and also thanks to Bert.

I fora del lab....comencem!: els meus amics de la carrera a qui encara continuo veient i espero que per molts anys, sou genials tots vosaltres: la Carmen, la Vicky, la Susi, el Sergio, la Cris, l'Uri, la Maite, la Mar (i a les parelles!: la Violeta, (Marge Simpson!), el Miquel, el Manel, el Paco, el Ramon).

A mis amigos de Llívia, sobretodo a ti, Saso.

Y bueno, está claro, a mi colombiano preferido, Héctor, a Eva, Víctor, Romina, Anna y al Banty (algún día sé que iré a la India con vosotros), para que podamos seguir haciendo calçotades en casa la iaia Tomàs i tantes altres cosetes. A l'Albert, trobaré a faltar aquells dinarillos als Menjadors que es convertien en moments únics i que trenquen la monotonía del día. A la Carlo i l'Uri. Al madrileño más majó, Antonio. I a l'Olgüeta, que Bristol té una joia amb tu allà.

Al Marc pifo, merci per aquestes estonetes dels últims dimecres que em van tan bé.

A les nenes, la Marta (i el Sebas), la Silvia (i l'Adri), la Mireia, la Pati (y Bruno!), perquè no sé què faria sense les confidències i les rises de cada setmaneta. Y claro, a mi cacereña favorita, Sandra. También a los Txetxus.

A la Laia, tot i que aquest any no ha pogut ser, continuarem celebrant aquells memorables 24 de Desembre! Gràcies per saber que estàs sempre a prop.

Al Joan pels cines i les estones que passo tan a gust al teu costat.

A ti, Mónica, por ser como eres, porque ahora no puedo imaginarme mi día a día sin ti cerca; a la Gemma, (amb el seu Siscents, és clar) la més guapi i espavilada de totes, gràcies per teva alegría.

A toda mi gente de Bilbao, donde tengo un pedazo de mi corazón, especialmente a Mikelats y Maitena, y por supuesto a ti, Asier. Os echo de menos. Maite zaitud a los tres.

I a tu Laureta, perquè continuem compartint pis per molt de temps més; gràcies per la teva paciència i bon caràcter i perquè contrarrestes la meva hiperactivitat i em dones

tranquil·litat; i a la Titolina (Berta) l'altra súper-nena de Rocafort, per estar sempre aquí, molt a prop, escoltant-me i compartint tantes i tantes hores; gràcies per la teva generositat i complicitat. Us estimo molt a les dues! I perdoneu pel meu estrés dels últims mesos...

A Fer, el mejicano-catalán que más quiero, la próxima vez me voy a Méjico contigo...I bé, está clar, la millor cosa d'haver començat a fer la tesi al Departament de Genètica és conèixe't a tu, David, perquè en moltes coses és un abans i un després. Et dono les gràcies per tot el que tenim. Crec que entre tu i jo sobren les paraules i que ja saps tot el que penso i sento.

Entre tu i jo, Núria, també sobren les paraules. Ens queda molt per endavant i em posa contenta saber que ens tindrem l'una a l'altra sempre.

I si tot això que ara acabo ha estat possible ha sigut gràcies al recolzament incondicional de la meva família, dels que hi són i dels que fa poc que ens han deixat: Iaia i tiu Cinto, sé que estaríeu tan orgullosos de mi que això sol em fa feliç. Tots pensem en vosaltres i espero que aquesta tesi pugui ser un motiu d'alegria en aquesta època difícil que passem. A la tia Tere, ens queden moltes i moltes coses per fer tots junts (París ens espera!)! ets la millor tia que mai haguéssim pogut tenir la Glòria i jo...A la Montse dedico també especialment aquesta tesi pels ànims donats quan la feia i pels ànims que et voldria donar jo a tu. Als avis, que són un exemple de bondat i senzillesa, també se la dedico especilament. A l'Elena, el tiu Joan (ara que he acabat vindré a la Masia!), la Mati i el tiu Josep Maria.

I, com no, a la Glòria i als meus pares, que són les persones amb qui sé que sempre podré compartir TOTES les meves penes i alegries. Gràcies per donar-m'ho tot dia rera dia.

TAULA DE CONTINGUTS

INTRODUCCIÓ.....	1
1. Comunicació intercel.lular. Vies de senyalització. La via Wnt.....	1
1.1 Comunicació intercel.lular. Vies de senyalització.....	1
1.2 La via Wnt.....	5
1.2.1 Història i filogènia.....	5
1.2.2 Característiques estructurals de les proteïnes Wnt.....	12
1.2.3 Secreció, transport i recepció dels lligands Wnt.....	14
1.2.4 Vies de transducció de la senyal Wnt.....	18
1.2.5 Via o xarxa?.....	22
1.2.6 La via canònica Wnt/ β -catenina en més detall.....	24
1.2.7 Funcions diverses sota el control de la senyalització Wnt.....	27
1.2.8 Subfamília Wnt-5 a diferents organismes.....	32
1.2.9 La via Wnt i el càncer i altres malalties humanes.....	34
2. La planària com organisme model.....	37
2.1 L'organisme.....	37
2.1.1 Posició filogenètica i taxonomia dels Plathelminths.....	37
2.1.2 Morfologia i anatomia interna.....	39
2.2 La regeneració de les planàries. Model epimòrfic-morfalàctic.....	41
2.3 El sistema nerviós de la planària.....	46
2.4 Regeneració del sistema nerviós de la planària.....	49
OBJECTIUS.....	53
MATERIALS I MÈTODES.....	55
1. Material biològic.....	55
1.1 Captura i manteniment en el laboratori.....	55
2. Obtenció d'àcids nucleics.....	56

2.1 Aïllament de RNA Total amb el reactiu TRIZOL [®] Reagent (Life Technologies).....	56
2.2 Síntesi de cDNA utilitzant l'enzim SuperScript [™] III RNase H- Reverse Transcriptase.....	57
3. Amplificació de DNAs per PCR.....	58
3.1 PCRs amb oligonucleòtids degenerats i específics.....	58
3.2 RACE PCR.....	60
4. Hibridació <i>in situ whole-mount</i>	63
4.1 L'objectiu d'una hibridació <i>in situ whole- mount</i>	63
Preparació de sondes de RNA marcades amb digoxigenina per hibridacions <i>in situ</i>	63
4.3 Protocol d'hibridació <i>in situ whole-mount</i>	67
5. RNA d'interferència (RNAi).....	69
5.1 RNAi mitjançant injecció.....	69
5.1.1 Síntesi de la doble cadena de RNA pel mecanisme de RNAi per injecció.....	69
5.1.2 Microinjecció.....	71
5.2 RNAi mitjançant producció de menjar artificial. Bactèries productores de dsRNA.....	72
5.3 Anàlisi per RT-PCR.....	77
5.3.1 Condicions per test RT-PCR després de la injecció de dsRNA <i>Gtwnt-5</i> i de la ingestió de bactèries productores de dsRNA <i>Gtwnt-5</i>	78
5.3.2 Condicions per test RT-PCR després de la injecció de dsRNA <i>gsk-3</i> i de la ingestió de bactèries productores de dsRNA <i>gsk-3</i>	78
5.3.3 Condicions per test RT-PCR d' <i>engrailed</i>	79
6. Immunofluorescència indirecta.....	80
6.1 Protocol d'immunotincions.....	80

6.2 Tinció DAPI.....	81
7. Comptatge de mitosis.....	82
7.1 Tractament amb colchicina.....	82
7.2 Tinció orceïna acètica.....	82
8. Captació d'imatges.....	83
8.1 Lupa esteoroscòpica i microscopi òptic.....	83
8.2 Lupa de fluorescència.....	83
8.3 Microscopi confocal.....	83
9. Suport informàtic.....	83
10. Esquemes oligonucleòtids emprats.....	85
RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	89
1. Aïllament i caracterització de l'expressió de diversos elements de la via Wnt a planària.....	91
1.1 GtWnt-5, primer Wnt trobat a Plathelminths.....	91
1.1.1 <i>Gtwnt-5 a member of the wnt family expressed in a subpopulation of the nervous system of the planarian Girardia tigrina</i>	93
1.2 La β catenina, / α Importina de <i>G.tigrina</i>	101
1.3 GSK-3, el regulador negatiu de la via.....	111
1.4 Els factors de transcripció associats: família TCF/LEF.....	124
2. Estudi de fenotip per manca de funció de <i>Gtwnt-5</i> i <i>Gtgsk-3</i>	129
2.1 Efectes de la inhibició de <i>Gtwnt-5</i>	129
2.1.1 Resultats pel mètode d'injecció i pel mètode d'ingesta de bacteries productores de dsRNA <i>Gtwnt-5</i> . Anàlisi de resultats per RT-PCR. Descripció dels fenotips obtinguts.....	129
2.1.2 Anàlisi de resultats amb hibridacions <i>in situ</i> i immunodeteccions. Marcadors neurals. Estudi de comportament.....	134
2.1.3 Bases i limitacions de la tècnica del RNAi (RNA <i>interference</i>).....	141
2.1.4 Com explicar l'absència de fenotip quan inhibim <i>Gtwnt-5</i>	144
2.2 Efectes de la inhibició de <i>Gtgsk-3</i>	146

2.2.1 Resultats pel mètode d'injecció i pel mètode d'ingesta de bactèries productores de dsRNAsk-3. Anàlisi de resultats per RT-PCR.	
Descripció dels fenotips obtinguts.....	146
2.2.2 Tractament amb inhibidors de la GSK-3. Descripció dels fenotips obtinguts.....	150
2.2.3 Anàlisi de resultats amb immunodeteccions contra el marcador neural FMRF-amida	159
2.2.4 Anàlisi mitosis amb tractament amb colchicina i tinció amb orceïna acètica	162
2.2.5 Discussió sobre el paper de la GSK-3 en la diversitat dels fenotips obtinguts.....	164
3. Conservació i evolució de les vies de senyalització a l'escala filogenètica.	
Via Wnt a planària.....	175
3.1 Conservació i evolució dels sistemes de senyalització a l'escala filogenètica.....	175
3.2 Nombre de gens i vies de senyalització Wnt a la planària.	
Via canònica o no canònica? Interaccions entre <i>Gtwnt-5</i> , <i>gsk-3</i> i <i>engrailed</i> de planària.....	180
CONCLUSIONS.....	187
PERSPECTIVES.....	193
BIBLIOGRAFIA.....	195

1.COMUNICACIÓ INTERCEL.LULAR.VIES DE SENYALITZACIÓ. LA VIA WNT

1.1 Comunicació intercel.lular. Vies de senyalització

Al llarg del desenvolupament s'originen múltiples respostes, però la gran majoria d'esdeveniments de senyalització i comunicació que acaben donant lloc a dites respostes biològiques impliquen inicialment només a un grup reduït de molècules. Una de les troballes més sorprenents sobre la senyalització fou precisament el fet que existeixen poques vies i que s'utilitzen repetidament al llarg del desenvolupament dels individus i de l'evolució dels metazous (Pires-da Silva i Sommer, 2003). Es parla de set grans vies de senyalització cèl.lular-cèl.lular que regeixen i són responsables de la major part del desenvolupament d'un organisme: les molècules de membrana Notch-Delta, els *transforming growth factors-β* (TGF- β), els Hedgehog (Hh), la via dels RTK (*receptor tyrosine kinase*), la via de *Janus kinase*(JAK)/*signal transducer and activator of transcription*(STAT), els mecanismes que impliquen els receptors d'hormones nuclears i els Wnts. Però segons alguns autors (Gerhart, 1999) la llista es fa més llarga: es consideren 17 vies de senyalització; cinc d'elles són utilitzades repetidament en el desenvolupament primerenc de metazous evolucionats com els vertebrats, els artròpodes o els nemàtodes; cinc més són emprades repetidament en fases més avançades del desenvolupament, com l'organogènesi i la citodiferenciació; i les set restants s'utilitzen quasi exclusivament en el funcionament fisiològic del fetus, juvenil i adult:

<p><i>Early development and later</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1.Wnt pathway 2.Receptor serine/threonine kinase (TGFβ) pathway 3.Hedgehog pathway 4.Receptor tyrosine kinase (small G proteins) pathway 5.Notch/Delta pathway <p><i>Mid-development and later</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 6.Cytokine receptor (cytoplasmic tyrosine kinases) pathway 7.IL1/Toll NFκB pathway 8.Nuclear hormone receptor pathway 9.Apoptosis pathway 10.Receptor phosphotyrosine phosphatase pathway <p><i>Larval/adult physiology</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1.Receptor guanylate cyclase pathway 12.Nitric oxide receptor pathway 13.G-protein coupled receptor (large G proteins) pathway 14.Integrin pathway 15.Cadherin pathway 16.Gap junction pathway 17.Ligand-gated cation channel pathway
--

Taula 1. Les 17 vies de senyalització intercel.lular. Tret de Gerhart, 1999

INTRODUCCIÓ

Ara bé, si l'organisme disposa d'un nombre tan limitat de molècules de senyalització, com s'aconsegueix l'especificitat en cada cas? Dita especificitat depèn en primer lloc de la història de la cèl.lula (competència cel.lular), de la intensitat de la senyal rebuda i de les interaccions reguladores amb altres cascades de senyalització. Per tant, una de les propietats que han de presentar les vies de senyalització és la flexibilitat per poder generar diferents respostes a diferents teixits i espècies, i és per això que enlloc de ser cascades lineals solen haver-hi diferents nivells d'embranchament.

Davant d'aquesta flexibilitat, quins són els mecanismes emprats per aconseguir aquella especificitat que dèiem en cada cas? Es proposen cinc mecanismes diferenciats (Pires da-Silva i Sommer, 2003): primer (**a.** a la figura 1), un mateix receptor pot activar diferents efectors nuclears segons el teixit; segon (**b.** a la figura 1), la diferent cinètica del lligand o del receptor pot produir diferents respostes cel.lulars (per exemple el receptor Fz2 té una afinitat deu vegades major per Wg que el receptor Fz; la primera unió activa l'anomenada via Wnt canònica i la segona interacció produeix reorganitzacions al citoesquelet; tercer (**c.** a la figura 1), l'activació combinatorial per més d'una via, és a dir, moltes vies poden ser integrades bé a nivell de proteïnes senyalitzadores, bé a nivell dels *enhancers* dels gens diana; quart (**d.** a la figura 1), l'existència d'especificitat tissular per certs factors de transcripció; i cinquè (**e.** a la figura 1), la possibilitat de compartimentalització a la cèl.lula (formació de complexos proteics citosòlics, evitant així per exemple, senyalitzacions creuades per part de proteïnes que poden participar en diferents vies, com la quinasa GSK-3 que, com veurem, està implicada a la via Wnt i al metabolisme del glicogen, entre d'altres).

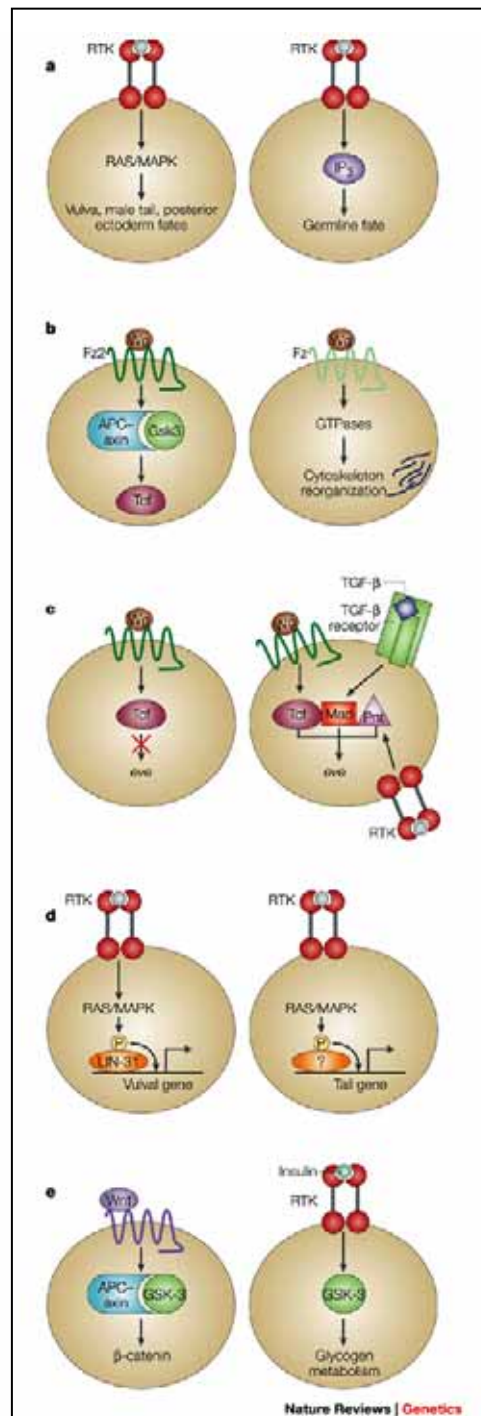


Figura 1. Cinc mecanismes per aconseguir especificitat davant la flexibilitat de les vies de senyalització. Tret de Pires da-Silva i Sommer, 2003.

La robustesa seria una de les altres propietats d'una via de senyalització, robustesa aconseguida per mig de *feed-back loops* positius (que amplifiquen, estableixen o prolonguen la senyal) i negatius (inhibeixen i/o limiten la senyalització).

Sembla ser doncs que pel desenvolupament dels organismes és crucial que les cèl.lules puguin comunicar-se entre elles, i això sovint està mediat per molècules senyalitzadores secretables que s'uneixen a receptors de la superfície cel·lular i que

INTRODUCCIÓ

modulen l'activitat d'efectors intracel.lulars específics. Així s'ha demostrat que actuen les proteïnes Wnt, activant vies de senyalització que controlen una àmplia diversitat de processos del desenvolupament, com l'especificació de destí cel.lular, la proliferació, la polaritat i la migració cel.lular entre molts d'altres.

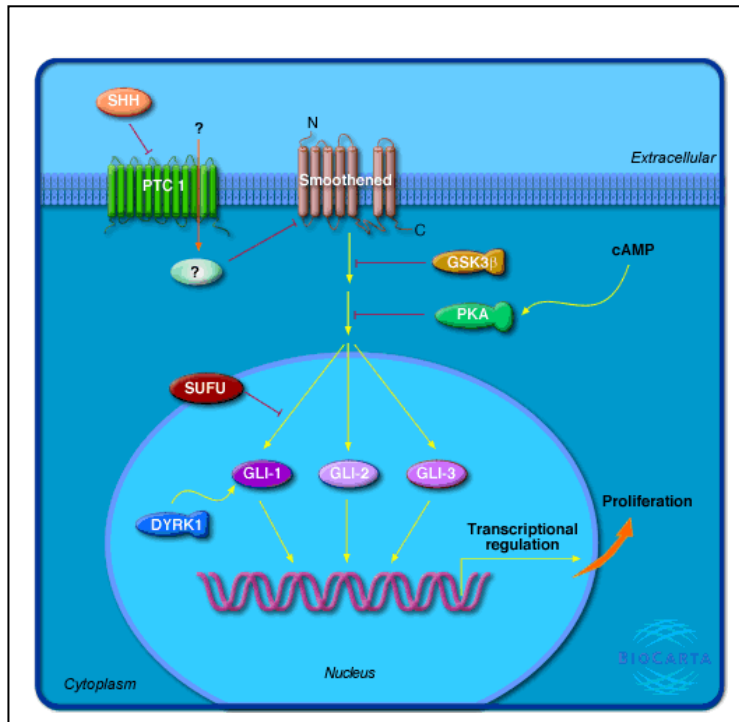


Figura 2. Exemple d'una via de senyalització: via de Shh (Sonic Hedgehog). L'activació té lloc a través de la unió de Shh a un complex receptor que inclou Patched (Ptc-1) i Smoothened, un receptor acoplat a proteïnes-G. Ptc-1 és una proteïna integral de membrana amb 12 dominis transmembrana que actua inhibint l'activació de Smoothened. Downstream de Smoothened participen les proteïnes de la família d'activadors de la transcripció Gli: Gli-1, Gli-2 i Gli-3, homòlogues de *cubitus interruptus* de *Drosophila*. Les quinases GSK-3 i PKA inhibeixen la via. *Suppressor of Fused* (SUFU) interacciona directament amb les proteïnes Gli inhibint també la via, mentre que Dyrk1, una altra quinasa que actua per mig d'una altra via, estimula l'activació de la transcripció per part de Gli-1. Tret de http://www.biocarta.com/pathfiles/h_shhPathway.asp.

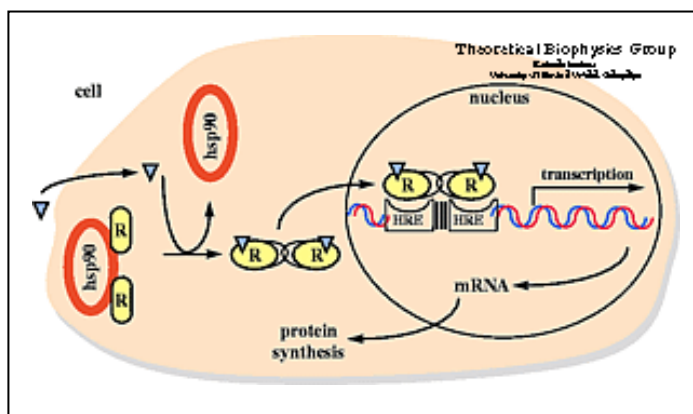


Figura 3. Via dels receptors nuclears d'hormones. Els receptors d'hormones nuclears són factors de transcripció activats per lligand que regulen l'expressió gènica interaccionant amb seqüències específiques de DNA *upstream* dels seus gens diana. El mecanisme d'acció seria: 1) activació del receptor per unió de la hormona; 2) unió del receptor al DNA i regulació de la transcripció. R: nuclear hormone receptor; HRE: hormone response element; hsp90: heat shock protein, que, en aquest cas fa d'iniciadora del procés. Tret de http://www.ks.uiuc.edu/Research/pro_DNA/ster_horm_rec/

1.2 La via Wnt

1.2.1 Història i filogènia

El primer gen *Wnt*, el gen *Wnt-1* de ratolí (inicialment anomenat *int-1*), va ser descobert el 1982 com a proto-oncogen activat per la integració de virus de tumors mamaris de ratolí a tumors mamaris. Per tant, per la potencial implicació dels Wnts en càncer, aquesta va ser l'àrea de recerca inicial, de la que en parlarem breument més endavant. Posteriorment, però, la identificació molecular de *wingless* (*wg*), un gen de polaritat segmental de *Drosophila*, com a ortòleg del *Wnt-1* de ratolí i l'anàlisi fenotípic de les mutacions al ratolí van fer concloure amb claredat que els Wnts regulaven moltes de les decisions del desenvolupament. S'han descobert més de 100 gens Wnt fins el moment, des de l'humà fins als cnidaris, definits per homologia de seqüència respecte els membres originals *Wnt-1* de ratolí i *wg* de *Drosophila*.

Per tant, dos varen ser els focus inicials d'estudi i descobriments de la via Wnt:

- descobriments de *wingless* (*wg*) com a gen de polaritat segmental a *Drosophila*
- descobriments de la implicació de la via Wnt a la formació dels eixos embriònics a vertebrats

Per anàlisi mutacional i estudis d'epistàssia genètica es van identificar els primers elements i ordre de la via a *Drosophila*: els components de l'anomenada via Wnt canònica (com veurem s'ha definit més d'una via de senyalització que activen aquestes proteïnes) van ser identificats inicialment com a mutacions que produïen efectes iguals o oposats als observats als mutants *wg* (Cadigan i Nusse, 1997) a *Drosophila*, i també per assajos de *yeast-two-hybrid* i *activity-based screens* s'han pogut identificar molts elements de la via.

Tot i haver-se identificat membres de la família Wnt tant a vertebrats com a invertebrats, sembla ser que són inexistents a plantes, a eucariotes unicel·lulars com *Saccharomyces cerevisiae*, als coanoflagelats (Protozous unicel·lulars i colonials considerats molt propers als Metazous) i a procariotes. Fins el moment, 19 gens Wnt s'han trobat al genoma humà, almenys 18 al del ratolí, 16 a *Xenopus*, 11 a pollastre i 12 a peix zebra, entre d'altres. Els genomes de vertebrats contenen moltes combinacions de gens Wnt altament similars, als quals s'hi refereix normalment com a parelles A-B. Entre els invertebrats sembla que el nombre és menor: entre els més estudiats en trobem 7 a *Drosophila*, 5 a *C.elegans* i un al cnidari *Hydra*, entre d'altres. Molt

INTRODUCCIÓ

recentment, però, s'ha descrit al cnidari *Nematostella vectensis* l'existència de 12 lligands Wnt diferents (Kusserow *et al.*, 2005).

En aquest treball caracteritzem el primer Wnt trobat a Platihelminths i el primer Wnt de la subclasse 5 trobat a Lofotrocozoous.

La majoria de gens Wnt doncs han estat aïllats de dos dels tres grans grups de bilaterals: els deuterostoms i els ecdizosous. A l'article de Prud'homme *et al.*, del 2002 mostren l'aïllament de diversos gens Wnt de dos Lofotrocozoous: *Platynereis dumerilii* (un anèlid) i *Patella vulgata* (un molusc). Aquest i altres anàlisis filogenètics parlen de l'existència de 12 subfamílies de Wnts, 9 de les quals eren ja presents a l'ancestre comú dels bilaterals, *Urbilateria*, donant idea de la complexitat genètica d'aquest ancestre. La figura 4 mostra els 6 gens Wnt aïllats de *Platynereis dumerilii* i els 4 de *Patella vulgata*, juntament amb els 19 de l'humà, com a representatius dels diferents vertebrats, els 7 de *Drosophila* i els 5 de *C.elegans*, i els gens Wnt de l'amfiox (cordat no vertebrat) i d'un equinoderm (deuterostom no cordat). Es tracta de 12 subfamílies paràlogues (originades per duplicació), contenint gens ortòlegs (originats per especiació). Com hem dit, al cnidari *Hydra* s'ha aïllat un gen Wnt homòleg a la subfamília Wnt3, fet que semblaria indicar que aquesta subfamília existiria abans de la divergència entre bilaterals i cnidaris. Molt recentment, però, i com hem apuntat unes línies més amunt, s'ha publicat l'existència a *Nematostella vectensis*, un representant del grup basal de cnidaris, de 12 gens Wnt diferents (Kusserow *et al.*, 2005) (figura 5b). Així doncs, els cnidaris posseeixen representants de 11 de les 12 subfamílies Wnt (sembla ser que NvWnt7 i NvWnt8 representarien una duplicació específica de cnidaris o antozous). Segons els autors d'aquest estudi, a vertebrats trobaríem les 12 subfamílies, mentre que a als ecdizosous només en trobaríem 7 en el cas de *Drosophila* i 5 en el cas de *C.elegans*. A lofotrocozoous, l'altre gran grup del clade dels protostoms, les subfamílies -3, -6, -8 i -11 no han estat identificades fins el moment, i és per això que encara no està clar quins gens Wnt existien al punt de divergència entre protostoms i deuterostoms. Pel que fa a la subfamília WntA, tots dos estudis, el de Prud'Homme *et al.*, i el de Kusserow *et al.*, coincideixen en que s'ha perdut durant l'evolució dels deuterostoms. Una altra observació filogenètica important que es dedueix de tots dos treballs és que possiblement existiren pèrdues de gens Wnt als llinatges dels ecdizosous perquè tant *Drosophila* com *C.elegans* presenten un nombre menor de gens Wnt que *Urbilateria*, havent passat el mateix amb altres famílies de gens. A més, les seqüències del gens

d'aquests dos organismes model són molt divergents, fet que fa difícil establir relacions d'ortologia amb altres gens. La sorprenent nova informació revelada a l'estudi de Kusserow *et al.*, 2005 és que cnidaris i bilaterals doncs comparteixen 11 de les 12 subfamílies conegudes (WntA, Wnt1-8 i Wnt10-11; només el Wnt-9 no ha estat trobat a cnidaris) i, per tant, segurament presents abans de la divergència entre bilaterals i cnidaris. L'últim ancestre comú entre tots dos, *Ur-metazoa*, deuria contenir-los tots 11 al seu genoma. Aquests descobriments donen idea de l'ancestralitat d'aquesta família de proteïnes que devien aparèixer aproximadament fa uns 650Ma (Peterson *et al.*, 2004), controlant funcions essencials per la diversificació dels diferents plans corporals dels organismes.

A la figura 4 es pot veure també com només hi ha parelles de gens de la mateixa subfamília a partir dels vertebrats, ja que a l'amfiox, que en seria el grup germà, només hi ha un gen ortòleg en 5 de cada 7 casos. Possiblement aquestes parelles són resultat de la duplicació esdevinguda durant l'evolució dels vertebrats. De fet es postula que la duplicació de molts gens reguladors permet la diversitat morfològica dels metazous (Holland i García-Fernández 1996; Valentine *et al.*, 1996, Chervitz *et al.*, 1998). Del que es dedueix a l'article de Prud 'Homme *et al.*, les úniques relacions filogenètiques clares entre les diferents subfamílies són el *clustering* per una banda de Wnt-4 i -11, i de Wnt-1, -6, -10, per l'altra (figura 5A). Al genoma humà i també al del ratolí trobem de fet alguns dels gens Wnt en *clusters* de dos, per exemple, Wnt6 i Wnt10a, Wnt1 i Wnt10b i Wnt3 i Wnt15. També al genoma de *Drosophila*, Wg (ortòleg del Wnt-1 de vertebrats), DWnt6 i DWnt10 es troben immediatament adjacents l'un de l'altre al segon cromosoma. Per tant sembla que podria haver existit un cluster ancestral de gens Wnt consistent en Wnt1, Wnt6 i Wnt10 a l'ancestre comú de vertebrats i artròpods. A vertebrats podria haver-se duplicat aquest *cluster* amb la subseqüent pèrdua del Wnt1 d'un *cluster* i del Wnt6 de l'altre. Les dades de Kusserow *et al.*, 2005 suporten la idea d'un cluster de gens Wnt -1, -6, -9 i -3 a l'ancestre comú de cnidaris i bilaterals (figura 5B).

Una de les aportacions més importants de l'article de Prud 'Homme és que els permet determinar l'ancestralitat de dues subfamílies: Wnt-2-13 i Wnt-9-14-15, que fins aquell moment no s'havien trobat fora de vertebrats (tot i que sembla que DWnt4 podria ser un ortòleg ambigu de la subfamília Wnt-9-14-15). La idea d'ancestralitat d'aquestes subfamílies es veu ara reforçada amb l'estudi a *N.vectensis*, excepte pel que fa a la

INTRODUCCIÓ

subfamília Wnt-9 que, com hem dit, pot haver-se perdut en l'evolució al llinatge dels cnidaris.

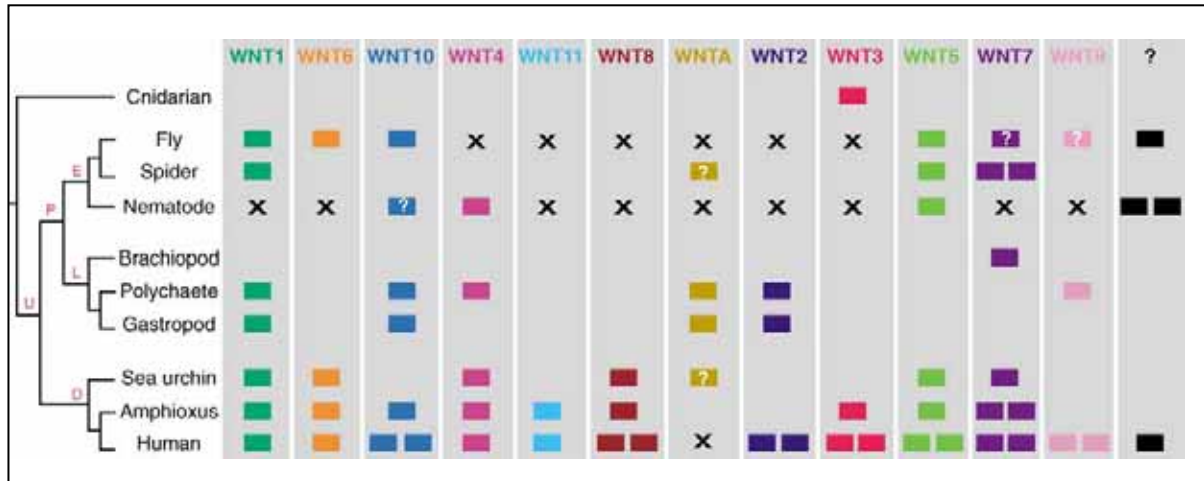


Figura 4. Distribució dels gens Wnt als Metazous. Es mostra la posició dels últims avantpassats comuns de les principals subdivisions dels metazous: U, *Urbilateria*, avantpassat dels bilaterals; D, avantpassat dels deuterostoms; P, avantpassat dels protostoms; E, avantpassat dels ecdizosous; L, avantpassat dels lofotrocozous. Els signes d'interrogació indiquen relacions d'ortologia incertes. Les caixes són sinònim de presència d'un determinat membre Wnt a un grup donat. Una "X" indica que no s'ha trobat un homòleg d'aquella subfamília al genoma d'aquell organisme. Cal tenir en compte que de molts organismes encara no en tenim el genoma totalment seqüenciat. El signe d'interrogació de la cantonada dreta a dalt significa gens Wnt orfes. Els noms senzills de les subfamílies Wnt2 and Wnt9 són Wnt2/13 i Wnt9/14/15, respectivament. Tret de Prud'Homme et al., 2002

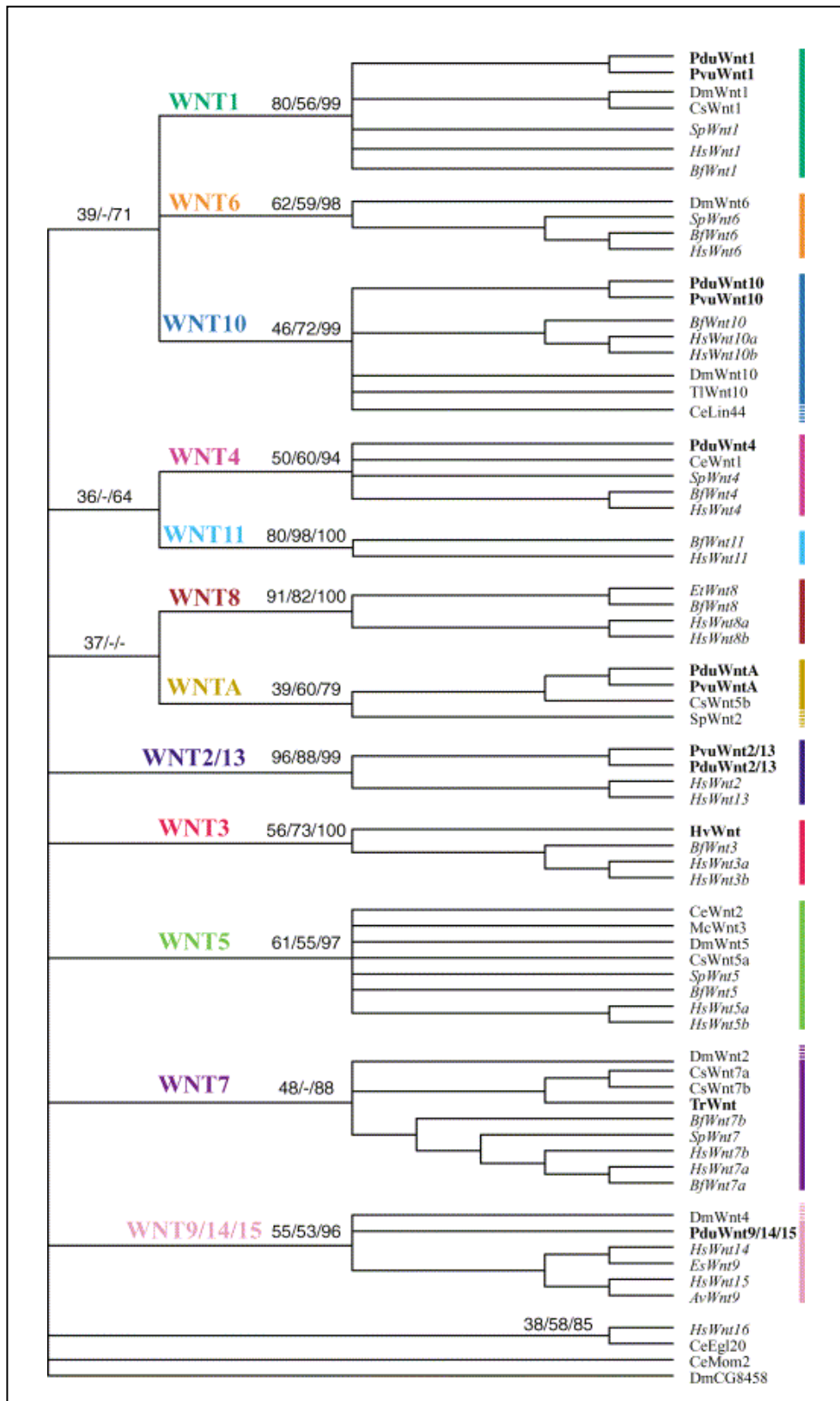


Figura 5A. Arbre filogenètic consens de la família Wnt. La discussió està al text. Els valors estadístics per les diferents subfamílies (MP, ML, mètode Bayesià) s'indiquen als nodes. *Av*, *Alopius vulpinus* (tauró); *Bf*, *Branchiostoma floridae* (amfiox); *Ce*, *Caenorhabditis elegans*; *Cs*, *Cupiennius salei* (aranya); *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Es*, *Eptatretus stoutii* (hagfish); *Et*, *Evasteria troschelii* (equinoderm); *Hs*, *Homo sapiens*; *Hv*, *Hydra vulgaris*; *Mc*, *Mysidium columbiae* (crustaci); *Pdu*, *Platynereis dumerilii* (anèlid); *Pvu*, *Patella vulgata* (molusc); *Sp*, *Strongylocentrotus purpuratus* (equinoderm); *Tl*, *Triops longicaudatus* (crustaci); *Tr*, *Terebratulina retusa* (braquiòpod). Els gens de deuterostoms estan en cursiva, els gens de lofotrocozoous en negreta, l'únic d'*Hydra* en negreta i cursiva i els d'ecdzisous en grafia normal. Tret de Prud'Homme *et al.*, 2002

INTRODUCCIÓ

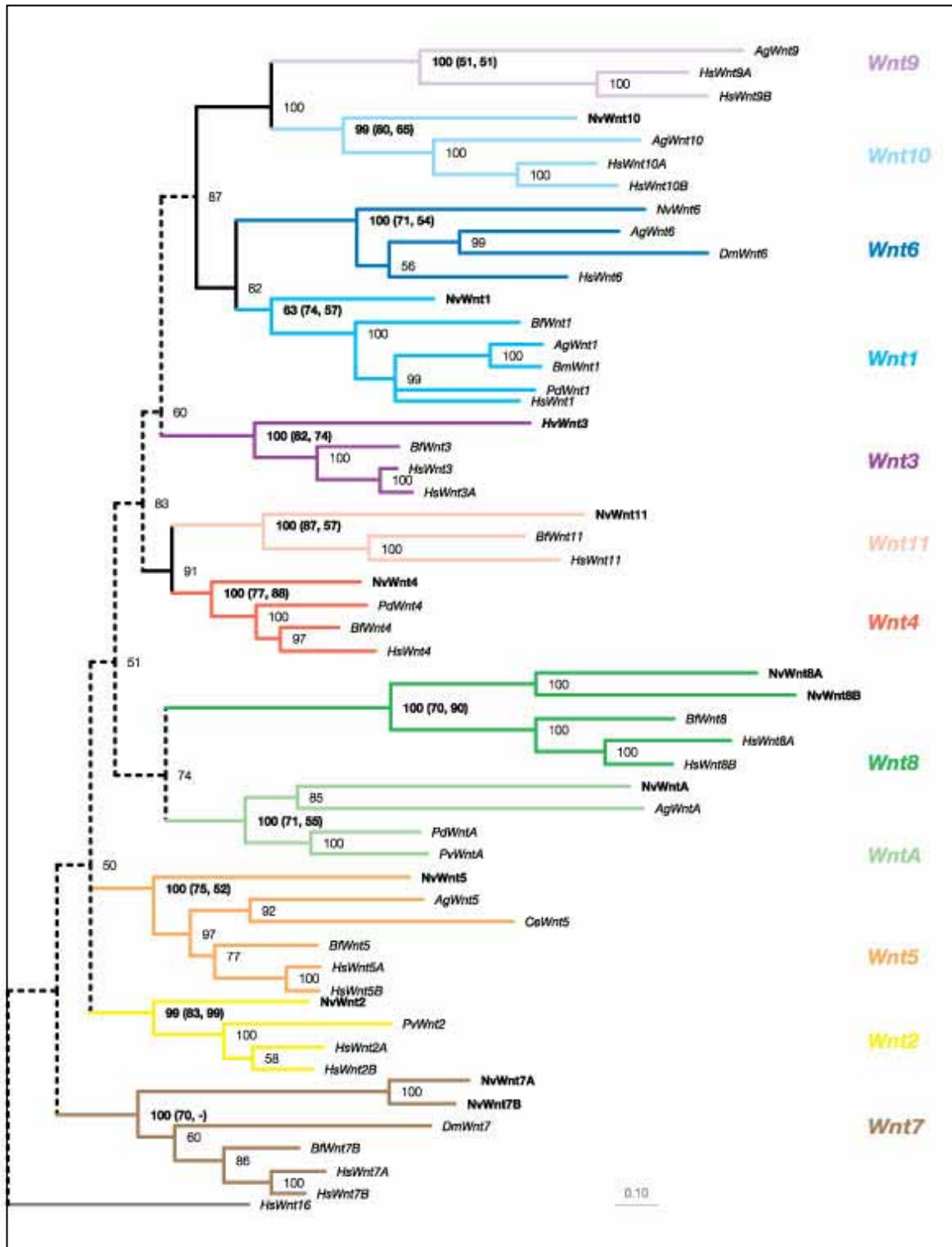


Figura 5B. Arbre filogenètic consens Bayesià de la família Wnt. La discussió està al text. Els números a la dreta de les branques representen valors de diferents anàlisis. Els de l'anàlisi Bayesià estan a totes les branques i els trobats per MP (Paup) i els de ML (TREE- PUZZLE) entre parèntesi. *Bf*, *Branchiostoma floridae* (amfiox); *Bm*, *Bombyx moori* (insecte); *Ce*, *Caenorhabditis elegans*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Hs*, *Homo sapiens*; *Hv*, *Hydra vulgaris*; *Nv*, *Nematostella vectensis* (anèmona de mar); *Pd*, *Plathynereis dumerlii* (poliquet); *Pv*, *Patella vulgata* (molusc), *Ag*, *Anopheles gambiae*. Els gens de bilaterals estan en cursiva, els gens de *N. vectensis* en negreta i els de *H. vulgaris* en cursiva i negreta. Tret de Kusserow *et al.*, 2005.

A nivell de seqüència, patrons d'expressió i funcions aquests gens estan altament conservats en l'evolució i això ha facilitat estudiar-ne les activitats i mecanismes d'acció. Com dèiem, són gens altament conservats entre les diferents espècies de vertebrats i invertebrats. La majoria de proteïnes Wnt tenen aproximadament un 35% d'identitat de seqüència aminoacídica, però els membres d'un mateix subgrup (p.ex Wnt3 i Wnt3a) poden presentar entre un 58% i un 83% d'identitat de seqüència i també patrons d'expressió en part solapants. A vertebrats els ortòlegs de diferents espècies són altament similars en seqüència. Per exemple el Wnt1 humà i el de ratolí són idèntics en un 98% i els Wnt5 d'humà i *Xenopus* són idèntics en un 84%. També hi ha relacions d'ortologia entre l'humà i *Drosophila*, en percentatges que van d'un 21% entre el Wnt8a/d d'humà i el DWnt8 de *Drosophila*, a un 42% entre el Wnt1 d'humà i el *wg* de *Drosophila*. En canvi és més difícil establir relacions d'ortologia amb els Wnts de *C.elegans*.

Molts resultats demostraren des dels inicis dels estudis d'aquestes molècules que existien proteïnes Wnt funcionalment diferents i que sovint les vies de senyalització activades per aquests lligands regulaven l'expressió gènica però a través d'interaccions combinatorials amb altres vies de senyalització. En primer lloc, però, quins són els trets estructurals que defineixen aquesta família de proteïnes?

1.2.2 Característiques estructurals de les proteïnes Wnt

Els gens Wnt codifiquen per glicoproteïnes d'uns 350-400 aminoàcids de longitud. El pes molecular de les diferents proteïnes Wnt humanes és molt semblant, ocupant un rang desde 39KDa (Wnt7a) fins 46KDa (Wnt10a). A *Drosophila* també són similars en mida, amb excepció de *Wg* que fa 54 KDa i té una inserció interna no trobada als seus ortòlegs a vertebrats, i *DWnt3/5* que fa uns 112KDa. Malhauradament, degut al seu alt grau d'insolubilitat, poc se'n sap de l'estructura d'aquest conjunt de proteïnes; això sí, totes elles presenten 23 o 24 residus de cisteïnes al llarg de la seqüència, amb l'espai relatiu entre elles força conservat, suggerint la possibilitat que el plegament de la proteïna Wnt depengui de la formació de múltiples ponts disulfur intramoleculars (Figura 6). A més de les cisteïnes, a la seqüència trobem altres residus invariants (Yang-Snyder *et al.*, 1996). Aquestes molècules presenten característiques típiques dels factors de creixement secretables: una senyal hidrofòbica (seqüència conservada entre els *Wnts*: CKCHGvSGSC) i una seqüència conservada oligosacàridica lligada a asparagina. La regió carboxi-terminal sembla implicada a determinar l'especificitat de respostes als diferents Wnts (Du *et al.*, 1995). De fet, mutants on s'ha delectonat l'extrem carboxi-terminal poden actuar com a formes dominants negatives de manera cel.lular autònoma.

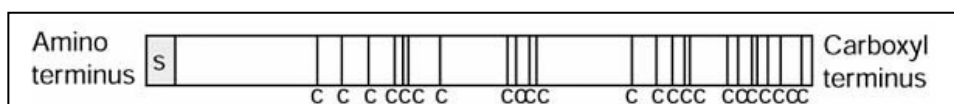


Figura 6. Esquema de l'estructura típica d'una proteïna Wnt amb els residus conservats de cisteïnes. Modificat de Miller, 2002

Com dèiem, un dels trets estructurals típics d'una proteïna Wnt és el seu grau d'insolubilitat. A diferència d'altres molècules senyalitzadores com les proteïnes Hedgehog o BMPs, han calgut molts esforços per poder aïllar els Wnts en forma activa. Moltes aproximacions que han restat sense ser publicades consistien en intents de produir proteïnes Wnt secretades en cultius cel.lulars. Normalment, la sobreexpressió d'aquests gens en cèl.lules en cultiu resultava en una acumulació de proteïna mal

plegada al recticle endoplasmàtic (Kitajewski *et al.*, 1992). Es trobaven formes secretades de les proteïnes Wnt a la matriu extracel.lular o a la superfície de la cèl.lula (Bradley i Brown, 1990; Papkoff i Schryver, 1990; Burrus i McMahon, 1995; Schryver *et al.*, 1996), però cap dels esforços per solubilitzar dit material havien tingut èxit. Més endavant es van desenvolupar diferents mètodes per produir-ne formes solubles; tot i que al principi només es recuperava una petita quantitat de proteïna, els assajos *in vitro* demostraren que eren formes actives. L'activitat de Wg podia ser testada per l'estabilitat de la proteïna *downstream* β -catenina, i la de la proteïna Wnt-1 per la inducció de transformació morfològica de cèl.lules diana (Jue *et al.*, 1992; Bradley i Brown, 1995). A l'article de Willert *et al.*, 2003 aconseguixen aïllar el producte del gen Wnt3a de ratolí, observant que una de les cisteïnes conservades (en concret C77 que és present a tots els Wnts) es troba lligada a àcid palmític i demostren que aquesta modificació és necessària per l'activitat proteica. Així doncs, les molècules Wnt degut a aquesta modificació lipídica són molt més hidrofòbiques que el que s'havia predit a partir de la seva seqüència primària d'aminoàcids. La major part de molècules que les cèl.lules secreten es troben glicosilades però no acilades, tot i que diferents estudis com dèiem demostren que no només Wnt, sinó també el producte del gen Hedgehog porta palmitat associat covalentment (Pepinsky *et al.*, 1998; Willert *et al.*, 2003). En el cas d'aquesta última proteïna existeix una segona modificació lipídica en forma de colesterol (Porter *et al.*, 1996) (figura 7).

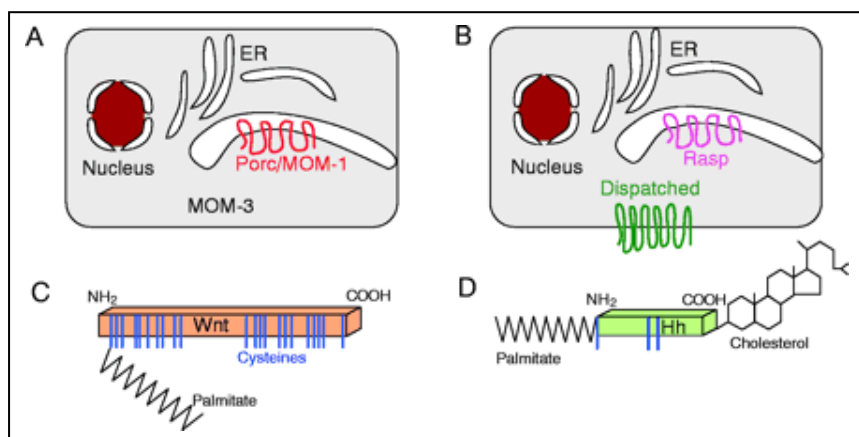


Figura 7. Producció de proteïnes Wnt i Hedgehog modificades lipídicament. Tret de Nusse, 2003

INTRODUCCIÓ

1.2.3 Secreció, transport i recepció dels lligands Wnt

Es tracta de molècules que són secretades, i per això sembla essencial el paper de la proteïna *porcupine*, que, mutada, provoca una retenció de la proteïna Wg al reticle endoplasmàtic. No se sap prou bé si les proteïnes Wnt se secreten com a monòmers, oligòmers o formant part d'un complexe multiproteic. El que sí que es coneix és que es tracta de molècules que es glicosilen tot i que encara no es coneix el motiu d'aquestes glicosilacions. Un cop secretades, les proteïnes Wnt s'associen amb glicosaminoglicans de la matriu extracel.lular i s'uneixen amb força a la membrana de la cèl.lula, tot i que com hem dit a l'anterior subapartat, es possible recollir proteïna Wnt del medi de cèl.lules de cultiu.

Com a totes les vies de senyalització i comunicació cel.lular, els mecanismes de transport i localització dels components de la via són essencials perquè la senyal es propagui i distribueixi correctament a través dels teixits en desenvolupament.

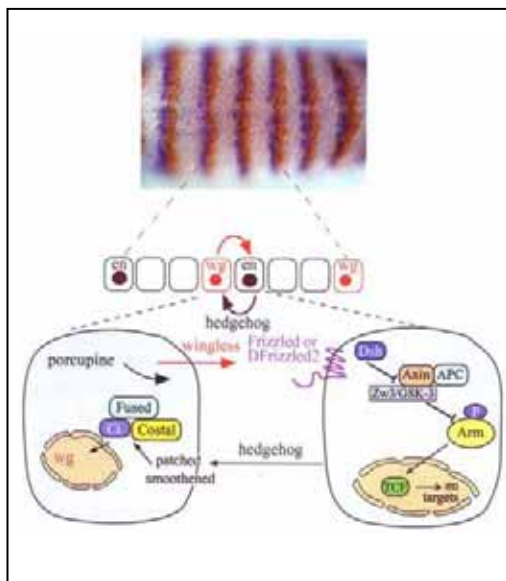


Figura 8. A *Drosophila* tant *wg* com *en* són gens de polaritat segmental, que estableixen un *loop* regulador positiu a nivell de la cutícula larvària. *En* es troba sota el control de la via Wnt canònica. Tret de Carroll *et al.*, 2001

Els Wnts controlen esdeveniments de curt i llarg abastament, per exemple, a *Drosophila*, *wg*, com a funció a curta distància, activa la transcripció d'*engrailed* (*en*) i controla l'especificació de cutícula "nua". Una autoactivació autocrina manté l'expressió de *wg* a una línia de cèl.lules, i a les immediatament adjacents, i de forma paracrina, s'activa l'expressió de *hedgehog* i *engrailed*, que al seu torn, via *feed-back loop*, mantenen l'expressió de *wg* (figura 8). La senyalització Wnt cap a cèl.lules adjacents no requereix endocitosis, però si es bloqueja dit transport, les conseqüències funcionals es revelen per l'acumulació d'*Armadillo*, que és una evidència molecular directa de la senyalització Wnt.

Com a exemple de funció a llarga distància, *wg* especifica el patró de diversitat (longitud i orientació) de denticles. En els events de llarga distància hi juguen un paper

essencial l'endocitosis i les vesícules. Actuen doncs els Wnts com a morfògens? És a dir, poden alterar l'expressió gènica de forma dependent de concentració originant diferents respostes a diverses distàncies del lloc de secreció? Aquest aspecte ha estat estudiat sobretot per Wg perquè existeixen bons anticossos disponibles, i s'ha demostrat que la proteïna pot ser trobada a moltes cèl·lules de distància de la cèl·lula secretora (revisat a Cadigan i Nusse, 1997); els mutants per Wg, a més, presenten fenotips que abarquen àrees més grans que el domini d'expressió del mRNA. I, per altra banda, diferents experiments són consistents amb el fet que les dianes a curta distància per Wg requereixen més activitat Wg que la requerida per dianes existents a més llarga distància.

Extracel·lularment, hi ha altres molècules que poden modular la senyalització Wnt, són inhibidors extracel·lulars entre els que trobaríem per exemple Cerberus que, a més, funciona com antagonista multivalent de diferents factors de creixement (Piccolo *et al.*, 1999). En realitat, podríem classificar aquests antagonistes extracel·lulars en funció de si s'uneixen als lligands Wnt o a una de les subunitats del complex receptor dels Wnt a la superfície cel·lular. Al primer tipus pertanyen les proteïnes de la família sFRP (secreted Frizzled-related protein), la proteïna WIF (Wnt Inhibitory Factor)-1 i Cerberus. La segona classe inclou membres de la família Dickkopf (Dkk), que inhibeixen la senyalització Wnt unint-se al component LRP5/LRP6 del complex receptor dels Wnts. El que està clar és que la recepció i transducció de la senyal Wnt per mig de la que anomenem via canònica implica la unió de les proteïnes Wnt a membres de dues famílies diferents de receptors a la superfície cel·lular: uns serien els membres de la família Frizzled (Fzd) i els segons serien membres de les "LDL-receptor-related proteins" (LRP). La iniciació de la senyalització per la via no-canònica implica la unió de lligands Wnt amb receptors Fzd però en absència de membres LRP. És per això que en teoria els antagonistes de la primera classe podrien inhibir tots dos tipus de vies, mentre que els membres de la classe Dickkopf inhibirien específicament la via canònica (Kawano i Kypta, 2003), segons es mostra a la figura 9. L'estructura d'un típic receptor Fzd consisteix en un domini N-terminal ric en cisteïnes (CRD), set dominis transmembrana i una cua citoplasmàtica curta que conté un domini PDZ consens de motiu S/T-X-V (segons el codi en lletra única d'aminoàcids) a l'extrem C-terminal (figura 10).

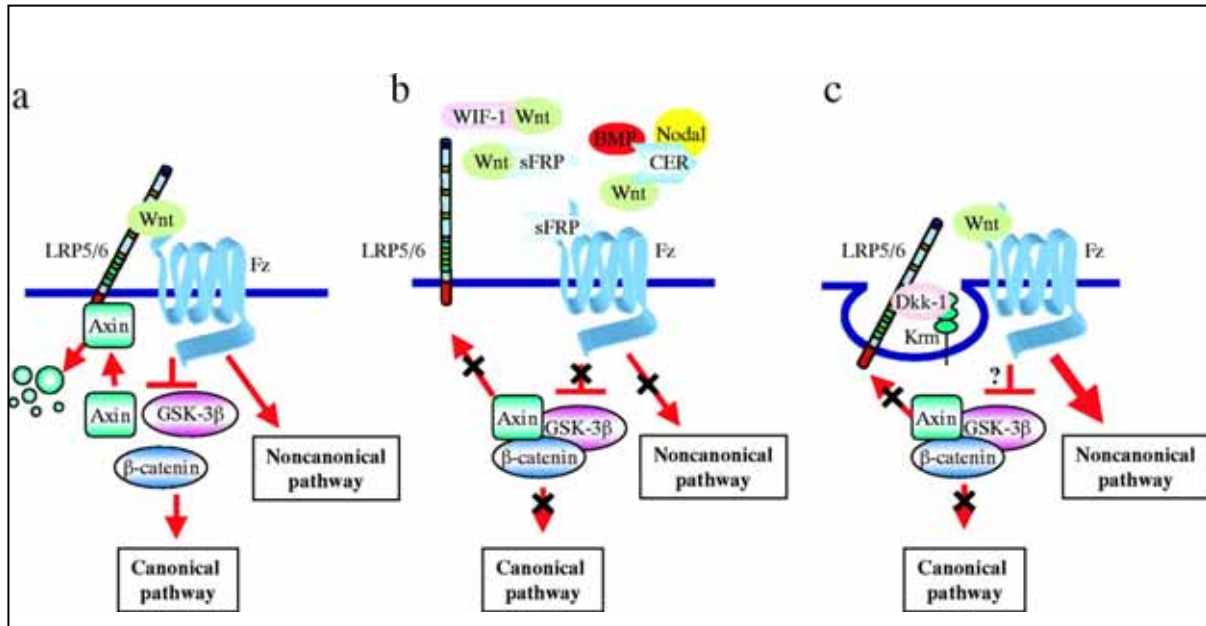


Figura 9. Regulació de la via Wnt per part dels seus antagonistes extracel·lulars . Tret de Kawano i Kypta, 2003

- a) situació d'activació de les vies canònica i no-canònica
- b) Antagonistes com els sFRPs, Cerberus (CER) i WIF-1 impedeixen la unió dels Wnts als seus receptors. En aquest cas totes dues vies estan inhibides.
- c) Dkk-1 interacciona amb LRP5/6 i el co-receptor Kremen 1/2 (Krm), fet que provoca la endocitosis de LRP5/6 evitant la formació del complex LRP5/6–Wnt–Frizzled. L'Axina recluta totes les proteïnes del complex destructor de la β-catenina inhibint-se així la via canònica, mentre que el complex Wnt-Fzd pot encara activar la via no-canònica.

Aquest tipus de receptor recorda a aquells receptors de 7 dominis transmembrana lligats a proteïnes G, i, de fet, com veurem més endavant, un grup de receptors Fzd transdueix les senyals utilitzant un grup de proteïnes G heterotrimèriques, tot estimulant un increment intracel·lular de calci i una activació de la quinasa PKC. S'han aïllat membres de la família Fzd tant a vertebrats (10 a humans i a ratolí, per exemple) com a invertebrats (5 a *Drosophila*, 3 a *C.elegans*, entre d'altres). Els 2 membres de la família LRP, LRP-5 i LRP-6 a vertebrats o l'homòleg del primer, *arrow*, a *Drosophila*, poden unir-se als Wnts tot formant un complex ternari amb un Wnt i un Fzd.

A nivell de membrana diferents estudis demostren que els proteoglicans (PGs) també hi juguen un paper important tot facilitant l'entrega dels lligands Wnts als receptors Fzd (que seria el paper que per exemple exerceixen dits PGs a la via dels TGF-β). De fet, encara no es coneix bé si el paper d'aquestes molècules consistiria en segrestar, presentar o rebre el lligand.

Com hem apuntat anteriorment, un cop s'ha donat la interacció a nivell de membrana, els Wnts poden transduir la senyal per mitjà de diferents vies. I, en principi, sembla que un o altre Wnt activen preferencialment una via o una altra però la distinció no és absoluta perquè depèn dels receptors i altres cofactors que existeixin a la superfície cel.lular (Moon *et al.*, 1997b). Per tant, la diversitat de respostes dels diferent Wnts és deguda en part a la diversitat de receptors existents a la superfície de la cèl.lula.

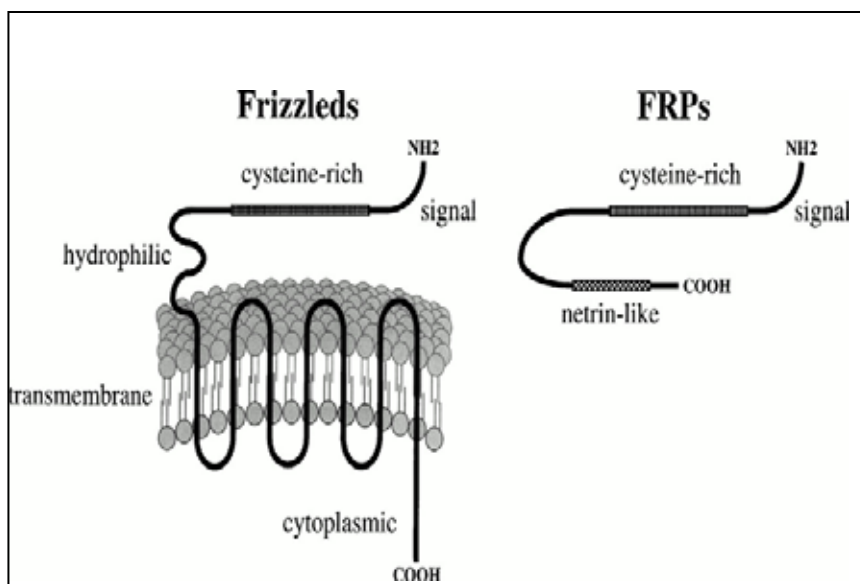


Figura 10. Estructura d'un típic receptor de la família Frizzled i exemple d'un antagonista d'aquests receptors: *FRPs* (*frizzled-related proteins*) (són proteïnes estructuralment relacionades al CRD dels Frizzled. Són molècules secretades i sembla ser que actuen com a antagonistes dels Wnts) Tret de la pàgina Web dels Wnts: <http://www.stanford.edu/~rnusse/Wntwindow.html>.

1.2.4 Vies de transducció de la senyal Wnt

Diferents experiments de duplicació axial a *Xenopus* i de transformació de cèl.lules en cultiu a ratolí van donar lloc a la idea de que els Wnts devien ser funcionalment diferents i que Wnts particulars podien estar actuant per vies que no fossin la mateixa en tots els casos. El primer tipus d'assajos va permetre distingir entre Wnts que tenien una capacitat alta, intermitja o molt baixa d'aconseguir una duplicació axial quan es sobreexpressaven a blastòmers ventrals d'embrions primerencs de *Xenopus*. Així doncs els que tenien capacitat d'inducció es van anomenar classe XWnt1 (XWnt1, XWnt3a, XWnt8 i XWnt8b) i aquell grup que no produïa una duplicació axial completa sinó que per contra donava lloc a una disminució de l'adhesió cel.lular i una alteració en moviments morfogenètics durant la gastrulació es va anomenar classe XWnt5a (XWnt5a, XWnt4 i XWnt11). El segon tipus d'assajos consistia en analitzar la capacitat transformadora dels diferents Wnts sobre cèl.lules epitelials mamàries murines on trobaven grups d'alta, mitja i baixa capacitat de transformació, grups similars als trobats amb el primer assaig. Aquesta classificació, però, sembla poder indicar que potser tot deu dependre dels receptors disponibles. I cal tenir en compte que tots aquests fets ens indiquen que no tots els Wnts activen les mateixes respostes fisiològiques ni a través de la mateixa via. I, com s'ha descrit en alguns articles, sembla que les diferents vies poden interaccionar a diferents nivells, per exemple, la classe XWnt5a pot bloquejar la capacitat inductora axial dels membres de la classe XWnt1 (Torres *et al.*, 1996).

Actualment se sap doncs que les senyals Wnt es transdueixen a través de tres mecanismes de senyalització diferents (figura 11): a) **via "Wnt/ β -catenina"**, és la via canònica; b) **via "Wnt/calci"**; i c) **"via de polaritat cel.lular"**. Diferents parelles de Wnt i receptor Fzd activen un d'aquests mecanismes i originen respostes cel.lulars úniques. En principi la via canònica regula la determinació de destins cel.lulars durant el desenvolupament, mentre que la via de la polaritat cel.lular principalment regula l'organització del citoesquelet. La funció biològica de la via Wnt/calci no està clara tot i que, com s'ha suggerit, podria estar implicada en controls de moviments morfogenètics. Molt al final de l'escriptura d'aquesta tesi han sortit un parell d'estudis a Nature que proposen l'existència d'una quarta possibilitat de transducció de la senyal Wnt, a través de la via PKA/CREB en el contexte de la miogènesi de vertebrats (Pourquié, 2005).

De totes elles, la més intensament estudiada ha estat la **via canònica** que, a grans trets, depèn de la regulació dels nivells de la proteïna β -catenina (homòloga de la proteïna Armadillo de *Drosophila*) citosòlics. En absència de la senyal Wnt, la β -catenina és conduïda cap a la degradació gràcies a un complex multi-proteic que, en absència del lligand, es troba actiu. La senyal Wnt, en canvi, antagonitza el "complex de destrucció" de la β -catenina i s'estabilitzen els nivells d'aquesta al citoplasma. La β -catenina és translocada al nucli de la cèl.lula on interacciona amb factors de transcripció de la família TCF/LEF i s'activa la transcripció de gens diana. Tot i que l'esquema pugui semblar simple, el cert és que la complexitat augmenta a mida que apareixen més i més proteïnes que juguen un paper en la regulació de l'estabilitat de la β -catenina, reguladors positius i reguladors negatius de la via canònica. Els diferents estudis han demostrat amb el temps que aquesta via i els seus components *downstream* es troben altament conservats al llarg de l'escala filogenètica. (revisions: Miller, 2002; Wodarz i Nusse, 1998; Moon *et al.*, 1997a; Orsulic i Peifer, 1996).

L'activació de la via **Wnt/calci** implica un augment intracel.lular de calci i l'activació de la quinasa PKC, una quinasa depenent de calmodulina, calcineurina i del factor de transcripció NF-AT (Veeman *et al.*, 2003; Kuhl, 2004); l'activen parelles de Wnts i Fzds que no activen les altres vies, incloent Wnt5a, Wnt11 i Fzd2 (Kuhl *et al.*, 2000). Sembla ser que també hi ha participació de proteïnes G heterotrimèriques i de la CamkII (quinasa II regulada per calci/calmodulina) i PKC (Sheldahl *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Per exemple, el Frizzled-1 de rata (RFzd-1), però no el RFzd-2, pot promoure l'acumul de XWnt-8 a la superfície cel.lular i activar gens diana de la via Wnt/ β -catenina (Sheldahl *et al.*, 1999; Yang-Snyder *et al.*, 1996). En canvi, l'expressió de XWnt-5 o RFzd-2, però no XWnt-8 o RFzd-1 provoca uns augments dels fluxes de calci a peix zebra i una activació de la PKC a *Xenopus* (Sheldahl *et al.*, 1999; Slusarski *et al.*, 1997a, b). Basant-se en aquests resultats, diferents autors proposen la classificació en dues classes de proteïnes Frizzled: RFzd-1 de rata, els Frizzleds 7 i 8 de ratolí, el Fzd-1 de *Xenopus* i el Fzd-1 i -2 de *Drosophila* activen els gens diana de la via canònica però no PKC. Per contra, RFzd-2 de rata, els FZD-3, -4 i -6 de ratolí activen PKC però no la via canònica. A més, la complexitat augmenta quan certs estudis demostren que la via del Wnt-5a pot antagonitzar la via Wnt/ β -catenina: a ratolí, Wnt-5a bloqueja la transformació de cèl.lules epitelials mamàries provocada per Wnt-1 (Olson i Gibo,

INTRODUCCIÓ

1998); i a *Xenopus*, XWnt-5a bloqueja l'habilitat de XWnt-8 d'induir un eix secundari D-V (Torres *et al.*, 1996). S'especula que aquestes antagonitzacions de la via canònica doncs, els Wnts-5 les duen a terme utilitzant una via independent de la degradació de la β -catenina (Topol *et al.*, 2003). I també l'habilitat de Wnt-5a de suprimir l'activitat transformadora de Wnt-1 suggereix que Wnt-5a podria actuar com a supressor de tumors.

La **via de polaritat cel.lular ("PCP" o "planar cell polarity pathway")** controla la polaritat de les cèl.lules a base de regular l'organització del seu citoesquelet. A vertebrats la via sembla que regula els moviments cel.lulars polaritzats que tenen lloc durant la gastrulació i la neurulació (Heisenberg *et al.*, 2000; Wallingford *et al.*, 2001). I a *Drosophila* aquesta via controla la correcta orientació dels tricomes de l'ala adulta i l'apropiada disposició angular dels omatidis de l'ull, així com la divisió asimètrica d'alguns neuroblasts (Adler i Lee, 2001; Strutt, 2001 a i b). Els elements d'aquesta via que trobem en comú a vertebrats i a invertebrats són membres de la família Fzd i la proteïna citoplasmàtica Dishevelled, de la que en parlarem més endavant. Cap altre component de la via canònica s'ha demostrat que estigui implicat en aquesta via fins el moment. La via de polaritat tissular també s'anomena via de Frizzled perquè s'ha demostrat que és un receptor Frizzled el que rep i interpreta la senyal que permet que tots els tricomes s'alineïn perfectament, de forma que tots ells surten del mateix vèrtex de la cèl.lula i apunten cap a la mateixa direcció; als mutants per Frizzled aquests pèls estan tots orientats al atzar (Orsulic i Peifer, 1996). Tot i que a vertebrats el Wnt11 a través de Fzd7 podria utilitzar aquest mecanisme, encara es desconeix un lligand Wnt a *Drosophila* que empri aquesta via de polaritat cel.lular. En aquesta via no canònica, Dishevelled és activat per Frizzled i resulta en una activació de RhoA i c-Jun Kinase (JNK) per mecanismes no clars encara. Quan s'activa RhoA hi ha alteracions a l'organització del citoesquelet, donant lloc a canvis en la forma i moviment cel.lulars.

Potser de tot això doncs, una de les preguntes sense resposta clara que encara es debat és l'especificitat d'interacció entre els diferents lligands Wnt i els receptors Fzd i també quina via *downstream* activa cada una d'aquestes parelles. I l'altra qüestió en debat és com la proteïna Dsh s'activa en resposta a la interacció Wnt/Fzd i com aquesta proteïna pot discriminar si activa en un moment donat la via canònica de la qual forma part o la via de polaritat cel.lular on també es troba implicada.

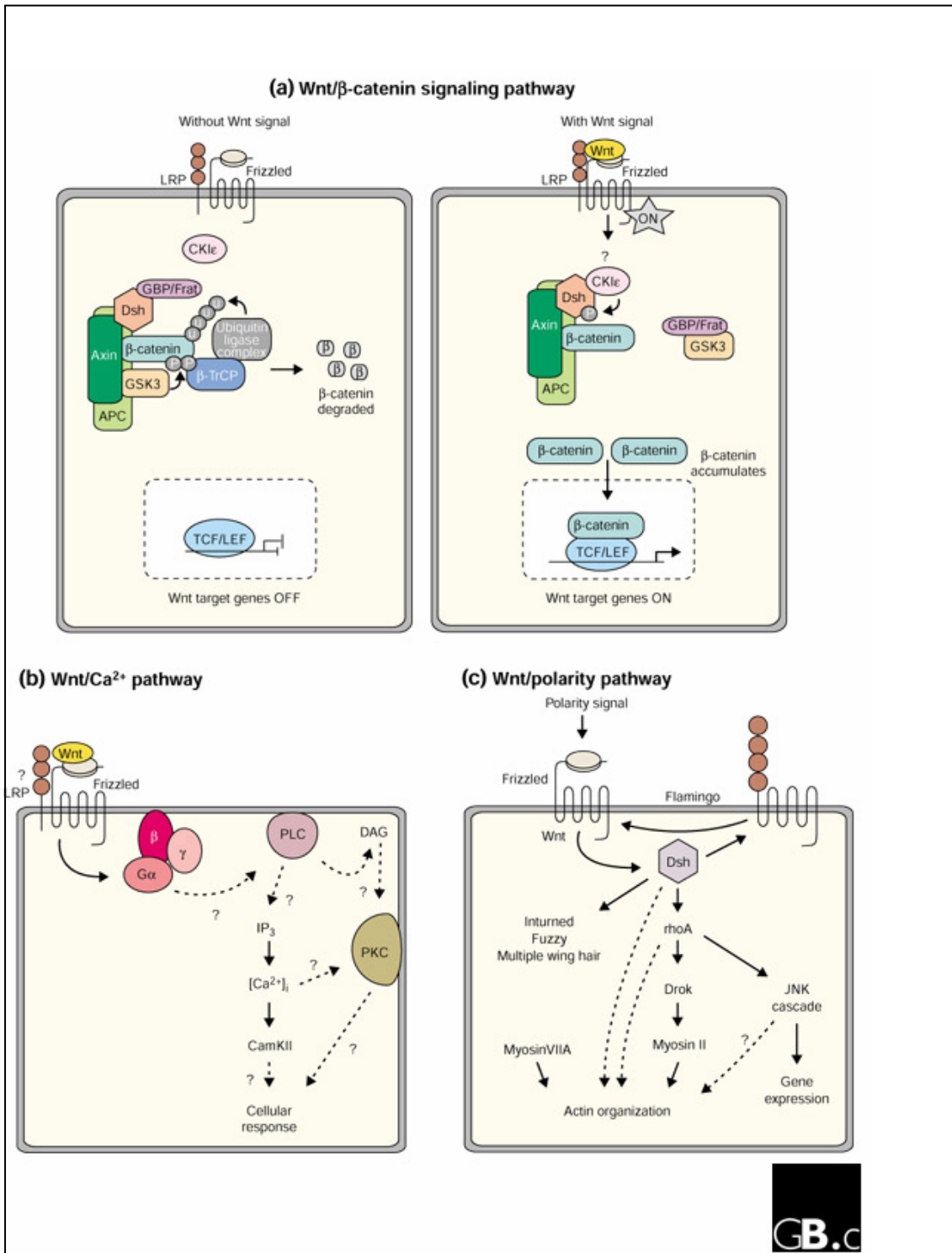


Figura 11 . Les tres vies utilitzades per molècules Wnt. Tret de Miller , 2002

1.2.5 Via o xarxa?

Però tot es complica si tenim en compte que alhora de parlar de mecanismes de senyalització és més acertat parlar de xarxes que no pas de vies linials (Martínez-Arias i Stewart, 2002). La majoria d'elements de la via Wnt no sols estan implicats en la transducció de la senyal Wnt sinó que també participen en altres processos cel·lulars o bioquímics.

Estudis de pèrdua de funció dels gens *wnt* han demostrat un alt grau de pleiotropia. A més, sembla que el paper de *wg* és en molt casos més permissiu que instructiu, per exemple en les decisions de destí cel·lular aporten senyals permissives que assegurin l'expressió estable de programes específics del desenvolupament. Les proteïnes Wnt serien un *on/off* per l'adopció d'aquests destins cel·lulars.

Per altra banda, hi ha molts exemples d'interaccions a diferents nivells de les diverses vies de senyalització:

A *Drosophila* tant Wg com Hh donen informació posicional. Als mutants de polaritat segmental, les cèl·lules prenen destins cel·lulars incorrectes, per exemple, als mutants per Wg o Hh totes les cèl·lules adquireixen destins cel·lulars anteriors i secreten pèls independentment de la seva posició. Les cèl·lules que expressen un o altre producte necessiten les unes de les altres per poder produir el respectiu lligand. Per tant, als mutants per Wg l'expressió per Hh també decau, i a la inversa (Orsulic i Peifer, 1996).

També les vies de Wnt i Notch interaccionen a molts nivells (Schubert *et al.*, 2001); Wg pot interaccionar amb Notch a nivell de les repeticions EGF 19 a 36 (Wesley, 1999). A més, la proteïna Dishevelled interacciona amb el domini intracel·lular de Notch inhibint aquesta via de senyalització (Axelrod *et al.*, 1996); i a la inversa, la senyalització Notch també pot inhibir la senyalització Wnt (Lawrence *et al.*, 2001). Per altra banda, la Presenilina 1, que activa la via Notch, inhibeix la via Wnt. I totes dues vies poden regular l'expressió de Brachyury (en concret, Brachyury és diana directa de Wnt3a) (Yamaguchi *et al.*, 1999b; Arnold *et al.*, 2000)

En casos determinats, diferents factors han de coordinar els seus rols: Marcelle *et al.*, 1997 mostren com diferents factors són necessaris per les accions coordinades del tub neural dorsal (via BMPs i Wnts), del tub neural ventral/notocorda (via Sonic-Hedgehog) i dels somites (via Noggin) per un correcte *patterning* del compartiment dorsal del somita.

A l'embrió de *Drosophila*, per la correcta diferenciació de l'epiteli de l'intestí mig calen senyals inductives tant per part de Wg com de Dpp des del mesoderm visceral cap a l'endoderm. Ambdues senyals controlen coordinadament l'expressió del gen homeòtic *labial* a l'epiteli de l'intestí mig (Steitz *et al.*, 1998). *Ultrabithorax* és un gen homeòtic que a nivell de l'intestí larvari de *Drosophila* respon també a Wg i a Dpp. De fet, cal la participació coordinada de Wg, Dpp i Ubx per la inducció endodèrmica i especificació cel.lular a l'intestí.

A més de les interaccions entre diferents vies de senyalització, els Wnts poden autoregular-se (Yu *et al.*, 1998). En diferents contextes la via Wnt pot interaccionar amb les vies on participen els FGFs i l'àcid retinoic.

1.2.6 La via canònica Wnt/ β -catenina en més detall

Com ja s'ha dit, el resultat de l'activació d'aquesta via de senyalització per part de certes parelles de Wnt/Fzd és la formació d'un *pool* de β -catenina lliure i estable al citoplasma cel.lular que serà translocada al nucli on activarà la transcripció de gens diana. En absència d'aquesta senyalització, hi ha un complex proteic que hem anomenat el "complex de destrucció" format essencialment per quatre molècules que promouen la fosforilació, ubiquïtinització i subseqüent degradació de la β -catenina via proteasoma. Quan aquest complex està actiu, els nivells de β -catenina lliures són baixos. Com veurem, però, hi ha un altre *pool* de β -catenina unit a membrana que manté els nivells estables independentment de la presència o absència de la senyal Wnt. Les quatre proteïnes identificades que formen part del complex i que directament promouen la destrucció de la β -catenina són la quinasa GSK-3 (glicogen sintasa quinasa 3), l'Axina, la proteïna APC (producte del gen "*adenomatous polyposis coli*") i la proteïna β -TrCP/Slimb. L'Axina i APC serveixen essencialment de pont entre la β -catenina i la GSK-3, l'element central del complex de destrucció, facilitant la fosforilació de la β -catenina per part de la quinasa. Per tal que la β -catenina sigui conduïda a la via d'ubiquïtinització cal que tingui lloc primer dita fosforilació en uns residus conservats de serines i treonines de l'extrem N-terminal de la β -catenina, domini anomenat "destruction box". Si aquests llocs estan mutats resulta en formes de β -catenina altament estables i constitutivament actives (Pai *et al.*, 1997; Yost *et al.*, 1996), formes trobades recentment a diferents càncers humans. D'altra banda també mutants dominants negatius de *zeste-white 3* (*zw3* o *shaggy*, ortòleg de la GSK-3 a *Drosophila*) i de GSK-3 a *Xenopus* mimetitzen l'activació constitutiva de la via Wg/Wnt. Tot i que sembla doncs que el paper crucial en aquest complex de destrucció el té la GSK-3, aquesta i la β -catenina no interaccionen directament i aleshores l'Axina i APC calen per aquesta interacció i per promoure la fosforilació. L'Axina és al seu torn regulada via fosforilació per la GSK-3; s'ha demostrat que l'Axina fosforilada s'uneix més efectivament a la β -catenina que no pas desfosforilada (Willert *et al.*, 1999 a i b). APC és un gen supressor de tumors i les seves mutacions s'han trobat a múltiples càncers colorectals; APC és clarament un regulador negatiu de la via canònica, promovent la degradació de la β -catenina i funcionant de forma similiar a l'Axina (Moon *et al.*, 1997a). Alguns autors suggereixen també que APC podria estar implicat en transportar la β -catenina dins i fora del nucli (Henderson i Fagotto, 2002). Per últim, com la fosforilació de la β -catenina

estimula la seva ubiquïtinització?: un component del complex "SCF ubiquitin ligase", la proteïna β -TrCP/Slimb, s'uneix a la β -catenina fosforilada que serà ubiquïtinitzada i d'aquesta forma dirigida al 26S proteasoma per la seva proteolisi (Orford *et al.*, 1997).

Com en presència de la senyal Wnt s'inactiva aquest complex de destrucció? Les proteïnes Dishevelled (Dsh) i GBP/Frat1 protegeixen la β -catenina de la degradació. Genèticament Dsh és el component intracel.lular més *upstream* de la via Wnt/ β -catenina i s'activa en resposta a la senyalització Wnt (Noordermeer *et al.*, 1994; Siegfried i Perrimon, 1994; Siegfried *et al.*, 1994). Es tracta d'una fosfoproteïna que funciona en associació amb altres proteïnes senyalitzadores (Li *et al.*, 1999) i s'uneix a l'Axina i aquesta interacció podria resultar en una *downregulació* de la GSK-3. L'altra protectora de la β -catenina, la GBP (GSK-3 binding protein) o el seu homòleg a mamífers Frat1, funcionen com a reguladors positius de la via; a *Xenopus*, la sobreexpressió de GBP/Frat1 mimetitza l'activació de la via Wnt/ β -catenina i produeix la formació d'un eix D-V ectòpic (Yost *et al.*, 1998).

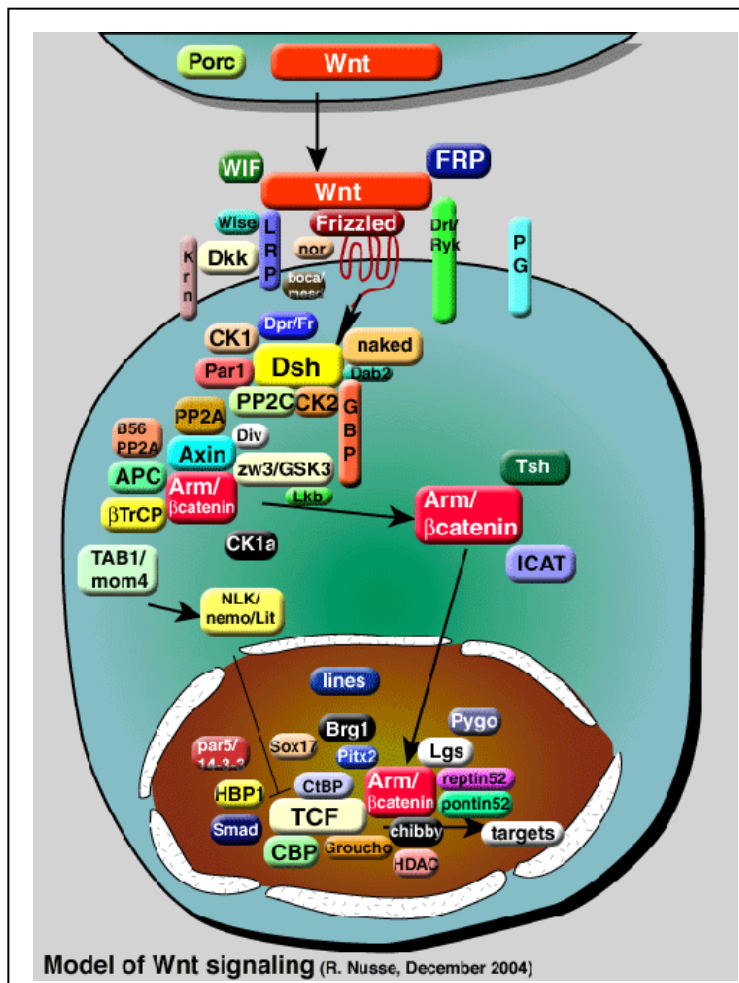


Figura 12. Model de la via canònica Wnt. Tret de Wnt web page

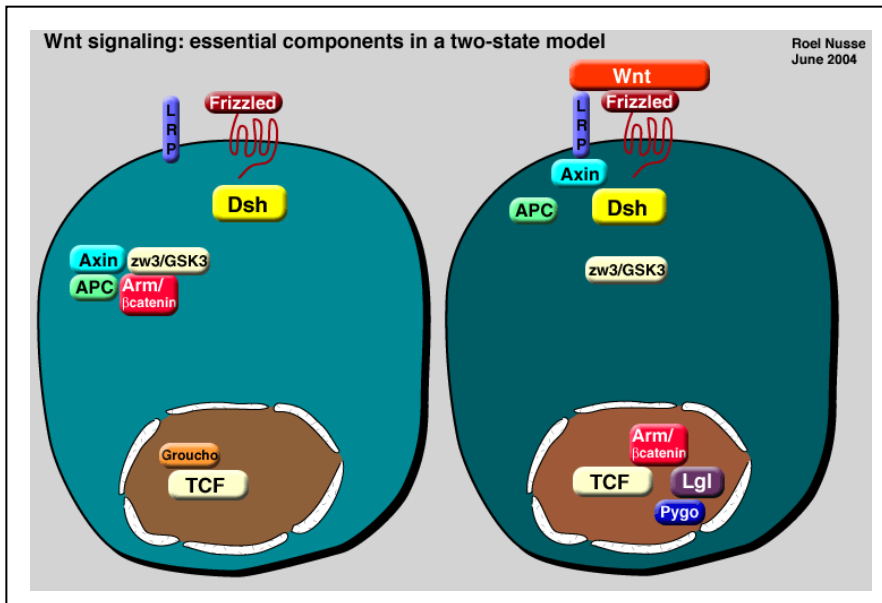


Figura 13. Esquema de la via amb els seus components bàsics, en absència i en presència de lligand. Tret de Wnt web page

Després d'aquest breu resum caldria dir que només hem posat èmfasi en alguns dels components més estudiats de la via canònica, per entendre el funcionament general de la via, sense aturar-nos en molts dels elements que, com s'il·lustra a la figura 12, juguen algun paper produint activacions o inhibicions via múltiples interaccions proteiques. La figura 13, en canvi, mostra només una visió simplificada del funcionament de la via en presència i absència d'un lligand Wnt. D'altra banda, però, i per enfocar el present treball, sí que m'agradaria aturar-me en tres elements *downstream* de la via canònica, ja esmentats anteriorment. És per això que al primer gran apartat de Resultats i Discussió com veurem he analitzat amb més detall les característiques i funcions descrites de:

- 1- La β -catenina
- 2-El regulador negatiu: la GSK-3
- 3-Els factors de transcripció associats: família TCF/LEF

1.2.7 Funcions diverses sota el control de la senyalització Wnt

A *Drosophila* :

El gen *wg* de *Drosophila* és un dels membres de la família Wnt més ben caracteritzat. La seva funció com a gen de polaritat segmental va ser descoberta fent *screenings* genètics de mutacions zigòtiques letals que afectaven el patró larvari de la cutícula. A l'embrió de *Drosophila*, *wg* es necessita per la formació de les fronteres dels parasegments i pel manteniment de l'expressió d'*engrailed* a les cèl.lules adjacents. L'epidermis dels embrions mutants per *wg* mostra una segmentació rudimentària que es tradueix en un patró de cutícula anormal. Embrions mutants per gens com *porcupine* (*porc*), *dishevelled* (*dsh*) i altres mostren un fenotip similar, mentre que mutacions al gen *zeste-white 3* (*zw3*), homòleg de GSK-3, mostren el fenotip oposat. L'anàlisi dels dobles mutants indicava que aquests gens cooperen en una via per transduir la senyal Wg.

A vertebrats:

Ja hem esmentat la implicació de la via Wnt en la formació dels eixos a vertebrats. Trànscrips que codifiquen per la β -catenina, Dsh, GSK-3 i Fzd es troben ja presents a ous de *Xenopus*, i la seva expressió ectòpica (o inhibició en el cas de la GSK-3) origina la duplicació de l'eix A-P (antero-posterior), com la produïda per alguns dels Wnts (segons dèiem a l'apartat 1.2.4). Ara bé, sembla que cap dels Wnts, ni tan sols XWnt8b, que és l'únic XWnt matern capaç d'induir un eix ectòpic complet, està implicat en la formació de l'eix endogen de l'organisme perquè cap d'ells s'expressa ni al lloc correcte ni en el moment adequat. En canvi, hi ha moltes evidències de que elements *downstream* de la via Wnt són essencials per la inducció de l'eix primari (Larabell *et al.*, 1997; Molenaar *et al.*, 1996). Hi ha molts estudis centrats en aquest aspecte del paper que la via Wnt pot tenir en l'especificació dels eixos corporals; per exemple, a Fagotto *et al.*, 1997, demostren que aquesta via també es troba implicada al centre dorsaltzador de Nieuwkoop, requerint β -catenina materna. El gen *siamois* també s'expressa a dit centre de Nieuwkoop. Els autors d'aquest article fan entre d'altres dos experiments: en primer lloc sobreexpressen cadherines i observen que segreguen la β -catenina a la membrana de la cèl.lula i així es bloqueja la senyalització; en segon lloc, per RT-PCR detecten la inducció de l'expressió de *siamois* (és un gen de tipus Hox), activada per Wnt. En aquest article també posicionen la GSK-3 *upstream* de la β -catenina. A

INTRODUCCIÓ

Xenopus, GSK-3 té activitat ventralitzadora i la forma dominant negativa indueix duplicació axial. La sobreexpressió de GSK-3 pot inhibir la inducció axial per part de Wnt indicant que GSK-3 actua *downstream* de Wnt.

Diferents molècules senyalitzadores presenten capacitats dorsalitzadores: Wnts, membres de la família dels TGF- β s com *VGL* o *Activin* i *Noggin*. A més, *Vgl* i *Activin* són inductors de mesoderm i *Noggin* és un neuralitzador. Pel que fa als Wnts: *Wnt1*, *Wnt8* i *Wnt8B* són potents dorsalitzadors; cap dels Wnts se sap que tingui propietats inductores del mesoderm tot i que en etapes més avançades se sap que controlen el *patterning* del mesoderm ventral durant la gastrulació i el *patterning* del SNC (sistema nerviós central). A Holland i Holland 2001, en un estudi d'enfoc més evo-devo (evolució i desenvolupament), es proposa l'existència, tot i la gran diversitat de formes de gastrulació als deuterostoms, d'un centre senyalitzador posterior al deuterostom ancestral establert a l'estadi de blàstula tardana-gàstrula primerenca per les vies de Wnt i Notch, i per factors de transcripció com *Caudal* i *Brachyury*. A tunicats només restarien vestigis d'aquest centre on s'hi ha trobat mRNA de *wnt-5* i *β -catenina*

A vertebrats la via Wnt es troba implicada tant al *patterning* A-P com al D-V (dorso-ventral) (per mig de la β -catenina). A tunicats i a l'amfiox sembla ser que només estaria implicat al *patterning* A-P gràcies a l'existència del centre organitzador posterior que esmentàvem més amunt, centre que inclouria molècules com Wnts, Notch, *brachyury* i *Caudal*. Sembla doncs que el paper de les proteïnes Wnt al *patterning* D-V seria una innovació dels vertebrats.

A part del seu paper a l'especificació dels eixos corporals, la via Wnt a vertebrats també participa per exemple a la miogènesi. Si s'inhibeix *XWnt-8* es bloqueja l'expressió de *MyoD* i d'altres factors de transcripció a l'estadi de gàstrula. També a ratolí s'ha demostrat aquest paper en la somitogènesi i miogènesi (Hoppler *et al.*, 1996).

Un altre focus d'estudi és la implicació de la via al desenvolupament neural. A *Drosophila*, *Wg* es troba implicat en la formació del SN i de l'ull (Cadigan i Nusse, 1996). L'anàlisi dels defectes neurals resultants de la disrupció de *Wnt-1* evidenciaren que a vertebrats aquest gen també jugava un paper en el desenvolupament neural. Tot sembla indicar doncs que *Wnt-1* alhora que manté l'expressió d'*Engrailed*, conserva també entre *Drosophila* i vertebrats un important paper en l'especificació de destí i funció neural. *Wnt3a* té també un paper general en l'especificació de destí neural al llarg de l'eix A-P. Pel que fa a l'organogènesi, els gens d'aquesta família s'expressen no només durant l'embriogènesi sinó també a diferents òrgans de l'adult. *Wnt4* a ratolí s'expressa

al mesènquima del ronyó i la disrupció d'aquest gen produïa en algun cas ratolins sense ronyons; a les glàndules mamàries trobem com a mínim 6 Wnts diferents. Es pot trobar una taula completa dels mutants Wnt a ratolí a Logan i Nusse, 2004.

Gene	Organism	Phenotype
Wnt-1	Mouse	Loss of midbrain and cerebellum
Wnt-2	Mouse	Placental defects
Wnt-3A	Mouse	Lack of caudal somites and tailbud
Wnt-4	Mouse	Kidney defects
Wnt-7A	Mouse	Ventralization of limbs
wingless	<i>Drosophila</i>	Segment polarity, limb development, many others
DWnt-2	<i>Drosophila</i>	Muscle defects, testis development
lin-44	<i>C. elegans</i>	Defects in asymmetric cell divisions
mom-2	<i>C. elegans</i>	Defects in endoderm induction and spindle orientation
<p>Taula 2 Fenotips de mutacions Wnt a ratolí, <i>Drosophila</i> i <i>C.elegans</i> (revisat per Wodarz i Nusse, 1998). Una versió més completa pot ser trobada a la pàgina web dels Wnts. Wg seria l'ortòleg dels Wnt-1 de vertebrats; lin-44 seria un Wnt-10 i mom-2 possiblement un Wnt-1.</p>		

Després d'aquest breu recull d'algunes de les funcions dels gens Wnt a vertebrats, només caldria recordar que en molts casos són rols realitzats gràcies a interaccions combinatòries amb altres vies tal i com s'il.lustra a la taula 3, treta de Moon *et al.*, 1997a.

INTRODUCCIÓ

System	Factors cooperating with WNT	WNT alone	Factor alone	WNT and factor
Mammary carcinogenesis in mice ³¹	INT2/FGF3	15% of males with mammary tumors	No tumors	Nearly all have tumors
Mesoderm induction in <i>Xenopus in vitro</i> ^{30,32}	bFGF Activin	No induction	Ventral mesoderm	Dorsal mesoderm
Myogenesis in chick embryo explants of pre-segmental plate mesoderm ³³	Sonic hedgehog	No inducitor	No inducitor	Induction of MYOD and myosin heavy chain
Neural induction in <i>Xenopus in vitro</i> ³⁴	Noggin Follistatin Chordin	No induction	Anterior neural-gene induction	Suppress anterior, induce posterior neural genes

Taula 3 . Diferents contextes on interaccionen varies vies de senyalització. Tret de Moon *et al.*, 1997a

Més recentment, s'ha demostrat el paper que aquesta via de senyalització té en l'auto-renovació de les cèl.lules mare hematopoiètiques (Reya *et al.*, 2003). Els autors demostren que aquesta via és un dels factors responsables de l'habilitat de les HSCs (*hematopoietic stem cells*) de renovar-se elles mateixes i donar lloc als diferents llinatges cel.lulars de la sang.

A *C.elegans* :

La via de senyalització Wnt té el seu paper també al nèmatode *C.elegans*, principalment controlant l'especificació de destí cel.lular i la determinació de polaritat cel.lular i la migració. A *C.elegans* existeixen almenys 5 gens Wnt: Mom-2, Lin-44, Egl-20, CWN-1, CWN-2. Lin-44 seria un Wnt-10, CWN-1 seria un Wnt-4 i CWN-2 seria un Wnt-5 segons l'estudi filogenètic de Pru D'Homme, 2002. El primer d'ells es troba implicat en l'establiment de la polaritat a l'embrió. És doncs una senyal Wnt la que de part de la cèl.lula P2 a l'estadi embrionari de quatre cèl.lules polaritza la cèl.lula EMS que aleshores es dividirà en les dues cèl.lules filles E (línia endodèrmica) i MS (línia mesodèrmica) segons mostrem a la figura 14. Tot i que hi trobem ortòlegs de la majoria de membres de les anomenades vies canònica i no canònica, sorprenentment ja els primers estudis genètics d'aquesta via de senyalització a *C.elegans* demostraren diferències importants pel que fa a la ja prèviament establerta via canònica entre *Drosophila* i *C.elegans* : tant la inducció embriònica de l'endoderm com l'especificació de moltes divisions cel.lulars asimètriques durant el desenvolupament del cuc depenen

d'una senyal Wnt però que desemboca en una repressió més que en una activació del factor de transcripció de la família TCF/LEF-1, Pop-1. Però més recentment, s'ha vist que tret d'aquestes vies divergents de senyalització Wnt, *C.elegans* també té l'anomenada via canònica que converteix Pop-1 en activador i controla l'expressió de molts gens amb homeobox. Com veurem més endavant, hi trobem altres peculiaritats com la presència de tres β -catenines amb funcions diferenciades (Korswagen, 2002). Altres components de la via Wnt han estat clonats també al nemàtode (la pàgina web *Wnt Genes* ho recull en taules molt informatives); així, per exemple, s'han trobat tres gens que codifiquen per proteïnes Fz diferents i dues proteïnes amb domini HMG que codifiquen per factors de transcripció implicats a la via Wnt a *C.elegans*, així com un homòleg de la proteïna Dsh.

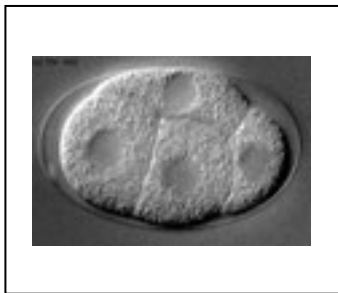
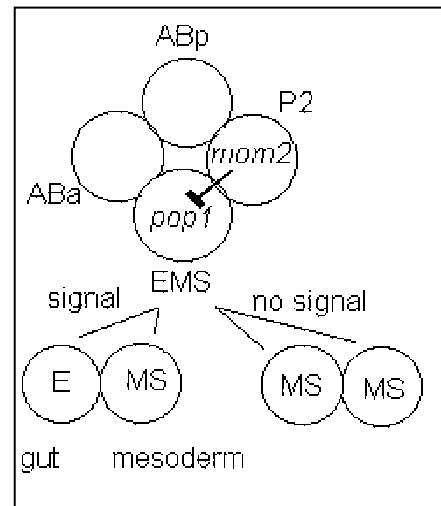


Figura 14. Inducció endodèrmica a l'estadi de 4 cèl.lules a *C.elegans*. Tret de Wnt web page



A cnidaris:

Hem parlat una mica més amunt de la via Wnt en l'especificació axial als vertebrats. Doncs bé, a l'article de Hobmayer *et al.*, 2000, es demostra la implicació d'aquestes proteïnes a la formació de l'eix al cnidari *Hydra* i es postula que aquest mecanisme de senyalització podria haver estat central en l'evolució de la diferenciació axial ja als primers organismes multicel.lulars. En aquest estudi mostren el clonatge i anàlisi d'expressió de Wnt, Dsh, GSK-3, β -catenina i Tcf/Lef. A *Hydra*, Wnt i Tcf s'expressen al putatiu organitzador del cap (extrem de l'hipostoma) (figura 15). Quan aquest centre organitzador s'estableix durant la formació de gemmes o en la regeneració del cap, Wnt, β -catenina i TCF són *activats* transcripcionalment. *Hydra* pot desenvolupar-se a partir d'agregats i es demostra que els organitzadors formats *de novo*

INTRODUCCIÓ

quan es torna a establir un patró a partir d'aquests agregats estan definits per dominis d'expressió de Wnt i Tcf.

A diferència d'*Hydra*, considerat un cnidari força derivat, on fins el moment un sol Wnt ha estat caracteritzat (ortòleg dels membres de la subfamília Wnt-3), a *Nematostella vectensis* (Kusserow *et al.*, 2005) el nombre s'eleva a 12 Wnts diferents, suggerint una complexitat d'aquesta família ja existint molt aviat en l'evolució dels metazous. Els patrons d'expressió dels gens Wnt durant l'embriogènesi d'aquest cnidari basal suggereixen funcions diferents durant la gastrulació i desemboquen en patrons d'expressió solapants al llarg de l'eix primari de l'estadi de larva plànula.

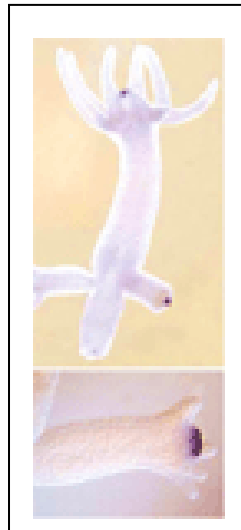


Figura 15. Hibridació *in situ* whole-mount per visualitzar l'expressió de HyTCF durant la morfogènesi de pòlips intactes a *Hydra*. Modificat de Hobmayer *et al.*, 2000

1.2.8 Subfamília Wnt-5 a diferents organismes

Centrant-nos ara en concret en la subfamília dels Wnt-5 podríem fer el següent breu recull:

La proteïna Wnt-5 (*Dwnt-5* (= *Dwnt-3*)) de *Drosophila* juga un paper essencial en establir la correcta arquitectura del cordó neural ventral embriònic (Fradkin *et al.*, 2004). Aquest estudi presenta un anàlisi detallat de la localització del mRNA i la proteïna al SNC de *Drosophila* durant gran part del desenvolupament de l'embrió i demostren la funció crucial que duu a terme en el desenvolupament dels tractes axonals

del SNC, permetent, en concret, una correcta defasculació o separació de les projeccions axonals primerenques.

En el cas de l'ascídia *Halocynthia roretzi*, diferents experiments indiquen que HrWnt-5 deu regular el moviment morfogenètic de les cèl.lules de la notocorda durant l'embriogènesi d'aquests organismes (Sasakura i Makabe, 2001).

L'amfiox té un primordi de cua inequívocament homòleg al dels vertebrats. Es coneix l'expressió d'*AmphiWnt5*, d'*AmphiWnt3* i *AmphiWnt6*; aquests tres gens tenen els seus homòlegs a vertebrats on són reconeguts com a marcadors del primordi de cua. A l'estadi de larva de 3 dies en concret, *AmphiWnt5* s'expressa també a la vesícula cerebral (Schubert *et al.*, 2001).

En el cas del ratolí, la mutació de pèrdua de funció de *Wnt5a* provocava defectes al creixement a la cara en desenvolupament, orelles i genitals. A Yamaguchi *et al.*, 1999 a, s'indica com *Wnt5a* regula una via comú a moltes estructures el desenvolupament de les quals requereix extensió a partir de l'eix primari corporal. En aquests ratolins mutats s'observava una reducció del nombre de cèl.lules proliferants a la zona de progrés i a la línia primitiva del mesoderm, la qual cosa suggeria que una de les funcions de *Wnt5a* és regular la proliferació de cèl.lules progenitores.

Els experiments amb *Xwnt-5A* de *Xenopus* mostraren que la sobreexpressió d'aquest gen conduïa a malformacions complexes diferents d'aquelles provocades per l'expressió ectòpica de *Xwns -1, -3A o -8*. Aquests fenotips no eren resultat de *XWnt-5A* actuant com a agent inductor perquè la seva sobreexpressió no rescatava estructures dorsals a embrions UV-irradiats. Tot feia indicar que, en canvi, podria actuar com a agent que alterava els moviments morfogenètics (Moon *et al.*, 1993), funció assignada com hem dit abans als membres de l'anomenada classe XWnt5a.

Al cnidari *N.vectensis*, les hibridacions *in situ whole-mount* revelen que *NvWnt5* s'expressa a l'endoderm oral des de l'estadi de gàstrula tardana (Kusserow *et al.*, 2005) (figura 16).

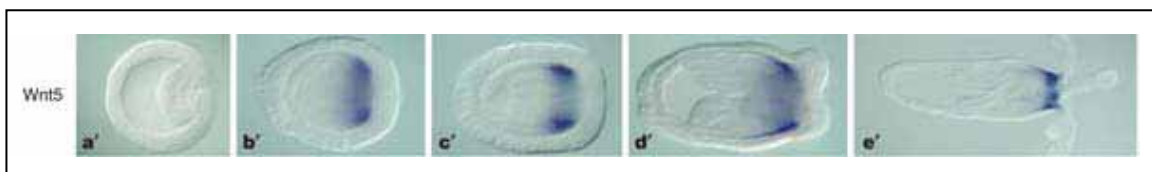


Figura 16. Expressió d'un Wnt de la subclasse Wnt5 durant el desenvolupament de *N.vectensis*. Tret de Kusserow *et al.*, 2005

1.2.9 La via Wnt i el càncer i altres malalties humanes

Moltes de les vies de senyalització que regulen processos del desenvolupament s'han trobat sovint implicades a diverses malalties humanes, entre elles el càncer. Aquest fet reforça el concepte de que el càncer no és més que una forma de desenvolupament errònia. Com ja hem esmentat, l'àrea de recerca inicial relacionada amb els Wnts va ser la possible implicació d'aquestes molècules en càncer ja que el membre fundador de la família va ser l'anomenat *int-1* (*Wnt-1*) de ratolí, identificat com a proto-oncogen que s'activava per la integració de virus de tumors mamaris de ratolí a tumors mamaris. Ara bé, tot i que avui dia aquest camp de recerca és tan ampli i podríem dedicar-hi moltes pàgines a parlar-ne, nosaltres només hi dedicarem aquest subapartat, ja que el treball que presentem es centra en les funcions de la via Wnt en el desenvolupament normal dels organismes. Per començar, la taula 4 resumeix unes quantes anormalitats i malalties degeneratives causades per la desregulació de la via Wnt: algunes d'elles són degudes a mutacions en elements extracel·lulars de la via com algun lligand Wnt o en el receptor LRP. També succeeixen efectes dramàtics per la mutació d'algun element intracel·lular de la via com Axin2, i sens dubte, APC (recordem: producte del gen *adenomatous polyposis coli*) identificat com a gen supressor de tumors i les mutacions del qual s'han trobat a múltiples càncers colorectals; de fet, és la malaltia més coneguda implicant una mutació a la via Wnt, malaltia anomenada FAP (*familial adenomatous polyposis*), d'herència dominant autosòmica que consisteix en la formació de múltiples pòlips al còlon i al recte (Nishisho *et al.*, 1991). Moltes de les mutacions que porten a una activació constitutiva de la via Wnt poden provocar finalment un càncer. APC és un regulador negatiu de la via i les mutacions en aquest i altres gens del complex destructor de la β -catenina com l'Axina produeixen una desregulació dels nivells de β -catenina a la cèl·lula, fet que s'ha relacionat amb el càncer (mutacions en certs llocs de fosforilació de la pròpia β -catenina també poden ser causa de càncer) i, per tant, considerant la β -catenina com a proto-oncogen (Giles *et al.*, 2003; Behrens i Lustig 2004).

Per últim, segons Taipale i Beachy, 2001 i altres autors, un càncer es pot considerar una malaltia de les cèl·lules sòca i també en aquest cas hi ha estudis que parlen de que la via de senyalització Wnt sembla que juga un paper clau en regular les decisions de les cèl·lules sòca a proliferar o a autorenovar-se. La pèrdua de TCF4 o la sobreexpressió de Dkk al còlon promou la pèrdua de cèl·lules sòca a les criptes del

còlon (Korinek *et al.*, 1998 a i b; Kuhnert *et al.*, 2004). També abans hem comentat la capacitat de Wnt3a *in vitro* en promoure l'autorenovació de les cèl.lules mare hematopoètiques (Reya *et al.*, 2003).

TABLE 5 Human genetic diseases and Wnt signaling components

Gene	Disease	References
<i>WNT3</i>	Tetra-amelia	(Niemann et al. 2004)
<i>LRP5</i>	Bone density defects Vascular defects in the eye (osteoperosis-pseudoglioma syndrome, OPPG; familial exudative vitreoretinopathy, FEVR)	(Boyden et al. 2002, Gong et al. 2001, Little et al. 2002, Toomes et al. 2004)
<i>FZD4</i>	Retinal angiogenesis defects (familial exudative vitreoretinopathy, FEVR)	(Robitaille et al. 2002 Xu et al. 2004, Toomes et al. 2004)
<i>Axin2</i>	Tooth agenesis Predisposition to colorectal cancer	(Lammi et al. 2004)
<i>APC</i>	Polyposis coli, colon cancer	(Kinzler et al. 1991, Nishisho et al. 1991)

Taula 4. Diferents malalties humanes on hi ha implicació de la via Wnt. Tret de Logan i Nusse 2004

2. LA PLANÀRIA COM ORGANISME MODEL

2.1 L'organisme

2.1.1 Posició filogenètica i taxonomia dels Plathelminths

Fins fa una mica menys de 10 anys, les úniques eines disponibles per a la realització d'arbres filogenètics eren les morfològiques i embriològiques. Això va provocar, inicialment, i degut a la seva simplicitat morfològica, que els Plathelminths fossin considerats organismes primitius, ocupant una posició privilegiada a la base dels triblàstics. Una de les visions clàssiques estava basada en la hipòtesi del "planuloid-aceloid" (Hyman, 1940; Hyman, 1959), sobre l'origen dels Bilateria, o triblàstics amb simetria bilateral, segons la qual els bilaterals s'haurien originat a partir de l'ancestre "planuloid" molt similar a la larva plànula dels cnidaris. L'"aceloid" seria una forma que evolucionà a partir de la forma "planuloid" i a partir de la qual apareixeren la resta de triblàstics. Els primers triblàstics, de gran simplicitat morfològica, no presentarien doncs ni celoma ni segments i tindrien un intestí cec, característiques que comparteixen els Plathelminths actuals i raó per la qual eren situats en una posició basal a l'arbre filogenètic, representant la transició entre diblàstics i triblàstics i constituint un grup germà dels celomats bilaterals, precedint la divergència entre protostoms i deuterostoms (Hyman, 1951; Salvini-Plawen, 1978; Willmer, 1990; Nielsen, 1995). Almenys evolutivament parlant representaven doncs un focus d'interès molt important. Existia també una hipòtesi contrària que considerava que l'ancestre dels Bilateria havia de ser celomat i segmentat, i que, per tant, posicionava als Plathelminths com a branca lateral de l'arbre considerant que la segmentació i el celoma s'havien perdut secundàriament (Remane, 1963).

Però aquest concepte d'ancestralitat i basalitat ha canviat mercès a les dades de filogènia molecular basades en la seqüència del rDNA ribosomal 18S, segons les quals els Plathelminths serien un llinatge que apareix aviat dins la línia dels protostoms (Carranza *et al.*, 1997; Aguinaldo *et al.*, 1997), concretament a la base dels lofotrocozoous (figura 17, B). Aquesta nova hipòtesi està força acceptada, tot i que encara és un tema que genera controvèrsia. Les dades del rDNA ribosomal 18S s'han vist recolçades posteriorment amb les dades dels gens Hox (Bayascas *et al.*, 1998) i d'altres com la miosina (Ruíz-Trillo *et al.*, 2002), l'ordre dels gens mitocondrials (Ruíz-

INTRODUCCIÓ

Trillo, 2004) i dades del rDNA ribosomal 28S (Mallatt i Winchell, 2002) que reforcen aquesta última hipòtesi i que es tractaria d'organismes simples, no un grup germà dels Bilaterals, però sí el primer grup descendent del llinatge dels lofotrocozous. Les planàries d'aigua dolça, els organismes model utilitzats en aquest treball, són formes de vida lliure (Classe Turbellaria) del filum Platihelminths (cucs plans). Pertanyen a l'Ordre Seriata, al SubOrdre Tricladida (nom que deriva del fet que presenten un sistema intestinal que es divideix en tres branques principals), i a l'InfraOrdre Paludícola, fent el terme referència a l'hàbitat que solen ocupar. Per aquest treball hem utilitzat una raça asexuala. Pel que fa a la polifília o monofília dels Platihelminths, també ha estat un tema molt discutit. La teoria de la monofília no està massa clara degut a la manca de sinapomorfies evidents en aquest grup; el tipus de crivellatge embriònic, dels orígens del mesoderm, de l'estructura del sistema nerviós i de les dades del rDNA18S recolzen per una banda que el grup dels Acels, que sempre havien estat considerats un ordre dels Platihelminths, no pertanyen a dit grup sinó que representarien la branca més inicial dels Bilaterals i que els Platihelminths serien polifilètics (Ruiz-Trillo *et al.*, 1999).

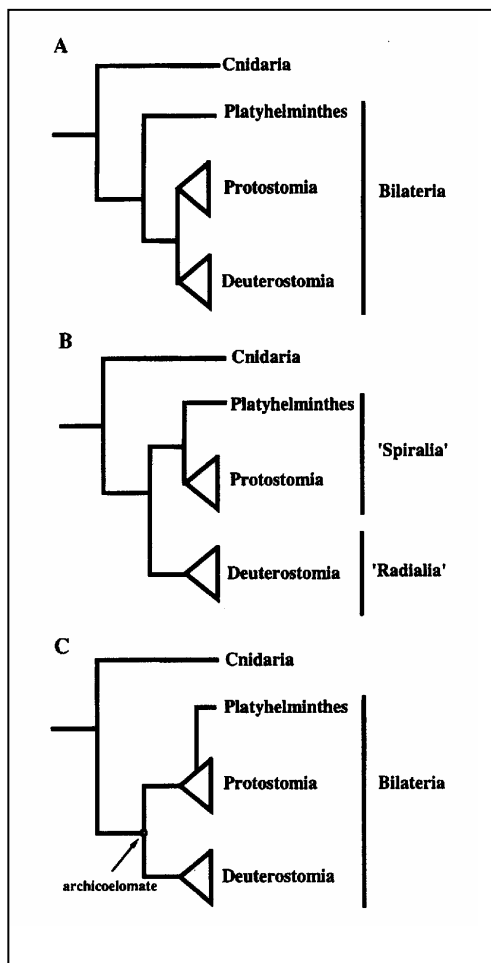


Figura 17. Hipòtesis filogenètiques controvertides sobre l'origen dels Platihelminths i la condició "acelomat". **A:** aquest arbre assumeix que la condició "acelomat" és un caràcter primitiu dins dels tripoblàstics. Els Platihelminths serien doncs un grup germà de la resta dels bilaterals, que, al seu torn es dividirien en dos grups d'organismes celomats, els protostoms i els deuterostoms (després de Hyman, 1951). **B:** aquest arbre mostra la separació molt temprana dels Bilaterals en dos grups, els "Spiralia" dels que formarien part els Platihelminths, i els "Radialia". En aquest arbre la condició "acelomat" és primitiva dins dels "Spiralia" triblàstics, sent doncs els Platihelminths el primer grup descendent d'aquest llinatge però no el grup germà dels Bilaterals. **C:** aquest arbre proposa que la condició "acelomat" va aparèixer per processos de neotènia d'estadis del desenvolupament de protostoms, abans que l'aparició de cavitats celòmiques (enterocels). Els enterocels dels deuterostoms serien homòlegs a les cavitats gàstriques dels celenterats diblàstics, mentre que les cavitats celòmiques dels dels protostoms (squizocels) serien derivades. L'ancestre hipotètic dels bilaterals seria un « arquicelomat » (després de Siewing 1980 ; Rieger 1985). Tret de Carranza et al., 1997

2.1.2 Morfologia i anatomia interna

Degut a que la morfologia i anatomia interna de la planària s'ha revisat sovint en altres tesis doctorals, nosaltres intentarem fer-ne un resum. Així doncs, les planàries són organismes tripoblàstics, acelomats, no segmentats i comunment aplanats dorsoventralment. Presenten simetria bilateral i polaritat anteroposterior manifestada per una clara cefalització del SNC, del qual sí que en parlaré amb més detall més endavant. Aquest treball està realitzat concretament amb l'espècie *Girardia tigrina*. Els Plathelminths tenen una mida que oscil·la entre els pocs mil·límetres, uns 15 en el cas de *G. tigrina*, fins a mig metre en el cas de les planàries del llac Baikal. Tenen un cos tou, sense estructures circulatòries, respiratòries (l'oxigen l'obtenen per difusió) ni esquelètiques. Es pensa que la forma plana és una resposta adaptativa a la manca d'aparell circulatori i respiratori.

El sistema excretor està constituït per una xarxa elaborada de cèl·lules flamígeres que estan connectades per condutes ciliats, i està implicat tant en l'osmorregulació com en l'excreció pròpiament dita.

La paret corporal està constituïda per una epidermis monoestratificada ciliada ventralment, dins de la qual s'intercalen cèl·lules rabdítiques especialitzades en la secreció del moc, que l'animal utilitza per moure's, protegir-se, adherir-se als substrats i capturar preses. La musculatura la constitueixen fibres en disposició circular, oblíqua i longitudinalment respecte l'eix principal, més desenvolupades a nivell ventral per atendre les seves necessitats motrius. En aquesta posició ventral hi trobem cèl·lules epitelials ciliades que ajuden a la locomoció. Tenen un intestí cec amb tres branques principals, sense anus i una faringe com a constituents de l'aparell digestiu. El menjar és ingerit a través de dita faringe, molt musculada i extensible, que fa alhora de boca i d'anús de l'animal.

Les planàries d'aigua dolça tenen modalitats de reproducció asexual, sexual i mixta. La reproducció asexual té lloc per fissió transversal; els dos fragments resultants regeneren les parts que falten. Les espècies amb reproducció sexual són hermafrodites amb fertilització creuada. El sistema reproductiu és molt complexe i consisteix en un parell d'ovaris situats ventralment darrera dels ganglis cefàlics, amb nombrosos testicles situats dorsolateralment (per a més informació vegeu Rieger *et al.*, 1991) (figura 18 C).

El parènquima és una massa de teixit que omple l'espai existent entre l'epidermis i l'intestí. És un teixit poc organitzat que fa de suport als òrgans interns i on

INTRODUCCIÓ

hi podem trobar uns sis o set tipus cel·lulars diferenciats (Baguña, 1981) i un tipus de cèl·lula indiferenciada, petita i de forma rodona o ovoide: el neoblast.

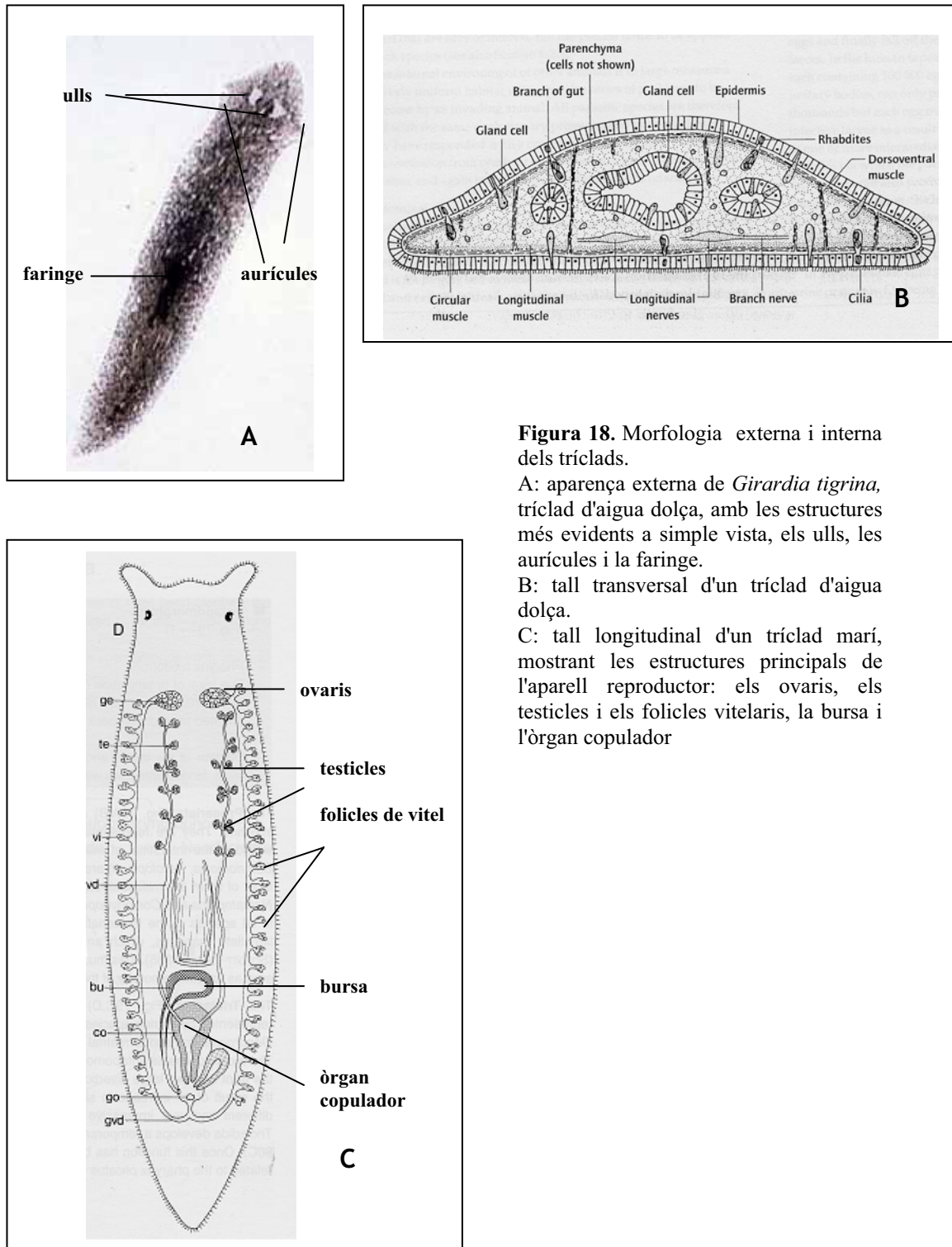


Figura 18. Morfologia externa i interna dels trícclads.

A: aparença externa de *Girardia tigrina*, trícclad d'aigua dolça, amb les estructures més evidents a simple vista, els ulls, les aurícules i la faringe.

B: tall transversal d'un trícclad d'aigua dolça.

C: tall longitudinal d'un trícclad marí, mostrant les estructures principals de l'aparell reproductor: els ovaris, els testicles i els folicles vitel·laris, la bursa i l'òrgan copulador

2.2 La regeneració de les planàries. Model epimòrfic-morfalàctic

Els neoblasts, doncs, són cèl.lules de 5-8µm de diàmetre, indiferenciades i amb una relació nucli/citoplasma molt alta (figura 19). La manca de marcadors adequats però fa que encara sigui difícil determinar quina és la heterogeneïtat d'aquesta població, és a dir, saber quines cèl.lules són neoblasts i quines són només descendents de neoblasts determinades a llinatges cel.lulars específics. L'esquema de la figura 20 il.lustra la compartimentalitat i un model d'amplificació de la població de neoblasts. Encara ara es barregen dues hipòtesis sobre la font dels neoblasts: una, la dediferenciació de cèl.lules somàtiques, i l'altra, l'autorenovació.

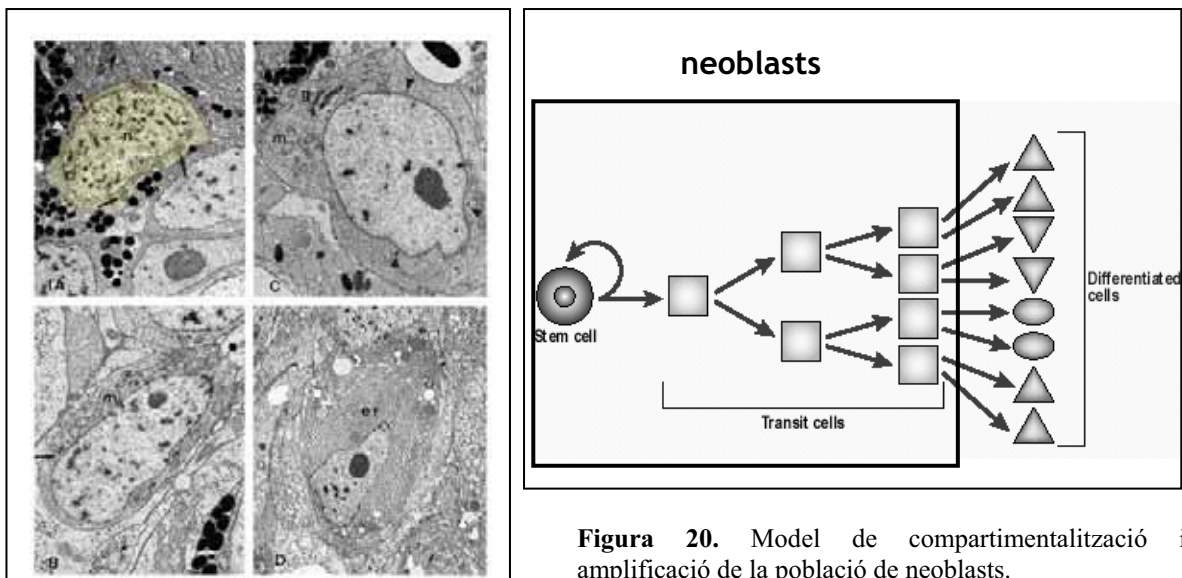


Figura 19. Imatges de neoblasts de microscopia electrònica des d'un estadi molt indiferenciat a estadis més avançats de diferenciació, amb l'aparició de cossos cromatoids i altres orgànuls cel.lulars. Tret d'Auladell *et al.*, 1993

Figura 20. Model de compartimentalització i amplificació de la població de neoblasts.

Clàssicament, els processos regeneratius s'han classificat en dos tipus, l'epimorfosi i la morfàlaxi. La primera suposa divisió cel.lular a prop i a la superfície del tall i d'aquesta forma es proveeix teixit nou d'on les estructures perdudes es regeneraran. En principi l'estructura regenerada, com per exemple, una extremitat, tindrà la mida d'una extremitat normal, com per exemple el cas de la regeneració dels amfibis (figura 21). La morfàlaxi, en canvi, no necessita divisió cel.lular perquè el teixit antic es remodela per permetre la construcció de les noves estructures. A *Hydra*, per exemple, la regeneració és morfàlactica, de manera que es pot formar un individu sencer a partir

INTRODUCCIÓ

d'un tros de la columna del pòlip, però això sí, de mida més petita que un individu normal.

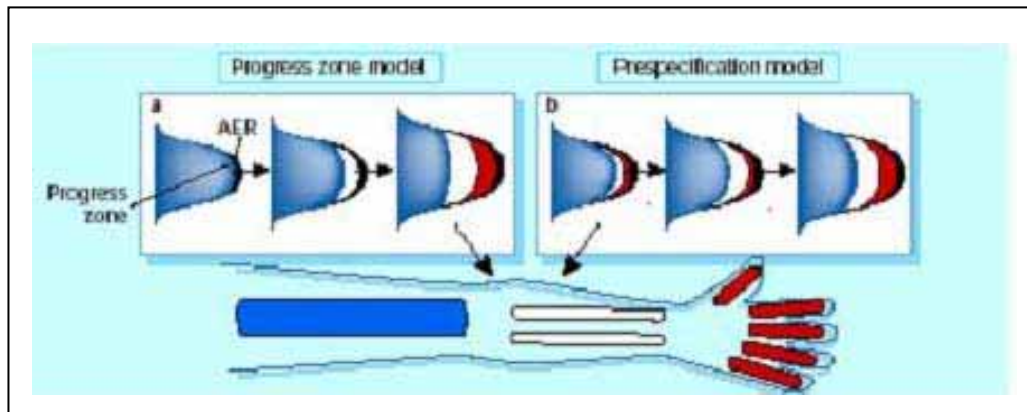


Figura 21. Dos models de desenvolupament proximo-distal d'extremitats d'amfibis: **a:** al "model de la zona de progrés", els destins dels elements proximals (blau) s'especifiquen abans dels destins dels elements més distals, a mida que el primordi creix. A la zona de progrés tenen lloc canvis de destí cel·lular, a la vora de la AER (*apical ectodermal ridge*). En canvi, **b:** al model proposat per Dudley *et al* i Sun *et al*, 2002, "model de preespecificació", els destins proximo-distals ja s'especifiquen des de ben aviat i la seqüència observada en el temps del desenvolupament esquelètic resulta d'aquesta expansió selectiva d'aquells dominis pre-especificats juntament amb la determinació cel·lular i l'adquisició d'un destí cel·lular definitiu. Modificat de Duboule *et al.*, 2002

Pel que fa a les planàries, Saló i Baguñà (1984 a i b, 2002) postularen un tipus de regeneració que combinava tots dos processos. Com ja hem esmentat, la capacitat de regeneració i la gran plasticitat morfològica d'aquests organismes és deguda als neoblasts, població de cèl·lules soca que es manté al llarg de la vida de l'organisme (per revisions generals: Baguñà *et al.*, 1994 i Baguñà, 1998). Un fragment diferenciat d'una planària sencera pot reorganitzar-se per produir un animal amb tots els sistemes d'òrgans restaurats en les dimensions apropiades. Els neoblasts per morfologia, constituïrien el 25-30% del conjunt total de cèl·lules i són les úniques cèl·lules proliferatives a la planària, i, per tant, podrien ser considerades totipotents. En individus intactes aquestes cèl·lules estan escampades per tot el parènquima i les divisions de la seva progènie generen reposicions de les cèl·lules que es perden al llarg del *turnover* cel·lular fisiològic. Quan hi ha una ferida, els neoblasts són estimulats a proliferar; migren localment cap a l'epiteli de la ferida i donen lloc al blastema de regeneració, a on les parts distals que falten seran regenerades. Hi ha molts experiments clàssics i

demostracions més recents (Saló i Baguñà, 2002) que indiquen que els neoblasts són les cèl·lules sota de la planària: organismes irradiats amb raigs X perdien les cèl·lules proliferatives i la capacitat de regeneració. La introducció de neoblasts a aquestes planàries irradiades restaurava tant la capacitat de regeneració com la viabilitat. Es comprovà també que les fraccions de neoblasts eren cèl·lules sota que no sols donaven lloc a la línia somàtica sinó també a la línia germinal. Per altra banda sembla ser que els neoblasts, a més a més, responen a la informació posicional proveïda per les cèl·lules diferenciades. L'altre punt en el que es treballa actualment és l'heterogeneïtat de la població de neoblasts. La identificació de marcadors de neoblasts pot ajudar a conèixer quin percentatge de cèl·lules morfològicament definides com a neoblasts són realment totipotents i quins representen descendents amb el llinatge ja restringit.

Les planàries d'aigua dolça han estat doncs desde dècades un model clàssic per estudiar els problemes de regeneració i desenvolupament. La regeneració de parts corporals a partir de teixits diferenciats ha fet plantejar-se qüestions com les referents a la regulació de la polaritat, la identitat posicional i l'escala o proporció dels teixits regenerants. La regeneració reflecteix bé la inherent pluripotència de cèl·lules diferenciades o bé el manteniment en l'adult de cèl·lules indiferenciades a partir de les quals els teixits mancants seran regenerats.

Tots aquests trets els fan un grup singular respecte la majoria dels grans grups animals, ja que a diferència de molts organismes que presenten formes adultes estrictament determinades des del punt de vista de la mida i del patró, les planàries poden regenerar i remodelar el seu cos. En aquests organismes, la regeneració no és només el mecanisme de reproducció asexual, sinó també el sistema emprat en el cas de lesions corporals per tal de restaurar el patró. Això és el que ens fa possible poder induir la regeneració experimentalment després d'una amputació traumàtica i a 17°C, per exemple; en aquesta situació l'animal triga aproximadament 7-10 dies en ser de nou un organisme sencer. Les planàries poden presentar modalitats de regeneració terminal, bipolar, bilateral, intercalar i supernumerària (figura 22). Un dels focus d'interès d'avui dia és descobrir quines són les molècules i vies de senyalització que regeixen aquests processos i posteriorment establir comparacions entre la regeneració i l'embriogènesi.

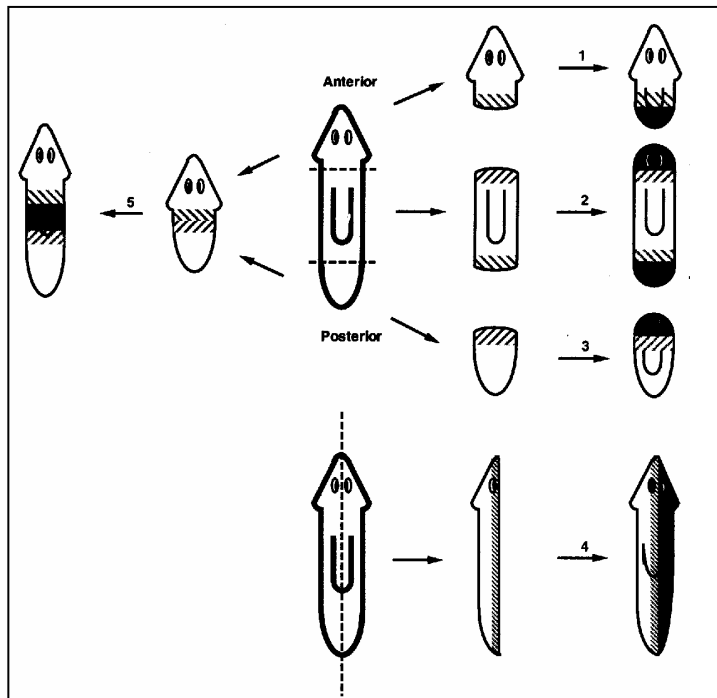


Figura 22. Diferents tipus de regeneració: (1) regeneració posterior; (2) regeneració bidireccional; (3) regeneració anterior; (4) regeneració lateral i (5) regeneració intercal·lar. Modificat de Bayascas *et al.*, 1997.

Un dels primers estudiosos de la regeneració de les planàries fou Morgan que va demostrar que un fragment tan petit com 1/279 d'una planària podia regenerar un animal complet. També va atacar el problema de la polaritat; com un fragment de cua pot fer un nou cap i a la inversa? Morgan va presentar la primera suggerència d'un gradient morfogènètic (progressiu augment o disminució de la concentració de molècules que fa que les cèl·lules adoptin diferents destins cel·lulars a diferents concentracions) i va distingir també la regeneració epimòrfica de la morfolàctica, demostrant que totes dues tenien lloc a les planàries (Morgan, 1898). Com hem dit, Saló i Bagaña postularen el model epimòrfic-morfolàctic de regeneració en planàries: el fenomen d'epimorfosi en planàries consisteix en l'acumulació, formant blastema o no, de cèl·lules indiferenciades prop de la ferida, les quals proliferen usualment fora del blastema, ja sigui en les zones més properes a la ferida o postblastema, com a les més allunyades; els processos morfolàctics que contribuirien a la remodelació del teixit antic que resta són canvis al balanç de proliferació/mort cel·lular de les diferents parts del cos i canvis a la determinació o vies de determinació i diferenciació dels neoblasts per acomodar les noves i velles regions a les noves posicions actuals, ja que cal restaurar la simetria i proporcions (figures 23, 24).

Pel que fa a la determinació del patró durant la regeneració, té lloc aviat i de forma seqüencial a la regió del post-blastema, quan el blastema no s'ha format o és pràcticament invisible. Això concorda amb el model epimòrfic-morfalàctic exposat una mica més amunt on una primera etapa morfalàctica en la que s'estableix el patró seqüencialment en una estreta banda de teixit precedeix una fase epimòrfica on el patró s'expandeix i finalment es defineix.

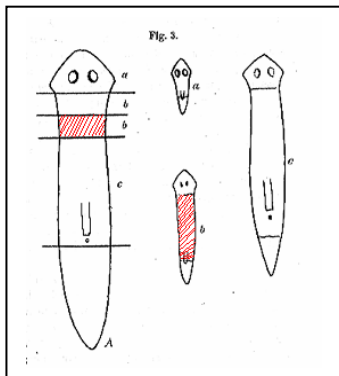


Figura 23. Model epimòrfic-morfalàctic de regeneració de les planàries. A partir d'un fragment (fragment ratllat) de planària es donarà un procés epimòrfic, és a dir, la formació d'un blastema o teixit *de novo* que produirà estructures noves, i un procés morfalàctic que consisteix en la remodelació del teixit que resta (esquema tret de Morgan, 1898)

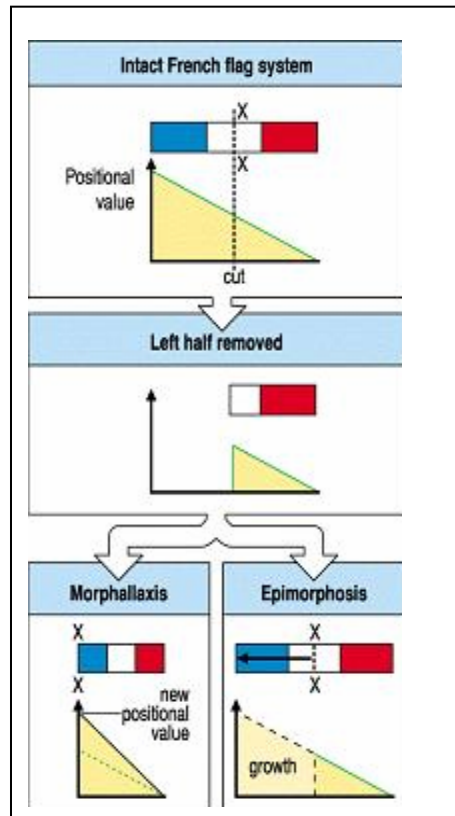


Figura 24. Un patró com el de la bandera francesa s'especifica per un gradient de valor posicional. Si el sistema es talla per la meitat pot regenerar de dues maneres: per morfàlisi s'estableix una nova frontera a nivell del tall i els valors posicionals es canvien al llarg de la regió. En la regeneració per epimorfosi, els nous valors posicionals s'adquireixen per creixement a partir de la superfície del tall. Modificat de Wolpert, 2002

Les cèl.lules que s'acumulen al blastema primerenc s'organitzen per produir una única estructura independentment de la naturalesa del teixit pre-existent d'on provenen. Hi ha resultats que mostren que el destí de les cèl.lules que formen el blastema de cap es troba ja especificat 12-24 hores després de l'amputació (Baguña *et al.*, 1994).

Per altra banda, la polaritat A/P durant la regeneració de parts del cos de la planària pot ser determinada per trossos ben petits de teixit (Morgan, 1898). Com a excepció, tindriem el teixit enfront dels fotoreceptors de moltes espècies de planàries que no poden regenerar (Morgan, 1898), segurament degut a la manca d'activitat

mitòtica en aquesta regió (Newmark i Sánchez-Alvarado, 2000; revisió Reddien i Sánchez-Alvarado, 2004).

2.3 El sistema nerviós de la planària

Des d'un punt de vista morfològic el SNC de la planària és aparentment simple i de trets primitius, amb ganglis cefàlics a la part anterior i dos cordons nerviosos ventrals disposats longitudinalment al llarg del cos. Tot i així, presenta una sèrie de característiques interessants: moltes neurones tenen funció neurosecretora i les seves capacitats integratives són intermitges entre les de cnidaris i els metazous superiors; també, amb similituds amb vertebrats com la presència de neurones multipolars al SNC i neurones bipolars a les commissures de les planàries. A nivell molecular Umesono *et al.* (1997,1999) mostraren que el cervell de la planària pot ser dividit en quatre dominis moleculars basant-se en l'anàlisi de l'expressió dels homòlegs a planària de la família de gens *otd/Otx*. Més recentment *microarrays* de DNA han estat utilitzats per aïllar un gran nombre de gens neurals i per definir molts dominis moleculars i funcionals al cervell de la planària (Cebrià *et al.*, 2002 a i b). Estudis d'embriologia comparativa han suggerit que els SNCs dels bilaterals (tant protostoms com deuterostoms presenten un sistema nerviós centralitzat) tenen origen diferents, ja que en el cas dels protostoms, el SNC es forma a partir de l'ectoderm ventral i, en canvi, en el cas dels deuterostoms s'origina a partir del tub neural dorsal. Però aquesta visió ha canviat gràcies a les dades moleculars que hem esmentat anteriorment que donen suport a la hipòtesi contrària, especialment les dades referents a la conservació de patrons d'expressió de molts gens reguladors.

Morfològicament, el sistema nerviós de la planària ha estat estudiat per immunocitoquímica utilitzant dos marcadors: el neuropeptid F (NPF) propi dels cucs plans i la serotonina (5-HT) en crioseccions. Aquesta tècnica ha permès fer una descripció molt precisa del sistema nerviós d'aquest organisme. S'ha pogut comprovar entre d'altres coses que el sistema nerviós central de la planària té forma de ferradura.

El cervell està compost per dos lòbuls laterals en posició antero dorsal, connectats per tres commissures, una antero dorsal davant els ulls i dues de ventrals darrera els ulls. El parell de ganglis doncs pren forma d'U invertida amb entre 8 o 9

branques cefàliques, depenent de l'espècie, que connecten els ganglis cerebrals amb els òrgans sensorials de cada costat.

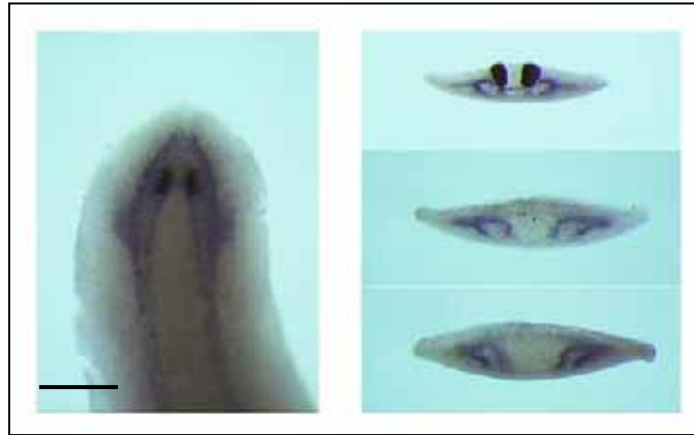


Figura 25. *G.tigrina*, hibridació *in situ whole-mount* contra el marcador neural sinaptotagmina amb talls transversals per detectar la senyal a nivell intern del SNC. Esc.barres 0,5mm

La parella de cordons nerviosos principals s'extén des dels lòbuls laterals del cervell fins la cua de l'organisme. Les seccions al criostat (figura 25), tot i que també es pot veure amb immunotincions sobre l'animal sencer (figura 26), ens mostren com ambdós cordons nerviosos presenten de forma iterativa acúmuls de cèl.lules nervioses en forma de petits ganglis d'on surten les branques laterals que connecten els dos cordons nerviosos principals amb el plexe submuscular i també les comissures transversals que connecten els dos cordons centrals. A nivell dorsal no s'observen cordons nerviosos.

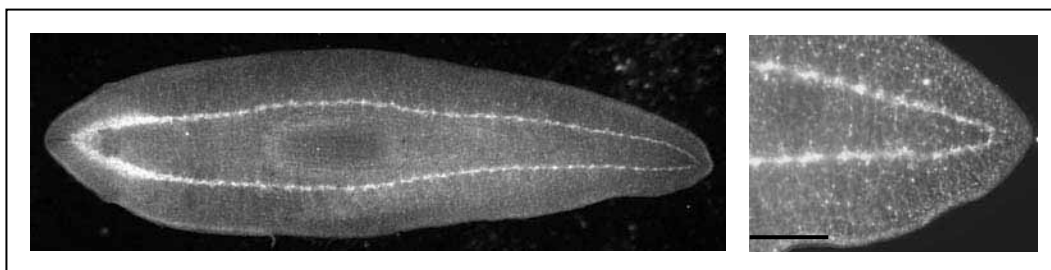


Figura 26. *G.tigrina*, immunotinció contra el neuropèptid FMRFamida en organisme intacte i detall de la cua. S'endevinen els ganglis al llarg dels cordons nerviosos principals, i la connexió posterior dels dos cordons nerviosos. Esc.barres 0,5mm

INTRODUCCIÓ

Per altra banda, la faringe presenta el seu propi plexe nerviós faríngic i intestinal. Aquest primer plexe, connectat directament amb el cervell, envia les seves fibres al tub faríngic on formen una xarxa cilíndrica interna i una d'externa a la paret del tub (figura 27).

Finalment trobem dos plexes perifèrics: el subepitelial i el submuscular. La xarxa de neurones d'entrada i de sortida de la faringe és similar en estructura al plexe nerviós submuscular (Baguñà i Ballester, 1978).

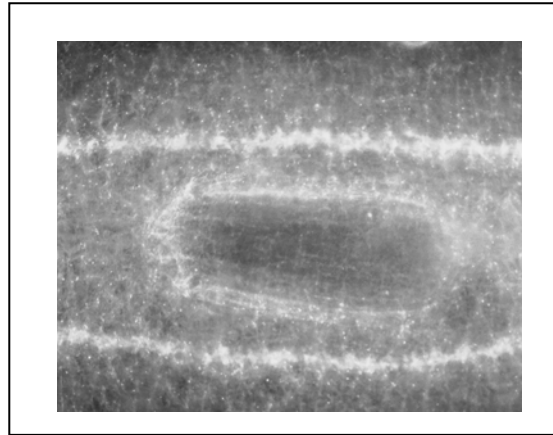


Figura 27. *G.tigrina*, detall del plex nerviós faríngic i dels cordons nerviosos principals.

Cal també esmentar els òrgans sensorials que comprenen quimiorceptors i mecanoreceptors, localitzats a la part anterior de l'animal i que envien projeccions als ganglis cefàlics que processen les senyals i que dirigeixen les respostes adequades. L'expressió, per *in situ whole-mount* i de seccions, de *Gtsix-3*, també clonat al nostre grup, mostra la localització del transcrit a nivell de les projeccions que comentàvem (figura 28) (Pineda i Saló, 2002).

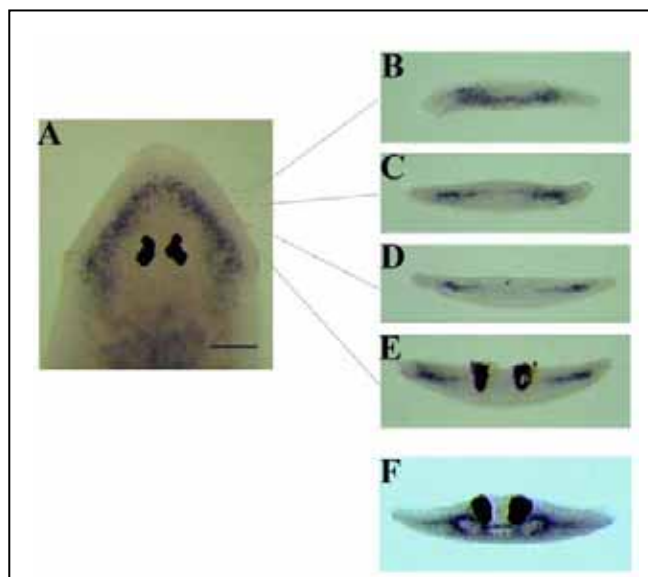


Figura 28. *G.tigrina*, hibridació *in situ whole mount* de *Gtsix-3*. Tret de Pineda i Saló, 2002. Esc.barres 0,5mm

2.4 Regeneració del sistema nerviós de la planària

El desenvolupament i l'evolució del sistema nerviós central han estat uns dels tòpics que més interès han despertat dins del camp de la biologia del desenvolupament. Malgrat les diferències existents entre el SNC dels vertebrats i els invertebrats, hi ha una sèrie de mecanismes i programes genètics bàsics pel desenvolupament del cervell que es troben altament conservats. Les planàries d'aigua dolça són un sistema biològic que ens pot ser molt útil per estudiar la formació del SNC en un contexte diferent que el de l'embriogènesi normal: la regeneració neural.

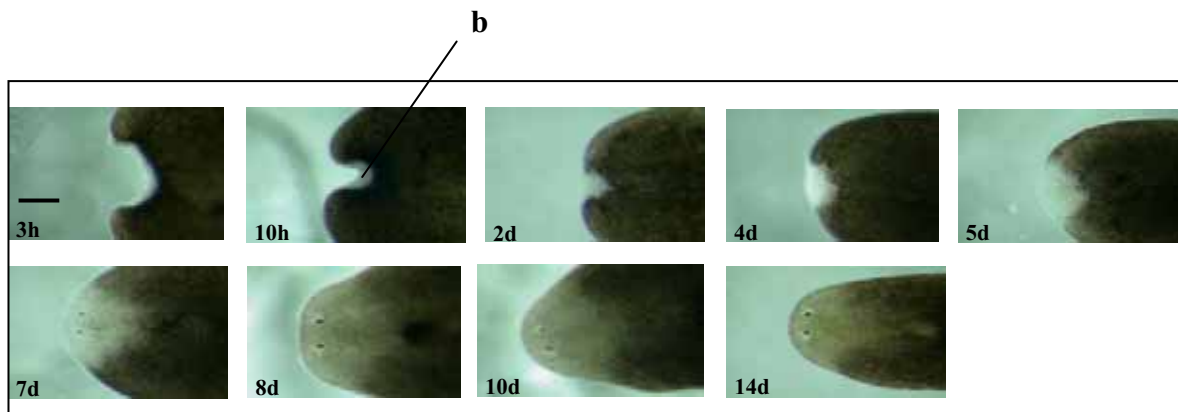


Figura 29. Regeneració cefàlica a *Schmidtea mediterranea* a 17°C. Primer hi ha una contracció muscular per cicatritzar la ferida (15'). Posteriorment, a les 3h, hi ha una relaxació muscular. A les 10h s'inicia la formació del blastema (b). Als 2d ja tenim un blastema indiferenciat. Als 4d el blastema va creixent per aportació basal de cèl·lules proliferants al post-blastema (pb). Als 5d el blastema continua creixent i hi ha l'inici de la diferenciació de l'epidermis. Als 7d s'observa la completa diferenciació dels ulls i a partir dels 8d la pigmentació de la nova epidermis que va enfosquint el blastema, excepte en la zona despigmentada o zona periglobular que permet el pas de la llum als ulls. Esc. barres 0,5mm

El SNC de la planària pot ser utilitzat doncs com a model per estudiar la regeneració neural a organismes superiors. Tot i així, encara se n'han fet pocs estudis i es manté sense resoldre definitivament una antiga qüestió: el nou cervell regenerant ho fa a partir del creixement dels cordons nerviosos trencats o apareix independentment d'aquests cordons pre-existents i gràcies a la diferenciació en neurones dels neoblasts? Els treballs de Reuter *et al.* (1995, 1996) i Reuter i Gustaffson (1995) i Cebrià *et al.*, (2002 a i b), entre d'altres, intenten aclarir aquesta i altres qüestions. Al primer estudi utilitzaren antisèrum contra els neuropèptids F (NPF) i FMRFamida i contra l'amina biogènica 5-hidroxitriptamina (5-HT), i mostraren que durant la cicatrització i posterior regeneració després d'una decapitació a *G.tigrina*, la formació dels nous ganglis consisteix en dos processos: el primer procés té lloc durant els dies 1 i 2 i consisteix en què prolongacions

INTRODUCCIÓ

neurals emergeixen des de les protuberàncies dels antics cordons nerviosos i envien fibres cap a la banda contralateral i s'aproximen l'una a l'altra, cap al centre, a prop de la vora del blastema. El segon procés, del dia 3 a 5, neoblasts immunoreactius a 5-HT apareixen davant de la comissura anterior en desenvolupament; aquestes cèl.lules 5-HT-IR fasciculen amb la comissura cerebral anterior; apareixen fibres de les comissures posteriors del cervell i fibres cap a les aurícules. Van observar que eren cèl.lules indiferenciades que migraven cap als cordons nerviosos principals i que es diferenciaven en cèl.lules nervioses, renovant la població de cèl.lules neuronals. Aquest estudi donava doncs suport a la hipòtesi de que les cèl.lules nervioses són originades a partir de cèl.lules indiferenciades (figura 31).

Els treballs de Cebrià *et al.* 2002 a i b analitza com és regenerat el SNC de la planària i quins gens s'hi troben implicats. Per l'estudi utilitzaren una combinació d'immunotinció amb un homòleg de la sinaptotagmina (Tazaki *et al.*, 1999) i hibridació *in situ* de 12 gens neurals expressats a diferents dominis moleculars al cervell intacte, a organismes de *Dugesia japonica* (figura 30). Els gens neurals que utilitzaren Cebrià *et al.* en aquests treballs havien estat aïllats en projectes de *microarrays* de DNA de planària. Alguns d'ells presentaven homologia amb gens coneguts a altres organismes (N-CAM, receptor de tirosin-fosfatasa, subunitat α de proteïnes G, receptor de lipoproteïnes de baixa densitat, etc). Segons la seva *up-regulació* durant la regeneració van ser classificats com a: gens d'expressió temprana, mitjana o tardana. Com hem dit anteriorment, el cervell de la planària consisteix en dos ganglis lobulats connectats exclusivament per la seva part més anterior i pot ser dividit en una regió central d'estructura esponjosa, el neuropil, i moltes branques laterals que s'extenen cap els marges del cap. La combinació de la immunotinció contra Djsyt (*Dugesia japonica* synaptotagmin) amb les *in situs* dels diferents gens neurals els fa afirmar que el cervell de la planària no és una simple unió a la part anterior dels cordons nerviosos, sinó que es tracta de dues estructures diferenciades, sent el cervell una estructura localitzada més dorsalment. Aquesta observació es confirma posteriorment amb seccions de les *in situs whole-mount*. Proposen també que un homòleg de la família de les netrines s'expressaria a la regió solapant del cervell i els cordons nerviosos ventrals.

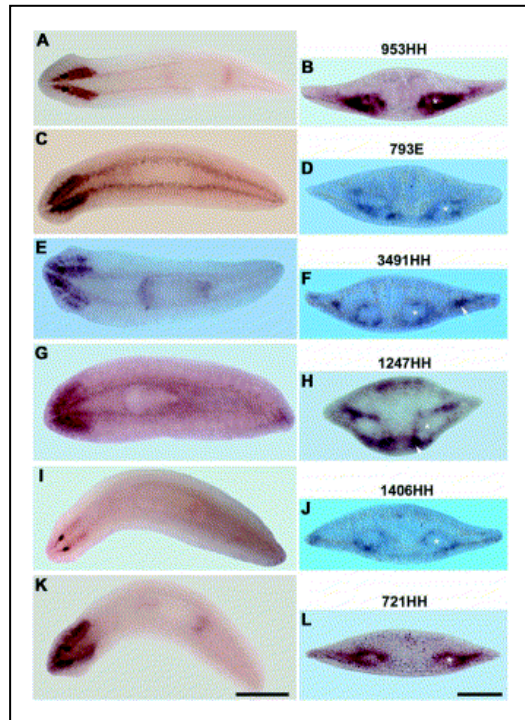


Figura 30. Diferents marcadors neurals. Tret de Cebrià *et al.* 2002a

El que demostren és que el primordi del cervell apareix al blastema el dia 1 de regeneració. En aquest estadi els cordons nerviosos ventrals romanen trencats a la regió del postblastema. Basant-se en observacions morfològiques i en l'expressió d'aquells diferents gens neurals parlen de tres estadis diferenciats en la regeneració del SNC de la planària. Al primer estadi s'observen dos *clusters* bilaterals de cèl.lules al blastema (Saló i Baguñà, 1984, a i b; Baguñà *et al.*, 1989; Newmark i Sánchez-Alvarado, 2000). Gens candidats responsables de fer que els neoblasts esdevinguin cèl.lules del cervell serien els homòlegs dels gens *otd/Otx* i *Pax-6* (Umesono *et al.*, 1997 i Pineda *et al.*, 2002) Al segon estadi, el que era el primordi del cervell observable al primer estadi esdevé un petit cervell amb les seves dues meitats connectades a la part més anterior i amb poques branques que s'extenen cap a les vores del cap. S'està estudiant el paper de les netrines en aquestes connexions. Al tercer estadi sembla ser que el SNC està ja reconstruït, almenys a nivell estructural (cervell esponjós i cordons nerviosos ventrals connectats per mig de moltes commissures transversals), però potser no a nivell funcional ja que el patró normal de gens neurals d'expressió tardana encara no està totalment restaurat. El patró d'expressió del gen *GtPax6-A* permet seguir la regeneració del SNC segons es mostra a la figura 32 (Pineda *et al.*, 2002).

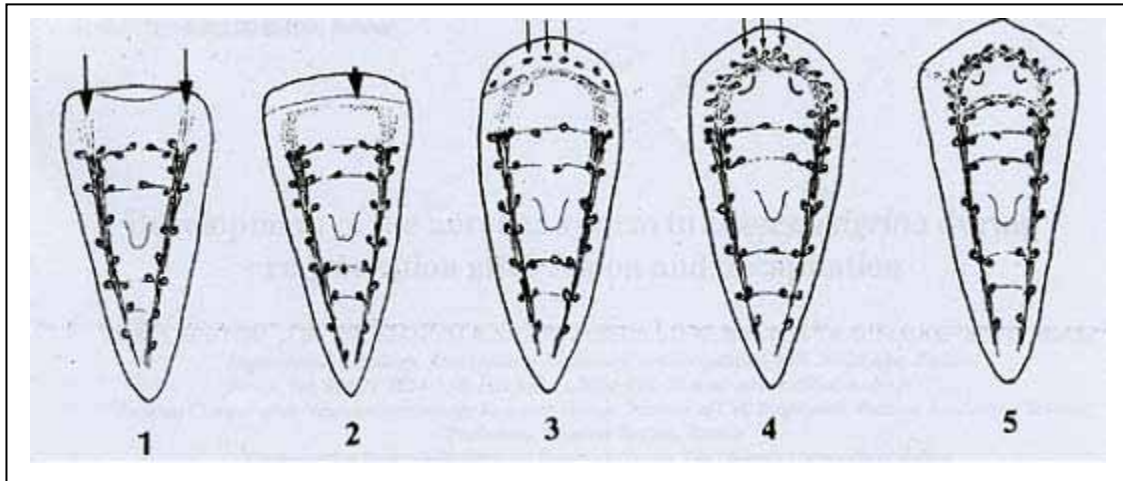


Figura 31. Esquema que mostra els dos processos ja esmentats en el text implicats en la regeneració del cervell a *Girardia tigrina*. Durant el primer procés, que inclouria els dies 1-2, fibres nervioses emergents dels cordons nerviosos antics (fletxes) creixen transversalment cap al centre, a prop a la vora de blastema- postblastema (fletxa curta), construint així una bastida on serà format el futur nou cervell. El segon procés, durant els dies 3-5, implica l'aparició de neoblasts davant de la comissura anterior en desenvolupament (fletxes petites). A continuació fibres nervioses fasciculen amb aquesta comissura anterior i més endavant apareixen fibres de les comissures posteriors del cervell i fibres cap a les aurícules. Modificat de Reuter *et al.*, 1996

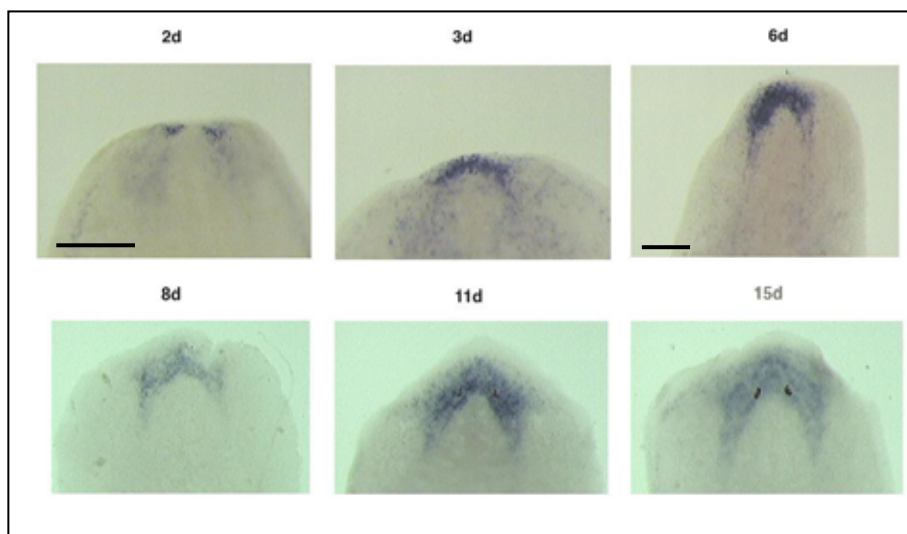


Figura 32. Hibridació *in situ whole-mount* de *GtPax6A* en planàries regenerants de l'espècie *G.tigrina*. Es detecta expressió ja als 2d de regeneració, com a dos *spots* localitzats a la regió on els antics cordons nerviosos ventrals varen ser seccionats i on es comença a formar el nou cervell. Als 3d de regeneració els *spots* positius per *GtPax6A* s'expandeixen i ressegueixen les fibres emergents dels cordons nerviosos antics. Les següents imatges corresponents als dies 6, 8, 11 i 15 de regeneració mostren l'expansió de la senyal que segueix la regeneració dels ganglis cefàlics. Modificat de Pineda *et al.*, 2002. Esc.barres 0,5mm

La comunicació entre les cèl.lules és essencial per integrar les ordres necessàries perquè un organisme pugui desenvolupar-se correctament des de l'estadi d'una cèl.lula fins el manteniment de l'estat adult. El nombre de vies de senyalització que les cèl.lules utilitzen per comunicar-se és relativament baix. És per això que aquestes vies s'utilitzen una vegada rera l'altra durant el desenvolupament dels organismes. La propietat que fa de les planàries uns organismes especialment interessants des del punt de vista del desenvolupament és la seva plasticitat morfològica i gran habilitat per regenerar les parts perdudes del cos. L'objectiu general d'aquesta tesi seria doncs determinar si en concret la via de transducció de senyals Wnt, que regeix múltiples funcions durant el desenvolupament normal dels diferents organismes, és també una de les que coordina la correcta regeneració durant la vida de les planàries.

Els elements integradors de l'anomenada via Wnt canònica (l·ligands, receptors, efectors citosòlics -activadors i inhibidors- i factors de transcripció nuclears) es troben, a grans trets, conservats al llarg de l'escala filogenètica. Amb l'aïllament d'alguna d'aquestes proteïnes i amb les eines de les que disposem per l'estudi de l'expressió i de la funció gèniques, així com amb diferents drogues inhibidores de quinases, ens disposem a averiguar si aquesta via també està conservada al filum dels Plathelminths, i a demostrar la seva implicació, o almenys la d'alguns dels seus elements, en el procés de regeneració de les planàries, tot intentant deduir en quins processos participen.

En aquest apartat de Materials i Mètodes del present treball només ens extendrem en aquelles tècniques aplicades per primera vegada a planària o en d'altres que han sofert alguna modificació. La metodologia d'aïllament de gens per PCR degenerades i la completació de la seqüència per mig del mètode de RACE-PCR són mètodes ja realitzats anteriorment i descrits exhaustivament en tesis i estudis previs. De la mateixa forma que el subclonatge en plàsmid, la subseqüent transformació en cèl.lules bacterianes competents, l'obtenció de DNA plasmídic (minipreparació de DNA) i la seqüenciació. És per això que no repetirem aquests punts, només els referenciarem. De la mateixa manera, totes les solucions utilitzades de les que no s'especifiqui la composició, aquesta es troba descrita a Sambrook *et al.*, 1989. Els enzims usats han estat de marques *Promega*, *Takara* i *Roche* i els productes han estat proveïts per les cases *Sigma*, *Merck* i *Prolabo* majoritàriament. En la descripció dels materials s'especifica la procedència d'aquells que es creu té relevància esmentar-la.

1.MATERIAL BIOLÒGIC

1.1 Captura i manteniment en el laboratori

Per aquest estudi s'ha utilitzat una línia asexual de la planària d'aigua dolça *Girardia tigrina*, en concret de la classe A (segons tesi Ribas 1990: organismes fissípars amb un patró de pigmentació externa clapejat sobre fons marró i amb una faringe clarament pigmentada, sent aquesta una pigmentació típica de les planàries europees). L'espècie utilitzatda pertany al Fílum dels Platihelminths, a la Classe Turbellaria, Ordre Tricladida, Subordre Continentalia, Família Dugesidae i Gènere Girardia. Els organismes han estat recollits al riu Calders (província de Barcelona). Es mantenen en *aigua de planàries* al laboratori (1 volum d'aigua de l'aixeta, 1 volum d'aigua destil.lada, 0.125 ml d'AguaSafe de TetraAqua/L H₂O, 10 µg/ml gentamicina sulfat de *Roig Farma S.A n° 30934-25*) a 19°C i s'alimenten dos vegades per setmana amb aproximadament 10 g de fetge de vedella per 100 planàries. El fetge es retira al cap d'entre 2-4 hores (es canvia l'aigua i l'endemà es torna a canviar)

2.OBTENCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

2.1 Aïllament de RNA Total amb el reactiu TRIZOL[®] Reagent (Life Technologies)

Precaucions a l'hora d'evitar contaminacions per Rnases

Treballar sempre amb guants i amb puntes i eppendorf lliures de Rnases.
En presència del TRIZOL[®], l'RNA es troba protegit de contaminació per RNAses.

Procediment per l'aïllament de RNA

Al treballar amb TRIZOL[®] cal utilitzar guants i protecció pels ulls. Treballar el primer pas sota campana i evitar el contacte amb la pell o la roba, tot procurant no inhalar els vapors.

1. Per cada 50-100mg de teixit homogenitzar en 1ml de TRIZOL[®] (nº catàleg 15596-026) (és una solució mono-fàsica de fenol i isotiocionatde guanidina) Per cada 5 planàries per exemple utilitzem 500µl de teixit. Per una planària utilitzariem 100µl. Aquests homogenitzats es poden guardar a -20º si cal per dies.
2. Incubem les mostres a temperatura ambient per permetre la completa dissociació de complexos nucleoproteics.
3. Centrifugar a 12,000 × g durant 10 min a 4°C, i transferir el sobrenadant a un tub nou.
4. Afegim 200µl de cloroform per 1 ml de reactiu TRIZOL[®], I agitem vigorosament durant uns 15 seg. Incubem 2-3 min a temperatura ambient.
5. Centrifuguem les mostres a no més de 12,000 × g durant 15 min a 4°C.
6. Transferim la fase aquosa incolora superior a un nou tub, I procedim a precipitar l'RNA barrejant amb isopropanol. Utilitzem 500µl per 1 ml de TRIZOL[®] utilitzat per l'homogenització inicial.
7. Incubem les mostres a temperatura ambient durant 10 min i centrifuguem a no més de 12,000 × g durant 10 min a 4°C.
8. Descartem el sobrenadant i rentem el pellet de RNA amb 75% ethanol, afegint com a mínim 1 ml d'etanol 75% per 1 ml de TRIZOL[®] utilitzat per l'homogenització inicial. Barregem amb vòrtex i centrifuguem a no més de 7,500 × g durant 5 min a 4°C.
9. Assequem el pellet de RNA breument, aproximadament uns 7 min a temperatura ambient. Dissolem l'RNA en 5-20µl d'aigua DEPC depenent de la quantitat inicial de teixit i ressuspenem amb l'ajuda d'una pipeta; incubem 10 min a 65°C.
10. Carreguem 1 µl de cada mostra de RNA en un gel al 1.5% d'agarosa per RNA juntament amb un marcador de RNA (RNAs de *E.coli* 16S i 23S) Correm el gel fins que la mostra ha migrat aproximadament 1.5 cm del pouet. Evaluem la quantitat i integritat del RNA sota llum UV. Les bandes de RNA ribosòmic haurien de ser, ben visibles amb poc o gens *smear*. La banda de DNA genòmic (propera al pou) ha de ser de una intensitat molt menor que les bandes de rRNA, o invisible.

L'RNA que no sigui utilitzat per la síntesi de cDNA pot guardar-se a -80° amb 0.1 volums de LiCl (4 M) i 3 volums d'etanol 100%. Per recuperar dit RNA simplement caldrà barrejar bé, centrifugar a 12,000 rpm durant 10 min, descartar el sobrenadant, rentar un cop amb etanol 80%, assecar el pellet, i dissoldre en Buffer QT.

2.2 Síntesi de cDNA utilitzant l'enzim SuperScript™ III RNase H- Reverse Transcriptase

Tractament amb DNasa

Abans de dur a terme la síntesi de cDNA a partir de l'RNA extret fem un tractament amb DNasa lliure de RNases per treure'ns de sobre el DNA genòmic i d'aquesta forma evitar la contaminació al cDNA amb DNA genòmic:

Barregem en un tub:

- 1 µg RNA
 - 2 µl X5 First-Strand Buffer (Invitrogen, SuperScript™ III Reverse Transcriptase kit)
 - 0.5 µl DNasa I RNasa *free* (5 U/µl, TAKARA)
 - fins a un volum final d'H₂O DEPC
- Incubem 15-30 min a 37°C .
Inactivem la DNasa I a 75°C durant 5 min.

Síntesi de cadena senzilla de cDNA utilitzant la transcriptasa reversa Superscript III

La reacció a 20µl de volum final següent pot ser feta per 10pg-5µg de RNA total o 10pg-5µg de mRNA:

1. Afegir els següents components a la reacció anterior

-1 µl d'oligo (dT)₂₀ (50µM), o 200-500ng d'oligo (dT)₁₂₋₁₈ o 50-250ng de random primers; o 2pmol d'oligo específic del gen d'interès. En el nostre cas hem emprat oligodT.

-1µl de dNTPs (10mM)

-Aigua DEPC fins 13µl totals

2. Escalfem a 65° durant 5 min i incubem en gel almenys per 1min

3.Recollim els components al fons del tub amb una breu centrifugació i afegim:

-4µl de 5X First-Strand Buffer

-1µl de 0.1M DTT

-1µl RNasaOUT™ Recombinant RNasa Inhibitor (Cat.no. 10777-019. 40U/µl)

-1µl SuperScript III (200U/µl) (Cat.no.18080-044) (si s'han de generar cDNAs de més de 5Kb a temperatures superiors a 50° , la quantitat d'enzim ha de ser augmentada a 400U)

4. Barrejar suaument . Si s'usen random primers cal un pas de 5 in a 25°

MATERIALS I MÈTODES

5. Incubem a 50° durant 30-60min. Augmentarem la temperatura de reacció a 55° si estem emprant oligonucleòtids específics de gen o si es tracta de motlles difícils o amb elevada estructura secundària.

6. Inactivem la reacció a 70° durant 15min

Aquest cDNA pot ser ja usat per amplificacions per PCR. Tot i així, per l'amplificació d'alguns motlles de cDNA més grans d'1kb cal un tractament previ per eliminar l'RNA complementari al cDNA. Amb aquest objectiu cal afegir 1µl (2U) de RNAsaH- d'*E.Coli* i incubar la reacció a 37° durant 20 min.

3 AMPLIFICACIÓ DE DNAs PER PCR

3.1 PCRs amb oligonucleòtids degenerats i específics

Majoritàriament, l'enzim usat per fer aquests PCRs ha estat el *Taq DNA polymerase* (*Promega* num cat M1861). S'han provat també altres enzims, però d'entre tots aquest és el que millors resultats ens ha donat. Les PCRs s'han fet tant sobre cDNAs, com sobre DNA genòmic, com fags de genoteca. No es descriurà aquest últim cas, ja que els *screenings* de genoteca no varen donar resultat.

Les condicions de PCR varien segons el parell d'oligonucleòtids utilitzat. En termes generals, l'estàndar era un *hold* a 94°C 2', 35 cicles de 94°C 30'', T_{anellament} 30'', 72°C 30'' a 2', un *hold* a 72°C 4' i indefinit a 4°C. La temperatura d'anellament era normalment 5°C per sota de la T_m més baixa de la parella d'oligonucleòtids. El temps d'extensió varia segons el parell d'oligonucleòtids utilitzats, però normalment es considera 1' per kb.

A continuació presentem les seqüències dels oligonucleòtids degenerats i les condicions de PCR que ens serviren per clonar amb èxit els diferents gens d'aquest treball. La posició relativa dels oligonucleòtids es troba també esquematitzada a les figures respectives per cada gen del final de la secció de Materials i Mètodes, apartat 10).

-Oligonucleòtids i condicions per **GtWnt-5**: descrits a Marsal *et al.*, 2003; (el fragment d'aproximadament 120bp amb que es va iniciar aquest treball va ser clonat per David Pineda i Tomàs, amb oligonucleòtids degenerats cedits pel grup del Prof. Thomas Holstein de la Universitat de Darmstadt, Alemanya)

-Oligonucleòtids i condicions per **Importina** (obtinguts de Schneider *et al.*, 2003)

HBC1	5'-CARATHYTIGCITAYGGIAAYCAR-3'	24mhr
HBC2	5'-GCIGCRTAIGTIGCIA-CICCYTC-3'	24mhr

Per la PCR amb aquests oligos degenerats, es van barrejar els següents components,

- 1 µl cDNA (≈38 ng/µl)
- 0.4 µl *Taq* DNA polymerase (Promega; 5 U/µl)
- 5 µl 10 × PCR buffer (Promega)
- 2 µl Mg²⁺ (Promega)
- 1 µl de cada un dels oligonucleòtids degenerats A(20 µM) i B(20 µM)
- 0.8 µl dNTPs (10 mM)
- up to a final volume of 50 µl with demineralized H₂O

Per la re-PCR, el cDNA va ser substituït per 1 µl d'una dil.lució 1:10 de la banda purificada obtinguda de la reacció de PCR anterior i amb els mateixos volums de reactius de la reacció primera.

Les condicions tant de la primera PCR com de la re-PCR foren:

- 94°C 3 min
- 35 cicles(PCR inicial), 30 cicles(re-PCR) :
- 94°C 1 min
- 45°C 1 min
- 72°C 1 min
- 72 °C 2 min
- 4°C infinit

-Oligonucleòtids i condicions per **GSK-3**:

GSK-6: 5'-GTNGCNATHAARAARGT-3'	17mehr
GSK-3: 5'-GGYTTDATRTCNCCKRTGRCA-3'	20mehr

Per la PCR amb aquests oligos degenerats, es van barrejar els següents components,

- 1 µl cDNA (≈38 ng/µl)
- 0.4 µl *Taq* DNA polymerase (Promega; 5 U/µl)
- 5 µl 10 × PCR buffer (Promega)
- 2.5 µl Mg²⁺ (Promega)
- 2.5 µl de cada un dels oligonucleòtids degenerats per GSK-3, **GSK-3** (20 µM) i **GSK-6** (20 µM)
- 0.8 µl dNTPs (10 mM)
- fins a un volum final de 50 µl amb H₂O destil.lada

Per la re-PCR, el cDNA va ser substituït per 1 µl d'una dil.lució 1:10 de la banda purificada obtinguda de la reacció de PCR anterior i amb els mateixos volums de reactius de la reacció primera.

Les condicions tant de la primera PCR com de la re-PCR foren:

- 95°C 3 min

MATERIALS I MÈTODES

-30 cicles :
95°C 1 min
42°C 1 min
72°C 1 min
-72 °C 2 min
-4°C infinit

-Oligonucleòtids i condicions per TCF:

TCF1: 5'-ATGCTNTAYATGAARGARAT-3' 20meh TCF2: 5'-CKYTTNCKYTTYTTYTTYTT-3' 20meh
--

Per la PCR amb aquests oligos degenerats, es van barrejar els següents components,

- 1 µl cDNA (≈38 ng/µl)
- 0.4 µl *Taq* DNA polymerase (Promega; 5 U/µl)
- 5 µl 10 × PCR buffer (Promega)
- 2.5 µl Mg²⁺ (Promega)
- 2.5 µl de cada un dels oligonucleòtids degenerats per TCF, **TCF-1** (20 µM) i **TCF-2** (20 µM)
- 0.8 µl dNTPs (10 mM)
- fins a un volum final de 50 µl amb H₂O destil.lada

Per la re-PCR, el cDNA va ser substituït per 1 µl d'una dil.lució 1:10 de la banda purificada obtinguda de la reacció de PCR anterior i amb els mateixos volums de reactius de la reacció primera.

Les condicions tant de la primera PCR com de la re-PCR foren:

-94°C 2 min
-35 cicles :
94°C 1 min
40°C 1 min
72°C 1 min
-72 °C 2 min
-4°C infinit

3.2 RACE PCR

Diferents kits comercials permeten l'elongació per PCR amb oligonucleòtids específics d'una seqüència coneguda de la qual no es coneixen les regions flanquejants.

La tècnica només va ser exitosa per completar el gen GtWnt-5; les condicions de PCR així com la seqüència dels oligonucleòtids específics W3' I W5' es troben especificades a Marsal *et.al.*, 2003.

L'aïllament de DNAs amplificats (aïllament de DNA a partir de gels d'agarosa, aïllament de DNA a partir de producte de PCR), el clonatge en plàsmids d'*E.coli* (protocols de lligació, transformació i minipreparació de DNA plasmídic) i la seqüenciació de DNA es troben descrits a la tesi d'Eva Jiménez (2003), realitzada també al nostre grup.

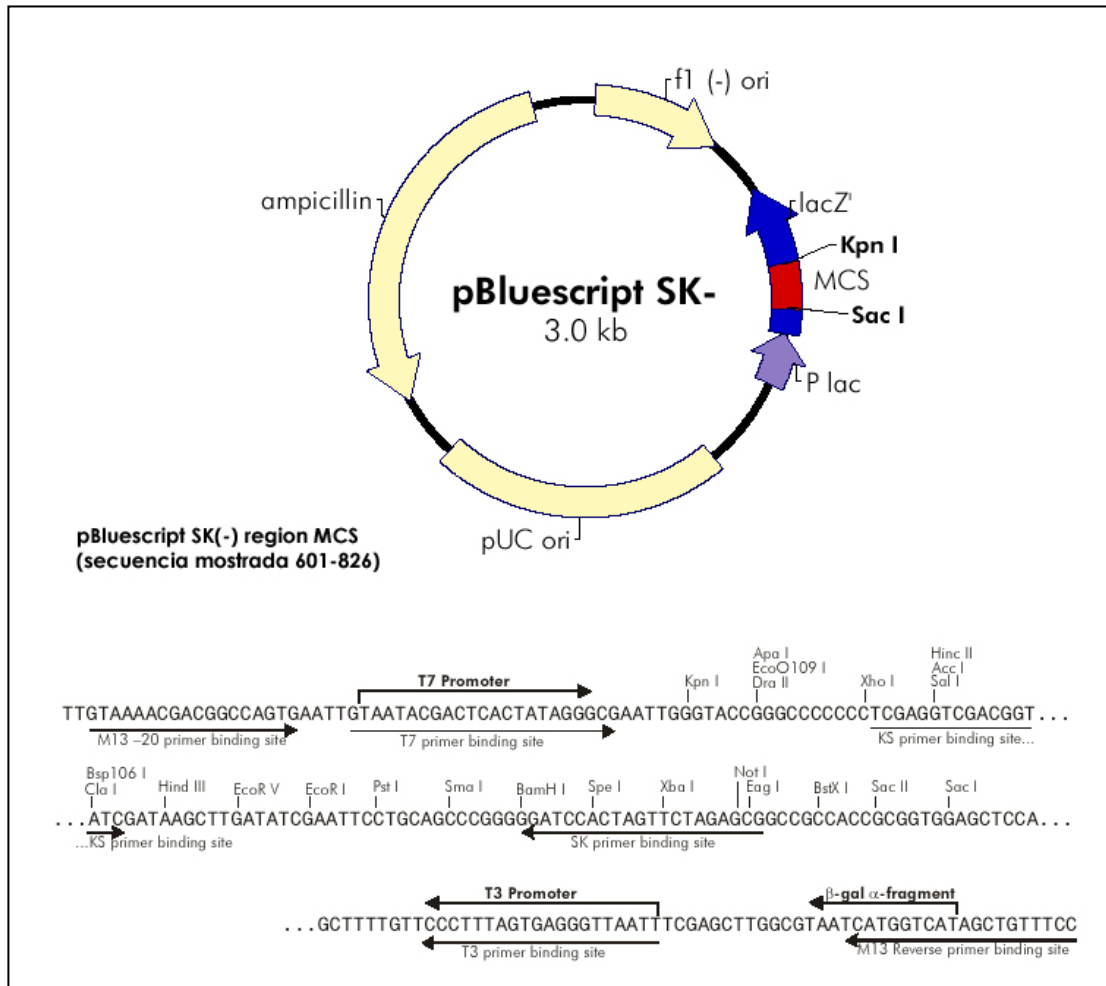


Figura 1. Vector pBluescript SK(-) i fragment de seqüència de 601 a 826 amb que es realitzaren els diferents clonatges d'aquest treball.

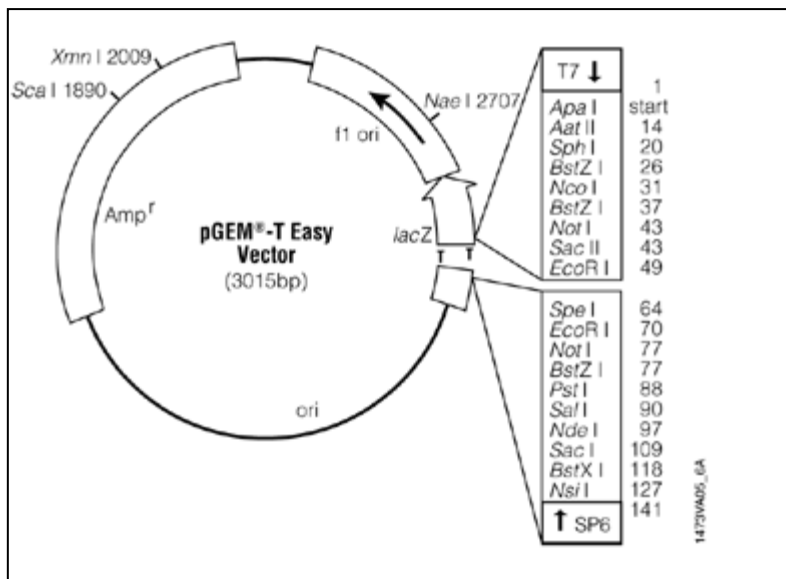


Figura 2. Mapa del plàsmid pGEM®-T Easy Vector utilitzat en algun dels clonatges d'aquest treball.

4. HIBRIDACIÓ *IN SITU* WHOLE-MOUNT

4.1 L'objectiu d'una hibridació *in situ* whole mount

La hibridació *in situ* whole-mount és un mètode per detectar el patró d'expressió d'un gen particular en un organisme. A planàries això té lloc fixant i despigmentant (pas de *bleaching*) les planàries intactes o regenerants, i permeabilitzant-les perquè la sonda sigui capaç d'entrar a la cèl.lula. La sonda és la cadena antisentit i de RNA, amb digoxigenina conjugada a alguns dels nucleòtids uracil (Schwarzacher *et al.*, 2000). La cadena RNA antisentit reconeixerà la cadena sentit del RNAm a les cèl.lules que expressen el gen d'interès. Després de la hibridació amb la sonda, les planàries s'incuben amb un anticòs contra digoxigenina conjugat a fosfatasa alcalina. Els anticòs units a la sonda antisense podran ser detectats colorimètricament per mig de la incubació en NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium (NBT)/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) Una reacció iniciada pel clivellament del grup fosfat del BCIP per la fosfatasa alcalina dóna lloc a un color blau i redueix el NBT a un precipitat violeta insoluble (Schwarzacher *et al.*, 2000). Normalment també es prepara una sonda sentit complementària a la sonda antisentit. Es prepara i s'hibrida en paral.lel a la sonda antisentit i serveix de control negatiu. Es realitza per examinar l'extensió i distribució de la hibridació no específica de la sonda. La sonda sentit hauria de ser la cadena complementària a la sonda antisentit per ser capaç d'utilitzar la informació d'hibridació no específica, si és que n'hi ha, de la sonda sentit a les hibridacions *in situ* whole mount amb la sonda antisentit. La similitud en la proporció A:T/G:C i la mida de la sonda fa que la informació d'unió no-específica sigui més fiable.

4.2 Preparació de sondes de RNA marcades amb digoxigenina per hibridacions *In Situ*

-Per GtWnt-5

Al llarg d'aquest treball hem dissenyat sondes *Antisense*- i *Sense* marcades amb digoxigenina que cobreixen tres zones diferents de la seqüència del gen GtWnt-5. Els fragments són els anomenats W600, W372 i W519, de 600pb, 372bp i 519bp respectivament. La regió que cobreix cadascuna d'elles està indicada a la figura.

MATERIALS I MÈTODES

La sonda corresponent a W600 fou amplificada amb els oligonucleòtids **W5E** i l'oligo **W3'** ; la sonda corresponent a W372 fou amplificada amb els oligonucleòtids **W5'.4** i **W3'.2** i, finalment, la sonda corresponent al fragment W519 fou obtinguda amb els oligonucleòtids **W5'** i **W3'.2**:

W5E: 5'-CAGACATGGACCTGTTCCAGTCG-3' 24meh
W3': 5'-GTGTGGAGACAATTTAAGATATGCC-3' 25meh
W5' 5'-GCAGATTTACTAAAATGATTGCCAG-3' 25meh
W5'.4: 5'-TTTAGGTCTCTCTTCAGTACT-3' 21meh
W3.2: 5'-GTACTACCGTGGAAAAACAAA-3' 21meh

-Per GSK-3

S'han dissenyat dues sondes per detectar els nivells de transcrit per GSK-3; la primera d'elles cobreix tot el fragment de 426bp clonat del gen en qüestió. L'amplificació es va realitzar amb els oligonucleòtids **G3'** i **G5'** que es mostren a la figura. La segona sonda té una mida de 240bp i es va obtenir amb els oligonucleòtids **GspF** i **G5'** (figura X).

G3': 5'-GTTGCCATCAAGAAGGTGCAC-3' 21meh
G5': 5'-GGTTTATATCGCGATGGCAC-3' 21meh
GspF: 5'-AATACGAGAAGACAGCAGCAA-3' 21meh

El disseny de les sondes s'ha realitzat sempre amb dues mostres, **Antisentit** i **Sentit**, d'acord amb el manual de Roche per a hibridacions *In Situ* no radioactives. Depenent de l'orientació de l'insert de cDNA al plàsmid, la cadena Antisentit es produeix digerint el plàsmid amb *Bam*HI i retrotranscrivint amb la RNA polimerasa T7, o es produeix digerint amb *Eco*RI i retrotranscrivint amb la RNA polimerasa T3. Aquests enzims de restricció s'escullen sempre i quan no hi hagi les seves dianes a l'insert mateix. Per exemple, en el cas de GSK-3, l'insert conté una diana interna per *Bam*HI i, per tant, vàrem utilitzar *Not*I en el seu lloc per a produir la digestió. Les sondes sentit es fan servir sempre com a control negatiu en una hibridació *In Situ*.

Preparació del DNA:

1. El plàsmid pBluescript II SK (+) contenint l'insert de cDNA d'interès va ser purificat d'un cultiu de bacteries DH5 α utilitzant el Kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). D'aquesta forma s'obtenen

50 µl DNA. Per a la seva quantificació, 1µl de la mostra es corre en un gel d'agarosa/EtBr a l'1% juntament amb el marcador de DNA λ*EcoRIHindIII* per quantificar el DNA.

2. El plàsmid purificat es va digerir de la seqüent manera:

Antisense:

Barrejar en un tub:

- al voltant de 5 µg DNA
- 15 µl Buffer H (Roche)
- 5 µl *EcoRI* (o altres) (15 U/µl de TAKARA)
- fins a un volum final de 150 µl amb H₂O

Sense:

Barrejar en un tub:

- al voltant de 5 µg DNA
- 15 µl Buffer B (Roche)
- 5 µl *BamHI* (o altres)(15 U/µl de TAKARA)
- fins a un volum final de 150 µl amb H₂O

S'incuben els tubs 2 hores a 37°C. Abans de prosseguir amb el tractament amb proteïnasaK, convé testar 5 µl de cada mostra en un gel a l'1% d'agarosa/EtBr amb un marcador de mida per assegurar-nos que tot el plàsmid ha estat digerit.

3. Afegim 50 µg/ml de proteïnasa K i ho deixem 30 min a 37°C.
4. Afegim H₂O fins a un volum final de 350 µl.
5. Afegim 350 µl de fenol-cloroform i centrifuguem durant 5 minuts a RT.
6. Transferim el sobrenadant a un nou tub de microcentrífuga de 1.5-ml
7. Microcentrifuguem els tubs i repetim el pas 5
8. Transferim el sobrenadant a un tub nou de microcentrífuga de 1.5-ml i afegim un volum de cloroform-alcohol- isoamílic. Centrifuguem les mostres durant 5 min a RT.
9. Transferim el sobrenadant a un nou tub de microcentrífuga de 1.5-ml. Precipitem el DNA: Afegim els següents reactius:
 - 0.1 volums de NaAc (pH 5.2 - 3 M)
 - 2 volums d' etanol (100%) fred
 - 1 µl seeDNA (Amersham Life Science)/tRNABarregem bé tot movent els tubs amunt i avall.
Incubem les mostres per una hora com a mínim a -20°C o tota la nit. Alternativament: 25 min a -80°C.
10. Centrifuguem les mostres durant 20 min a 4°C. Descartem el sobrenadant.
11. Rentem el pellet amb aproximadament 200 µl d'etanol (70%) fred. Centrifuguem les mostres durant 10 min a 4°C.

MATERIALS I MÈTODES

12. Descartem completament el sobrenadant i assequem el pellet a RT
13. Dissolem en 10 µl d'H₂O depc (H₂O tractada amb dietil pirocarbonat).
14. Quantifiquem el DNA:
Fem dil.lucions 1:100 de cada mostra i carreguem 1 µl, 5 µl i 25 µl of each dilution on a 1% agarose/EtBr gel together with a marker for DNA quantification e.g. the λEcoRIHindIII.

El següent protocol va ser realitzat segons el Manual de Roche per Hibridació i *In Situ* no-radioactiva amb alguna modificació.

Retrotranscripció:

14. Ha de realitzar-se tot el procés amb components i condicions RNAsa free. Per la retrotranscripció els següents components es barregen:

- 1 µg DNA
- 2 µl buffer de retrotranscripció X10
- 2 µl DIG RNA Labeling Mix (×10) (Roche)
- 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl - Roche)
- 2 µl RNA Polimerasa (20 U/µl - Boehringer Mannheim);(polimerases T7 o T3)
- fins a un volum final de 20 µl amb H₂O

Barrejar i centrifugar breument

Incubar durant 2 hores a 25°C (T3) o a 37°C (T7).

15. Transferir 1 µl de cada mostra a un nou tub i guardar a -20°C fins el control final ("Abans del tractament amb DNAsa ").
16. Afegir 1 µl DNAsaI RNAsa free (5 U/µl - TAKARA) i deixar a 37°C durant 15 min
17. Prendre 1 µl de cada mostra a un nou tub i guardar a -20°C fins el control final ("Després del tractament amb DNAsa ").
17. Precipitar l'RNA amb:
 - 30 µl d'H₂O depc
 - 0.1 volums LiCl (4 M)
 - 3 volums etanol fred (100%)
 - 1 µl yeast RNA

Barrejar bé i deixar 30 min a -80°C o tota la nit a -20°C.

18. Centrifugar les mostres durant 20 min a 4°C. Descartar el sobrenadant.
19. Rentar el pellet amb uns 150 µl d'etanol fred (70%). Centrifugem les mostres durant 10 min a 4°C.
20. Descartem el sobrenadant totalment i sequem el pellet a temperatura ambient durant uns minuts.
21. Dissolem el pellet en 100 µl d' H₂O depc. Deixem les mostres 30 min a 37°C o 10 min a 65°C per ajudar a que el pellet es dissolgui millor. Separem 2 µl per testar la concentració final del RNA (de les sondes antisense i sense) juntament amb les mostres de 1 µl que hem extret abans ("Abans del tractament amb DNAsa" i "Després del tractament amb DNAsa"). Ràpidament guardem la resta a -80°C.

22. El test s'ha de realitzar en un gel de RNA juntament amb un marcadore per quantificar (*E.coli* 16S i 23S RNAs) A més, un Dot Blot pot ser realitzar per a una millor quantificació del RNA.

4.3 Protocol d'hibridació *in situ* whole-mount (modificat d'Umesono *et al.*, 1997)

Solution	Vol.	Temp.	Time	Remarks
Fresh Planarian Water	50ml	RT	1min	
2%HCl/Holtfreter	50ml	4°C	5min	critical, shake by hand; removes the mucus
Carnoy	50ml	4°C	120min	prevent aggregation; fixative
MetOH	50ml	-20°C	60min	
5%H ₂ O ₂ /MetOH	30ml	RT	ON	leave under cold lamp; removes the pigmentation
70%EtOH/Holtfreter	50ml	4°C	30min	shaking
50%EtOH/Holtfreter	50ml	4°C	30min	shaking
30%EtOH/Holtfreter	50ml	4°C	30min	shaking
TPBS	50ml	4°C	30min	shaking
20µg/ml proteinase K/TPBS	10ml	37°C	8-12min	it depends on the size and regenerative stage; breaks down the proteins
Holtfreter	50ml	4°C	1min	shaking
4%PFA/Holtfreter	10ml	4°C	60min	shaking; fixative
Holtfreter	50ml	4°C	1min	shaking
Holtfreter	50ml	4°C	60min	shaking
Prehybridization	1ml	55°C	60min	In eppendorf
Hybridization	0.4ml	55°C	approx. 60h	preheat probe 10min at 70°C in Hybridization solution
50%formamide/5×SSC/0.1%tween20	5ml	55°C	5min	6 wells plate
50%formamide/5×SSC/0.1%tween20	5ml	55°C	60min	6 wells plate
50%formamide/5×SSC/0.1%tween20	5ml	55°C	60min	6 wells plate
50%formamide/5×SSC/0.1%tween20	5ml	55°C	60min	6 wells plate
Buffer I	5ml	RT	5min	6 wells plate
Buffer I	5ml	RT	30min	6 wells plate
Buffer II	1ml	RT	30min	24 wells plate
1:2000 antiDIG/Buffer II	0.5ml	RT	180min	24 wells plate
Buffer I	5ml	RT	5min	6 wells plate
Buffer I	5ml	RT	30min	6 wells plate
Buffer I	5ml	4°C	ON	6 wells plate
Buffer I	5ml	RT	30min	6 wells plate
Buffer I	5ml	RT	30min	6 wells plate
TMN	1ml	RT	5min	
20µl NBT/NCIP Stock Solution*/ ml TMN	0.5ml	RT	-----	In darkness; developing solution

RNase free

VOL." stands for Volume, "TEMP." for Temperature. Under "TEMP.", "RT" means Room Temperature. Under "TIME", "ON" means Over Night.

MATERIALS I MÈTODES

When colour reaction has reached the desired state, stop the reaction by washing in PBS($\times 1$), wash in ethanol, and finally keep the planarians in glycerol:

- wash two times 5 min in PBS at RT.
- Fix in 4% paraformaldehyde for 30 min at RT.
- Wash two times 5 min in PBS at RT.
- Do a serie of ethanol washes 5 min each at RT: 30% EtOH/PBS, 50% EtOH/ PBS, 70% EtOH/PBS, 100% EtOH, 70% EtOH/PBS, 50% EtOH/PBS, and 30% EtOH/PBS.
- Wash two times 5 min in PBS at RT.
- Keep the planarians in 70% glycerol/PBS at 4°C.

* An anti-digoxigenin antibody (anti-DIG) conjugated to alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim), and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) (Roche) were used to colorimetrically detect probe hybridization (Sánchez Alvarado & Newmark, 1999)

Fresh Planarian Water: Tap water, demineralised water, AguaSafe from TetraAqua[®] to neutralize chloride and heavy metals (0.625 ml/5 L H₂O - 2.5 L tap water and 2.5 L demineralized water), and the antibiotic gentamicin sulphate (10 µg/ml)

Holtfreter: (NaCl 2.188 g, KCl 0.031g, CaCl₂ 0.063 g, NaHCO₃ 0.125 g)/1000 ml

Carnoy: 60% ethanol/ 30% chloroform/ 10% acetic acid

TPBS: (0.1% Triton $\times 100$, KCl 0.2 g, NaCl 8 g, KH₂PO₄ 0.2 g, Na₂HPO₄*12H₂O 2.9 g)/1000 ml

Prehybridization: 50% formamide, 5 \times SSC, 0.1 mg/ml yeast tRNA, 0.1 mg/ml heparina, 0.1% Tween 20, 10 mM DTT

Hybridization: Prehybridization Solution + 10% Dextran Sulfat + probe

Buffer I: (0.1% Triton $\times 100$, Maleic acid 11.6 g, NaCl 9.76 g, 2N NaOH 95 ml)/1000ml

Buffer II: 10% Blocking Solution For nucleic acid hybridization and detection (Boehringer Mannheim)/ Buffer I

TMN: 0.1 M TrisHCl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl₂, 1% Tween 20, 10% PVA (Polyvinyl alcohol, 98-99% hydrolyzed). Dissolve the PVA warming the TMN solution.

PBS $\times 10$: (KCl 2 g, NaCl 80 g, KH₂PO₄ 2 g, Na₂HPO₄*12H₂O 28.9 g)/1000 ml, pH 7.2-7.4.

5. RNA D'INTERFERÈNCIA (RNAi)

En aquest treball hem aplicat dues tècniques de RNAi diferents per estudiar la pèrdua de funció de diferents gens. La primera és la tècnica de microinjecció de doble cadena de RNA (*dsRNA*), i la segona la ingesta de bacteries productores de la doble cadena de RNA del gen d'interès.

5.1 RNAi mitjançant injecció

5.1.1 Síntesi de la doble cadena de RNA pel mecanisme de RNAi per injecció

En aquest punt és important que tot el material utilitzat estigui lliure de RNases, segons s'aconsella als manuals de laboratori alhora de treballar amb RNA. El vector pBluescript (Figura 1) permet la transcripció *in vitro* dels DNAs clonats gràcies a la incorporació dels promotors de les RNA-polimerases dels fags T3 i T7 als dos extrems del lloc múltiple de clonatge. La posició d'aquests promotors permetrà utilitzar una o altra RNA-polimerasa per sintetitzar ambdues cadenes senzilles per separat, la cadena amb sentit o *sense*, idèntica al RNA missatger, i la cadena complementària o *antisense*.

1-Preparació del DNA motlle (concentració final de 1µg/µl):

-Linearització plàsmid SK Bluescript digerit per SmaI que conté l'insert de cDNA d'interès. Per exemple, la linearització per EcoRI permetrà una posterior actuació de la RNA-polimerasa T3, i paral·lelament caldrà produir una linearització per part d'un dels enzims del lloc de clonatge múltiple de la banda oposada a SmaI, com per exemple BamHI, per permetre la posterior retrotranscripció per part de la RNA-polimerasa T7.

Les reaccions de digestió són a 150 µl finals, 2h30' a 37°C

-Tractament amb **Proteinasa K**: 1 µl a 20mg/ml

15' a 37°C

-Incrementar volum fins aprox. 300 µl

-Fenolitzar: 2x **fenol/cloroform** i 1x **cloroform isoamílic**, amb respectives centrifugacions de 2' cada una

-Precipitem amb NaAc i ETOH100%

-Rentem amb EtOH 70%

-Assecar a 65°C i ressuspendre en H₂O-DEPC a una concentració final de 1µg/µl

2-Síntesi ssRNA

DNA 1µl
Buffer X10 2 µl
DTT 200mM 1 µl
rNTPs 10mM 4 µl
Rnasa inhibitor 1 µl
RNA pol (Roche) 1 µl
H₂O-DEPC fins a 20 µl
1h30' a 37° C per T7 i a 25°C per T3

-tractar amb Dnasa-RNasa free (5u/ µl)(Takara): 2 µl 15' a 37°C
-recollir 1µl de cada cadena senzilla per testar posteriorment

3-Anellament ssRNAs

-ajuntar sense i antisense (40µl finals) i afegir 60µl d' H₂O-DEPC: barrejar bé
-incubar 10' a 70°C i 10' a 37°C
-precipitar afegint -500µl d'EtOH 100%
-0'5 µl de glicogen (Boehringer Mannheim)
Barrejar bé i 30' a -80°C
-centrifugar 15' a 4°
-rentar amb EtOH80%
-centrifugar 5' a 4°
-assecar pellet 4' a 65°
-ressuspendre en 10 µl H₂O-DEPC 10' a 65°C.Ajudar amb la pipeta
-testar 1 µl de dsRNA juntament amb el 1 µl de ssRNA reservat de cada cadena senzilla

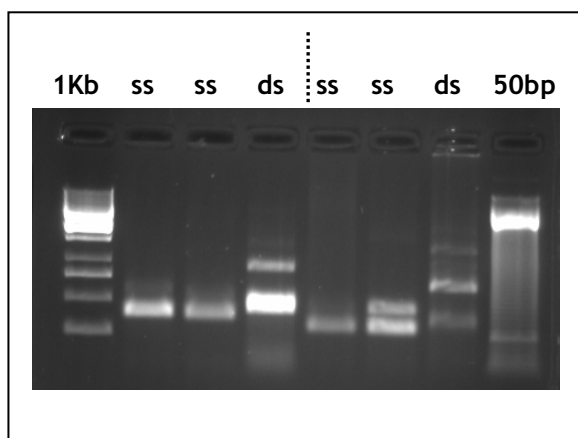


Figura 3. Gel per testar les dos cadenes senzilles i la doble de dues mostres diferents de DNA (separades per la línia de punts), juntament amb els marcadors de pes molecular 1Kb i 50bp

5.1.2 Microinjecció

Per la nostra experiència, hem arribat a la conclusió que el planteig de les injeccions depèn del gen concret, dels seus nivells d'expressió a l'organisme. Es va utilitzar un microinjector Drummond Scientific (Broomall, PA) Nanoject injector per injectar 23nl del respectiu dsRNA al teixit del postblastema, el teixit antic proper a la ferida. Això correspondria aproximadament a 10^{10} molècules of dsRNA, tot i que de vegades es realitzés més d'una punció. Paral·lelament sempre s'injecta un grup control amb H₂O enlloc d'amb dsRNA, però en tota la resta tractat com les planàries injectades amb dsRNA. En els casos tant de GSK-3 com de GtWnt-5 s'han seguit dos esquemes diferents. El primer consistia en injectar freqüentment, amb intervals d'un parell de dies o tres sense injectar. Abans del tall del cap ja produïm una primera injecció 24h abans d'induir la regeneració. Les planàries es deixen regenerar a 17°C mentre se les continua injectant. El segon procediment era més intens i breu en el temps i consistia en 3 injeccions de 32nl durant tres dies consecutius. 2 o 3 hores després de l'última injecció es produïa el tall del cap i els animals també es deixaven regenerar a 17°C. A mida que els organismes regeneraven controlàvem possibles alteracions fenotípiques amb una lupa Zeiss Stemi SV 6 i n'anàvem separant grups per: RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR's) per testar els nivells del transcrit, hibridacions *in situ whole-mount* del propi gen i per immunotincions amb marcadors neurals per detectar possibles alteracions al cervell regenerant.

5.2 RNAi mitjançant producció de menjar artificial. Bactèries productores de dsRNA

Aquest mètode pretén també produir RNAi específicament dels gens d'interès en aquest treball. Es tracta d'una alternativa a la injecció de doble cadena de RNA i, en principi, produeix menys dany als organismes i pot arribar a ser més ràpid. Bàsicament consisteix en alimentar les planàries amb bactèries que han estat transformades amb un plàsmid que porta insertat un fragment del gen d'interès. Les bactèries són HT115 (DE3) *d'E.Coli*, una soca Rnasa III deficient amb capacitat d'expressió de la polimerasa T7 induïda per IPTG. El vector L4440 és una modificació d'un plàsmid Bluescript que presenta dos promotors per la T7 en orientació inversa flanquejant el MCS (*multiple cloning site*), i entre vàries, dues dianes EcoRI on sera clonat el gen, o fragment de gen, en qüestió. La presència dos promotors flanquejants permetrà conduir la transcripció de les dues cadenes. Informació d'aquest vector i de la seva seqüència es pot trobar a la web d'Andy Fire: <http://www.ciwemb.edu>

Aquesta aproximació es va fer per primer cop a *C.elegans* segons es descriu a Timmons *et al.*, 2001. La soca HT115 (DE3) va ser obtinguda del CGC (Caenorhabditis Genomics Center) i el vector L4440 demanat a partir de la informació de la pàgina web esmentada més amunt. El protocol utilitzat s'ajusta al descrit a Newmark *et al.*, 2003 amb alguna variant.

1) obtenció per PCR sobre vector SK on ja existeix el gen d'interès, o fragment, clonat. Els oligonucleòtids utilitzats inclouen una diana EcoRI (en negreta als requadres) als extrems amb una cua de tres nucleòtids més (en cursiva als requadres) flanquejant les dianes:

Per GtWnt-5:

Oligonucleòtid WDS1: 5'-**CCGGAATTC**CTACCGTGGAAA-3' 21meh Tm=64°C

Oligonucleòtid WDS2: 5'-**CCGGAATTC**TTTAGGTCTCTC-3' 21meh Tm=62°C

Per GtGSK-3:

Oligonucleòtid DSGspF: 5'-**CCGGAATTC**AATACGAGAAGA-3' 21meh Tm=64°C

Oligonucleòtid DSG5': 5'-**CCGGAATTC**GGTTTTATATCG-3' 21meh Tm=60°C

Per GtTCF:

Oligonucleòtid DSTCF3': 5'-CCGGAATTCATGCTGTATATG-3' 21meh Tm=58°C

Oligonucleòtid DSTCF5': 5'-CCGGAATTCATAATTATCCCT-3' 21meh Tm=58°C

Per la PCR es van barrejar els següents reactius:

- 1/10 plàsmid SKcontenint l'insert d'interès (mini-prep concentració aprox.200ng/μl)
- 0.4 μl *Taq* DNA polymerase (Biotherm; 5 U/μl)
- 5 μl 10 × PCR buffer (Biotherm)
- 2 μl Mg²⁺ (Biotherm)
- 0'5 μl of each of the specific *GtWnt-5/GSK-3* primers (20 μM each)
- 0'8 μl dNTPs (10 mM)
- fins a un volum final de 50 μl amb H₂O destil.lada

Les condicions per la PCR varen ser:

35 cicles:

94°C, 30 seg

48°C, 30 seg

72°C, 1 min 30 seg

2)-Purificació fragment de PCR amb kit GFX™PCR DNA Band Purification Kit d'Amersham Biosciences.

3)-Càlcul concentració inserts purificats Wnt-5 i GSK-3: aprox. 15ng/ μl i vector L4440 salvatge: 68ng/μl

4)-Digestió EcoRI vector salvatge i inserts. Necessitem 20ng de vector i 20 ng d'insert per fer la lligació en proporció 1:1

digestió inserts

digestió vector l4440

2 μl DNA 1 μl EcoRI 2 μl bufferB 15 μl aigua <hr/> 20 μl totals

4μl vector 2μl buf 2μl EcoRI 12μl aigua <hr/> 20 μl totals
--

Les digestions es realitzaren a 37°C durant 4h i, en el cas de la de l'insert es realitzà per duplicat.

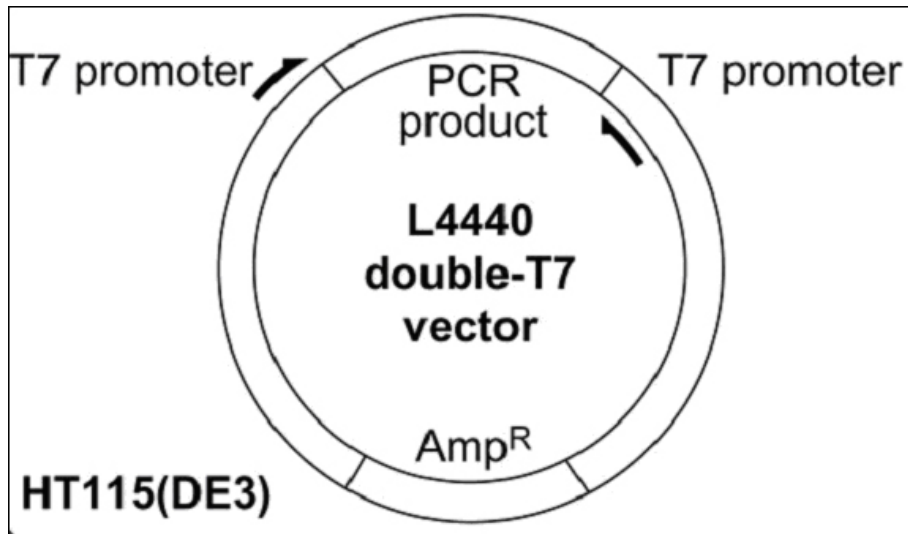


Figura 3
Esquema del
Vector L4440

5) Testem en un gel d'agarosa la linearització del vector

6) Lligació a 17°C en proporció 1:1, per tant 5µl de vector digerit i 20 µl d'insert digerit (20ng:20ng). Per tant:

5µl vector digerit

20µl inserts digerits

25µl kit lligació

7) Com que la transformació en cèl.lules HT115 no és massa eficient, prèviament a la transformació en dites cèl.lules, es realitza una transformació estàndar en cèl.lules DH5-α. No cal IPTG ni X-Gal perquè el vector no té selecció blau-blanc. Es fan mini-preps i es testen per digestió EcoRI i per seqüenciació.

8) Dels clons que han resultat ser positius se n'utilitza un petit volum de la mini-prep per transformació en cèl.lules HT115 (fetes competents amb CaCl₂):

1-afegir 1-100 ng de plàsmid amb insert lligat a 100µl de cèl.lules competents

2-Incubar en gel durant 30minuts

3-Shock tèrmic a 37°C durant 1minut

4-Incubar en gel durant 2 minuts

5-Afegir 1ml de medi LB i incubar durant 1h a 37°C, en agitació

6-Plauegem 10µl i 100µl respectivament en plaques LB amb tetraciclina (12'5µg/ml finals) i ampicil.lina (la tetraciclina ens permet seleccionar pel transposó que fa possible disrupcioner la RNAsaIII de les cèl.lules HT115, i l'ampicil.lina ens sel.lecciona el plàsmid L4440. Incubació overnight a 37°C (són cèl.lules de creixement lent; podem arribar a necessitar unes 36 hores per obtenir colònies)

9) Es piquen un nombre elevat de colònies amb les que es fa mini-prep tradicional amb Kit Quiagen. Es testen per digestió i d'aquelles positives es fa PCR sobre el plàsmid en qüestió i se seqüencia la banda de PCR per comprovar que es tracta del fragment del gen d'interès. Els clons positius es guarden en forma de glicerinat a -80°C

10) Amb un dels clons positius de cada gen d'interès es procedeix a preparar el menjar artificial. Cada clon es fa créixer overnight a 37°C en agitació en 3ml de LB+tet+amp

11) Fem un inòcul 1/10 del cultiu overnight en 3ml de LB només amb ampicil.lina i el fem créixer durant 1h30' a 37°C en agitació.

12) Inducció dels cultius amb IPTG 1mM durant 4hores a 37°C en agitació (es poden provar diferents concentracions d'IPTG, segons llegim a l'article)

13) Pelletagem les cèl.lules durant 5' a aproximadament 2000r.p.m i les conservem en gel

14) Paral.lelament macerem un trosset de fetge en un petit volum d'aigua fins que en poguem agafar en un eppendorf un líquid espès que centrifugarem. Recollirem 250µl del SN. Per altra banda hem dissolt a 65°C (aigua pre-escalfada en un eppendorf) agarosa de baix punt de fusió en 250 µl aigua mq, de forma que ens quedi que l'agarosa està a una concentració 1% en el volum final de 500 µl a l'ajuntar l'aigua amb agarosa amb el macerat líquid de fetge. Afegim unes traces de colorant Roig neutre (Fluka) visible a través de la pell de la planària per assegurar-nos que realment han menjat.

15) Ressupenem el pellet de cèl.lules amb 50 µl del macerat que conté l'agarosa de baix punt de fusió, i ho distribuïm sobre un paper de parafilm en forma de gotes, en petris diferents per cada gen.. Deixem que se solidifiqui a la nevera una estona

16) Donem el menjar a les planàries en forma de petites gotes solidificades. És important constatar si mengen, la qual cosa és força senzilla perquè el colorant s'endevina sota l'epidermis de l'animal segons es mostra a la fotografia.

Notes:

-S'aconsella fer la inducció amb IPTG de nou cada vegada. Els cultius inicials els hem utilitzat durant tot el període de temps que dura un experiment (en el nostre cas 4-5 ingestes)

-En funció del gen en qüestió i dels resultats dels tests per RT per anar controlant els nivells de transcrit, es fan més o menys ingestes. En ambdós gens en el nostre cas es realitzaren una mitja de 5 ingestes, sempre amb intervals de 3-4 dies, ja que sinó els animals no tenen gana suficient.

-Després de la última ingesta se'ls talla el cap i s'observa l'evolució de la regeneració en el temps de cada individu per separat.

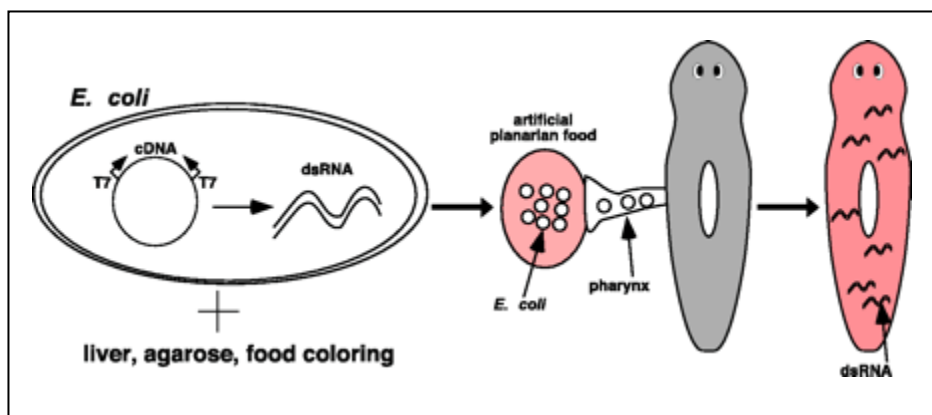


Figura 4. Mètode per alimentar planàries amb dsRNA produït a *E.coli* HT115. Tret de Newmark *et al.*, 2003



Figura 5. Planàries alimentades amb el fetge artificial, el color vermell és el colorant incorporat, inoquo, que s'endevina sota la pell

5.3 Anàlisi per RT-PCR

L'objectiu de la RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) és examinar si un organisme o una part d'un organisme expressa un gen en particular i si així és i interessa examinar fins a quin nivell comparant-ho amb altres mostres. L'RNA s'extreu del teixit de l'organisme i a partir d'ell es sintetitza aquest cDNA. Posteriorment es realitza una PCR amb els cDNAs particulars i amb dos gens específics pel gen d'interès. Part del nostre treball s'ha basat en testar per RT-PCR el nivell dels gens caracteritzats quan els individus han estat injectats amb RNAi o tractats amb drogues com l'alsterpaulona.

En els anàlisis per RT-PCR sempre s'inclou una RT-PCR control del gen *Dth2* (Garcia-Fernández *et al.*, 1993). Com que la seva expressió és ubíqua, l'amplificació del fragment de *Dth2* a partir de diferents regions de la planària o a partir de diferents organismes hauria de ser equivalent, assumint doncs que la concentració utilitzada de cDNA per la PCR és la mateixa. Els oligonucleòtids emprats foren:

Dth2F (*forward*) 5'-CCAATGCTAGTAATGATCCGCGTAT-3' 25meh

Dth2R(*reverse*) 5'-TGGGAGACCGTTCTTTATCGT-CAAC-3' 25meh

I les condicions de la RT-PCR:

- Dos volums diferents (0.4 µl i 2 µl per un volum final de 25 µl) per cada cDNA. El volum correcte per cada cDNA podia doncs ser calculat per utilitzar concentracions iguals a l'hora de fer les RT-PCRs amb les diferents mostres de cDNA amb els oligonucleòtids per *GtWnt-5*, *GSK-3*, o altres gens com *Engrailed*.
 - 2.5 µl 10× buffer (*Promega*)
 - 0.5 µl dNTPs (10 mM)
 - 0.5 µl de cada un dels oligonucleòtids Dth2F (10 µM) i Dth2R (10 µM)
 - 2.5 µl Mg²⁺ (*Promega*)
 - 0.3 µl *Taq* DNA polymerase (5 U/µl; *Promega*)
 - fins a un volum de 25 µl amb H₂O

Les condicions per la PCR varen ser:

30/35 cicles:

- 94°C, 30 sec
- 60°C, 30 sec
- 72°C 1min

5.3.1 Condicions per test RT-PCR després de la injecció de dsRNAGtWnt-5 i de la ingestió de bacteries productores de dsRNAGtWnt-5:

Cal esmentar que els oligonucleòtids específics que es trien per dur a terme una RT-PCR han de complir la condició que un d'ells ha de ser de fora de la regió utilitzada per dissenyar la dsRNA ja que, si tots dos són de dins, podria ser que per RT-PCR obtinguéssim una banda corresponent al dsRNA microinjectat o insertat al vector L4440.

Per la RT-PCR de GtWnt-5 es van barrejar els següents reactius:

- Xµl de cDNA "control" o "alimentat" (segons ajust amb PCRDth2)
- 0'3 µl *Taq* DNA polymerase (Gene Craft Germany Biotherm™; 5 U/µl)
- 2'5 µl 10 × PCR buffer (Gene Craft Germany Biotherm™)
- 1 µl Mg²⁺ (Gene Craft Germany Biotherm™)
- 0'25 µl dels oligonucleòtids específics **W3'2** i **W5'**
- 0'4 µl dNTPs (10 mM)
- fins a un volum final de 25 µl amb H₂O

Les condicions per la PCR varen ser:

35-40 cicles:

- 94°C, 30 seg
- 60°C, 30 seg
- 72°C, 1 min 30 seg

5.3.2 Condicions per test RT-PCR després de la injecció de dsRNAGtGSK-3 i de la ingestió de bacteries productores de dsRNAGtGSK-3:

Per la RT-PCR de GSK-3 es van barrejar els següents reactius:

- Xµl de cDNA "control" o "alimentat" (segons ajust amb PCRDth2)
- 0'3 µl *Taq* DNA polymerase (Gene Craft Germany Biotherm™; 5 U/µl)
- 2'5 µl 10 × PCR buffer (Gene Craft Germany Biotherm™)
- 1 µl Mg²⁺ (Gene Craft Germany Biotherm™)
- 0'5 µl dels oligonucleòtids específics **G3'** i **G5'**
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- fins a un volum final de 25 µl amb H₂O

Les condicions per la PCR varen ser:

35-40 cicles:

- 94°C, 30 seg
- 58°C, 30 seg
- 72°C, 1 min 30 seg

5.3.3 Condicions per test RT-PCR d'*Engrailed*

(segons projecte final de carrera de Mette Handberg-Thorsager “Characterization of the Homeobox Gene *engrailed* in the planarian *Girardia tigrina*”)

Per la RT-PCR de GtEngrailed es van barrejar els següents reactius:

- Xµl de cDNA "control" o "alimentat" (segons ajust amb PCRDth2)
- 0'3µl *Taq* DNA polymerase (Gene Craft Germany Biotherm™; 5 U/µl)
- 2'5 µl 10 × PCR buffer (Gene Craft Germany Biotherm™)
- 1µl Mg²⁺ (Gene Craft Germany Biotherm™)
- 0'5 µl dels oligonucleòtids específics **En4R** i **En5R**
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- fins a un volum final de 25 µl amb H₂O

Les condicions per la PCR varen ser:

35 cicles:

- 94°C, 30 seg
- 60°C, 30 seg
- 72°C, 1 min

Els oligonucleòtids emprats foren:

En4R: 5'- TCGCTTTTCTTCACTGAGATATC -3' 23meh

En5R: 5'-GAGTCCAAG-TCCGTCCCGTCGGCG-3' 25meh

6. IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTA

6.1 Protocol d'immunotinció

La immunofluorescència indirecta es troba descrita a la tesi d'en F. Cebrià Sánchez (Universitat de Barcelona, 2000), però amb algunes modificacions que hem inclòs i que descrivim a continuació. Els experiments han estat realitzats al llarg d'aquest treball amb planàries tant intactes com regenerants, així com injectades amb dsRNA i tractades amb la droga alsterpaulona.

Nota: No tot el líquid ha de ser retirat del pou per evitar que les planàries s'enganxin unes amb les altres o a la paret del pouet.

1. Incubem les planàries en la solució de maceració (1:1:13, àcid acètic:glicerol: PBS, Bueno, 1994) a 17°C durant 10 min en un eppendorf (si tenim un o 2 individus per grup) o en un falcon de 15ml si en tenim més.
2. Rentar un cop en PBS.
3. Fixar les planàries en paraformaldèhid (PFA) 4% en PBS durant 4 hores a 4°C.
4. Deixem els animals 5 min en methanol:4% PFA en PBS (1:1) a 17°C.
5. Deixem els organismes 5 min en metanol 100% a 17°C.
6. Despigmentem les planàries tota la nit en 10% H₂O₂ en metanol at 4°C sota llum freda.
7. Rentem 2×5min en 100% methanol a 17°C.
8. Rentem amb PBST:methanol (1:1) durant 5 min a 17°C.
9. Deixem els organismes en PBST durant 5 min a 17°C.
10. Incubem en 0.25% BSA (albúmina sèrica bovina, fracció V) en PBST durant 1h a 17°C.
11. Incubem amb l'anticòs primari diluït en 0.25% BSA en PBST durant 24 hours a 4°C, en agitació suau.
12. Rentem les planàries 4-5 cops amb 0.25% BSA en PBST al llarg de 24 h a 17°C.
13. Incubem amb l'anticòs secundari conjugat a fluorescència i diluït en 0.25% BSA en PBST durant 24 h a 4°C en la foscor.
14. Rentem els animals en 0.25% BSA en PBST a 17°C en la foscor.
15. Fem un rentat amb equilibration buffer (Slow Antifade reagent Kit, Molecular Probes) i muntem les planàries entre portaobjectes i cubreobjectes amb unes gotes d'anti-fading en glicerol (SowFade Light Antifade Kit, Molecular Probes)

PBS×10: (KCl 2 g, NaCl 80 g, KH₂PO₄ 2 g, Na₂HPO₄*12H₂O 28.9 g)/1000 ml, pH 7.4.

PBST: PBS amb 0.3% Triton×10

Com a **anticossos primaris** en algun moment d'aquest treball s'han utilitzat:

1. Anti FMRF-amida (DiaSorin) (1:100), generat a conill
2. Anti tubulina Ab-4 (clons DM1A I DM1B) anticòs monoclonal (Neomarkers) (1:200), generat a ratolí
3. Anti tirosina fosforilada anticòs monoclonal (Cell Signalling Technology) (1:500), generat a ratolí
4. Anti fosfo histona H3 anticòs policlonal (Upstate Cell Signalling Solutions) (1:200-1:500), generat a conill
5. Anti β -catenina de *Xenopus* (cedit per Pierre .McCrea) anticòs policlonal (1:200-1:500), generat a conill
6. Anti β -catenina d'eriçó de mar (cedit per Prof. McClay, Duke University) (1:200-1:500), generat a *guinea pig*

Els **anticossos secundaris** utilitzats contra els anticossos primaris són:

1. Donkey Anti-Rabbit IgG (1:200) de Jackson ImmunoResearch conjugat a isotiocianat de Fluoresceïna (FITC)
2. Donkey Anti-Rabbit IgG (1:200) de Jackson ImmunoResearch conjugat a Rhodamine-red
3. Goat Anti-Mouse IgG (1:50) de Jackson ImmunoResearch conjugat FITC (GAM-FITC).
4. Goat Anti-Mouse IgG (1:50) de Jackson ImmunoResearch conjugat a Rhodamine-red
5. Goat Anti-Guinea Pig IgG (1:400) de Jackson ImmunoResearch conjugat a Cy5 (cianina5)

6.2 Tinció DAPI

-Tinció durant 5' amb DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) dissolt en PBS

-un parell de rentats amb de 5' amb PBS

-Muntatge amb glicerol/PBS

7.COMPATGE DE MITOSIS

7.1 Tractament amb colchicina

Aquesta tècnica es va emprar per a l'estudi i compatge de les mitosis, ja que la colchicina és un agent antimitòtic clàssic. Organismes controls i organismes tractats de 3 dies de regeneració (on es considera que existeix un pic mitòtic a 19°), van ser incubats durant 24h en *aigua de planàries* (apartat 1.1 de Materials i Mètodes) amb 0.05% de colchicina (*Sigma*, nº catàleg C9754). La incubació es realitzà durant 24 hores i els organismes es varen preparar pel posterior tractament amb orceïna acètica (apartat 7.2 de Materials i Mètodes). D'aquesta forma es comptabilitzen les mitosis aturades a la zona del postblastema (aprox.600µm al voltant de la ferida) (Saló i Baguñà, 1989) en organismes de 2d i mig de regeneració a 19°C (el procediment complet es troba explicat a l'apartat 2.2.4 de Resultats i Discussió)

7.2 Tinció amb orceïna acètica

- 1-Fixar els animals en Carnoy durant 15'
- 2-Posar en HCl 1N a temperatura ambient durant 2'.
- 3-Posar en HCl 1N a 60° durant 4-5'' (en les primeres hores de regeneració aquest pas s'escurça a 1-2' degut al perill de que les cèl.lules prop de la ferida es desprenguin).
- 4-Tenyir amb orceïna acètica. El temps de tinció depèn del tamany essent de 5' per a organismes de 5mm, 10' per a organismes de 8mm i 15' per animals de 11mm
- 5-Diferenciar amb àcid acètic al 5% durant 20'. Fer diversos rentats durant aquest temps
- 6-Muntar amb glicerol al 25% sobre un porta i col.locant amb una lleugera pressió el cubre al damunt, sense trencar l'epidermis. Per a obtenir preparacions semi-permanents, la preparació es laca mantenint-la a 4°. En aquestes condicions es poden mantenir més d'un mes.

8. CAPTACIÓ D'IMATGES

8.1 Lupa estereoscòpica i microscopi òptic

Les diferents mostres s'han observat sota la lupa estereoscòpica Zeiss Stemi SV6 i amb una vídeo càmera de color Sony CCD. També s'han utilitzat els objectius de 10x 20x i 40x del microscopi òptic Zeiss Axiophot. Les imatges s'han salvat digitalment amb una càmera Nikon Coolpix 995.

8.2 Lupa de fluorescència

La lupa GFP utilitzada al Parc Científic de la Universitat de Barcelona és una Leica MZFLIII.

8.3 Microscopi confocal:

El microscopi confocal utilitzat del Parc Científic de la Universitat de Barcelona és un Leica TCS 4D.

9. SUPORT INFORMÀTIC

Pel tractament de les seqüències s'han usat els buscadors de les pàgines web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> i <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>, per comparar les seqüències amb els bancs de dades. Aquesta eina no només s'ha usat per adscriure els gens trobats dins dels seus respectius grups, sinó també per descartar contaminacions creuades d'altres organismes amb els que es treballa al laboratori. També s'ha usat la pàgina electrònica: <http://us.expasy.org/tools/dna.html> per fer traduccions a proteïna. Altres eines pel treball amb seqüències es poden trobar al programa BioEdit (alguns alineaments de seqüències s'han realitzat amb el programa Bioedit). Pel que fa als anàlisis filogenètics, les matrius de distància es van inferir amb el programa PROTDIST del set PHYLIP, utilitzant la matriu Dayhoff PAM; els arbres filogenètics mostrats i no mostrats al treball es van inferir amb el programa FITCH, del set PHYLIP amb l'algoritme de Fitch-Margoliash.

Durant els darrers mesos de la realització d'aquesta tesi doctoral s'ha tingut accés a la base de dades de *Schmidtea Mediterranea*, (el treball de seqüenciació està sent realitzat al Genome Sequencing Center de la Universitat de Washington, St.Louis) que inclou en aquests moments 10^7 clons diferents. La base de dades a la qual es pot accedir mitjançant la pàgina Web del NCBI es troba encara en procés de ser completada i s'ha utilitzat per fer cerques d'homòlegs dels gens aïllats en aquest treball.

10. ESQUEMES OLIGONUCLEÒTIDS EMPRATS

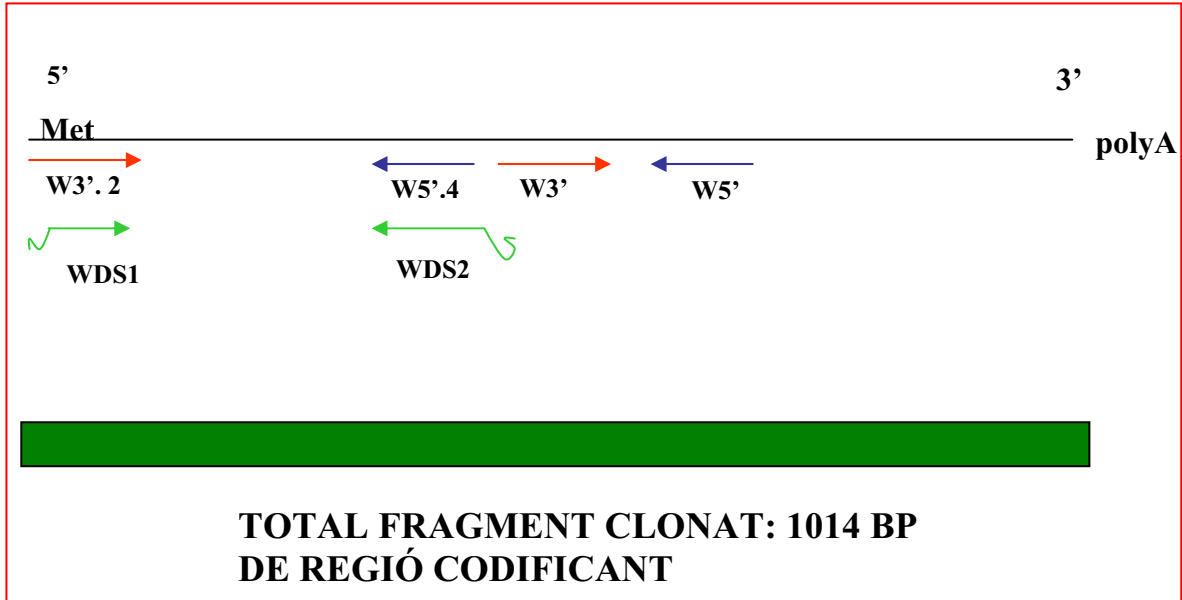


Figura 6. Dibuix que mostra esquemàticament la mida del gen GtWnt-5, així com la posició relativa dels diferent oligonucleòtids utilitzats per al disseny de sondes per hibridacions *in situ whole-mount* i per la síntesi de dsRNA.

- W3':** 5'-GTGTGGAGACAATTTAAGATATGCC-3'
- W5':** 5'-GCAGATTTACTAAAATGATTGCCAG-3'
- W5'.4:** 5'-TTTAGGTCTCTCTTCAGTACT-3'
- W3'.2:** 5'-GTACTACCGTGGAAAAACAAA-3'
- WDS1:** 5'-CCGGAATTCCTACCGTGGAAA-3'
- WDS2:** 5'-CCGGAATTCCTTAGGTCTCTC-3'

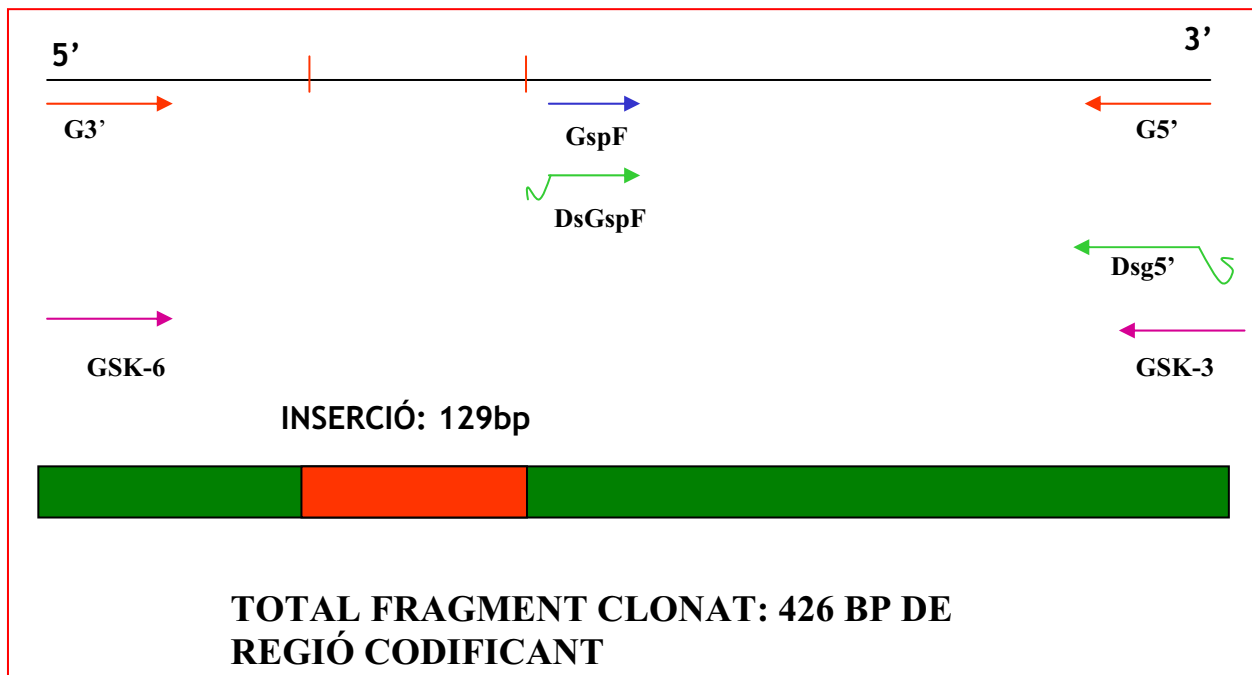


Figura 7. Dibuix que mostra esquemàticament la mida del fragment clonat homòleg al gen GSK-3, així com la posició relativa dels diferent oligonucleòtids utilitzats per al disseny de sondes per hibridacions *in situ whole-mount* i per la síntesi de dsRNA.

GSK-6:	5'-GTNGCNATHAARAARGT-3'
GSK-3:	5'-GGYTDDATRTCNCCKRTGRCA-3'
G3':	5'-GTTGCCATCAAGAAGGTGCAC-3'
G5':	5'-GGTTTTATATCGCGATGGCAC-3'
GspF:	5'-AATACGAGAAGACAGCAGCAA-3'
DSGspF:	5'-CCGGAATTCAATACGAGAAGA-3'
DSG5':	5'-CCGGAATTCGGTTTTATATCG-3'

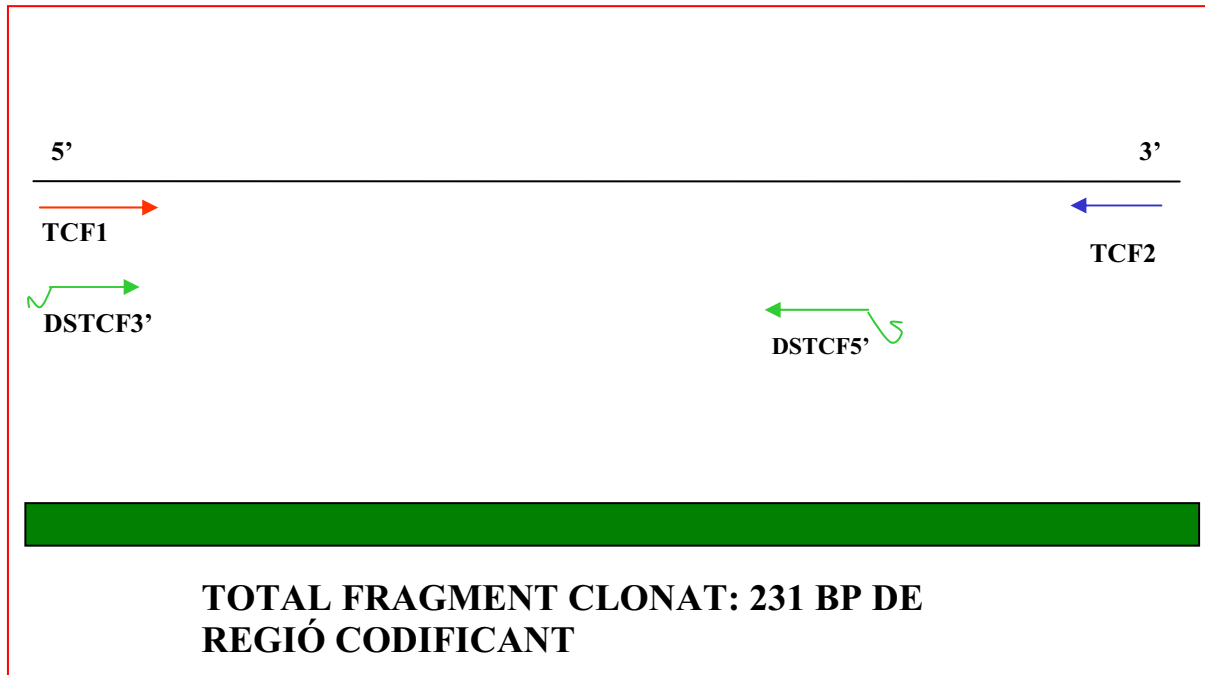


Figura 8. Dibuix que mostra esquemàticament del fragment clonat homòleg a membres de la família TCF, així com la posició relativa dels diferent oligonucleòtids utilitzats per al disseny de sondes per hibridacions *in situ* whole-mount i per la síntesi de dsRNA.

TCF1: 5'-ATGCTNTAYATGAARGARAT-3'
TCF2: 5'-CKYTTNCKYTTYTTYTTYTT-3'
DSTCF3': 5'-CCGGAATTCATGCTGTATATG-3'
DSTCF5': 5'-CCGGAATTCATAATTATCCCT-3'

Amb els presents resultats voldríem posar de manifest que aquesta via conservada al llarg de l'escala filogenètica també ho està al filum dels Plathelminths, almenys pel que fa a un dels lligands, al regulador negatiu de la via i al factor de transcripció associat. Les nostres aproximacions demostren que aquesta via està activada al SNC de planàries i que sembla necessària per la regeneració de dit sistema.

Al llarg de tot aquest temps hem intentat aïllar utilitzant l'aproximació de les PCRs degenerades molts dels membres de la via Wnt, tot començant per elements de la família dels Wnt mateixos, de la família de receptors Frizzled, diferents proteïnes citosòliques, així com alguns antagonistes i també efectors nuclears. Un conjunt d'elements tots ells que mica en mica han anat dibuixant al llarg dels anys i amb l'esforç de molts investigadors l'anomenada via Wnt canònica, una via activada per proteïnes senyalitzadores que, com sabem, controlen moltes de les decisions del desenvolupament dels organismes. Hem aconseguit aïllar un dels lligands Wnt ubicat a la subclasse Wnt-5; la GSK-3 que és l'element indispensable en la regulació negativa de la via, i, per últim, un homòleg a un dels factors de transcripció associats, un element TCF. Cal dir que s'han destinat també molts esforços a l'aïllament de l'element clau de la via, la β -catenina, proteïna molt conservada a nivell estructural i funcional al llarg de l'escala filogenètica, sense èxit. De totes formes, s'ha aconseguit aïllar una proteïna germana provinent d'una proteïna ancestral comú, una proteïna homòloga a les α -importines, destinades al transport nuclear. Hem decidit doncs incloure a l'apartat 1.2 el clonatge i l'anàlisi de filogènia d'aquesta proteïna.

El **Capítol I**, per tant, inclou en primer lloc l'article "*Gtwnt-5* a member of the wnt family expressed in a subpopulation of the nervous system of the planarian *Girardia tigrina*". (Marsal *et al.*, Gene Expression Patterns. 2003 Aug;3(4):489-95) a l'apartat 1.1, així com un resum del mateix. Els resultats del clonatge dels altres elements es troben descrits als apartats 1.2, 1.3, i 1.4 respectivament, juntament amb l'anàlisi filogenètic i d'expressió en algun dels casos. Hem cregut convenient precedir tots ells per una part introductòria més completa que el que s'ha comentat a la Introducció en sí de cadascun dels elements que descriu el que se'n coneix i quin és el paper que juga a la cascada de senyalització.

El **Capítol II** descriu els fenotips de manca de funció de GtWnt-5, GtGSK-3 a l'utilitzar diferents tècniques de RNAi (RNA *interference*) com són la microinjecció i la

ingesta de bactèries productores de la doble cadena de RNA en qüestió. També es descriu el resultat de la utilització de diferents drogues inactivadores de la GSK-3. Es discuteix i es formulen hipòtesis sobre les conseqüències que la seva manca pot produir en aquests organismes i en concret en la seva regeneració, intentant inferir així la seva possible funció en organismes salvatges.

El **Capítol III** és un capítol de discussió més general i integrador que intenta reafirmar la importància en l'evolució, així com en la regeneració de la planària, dels sistemes de senyalització, que permeten la comunicació entre cèl.lules. Es discuteix també sobre el possible nombre de gens Wnt i vies Wnt diferents a la planària, fent èmfasi a la via Wnt canònica. També s'exposa un possible *loop* regulador entre *Gtwnt-5* i *Gtengrailed*

1. AÏLLAMENT I CARACTERITZACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE DIVERSOS ELEMENTS DE LA VIA WNT A PLANÀRIA.

1.1-GtWnt-5, primer Wnt trobat a Plathelminths

En primer lloc, hem aïllat i caracteritzat un membre de la subclasse Wnt-5 de proteïnes senyalitzadores, que correspon al primer Wnt trobat a Plathelminths i el primer Wnt-5 trobat a Lofotrocozoous. El clonatge i anàlisi de seqüència, així com les relacions filogenètiques amb altres membres Wnt es mostren a l'article. També l'anàlisi d'expressió espacial i temporal en organismes intactes i en regeneració es troba descrit al mateix treball.

El gen identificat en aquest treball és un homòleg del gen *Wnt-5* d'altres organismes i per això l'anomenarem *GtWnt-5*. Segons els experiments de duplicació axial realitzats a embrions de *Xenopus* que van fer definir dues classes de *Wnts* com hem esmentat en seccions anteriors, aquest gen s'inclouria a la classe XWnt-5A. En principi els membres d'aquesta classe no produïen duplicació axial, tot i que això és discutible perquè segons alguns experiments aquesta incapacitat pot ser solventada per un receptor determinat. En canvi, segons alguns articles, els membres d'aquesta classe alteraven moviments morfogenètics durant el desenvolupament. També es parla d'una preferència d'utilització de la via no-canònica enfront de la via canònica. De totes formes, aquesta subdivisió en classes de *Wnts* que utilitzen la via "canònica" o les "no-canòniques" fa referència només al llinatge de vertebrats fins el moment; podria ser per tant, que en invertebrats com l'organisme que estudiem aquesta classificació no fos tan estricta. A la Introducció s'han comentat ja algunes de les accions que es coneixen d'alguns *Wnt-5* de diferents organismes, per poder tenir-ho present alhora de buscar alguna similitud d'expressió i funcional amb el gen clonat a la nostra espècie.

En aquest primer apartat de Resultats i Discussió afegim l'article "*Gtwnt-5* a member of the wnt family expressed in a subpopulation of the nervous system of the planarian *Girardia tigrina*" i en presentem un breu resum a continuació:

RESULTATS I DISCUSSIÓ

L'article descriu l'aïllament i caracterització de l'expressió de GtWnt-5 en planàries intactes i al llarg de tot el procés regeneratiu. El fragment d'aproximadament 120bp amb que es va iniciar aquest treball va ser clonat per David Pineda i Tomàs, amb oligonucleòtids degenerats cedits pel grup del Prof. Thomas Holstein de la Universitat de Darmstadt, Alemanya, descrits a l'article. Les meves contribucions són obtenir la seqüència completa del gen, fer-ne l'anàlisi filogenètic i l'estudi de l'expressió en individus intactes i durant el procés de regeneració. Una de les aportacions importants és l'adscripció d'aquest nou gen a la subclasse dels Wnt-5, ja que fins el moment cap altre membre Wnt-5 ha estat identificat en el clade dels lofotrocozoous; és així mateix el primer gen Wnt trobat a Plathelminths, publicat fins el moment. El patró d'expressió temporal i regional, analitzats per hibridació *in situ whole-mount* i sobre crioseccions revelen que ens trobem davant d'un marcador neural nou de ganglis cefàlics, cordons nerviosos ventrals principals i sensors acumulats essencialment a la perifèria del cap. GtWnt-5 es detecta en organismes intactes segons un patró espacial diferencial a nivell dels ganglis, possiblement en forma de gradient: la senyal es localitza preferentment a la part més externa dels ganglis cefàlics i dels cordons nerviosos principals, mentre que sembla que les neurones més interiors són negatives. A més, la distribució de la senyal és iterada a nivell dels ganglis, localitzada a la base de l'inici de les vuit branques cefàliques (figura 1), suggerint una altra vegada que el cervell de les planàries, tot i semblar aparentment simple des del punt de vista morfològic, no és una estructura contínua sinó que pot ser dividit en compartiments. GtWnt-5 pot ser utilitzat també per fer un seguiment de la regeneració del SNC; la senyal apareix per primer cop el dia 3d de regeneració, però els nivells màxims es detecten entre els dies 7 i 10 (en un patró que permet corroborar el tipus de regeneració epimòrfic-morfalàctic proposat a planària per Saló i Baguña, 1984 a i b), catalogant-lo doncs com a gen d'estadis regeneratius intermedis. Possiblement la seva funció estarà relacionada més en la organització i manteniment del SNC que no en fenòmens inductius.

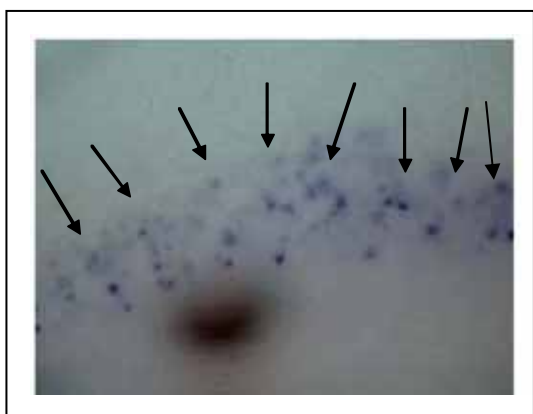


Figura 1. Hibridació *in situ whole-mount* de GtWnt-5. Imatge al microscopi amb objectiu de 20X. Patró iteratiu (fletxes negres) de GtWnt-5 a nivell de la part externa dels ganglis cefàlics en un organisme intacte, que podria coincidir amb les projeccions o branques dels ganglis cefàlics per connectar amb els sensors de la perifèria del cap



ELSEVIER

Gene Expression Patterns 3 (2003) 489–495



www.elsevier.com/locate/modgep

Gtwnt-5 a member of the *wnt* family expressed in a subpopulation of the nervous system of the planarian *Girardia tigrina*

Maria Marsal, David Pineda, Emili Saló*

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

Received 7 January 2003; received in revised form 3 March 2003; accepted 6 March 2003

Abstract

Wnt proteins are a family of highly conserved secreted glycoproteins that regulate cell-to-cell interactions during embryogenesis. They act as signaling molecules and take part in many crucial decisions throughout the development of organisms ranging from *Hydra* to human. We have isolated and characterized the expression of a member of the Wnt family, *Gtwnt-5* gene in the planarian *Girardia tigrina*. Planarians are free-living members (Class Turbellaria) of the Phylum Platyhelminthes. They are best known for their high regenerative capabilities. These organisms have an apparently simple central nervous system (CNS) from a morphological perspective, with cephalic ganglia in the dorsal anterior region and two ventral main nerve cords along the body. However, a large number of planarian neural genes have recently been identified and therefore it is possible to define different molecular and functional domains in the planarian brain. The present study shows expression of *Gtwnt-5* in a subpopulation of the whole CNS of intact organisms, being activated during regeneration. *Gtwnt-5* reveals a differential spatial pattern: the expression is preferentially found in the most external region of the CNS. In addition, a kind of iterative pattern has been observed at the ganglia level, suggesting that the planarian brain might not be a continuous structure but compartmented or regionalized. *Gtwnt-5* signal is also detected at the sensors of the worm: at the auricle level and all around the cephalic periphery. All these data provide us with a new neural marker for the planarian brain, and can be used to follow regeneration of the CNS.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Planarian; Regeneration; Central nervous system; wnt

1. Results and discussion

Genetics in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*, biochemistry in cell culture, ectopic gene expression in *Xenopus* embryos, and knockouts in mouse have led to the conviction that Wnt proteins are essential for many of the decisions in development such as specification of cell polarity, cell fate identity and embryonic induction (Wodarz and Nusse, 1998). The genes included in the so-called XWnt-5A class are not able to duplicate the body axis after injection of mRNAs into ventral blastomeres of early *Xenopus* embryos, and instead they seem to play a role in controlling morphogenetic movements (Torres et al., 1996). With this work we report the isolation and characterization of a member of the Wnt

family which clusters with the Wnt-5 class of wnt molecules.

Several genes have recently been isolated in the planarian central nervous system (CNS) (for review see Saló and Baguña, 2002; Cebrià et al., 2002a,b; Pineda et al., 2002; Pineda and Saló, 2002). The planarian brain consists of two lateral lobes in an anterior-dorsal position, connected by a large anterior commissure and several lateral branches, eight or nine depending on the species, which connect the ganglia to the edge head sensors. More ventrally, the two main nerve cords extend from the ganglia to the tail of the worm (Morita and Best, 1966; Baguña and Ballester, 1978; Rieger et al., 1991; Reuter et al., 1995; Agata et al., 1998). With this work we report the isolation and characterization of *Gtwnt-5*, a gene which is continuously expressed in both the cephalic ganglia and the ventral nerve cords of the organism, as well as in the sensory organs spread all around the periphery of the planarian, but mainly concentrated in the anterior part of the body. Compared with other neural

* Corresponding author. Tel.: +34-93-402-1497; fax: +34-93-411-0969.
E-mail address: esalo@ub.es (E. Saló).

genes like *Dugesia japonica* *Djotx-A*, *Djotx-B*, *Djotp* (Umesono et al., 1997, 1999), *D. japonica* and *Girardia tigrina* *Pax6A* genes (Pineda et al., 2002), *Gtsix3* (Pineda and Saló, 2002) and planarian brain EST's collections (Cebrià et al., 2002a,b), it is possible to underline temporal and regional differences with *Gtwnt-5* expression. During head regeneration *Gtwnt-5* expression is activated at a mid stage and continuously expands through the whole regenerative process.

1.1. *GtWnt-5* full sequence

We isolated a planarian cDNA fragment with homology to different *wnt-5* genes by using degenerate polymerase chain reaction (PCR). The initial fragment was 140 bp in length and the complete cDNA sequence was obtained by 5'- and 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) PCR. Fig. 1A shows the nucleotide and amino acidic sequences of the isolated *Gtwnt-5* gene. The leader region includes



Fig. 1. Sequence of *Gtwnt5* and phylogenetic relationship between representatives of the wnt class. (A) Full nucleotide and amino acid sequence of *Gtwnt5*. Nucleotides are numbered at the right margin, and the deduced amino acids are numbered at the left. The conserved cysteine residues are in red. The consensus translation sequence surrounding the first methionine is in blue, and the polyadenylation signal is underlined. *Gtwnt-5* sequence has been deposited in the GenBank database under the accession number AY158890. (B) Phylogenetic tree showing the relationship of *Gtwnt-5* with members of the different Wnt subfamilies. The previous alignment was done with the whole cloned coding region and after removing those areas of ambiguous homology. Distance matrix was inferred with the PROTDIST program from PHYLIP set, using the Dayhoff PAM matrix; phylogenetic tree was inferred with FITCH program, from PHYLIP set, using the Fitch–Margoliash algorithm. Species: A, amphioxus; An, *Anopheles*; Bomb, *Bombyx mori*; Ch, chicken; Fugu, *Fugu rubripes*; Gt, *Girardia tigrina*; Halo, *Halocynthia*; Hy, *Hydra*; Hyact, *Hydractinia*; Hu, human; Pldu, *Platynereis dumerilii*; Sp, *Srongolectrotus purpuratus*; X, *Xenopus*; Z, zebrafish. Scale bar: genetic distance.

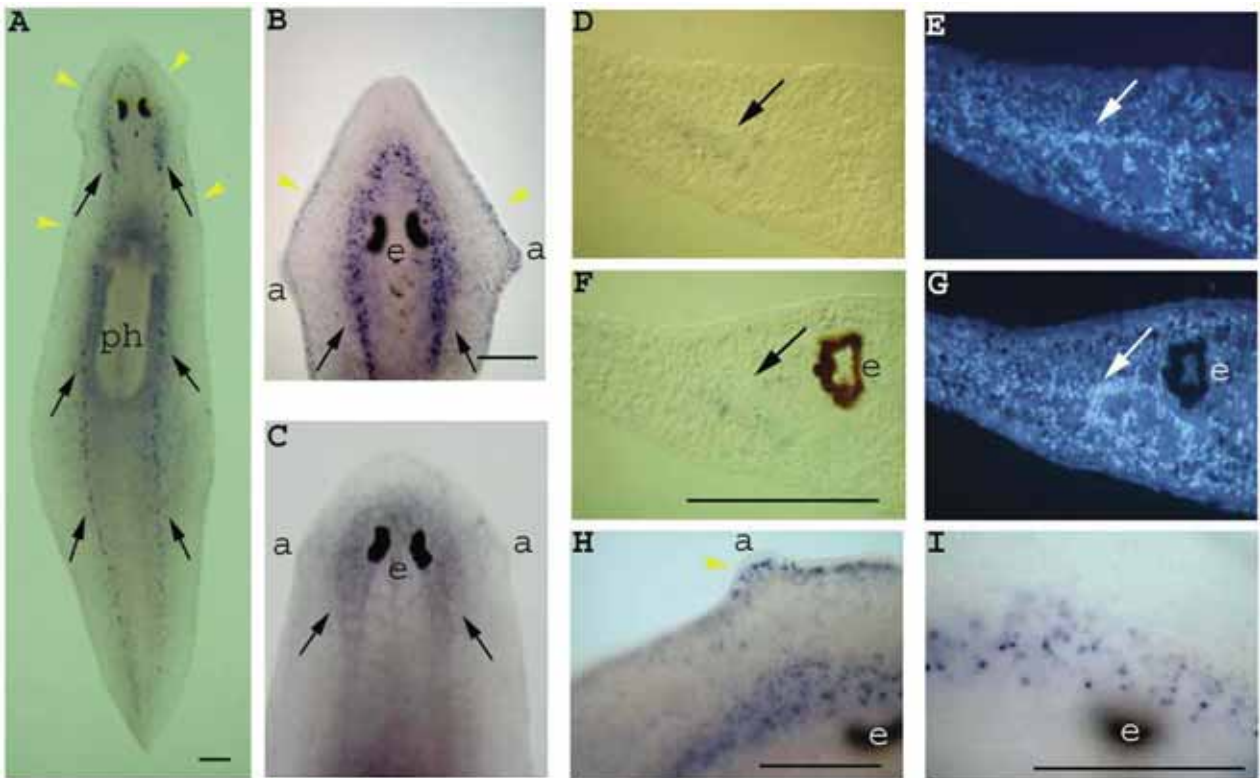


Fig. 2. Whole-mount in situ hybridization of *Gtwnt-5* in intact planarians. (A) Dorsal view of a whole intact planarian showing the expression in the central nervous system (arrows) and in the lateral anterior sensors from head to pharynx level (yellow arrowheads). (B) Higher magnification of the planarian head showing the expression in the intact cephalic ganglia (arrows) and the head sensors (yellow arrowheads). (C) Expression of *GtPax6A* (arrows), a ubiquitous central nervous system molecular marker. (D–G) The transversal cryosections anterior to the eyes (D,E) or at the eyes level (F,G) showing *Gtwnt-5* expression (D,F), together with Dapi staining (E,G) to localize the position of the nerve cell bodies, a circle of nuclei indicated by white arrows. In both sections *Gtwnt-5* signal is located in the external region of the ganglia (arrows), dorsal in the top. (H,I) Higher magnification of the head dorsal view with the expression of *Gtwnt-5* in the auricle (yellow arrowhead) and in the left cephalic lobe with a presumptive iterative pattern. a, auricle; e, eyes; ph, pharynx. Scale bars: 0.5 mm.

pattern comparison. Fig. 2B and C show *Gtwnt-5* and *GtPax6A* pattern of expression at the ganglia level. Both are undoubtedly neural markers, but they reveal a differential pattern, with *GtPax6A* ubiquitous in the CNS. Transversal cryosections were performed with hybridized organisms, which corroborate the above mentioned type of signal. The internal region of the CNS remains negative for *Gtwnt-5*, which obviously has neurons as revealed by the DAPI respective images (Fig. 2D,E and F,G). We speculate that the product of the gene could be distributed in a gradient manner, in an internal–external direction, with a maximum at the external part of the neural tube, the inner neurons remaining negative. In addition, *Gtwnt-5* signal is present in the sensors located at the dorso/ventral border including the auricle (Fig. 2H, yellow arrowhead), the cephalic periphery (Fig. 2B, yellow arrowheads) and, in some cases, reaching the pharynx level (Fig. 2A, yellow arrowheads).

1.2.2. Regenerating planarians

Planarians are able to regenerate a complete head with brain, auricles and eye spots in 2 weeks at 17 °C (Reuter et al., 1995, 1996). We present data on the *Gtwnt-5*

expression pattern observed in regenerative organisms, ranging from 1 to 14 days of regeneration at 17 °C. Organisms of 1 and 2 days of regeneration showed no signal (results not shown). First signals appear at the third day of the process in an arch shape, which corresponds to the newly formed anterior commissure of the brain, in the blastema (Fig. 3A). Some other planarian neural genes like *Djotx*, *DjPax6A* and six EST clones are expressed from the beginning of the process, an indication that they may be implied in early determination of the ganglia and nerve cords (Umesono et al., 1999; Pineda et al., 2002; Cebrià et al., 2002a). According to the timing of their up-regulation in the new forming blastema, neural genes are classified as early, mid and late regeneration expression genes (Cebrià et al., 2002a). *Gtwnt-5* might belong to the group of mid-regeneration genes: at 5 days of regeneration, an increase of *Gtwnt-5* expression is also detected in the nerve cords located close to the wound, probably related to the remodeling of this region to the posterior part of the new cephalic ganglia (arrows in Fig. 3B). The sensory cells located at the edge of the head have just been differentiated and express *Gtwnt-5* (yellow

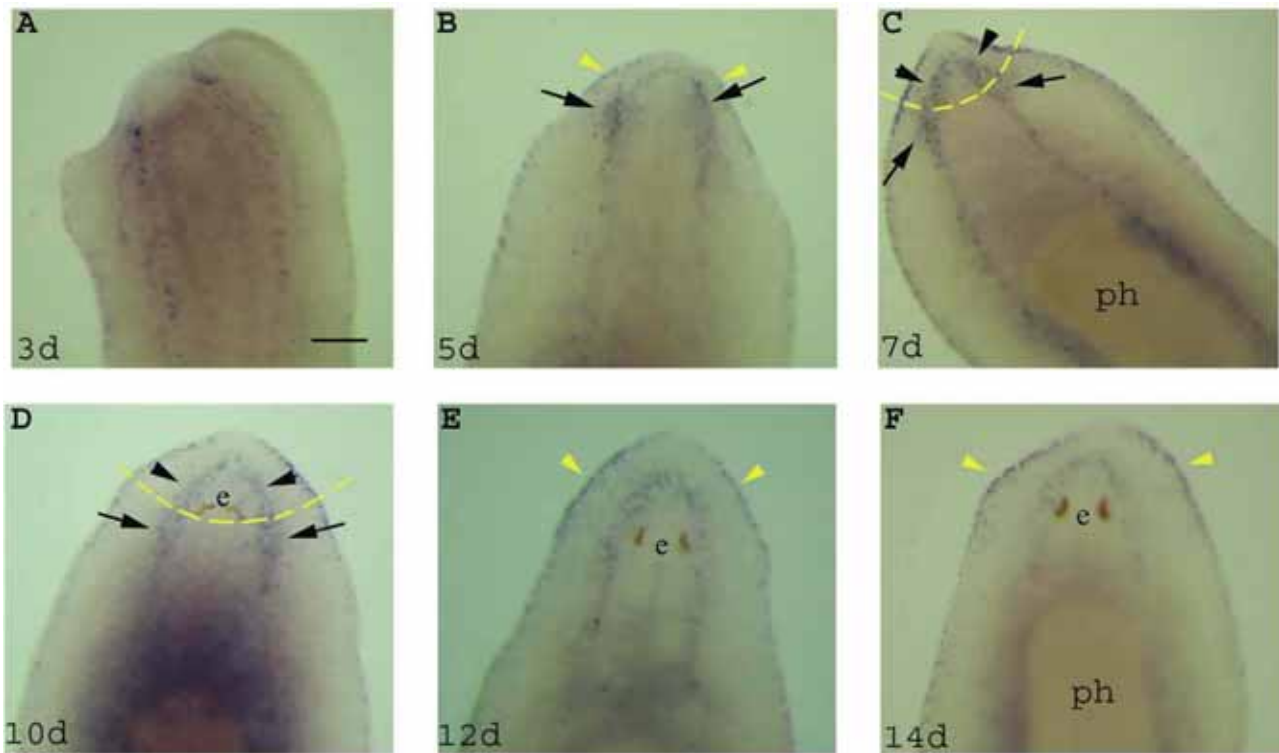


Fig. 3. Whole-mount in situ hybridization of *Gtwnt-5* during head regenerating planarians. (A) At 3 days of regeneration the first expression in the regenerative blastema can be observed with an arch shape that follows the new regenerated brain. (B) At 5 days of regeneration an increase in the *Gtwnt-5* expression can be observed in the old nerve cords located close to the wound (arrows), also the new dorsoventral border where the sensor cells differentiate are expressing *Gtwnt-5* (yellow arrowheads). (C) At 7 days of regeneration *Gtwnt-5* expression labels the newly regenerated cephalic ganglia; the yellow dashed line defines the border between blastema (new) and postblastema (old) regions, being the regenerated eyes (small brown dots) anterior to the border. (D) At 10 days of regeneration a similar pattern is maintained, with larger brain and eyes. (E,F) At later stages of regeneration, 12 and 14 days respectively, the activated *Gtwnt-5* expression compared to previous stages decreases and reaches the basal levels, while the dorsoventral border maintains the *Gtwnt-5* expression (yellow arrowheads). e, eyes; ph, pharynx. Scale bars: 0.5 mm.

arrowheads). This expression is maintained throughout the whole regenerative process. At 7 and 10 days of regeneration, the signal at the postblastema region (arrows in Fig. 3C,D), is as strong as that observed at the blastema region (arrowheads in Fig. 3C,D), a fact that corroborates the epimorphic-morphallactic model of regeneration in planarians (Saló and Baguña, 1984, 2002): formation of new structures at the blastema region (in this case differentiation of the anterior ganglia) and reorganization of old structures at the post-blastema region (in this case, the nerve cords located close to the wound reorganize in order to be determined as the posterior part of the cephalic ganglia). In individuals of 12 and 14 days of regeneration (Fig. 3E,F), *Gtwnt-5* expression decreases until it resembles that observed in intact individuals. Fig. 2I is a detailed image of *Gtwnt-5* expression at the ganglia level in organisms of late regenerative stages; a single focus plane is shown, but it is clear that not all the neurons express *Gtwnt-5* as the pattern at this level seems to be distributed in a kind of iterative manner (see also Fig. 2H). In posterior or tail regeneration, *Gtwnt-5* is activated later than 3 days

in the new ventral nerve cords produced in the blastema and maintained throughout the whole process (Fig. 4A–C).

In conclusion, the results in intact animals suggest that *Gtwnt-5*, a member of the Wnt-5 family, shows a continuous pattern of expression in the anterior sensors located at the dorsoventral border and in the CNS. It is a different pattern compared to previously described cephalic genes, and can be considered a new (intermediate regenerative stage) neural marker of the planarian CNS, with an external-internal gradient of distribution.

2. Experimental procedures

2.1. Species

The planarians used in this study belong to an asexual race (class A; Ribas et al., 1989) of *Girardia tigrina*. They were collected near Barcelona, maintained in spring water and fed with chicken liver twice per week. Planarians, 9–10 mm long, were cut transversally according to Saló and

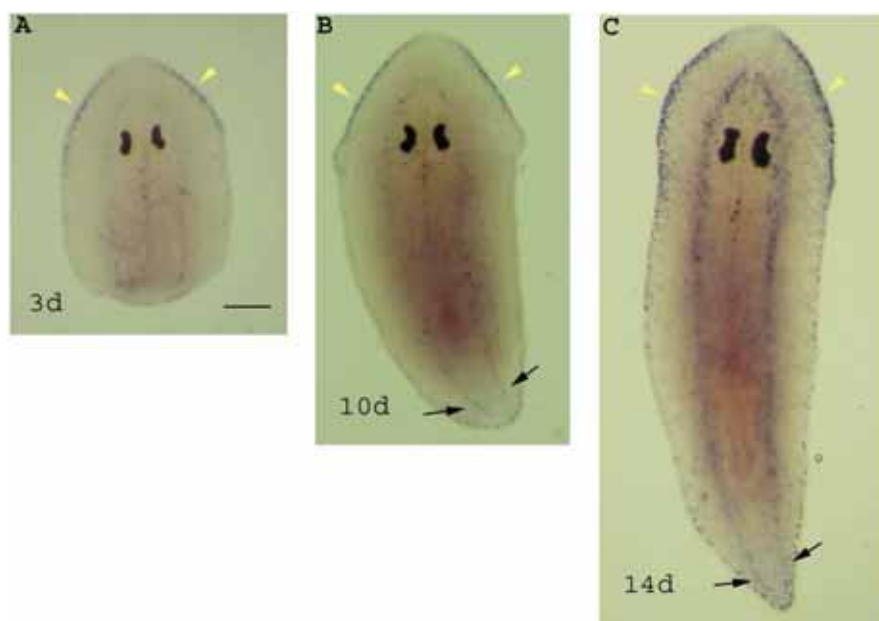


Fig. 4. Whole-mount in situ hybridization of *Gtwnt-5* during tail regenerating planarians. (A) At 3 days of regeneration no expression is detected in the blastema, while the expression of *Gtwnt-5* in the old CNS and in the cephalic sensors (yellow arrowheads) is visible. (B,C) At 10 and 14 days of regeneration respectively, *Gtwnt-5* is expressed in the CNS including the new ventral nerve cords differentiated in the posterior blastema (arrows). Scale bars: 0.5 mm.

Baguña (1984) and left regenerating in Petri dishes with spring water in the dark at 17 °C.

2.2. *Gtwnt-5* cDNA cloning

RNA extractions were performed according to the protocol of the commercial kit Trizol (Gibco BRL). The SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech) and the GeneRacer kit (Invitrogen) were used to prepare the specific cDNA needed to perform the PCR–RACE reactions. We meant to complete the 3'- and 5'-ends of an initial fragment of 140 bp obtained by degenerated PCR. The two degenerated primers were: DWnt-1 forward: 5'-TGG AA(AG) TGG GG(AGCT) GG(AGCT) TG(CT) (GT)A-3' and DWnt-3 reverse: 5'-ATA (AT)CC (ACGT)C(GT) (AT)CC (AG)CA (AG)CA (AGCT)A-3'. The PCR conditions were: denaturation step, 94 °C 30 s; hybridization step, 40 °C 30 s; and elongation step, 72 °C 30 s. Number of cycles: 36. The specific primer designed for 3'-RACE PCR was: *w3'*: 5'-GGGTGTGGAGATAATTTAAGATATGCC-3'. A total of 35 cycles of PCR was performed under these conditions: denaturation step, 94 °C 30 s; hybridization step, 67 °C 30s; and elongation step, 72 °C 2 min. The specific primer designed for 5'-RACE PCR was: *w5'*: 5'-GCA-GATTTACTAAAATGATTGCCAG-3'. A total of 35 cycles of PCR was performed under these conditions: denaturation step, 94 °C 30 s; hybridization step, 63 °C 30 s; and elongation step, 72 °C 2 min. We obtained two clones of 200 and 907 bp, respectively, from the 3'-RACE and one clone of 399 new base pairs of codifying region, reaching the first methionine, from the 5'-RACE. All clones were

subcloned in pBluescript + SK (Stratagene), digested with *Sma*I restriction enzyme and dephosphorylated. With the sequencing (ABI PRISM, Perkin Elmer) and after BLASTX analysis, all clones turned out to be homologous to the *wnt-5* genes found in other species. We named it *Gtwnt-5*, with 1005 bp of codifying region and 268 bp of the trailer non-codifying region of the gene. The codifying region was used as a basis for the phylogenetic analysis. The previous alignment was performed after removing some parts of the molecule: (a) the first 23 amino acids, (b) the region including the last nine conserved cysteines, and (c) ambiguous regions from which homology cannot be assured, like some large insertions which were only present in a few of the species. Distance matrix was inferred with the PROTDIST program from PHYLIP set, using the Dayhoff PAM matrix; phylogenetic tree was inferred with the FITCH program, from PHYLIP set, using the Fitch–Margoliash algorithm.

2.3. In situ hybridization

The codifying region from position 400 to position 1011 was used to synthesize a riboprobe labeled with UTP-digoxigenin, using the in vitro Roche labeling kit. The whole-mount in situ hybridizations were performed with intact and regenerative animals at different regenerative stages according to Agata et al. (1998), with some modifications: proteinase K (20 µg/µl), between 8 and 10 min depending on the size and stage of regeneration; hybridizations of 36 h at 55 °C with a final riboprobe concentration of 0.04 ng/µl. Images were obtained using

Leica DMLB 10×, 20× and 40× objectives, and a digital camera (Nikon COOLPIX 995).

The histological cuts were done at -24°C with Bright Clinicut. The preparation of the slides as well as the sections was done according to Cebrià (2000).

Acknowledgements

We thank Drs. Thomas Holstein and Bert Hobmayer for providing the oligonucleotides and PCR conditions to amplify planarian wnt genes. We thank Jordi Paps, Javier González-Linares and Arne Kusserow for helping in the phylogenetic tree construction. This work was supported by a grant from the DGICYT to E.S. (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, PB98-1261-C02-01 and BMC2002-03992). M.M. is recipient of a ‘Formación de Personal Investigador’ fellowship from Ministerio de Ciencia y Tecnología.

References

- Agata, K., Soejima, Y., Kato, K., Kobayashi, C., Umesono, Y., Watanabe, K., 1998. Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. *Zool. Sci.* 15, 433–440.
- Baguña, J., Ballester, R., 1978. The nervous system in planarians: peripheral and gastrodermal plexuses, pharynx innervation and the relationship between central nervous system structure and the acoelomate organization. *J. Morphol.* 155, 37–252.
- Cebrià, F., 2000. Determinació, diferenciació i restitució del patró muscular durant la regeneració i renovació celular a planàries d’aigua dolça. PhD Thesis, University of Barcelona, Barcelona.
- Cebrià, F., Kudome, T., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Agata, K., 2002a. 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., 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.
- Morita, M., Best, J.B., 1966. Electron microscopic studies of planaria. III. Some observations on the fine structure of planarian nervous system. *J. Exp. Zool.* 161, 391–413.
- Pineda, D., Saló, E., 2002. Planarian Gtsix3, a member of the Six/so gene family, is expressed in brain branches but not in eye cells. *Gene Expr. Patterns* 2, 169–173.
- Pineda, D., Rossi, L., Batistoni, R., Salvetti, A., Marsal, M., Gremigni, V., Falleni, A., Gonzalez-Linares, J., Deri, P., Saló, E., 2002. The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax-6 independent. *Development* 129, 1423–1434.
- Prud’homme, B., Lartillot, N., Balavoine, G., Adoutte, A., Vervoort, M., 2002. Phylogenetic analysis of the wnt gene family. Insights from lophotrochozoan members. *Curr Biol.* 20, 1395.
- Reuter, M., Gustafsson, M., Sheiman, I., Terenina, N., Halton, D., Maule, A., 1995. The nervous system of Tricladida. II. Neuroanatomy of *Dugesia tigrina* (Paludicola, Dugesidae): an immunocytochemical study. *Invert. Neurosci.* 1, 133–143.
- 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.
- Ribas, M., Riuort, M., Baguña, J., 1989. Morphological and biochemical variation in populations of *Dugesia (G) tigrina* (Turbellaria, Tricladida, Paludicola) from the western Mediterranean: biogeographical and taxonomical implications. *J. Zool. (Lond.)* 218, 609–626.
- Rieger, R.M., Tyler, S., Smith, J.P.S. III, 1991. Platyhelminthes: Turbellaria. In: Harrison, F.W., Bogitsch, B.J. (Eds.), *Platyhelminthes and Nemertinea, Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol. 3. Wiley-Liss, New York, pp. 7–140.
- Saló, E., Baguña, 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., Baguña, J., 2002. Regeneration in planarians and other worms. New findings, new tools and new perspectives. *J. Exp. Zool.* 292, 528–539.
- Torres, M., Yang-Snyder, J., Purcell, S., DeMarais, A., McGrew, L., Moon, R., 1996. Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors antagonized by the Wnt-5 class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J. Cell Biol.* 133, 1123–1137.
- Umesono, 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.
- Umesono, Y., Watanabe, K., Agata, K., 1999. Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionary conserved homeobox genes. *Dev. Genes Evol.* 209, 31–39.
- Wodarz, A., Nusse, R., 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 59–88.

1.2- La β -catenina / α Importina de *G.tigrina*

Al cor de la via canònica trobem la β -catenina o Armadillo (a *Drosophila*), proteïna multifuncional amb papers independents en la adhesió cel.lular mediada per cadherines i en la transducció de la senyal Wnt. No és però el nucli del present treball, i, per tant, no ens hi extendrem massa. Això sí, cal tenir-la present ja que la transducció de la senyal Wnt per la via canònica es centra en mantenir nivells citossòlics estables de la β -catenina evitant que la quinasa GSK-3, entre d'altres, impedeixin que la proteïna arribi al nucli. Es compon de 12 repeticions Arm (Armadillo) centrals (R1-R12), amb les regions C- i N-terminals flanquejants de la proteïna (una repetició Arm és un motiu de 42 aminoàcids determinats). El domini C-terminal conté el domini de transactivació, mentre que l'extrem N-terminal conté un nombre de residus de serines i treonines conservats que, un cop fosforilats, permeten dirigir així aquest *pool* de β -catenina citossòlica cap a la ubiquïtinització i ràpida degradació proteica. Fins el moment les quinases identificades responsables d'aquesta fosforilació selectiva són la CKI i la GSK-3, totes dues formant part del "complex destructor" de la β -catenina. Anàlisis mutacionals han demostrat que totes tres regions de la proteïna participen en les dues funcions (adhesió i senyalització). Tot i així, alguns autors (Gumbiner, 1995) argumenten que la regió de les repeticions Arm és tant necessària com suficient per induir una duplicació axial. Aquesta regió interacciona amb la proteïna E-cadherina de les unions adherens i amb la proteïna APC però no amb l' α -catenina, que requereix el domini N-terminal de la β -catenina per unir-se al complex d'adhesió. Com que se sap que l' α -catenina es necessita per l'adhesió mediada per cadherines, la regió dels Arm repeats probablement no pugui promoure adhesió cel.lular tota sola, fent improbable que la β -catenina indueixi aquella duplicació axial incrementant l'adhesió cel.lular.

Continuant amb el contexte estructural dels residus conservats a la β -catenina, excepte en el cas de *C.elegans*, la regió dels "Arm repeats" és la més conservada entre la majoria dels metazous; especialment la regió compresa entre R5-R7. Es creu que aquesta regió de la proteïna forma una mena de solc acídic que permet la unió de dominis bàsics de les proteïnes interaccionants. I també sembla que serien "hot spots" per la interacció amb cadherines, Axina, APC i TCF.

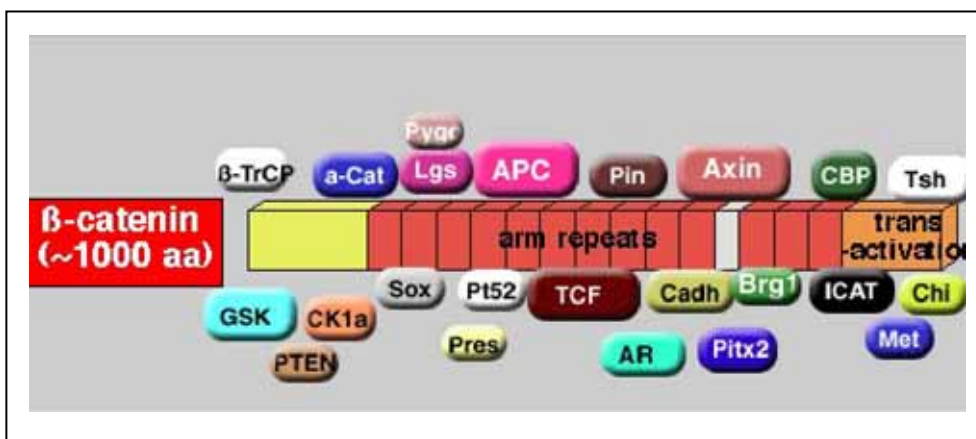


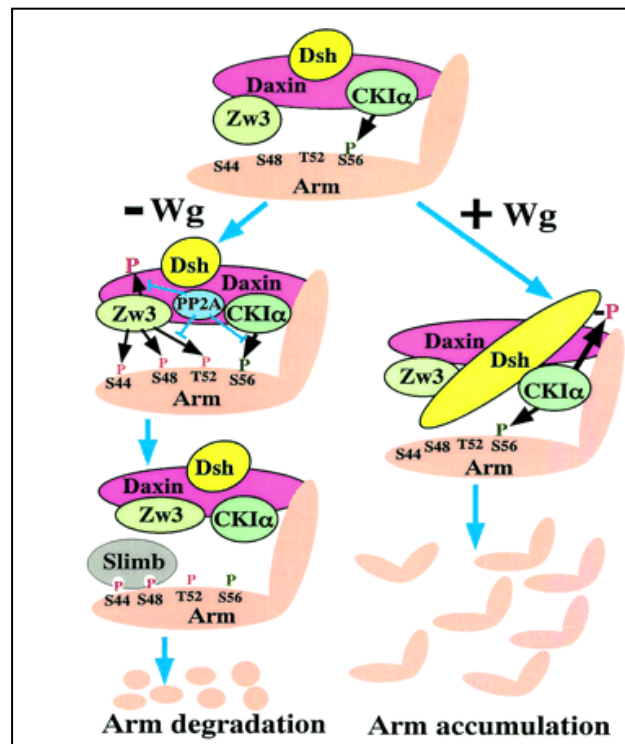
Figura 2. Interaccions proteïna-proteïna amb la β -catenina. Pàgina web Wnts

Pel que fa a l'evolució molecular i funcional de la β -catenina, es postula l'existència d'una única β -catenina a l'ancestre comú dels metazous (aprox. fa 700 MA) amb dualitat funcional (Schneider *et al.* 2003): adhesió cel.lular i senyalització, però la duplicació gènica va permetre l'aparició de β -catenines amb noves funcions i l'evolució de β -catenines de funció única. Per exemple: *C.elegans* té tres β -catenines, HMP-2 implicada només en l'adhesió i BAR-1 i WRM-1 implicades a la senyalització Wnt. *Drosophila*, només en té una: Armadillo, i vertebrats com l'humà o el ratolí tenen una β -catenina i una α -catenina o plakoglobin (implicada en l'adhesió cel.lular). Les β -catenines no són les úniques proteïnes amb "Arm repeats"; famílies com les importines- α (clonada també a *G.tigrina*), catenines p-120 o les placofilines o α -catenines presenten aquestes repeticions a la seva seqüència. Proteïnes amb repeticions Arm es troben a plantes (Amador *et al.*, 2001) i a llevat (Pan i Goldfarb, 1998). El fet de trobar també una proteïna homòloga a la β -catenina a *Dictyostelium* suggereix la seva existència abans dels metazous (Grimson *et al.*, 2000). Als cnidaris *Hydra* i *Nematostella* diversos components de la via Wnt/ β -catenina, entre ells la pròpia β -catenina, han estat aïllats, tot demostrant-ne la seva implicació a la formació axial (Hobmayer *et al.*, 2000). Diferents dades doncs semblen indicar que la β -catenina precedeix la separació entre diblàstics i triblàstics. Sembla ser també que els 4 residus a l'extrem N-terminal de la proteïna que, com hem dit, són els llocs de fosforilació per la GSK-3 i la CK-1a es troben conservats des de cnidaris fins humans.

Com hem comentat anteriorment, s'han descrit molts casos de melanomes i càncers de còlon on existeixen mutacions a llocs de la β -catenina específics per la seva estabilitat i per la fosforilació per part de la GSK-3.

Prosseguint amb el mecanisme de transducció de la senyal, quan les cèl.lules es troben exposades a certs Wnts, la β -catenina no és fosforilada ni ubiquitinitzada pel "complex de destrucció" gràcies a que aquest ha estat inactivat pels protectors Dsh i GBP/Frat-1. Per tant, els nivells basals de β -catenina citosòlica augmenten i és translocada al nucli cel.lular on troba factors de transcripció de la família TCF/LEF. Conjuntament activaran la transcripció de gens diana, com veurem més endavant. En absència de la senyal els factors TCF/LEF actuen com a repressors dels gens diana associant-se a membres de la família Groucho. S'hipotetitzava que la β -catenina quan entra al nucli podria alterar les propietats de plegament del DNA que tenen les proteïnes TCF/LEF (Behrens *et al.*, 1996). Mentre que alguns autors postulen que la β -catenina entra al nucli i converteix els elements TCF de repressors en activadors, d'altres proposen que la β -catenina s'endu del nucli les formes represores de TCF. És a dir, més que actuar com un co-activador nuclear d'aquests factors de transcripció, la β -catenina podria ésser la responsable de l'export nuclear de dites proteïnes que, en absència de la β -catenina actuen com a repressors transcripcionals, o bé podria induir l'activació citosòlica dels TCF (Chan i Struhl, 2002).

Figura 3. Regulació d'Armadillo (homòleg de la β -catenina a *Drosophila*) en presència i absència de Wg



Recentment, (Nelson i Nusse, 2004) s'ha discutit sobre la dualitat funcional palesa de la β -catenina. Per una banda la funció de senyalització i per l'altra és membre del "complex cadherínic" perquè uneix el citoesquelet d'actina de la cèl.lula a les

cadherines a través de l' α -catenina, jugant així un paper en el control de l'adhesió cel·lular i influenciant la migració. Per tant la via Wnt és un potent controlador de la proliferació i diferenciació i com veiem engloba components que participen alhora en l'adhesió i el control de la transcripció gènica. Aleshores, és interessant fer-se la següent pregunta: pot el *pool* de β -catenina que està unida a les cadherines alliberar-se i funcionar en senyalització? No entrarem a fons en aquest punt, només dir que hi ha molts nivells que connecten l'adhesió cel·lular i la via de senyalització Wnt, suggerint una coevolució dels dos processos.

Entre d'altres, aquí tenim alguns exemples funcionals de la β -catenina en diferents organismes. El seu paper a cnidaris és una demostració de la funcionalitat ancestral de la β -catenina: la localització nuclear asimètrica de la β -catenina a embrions de *N.vectensis* és essencial per la determinació axial, marcant el lloc d'inici de la gastrulació, i per l'especificació de l'endoderm (Wikramanayake *et al.*, 2003). A *Drosophila* és com *wingless* el producte d'un gen de polaritat segmental. Pel que fa als vertebrats, ja a l'embrió primerenc de *Xenopus* existeix la via Wnt amb paper d'inducció dorsal (Molenaar *et al.*, 1996). La manipulació dels nivells de β -catenina a *Xenopus* afecta l'especificació axial. Probablement gens diana de XTcf-3/ β -catenina són alguns dels gens zigòtics que primer s'activen després de la MBT ("mid-blastula transition"), i que són capaços per ells mateixos d'induir un eix secundari, com ara *siamois* (Lemaire *et al.*, 1995) o *gooseoid* (Cho *et al.*, 1991).

Després d'aquesta introducció general a la β -catenina, en aquest apartat incloem doncs com a resultat el clonatge d'una proteïna que es pot considerar germana de les β -catenines, l' α -importina:

L'Arm repeat és un motiu d'aproximadament 40 aminoàcids de longitud que es repeteix en tàndem i que va ser identificat en primer lloc al gen *armadillo* de polaritat segmental a *Drosophila*. Repeticions similars van ser trobades més endavant a la proteïna homòloga d'Arm a mamífers, la β -catenina, a la Placoglobina (α -catenina), a APC (producte del gen *adenomatous polyposis coli*) i a d'altres.

A partir de l'estructura coneguda de la proteïna β -catenina es va poder conèixer el plegament 3 dimensional característic d'una repetició Arm. Allí, les 12 repeticions formen una super-hèlix d'alfa-hèlices, amb tres hèlices per unitat. L'estructura cilíndrica forma un solc carregat positivament que presumiblement interacciona amb les

superfícies acídiques de les diferents proteïnes que se sap que interactuen amb la β -catenina (figura 2).

Evidentment, l'aïllament de l'homòleg a planària d'aquesta proteïna era un dels focus d'interès del present treball. Per una banda per l'interès evolutiu (Schneider *et al.*, 2003) que suscita dita proteïna clonada des de cnidaris fins a humans (i recordem que de fet fins i tot a plantes hi ha proteïnes amb Arm repeats (Amador *et al.*, 2001) i a llevat (Pan i Goldfarb, 1998)), i per l'altra, pel fet de ser un dels components clau de la via de senyalització que estem intentant caracteritzar a la planària amb aquest treball.

Les α i β -importines (també anomenades kariopherines) són molècules que permeten el transport nuclear de proteïnes amb NLS (*nuclear localization signal*) de forma selectiva. Totes les α -importines presenten un domini central compost de 8 repeticions Arm. El nombre i ordre d'aquestes repeticions romanen quasi invariables des de l'origen comú de fongs, plantes i mamífers. Diferents autors postulen doncs que les α i β -importines, així com totes les altres famílies de proteïnes amb repeticions Arm podrien pertànyer a la mateixa superfamília de proteïnes (Malik *et al.*, 1997).

Amb l'aproximació de la tècnica de PCR sobre cDNA de *G.tigrina* i utilitzant una col.lecció d'oligonucleòtids degenerats a partir de la informació de l'estudi de Schneider *et al.*, 2003, s'ha intentat repetidament aïllar algun fragment homòleg a la β -catenina. El més a prop que hem estat d'aconseguir-ho ha estat amb el clonatge del següent fragment d'aproximadament 1155bp que correspon a una de les molècules germanes de les beta-catenines, les α -importines, i que anomenem GtImportina.

```
GAATTCGATTAATCCTGCGTATGGGAACCAGGAGCAGGTGCAGGCCGTGATTGATTACCAATTGATCCCG
CTCATCATCTACCACTTGGACAAGGGCGACTTCCAGACACAGAAAGAAGCCGCTTGGGTCATCTCCAATC
TCACGATCTCGGGAACGCCCCAACAGTCGCCTATGTCGTTTCAGCAGGGCGTAATTCCTCCGTTCTGTAA
GATGCTCTCCGTTTCGAGACGCCCAAGTCGTCCAGGTCGTGCTCGACGGCATTCTCAACATCCTCAAGGTG
GCCAACGGCCAATCCGATGTCGTTTGTACGATGATCGAGGAGTGCGGTGGCTTGGACTTGATCGAGCAGC
TGCAGCACCACGAGAACGGAGAAATCTACAAACTCGCTTACGATATTATCGATAACTTCTTCAATGATGA
GATGGACGAATCGGAGAACCAGAACGGGCTCGAGTTGCGTGCCGATGGCGGCGATATGAACGCTC
TGCAGCAGAACAACACCCGGTGGATTTAACTTCTGAGAGACCCGGGTGAATGTGAGTGAGTGTGTGTGTA
GAGAGAGAGCGAATGATCGATTAACGAGAGCGAGAGACAGACAGAGACAGAGACAAATGTACGCTAGAAC
GATTGATGATTTTTATTTGAATATGAATCGTGATGTTTGTGTACTGCTCGATATGATGATGTCAATATTG
TGATGATGTGCTGCGTGAACGTGGCGGATGCTGATGATGTATTATTTGATATAGATTGTCTGTGGTGCT
TCAANTTCTTTGCCTTTTTTTATTTTTTCATTTTTAAATTTCTGAATATATTTGTGCATGTATCGGAATC
GATGACGGTGTTCGCATTGTGTGNGGGGCTTGGTGTTCGTCTATTTACACGGANGATGAGTATTTTGTGCG
CCTTAAGGATGCTGTCNNAANNTNCGGTCTANTNCCGGTACGGATTNAACTAGTCANAGGGANGANGAT
TCTGCNAAACGGNGGGANAATTCGGGTTTCCAAGAAACNGGGCTGGGGGTNNNTGATTTTTCGCNNGGTNGG
GAGGCCATGGGACCAANTNTNCAATTGACTAGTTGAAANNTNNGGTTNCAANAATTTNTGGGCNNGGGTT
TNANAAGGGGGGATTNCCCCNGGAATTTNTGATCTNGAATT
```

Figura 4. Seqüència de nucleòtids corresponent al fragment homòleg de la GtImportina

Els oligonucleòtids degenerats utilitzats corresponen a les altament conservades repeticions Arm del nucli central de la β -catenina de ratolí, esperant aproximadament una banda de 1062bp.

L'oligonucleòtid *upstream* és el següent:

5'-CARATHYTIGCITAYGGIAAYCAR-3' i correspon a la seqüència aminoacídica **QILAYGNQ** (situada a l'hèlix 3 de la quarta repetició Arm de la β -catenina de ratolí. Extret de Schneider *et al.*, 2003). A la nostra seqüència mostro en cursiva i negreta la localització, faltant els dos primers nucleòtids, d'aquest oligonucleòtid *upstream*. Més avall mostro la deduïda traducció aminoacídica on també assenyalo part de l'oligonucleòtid *upstream*, en cursiva i negreta.

L'oligonucleòtid *downstream* utilitzat és el següent:

5'-GCIGCRTAIGTIGCIA-CICCYTC-3' i correspon a la cadena reversa complementària de la seqüència aminoacídica **EGVATYAA** (situada a l'hèlix 3 de la dotzena repetició Arm de la β -catenina de ratolí. (extret de la mateixa font bibliogràfica que l'oligonucleòtid *upstream*). Aquest segon oligonucleòtid, però, no s'ha trobat a la nostra seqüència.

Les condicions de PCR es troben descrites a l'apartat 3.1 de Materials i Mètodes. El clonatge de la banda obtinguda es va realitzar en el vector p-GEM-T easy vector, entre dues dianes ECORI del lloc de múltiple clonatge (mirar figura 2 de Materials i Mètodes). El tamany entre les dues dianes és de 1156 parells de bases. L'anàlisi de restricció del fragment demostrà que BamHI i SacI no tallaven i que XhoI ho feia un cop.

A l'analitzar amb el programa BLASTx el resultat, ens n'adonarem que només era reconeguda com a Importina fins la posició AACTTC (511bp). Aquí mostrem la seqüència aminoacídica deduïda corresponent a aquella part de la seqüència reconeguda com a homòloga de la Importina:

<p>NSINPAYGNQEQVQAVIDYQLIPLIIYHLDKGDFQTQKEAAWVISNLT ISGTPQQVAYVVQQGVIPPFCKMetLSVRDAQVVQVVLVDGILNILKVA NGQSDVVCTMetIEECGGLDLIEQLQHHENGEIIYKLAYDIIDNFFNDE MetDESENQNGLELRADGGDMetNALQQNNTGGFN</p>

Figura 5 . Seqüència aminoacídica deduïda de GtImportina (5'3' pauta de lectura 2)

RESULTATS I DISCUSSIÓ

El programa NCBI blast ens detectà amb una homologia molt alta que el nostre fragment podria correspondre a una proteïna homòloga de la família de les α -importines, molècules encarregades del transport nuclear i que presenten a la seva seqüència repeticions en tàndem del domini Arm (40 aminoàcids). Com ja sabem, les repeticions Arm són també característiques d'altres famílies de proteïnes com les α i β -catenines i APC, entre d'altres. Tot i que el resultat del BLASTx de NCBI no mostrava cap homologia amb les β -catenines que eren les molècules que nosaltres cercàvem, la utilització d'un altre programa, en concret SMART (Simple Modular Architecture Research Tool), ens demostrà que la nostra proteïna conté almenys dos dominis proteics conservats que reconeix com a Arm repeats:

Arm: domain 1 of 2, from 9 to 49: score 42.6, E = 1.1e-09
 ->npenkqavveaGalppLvqLLsspdeevqeeAawALsNLaa<-
 n+e+ qav++ +p+++ L+ +d+++q+eAaw++sNL+
 GtImp 9 NQEQQVAVIDYQLIPLIIYHLDKGDFQTQKEAAWVISNLTI 49

Arm: domain 2 of 2, from 52 to 94: score 21.2, E = 0.0031
 ->npenkqavveaGalppLvqLLs..spdeevqeeAawALsNLaa<-
 +p++ +vv++G++pp++++ + + +d +v++++ + N+
 GtImp 52 TPQQVAYVVQQGVIPPFCKMET1sVRDAQVVQVVLGDGILN1LK 94

El mateix programa realitza també un alineament amb diferents proteïnes que contenen Arm repeats, de les que n'hem seleccionat algunes i entre les quals hi ha també tres β -catenines (la d'humà, CTNB HUMAN; la de Tripneustes, CTNB TRIGR; i l'Armadillo de *Drosophila*):

DVH.NRIVIR..GLNTIE	LFVQLLY	SPIENI	ORVAAGVLC	ELAQ	CTNB HUMAN	583-623
DSH.NRALIQ..GLNCIE	LFVQLLY	NNIENI	ORVAAGVLS	EELS	CTNB TRIGR	602-642
ESH.NRALIR..QQSVIE	IFVRLIF	NEIENI	ORVAAGVLC	EELAA	ARM DROME	596-636
RNP.PLNDI	EAGLIE	KLVEEFS	rHDNSTL	QFEAAWALT	NIAS	IMA1 XENLA 104-145
RNP.PIDDI	KSGIE	FILVKCE	rDDNPSL	QFEAAWALT	NIAS	IMA3 HUMAN 103-144
NQE.QVQAVI	DYQLIE	LIYHLD	KGDFQT	QKEAAWVIS	NLTI	imp-like <i>G.tigrina</i>

Figura 6. Alineament de fragments de proteïnes contenint repeticions Arm

Els números a l'extrem de cada seqüència aminoacídica corresponen a les posicions que abarquen al total del gen respectiu les respectives repeticions Arm. Per

exemple, el nostre Arm repeat seria homòleg al que va de la posició 596 a la 636 de la proteïna Arm de *Drosophila*.

En vermell estan assenyalades al fragment de seqüència de *G.tigrina* aquelles posicions compartides tant amb les β -catenines com amb les importines; en verd els aminoàcids compartits amb les Importines només; i en blau les posicions comunes amb les β -catenines.

Per tant, podem descartar definitivament que el fragment clonat no sigui una β -catenina? El que està clar és que es tracta d'una proteïna amb Arm repeats que, tot i que el NCBI BLAST no l'assimila a cap β -catenina, el segon programa utilitzat, i com he mostrat a l'alineament més amunt, no sembla descartar-ho.

Quan tota la seqüència nucleotídica s'introdueix per fer el BLAST, només trobem homologia significativa en les aproximadament 500 primeres parelles de bases, restant les darreres sense cap "match" significatiu. Si s'introdueixen únicament les darreres 500 parelles de bases aproximadament, separadament de les primeres, el BLAST detecta, amb valors molt baixos, una semblança amb una serina/treonina quinasa csk1:

```
Sequences producing significant alignments:
Serine/threonine-protein kinase csk1 (CAK-activating kinase)
(CAKAK) Length = 306

Score = 28.5 bits (62), Expect = 4.1
Identities = 14/48 (29%), Positives = 26/48 (54%)
Frame = -3

Query: 248 STTDNLYQIIHHQHPPQFTQHIITILTSSYRAVHKHHDSYSNKNHQSF 105
      ST  +  + I H++PP+   I+  + +S  +  +  H  +YSN+   SF
Sbjct: 243 STFPDWNKFIHFHEYPPKPWSEILPSVDTSIQYIVSHLVTYSNRASPSF 290
```

Probablement els valors són massa baixos per tenir-los en compte, deixant doncs oberta l'opció de que podria tractar-se de la β -catenina de *G.tigrina*, essent potser molt divergent de les fins ara clonades en altres organismes. Sortiríem de dubtes si aconseguíssim la seqüència completa del gen, fet que encara no ha estat possible.

Per altra banda, durant l'etapa final de l'escriptura d'aquesta tesi hem trobat finalment resultats d'homologia a l'introduir la seqüència nucleotídica del fragment de GtImportina a la base de dades d'ESTs de l'espècie *S.mediterranea*, en procés de ser completada. Un clon ha presentat homologia amb el nostre fragment especialment a la regió que indiquem a continuació a la figura 7. En concret, però, dit clon prové de la col·lecció de Sánchez-Alvarado *et al.*, 2002. Segons el programa BLASTn de NCBI el

RESULTATS I DISCUSSIÓ

valor més alt d'homologia amb el fragment de *G.tigrina* és el clon de *S.mediterranea*, seguit de kariopherines (α -importines) de peix zebra. Possiblement doncs, el nostre fragment i el de *S.mediterranea* no corresponguin a una β -catenina sinó a una Importina realment.

gi 21308489 gb AY067856.1 Schmidtea mediterranea clone H.1.	70	1e-08
gi 41152017 ref NM_201305.1 Danio rerio karyopherin alpha	56	2e-04
gi 28278860 gb BC045358.1 Danio rerio karyopherin alpha 4	56	2e-04
gi 46403254 gb AY577009.1 Danio rerio clone RZ151A3F12 kar.	56	2e-04

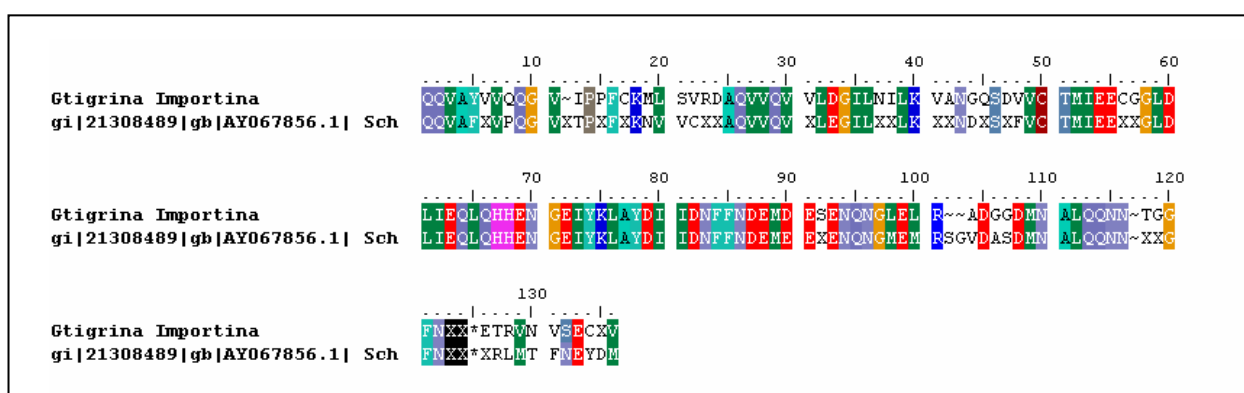


Figura 7. Alineament aminoacídic de *G.tigrina* Importina amb el clon de la base de dades de *S.mediterranea*. Aquí mostrem només la regió més homòloga.

1.3-El regulador negatiu: la quinasa GSK-3

La glicogen sintasa quinasa 3, GSK3, és una de les més de mil serin/treonina quinases que hi ha al genoma dels mamífers. Es troba altament conservada i és present inclús a plantes i a *Dictyostelium*, de fet podríem dir que és present a tots els eucariotes. Aquest enzim fou descobert fa més de 20 anys com a quinasa que fosforila i inactiva l'últim enzim a la síntesi del glicogen, la glicogen sintasa. En el cas d'humans existeixen dues isoformes molt semblants, GSK-3 α i GSK-3 β , amb un 97% de similitud de seqüència al seu domini catalític, i diferint bastant a la resta de seqüència. Participa a molts processos cel.lulars i serveix de nexa de diferents vies de senyalització i té efectes molt pleiotròpics, des del metabolisme del glicogen, la diferenciació de *Dictyostelium* i la segmentació de *Drosophila*, així com la regulació del cicle cel.lular i la proliferació. Es tracta d'un regulador clau de nombrosos mecanismes de senyalització, incloent-hi respostes cel.lulars als Wnts, receptors de tirosin quinases i receptors acoblats a proteïnes G. És una quinasa que normalment al fosforilar inactiva els seus substrats. Una característica inusual entre les quinases és que es troba normalment activa a les cèl.lules i que principalment es regula per inhibició de la seva activitat. És a dir, la GSK-3 és activa a cèl.lules no estimulades, cèl.lules en repòs, i s'inactiva durant respostes cel.lulars. És com si es tractés d'un repressor general, de forma que els seus substrats es troben inactius o inaccessibles en condicions de repòs. Per tant, la seva activitat normal és bloquejada quan s'activa una via de senyalització. Potser aquesta forma rara de regulació està relacionada amb el fet que aquesta quinasa té un nombre molt divers de dianes (Frame *et al.*, 2001).

Per exemple, en resposta a la via de la senyalització de la insulina, la GSK-3 és fosforilada i inhibida per la quinasa PKB (Akt). La PKB s'activa gràcies a la quinasa "fosfatidil inositol (PI) 3-quinasa", PI3K. Per ser inhibida, la GSK-3 cal que sigui fosforilada al residu Ser21 (GSK-3 α) o Ser9 (GSK-3 β) de l'extrem N-terminal. Un cop inhibida la GSK-3, la glicogen sintasa és desfosforilada i activada, contribuint així a la síntesi del glicogen. La GSK-3 quan està activa promou la fosforilació i inhibició del eIF2B ("eukaryotic protein synthesis initiation factor 2B"), inhibint així la síntesi proteica. La insulina a l'inhibir la GSK-3 estimula la defosforilació i activació del eIF2B, promovent un increment de la síntesi proteica (figura 8).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

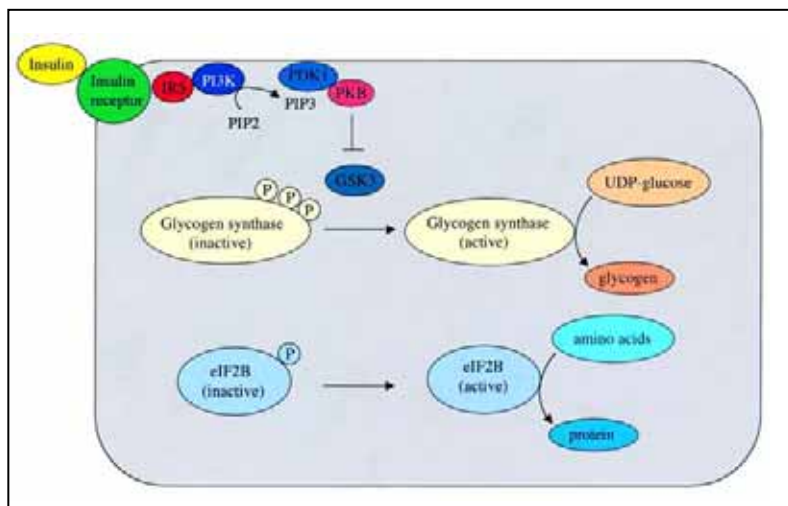


Figura 8. La insulina estimula la síntesi proteica i la del glicogen via la inhibició de la GSK-3 . Tret de Frame *et al.*, 2001

Una altra peculiaritat comparada amb altres quinases és la seva preferència per substrats que han estat prèviament fosforilats per altres quinases: Sembla ser que és la única quinasa que requereix un "priming phosphate", un fosfat, al residu n+4 (on n és el lloc de fosforilació per part de la GSK-3) per tal de poder fosforilar molts dels seus substrats; la seqüència òptima consens és Ser/Thr-Xaa-Xaa-Xaa-pSer/pThr (on pSer i pThr són fosfoserines i fosfotreonines respectivament i Xaa és qualsevol aminoàcid). Aquest motiu s'ha trobat a molts substrats reconeguts de la GSK-3, com la glicogen sintasa o una de les subunitats del eIF2B. A més, com hem avançat, és una de les poques quinases que s'inactiva per fosforilació. Un cop fosforilat el seu extrem N-terminal, aquest fa de pseudosubstrat evitant així que l'enzim pugui fosforilar els seus substrats (Frame *et al.*, 2001).

Ara bé, la regulació sobre la GSK-3 es fa de forma diferent en el contexte de la via Wnt: sembla ser que a la cèl·lula existeixen dos *pools* diferents de GSK-3 en condicions basals, un és el *pool* lliure i l'altre és una de les parts que constitueix el "complex destructor" de la β -catenina a la via Wnt juntament amb l'axina i APC entre d'altres. En absència de la senyal Wnt, si recordem, la GSK-3 fosforila l'Axina i la β -catenina (en aquesta ocasió sembla ser que no hi ha evidència de que la GSK-3 requereixi "primed phosphates" en aquestes dues proteïnes per poder-les fosforilar), però en presència de la senyal Wnt, la proteïna FRAT desplaça l'Axina i s'uneix a la GSK-3 inactivant-la. La unió de FRAT però no impedeix la fosforilació dels "primed substrates" de la via de senyalització de la insulina (figura 9). No hi ha doncs creuament entre totes dues vies. Com s'aconsegueix aquesta especificitat?

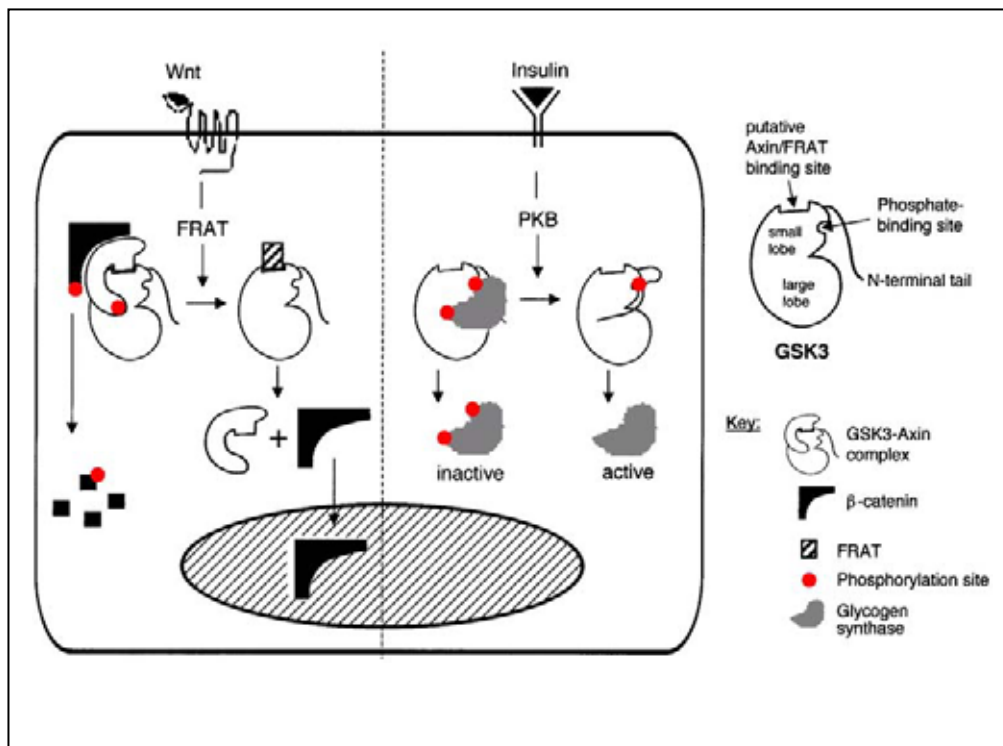


Figura 9. Els Wnts i la insulina inhibeixen la GSK-3 per diferents mecanismes. Tret de Frame *et al.*, 2001

Aproximadament el 5% del genoma humà codifica per receptors mentre que menys d'un 3% ho fa per quinases. Una quinasa individual haurà doncs de transmetre les senyals de múltiples receptors i per tant la cèl.lula ha de tenir sistemes per regular estrictament l'especificitat de la senyalització de les quinases que, com la GSK3, regulen funcions de forma tan pleiotròpica (Weston i Davis, 2001). Com la GSK3 podrà regular selectivament diferents dianes *downstream* en funció de la via de senyalització activada? Com és possible que la fidelitat de la transducció per GSK3 d'una o altra via, insulina o Wnt, per exemple, es vegi reforçada? Com hem dit, aquesta quinasa és capaç de fosforilar substrats prèviament fosforilats per altres enzims ("primed" substrats) així com substrats no fosforilats (figura 10). En el primer cas, la GSK-3 fosforilaria la glicogen sintasa que prèviament hauria estat fosforilada per la casein quinasa II; durant la senyalització per la insulina, la PKB fosforila la GSK-3 inhibint-la, fent-la inaccessible als "primed" substrats. Però la GSK-3 també, com deiem, pot fosforilar "non-primed" substrats, és a dir, substrats que no han estat fosforilats prèviament per altres enzims, com és el cas de components de la via Wnt, com la beta-catenina o l'axina. El paper de la insulina sobre la GSK-3 restringeix el seu efecte

RESULTATS I DISCUSSIÓ

només sobre els "primed" substrats, mentre que no té cap efecte sobre el segon tipus de substrats. D'aquesta forma la GSK-3 pot selectivament regular "primed" i "non-primed" substrats per mig de la fosforilació induint diferents respostes cel.lulars.

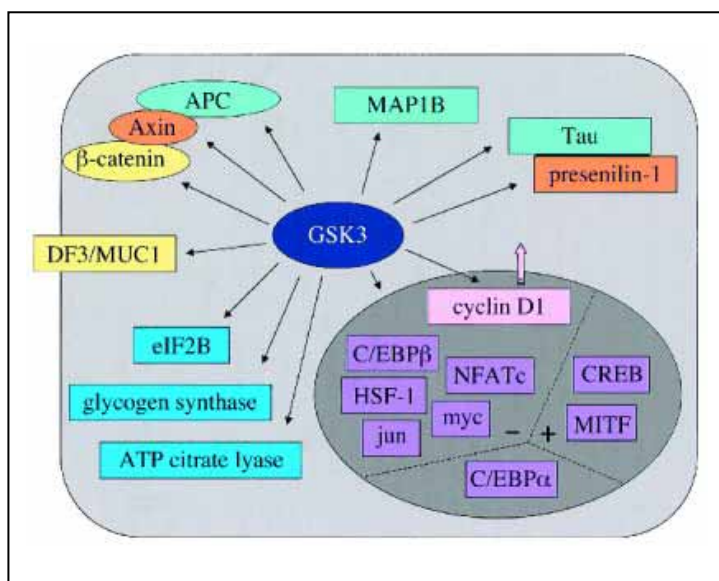


Figura 10. Diferents substrats de la GSK-3. Tret de Frame *et al.*, 2001

S'ha proposat també un potencial paper de la GSK-3 en la regulació de la proliferació cel.lular mitjançant la fosforilació de la ciclina CD-1: aquesta ciclina és necessària per les activitats de les CDK4 i CDK6 perquè les cèl·lules entrin a la fase S del cicle cel.lular.

Per una altra banda, tot i que sembla que depèn del context tissular, la GSK-3 pot tenir també un paper important en l'apoptosi (revistat a Jope i Johnson, 2004). No queda encara clar però mitjançant quin mecanisme la GSK-3 contribueix a l'apoptosi. Sembla ser que la inhibició de la síntesi proteica que té lloc quan eIF2B és fosforilat i inhibït per la GSK-3 és un important mecanisme facilitador de l'apoptosi. A més l'enzim facilita l'activació de la via de la c-Jun NH₂-terminal quinasa que sovint contribueix a dita mort cel.lular programada. Per últim, la regulació de diferents factors de transcripció seria una altra forma de participar en la regulació de l'apoptosi: per una banda inhibint factors de transcripció promotors de la supervivència cel.lular com CREB i el heat shock factor-1, i per una altra banda facilitant factors pro-apoptòtics com p53. Però curiosament, la GSK-3 també és essencial per la supervivència. Ratolins knock-out per la isoforma GSK-3β morien al 14 dia de gestació, efecte que la isoforma GSK-3α no compensava (Hoeflich *et al.*, 2000). Altres estudis demostraren també que la inhibició de la GSK-3 incrementava la citotoxicitat induïda pel tumor-necrosis-factor-α (TNF-α). Durant l'etapa final de l'escriptura d'aquestes pàgines ha estat publicat també un possible

paper pro-apoptòtic de la GSK-3 en la gametogènesi del cnidari *Hydra* (Rentzsch *et al.*, 2005). Tot plegat doncs semblaria indicar que mantenir els nivells apropiats de l'enzim és necessari perquè bé massa poc, bé massa quantitat podria promoure la mort cel.lular en certes situacions. A més alguns estudis recents demostren la importància de la regulació de la GSK-3 en la diferenciació neuronal de cèl.lules mare i en l'angiogènesi.

Diferents estudis demostren la posició de la quinasa GSK-3 a la cascada de senyalització Wnt: la sobreexpressió de GSK-3 produeix una desregulació dels nivells citosòlics de β -catenina/Arm i una disrupció dels efectes de Wg a l'intestí mig en desenvolupament dels embrions de *Drosophila* (Steitz *et al.*, 1998). Si per una altra banda s'inhibeixen totalment els reguladors negatius de la via com GSK3 es preveu en general que els gens *downstream* siguin activats de forma molt important. Al ser un regulador negatiu de la via de Wnt, si l'inhibim el que esperem és que la β -catenina s'acumuli al citosol i es transloqui cap el nucli on s'associarà amb els membres de la família TCF/LEF.

Concretant alguna de les funcions de la GSK-3 en el desenvolupament, (Ferkey i Kimelman, 2000; Frame i Cohen, 2001), la inhibició de la GSK-3 es requereix per l'especificació de l'eix D-V durant els primer estadis del desenvolupament de *Xenopus*. L'especificació dorsal implica la supressió de l'activitat GSK-3 per una senyal Wnt/Wg. Al peix zebra la inhibició de GSK-3 ja sigui per mig d'un dominant negatiu o per liti fenocopia el mutant *masterblind* (Axina), mutant al que ens referirem més endavant en més detall. Als eriçons de mar la GSK-3 és necessària per l'especificació de l'eix primari, l'eix A-V (animal-vegetal). A *C.elegans*, GSK-3 es necessita positivament tant per l'especificació de l'endoderm com per EMS orientació del fus mitòtic (Schlesinger *et al.*, 1999)

Molts estudis s'han centrat en cercar drogues o compostos que puguin regular l'efecte de la GSK-3. El liti, per exemple, produeix efectes dramàtics a la morfogènesi durant el desenvolupament de molts organismes. Molts autors suggereixen que l'activitat de la GSK-3 és inhibida per liti (Klein i Melton 1996), que té el mateix efecte dorsalitzador als embrions de *Xenopus* que l'expressió ectòpica de Wnt-1; també mimetitzava l'efecte de la insulina, que inhibeix GSK-3; diferents observacions indicarien doncs que sembla ser que la diana endògena del liti és la GSK-3. Recentment, però s'han trobat productes més específics, com l'alsterpaulona (Müller *et al.*, 2004): experiments previs amb embrions i larves del cnidari *Hydractinia* demostraren que l'alsterpaulona és l'inhibidor més potent de la GSK-3 β disponible actualment i actua

competint amb l'ATP per unir-se a la GSK-3 β (Leost *et al.*, 2000). Més recentment, alguns autors (Meijer *et al.*, 2003) han generat un compost anomenat BIO (6-bromoindirubin-3'-oxime) que sembla ser que també interfereix amb la quinasa GSK-3 i que pot ser utilitzat per mantenir cèl.lules ES en un estat indiferenciat (Sato *et al.*, 2004). Actualment es coneixen més de 30 inhibidors de la GSK-3. La GSK3 s'expressa de forma molt elevada al sistema nerviós de mamífers on participa en una àmplia varietat de processos biològics. En concret, la seva inhibició s'associa amb l'activació de vies de supervivència de neurones (Cross *et al.*, 2001; Culbert *et al.*, 2001; Facci *et al.*, 2003). Tau, una proteïna associada als microtúbuls, és un altre substrat de la GSK-3 fosforilat per ella, regulant així la dinàmica de microtúbuls, el creixement de neurones, la sinaptogènesi i la plasticitat sinàptica (Hall *et al.*, 2000). També es coneix que la GSK-3 β és la responsable de la hiperfosforilació de la proteïna Tau a la malaltia d'Alzheimer (Lovestone *et al.*, 1994), hiperfosforilació que té lloc en resposta al LPA (àcid lisofosfatídic), que *activa* la GSK-3. La retracció de les neurites és un procés essencial durant el desenvolupament del SN i també durant la neurodegeneració, i l'activació de la quinasa per part del LPA sembla ser un procés general que té lloc en diferents cèl.lules neuronals de diferents espècies en correlació amb aquest procés de retracció de les neurites (Sayas, *et al.*, 2002 a i b). El descobriment d'aquestes accions de la GSK-3 han permès comprendre que aquest enzim té certa implicació també a patofisiologies humanes, com els desordres bipolars, i la GSK-3 ha esdevingut una potent diana terapèutica de diferents fàrmacs (Cohen i Goedert, 2004) com el que esmentàvem una mica més a munt i d'altres com SB-415286 (o 3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione) de Tocris™ (Coghlan *et al.*, 2000; Cross *et al.*, 2001; Culbert *et al.*, 2001; MacAulay *et al.*, 2003; Facci *et al.*, 2003) que també està sent utilitzat simultàniament a l'escriptura d'aquestes pàgines.

Com deiem al principi d'aquest apartat, la GSK-3 fa de nexa de diferents vies de senyalització; per exemple es requereix també a la via de senyalització de Hedgehog on fosforila la proteïna Ci (Cubitus Interruptus) permetent així la seva proteòlisi. Ci-155 és la forma activadora, mentre que la forma Ci-75 és la repressora. Per tant, cert estudis demostren que a cèl.lules sense activitat de GSK-3 no es pot produir la proteòlisi de Ci, i, per tant, Ci és actiu inclús en absència de Hh (Price i Kalderon, 2002).

Amb tot això es pot deduir, com veurem més endavant, que no és mai fàcil averiguar d'entrada què passaria quan un enzim d'aquestes característiques és bloquejat; si bé la quinasa és capaç de discernir i separar les vies en les que està implicada, serem

capaços nosaltres de discernir si els efectes deguts al seu bloqueig són el resultat d'inhibir una o altra via, o moltes alhora?

Després d'aquesta breu introducció del que es coneix de les peculiaritats i funcionament de la GSK-3, passarem a mostrar els resultats referents al clonatge i anàlisi de la seqüència homòloga a *G.tigrina* de GSK-3, que anomenarem GtGSK-3:

```
GTTGCCATCAAGAAGGTGCACCAGGATCCGCGCTACAAGAACC GCGAGCTCAACATCATCCAGCGAGTGA
AGAGCCACCCGAATATCGTTCGAGTTCCGCTACTATTACTACAGCATGCTCCATGGAGCCACTGCGAGCAA
TACAGGTTCCAGTCACCATGGCTGCAATAACAATGCCAATAACAACAATAACAATACGAGAAGACAGCAG
CAACAATCGACTGGAAACTCTGGAACGGGCAGCAGCGGTGACATCTACCTGCATCTGGTGATGGAGTGCG
TGCCCGAGAGTCTGTCAGATTTGATCGCCCGGTACCATCACAACGGAGCCAGCCTGAGTGCTCGCCACAT
CAAGATATACACCTTCCAGATGCTCCGCGCGCTCGGCTACCTCCACTCGCTCAACGTGTGCCATCGCGAT
ATAAAA
```

Figura 11. Seqüència nucleotídica del fragment corresponent a GtGSK-3. Subratllat, putatiu lloc de *splicing*.

El fragment es va aïllar inicialment mitjançant PCR amb oligonucleòtids degenerats GSK-6 i GSK-3 (assenyalats a la figura 7 de Materials i Mètodes) que mostrem a continuació, i segons les condicions de PCR també especificades a l'apartat 3.1 de Materials i Mètodes:

Oligonucleòtid GSK-6: 5'-GTNGCNATHAARAARGT-3' 17meh
 Oligonucleòtid GSK-3: 5'-GGYTTDATRTCNCCKRTGRCA-3' 20meh

```
V A I k K V H Q D P R Y K N R E L N I I Q R V K S H P N I V E F
R Y Y Y Y S M L H G A T A S N T G S S H H G C N N N A N N N N N N T R
R Q Q Q Q S T G N S G T G S S G D I Y L H L V M E C V P E S L S D L I
A R Y H H N G A S L S A R H I K I Y T F Q M L R A L G Y L H S L N V C
H R d I K
```

Figura 12. Fragment de 142 aminoàcids deduïts de la seqüència nucleotídica de GtGSK-3. En minúscula i subratllades posicions rellevants per l'activitat enzimàtica (lloc d'unió d'ATP i lloc acceptor de protons) Subratllat, inici d'un putatiu lloc de *splicing*.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

La seqüència resultant es va alinear amb el programa Bioedit amb algunes de les proteïnes GSK-3 d'altres espècies.

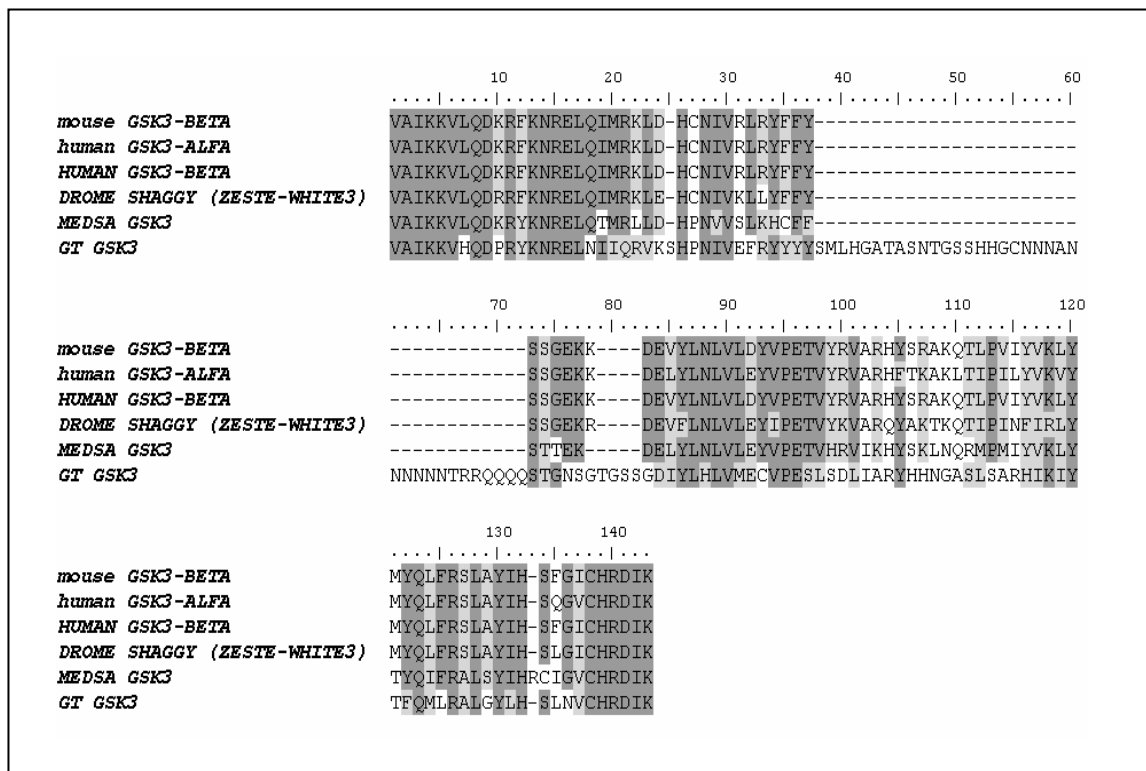


Figura 13. Alineament de GtGSK-3 amb els homòlegs de ratolí (mouse GSK-3 β), d'humà (GSK-3 α i GSK-3 β), d'una planta, *Medicago sativa* (MedSa GSK-3) i de *Drosophila melanogaster* (Drome shaggy o zeste-white3)

Exemple d'un dels casos amb que el programa BLASTX va trobar homologia:

Putative glycogen synthase kinase-3 homolog (GSK-3) (Gasket protein)

```
Score = 80.9 bits (198), Expect = 9e-16
Identities = 46/142 (32%), Positives = 73/142 (51%)
Frame = +1

Query: 1   VAIKKVHQDPYKNRELNIIQRVKSHPNIVEFRYYYYSMLHGATASNTGSSHHGCXXXXX 180
          VAIKKV QD R+KNREL I++++ H NI+   +++++S
Sbjct: 59   VAIKKVLQDRRFKNRELQIMRKLH-HDNIITLKWFFS----- 95

Query: 181 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDIYHLVMECVPELSLDLIARYHHNGASLSARHIKIY 360
          ++YL+LVME +PE+L + +Y   +L   +++Y
Sbjct: 96   -----SGEKRDEVYLNLMVEFLPETLYKVERQYARAKQTLPVNFVRLY 138

Query: 361 TFQMLRALGYLHSLNVCHRDIK 426
          +Q+LR++GYLHSL CHRDIK
Sbjct: 139 MYQLLRSMGYLHSLGFCRDIK 160
```

Ens trobem davant d'un gen que presenta una inserció d'aproximadament 130bp en comparació a altres organismes, segons es mostra a l'alineament. La zona clonada està inclosa dins del domini proteïna quinasa. A la que correspondria a la posició 636 de *shaggy* de *Drosophila*(**VAIK**) tindríem un lloc d'unió d'ATP i a la posició 732 de *shaggy* de *Drosophila* (**CHRD**) tindríem un lloc acceptor de protons, totes dues posicions en vermell i subratllades a la seqüència aminoacídica de la figura.

És interessant aquesta inserció no trobada fins el moment a altres organismes. N'hem comprovat la seva validesa fent la PCR sobre cDNAs diferents, per descartar que es tractés d'una contaminació amb DNA genòmic. Paral·lelament, vàrem fer una PCR directament sobre DNA genòmic per veure si es tracta d'un intró realment, però la mida obtinguda sobre DNA genòmic va resultar ser la mateixa, per tant no ens permetia saber si es tractava d'un intró o no. Alternativament es podien cercar llocs de *splicing* a la seqüència. EL programa BDGP (Berkeley *Drosophila* genome project, Splice Site by Neural Network); detecta que hi ha un lloc de *splicing* (marcat en blau) a la nostra seqüència (figures 11 i 12). La frontera exó/intró entre les dues “g”: aatacag / gttccagt

A banda de l'alineament amb els fragments corresponents de proteïnes homòlogues d'altres organismes, mostro com a exemple una de les homologies que el BLASTx va detectar. Curiosament, al fragment de *G.tigrina* existeix la inserció que

comentàvem part de la qual el programa assenyala amb símbols X; hi ha 25 X, algunes de les quals són repeticions de diverses N (asparagina) i de diverses Q (glutamina). Són varies les possibilitats que hauríem de contemplar: en primer lloc, segons el programa, aquestes X corresponen a regions de baixa complexitat, regions que es troben presents a moltes proteïnes i que sembla ser que dit programa no té en compte a l'hora de fer l'alineament. Sembla més plausible aquesta possibilitat, és a dir, considerar que en aquest llinatge existís un petit exó que a altres llinatges s'ha perdut, que no pas considerar com a vàlida l'opció de l'intró que esmentàvem més amunt. Per un costat, sembla força difícil acceptar que les diferents fonts de cDNA emprades estessin totes contaminades amb DNA genòmic, i per l'altre, que la possible existència d'aquest intró no produís una senyal de STOP i saltés la pauta de lectura.

S'ha realitzat també un estudi filogenètic, però el fragment de seqüència del qual disposem és massa curt i les posicions massa conservades i per tant poc informatives evolutivament parlant per construir un arbre filogenètic.

Pel que fa a l'anàlisi de l'expressió de GtGSK-3 per hibridació *in situ whole-mount*: inicialment es va dissenyar una sonda que comprenia tota la regió clonada del gen GtGSK-3 de 426bp. Més endavant se'n dissenyà una que cobria la zona que hem anomenat "G230", sempre segons el protocol descrit a l'apartat de Materials i Mètodes. Totes dues, i també segons el protocol d'*in situ* desenvolupat a Materials i Mètodes, s'utilitzaren amb individus intactes i individus regenerants de diferents estadis, donant els mateixos resultats ambdues sondes.

Les hibridacions *in situ whole-mount* mostraren que el patró d'expressió d'individus intactes es restringia a la part més anterior dels ganglis cefàlics, patró que recorda al de GtSix-3, també analitzat amb anterioritat pel nostre grup. Ara bé, les cèl.lules on es detecta GtSix-3 tot i ser també perifèriques no són cèl.lules del SNC mentre que les cèl.lules que marca GtGSK-3 sí que semblen cèl.lules perifèriques del SNC (figura 13). A diferència d'altres marcadors neurals com és el cas de GtWnt-5, GtGSK-3 no es detectava a nivell dels cordons nerviosos principals.

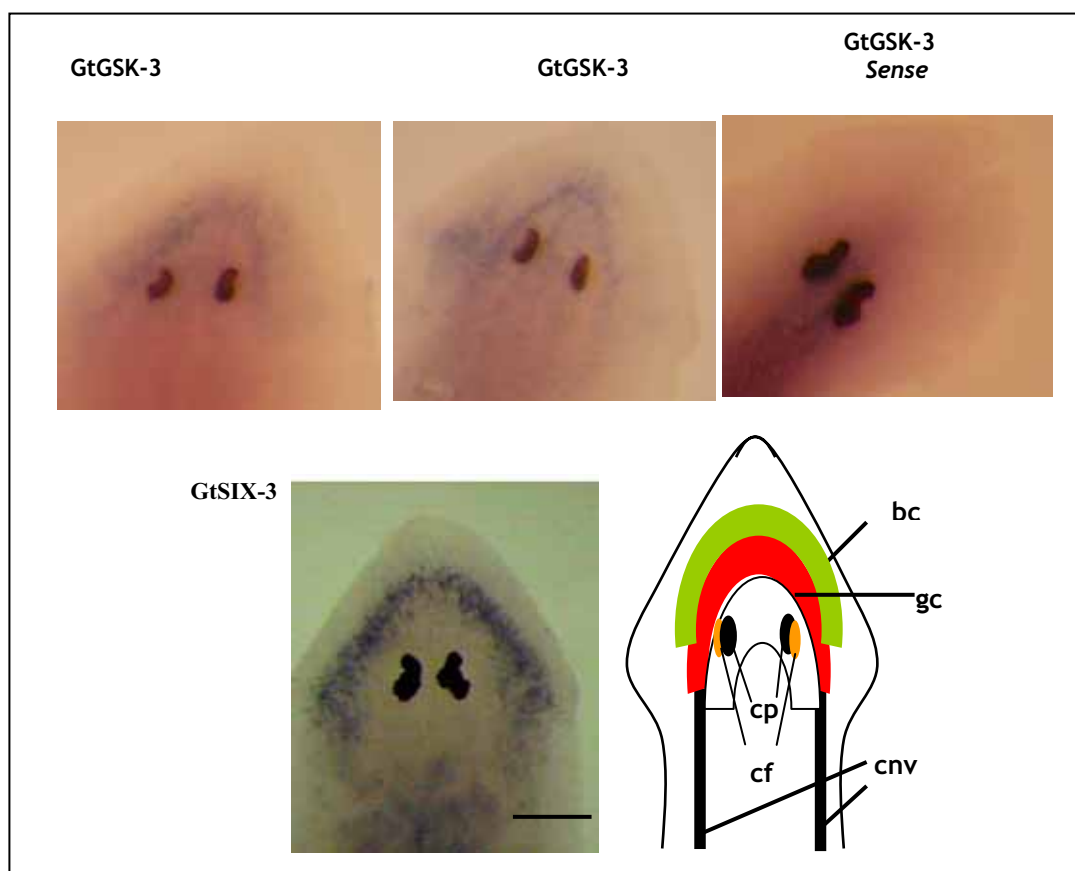


Figura 14. Patró d'expressió de GtGSK-3 en caps d'organismes intactes, comparat amb el patró de GtSix-3 i amb un individu control hibridat amb una sonda dissenyada a partir de la cadena respectiva *sense* de GtGSK-3. En el dibuix: GtSix-3 (verd) i GtGSK-3 (vermell). La resta del cervell és negativa per tots dos gens (blanc) bc: branques cefàliques; gc: ganglis cefàlics; cp: cèl.lules pigmentàries; cf: cèl.lules fotorreceptores; cnv: cordons nerviosos ventrals. Esc. barres 0,5mm

Es necessiten dues setmanes perquè una planària regeneri un cap complet amb totes les estructures després d'un tall a 17°. L'expressió de GtGSK-3 encara no es detecta a 2d de regeneració, segons mostra la figura 15. Trobem que hi ha un màxim d'expressió als dies 5d i 7d de regeneració, en un patró consistent amb la hipòtesi que el nou cervell es forma per elongació de les fibres neurals emergents dels antics cordons nerviosos seccionats cap al nou teixit (Reuter i Gustafsson, 1996), com ja hem comentat a la Introducció, apartat 2.4. Diferents marcadors neurals han estat classificats com a gens d'expressió inicial, intermèdia o tardana en la regeneració, depenent de quan són activats en el blastema regeneratiu (Cebrià *et al.*, 2002 a i b). Segons el patró temporal

RESULTATS I DISCUSSIÓ

d'expressió, GtGSK-3 no seria per tant un gen d'expressió inicial amb funció inductora de cervell sinó més aviat un gen que participa potser en la funció organitzadora de l'eix A-P del SNC i no en la inducció inicial.

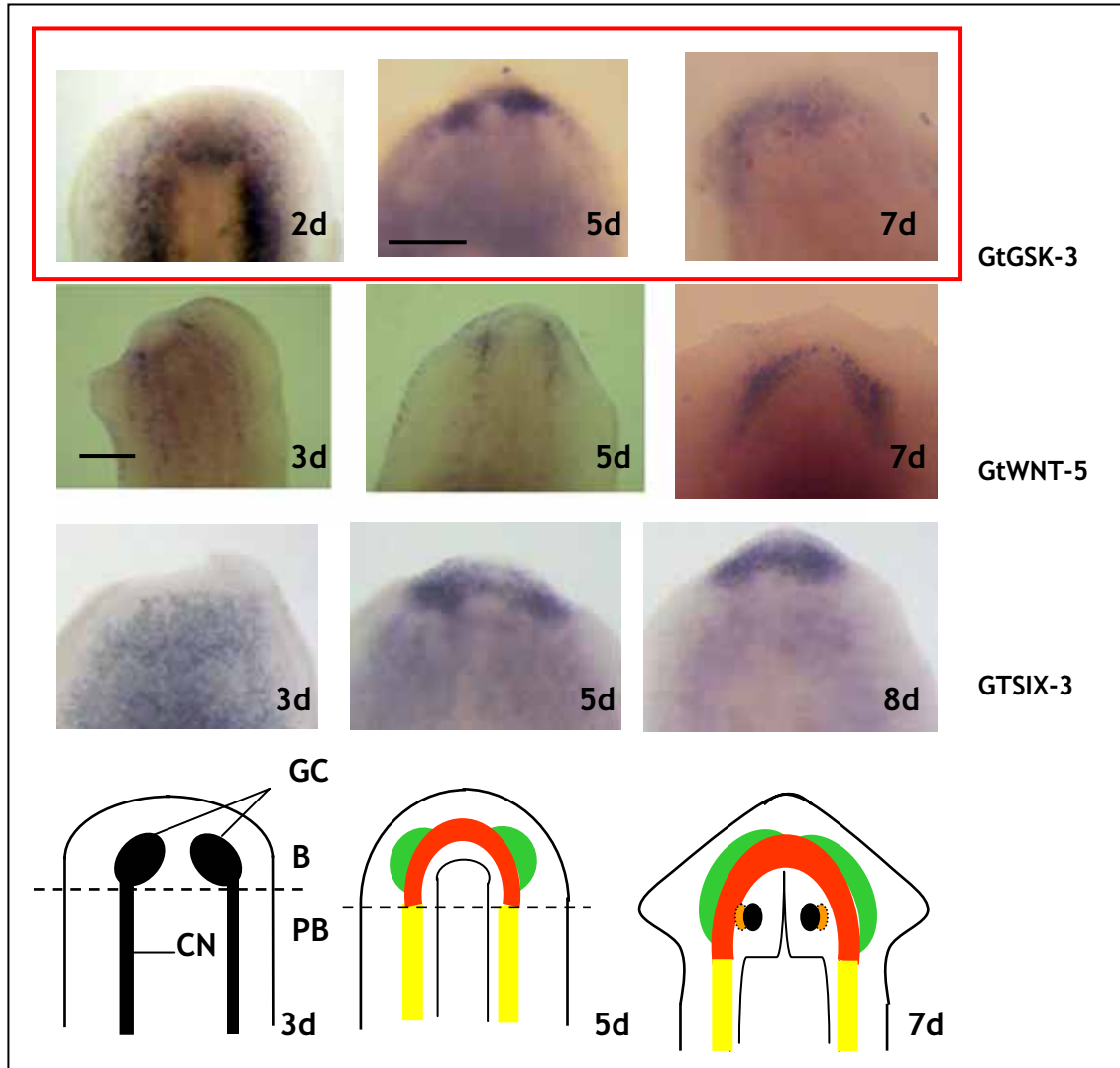


Figura 15. Patró d'expressió de GtGSK-3 en diferents estadis de regeneració comparat amb el d'altres marcadors neurals: GtWnt-5 (groc) i GtSix-3 (verd). Solapament entre GtGSK-3 i GtWnt-5 assenyalat en vermell. A 2d regeneració no es detecta cap dels tres gens. A 3d regeneració ja es detecta el transcrit de GtWnt-5. A 5d són presents tots tres. GtSix-3 es situa a nivell del primordi de les branques cefàliques, GtGSK-3 i GtWnt-5 a la part externa del primordi dels ganglis cefàlics. GtWnt-5 es detecta també a la part externa dels cordons nerviosos ventrals. La part del SNC negativa per aquests gens resta de color blanc. La línia negra de punts a l'esquema separa el blastema (B) del post-blastema (PB). GC: ganglis cefàlics en formació; (CN): cordons nerviosos antics. En vermell, enquadrades, només la sèrie d'imatges de l'expressió de GtGSK-3. esc.barres 0,5mm

Ara bé, al realitzar una RT-PCR regional de GSK-3 (RT-PCR realitzada segons condicions descrites a l'apartat 5.3 de Materials i Mètodes) vam observar que, tot i no detectar-los amb una hibridació *in situ whole-mount*, menys sensible en aquest sentit que una RT-PCR, existien nivells de transcrit de GSK-3 al llarg de l'eix A-P (figura 16). Per això no es pot especular sobre la funció de GSK-3 només segons el patró d'expressió observat en les *in situs*, ja que possiblement existeixen nivells basals d'aquesta proteïna en totes les cèl.lules de l'organisme. Però, per altra banda, pot ser que el que detectem per RT-PCR siguin gens duplicats perquè els oligonucleòtids emprats per la PCR són de regions consens de GSK-3 que no ens permetrien discriminar entre aquests gens.

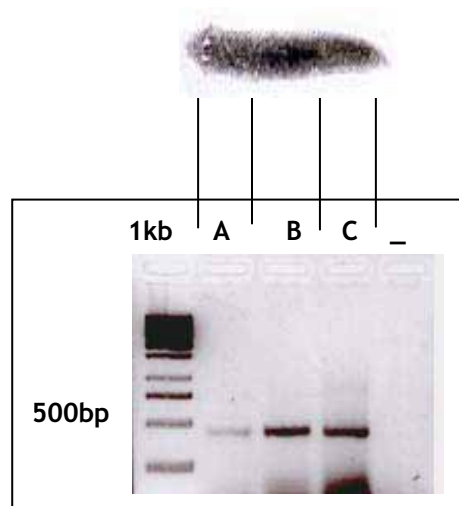


Figura 16. Gel per testar la RT-PCR de GtGSK-3 amb cDNAs de: (A) caps, (B) troncs, (C) cues. El primer carril és el marcador 1Kb de pes molecular i l'últim és un control negatiu

1.4 Els factors de transcripció associats: família TCF/LEF

Als organismes pluricel·lulars, les cèl·lules tenen en un moment donat la major part dels seus gens en estat silenciats, bé reprimint activament la seva transcripció o bé segregant factors de transcripció positius. Quan la cèl·lula entra en un determinat programa del desenvolupament es dona una desrepressió. Existeixen diferents mecanismes de repressió gènica; en primer lloc trobem repressors globals, com els productes dels gens Polycomb que inhibeixen grans grups de gens possiblement interaccionant amb components de la cromatina, i existeixen repressors específics que s'uneixen a regions adjacents del DNA, a una seqüència concreta i que competeixen amb els activadors desplaçant-los. Un altre mecanisme molt emprat per la seva economia durant el desenvolupament i que sovint regeix moltes decisions de formació de patró i destí cel·lular és el cas de factors que poden ser bé activadors, bé repressors en funció de les proteïnes interaccionants amb ells (Nusse, 1999). Aquest últim sembla ser que seria el cas dels membres de la família de factors de transcripció Tcf/Lef (T-cell factor/lymphoid enhancer factor). Aquestes proteïnes, en associació amb la β -catenina, són els efectors nuclears de la via de senyalització Wnt. En absència de la senyal Wnt, Tcf/Lef reprimeixen la transcripció en associació amb les proteïnes Groucho i CBP (CREB-binding protein). Per altra banda, també poden interaccionar amb altres cofactors duent a terme una funció "estructural", ensamblant complexos enhancer multiproteics, sembla ser que integrant d'aquesta forma diferents vies de senyalització (Eastman i Grosschedl, 1999).

Aquests factors de transcripció van ser identificats inicialment com a proteïnes d'unió al DNA específiques de limfoides i que reconeixien la seqüència nucleotídica 5' CTTTGWW 3' (on W indica A o T). Tots ells presenten un domini d'unió al DNA que es coneix com a "high mobility group domain" (HMG) i que sembla que produeix un fort plegament a l'hèlix de DNA (Giese *et al.*, 1992), efectivament, el plegament induït a la molècula de DNA per part del HMG del *lymphoid enhancer factor 1* (lef-1) facilita l'ensamblatge d'estructures funcionals nucleoproteiques. A humans i a ratolí se'n coneixen 4. De fet, al ratolí, recentment s'ha aconseguit el *knock-out* per tots quatre (Gregorieff 2004). L'únic membre d'aquesta família trobat al genoma de *Drosophila* és Pangolin (dTcf1), similar al TCF-1 de vertebrats especialment al seu extrem C-terminal. A *Xenopus* s'han clonat 4 gens virtualment idèntics propers sobretot al TCF-3 de mamífers. En el cas de *C.elegans*, Pop-1, un gen específic de mesoderm codifica per

un membre distant de la família TCF/LEF. Típicament, els dominis HMG de les proteïnes TCF/LEF presenten més d'un 90% d'identitat aminoacídica. De fet, fora del domini HMG també hi ha força conservació de seqüència, tot i que en menor grau. És l'extrem C-terminal dels membres individuals, generats normalment per *splicing* diferencial, el que divergeix més (figura 17 i Clevers i van de Wetering, 1997)

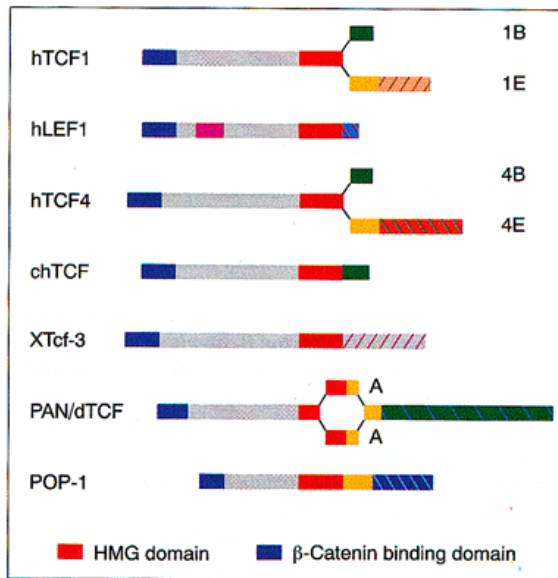


Figura 17. Dominis proteics dels membres TCF de diferents organismes. (h:humà, ch: pollastre; X:*Xenopus*, PAN/dTCF: pangolin o *Drosophila* TCF, POP-1: homòleg TCF a *C.elegans*). Tret de Clevers i van de Wetering, 1997

A *Drosophila*, a embrions mutants per *wg* o *Arm*, la reducció de TCF suprimia o almenys millorava el fenotip (Brunner *et al.*, 1997). Si TCF fos un regulador positiu de la via, disminuir la seva funció en aquells mutants per *wg* o *Arm* provocaria un empitjorament del fenotip *wg* o *Arm*. Per tant, tot això evidenciava una funció repressiva per TCF. Com veurem amb més detall, els mutants dTCF de pèrdua de funció a *Drosophila* indicaven clarament que els efectes downstream de la senyalització Wnt precisaven de dTCF. estudis de diferents línies mutades al gen dTCF van permetre determinar que: les mutacions en dTCF tenien fenotip de polaritat segmental; que els dominants negatius disruptaven la senyal de *wg*; i, per últim, trobaven també expressió alterada de gens diana com *engrailed* o *ultrabithorax* (Van de Wetering *et al.*, 1997). A vertebrats, per contra, aquesta evidència de que els efectes *downstream* de la senyalització Wnt precisaven de TCF es fa més difícil degut a la redundància d'aquests factors de transcripció que tenen uns patrons d'expressió diferents però solapants a l'embrió de ratolí.

Diferents estudis demostren la interacció genètica i bioquímica existent entre Tcf/Lef i Groucho (TLE a vertebrats), un repressor transcripcional que interacciona amb diferents proteïnes d'unió al DNA com Hairy, Engrailed i Dorsal. Estudis genètics a *Drosophila* també varen demostrar que reduir Groucho suprimia el fenotip mutant *wg* i *Arm*, indicant com per TCF el seu paper repressor. CREB/p300 (CBP) funciona en molts casos com a co-activador de la transcripció, però per altra banda ha estat considerat candidat com a co-repressor de les proteïnes Tcf/Lef-1. S'uneix al HMG i acetila un residu en el lloc d'unió de la β -catenina al dTCF. Aquesta acetilació es bloqueja en presència de la β -catenina. Sembla ser que dTCF es manté com a repressor fins que la concentració de β -catenina és alta (Eastman i Grosschedl, 1999).

Si considerem la via Wnt com a linial, quines serien les interaccions positives i negatives durant la senyalització? Wnt, Frizzled i Armadillo/ β -catenina serien components positius de la via, activats durant la senyalització; per contra, GSK3/ZW3 i TCF-Groucho-CBP són components negatius, inhibits durant la senyalització. Quan es redueixen els factors positius com Wnt o Arm/ β -catenina, els gens diana es *downregulen*, i si es redueixen els components negatius, el fenotip es redueix com hem dit anteriorment, i els gens diana s'*up-regulen*. De fet, una disminució total de la GSK-3/ZW3 per exemple, provocaria una forta *up-regulació* dels gens *downstream*. Tot això, però, es complica quan la via no és linial.

Per altra banda, cada vegada sembla més clar que diferents membres de la família Tcf/Lef funcionen a diferents teixits per dur a terme respostes específiques de teixit sota la via Wnt/ β -catenina.

Fins el moment molts són els gens diana identificats amb llocs d'unió per TCF i que són elements *downstream* de la via Wnt/ β -catenina. Es pot trobar una taula ("Wnt targets") molt completa i renovada periòdicament a la pàgina Web dels gens Wnt. Per esmentar només un cas, a Riese *et al.*, 1997 els autors identifiquen un WRS ("wg response element") a l'*enhancer* de Ubx a *Drosophila*, que és lloc d'unió per Lef-1. També descobreixen que cal la senyalització Dpp per tal que Lef-1 pugui estimular la transcripció. Lef-1 doncs té en aquest cas una funció crucial en coordinar diferents *inputs* de senyal. Hi ha de fet molts casos en que cal la combinació d'*inputs* de diferents vies de senyalització a nivells dels *enhancers* dels gens diana..

Així doncs en aquest apartat presentem com a resultat el clonatge d'un homòleg a *G.tigrina* dels TCF aïllat per mig de PCRs degenerades utilitzant els oligonucleòtids degenerats TCF-1 i TCF-2 marcats a la figura 7 de Materials i Mètodes i assenyalats a la figura 18 sobre la seqüència. Les condicions de la PCR es troben descrites a l'apartat 3.1 de Materials i Mètodes.

Oligonucleòtid TCF-1: ATGCTNTAYATGAARGARAT 20mehr
 Oligonucleòtid TCF-2: CKYTTNCKYTTYTTYTTYTT 20mehr

ATGCTTNCNTNT**GANGGAGAT**GAGACCAAAAAGTGCAAGAAGAGTGCACATTTAAAAGAATCAGCAGCCATT
 AACCAAATTTTGGGTAAAAAGTGGCACGAACTATCTCGAGAAGATCAGACAAAATATTACGAGTTAGCTA
 GAAAAGAAAAAGAACTTCATCAACAACCTTTATCCTGGTTGGTCTGCAAGGGATAATTATGCATCTCACGC
 TAAAAAACAACGCAAAAGA

Figura 18. Seqüència de nucleòtids corresponent al fragment clonat d'un element TCF a *G.tigrina*

EMRPKVQEECTLKESAAINQILGKKWHELSE
 DQTKYYELARKEKELHQQLYPGWSARDNYASHAKK

Figura 19. Fragment de 67 aminoàcids deduïts de la seqüència nucleotídica de GtTCF (5'3' pauta de lectura 1)

El percentatge més alt d'homologia que el programa Blastx (NCBI) va mostrar va ser amb la proteïna Pangolin (dTCF-1) de *Drosophila*, fet que ens permetia assegurar doncs que existeix almenys un membre de la família TCF a *G.tigrina*:

```
Score = 119 bits (298), Expect = 2e-27
Identities = 54/72 (75%), Positives = 64/72 (88%)
Frame = +2

Query: 17 EMRPKVQEECTLKESAAINQILGKKWHELSE 196
      EMR KV ECTLKESAAINQILG++WHELSE+Q+KYYE AR+E++LH +LYPGWSARDN
Sbjct:286 EMRAKVVAECTLKESAAINQILGRRWHELSEEQSKYYEKARQERQLHMELYPGWSARDN 345

Query: 197 YASHAKKKRKR 232
      Y +KKKKRK+
Sbjct: 346 YGYVSKKKRKR 357
```

RESULTATS I DISCUSSIÓ

De la mateixa manera que per GSK-3, l'estudi filogenètic s'ha realitzat, però el fragment de seqüència de TCF és massa curt i les posicions massa conservades i per tant poc informatives evolutivament parlant per construir un arbre filogenètic. Presentem però un alineament realitzat amb el programa BioEdit:

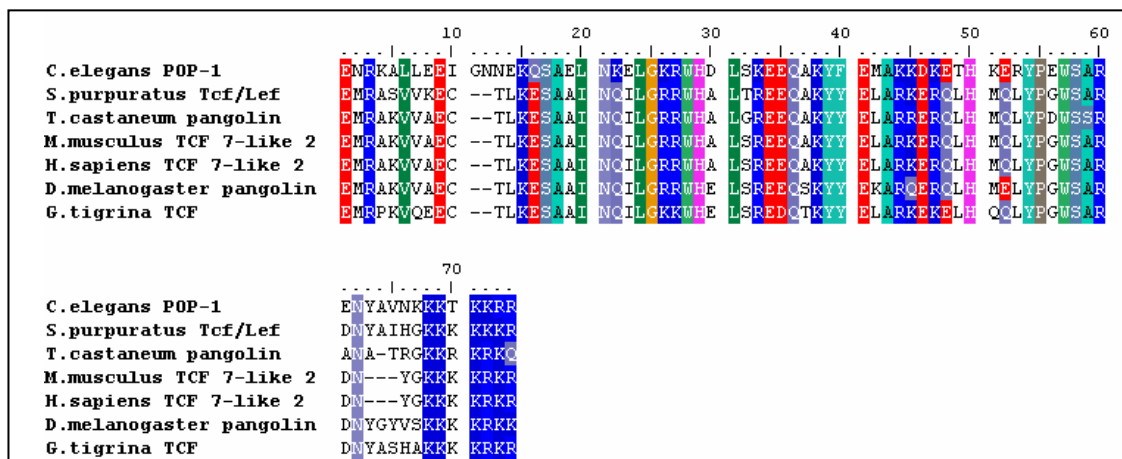


Figura 20. Alineament aminoacídic del fragment corresponent de *Girardia tigrina* TCF (GtTCF) amb els homòlegs de *C.elegans* (*C.elegans* POP-1), de *Strongylocentrotus purpuratus* (*S.purpuratus* TCF/LEF), de *Tribolium castaneum* (*T.castaneum* pangolin), de *Mus musculus* (*M.musculus* TCF 7-like 2), d'*Homo sapiens* (*H.sapiens* TCF 7-like 2) i de *Drosophila melanogaster* (*D.melanogaster* pangolin)

2. ESTUDI DE FENOTIP PER MANCA DE FUNCIÓ DE GTWNT-5 I GTGSK3

2.1 Efectes de la inhibició de *Gtwnt-5*

2.1.1 Resultats pel mètode d'injecció i pel mètode d'ingesta de bacteries productores de dsRNAGtwnt-5. Anàlisi de resultats per RT-PCR. Descripció dels fenotips obtinguts

Pel que fa al mètode d'injecció, en inici es va escollir com a fragment per dissenyar el dsRNA específic per *Gtwnt-5* la zona compresa entre els aminoàcids 137 i 326, donant com a resultat un fragment d'aproximadament 600nts. Dit fragment estava clonat en el plàsmid pBluescript (figura 1 a l'apartat de Materials i Mètodes) i es linearitzà amb HindIII i XbaI per les respectives posteriors retrotranscripcions amb les RNA polimerases T3 i T7. El mateix fragment havia estat utilitzat com a sonda de RNA per la hibridació *in situ whole-mount*. La construcció de la dsRNA es realitzà segons el mètode descrit a l'apartat 5.1.1 de Materials i Mètodes. Els diferents tests per RT-PCR dels nivells de transcrit realitzats durant l'esquema d'injecció mai van demostrar una disminució del mRNA de *Gtwnt-5*, per la qual cosa vam arribar a la conclusió que, per motius que encara no coneixem, aquella zona triada del gen *GtWnt-5* no podia funcionar com a RNAi. Una de les possibilitats podria ser que aquella zona concreta de la seqüència estés especialment protegida o prengué conformacions que la fessin inaccessible a la maquinària del RNAi.

El fragment que anomenem "W372" fou doncs el triat. Es van utilitzar els oligonucleòtids "W3'.2" i "W5'.4" per PCR sobre plàsmid que contenia el fragment que anomenem "W600" per obtenir el fragment de 372bp que es va subclonar en un altre vector pBluescript. Posteriorment es prosseguí a la linearització amb EcoRI i BamHI del lloc de múltiple clonatge respectivament per les posteriors retrotranscripcions amb les RNA polimerases T3 i T7 i es sintetitzà la cadena de dsRNA segons el procediment establert. Per a comprovar si en aquesta ocasió aconseguíem reduir els nivells de transcrit vam començar amb un esquema consistent en injecció d'un volum de 18.4 nl x2 (dues punçons) durant tres dies consecutius sense tallar el cap i duent a terme l'extracció de RNA el dia de l'última injecció. La reducció dels nivells de *GtWnt-5* després de 35 cicles de PCR va ser gairebé total segons es mostra a la figura 22, sent "c"

RESULTATS I DISCUSSIÓ

l'organisme control injectat amb H₂O i "i" el carril corresponent a l'organisme injectat amb dsRNA. Hi ha també dos marcadors de pes molecular (1Kb, 50bp) i un carril corresponent al control negatiu de PCR . Les condicions de PCR estan descrites a l'apartat 5.3.1 de Materials i Mètodes. Un cop comprovat que així érem capaços d'inhibir pràcticament el gen, procedírem a fer l'experiment llarg d'injecció segons es mostra a l'esquema de la figura 21 amb un grup de 12 organismes per injectar H₂O i un altre de 12 organismes per injectar dsRNA. Un dels objectius era observar si existia alguna alteració en la regeneració del cap en aquests organismes on s'estava procurant inhibir GtWnt-5: hi ha una pre-injecció el primer dia abans de tallar a nivell pre-faríngic (el primer dia de tall l'anomenem d0, dia zero de regeneració) i, periòdicament, i segons es mostra a l'esquema, injectem a nivell del post-blastema aproximadament. Paral.lelament hem d'extreure RNA (un organisme o un parell de controls i el mateix per injectats amb RNAi) i comprovar per RT-PCR si els nivells de GtWnt-5 es mantenen inexistents, baixos o, per contra, no ha funcionat el mecanisme de RNAi. Com es veu a l'esquema també hi ha dos grups que se separen per dur a terme una hibridació *in situ whole-mount*, un aturat al d9 de regeneració després del primer tall i després de patir 6 injeccions, i un aturat el dia d5 després del segon tall i havent patit 9 injeccions.

Pre-injecció	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6 extr.RNA
d7	d8	d9 <i>in situ</i>	d10=d0 segon tall	d1	d2	d3	d4
d5 <i>in situ</i>	Figura 21. Esquema "llarg" d'injecció de dsRNAGtWnt-5. Les fletxes corresponen als dies d'injecció						

Els resultats d'aquests experiments són la comprovació de la disminució del GtWnt-5 tant per RT-PCR una altra vegada com es mostra a les figures 22 i 23 (on els cDNAs “i” i “c” corresponen als d’organismes de 6 dies de regeneració), així com per hibridació *in situ whole-mount*, com serà mostrat al següent apartat.

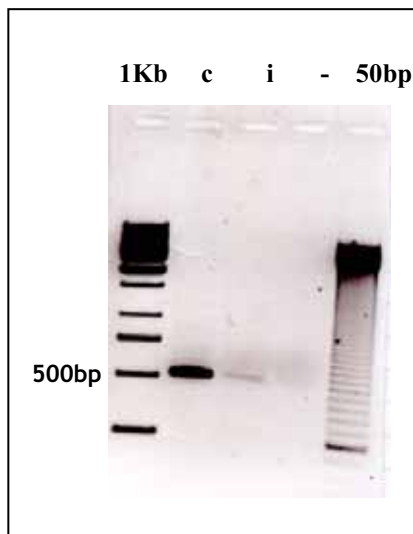


Figura 22. RT-PCR de 35 cicles de GTWnt-5, sent “c” un cDNA injectat amb H₂O i “i” un cDNA injectat amb dsRNAGtWnt-5.

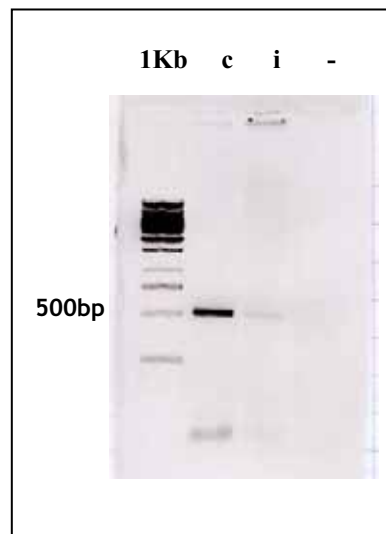


Figura 23. Ídem que figura 22 però amb cDNAs d’un experiment més llarg d’injecció

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Amb aquest treball hem posat a punt a planària un nou mètode de RNA d'interferència diferent de la injecció: la utilització de bacteries productores de dsRNA que són ingerides per la plànaria.

Es va aconseguir introduir l'insert "W372" desitjat al vector L4440 amb els oligonucleòtids descrits a l'apartat 5.2 de Materials i Mètodes, i, segons el procediment allí explicat, vàrem transformar la soca HT115 i vàrem preparar el menjar artificial. Els organismes van ser alimentats 5 cops amb intervals de tres dies sense menjar. Posteriorment se'ls tallà el cap i s'observà l'evolució de la regeneració anterior. Paral·lelament a aquests experiments d'ingesta, sempre afegíem un grup control alimentat només amb bacteries HT115 transformades amb el vector L4440 sense insert. De la mateixa forma que amb el mètode d'injecció, aconseguírem demostrar la inhibició de *GtWnt-5* pel mecanisme de RNAi: aquesta vegada provant la tècnica per ingesta de bacteries productores de dsRNA, també vàrem veure disminució del transcrit en qüestió. El test es va fer també per RT-PCR, segons les condicions descrites a l'apartat 5.3.1 de Materials i Mètodes.

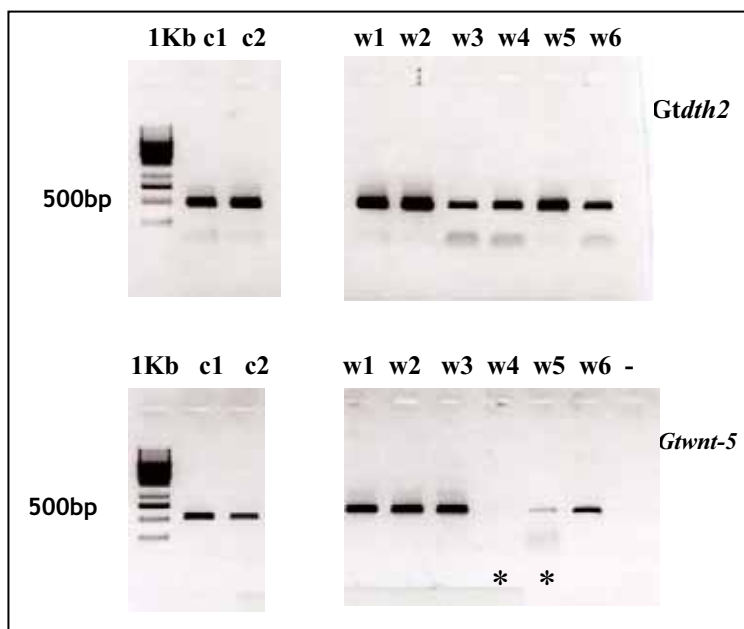


Figura 24. La figura mostra la RT-PCR d'un gen control, *Gtdth2*, d'expressió constant i la RT-PCR del gen *Gtwnt-5*, totes dues segons condicions descrites a l'apartat de Materials i Mètodes. c1 i c2 corresponen a cDNAs d'organismes alimentats amb el vector L4440 sense insert. De w1 a w6 es tracta d'individus alimentats amb bacteries productores de dsRNA *Gtwnt-5*. Assenyalats amb un asterisc, els organismes on ha funcionat la inhibició.

Com es pot veure a la figura 24 el mètode ha funcionat en alguns organismes (w4, w5) mentre que en els altres no. Això deixa palesa la variabilitat de la tècnica de

RNAi també amb aquest mètode (per exemple, no és fàcil testar quant han menjat uns individus més que els altres, i per tant el grau d'inhibició en alguns d'ells potser no ha estat suficient per detectar-ho per RT-PCR) però no suposa cap impediment per analitzar els casos concrets on el mètode sí que ha funcionat.

El plantejament següent era doncs que a continuació podríem prosseguir a analitzar possibles alteracions degudes a la manca de GtWnt-5, provocada per la injecció o ingestió del seu respectiu RNAi.

2.1.2 Anàlisi de resultats amb hibridacions *in situ* whole-mount i immunodeteccions. Marcadors neurals. Estudi de comportament

Un cop es va comprovar que en principi els nivells de transcrit de *Gtwnt-5* havien disminuït o desaparegut, vàrem dur a terme hibridacions *in situ* whole-mount del gen *Gtwnt-5* d'organismes control injectats amb aigua i d'organismes injectats amb dsRNA de *Gtwnt-5*. La figura 26 correspondria a un parell d'imatges d'un individu que va ser injectat amb el respectiu RNAi 6 vegades, mentre que la figura 25 mostra un parell d'imatges d'individus control injectats amb H₂O en diferents estadis de regeneració amb la típica localització del mRNA de *Gtwnt-5* a la perifèria dels ganglis cefàlics. Dita senyal no s'observa en els individus que han estat injectats amb l'mRNA de *Gtwnt-5*, tot indicant que el mecanisme de RNAi ha funcionat.

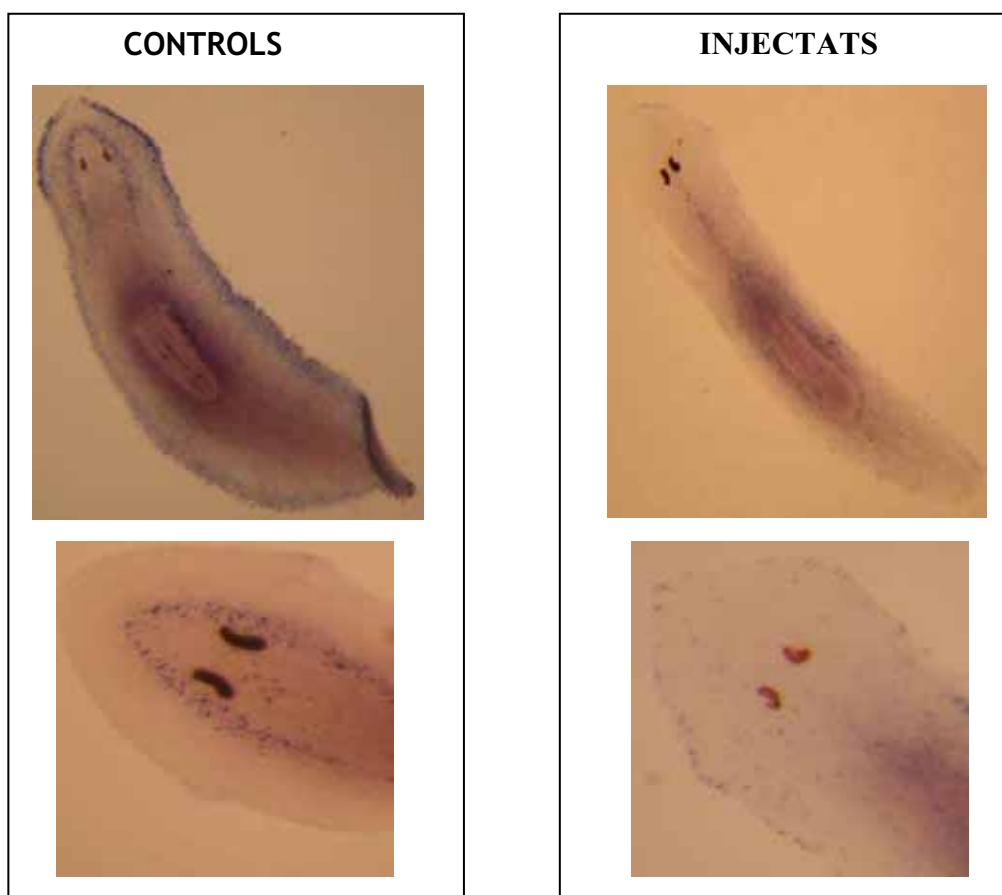


Figura 25. Sèries d'imatges després de la injecció d'H₂O, i *hibridació in situ* de *Gtwnt-5*. Es pot observar la senyal típica de *Gtwnt-5* tant a nivell de ganglis cefàlics com dels cordons nerviosos principals

Figura 26. Sèries d'imatges després de la injecció de dsRNAG*twnt-5*, i *hibridació in situ* de *Gtwnt-5*. No es detecta la senyal característica de *Gtwnt-5*.

Aleshores havíem comprovat tant per RT-PCR com per hibridació *in situ whole-mount* del propi gen GtWnt-5 que els nivells de transcrit havien disminuït. Ara bé, la manca d'aquest gen es traduïa en alguna alteració fenotípica detectable amb les nostres eines? Les aproximacions que ens podien ser d'utilitat eren les *in situ whole-mount* i les immunodeteccions de marcadors neurals diferents.

Vam decidir mirar també si la mancança de GtWnt-5 produïa no només alguna alteració qualitativa sinó també un canvi quantitatiu a nivell del cervell, és a dir, si el volum dels ganglis cefàlics es veia augmentat o disminuït respecte un cervell control. Amb aquest fi es va utilitzar el DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) conegut per la seva capacitat de formar complexos fluorescents amb el DNA, i utilitzat per tant per tenyir nuclis. La tinció es dugué a terme sobre talls transversals, realitzats a mà alçada, d'organismes controls i injectats amb dsRNAGtWnt-5 amb qui prèviament s'havia realitzat una hibridació *in situ whole-mount* de GtWnt-5. Les seccions foren a nivell dels ulls incloent els dos ganglis; s'incubaren 5' amb DAPI 5µM i posteriorment es van rentar un parell de cops amb PBS durant 5'. Es muntaren en 25%glicerol/PBS i s'observaren amb l'objectiu de 40X sota fluorescència. Vam mesurar l'àrea interna de cada gangli (vam triar aquelles seccions a nivell dels ulls que incloïen els dos ganglis) i la vam dividir per pel gruix del tall; això donava un quocient. Vam fer un promig entre els quocients dels ganglis de les seccions del grup control (5 mostres) (així com la desviació estàndar dins el grup) i el mateix pels ganglis del grup d'injectats (9 mostres), valors que mostrem a la taula de la figura 27.

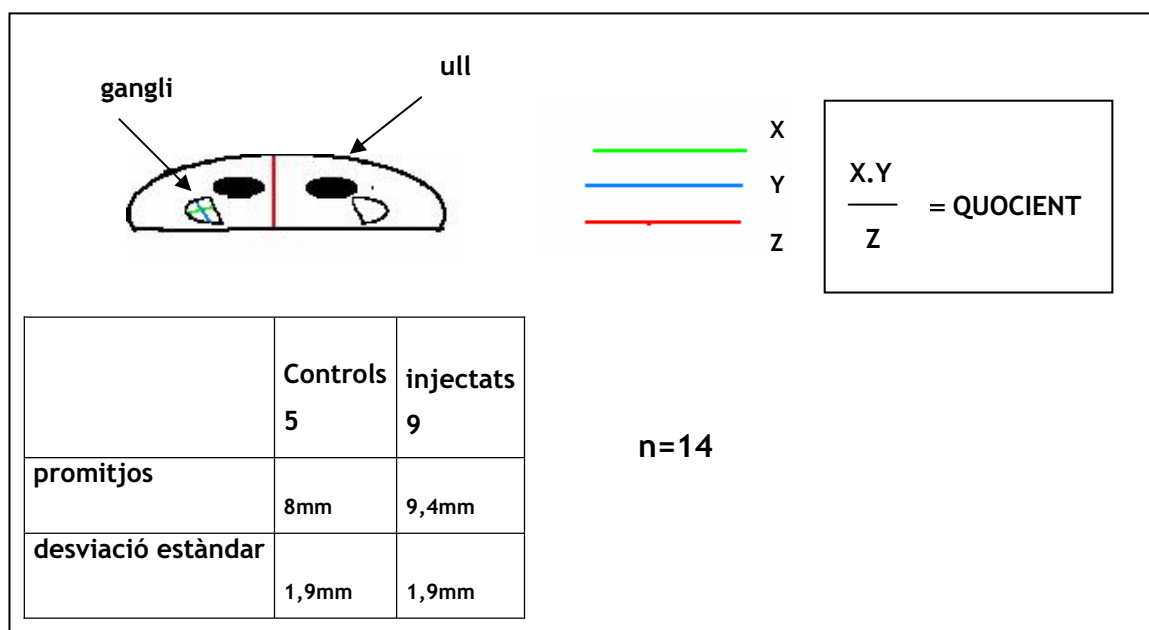


Figura 27 . Procediment realitzat per mesurar l'àrea interna de cada gangli i posterior mesura del quocient per comparar el grup control de l'injectat amb dsRNAGtWnt-5

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Al comparar els quocients dels dos grups no vam observar diferències significatives. Amb la pèrdua de funció de GtWnt-5 no es detectava un increment o una disminució del volum dels ganglis.

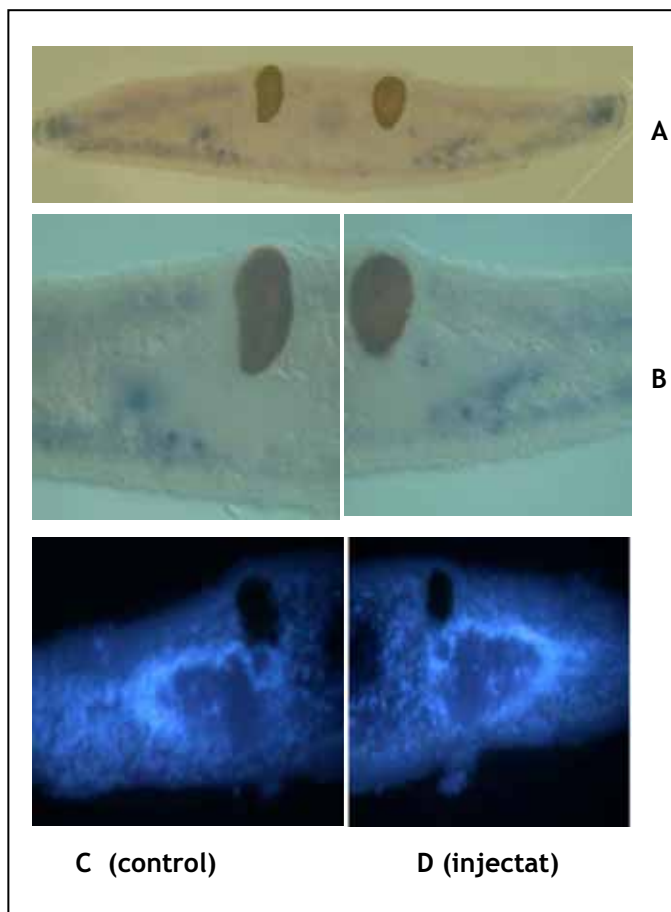


Figura 28. (A) i (B) Imatges al microscopi de camp clar, (A) amb objectiu de 10x i (B) amb objectiu de 40x. (C) i (D) tinció fluorescent DAPI, amb objectiu de 40x. Són seccions transversals a mà alçada d'hibridacions *in situ whole-mount* de GtWnt-5 sobre individus controls injectats amb H₂O (A) (B) i (C). (D) Tinció DAPI sobre una secció d'un organisme injectat amb dsRNAGtwnt-5

Pel que fa a les hibridacions *in situ whole-mount*, vam utilitzar una ribosonda específica per Pax6A, clonat també pel nostre grup (Pineda *et al.*, 2002) i així mateix marcador del SNC de la planària, no detectant-se cap diferència estructural ni d'organització entre els SNCs dels individus controls injectats amb H₂O i els individus injectats amb Gtwn^t-5.

Pel que fa a les immunotincions es van testar molts anticossos diferents per tal de trobar-ne alguns que fossin ja bé marcadors generals del SNC, ja bé marcadors neurals però de poblacions neurals més específiques. Finalment els que varen ser emprats amb èxit foren uns utilitzats ja anteriorment i coneguts com a marcadors generals del SNC de les planàries: un anticòs contra el neuropèptid FMRF-amida

(apartat 6 de Materials i Mètodes), un altre contra la tirosina fosforilada (apartat 6 de Materials i Mètodes) i, per últim, un anticòs contra la tubulina (apartat 6 de Materials i Mètodes). El protocol utilitzat per la immunotinció és el descrit a Materials i Mètodes, també a l'apartat 6. En els casos de la FMRF-amida i de la tirosina fosforilada, la senyal es detecta a nivell dels ganglis cefàlics i a nivell dels cordons nerviosos principals (figures 29 i 30), així com, sobretot en el cas de la FMRF-amida, de tota la xarxa neuronal que envolta la faringe (figura 27 de l'apartat 2.3 de la Introducció) i subepidèrmica. La senyal amb aquest anticòs era sempre més intensa que amb els altres dos utilitzats. L'anticòs contra la p-tirosina també donà marcatge a nivell dels ulls tot i que pensem que es tracta d'una tinció inespecífica que succeeix sovint amb estructures que són cavitats. L'anticòs contra la tubulina no va donar senyal a nivell dels ganglis cefàlics, en canvi, marca les projeccions cefàliques (figura 31).

Aquestes proves, realitzades amb els diferents marcadors neurals, no van revelar mai diferències entre el SNC de les planàries control i el de les planàries injectades (figura 32). L'aparença general del SNC, és a dir, la morfologia dels ganglis, de les projeccions cefàliques, ulls i cordons nerviosos principals, eren aparentment iguals en tots dos grups. Les possibles raons es discuteixen a l'apartat 2.1.4.

Pel que fa al comportament entre els individus controls i els injectats (o alimentats) amb dsRNAGtWnt-5 no vam observar cap fenotip: la mobilitat de l'organisme, la fotofòbia característica, l'atracció exercida pel menjar... eren iguals, indicant que fotorreceptors i receptors químics i mecànics, així com les connexions nervioses tant d'entrada com de sortida, aparentment no estaven afectats.

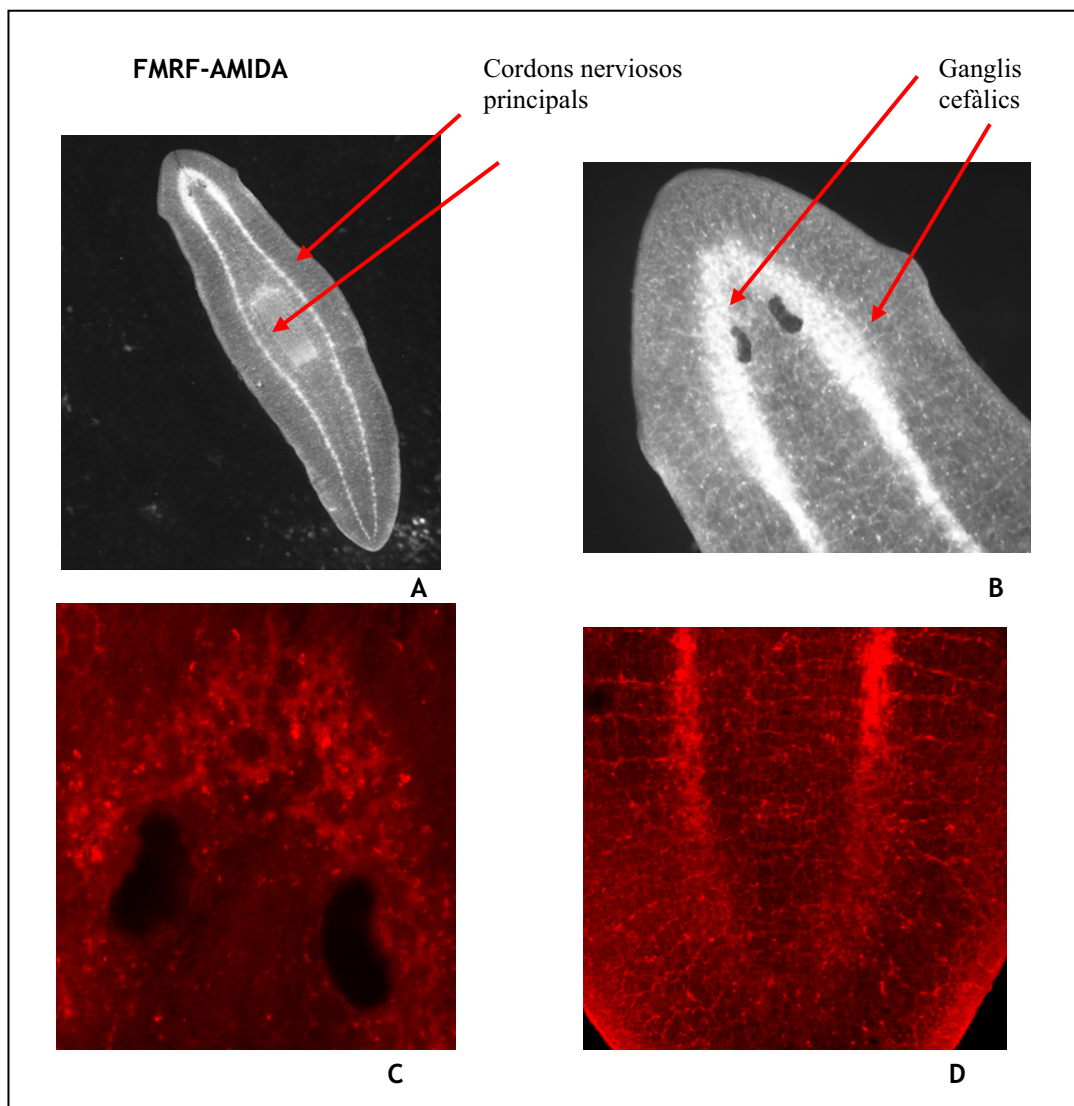


Figura 29. Imatges d'immunotincions contra el pèptid FMRF-amida, amb anticòs secundari rhodamine-red. A i B són imatges preses amb lupa de fluorescència, mentre que C,D són projeccions del conjunt de plànols realitzades amb microscopia confocal. D correspon a la part més posterior de l'organisme on es connecten els dos cordons nerviosos ventrals.

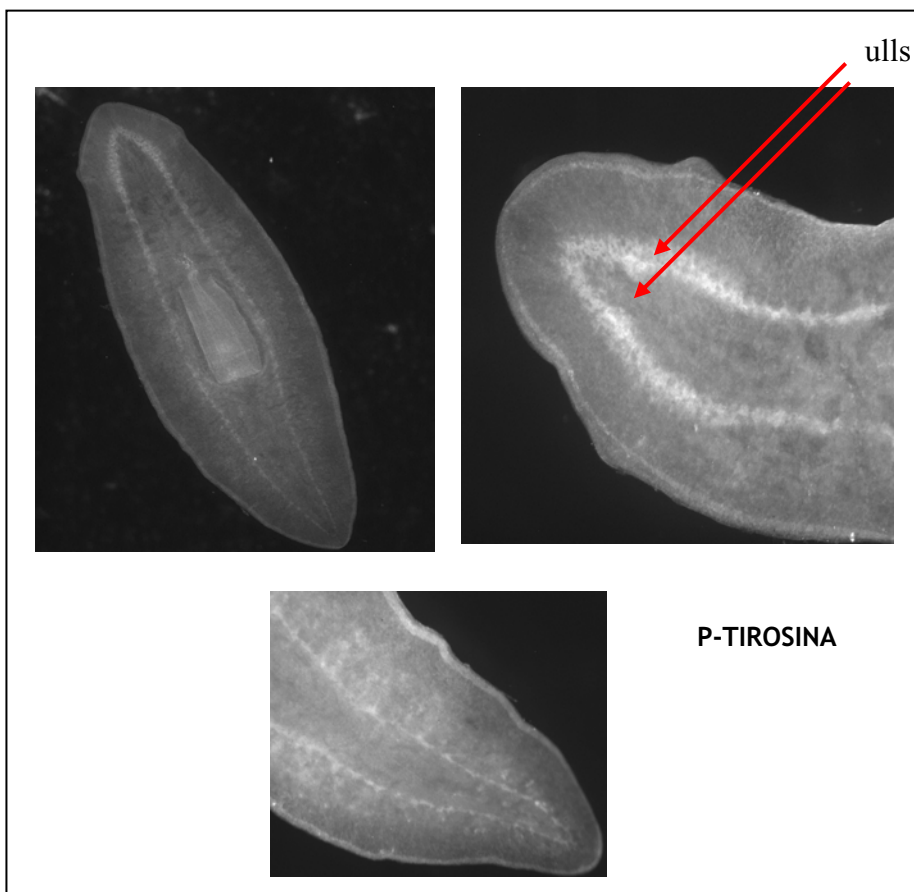


Figura 30. Imatges amb lupa de fluorescència d'immunotincions contra la p-tirosina

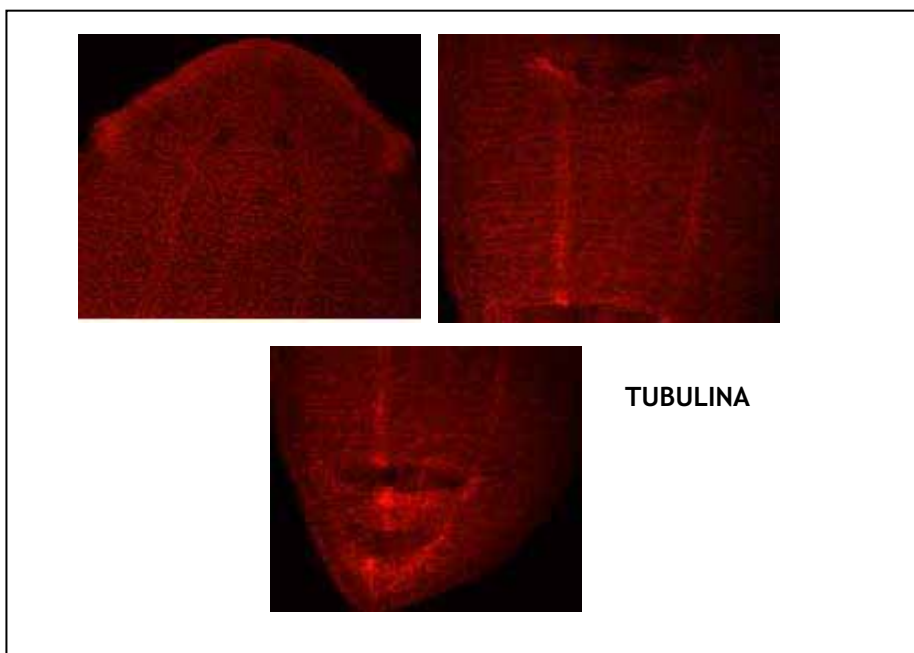


Figura 31. Imatges de microscopia confocal d'immunotincions contra la tubulina (secundari: rhodamine-red)

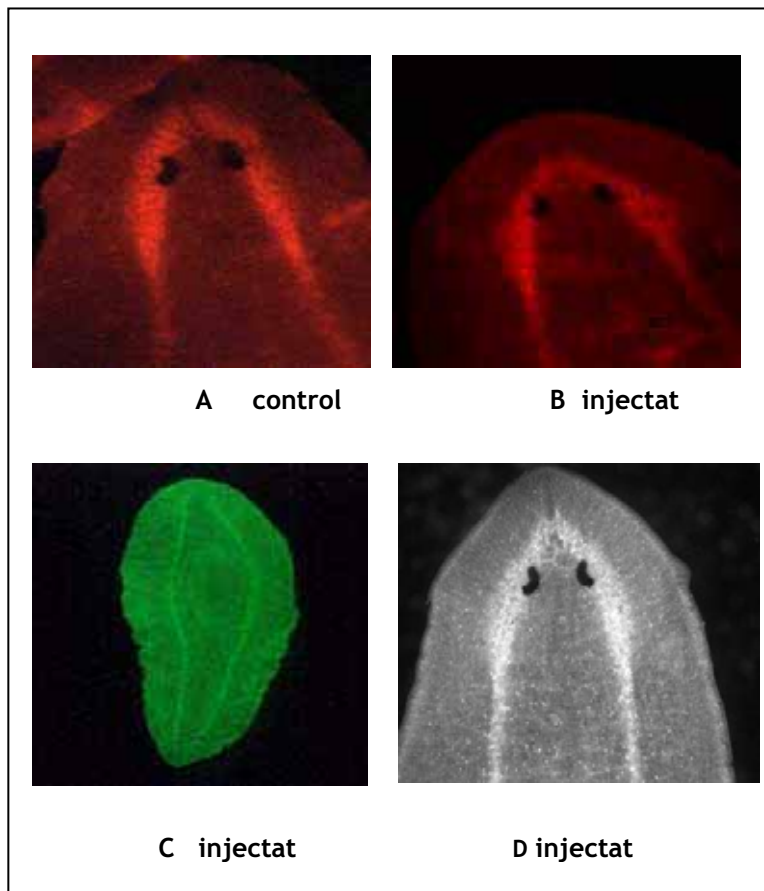


Figura 32. Imatges comparatives d'immunotincions entre un individu injectat amb H₂O (A) contra el pèptid FMRF-amida (secundari: rhodamine-red) i diferents individus injectats amb dsRNAG*wnt-5*: (B) immunotinció contra la FMRF-amida, (C) en un estadi més inicial de regeneració i immunotinció contra la tubulina (anticòs secundari en aquest cas: fluoresceïna) i (D) immunotinció contra la p-tirosina

2.1.3 Bases i limitacions de la tècnica de RNAi (RNA interference)

El desenvolupament de la tècnica de RNA d'interferència o RNAi es basa en l'existència a moltes espècies de sistemes de protecció per limitar els efectes de l'expressió de gens exògens o aberrants, com per exemple els virus o transposons. Per exemple, les plantes han desenvolupat el mecanisme conegut com PTGs o *post-transcriptional gene silencing* amb el que es reconeixen els transgens com a objectes genètics foranis. Estudis a *C.elegans* són els que van demostrar que la introducció de dsRNA (*double strand RNA*) silenciava l'expressió gènica de forma dependent d'homologia i molt més eficientment que les cadenes *sense* i *antisense* per separat. Més recentment s'ha descobert que l'RNAi també inhibeix informació gènica zigòtica i materna a embrions primerencs de ratolí.

Alhora de dissenyar un experiment de RNAi entre d'altres hem de considerar: la naturalesa del dsRNA en qüestió (ha de contenir seqüències exòniques) i l'homologia el més estricta possible per evitar interferència creuada amb seqüències altament homòlogues. Pel que fa a la longitud del DNA, la mínima no es coneix encara; la majoria d'experiments utilitzen fragments més grans de 500bp, tot i que amb longituds menors també s'han obtingut bons resultats. Per exemple, en el nostre grup el gen que codifica per l'Opsina va ser inhibit amb un fragment de 250bp. Dels sistemes d'incorporació de dsRNA es coneix la microinjecció, l'electroporació, així com a *C.elegans* i a planària s'han obtingut resultats produint menjar artificial contenint bacteries productores de dsRNA del gen d'interès i també simplement submergint els animals en una solució del dsRNA. Per altra banda, l'efecte del RNAi no és heretable, però s'ha desenvolupat un mètode a *C.elegans* amb animals transgènics que duen un plàsmid que expressa el dsRNA (Bosher i Labouesse, 2000). L'aplicació de la tècnica del RNAi en mamífers ha presentat més complicació ja que s'ha descobert que la introducció de dsRNA provoca l'activació inespecífica de la resposta de l'interferó del sistema immune (Elbashir *et al.*, 2002); alternativament, s'injecten dsRNAs més petits (siRNAs, *small interfering RNAs*) obtinguts *in vitro* utilitzant el complex Dicer, complex proteic iniciador del mecanisme, que ja ha estat clonat prèviament (Provost *et al.*, 2002). Pel que fa al mecanisme del RNAi, podríem dir en primer lloc que la degradació del RNA succeeix tant al citosol com al nucli ja que el RNA nuclear també és diana del RNAi i que molts dels factors implicats en aquest mecanisme han estat trobats fent *screenings* de mutants per RNAi a *C.elegans*. RNAs sintètics i virus

RESULTATS I DISCUSSIÓ

replicants entre d'altres poden activar el mecanisme de silenciament. El mecanisme de RNAi s'inicia amb l'enzim Dicer, una RNasa III, membre entre d'altres d'una família de proteïnes molt conservades evolutivament, que processa la doble cadena de RNA en fragments d'aproximadament 25 nucleòtids anomenats siRNAs (*small interfering RNAs*). Aquests siRNAs s'incorporen a un complex nucleasa multiproteic, el RISC (*RNA-induced silencing complex*). Aquest complex s'activa a mida que va desenrotllant els siRNAs que seran utilitzats com a guia per la selecció de substrat. Els complexos RISC actius actuen promovent la degradació de RNA i la inhibició de la traducció. Complexos similars també dirigeixen el remodelament de la cromatina. L'amplificació de la senyal almenys a plantes sembla ser que es realitza amb RNA polimerases dependents de RNA (RdRP) que sintetitzen nou dsRNA a partir dels siRNAs (Hannon, 2002).

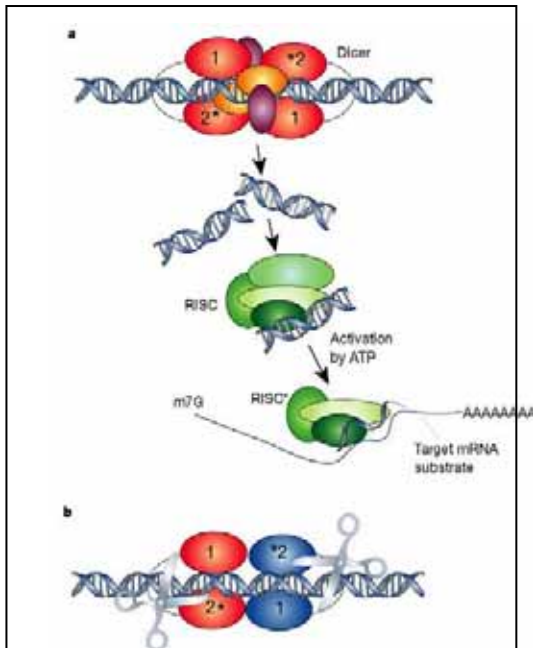
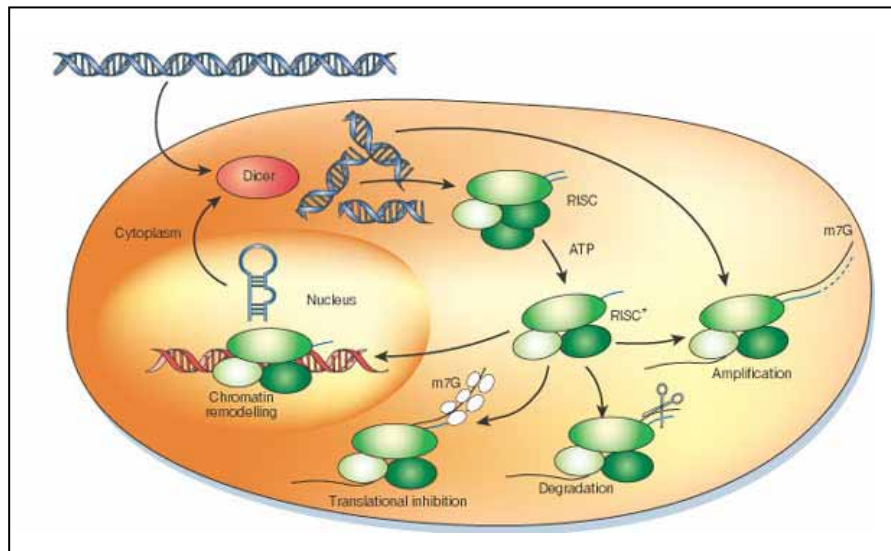


Figura 33. Funcions dels complexos proteics DICER i RISC en el context de RNAi. Tret de Hannon, 2002

Figura 34. Possible model de funcionament del RNAi. Tret de Hannon, 2002



La tècnica de RNAi presenta, però, algunes limitacions a tenir en compte: en primer lloc, la degradació de la doble cadena de RNA pot veure's condicionada per la disponibilitat de la maquinària del RNAi en un teixit donat i/o en un estadi específic del desenvolupament; a més, l'estabilitat natural de cada RNA diana té un important efecte en la potència del RNAi: RNAs més estables són més susceptibles a ser afectats; RNAs menys estables són menys susceptibles a ser-ho. Per altra banda, encara que no s'ha demostrat, sembla ser que alguns mRNAs poden ser resistents a l'acció del RNAi, ja sigui per composició de la seva seqüència, estructura secundària, segrest dins la cèl.lula... Per exemple, en el cas de *C.elegans*, diferents grups han observat resistència parcial o completa de certs gens expressats al SN madur (independentment del mètode d'incorporació de la dsRNA). Les possibles raons podrien ser que aquest sistema tingui un component limitant de la maquinària de RNAi o que en aquest teixit hi hagi un component desestabilitzant el dsRNA (Timmons *et al.*, 2001).

Ara bé, pel que fa al cas que ens ocupa nosaltres hem demostrat amb aquest treball que alguns gens de planària expressats al SNC han pogut ser inhibits per la tècnica de RNAi, fet ja demostrat prèviament per altres grups (Pineda *et al.*, 2000; Newmark *et al.*, 2003). El cas concret de GtWnt-5 ens va fer adonar que hi ha regions del gen clonat que no funcionen com a RNAi; la regió compresa entre l'oligo W3' i l'extrem 5' del gen, que anomenem "w600", no funcionà mai, és a dir, mai vàrem observar una disminució del nivell de transcrit de GtWnt-5; en canvi, al seleccionar la zona anomenada "w372" que comprèn desde l'oligo W3'.2 a l'oligo W5'.4, aconseguírem l'efecte desitjat. Possiblement deuen existir àrees que, ja sigui per conformacions pròpies que pugui prendre l'RNA mateix, ja sigui per potser tractar-se d'una zona protegida, o per motius que desconeixem, no permeten que l'RNA endogen sigui truncat.

Per últim, és interessant comentar que hi ha força variabilitat entre organismes, és a dir, quelcom similar a la diferent penetrància d'un fenotip donat. Per això la necessitat de repetir els experiments i corroborar lo observat.

Una modificació interessant al mètode d'injecció és la realització de la tècnica de doble tall per reforçar el possible fenotip (Mannini *et al.*, 2004): als neoblasts hi ha una gran quantitat de transcrits silenciats en forma de partícules ribonucleoproteiques que els podrien fer menys sensibles a l'acció del RNAi. Caldria doncs forçar el sistema i induir una segona regeneració en cadena per sensibilitzar aquestes cèl.lules a l'acció del RNAi.

2.1.4 Com explicar l'absència de fenotip quan inhibim *GtWnt-5*

Els individus amb *dsRNA^{wnt-5}* regeneren normal aparentment. Tot i fer les immunotincions amb estadis on sembla que *GtWnt-5* hauria de ser més necessari segons les nostres *in situs* (aproximadament 7d regeneració), no veiem diferències a nivell del cervell. Quan aplico el *dsRNA^{wnt-5}*, què passa a nivell cel.lular d'aquelles cèl.lules del sistema nerviós que normalment, i segons la detecció del transcrit per *in situ*, expressen *GtWnt-5*? quan no hi ha proteïna aleshores la via activada per dit gen hauria d'estar bloquejada, a no ser que existeixi redundància i aquesta via pugui ser activada per altres lligands donant lloc a la mateixa resposta cel.lular normal. Per això podria ser que, tot i no detectar transcrit, ni per *in situ* ni per RT-PCR, el fenotip fos normal, és a dir, que existís **redundància**.

Per una altra banda, també podria ser que la funció de *GtWnt-5* fos molt específica i la seva inhibició produís una alteració no detectable amb la **sensibilitat** dels mètodes utilitzats. Per això convindrien més que marcadors generals del SNC, marcadors més específics, de poblacions neurals especialitzades o estructures concretes, com per exemple marcadors de les branques cefàliques a la base de les quals *GtWnt-5* presenta un patró regionalment iteratiu (Marsal *et al.*, 2003). Els marcadors neurals generals del SNC emprats (FMRF-amida, p-tirosina i tubulina) així com les *in situs* de Pax6A demostren que a nivell macro de connexions i comissures neurals la manca de *GtWnt-5* no produeix alteració. Ara bé, si l'efecte de pèrdua de funció de *GtWnt-5* és més quantitatiu que qualitatiu, podria ser que el número de cèl.lules formant part dels nous ganglis regenerants fos menor que en un individu control. Aquest era el propòsit d'utilitzar la tinció DAPI, que ens va revelar que el volum dels ganglis cefàlics en un individu injectat era molt similar que el dels individus control. Com hem comentat a l'apartat 2.1.2 tampoc vam detectar cap comportament extrany enfront de la llum o del menjar. En un futur, les immunotincions contra la β -catenina per detectar translocacions de la proteïna sota una senyal Wnt, ens hauran de ser útils per ressoldre aquesta manca d'eines sensibles i altres punts com definirem a l'apartat de Perspectives d'aquesta tesi.

L'altra possibilitat és que els motius de la no detecció d'anormalitats no siguin la redundància ni la poca sensibilitat, sinó que simplement la inhibició que produïm no sigui suficient per induir un fenotip. El planning d'injecció que duem a terme ja té en compte no parar d'injectar durant tot el procés, assegurant-nos de mantenir inhibits o a nivells baixos els transcrits. Hem observat, però, que el procés de regeneració es dona

igual que en organismes control. És possible que nivells molt baixos de GtWnt-5 siguin suficients per dur a terme la funció que li pertoca.

2.2 Efectes de la inhibició de *Gtgsk-3*

2.2.1- Resultats pel mètode d'injecció i pel mètode d'ingesta de bacteries productores de dsRNAsk-3. Anàlisi de resultats per RT-PCR. Descripció dels fenotips obtinguts

De la mateixa forma que amb el gen *Gtwnt-5*, ens vam disposar a analitzar la funció de GtGSK-3 mitjançant la gènesi de fenotips de manca de funció amb RNAi, tant per injecció com per ingesta de bacteries productores de dsRNA.

Pel que fa al mètode d'injecció, vam escollir com a seqüència per dissenyar el dsRNA específic per *Gtgsk-3* el fragment anomenat "G230" (de 230bp de longitud) i s'obtingué amb els oligonucleòtids "GspF" i "G5" (veure figura 8 de Materials i Mètodes) per PCR sobre plàsmid que contenia el fragment total de 426bp de *Gtgsk-3*. El fragment resultant es va subclonar en un altre vector pBluescript. Posteriorment es prosseguí a la linearització amb EcoRI i BamHI del lloc de múltiple clonatge respectivament per les posteriors retrotranscripcions amb les RNA polimerases T3 i T7 i es sintetitzà la cadena de dsRNA segons el procediment establert.

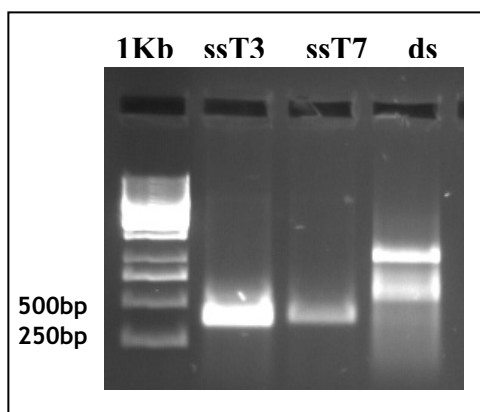


Figura 35. Gel d'agarosa per testar les cadenes de RNA simple i la doble cadena de RNA respectiva del gen *Gtgsk-3*

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Com veurem més endavant, vam aconseguir veure per RT-PCR la disminució dels nivells de transcrit de *Gtgsk-3*, havent dut a terme tant el protocol d'injecció curt com un de llarg com s'havia fet amb *Gtwnt-5* (el dia d0 s'havien produït talls pre i post faríngics). En primer lloc, vàrem fer un seguiment fenotípic de la regeneració d'aquests organismes injectats, sempre comparant-los amb els del grup control injectat amb aigua. Amb organismes injectats 7 cops i amb inducció de dos talls vam observar al dia 9 de regeneració que 12 de 21 organismes no presentaven o presentaven molt poc blastema anterior. Quatre dies després, sense ser injectats, el 75% fan un petit blastema amb petits ulls, és a dir, recuperen un fenotip normal, mentre que el 25% d'ells només recuperen un blastema sense ulls, al tretzè dia de regeneració (mirar percentatges a la taula 1).

Pel que fa al mètode de RNAi per ingesta de les bacteries productores de dsRNA, es va seguir el mateix procediment utilitzat per *Gtwnt-5*. Es va aconseguir introduir l'insert "G230" desitjat al vector L4440 amb els oligonucleòtids descrits a l'apartat 5.2 de Materials i Mètodes, i, segons el procediment allí explicat vàrem transformar la soca HT115 i vàrem preparar el menjar artificial. Els organismes van ser alimentats quatre cops amb intervals de tres dies sense menjar. Posteriorment se'ls tallà el cap i s'observà l'evolució de la regeneració anterior. En un primer experiment (ingesta A de la taula 1), aproximadament el 62% dels individus presentaven una regeneració anormal, tot i que d'aquests la majoria varen morir entre el dia 12 i 13d de regeneració. El 20% va recuperar el blastema i posteriorment els ulls. En un altra tanda d'experiments (ingesta B), s'estudià la regeneració de 18 organismes alimentats de la mateixa manera que amb l'experiment anterior: vuit dies després del tall, 9 organismes estaven normals aparentment; dels altres 9, 3 no tenien gens de blastema, 3 el tenien atrofiat i els 3 restants presentaven un blastema sense ulls. Dies més tard (13d de regeneració) aquests organismes morien.

Com veiem doncs tant amb un mètode com amb l'altre, i sempre comparant amb el grup control alimentat amb les bacteries HT115 transformades amb el vector L4440 sol, detectem una alteració en la regeneració del blastema anterior, en certs casos completament inhibida i en d'altres donant lloc a un blastema atrofiat. De totes formes, existeix també una variabilitat palesa, possiblement degut a que el grau d'inhibició per RNAi no és igual per a tots els individus i el fenotip resultant per tant tampoc (el terme "regeneració alterada" inclou individus sense blastema, amb blastema petit i atrofiat o amb blastema normal però sense ulls (figura 36). El RNAi de *Gtgsk-3* provoca fins i tot en alguns casos la mort dels organismes. La taula 1 il.lustra en percentatges aquests

resultats, les regeneracions anteriors normals i les alterades obtingudes amb l'experiment d'injecció, juntament amb els obtinguts amb els dos experiments d'ingesta (ingesta A, ingesta B), juntament amb l'evolució dels fenotips en el temps. És important remarcar que en cap cas, ni amb la injecció ni amb la ingesta, el blastema posterior va resultar alterat.

	Regeneració normal	Regeneració alterada 9d reg.	Fenotip al 13d reg.
Injecció	42%	57% (fenotips varis) →	75% recup/25% no recup.
Ingesta A	38%	62% (fenotips varis) →	80% RIP/20% recup.
Ingesta B	50%	50% (fenotips varis) →	100% RIP

Taula 1. Percentatges de fenotip normal o alterat de regeneració anterior obtinguts amb els diferents experiments de RNAi i evolució en el temps dels fenotips de regeneració alterada

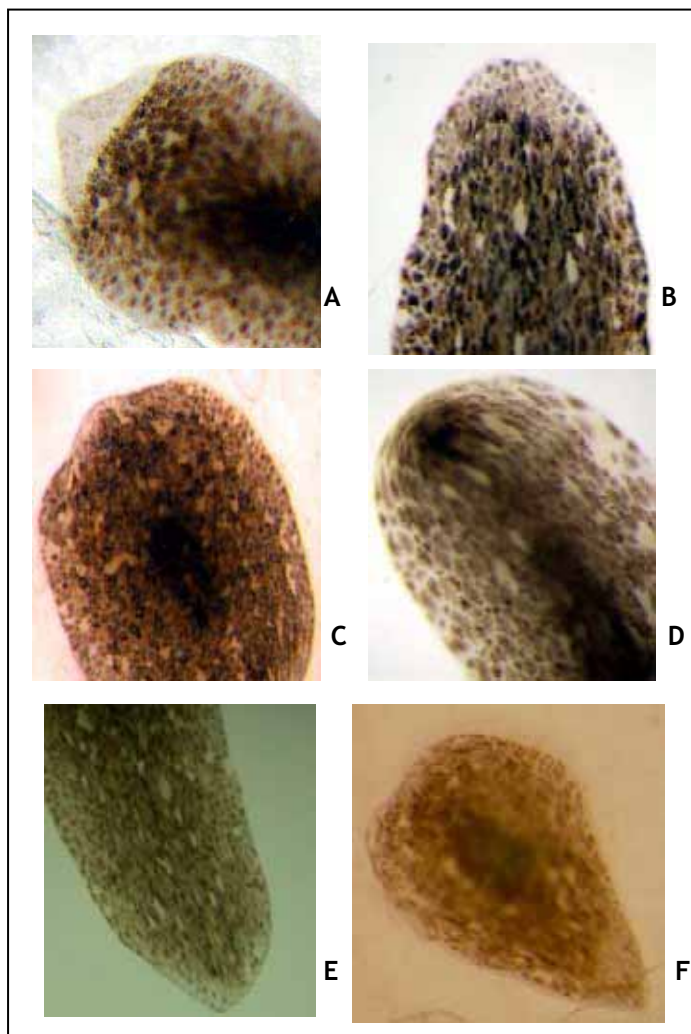


Figura 36. (A) Una planària control de 8d regeneració amb blastema i ulls nous. La resta d'imatges (B,C i D) corresponen als diferents fenotips de "regeneració anterior alterada" observats durant els experiments d'injecció i ingesta de dsRNAGtgsk-3. (B) Una planària de 8d regeneració amb un blastema petit sense ulls; (C) Una planària de 8d de regeneració amb un blastema molt petit, atrofiat i sense ulls. (D) Una planària sense blastema.

(E i F) Anàlisi de la regeneració posterior; (E) Tronc regenerant la cua d'un organisme control de 8d de regeneració i (F) Tronc d'un organisme regenerant de 8d de regeneració injectat amb dsRNAGtgsk-3 amb regeneració anterior afectada però regeneració posterior normal.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Seguint les condicions descrites a l'apartat 5.3 de Materials i Mètodes, es van realitzar RT-PCRs, tant per quan havíem dut a terme el mètode d'injecció com quan havíem dut a terme el d'ingestió. Per qualsevol dels casos es mostra la PCR control pel gen d'expressió ubíqua *GtDth2* (condicions especificades també a l'apartat 5.3 de Materials i Mètodes) (figura 37, A).

Els cDNAs utilitzats per la RT-PCR de la fotografia que mostrem a continuació corresponen a un individu control injectat amb H₂O “c”, i a un individu injectat amb dsRNAGSK-3:”i”, segons una tanda d'injeccions estàndar. Tots ells són individus de 4 dies de regeneració. Observo que GSK-3 està inhibit pràcticament del tot a “i” (figura 37, B) després de 40 cicles de PCR en aquest cas concret. El primer carril és el marcador 1Kb de pes molecular.

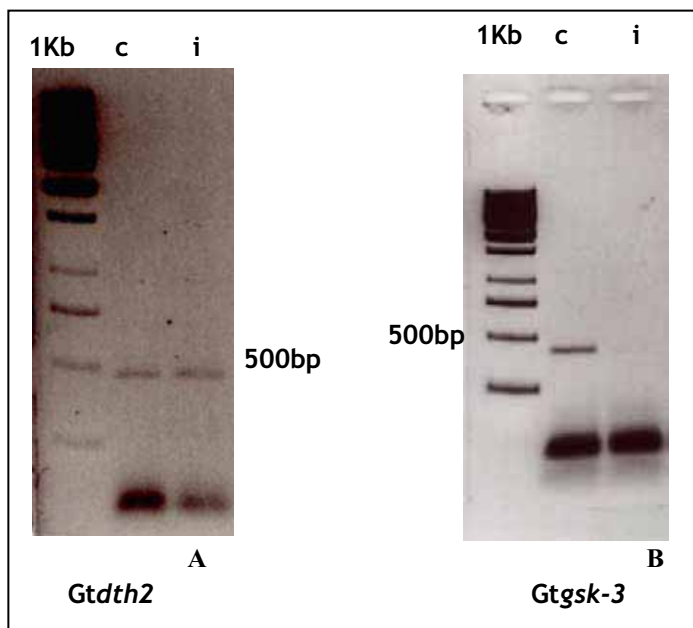


Figura 37. El gel A mostra la RT-PCR control per *GtDth2* sent “c” un cDNA injectat amb H₂O i “i” un cDNA injectat amb dsRNAGSK-3. El gel B és la respectiva RT-PCR de 40 cicles de *Gtgsk-3*, amb els mateixos cDNAs

2.2.2 Tractament amb inhibidors de la GSK-3. Descripció dels fenotips obtinguts

Molts estudis del desenvolupament s'han basat en cercar drogues que tinguin efectes més o menys dràstics en certs processos. Avui dia no hi ha dubte de l'efecte que per exemple té el LiCl en el desenvolupament. El LiCl és una de les drogues més efectives pel tractament dels trastorns bipolars i també té efectes dramàtics a la morfogènesi en el desenvolupament de molts organismes. A Klein i Melton, 1996, s'il·lustra la hipòtesi de que possiblement la diana endògena del liti sigui la GSK-3, ja que el tractament amb liti fenocopia la pèrdua de funció de GSK-3- β a *Xenopus* i *Dictyostelium*. Tot cercant sistemes per inhibir aquesta quinasa a la planària ens vam disposar a provar el liti. Es van fer immersions amb animals intactes i que havien de regenerar el cap, però malhauradament morien amb 0.3M i 0.03M de liti dissolt en *aigua de planàries*.

Però la GSK-3 té altres funcions a més de la de participar a la via Wnt, i el LiCl no és massa específic (Cohen i Goedert, 2004). Per una altra banda, les paulones constitueixen una nova família de benzazepinones molt prometedores, sembla ser com a compostos amb propietats antitumorals. Són potents inhibidores del cicle cel·lular, regulant quinases depenents de ciclins (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) i competint per ATP. Leost *et al.*, 2000 demostren que així mateix són potents inhibidores de la GSK-3- β i de la CDK5/p25 neuronal, tots dos enzims responsables de la major part de la hiperfosforilació de la proteïna Tau d'unió als microtúbuls. Diferents referències bibliogràfiques i comunicacions personals ens indicaren que possiblement una de les paulones, en concret l'anomenada **alsterpaulona**, fos força més específica que el liti i ens disposàrem a utilitzar-la per detectar possibles alteracions fenotípiques en animals intactes i especialment durant el procés de regeneració, tot procurant cercar eines per demostrar que dits efectes eren conseqüència de que la quinasa GSK-3 no estava funcionant, i poder així establir l'associació entre la manca d'activitat de la GSK-3 i els possibles efectes fenotípics. Actualment estem duent a terme experiments similars amb el compost **SB-415286** (3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione), de *Tocris*, un altre potent i selectiu inhibidor de la GSK-3, que estimula la síntesi de glicogen, la transcripció gènica i és neuroprotector (Coghlan *et al.*, 2000; Cross *et al.*, 2001; Culbert *et al.*, 2001).

Pel que fa a l'alsterpaulona (Alp) vàrem treballar dil.luint la droga en *aigua de planàries* (mirar apartat 1.1 de Materials i Mètodes). Els organismes es submergien en aquesta solució. Paral.lelament sempre vàrem fer un grup control només amb DMSO (organismes submergits en DMSO 1:1000 en *aigua de planàries*) per descartar que aquesta substància, en la que havíem dil.luït també la droga, pogués tenir de per sí efectes de toxicitat (la concentració inicial d'Alp a la que vam treballar, 5µM, va ser a partir de la informació obtinguda de grups treballant amb cnidaris)

Els factors a considerar al llarg de l'experiment varen ser:

- concentració de la droga: 5µM (**A**), 10µM (**B**) i 0,5µM(**C**)
- temps de tractament amb la droga respecte la inducció del tall: començant a tractar abans del tall (**pre-tractament**)i/o tractament després del tall (**post-tractament**)
- forma d'incubació amb la droga: **contínua** o **polsos** de 4-6h cada dia.

Les observacions a realitzar eren: les **morfològiques** tant a simple vista com amb anticossos contra marcadors neurals com la FMRF-amida (per detectar possibles canvis en l'organització i estructura del SNC); les RT-PCRs de **gens diana** de la via Wnt canònica com *engrailed*, que haurien d'estar *activats*, ja que la inhibició de la GSK-3 mimetitzava una super-activació de la via Wnt canònica.; i el comptatge de **mitosis**, prèvia incubació amb colchicina, per tal de constatar si la inactivació de la GSK-3 produïa alteracions en la proliferació cel.lular.

Així doncs:

1-Quan el tractament es realitzava en forma de **post i pre-tractament** amb la concentració **A** i amb incubació **contínua** (figura 38), obteníem en un 90% dels casos, un "fenotip fort", consistent en absència de blastema tant anterior com posterior, mentre que en un 10% dels casos s'obtenia un fenotip intermedi de "cap sense blastema", que, com el seu nom indica, implica la formació de regió cefàlica al teixit antic, sense que l'animal hagi format cap blastema regeneratiu; el blastema posterior es formava normalment. La diferència entre el grup control, amb un blastema diferenciat on hi trobem els ulls, i el grup tractat és evident. Els individus control, grup tractat amb DMSO, presenten, al vuitè dia de regeneració, un patró de regeneració anterior perfectament normal, amb la mida de blastema i la formació dels ulls corresponent al dia de regeneració que pertoca a una temperatura de 19°C. En aquests individus control el blastema és fàcilment distingible de la resta de teixit, el teixit antic, ja que encara no

presenta pigmentació (figura 39). Per contra, els individus tractats que han desenvolupat el fenotip de “cap sense blastema” no han fet blastema, no veiem cap mena de teixit despigmentat; la regió anterior presenta una morfologia que recorda a la d’un cap menut, sense aurícules, però amb uns ulls petits (figura 40). Si la incubació era en forma de **polsos** s’obtenia amb un 20% el “fenotip fort” mentre que la resta d’organismes regeneraven normal:

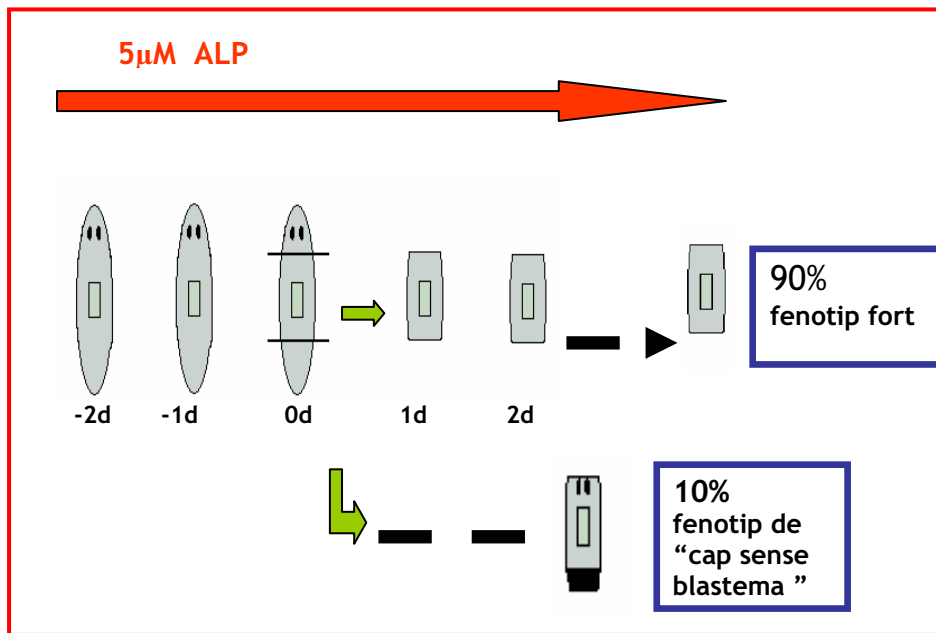


Figura 38. Esquema il·lustrant experiment on en el 90% dels casos obteníem el “fenotip fort”

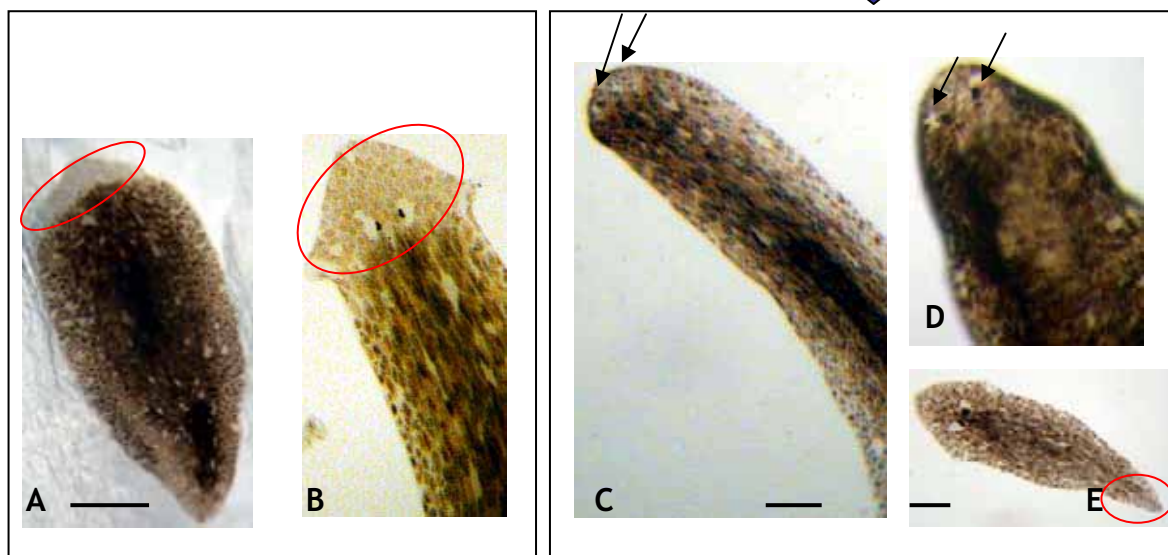


Figura 39. Individus control tractats amb DMSO. A: de 8d regeneració i B: de 15d regeneració. Esc.barres 0,5mm

Figura 40. Individus tractats amb Alp. C: de 8d regeneració; D: de 15d regeneració; E: cap regenerant cua de forma normal. Les fletxes assenyalen els nous ulls formats al teixit antic. Fenotip de “cap sense blastema”. Esc.barres 0,5mm

RESULTATS I DISCUSSIÓ

2-Quan el tractament es realitzava en forma de **pre-tractament i post-tractament** (tan curt -fins 0d o fins 1d- com llarg), amb la concentració **B** i amb incubació tant **contínua** com en forma de **polsos** (figura 41), obteníem en un 100% dels casos, el “fenotip fort” (figura 43). Aquests organismes, en absència ja de la droga, no van recuperar mai el fenotip normal (no van regenerar el blastema posterior ni l’anterior) en 20 dies, temps després del qual van morir:

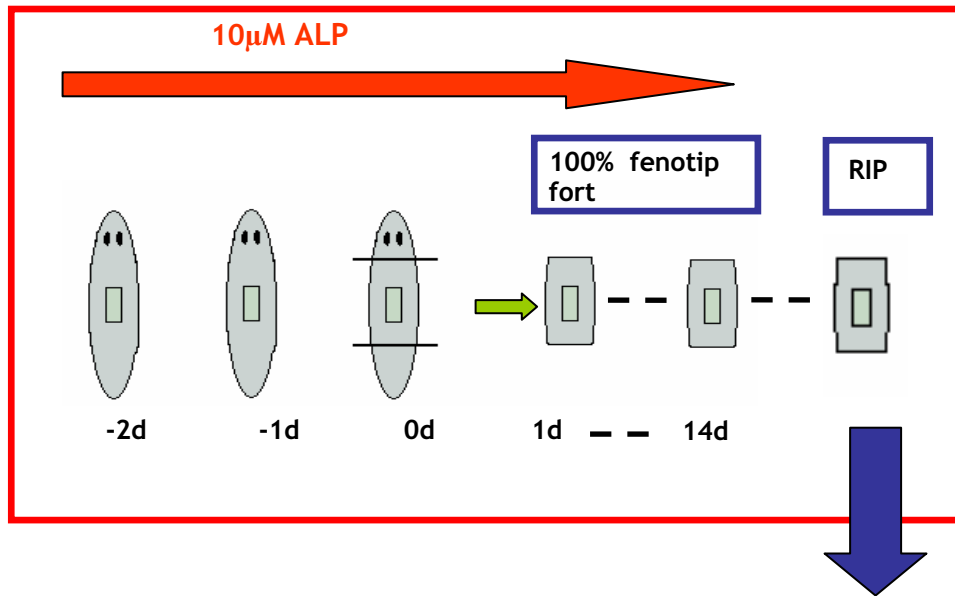


Figura 41. Esquema il·lustrant l'experiment on en el 100% dels casos obteníem el “fenotip fort”

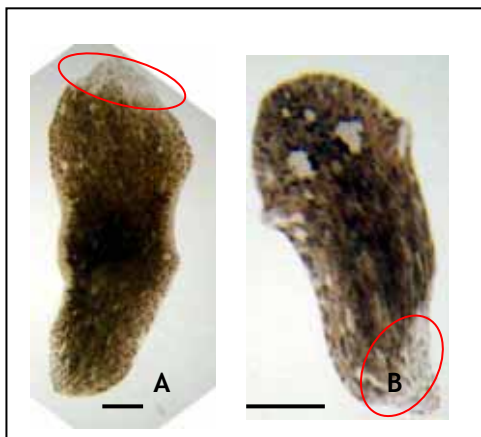


Figura 42. Individus control de 8d regeneració tractats amb DMSO. A: tronc regenerant anterior; B: cap regenerant cua. Encerclats, els blastemes regeneratius. Esc.barres 0,5mm



Figura 43. Individus de 8d regeneració amb tractament continuat d'Alp 10µM. C: tronc regenerant anterior; D: cap regenerant cua. Fenotip fort. Esc.barres 0,5mm

3-Quan el tractament es realitzava en forma de **pre-tractament** però sense **post-tractament** (figura 44), amb la concentració **B** i amb incubació **contínua**, el fenotip majoritari observat era el de “cap sense blastema” (figura 45, C), tot i reprendre's el tractament en dies més avançats de regeneració (d4); amb un 10% s'observà també un altre tipus de fenotip intermedi: individus amb blastema anterior i posterior però sense ulls (figura 45, B) mentre que la resta (aproximadament un 30%) presentaven un fenotip normal (figura 45, A).

Figura 44. Esquema il·lustrant l'experiment on obteníem un 60% d'organismes amb “cap sense blastema”, un 10% d'individus amb blastemes però sense ulls i la resta d'organismes amb regeneració normal

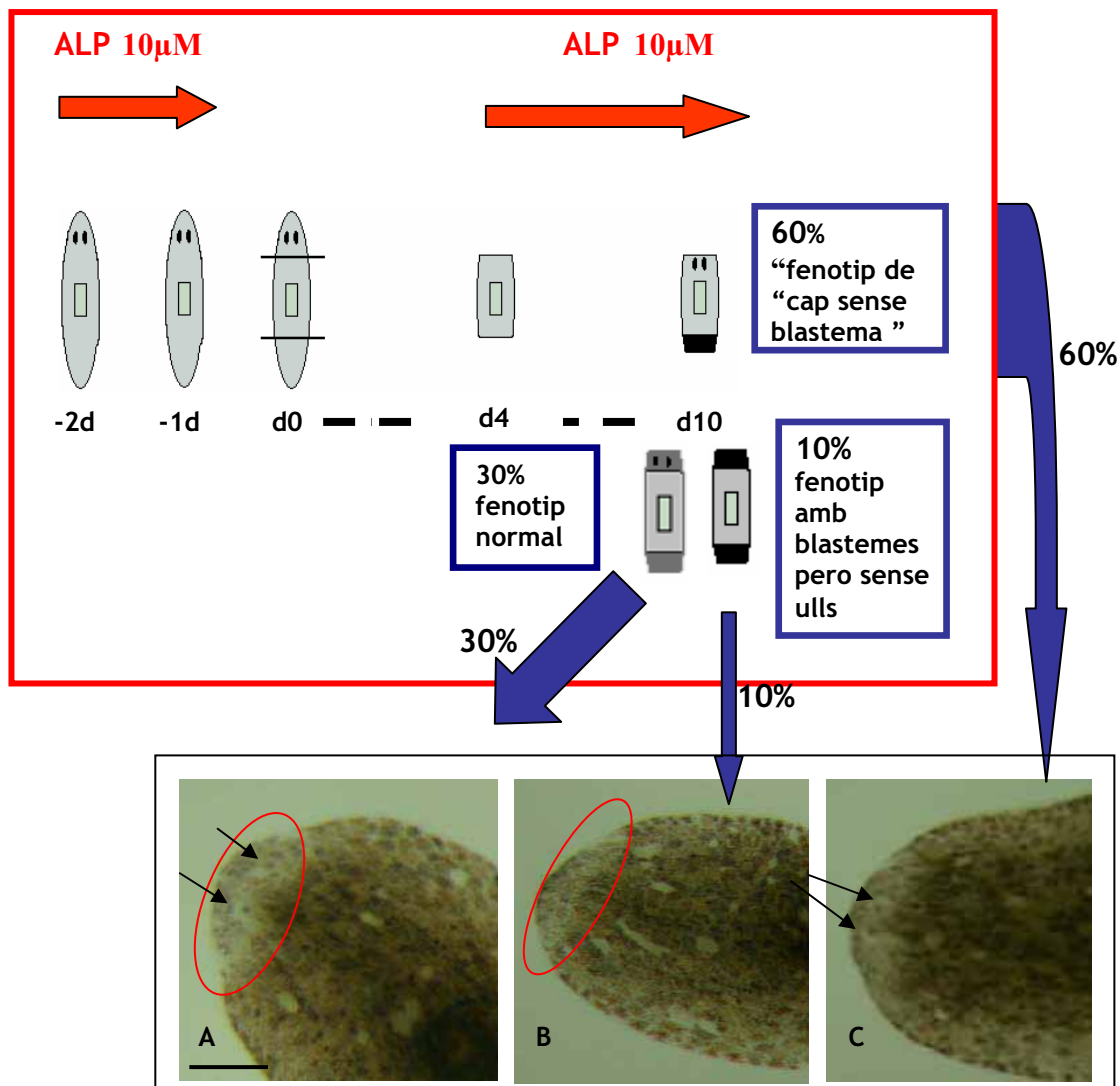


Figura 45. Imatges dels diferents blastemes que resulten de l'experiment il·lustrat a la figura 44. A: blastema normal amb ulls, B:blastema sense ulls, C: fenotip de “cap sense blastema”. Encerclats, els blastemes regeneratius. Fletxes assenyalant els nous ulls. Esc.barres 0,5mm

RESULTATS I DISCUSSIÓ

4-Quan el tractament es realitzava en forma de **post-tractament** a partir de les 12h després de la inducció del tall, sense haver-se realitzat pre-tractament, els individus regeneraven de forma normal (figura 46 A i B):

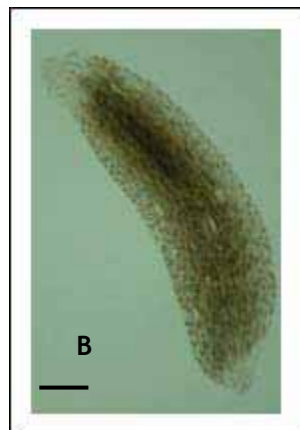
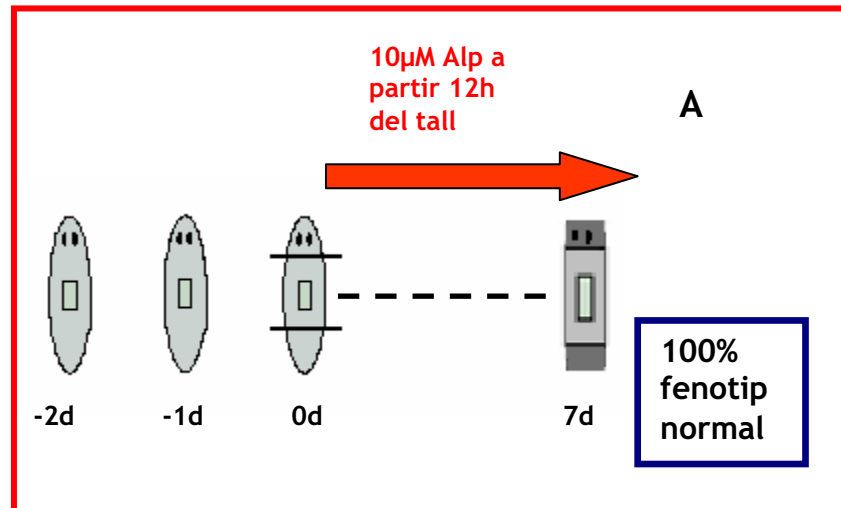


Figura 46. A: Esquema il·lustrant l'experiment on obteníem un 100% d'organismes amb regeneració normal, quan el tractament es realitzava a partir de 12h després del tall. B: exemple d'un organisme de fenotip normal, amb els blastemes regeneratius anteriors i posteriors. Esc.barres 0'5mm

5-Quan la concentració utilitzada era la C ($0'5\mu\text{M}$), fos quina fos la combinació de tractament, no observàrem alteració fenotípica de cap tipus, tots els individus regeneraven normal (figura 47).

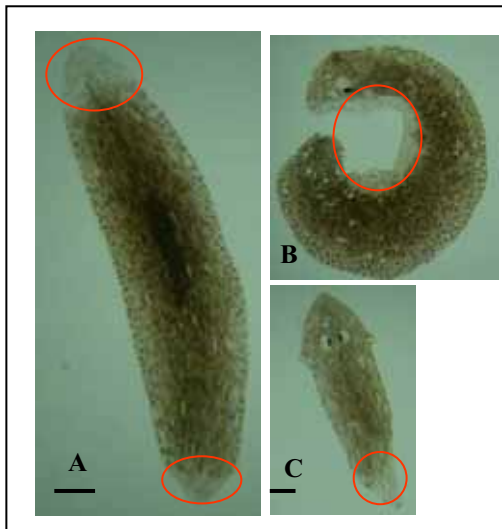


Figura 47. Els grups tractats amb la concentració C ($0'5\mu\text{M}$) i els tractats amb DMSO mostren un estat normal de regeneració a 8d regeneració. A: tronc regenerant anteriorment i posteriorment. B: organisme regenerant longitudinalment. C: cap regenerant cua. Encerclats, els blastemes regeneratius. Esc.barres $0'5\text{mm}$

6- El tractament en individus intactes no donava lloc a cap fenotip (figura 48). Les possibles raons seran discutides més endavant.

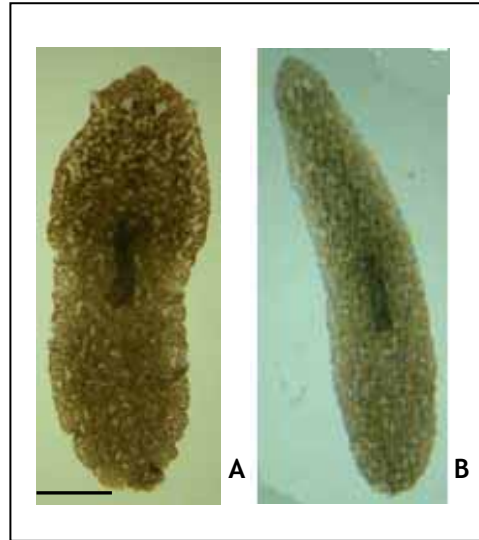


Figura 48. Organismes intactes abans (A) i després (B) del tractament. Aparentment no hi ha alteració fenotípica. Esc barres 0,5mm

7-Si es realitza un segon tall en un organisme que no ha regenerat el cap degut al tractament amb Alp, es recupera la capacitat regenerativa si aquesta segona regeneració té lloc en un medi control sense droga (figura 49, A, B, C):

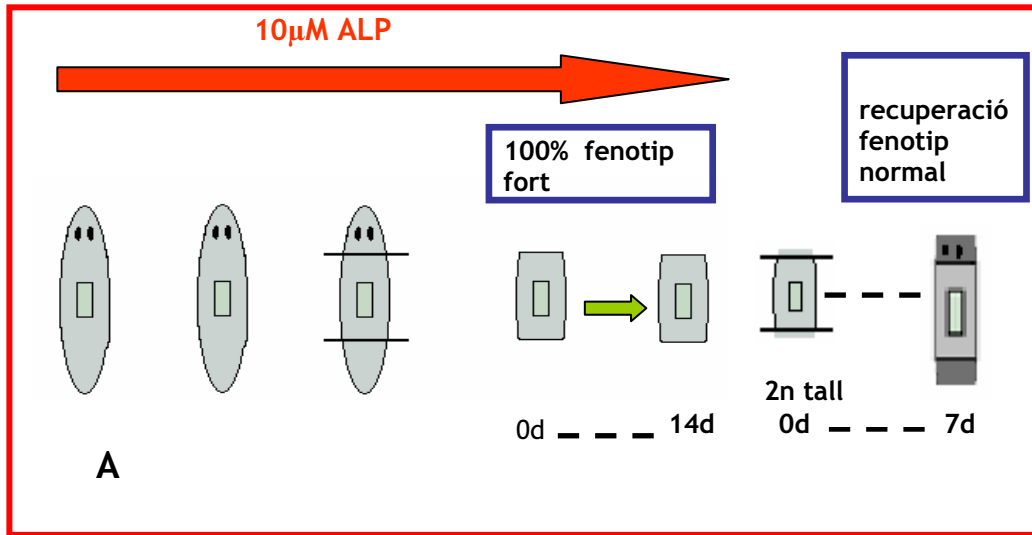
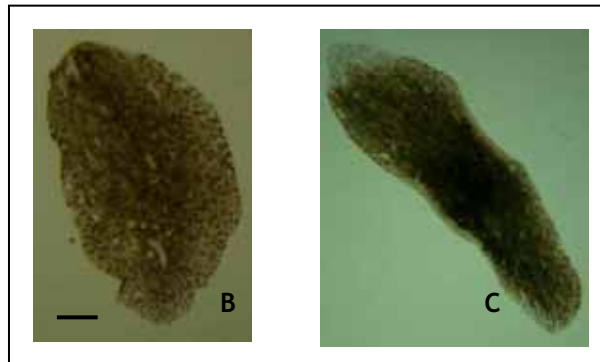


Figura 49. (A): Esquema il.lustrant l'experiment on obteníem un 100% d'organismes amb fenotip fort (B), però amb posterior recuperació d'una regeneració normal (C), després d'un segon tall en medi sense Alp. Esc.barres 0'5mm



Per tant, segons els nostres resultats, semblava que la GSK-3 havia d'estar activa a la fase inicial de la regeneració per permetre'n aquesta. En concret, necessàriament activa en les primeres 12 hores de regeneració, temps que coincideix amb l'interval en que es determina el cap a l'esboç de blastema+postblastema anterior a planària (Saló, 1984).

Per una altra banda l'aparició del fenotip intermedi de "cap sense blastema" suggeria que la GSK-3 podria estar controlant dos fenòmens independents: la formació de blastema anterior i la morfogènesi de cap. Hi hauria doncs una fase Wnt-depenent (control de tipus inhibitori) pel que fa a la formació de blastema i una fase Wnt-depenent en estadis una mica més avançats de la regeneració pel que fa a la determinació del cap.

2.2.3 Anàlisi de resultats amb immunodeteccions contra el marcador neural FMRF-amida

Vam voler comprovar si les alteracions fenotípiques observades a simple vista es traduïen en una desorganització o malformació del SNC i per això vam realitzar immunotincions contra la FMRF-amida amb individus dels diferents fenotips observats, que tornem a mostrar a la figura 50. Aquesta figura és un recull d'alguns dels diferents fenotips obtinguts al llarg dels diversos experiments. Es tracta d'organismes de 8d de regeneració: amb fenotip de regeneració normal (A); amb fenotip intermedi amb blastema però amb absència d'ulls (B); i amb fenotip intermedi de "cap sense blastema (C i D i D').

Segons van revelar les immunotincions contra la FMRF-amida, els organismes de fenotip "cap sense blastema" mostren un SNC completament regenerat, però comprimit (figura 52) en relació als regenerants controls (figura 51). La regió de connexió anterior entre els dos ganglis cefàlics (molt més curts que els dels controls) és molt més ampla que la dels individus control. Si observem també les imatges del plànol on apareixen els ulls veiem que mostren una morfologia similar en els dos grups. Val a dir que les imatges de les immunotincions corresponen a individus de 14d de regeneració i que, per tant, l'organisme tractat amb Alp havia desenvolupat ja un cap de

morfologia similar al control a simple vista. Les immunotincions realitzades amb organismes de 8d regeneració revelarien en canvi un cervell format però encara molt més comprimit i un retardament en la regeneració completa.

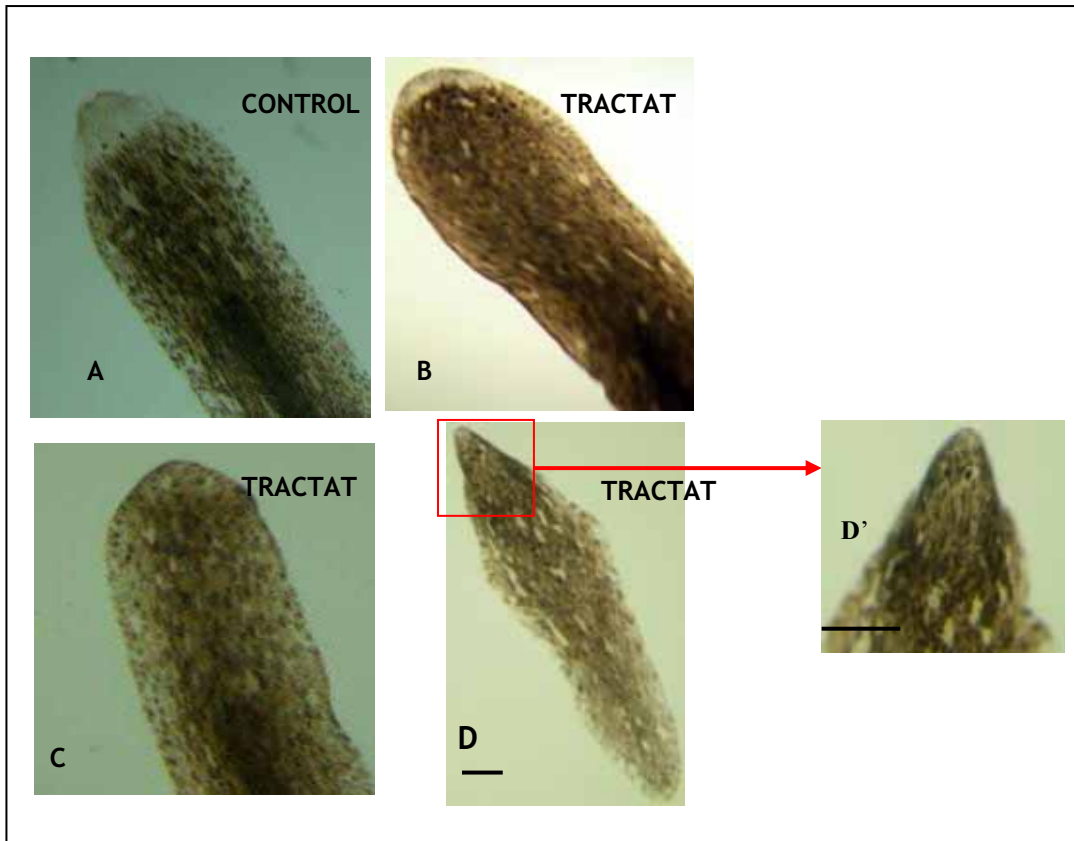


Figura 50. Recull d'alguns dels diferents fenotips obtinguts al llarg dels diversos experiments. Són organismes de 8d de regeneració. (A) fenotip de regeneració normal; (B) fenotip intermedi amb blastema però amb absència d'ulls; (C i D) fenotip intermedi de "cap sense blastema; (D') detall de D.

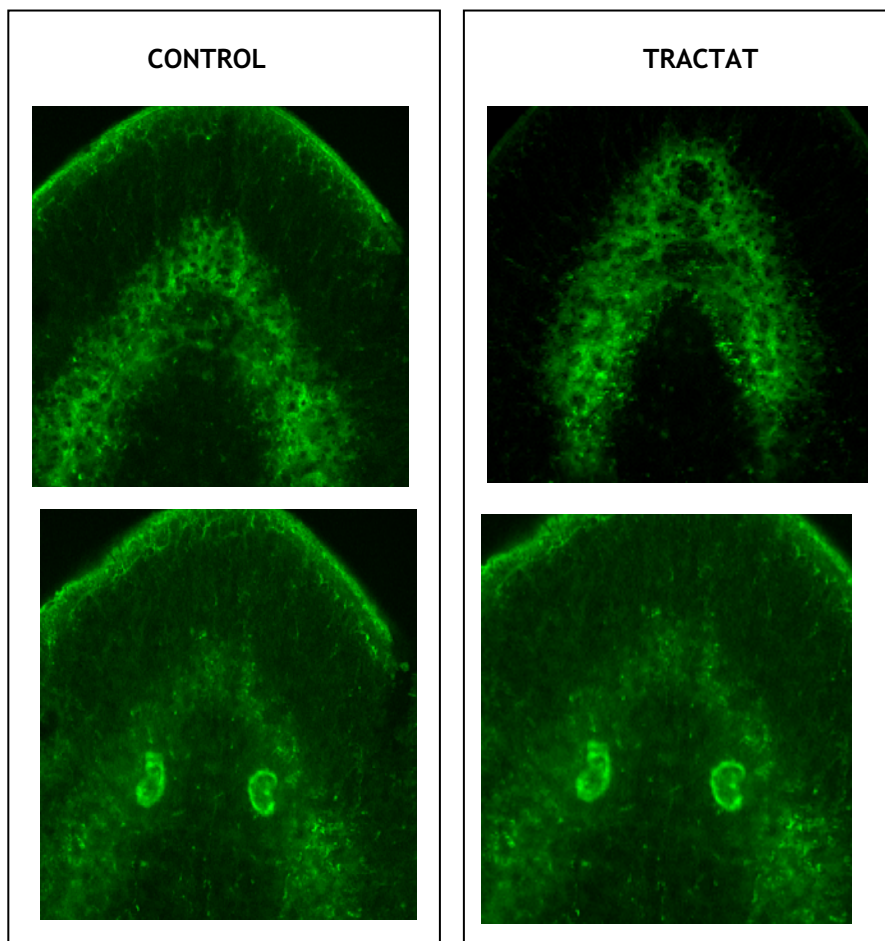


Figura 51. Immunotinció contra el pèptid FMRF-amida. Sèries d'imatges de microscopia confocal d'organisme control de 14 dies de regeneració a 19° de fenotip normal

Figura 52. Immunotinció contra el pèptid FMRF-amida. Sèries d'imatges de microscopia confocal d'organisme tractat amb Alp de 14 dies de regeneració a 19°, de fenotip "cap sense blastema"

2.2.4 *Anàlisi mitòtic amb tractament amb colchicina i tinció amb orceïna acètica*

Com hem vist, la inhibició de la quinasa GtGSK-3 ha donat lloc a un fenotip sense regeneració anterior, i sense regeneració posterior en alguns casos. En altres ocasions ha provocat un fenotip amb absència de blastema anterior tot i produir-se la regeneració del cap al postblastema. No sabem si això és degut a que els neoblasts (úniques cèl.lules proliferatives de la planària) no es divideixen o a que no poden migrar cap al lloc de la ferida. Amb aquest experiment volíem detectar les cèl.lules mitòtiques, i poder comparar possibles canvis en el nombre de cèl.lules en divisió en els individus controls respecte els individus on s'ha inhibit la GtGSK-3. La colchicina és un agent antimitòtic clàssic que actua inhibint el fus mitòtic i aturant per tant totes aquelles cèl.lules que entren en proliferació a la metafase. El tractament a realitzar amb l'alsterpaulona el vam fer sota unes condicions que afavorien l'aparició del fenotip intermedi "cap sense blastema" (pre-tractament fins el dia 0) en un dels grups, fenotip que presentava un blastema posterior de regeneració normal, mentre que per contra no es formava un blastema anterior regeneratiu. El segon grup tractat amb la droga va rebre un pre- i post-tractament, condicions que afavorien l'aparició de l'anomenat "fenotip fort", sense blastemes anterior ni posterior.

Vàrem treballar també amb un grup control de planàries de 2'5d de regeneració a 19°C (en individus de 3d regeneració a 17°C, se sap que hi ha un pic mitòtic important (Saló i Baguñá, 1984 a i b)), i amb els dos grups d'individus tractats amb alsterpaulona. Els talls s'havien realitzat a nivell pre i post-faríngic. Els animals es submergiren en aigua de planària amb 0.05% de colchicina (*Sigma*, nº catàleg C9754) a 19° (mirar apartat 7.1 de Materials i Mètodes). Es realitzaren estudis control previs d'incubació amb colchicina de 6, 12 i 24 hores, optant finalment per les 24 hores. Després doncs de la incubació amb colchicina durant 24 hores, les mitosis van ser observades amb el procediment Gomori, lleugerament modificat, com s'indica a l'apartat 7.2 de Materials i Mètodes. Ens centràrem en els post-blastemes de les cues regenerant cap i dels caps regenerant cua, deixant els troncs sense tinció, per observar-ne la regeneració.

El primer grup tractat amb alsterpaulona va rebre la droga durant els dies -2d i -1d i fins el dia 0 (grup "pre-"), en que van ser tallats pre- i post-faríngicament. El segon grup tractat amb Alp va rebre a més a més un post-tractament de dos dies (grup

RESULTATS I DISCUSSIÓ

“pre- i post-“). La concentració de la droga era de 10 μ M. Com hem avançat, tots tres grups es van incubar amb 0,05% de colchicina 24 hores a partir del dia 2’5 de regeneració.

Les mitosis observades van incloure principalment metafases a més d'alguna anafase i telofase. El comptatge es va fer amb doble cec: les diferents mostres varen ser comptades per dues persones diferents i que no coneixien el tractament rebut pels organismes. El total de mostres observades (caps o cues regenerants) va ser de 26, entre controls i tractats. Els resultats obtinguts revelen una diferència evident en el nombre de mitosis del grup control respecte els grups tractats amb alsterpaulona. Pel que fa a la comparació entre regeneració anterior (cues regenerant cap) i regeneració posterior (caps regenerant cues): l’afectació en la regeneració anterior és molt més important que en la regeneració posterior en el grup “pre-“. En canvi en el grup “pre- i post-“ hi ha una reducció dràstica de les mitosis en tots dos blastemes.

	CONTROL	Grup “pre-“ ALP 10 μ M	Grup “pre- i post” ALP 10 μ M
Reg.anterior	130,75 \pm 45,98	81,7 \pm 30,22	34,40 \pm 15,53
Reg.posterior	123,30 \pm 43,36	121,9 \pm 41,25	77,5 \pm 34,98

Taula 2. Promitjos de les mitosis observades per grup i en tots dos blastemes (anterior i posterior) després del tractament amb colchicina

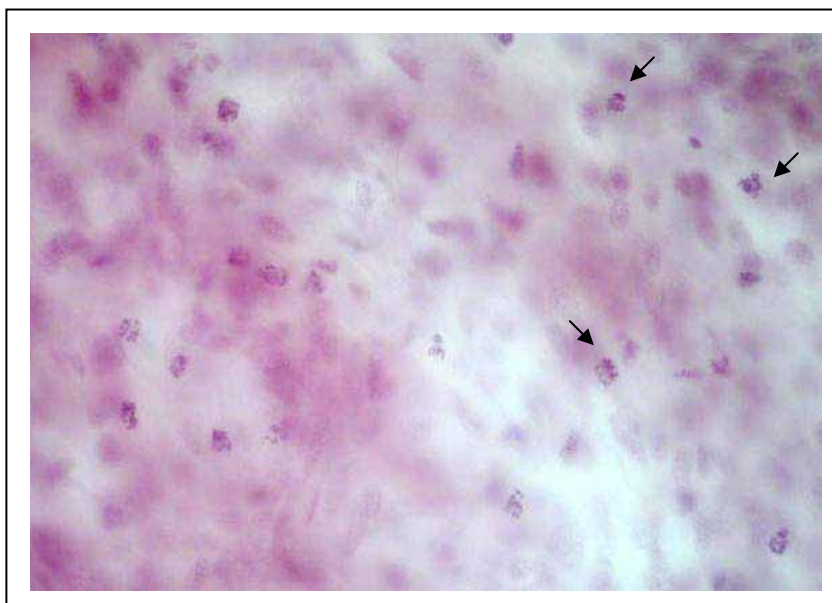


Figura 53. Imatge al microscopi amb objectiu de 40X. La tinció amb orceïna acètica permet observar mitosis després d'un tractament amb colchicina. Les fletxes negres assenyalen algunes de les mitosis.

2.2.5 Discussió sobre el paper de la GSK-3 en la diversitat dels fenotips obtinguts

Hi ha diferents mètodes per activar i detectar la senyalització Wnt. El primer mètode seria afegir proteïna Wnt, ja sigui en forma purificada (existeix un protocol per la purificació de proteïnes Wnt (Karl Willert: *Protocol for the Purification of Wnt Proteins*, pàgina Web dels Wnts) o com a medi condicionat. Existeixen diversos "reporter transgenes" que responen a senyals Wnt en animals intactes i que per tant reflecteixen la senyalització Wnt endògena. Aquests reporters es basen en un lloc multimèric d'unió per TCF. S'han descrit diferents línies transgèniques, a ratolí (Maretto *et al.*, 2003) i a peix zebra (Dorsky *et al.*, 2002; Hurlstone *et al.*, 2003).

Ara bé, si en un moment donat nosaltres volguéssim activar la senyalització Wnt en un sistema, hem de tenir en compte que la resposta a un determinat Wnt dependrà dels receptors expressats en aquell moment a la superfície cel·lular. A més cal considerar també que la majoria dels gens diana de la via Wnt són específics de tipus cel·lular i només activats a determinats teixits. Se sap que l'activació de la via es tradueix, en la majoria de les cèl·lules, en un increment dels nivells de β -catenina (la detecció es pot fer amb anticossos), també un increment en l'expressió de l'Axina2 (gen que es troba sota el control de la senyalització Wnt a molts teixits, es pot considerar una diana universal de Wnt), així com en una fosforilació de Dishevelled i de la cua del receptor LRP (Tamai *et al.*, 2004). El bloqueig d'alguns reguladors negatius de la via com l'Axina, l'APC o la GSK-3, així com la utilització del RNAi pels mateixos efectes, també activen la via. S'ha utilitzat amb èxit RNAi contra LRP/Arrow i contra Dishevelled, donant resultats exitosos per cèl·lules S2 de *Drosophila* (Matsubayashi *et al.*, 2004; Cong *et al.*, 2004) però també en cèl·lules de mamífer (Lu *et al.*, 2004).

En aquest treball, nosaltres hem optat per intentar induir una activació de la via de senyalització Wnt bloquejant la quinasa GSK-3. De fet, diferents estudis mostren com inhibir la GSK-3, el regulador negatiu clau de la via Wnt, suposa mimetitzar una superactivació de la via Wnt. A la literatura es troben descrits diferents fenotips resultants d'aquesta inhibició que descrivim a continuació: a nivell fenotípic i en el cas de *Xenopus* té lloc una duplicació axial (de la mateixa forma que quan se sobreexpressen alguns dels Wnts, si recordem l'apartat 1.2.4 de la Introducció) i una afectació dels destins D/V. Al peix zebra es produeix un fenotip sense ulls, l'anomenat mutant *masterblind* (*mbl*): la inhibició de la quinasa ja fos amb una sobreexpressió del

dominant negatiu *dnGSK-3 β* o amb tractament amb liti fenocopiava el mutant *mbl*, amb reducció o absència de telencèfal, vesícules òptiques i placodes olfactoris. La sobreexpressió de l'axina *axin1* (també la sobreexpressió de *GSK-3 β*) rescatava completament *mbl* demostrant que era aquest gen mutat el responsable del fenotip mutant. Diferents autors (van de Water *et al.*, 2001) proposen per tant que la funció de la proteïna Axin1/Mbl és antagonitzar la via Wnt i establir i mantenir el SNC més anterior. De fet, el tractament d'embrions de *Xenopus* i peix zebra amb liti després de la fase de MBT (mid blastula transition) produïa una posteriorització del SNC, de forma molt similar a la que s'indueix amb l'expressió ectòpica de Wnts (Fredieu *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1995). L'estudi d'un altre mutant de peix zebra, el mutant *headless* (Kim *et al.*, 2000) demostra com en aquest organisme l'activació ectòpica de la via Wnt bloqueja la formació del cap, mentre que els antagonistes de Wnt són inductors de cap (l'expressió ectòpica d'antagonistes de Wnt, com Cerberus o Dkkopfl reduïa el fenotip *hdl*). En aquest cas no es tracta de mutacions o inhibició de l'activitat de GSK-3 la que pot alterar la correcta formació del cap i del SNC, sinó que demostren que la funció d'altres elements de la via com l'activitat repressora de Headless/Tcf3 és també essencial per la correcta formació del cap. Mutacions en aquest factor de transcripció són les que donen lloc al nom del mutant *headless* que es caracteritza per una pèrdua completa dels ulls, cervell anterior i part del cervell mig. El fenotip està associat a la pèrdua d'un mecanisme que és essencial pel bloqueig i no l'activació de la senyalització Wnt. La repressió basal de gens diana de la via per part de Tcf3 durant la gastrulació inicial del peix zebra sembla essencial per permetre la repressió dels gens implicats en la formació del MHB (*mid hindbrain boundary*) i en canvi permetre l'activació de l'expressió dels gens responsables per la correcta formació del cervell anterior, els ulls i el cervell mig. Sembla doncs que en aquestes fases la via Wnt ha d'estar bloquejada per permetre el correcte inici de la formació del cap al peix zebra.

Com s'ha detallat al subapartat 2.2.2 de la discussió, vàrem emprar una droga específica per inhibir la quinasa GSK-3, de forma semblant al tractament utilitzat en un altre treball (Müller *et al.*, 2004) amb l'hidrozou *Hydractinia*. En aquest i altres estudis s'assumeix que la formació axial i el valor posicional es troben sota control de la via Wnt (Hobmayer *et al.*, 2000; Bode, 2003) i, per tant, és força temptador suposar que les accions observades de l'alsterpaulona són degudes a la seva capacitat per inhibir la GSK-3. L'alsterpaulona portaria a una activació dels gens diana del complex β -catenina/TCF, ja que, com sabem, la inhibició del regulador negatiu de la via, la GSK-3,

produeix una acumulació citosòlica de la β -catenina, que es translocaria al nucli i que, acomplexada amb els factors Tcf/Lef, activaria la transcripció de gens diana, és a dir, es mimetitzava una superactivació de la via Wnt. Fenotípicament, amb el tractament amb l'alsterpaulona els autors observen la inducció de la gemmació i la formació ectòpica de caps al llarg de la regió gàstrica. Se sap que a *Hydra*, la gemmació i la formació d'eixos emergents d'agregats va precedida de l'establiment de centres organitzadors del cap on Wnt i altres elements *downstream* de la via canònica s'expressen (Hobmayer *et al.*, 2000). A *Hydractinia* sembla ser que l'estimulació d'esdeveniments *downstream* de la cascada per la droga resulta en l'establiment d'àrees expressant Wnt, és a dir nous punts d'inici de la via al llarg de la columna dels pòlips. En conclusió proposen la possible existència d'un "feed-back loop" positiu, ja que l'activació de gens sota el control del complex β -catenina/TCF portaria a una nova producció i secreció de lligand Wnt, com s'il·lustra a la figura extreta del mateix article on també s'inclou la possible funció d'activadors de la quinasa PKC en el model (Holstein *et al.*, 2003) (figura 54).

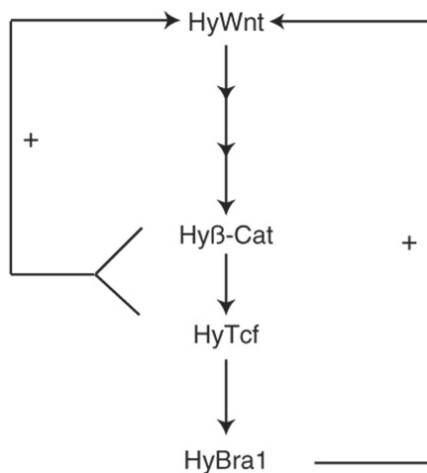


Figura 54. Model del putatiu *feedkback loop* positiu a *Hydra* en la senyalització Wnt. Evidències anteriors i comparacions amb vertebrats donen suport a la idea de que existeix una autoactivació de la via Wnt i un *feedback* entre HyWnt i el factor de transcripció HyBra1 implicats en l'establiment i manteniment de la cascada de senyalització de HyWnt (Holstein *et al.*, 2003)

Aquest establiment d'un "feed-back loop" positiu de Wnt també s'ha observat en el procés d'especificació de l'endomesoderm a l'embrió d'eriçó de mar (Davidson i Levine, 2003). Cada vegada hi ha més estudis que demostren que la senyalització Wnt pot promoure l'expressió de molts components de la cascada (TCF-1, LEF-1, diversos receptors Fz, entre d'altres), indicant que el control per *feedback* és un esdeveniment clau en la regulació de la via Wnt. De fet, també a *Drosophila* s'ha demostrat l'existència d'un lloc d'unió funcional per TCF al promotor de Wg (Van de Wetering *et al.*, 1997; Lessing i Nusse, 1998). Tornant al cas dels cnidaris, el que sembla que queda força clar és que la β -catenina i Tcf localitzats al llarg de la columna del cos dels pòlips

aporten valors posicionals necessaris pel re-establiment d'una font nova de mòlecules Wnt. Aquests efectes es produïen sempre i quan la dosi de droga i el temps d'incubació fossin els òptims, perquè una dosi superior semblava que suprimia la capacitat d'establir nous centres organitzadors i observaven una regressió dels caps, i els estolons no podien produir nous pòlips. A més, com hem esmentat al subapartat 2.2.2 l'alsterpaulona també és una potent inhibidora de moltes quinases dependents de ciclins (Schultz *et al.*, 1999; Leost *et al.*, 2000) i per això alguns efectes observats podrien ser deguts al bloqueig del cicle cel.lular de cèl.lules soca i altres cèl.lules derivades que s'estessin dividint.

Per altra banda, hem de fer altres consideracions en relació al tractament amb l'alsterpaulona. Hi ha diversos aspectes a tenir en compte. En primer lloc, hi ha evidències clares que a *Dictyostelium* i a *C.elegans* la fosforilació de la β -catenina per part de la GSK-3 l'activa enlloc de dirigir-la cap el procés de destrucció. Per comunicació personal sabem que a *Dictyostelium* poden existir més d'una β -catenina. I, curiosament, *C.elegans* en presenta tres, si recordem, que sembla que responen de forma diferent a la GSK-3; una s'activa, mentre que les altres dues són degradades en resposta a l'activitat de la quinasa. És a dir, a l'hora d'interpretar bé els resultats obtinguts amb la droga, cal tenir en compte: els possibles efectes colaterals pel fet de que la droga pugui tenir altres dianes; la possibilitat que existeixin a la planària més d'una β -catenina amb resposta diferent enfront la GSK-3.

Pel que fa al cas que ens ocupa, les immunes contra la FMRFamida d'organismes del fenotip intermedi "cap sense blastema" ens mostren que tots els individus tenen efectivament un cervell "comprimit" a la zona del post-blastema; podríem ser davant d'un cas en que el model epimòrfic-morfalàctic postulat per Saló i Baguñá i del que parlàvem a la Introducció no es compliria totalment. Si recordem, el model epimòrfic-morfalàctic exposat a l'apartat 2.2 de la Introducció proposa que "una primera etapa morfalàctica en la que s'estableix el patró seqüencialment en una estreta banda de teixit precedeix una fase epimòrfica on el patró s'expandeix i finalment es defineix". En primer lloc hauríem de dir que la definició dels termes "epimorfosi" i "morfalaxi" està encara sota debat. Una de les hipòtesis proposa que "epimorfosi" és equivalent a proliferació. Si fem cas de la definició d'aquesta manera, aquí semblaria que tot el procés regeneratiu que tenen aquests individus tractats amb alsterpaulona és preferentment morfalàctic i no epimòrfic: aparentment no hi ha formació de nou teixit: no es forma blastema, i, en canvi, té lloc una remodelació del teixit antic, que juntament amb el manteniment d'una activitat mitòtica basal permet reconstruir-hi les estructures

perdues, en aquest cas el cervell. Ara bé, és possible que es formi cervell sense proliferació cel.lular? Organismes irradiats amb raigs X (suprimint doncs tota capacitat proliferativa) i seguidament tallats formen un petit blastema transitori, gràcies a la presència de neoblasts pre-existents, que arriba a diferenciar-se correctament, abans de lissar per manca de cèl.lules de recanvi (Saló, 1984). Fins el moment, mai s'havia observat el fet que tant fotoreceptors com cervell es formaven sempre al blastema i aparentment mai a teixits preexistents, tot suggerint que certs processos cel.lulars capaços de produir determinats tipus cel.lulars o òrgans a l'adult requerien esdeveniments especialitzats d'epimorfosi (Reddien i Sánchez Alvarado, 2004). Si realment hi ha una reducció important de l'increment mitòtic en el nostre cas, hauríem trobat una excepció a aquesta regla amb el fenotip de “cap sense blastema”, que seria doncs principalment morfolàctic, com hem comentat anteriorment. La inactivació de la GSK-3 produeix una disminució dràstica de l'increment del nombre de cèl.lules proliferants que detectem a nivell del post-blastema. Els neoblasts han proliferat poc i el que ha succeït és que no han arribat a la massa crítica per migrar i formar el blastema anterior, però han sigut suficients per permetre la remodelació dels cordons nerviosos antics a ganglis cefàlics. És a dir, en el cas del fenotip “cap sense blastema” és possible que es produeixi la inhibició parcial de la proliferació però que no afecti a la determinació del neoblasts a fer cervell i per això pot aparèixer un nou cervell dins del postblastema per re-organització del teixit. En el cas de l'anomenat “fenotip fort” no es forma ni blastema ni cervell per manca de suficients noves cèl.lules per determinar-se en les estructures perdudes i per inhibició de la determinació de les estructures anteriors

Els experiments amb colchicina sota condicions de tractament amb Alp que afavorien l'aparició d'un fenotip amb regeneració posterior normal i regeneració anterior inexistent com el de “cap sense blastema” també confirmen que la reducció de les mitosis amb la droga no és igual al blastema anterior com al posterior. Es demostra doncs que en els individus de fenotip “cap sense blastema” la inactivació de la GSK-3 amb l'Alp produeix una disminució dràstica del pic mitòtic del post-blastema anterior, mentre que, la disminució d'aquestes mitosis a nivell del post-blastema posterior és molt menys dràstica.

També hem constatat que els individus que han estat tractats amb Alp, segons les condicions que provocaven l'aparició d'un “fenotip fort”, i que eren tallats per segon cop, recuperaven la capacitat regenerativa quan eren retornats a un medi sense droga. La generació d'una nova confrontació dorso-ventral i l'alliberament del bloqueig sobre la

RESULTATS I DISCUSSIÓ

GSK-3 permeten que tot estigui a punt per uns índex de proliferació i per les ordres de determinació cefàlica correctes.

Suposem que a l'alterar GSK-3 estem també alterant selectivament la via Wnt, aleshores: els nostres resultats suggereixen que per tal que una planària pugui regenerar el blastema anterior cal que unes cèl.lules mantinguin la GSK-3 **ON** (via Wnt **OFF**) just abans o en el moment de la inducció de la ferida (les 12 primeres hores). El fet de tenir la quinasa activa segurament no és tan necessari en etapes posteriors pel que fa a aquest procés perquè quan la incubació és posterior a la inducció de la regeneració no té efecte i dita regeneració és normal. O dit d'una altra forma, l'efecte no és dependent del nombre de dies que es realitzi sinó del moment en què es realitza. Per tant:

-Cal Wnt **OFF** per formar el cap durant l'inici del procés de la regeneració

-El temps d'inhibició de la via Wnt per permetre la formació del blastema anterior sembla coincidir amb les 12 primeres hores, igual al temps que s'estima per la determinació de cap (Saló, 1984). Com en altres models descrits una mica més amunt la via Wnt té un paper inhibidor en el procés de la determinació de la regió cefàlica durant les primeres fases de la regeneració anterior de planària. Cal la via Wnt **OFF** o en la seva activació mínima per la determinació de les estructures més anteriors.

-Un cop determinat el cap, aquest esdevé GSK-3 /Wnt-independent: organismes adults no mostren cap efecte a la incubació amb la droga excepte quan s'indueix la regeneració del cap.

Separadament al procés de formació de blastema hem de considerar l'aparició del fenotip "cap o cervell sense blastema". Hem de tractar els dos processos independentment perquè hem vist alguns casos en que no es forma blastema però tampoc cervell al post-blastema. Sembla que per tal que es pugui formar el cervell cal que necessàriament existeixi una finestra de temps en que certes cèl.lules hagin pogut tenir la quinasa **ON**, ja que si no s'atura mai el tractament no es forma blastema, però tampoc es forma el "cap o cervell sense blastema".

És però difícil acotar l'interval de temps on sí que algunes cèl.lules necessiten la GSK-3 **ON** (via Wnt **OFF**) per permetre la inducció del nou cervell, encara que sigui en un teixit antic.

El fenotip de "cap sense blastema" (on no hi ha formació de blastema anterior, però es dona la formació de cervell), s'obté amb una freqüència elevada quan s'allibera

la inhibició de la quinasa a partir de 12 hores del dia d0. L'aparició d'aquest nou fenotip posa en evidència l'existència de dos processos que poden deslligar-se l'un de l'altre;

El primer seria el **control de la proliferació cel.lular** dels neoblasts del post-blastema: els resultats exposats a l'apartat 2.2.4 indiquen que l'Alp provoca una inhibició del pic mitòtic característic del dia 3d de regeneració, tot i que les mitosis basals es mantenen. No podem afirmar amb certesa quin és el mecanisme molecular que provoca aquest resultat; l'obtenció de fenotips similars d'inhibició de regeneració anterior amb l'RNAi específic de GSK-3 és una prova a favor de que realment el fenotip és conseqüència de bloquejar l'activitat de la quinasa GSK-3, que al seu torn podria produir aquest efecte per mig d'altres quinases, ja que uns dels substrats de la GSK-3, com ja hem comentat, són CDKs (quinases depenents de ciclins, reguladores de la proliferació cel.lular). Per una altra banda, l'Alp també té la capacitat d'inhibir directament, sense fer-ho a través de la GSK-3, quinases reguladores del cicle cel.lular, però els resultats obtinguts a l'emprar RNAi de GSK-3 suporten la hipòtesi de que probablement estem bloquejant directament la GSK-3 i no altres quinases (l'activitat de les quals sí que podria estar alterada posteriorment, com a conseqüència). L'altra qüestió és, suposant que la GSK-3 està bloquejada, s'altera selectivament la via Wnt i podem doncs dir que és l'activació constitutiva de la via Wnt la que impedeix la sobreproliferació d'aquests neoblasts i, per tant, la formació del blastema anterior? La dada a favor d'aquesta hipòtesi és l'obtenció d'un fenotip on el blastema posterior es manté inalterat, regenera normal, mentre l'anterior no regenera: aquesta diferencialitat al llarg de l'eix A-P podria estar sota control de la via Wnt.

El segon procés, que sí que semblaria estar regit per la via Wnt, afectaria a la **determinació de la regió cefàlica**, durant les 0-12h inicials de la regeneració (fenomen molt primerenc, dada també recolçada per experiments previs (Saló, 1984) de transplantaments amb objectius d'inhibir la determinació cefàlica. Aquest tindria lloc immediatament després del primer procés i regularia selectivament la determinació dels neoblasts cap a cervell i la posterior inducció d'aquest cap a la resta d'estructures cefàliques. Com sabem, s'ha descrit aquesta funció repressora de la senyalització Wnt en la determinació cefàlica en altres models.

Tornant a la qüestió del blastema posterior, en el fenotip intermedi de "cap sense blastema" no està afectat ni pel que fa al creixement (corroborat amb el comptatge de mitosis) ni en la determinació ni diferenciació. Això podríem explicar-ho segons dues possibilitats: A) el blastema posterior creix i es determina més tardanament i en la

situació esmentada la droga no altera el mecanisme molecular regulador del cicle cel·lular i, B). Seguint els fenotips descrits per models de vertebrats la via Wnt estaria controlant, per repressió, la determinació exclusivament del blastema anterior. En canvi, l'obtenció dels fenotips on la regeneració de tots dos blastemes es veu bloquejada podrien ser resultat de l'efecte sobre les quinases reguladores del cicle cel·lular: la inhibició de la proliferació bloquejaria doncs la formació dels blastemes tant anterior com posterior, per mig d'una via diferent de la de Wnt.

En un individu salvatge per tant cal que a l'inici de la regeneració certes cèl·lules tinguin una GSK-3 activa per potser reprimir d'aquesta forma certs substrats o vies (potser la via Wnt) i així permetre primer l'activació de la proliferació de qualsevol blastema. En un altre interval de temps cal que altres cèl·lules (potser les mateixes) tinguin també la quinasa activa (o dit d'una altra forma: un balanç correcte de cèl·lules amb la quinasa **ON** i cèl·lules amb la quinasa **OFF**) per induir la formació del cervell. Aquests resultats recorden als obtinguts a peix zebra amb els mutants *masterblind* i *headless* esmentats anteriorment on es relacionen directament els efectes fenotípics observats amb una superactivació de la via Wnt. Així doncs, no seria tan agosarat afirmar que a les planàries el fet d'inhibir la GSK-3 i produir aquests fenotips també està en relació directa amb que la via Wnt està sent alterada. Per extensió al que deiem abans, doncs, l'equilibri en l'estat **ON/OFF** de la GSK-3 es tradueix també al mateix per la via Wnt que aleshores esdevé essencial perquè les planàries puguin regenerar el cap i induir la formació de cervell.

Tot això ens porta a suggerir que aleshores potser la via de senyalització Wnt, o com a mínim la GSK-3, es trobarien implicades en el *patterning* axial A-P a planària. Si recapitem, recordarem que un dels experiments més coneguts amb la via Wnt són els de duplicació axial a *Xenopus* amb que es va demostrar que alguns Wnt eren capaços de duplicar l'eix A-P i que diferents elements *downstream* de la via eren essencials per la formació de l'eix primari (Larabell *et al.*, 1997; Molenaar *et al.*, 1996). A vertebrats la via Wnt es troba implicada tant al *patterning* A-P com al D-V, però sembla que aquest segon paper dels Wnt seria una innovació dels vertebrats. En canvi, la funció en el *patterning* A-P ja existia a tunicats i a l'amfiox, mercès a la presència d'un centre organitzador posterior amb diverses molècules senyalitzadores entre les que s'inclourien els Wnts (Holland i Holland, 2001). No hi ha dubte tampoc del rol de la via Wnt en l'especificació axial a diferents cnidaris (Hobmayer *et al.*, 2000; Wikramanayake *et al.*, 2003; Holstein *et al.*, 2003) com ja hem discutit a l'apartat 1.2.7 de la Introducció, així

com anteriorment en aquest mateix apartat, ni de la funció a *Drosophila* de *wg* i *arm* com a gens de polaritat segmental (mutacions al gen *arm* afecten la part posterior del segment i produeixen estructures anteriors a aquesta regió).

Els nostres resultats indiquen que probablement la GSK-3 juga un paper en l'activació mitòtica inicial de la regeneració, en la formació de blastema anterior i en la inducció de cervell, però, tot i que donem per fet que el fenotip és també resultat de l'alteració de la via Wnt, no hem d'oblidar la participació que té la GSK-3 en molts altres processos. Com hem esmentat, una de les eines per testar si la via Wnt es troba afectada en els nostres casos particulars són els tests dels gens diana de la via Wnt canònica, resultats que comentarem a l'apartat 3.2 del Capítol III de Resultats i Discussió.

Calia però comparar els efectes produïts pels diferents compostos emprats, l'Alp, el SB-415286 i el liti, així com els vistos amb dsRNAGSK-3, ja que si observàvem les mateixes alteracions morfològiques seria un factor a favor a considerar que realment el que vèiem era resultat d'estar inhibint la GSK-3. De moment, el compost SB-415286 a una concentració 10µM, 25µM i 50 µM sota les mateixes condicions que les emprades per l'Alp, no ha provocat cap alteració durant la regeneració ni en individus intactes. Pel que fa als resultats fenotípics observats amb RNAi de GSK-3, tot i que menys dràstics, foren similars als obtinguts amb l'alsterpaulona (taula 1 de l'apartat 2.2.1); inhibint doncs l'enzim per RNAi i amb la droga alsterpaulona tenim resultats semblants, que inclouen en tots dos casos variabilitat, com ja sabem. El fenotip intermedi "cap sense blastema", però, sols es va obtenir amb el tractament amb la droga.

Ara bé, en principi, ja que aquesta quinasa no només està implicada a la via Wnt, el seu bloqueig podria tenir efectes molt pleiotròpics. Per exemple, la bibliografia esmenta funcions de la GSK-3 en proliferació, supervivència cel.lular i apoptosi. Sembla ser que nivells massa alts o massa baixos de GSK-3 poden produir mort cel.lular. També s'han trobat casos en que la GSK-3 és necessària per la correcta determinació neural de cèl.lules mare. Per tot això no seria estrany detectar a planària un possible fenotip de manca de proliferació cel.lular i regeneració anterior quan inhibim per RNAi o amb la droga Alp la quinasa GSK-3, o, el que és el mateix, quan mimetitzem una superactivació de la via Wnt. És a dir, a la planària estem observant fenotípicament un retardament o una impossibilitat total de regenerar la part anterior i, per tant, cervell i ulls (sobretot amb l'alsterpaulona que és inhibidor molt específic de la GSK-3). Ara bé, en primer lloc no podem assegurar que aquests efectes es produeixen

sota el contexte de la via Wnt o per desregulació d'altres substrats de la GSK-3 independents de la via. És a dir, és alhora important i difícil determinar si canvis en l'activitat d'aquesta quinasa estan sempre lligats a canvis en l'activitat de la β -catenina; la selectivitat s'aconsegueix segurament en base a les diferents interaccions proteiques específiques d'aquesta proteïna amb els altres components del complex destructor de la via canònica, per exemple. La GSK-3 pot regular selectivament diferents dianes seves *downstream* en funció de la via de senyalització activada, i per això pot ser que quan bloquegem la GSK-3 hi hagi diferents processos i vies alterades conseqüentment o potser també hi ha selectivitat i de vegades que s'alteri un procés no implica necessàriament que se n'alteri un altre. En segon lloc, la β -catenina en sí mateixa és diana de diferents senyals, per tant potser estaria actuant com integradora de la senyal Wnt però també d'altres senyals. En tercer lloc, un altre punt no resolt és la possible existència de diferents isoformes per la GSK-3 a planària.

Vam decidir emprar una segona eina: anticossos contra la β -catenina, per tal de detectar la translocació de la proteïna cap al nucli quan s'activa la via Wnt canònica. Suposant que la proteïna és molt conservada en l'evolució, vam decidir utilitzar anticossos contra la β -catenina de *Xenopus* i contra eriçó de mar cedits pel grup de Pierre D. McCrea (University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston Texas) i per McClay DR (DCMB Group, Department of Biology, Duke University, Durham, North Carolina), respectivament. Ara per ara, no hem tingut èxit amb les immunotincions, ja que possiblement els dos anticossos no reconeixen la β -catenina de *G.tigrina*.

Com a conclusió final d'aquest apartat 2.2 podríem dir que tot sembla indicar que l'Alp actua alterant específicament la proteïna GSK-3, ja que el seu ús origina fenotips similars als obtinguts amb l'RNAi de GSK-3. Organismes intactes o que han rebut un tractament amb Alp que comença més tard de les 12 hores de l'inici de la regeneració no presenten afectació al manteniment de l'eix A-P ni a la capacitat de regeneració inicial.

La inactivació de la GSK-3 ja sigui per RNAi o per tractament amb drogues afecta dos processos:

1-El control de l'activació de la resposta mitòtica a l'inici de la regeneració, segurament com a resultat d'alterar quinases relacionades amb ciclines (se sap que per exemple la GSK-3 fosforila la ciclina CD-1 necessària per les activitats de les CDK4 i CDK6)

2-El control de la determinació inicial anterior, durant les 12 primeres hores de regeneració, fenomen que s'inhibeix molt probablement quan la via Wnt està activa constitutivament (GSK-3 inhibida).

Concloure també amb dos punt més:

-en primer lloc, en alguns fenotips la regeneració del blastema posterior no queda afectada sota efecte de la inactivació de la GSK-3;

-en segon lloc, la inhibició anterior és irreversible i només es recupera al re-induir una regeneració anterior en un medi sense droga.

3. CONSERVACIÓ I EVOLUCIÓ DE LES VIES DE SENYALITZACIÓ A L'ESCALA FILOGENÈTICA. VIA WNT A PLANÀRIA.

3.1 Conservació i evolució de les vies de senyalització a l'escala filogenètica

La senyalització cèl.lula-cèl.lula és una característica pròpia de les formes de vida multicel.lulars, com són els animals, les plantes i els fongs, que van divergir fa uns 1.2 bil.lions d'anys des d'un ancestre comú que descendia d'un llinatge de formes de vida unicel.lulars. Una de les troballes més importants pel que fa a l'evolució de les vies de senyalització és que van aparèixer abans de l'origen dels bilaterals i que la duplicació gènica i la subseqüent divergència en les seqüències proteiques van ser importantíssimes per dita evolució. Els cnidaris i les esponges contenen també molts d'aquests sistemes de senyalització (membres de les vies Wnt, TGF- β , Hh, Notch i receptors nuclears); per contra, estudis en eucariotes unicel.lulars o plantes no han proporcionat evidències fins el moment de la presència de sistemes avançats de senyalització. Estudis en els coanoflagel.lats, considerats grup germà dels metazous, identificaren el primer receptor tirosina-quinasa fora dels metazous indicant per tant que l'evolució d'algunes molècules senyalitzadores precedí la multicel.lularitat.

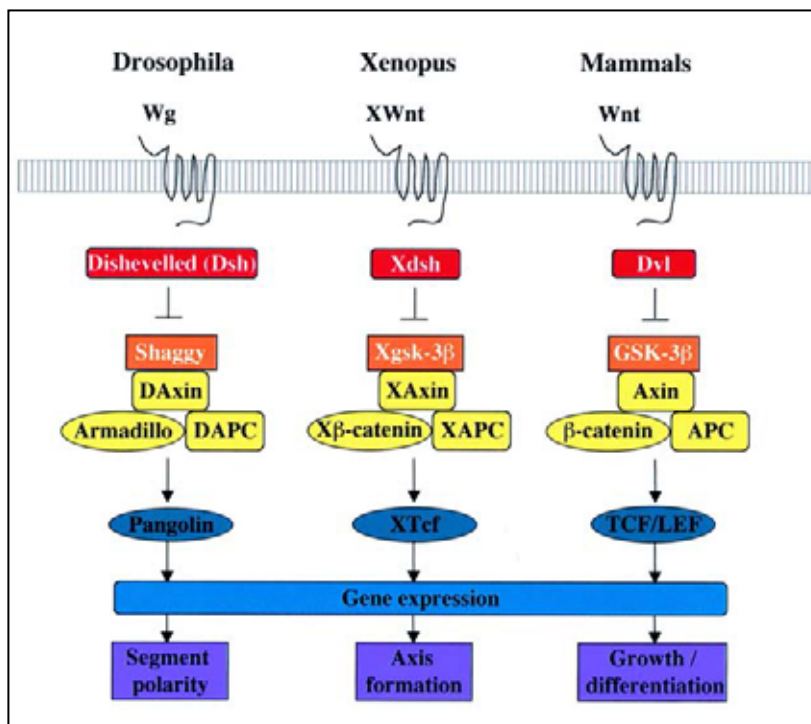


Figura 55. Conservació de la via Wnt a *Drosophila*, *Xenopus* i mamífers. Tret de Frame *et al.*, 2001

Ara bé, tot i que les vies de senyalització romanen pràcticament invariables pel que fa als seus components de transducció, ha augmentat el nombre de lligands i receptors en l'evolució, i la varietat de dianes de senyalització, així com la sofisticació de xarxes reguladores i circuits. Una de les limitacions en l'estudi de l'evolució dels sistemes de senyalització és que encara només disposem d'un nombre baix i dispar de seqüències gèniques de la majoria d'organismes de l'escala filogenètica i que moltes d'elles pertanyen a organismes model, com *Drosophila* o *C.elegans*, de vegades molt divergents. Per això la conveniència d'estudiar organismes que representin taxes claus en l'evolució dels metazous (Pires da-Silva i Sommer 2003). Aquest és un dels objectius del nostre treball, l'estudi d'una de les vies de senyalització, la via Wnt, en un filum, els Plathelminths, considerats fins fa poc el grup germà dels bilaterals i que representarien la transició de diblàstics a triblàstics, amb aparició de simetria bilateral i cefalització. De totes formes, la posició filogenètica acceptada actualment, basada en altres dades, els considera com un llinatge que apareix aviat dins la línia dels protòstoms (Carranza *et al.*, 1997; Aguinaldo *et al.*, 1997), i, com deiem ja a la Introducció, concretament a la base dels lofotrocozous. Això ens permet afegir que precisament el posicionament filogenètic dels organismes té importants conseqüències en com interpretar correctament l'evolució de les vies de senyalització.

Com es pot veure, és evident que tot i el baix nombre de vies de senyalització aquestes han de ser prou flexibles per permetre la generació de noves morfologies. Però aleshores, hi ha moltes qüestions que se'ns plantegen a l'hora de parlar dels sistemes de senyalització i de la seva evolució: existeix alguna correlació entre la complexitat de les vies de senyalització i els patrons corporals? És a dir, la complexitat d'un organisme pot ser deduïda simplement a partir del nombre de gens i de vies de senyalització presents al seu genoma? Sembla ser que no. En famílies de proteïnes com els Wnts, els TGF- β s i RTKs s'ha observat una gran expansió en els vertebrats respecte els invertebrats, per exemple, a l'humà s'han trobat 29 lligands amb dominis TGF- β , mentre que només se n'han vist 6 a *Drosophila* i 4 a *C.elegans*; però en altres casos succeeix el contrari: el genoma de *C.elegans* codifica per almenys 270 receptors d'hormones nuclears, mentre que només se n'han trobat 25 a *Drosophila* i 59 a humans. Però a tot això cal afegir que a l'hora de comparar genomes i proteïnes s'ha de tenir en compte que moltes d'aquestes contenen dos o més dominis que es poden combinar de maneres molt diverses segons la proteïna i l'organisme. I, de fet, molts dels elements dels sistemes de senyalització són proteïnes amb multi-dominis, com receptors transmembrana que presenten dominis

extracel.lulars d'unió als lligands i d'unió a inhibidors específics i dominis intracel.lulars implicats en la transducció de la senyal dins la cèl.lula (Pires da- Silva i Sommer 2003).

Signalling molecules	Species			
	Human	Fly	Worm	Yeast
Ligand				
RTK	48	3	4	0
TGF- β	29	6	4	0
Wnt	18	7	5	0
Notch	3	2	2	0
STAT	7	1	1	0
Receptor				
RTK	25	6	1	0
Wnt	12	6	5	0
NHR	59	25	270	1

NHR, nuclear hormone receptor; RTK, receptor tyrosine kinase; STAT, signal transducer and activator of transcription; TGF- β , transforming growth factor- β ; Wnt, wingless related. The table contains selected entries from REF. 44.

Taula 3. Molècules de senyalització a diferents organismes. Tret de Pires da-Silva i Sommer 2003

Pel que fa a la via Wnt, com s'ha comentat a la Introducció, és una de les cinc vies que predominen al desenvolupament embrioní primerenc, juntament amb les vies de TGF β , Hedgehog, RTK i Notch. Les planàries són organismes que podríem considerar en constant dinamisme com si talment es tractés d'embrions en continu canvi i remodelació del patró corporal. Això es deu a la seva plasticitat i a la seva capacitat de regeneració i substitució de les parts perdudes, ja sigui per la pròpia reproducció asexual per fissió o per amputació artificial. Sigui com sigui, l'interès recau en determinar si les vies utilitzades una vegada rera l'altra durant l'embriogènesi dels diferents organismes són també les que coordinen la correcta regeneració durant la vida de les planàries. Es poden doncs equiparar a aquest nivell d'utilització de vies de senyalització ambdós processos? Amb el present treball intentem fer una aportació en aquest sentit, tot procurant demostrar la implicació de la via Wnt, o almenys d'algun dels seus elements, en el procés de regeneració de les planàries.

Com ja hem comentat breument a la Introducció, elements de la via Wnt s'han trobat a organismes primitius duent a terme funcions essencials en el desenvolupament. Així a *Dictyostelium* l'homòleg de la GSK-3 anomenat Gsk-A controla la diferenciació cel.lular (Schilde *et al.*, 2004) i comparteix un 78% d'identitat de seqüència aminoacídica amb la GSK-3 β de mamífers (Harwood *et al.*, 1995). Hobmayer *et al.*, 2000, descriuen l'aïllament i caracterització al cnidari *Hydra* dels homòlegs d'un Wnt,

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Dishevelled, GSK-3, β -catenina i Tcf/Lef. Els autors demostren que existeix una conservació estructural, a nivell dels dominis d'interacció proteïna-proteïna, així com una conservació funcional (la sobreexpressió de Hy β -cat a blastòmers ventrals d'embrions de *Xenopus* en estadi de 8 cèl.lules produïa la formació d'un eix secundari), tot indicant que aquesta via de senyalització deu haver aparegut molt aviat en l'evolució.



Figura 56. Hy β -Cat (β -catenina d'*Hydra*) induïx un eix secundari a embrions de *Xenopus* (Hobmayer *et al.*, 2000)

Estudis amb un altre cnidari, *Nematostella vectensis* (Wikramanayake *et al.*, 2003), corroboren l'ancestralitat funcional de la β -catenina i de la via Wnt en sí, tot demostrant que la localització nuclear asimètrica de la β -catenina en embrions d'aquests organismes "pre-bilaterals" és essencial per la determinació axial i per l'especificació de l'endoderm. De la mateixa forma que en el cas que ens ocupa, les planàries, els cnidaris, en contrast amb els metazous més avançats (on la majoria de mecanismes de formació de patró succeeixen generalment només durant l'embriogènesi), són organismes que es troben en un estat constant de creixement i reemplaçament tissular. En tots dos tipus d'organismes, els processos que governen el patterning axial han d'estar contínuament activats per mantenir la forma de l'animal. Els patrons d'expressió espacials i temporals dels diferents components aïllats de la via Wnt a *Hydra* durant l'establiment de centres organitzadors en la regeneració del cap o en la formació de gemmes suggerien amb força que aquesta via senyalitzadora no només estava implicada en la formació axial a *Hydra* sinó que, a més, deuria constituir un mecanisme clau per l'evolució de la diferenciació dels eixos en els organismes pluricel.lulars. En el cas de cnidaris la seva gran capacitat de regeneració és mediada per cèl.lules soca epitelials i es basa en l'establiment d'un centre senyalitzador, un organitzador que secreta factors de creixement que actuen com a morfògens i que regulen la formació axial i la diferenciació cel.lular, com per exemple els Wnts (Holstein *et al.*, 2003). Per això els components d'aquestes vies de senyalització es troben activats durant la regeneració de *Hydra*, per exemple (troben també co-

localització de les expressions de TCF i de la β -catenina amb els “spots” de senyal de Wnt als organitzadors). Aquestes molècules identificades en la regeneració dels cnidaris actuen així mateix durant les etapes inicials de l’embriogènesi d’animals superiors també amb la formació de centres organitzadors que utilitzen els mateixos sets de gens, com l’organitzador d’Spemann. Segurament dites molècules es trobin al nucli de xarxes d’interaccions moleculars que són la base per explicar almenys algun dels mecanismes que permeten la regeneració de vertebrats també.

Per això és força temptador pensar que a planàries, organismes d’un dinamisme semblant als cnidaris, salvant les distàncies, és clar, la via Wnt, entre d’altres, podria ser funcionalment equiparable en aquest sentit, és a dir, ser també necessària per l’especificació axial en els processos de regeneració, habituals durant tota la vida d’aquests organismes. Les planàries poden regenerar com sabem a partir de múltiples trossets amputats del cos i ho fan mantenint la polaritat de l’eix A-P original. Per això d’aquesta forma a planàries la via Wnt seria un sistema candidat responsable de regular la formació dels eixos corporals. El resultat que nosaltres aportem amb aquest treball que principalment podria corroborar aquesta hipòtesi és la tanda d’experiments amb l’alsterpaulona, la droga inhibidora de la quinasa GSK-3, experiments que s’han detallat en anteriors apartats i que suggereixen que la inhibició de la via Wnt podria estar implicada en permetre la formació del cap. De fet, aquesta funció concreta de la via Wnt ja ha estat descrita a altres organismes, com a *Xenopus* o al peix zebra (mutants *headless* (Kim *et al.*, 2000) i *masterblind* (van de Water *et al.*, 2001) i experiments amb la mateixa droga han estat realitzats en cnidaris (Müller *et al.*, 2004) (mirar apartats 2.2.2 i 2.2.5). Per comunicació personal sabem que una *Hydra* regenerant tractada amb Alp presenta un retardament de la regeneració. El tractament amb Alp en una *Hydra* intacta indueix la gemmació i s’obtenen fenotips amb múltiples caps ectòpics quan la droga s’elimina. Això indica que la superactivació de la via Wnt (presència de la β -catenina de forma ubíqua) quan la GSK-3 està inactivada per la droga no permet la formació de nous punts d’inici d’eixos, però que quan la droga es treu, la gènesi de “pics” d’expressió de β -catenina a cnidaris, enlloc d’una expressió ubíqua, és el que permet que es generin els centres organitzadors axials. És a dir, a cnidaris, la gemmació i la formació del cap són accions precedides sempre per l’establiment de centres organitzadors on Wnt i altres elements *downstream* de la via canònica s’expressen (Hobmayer *et al.*, 2000). A planàries intactes durant el tractament amb Alp tampoc no detectem cap efecte aparent. Al treure-la tampoc creiem que es generin aquells “pics” de

β -catenina que hem comentat que es necessiten a cnidaris per establir els centres organitzadors de nous eixos, ja que en principi a planària l'inici de la formació d'un nou cap no necessita de la via Wnt activada. A l'hora de fer comparacions, però, també hem de tenir en compte que la regió oral dels cnidaris es considera la part posterior dels organismes bilaterals.

3.2 Nombre de gens i vies de senyalització Wnt a la planària. Via canònica o no-canònica? Interaccions entre *Gtwnt-5*, *GSK-3* i *engrailed* de planària

Drosophila és un dels primers casos on es va detectar una de les funcions d'un dels lligands Wnt; ja l'hem comentada a la Introducció i ens referim al paper de *wingless* (*wg*) com a gen de polaritat segmental. També s'ha esmentat l'existència d'un *loop* regulador que *wg* manté amb *engrailed*. A *Drosophila* a nivell de la cutícula larvària, s'estableix aquest *feedback loop* positiu on *en* és un gen diana de la via Wnt canònica on participa GSK-3, activada en aquest cas per Wg, homòleg dels Wnts-1 de vertebrats (figura 8 de la Introducció, Carroll *et al.*, 2001).

Ja sabem que quan un regulador negatiu de la via com la GSK-3 es bloqueja, hi ha una forta activació dels gens diana com *siamois*, *ubx* o *engrailed*. Per tant, la primera eina de la que disposem per testar aquesta hipòtesi són les RT-PCR de gens diana de la via. Sempre suposant una conservació de la via Wnt a planària, al fer dsRNAGtGSK-3 o amb el tractament amb Alp podríem observar també una activació del gen *engrailed* de planària. Un dels objectius generals del nostre treball és intentar averiguar si existeix com a tal, una via Wnt "canònica" també a planària. Preguntes que ens faríem tot seguit serien: hi ha més d'un lligand Wnt i, si és així, diferents receptors i diferents possibles vies de senyalització?

Engrailed ha estat clonat també a l'espècie *G.tigrina* per membres del nostre grup (Projecte final de carrera de Mette Handberg-Thorsager "Characterization of the Homeobox Gene *engrailed* in the planarian *Girardia tigrina*" de la Universitat de Copenhague en col.laboració amb la Universitat de Barcelona) i vam considerar

interessant detectar si els nivells d'aquest gen s'alteraven quan GtWnt-5 disminuïa. D'aquesta forma disposaríem d'una evidència indirecta de que GtWnt-5 podria estar utilitzant la via canònica, sota la qual sempre s'ha descrit *engrailed* com a gen diana. Segons això, els nivells d'*engrailed* també es veurien modificats a l'hora de produir RNAi de GSK-3, regulador de la via canònica per excel·lència. Per RT-PCR detectem en el nostre treball una putativa regulació entre GtWnt-5 i Engrailed, segons resultats que mostrem a continuació. També per una altra banda, per RT-PCR també detectem que els nivells d'*engrailed* estan incrementats a la planària quan inhibim GSK-3 per RNAi. Això és una demostració que recolça la possibilitat de que en aquest cas nostre en que estem bloquejant la GSK-3, les conseqüències es reflexen directament a la via Wnt (perquè *engrailed* en tot cas descrit fins el moment és sempre una diana de la via canònica), i de rebot és una evidència de que les planàries amb els fenotips de regeneració anterior inhibida tenen la via Wnt alterada. O, dit d'una altra forma, la via de senyalització Wnt a la planària participa en el procés de regeneració anterior, i funciona en l'especificació axial. Demostrem que quan disminueix el transcrit de *Gtwnt-5* hi ha també una reducció dels nivells d'*engrailed* i per tant podem dir que existeix un *loop* entre ells; ara bé, però no podem determinar ara per ara si és regulació de forma directa per la via canònica (com el *loop wg/en* a *Drosophila*) o bé es tracta d'un efecte indirecte. La dada de que quan els nivells de GSK-3 disminueixen, bé per RNAi o amb el tractament amb Alp, els nivells d'Engrailed incrementen, és un fet més que corrobora que Engrailed és sota la regulació de GSK-3 a la via Wnt canònica. Com que els nivells d'*engrailed* també es veuen afectats amb dsRNAGtWnt-5 tot sembla indicar que GtWnt-5 estaria emprant la via Wnt canònica.

Les RT-PCRs d'organismes injectats o alimentats amb dsRNAGWnt-5 ("i" injectat amb dsRNAGtWnt-5, a la figura 57) varen mostrar una reducció d'*engrailed* (mateixos cDNAs anteriors però fent RT-PCR d'*engrailed*, segons condicions descrites a Materials i Mètodes) Es realitzà també com sempre la RT-PCR control del gen *Dth2* tot i que no es mostren els resultats aquí.

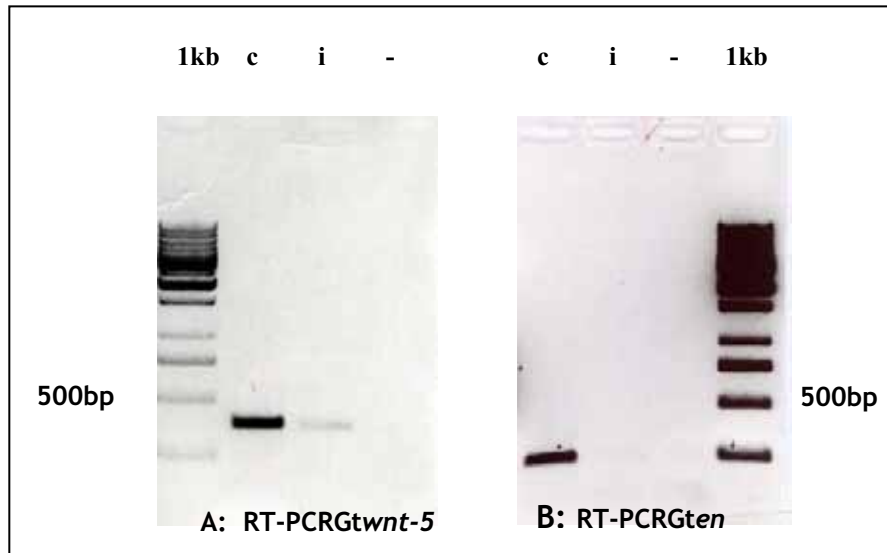


Figura 57. El gel A mostra el resultat d'una RT-PCR de 35 cicles de GtWnt-5, sent "c" un individu injectat amb H₂O i "i" un individu injectat amb dsRNAGtWnt-5. El gel B és la RT-PCR d'*engrailed* amb els mateixos cDNAS

Amb els cDNAs on es testava l'expressió de GSK-3, a continuació testàvem sempre els nivells d'*engrailed* per RT-PCR. Els individus injectats amb dsRNAGSK-3 presentaven el doble o més de transcrit d'*engrailed* que els individus control (figura 58). Cal tenir en compte que el grau d'inhibició de GSK-3 que aconseguíem amb les injeccions de dsRNA podria no ser suficient perquè proporcionalment detectéssim un canvi en els nivells d'*engrailed*. Val a dir que s'observà una variabilitat similar a la detectada en el fenotips de regenerants anteriors obtinguts amb la droga Alp i amb els mètodes de RNAi.

Segurament, però, molts contextes no tenen perquè complir la lineritat observada a nivell de la cutícula larvària de *Drosophila* pel que fa a la relació *wg/en*. En realitat, les deduccions respecte l'activació i inactivació de gens diana de les vies de senyalització poden ser arriscades, perquè en moltes situacions no són cascades linials, sinó xarxes on existeixen molts nivells d'embranchament.

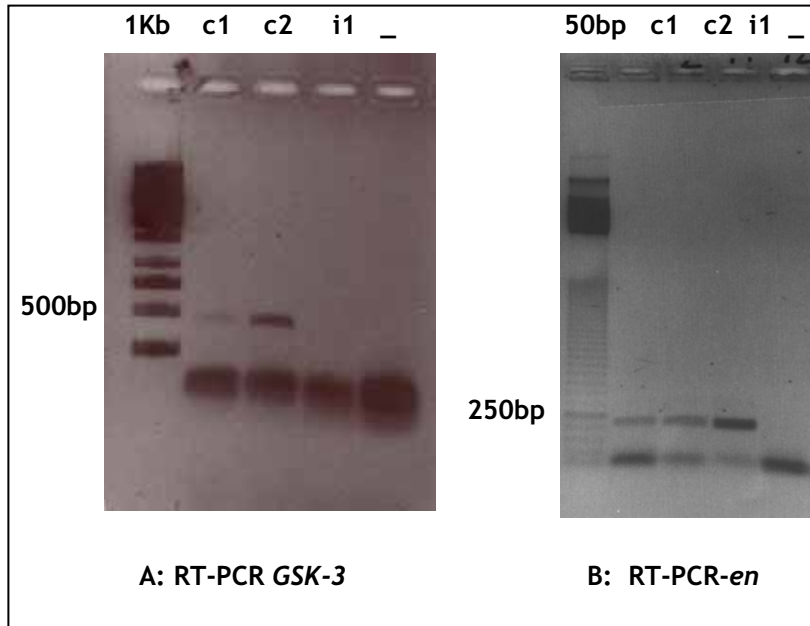


Figura 58. El gel A mostra la RT-PCR de *GSK-3* amb cDNAs control injectats amb H₂O (“c1 i c2”) i cDNAs injectat amb RNAi de *GSK-3* (“i1”), juntament amb el marcador 1Kb de pes molecular. El gel B mostra la RT-PCR d'*engrailed* amb els mateixos cDNAs, juntament amb el marcador de pes molecular 50bp.

Però suposem que el gen *engrailed* de *G.tigrina* es troba sota regulació de la *GSK-3* i, per tant, sota la regulació de la via Wnt canònica. Aleshores, *Wnt-5* a planàries està implicat a la via Wnt canònica enlloc d'una via Wnt no canònica segons s'ha descrit sempre a la literatura per la subclasse *Wnt-5*? Això ens porta a parlar del possible nombre de wnts i receptors Frizzled que poden tenir aquests organismes: Si donem una ullada a l'escala filogenètica tot fa pensar que als llinatges dels protostomats podria haver-se donat una pèrdua de membres de la família Wnt i que per tant la planària podria tenir un nombre menor tant de Wnts com de Frizzleds i que d'aquests una parella concreta formada per *Wnt-5* i un receptor activaria la via canònica per la qual està regulat *Engrailed*. Pot ser que s'hagi reduït el número i que hi hagi compartiment de funcions, p.ex. *Gtwnt-5* fer un dels rols de *wg* pel que fa a la regulació d'*engrailed*, quan clàssicament es considera *wg* com homòlegs dels *wnt-1* i no dels *wnt-5*. A més, la qüestió de l'adscripció dels *Wnt-5* a la subclasse de Wnts que utilitzen la via no canònica roman com a qüestió oberta, ja que aquest fet només s'ha descrit a vertebrats. En funció de la situació, del receptor, del numero de Wnts, pot ser els *Wnt-5* algun cop utilitzin la via canònica; potser depenent del tipus de receptor Frizzled disponible a la superfície cel.lular, per exemple.

De fet, aquesta és una de les qüestions que més interès suscita,

RESULTATS I DISCUSSIÓ

un cop s'ha donat la interacció lligandX-receptorY, què és el que passa a continuació?
Es contemplen entre d'altres diferents possibilitats:

- 1- Cada unió Wnt-Frizzled activa la mateixa cascada *downstream*: Dsh, GSK-3, B-catenina i proteïnes HMG box (proteïnes TCF/LEF)
- 2- Existeixen diferents cascades de senyalització *downstream* dels Frizzleds, però cada membre de la família Frizzled pot acoplar-se només a una d'aquestes vies. Si un Frizzled concret pot unir-se a diferents Wnts, s'activarà sempre la mateixa via per un Frizzled donat independentment de quin sigui el Wnt.
- 3- Existeixen diferents cascades de senyalització *downstream* dels Frizzleds i un determinat Frizzled pot acoplar-se a moltes d'aquestes cascades. Que se n'activi una o una altra depèn de quin Wnt s'ha unit al receptor.
- 4- Existeixen diferents cascades de senyalització *downstream* dels Frizzleds, però només una pot ser activada pels Wnts, mentre que les altres són independents de lligand o bé són activades per lligands diferents dels Wnts.

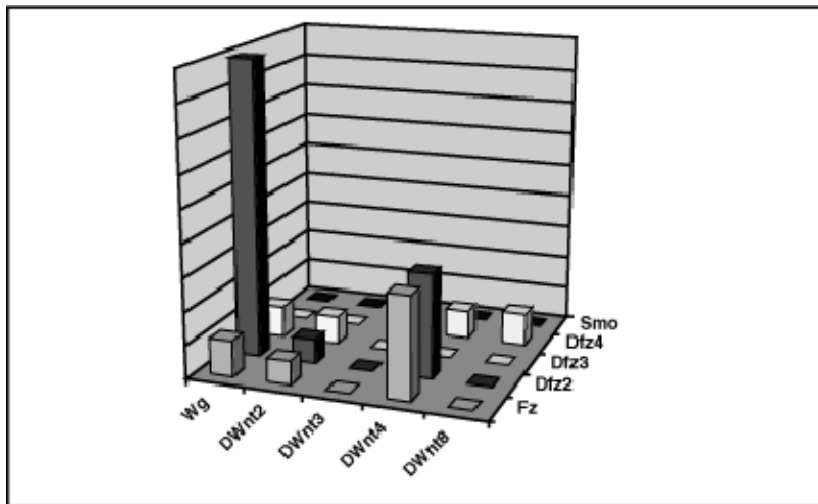


Figura 59. Dibuix que mostra la unió entre els Frizzled de *Drosophila* i els Wnts. Tret de Wu i Nusse 2002

A l'article Marsal *et. al.*, 2003 describim el clonatge i caracterització de GtWnt-5, i sabem, per comunicació personal, que Agata *et.al* han clonat un membre de la família diferent en seqüència del clonat pel nostre grup. Quan la base de dades de *Schmidtea Mediterranea*, en procés de realització, estigui completa, la cerca de membres d'aquesta família, així com la dels receptors Frizzled serà més ràpida i agilitzarà l'estudi d'aquestes molècules de senyalització, permetent alhora fer hipòtesis evolutives sobre aquestes famílies i les vies de senyalització que controlen. L'anàlisi *in*

silico de les 10⁷ seqüències accessibles de la base de dades de l'espècie de planària *Schmidtea mediterranea* no ha permès encara caracteritzar més elements de la via Wnt.

Per acabar, hi ha un factor a tenir en compte, el fet que els patrons d'expressió de GtWnt-5 i de GtGSK-3 segons els nostres resultats d'hibridacions *in situ whole-mount* se solapen en algunes cèl.lules del SNC a nivell dels ganglis cefàlics (figura 57). Això podria suggerir que almenys en aquestes cèl.lules del cervell totes dues proteïnes podrien estar participant a la mateixa via Wnt canònica en algunes etapes. És a dir, en aquest contexte, GtWnt-5 faria servir la via canònica, tot i que no es descarta que en altres contextes i en funció dels receptors disponibles pugui emprar una via diferent. Teòricament, però, hem de recordar que els Wnts són proteïnes de senyalització secretables i, per tant, els patrons d'expressió de GtWnt-5 i GtGSK-3 podrien divergir una mica l'un de l'altre.

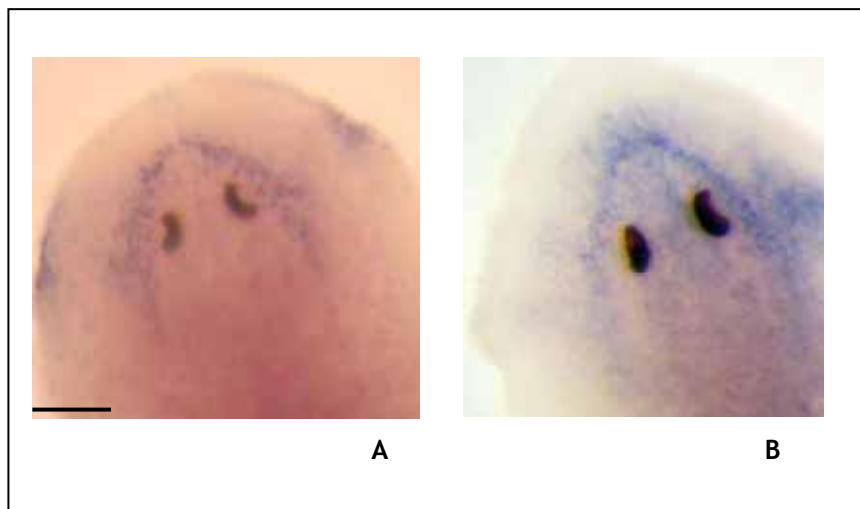


Figura 60. Hibridacions *in situ whole-mount* sobre organismes intactes. A: GtWnt-5 i B:GtGSK-3. En ambdós casos la senyal es detecta en una franja de cèl.lules a la part externa dels ganglis cefàlics, ocupant una àrea més ampla en el cas de GtWnt-5. Esc.barres 0,5mm

A partir d'aquests resultats i dels descrits en anteriors apartats podem suggerir algunes de les implicacions de la via Wnt a nivell cefàlic en el cas de planàries:

1-El control de l'increment proliferatiu cel.lular en el post-blastema anterior i de la determinació cefàlica (tots dos processos definits durant les etapes més primerenques de la regeneració). El transcrit de GtWnt-5 apareix més tard, i per tant, possiblement,

aquest gen no participa en aquestes fases, tot això deduït no sols a partir del patró d'expressió sinó a partir del fet que la seva manca no provoca un impediment d'una regeneració normal. Per altra banda, en tot cas la via Wnt que participés en aquest contexte hauria d'estar **OFF** segons els nostres resultats relacionats amb els fenotips de manca de funció de GSK-3.

Dits fenotips suggereixen en canvi un paper d'aquesta quinasa, via Wnt o via diferent, en la regeneració anterior pel que fa a la determinació cefàlica i potser també a la proliferació de neoblasts per produir el creixement del blastema. Encara que per hibridació *in situ whole-mount* no es detecti GSK-3 en els primers estadis de regeneració (apartat 1.3 de Resultats i Discussió), i que quan es detecta només sigui a nivell dels ganglis cefàlics, la sensibilitat de la RT-PCR ens ha permès detectar el transcrit en caps, troncs i cues i en els blastemes de regeneració més primerenca.

Per tant, es tractaria d'un enzim ubíquo que a nivells basals podria ja exercir les funcions proposades.

2-Organogènesi i manteniment del cervell i del SNC. Més tard en el temps durant el procés de regeneració es detecten tots dos transcrits, per tant tots dos podrien funcionar en l'organogènesi i en el manteniment dels ganglis cefàlics. Quan el tractament amb Alp es comença més tard de les 12 primeres hores de regeneració el procés és normal i quan és realitzat sobre individus intactes tampoc no produeix efecte. Les funcions de la GSK-3 que hem suggerit sobre el control anterior tenen lloc en estadis molt primerencs; 12 hores més tard de la inducció de la regeneració o en individus intactes aquests rols no es necessiten. Ara bé, aquesta quinasa té funcions que van més enllà de la regulació negativa sobre la via Wnt, regula molts substrats i probablement moltes decisions apart del control sobre la regeneració i manteniment dels ganglis. A una determinada dosi de la droga pot ser que encara hi hagi certa activitat enzimàtica suficient perquè certes funcions es mantinguin inalterades i per això no veiem cap anormalitat. Com que detectem el transcrit de GtGSK-3 en etapes més avançades de la regeneració i en individus intactes, suggerim que la GSK-3 té funció organitzadora i de manteniment dels ganglis i que pot ser que l'activitat necessària de l'enzim per dur-les a terme sigui petita i el tractament amb l'Alp no afecti aquest *pool* d'enzim.

Les conclusions d'aquest treball són:

- La via de proteïnes senyalitzadores Wnt existeix a planària, almenys pel que fa a un dels lligands (GtWnt-5), al regulador negatiu de la via Wnt canònica (GtGSK-3) i a l'efector nuclear (GtTCF)
- Amb GtWnt-5 s'ha identificat doncs la primera molècula Wnt a Platihelminths i el primer membre de la subclasse Wnt-5 a lofotrocozoous
- GtWnt-5 és un marcador del SNC, ganglis cefàlics i cordons nerviosos ventrals, així com dels sensors de la perifèria de l'organisme. En individus intactes es presenta en forma d'un patró iteratiu a nivell dels ganglis cefàlics, i segons un gradient que deixa les neurones de la part interna negatives per la senyal. Es tracta d'un gen d'estadis intermedis de regeneració, amb una implicació funcional més en l'organització i manteniment del SNC que no amb els fenòmens d'inducció i determinació cefàlica de les primeres fases.
- La inhibició per RNA d'interferència funciona tant amb el mètode de microinjecció com amb el de la ingesta de bacteries HT115 productores del dsRNA del gen d'interès.
- La manca d'expressió de GtWnt-5 després de la utilització del seu RNAi específic ha estat demostrada per anàlisi amb RT-PCR i per hibridacions *in situ whole-mount*. La manca de funció de GtWnt-5 no provoca ni canvis de comportament en els organismes, ni cap alteració detectable en l'estructura del SNC. Tampoc no detectem diferències en el volum dels ganglis cefàlics. La regeneració d'aquests organismes és un procés normal. Per tant, hipotetitzem un possible fenomen de redundància amb altres gens.
- La seqüència de l'homòleg de la quinasa GSK-3 a planària presenta una inserció de 130bp no trobada en els demés organismes analitzats.
- El transcrit de GtGSK-3 es detecta per *in situ whole-mount* a nivell dels ganglis cefàlics en individus regenerants i intactes, però per RT-PCR comprovem que és present al llarg de l'eix A-P. L'expressió en intactes es restringeix a les cèl·lules més perifèriques dels ganglis cefàlics.
- Ambdós mètodes de RNAi han demostrat per RT-PCR que els nivells de transcrit de GtGSK-3 eren pràcticament inexistents. La pèrdua de funció de

CONCLUSIONS

GtGSK-3 s'ha traduït en un fenotip de regeneració anterior anormal amb variabilitat fenotípica

- La utilització de la droga Alsterpaulona com a inactivadora de la GSK-3 ha donat lloc a fenotips de regeneració similars als obtinguts amb la tècnica de RNAi. En funció de les condicions temporals i de dosi del tractament observem percentatges variables de diferents fenotips. N'apareixen essencialment dos: “fenotip fort” (absència de blastemes anterior i posterior) i fenotip intermedi “cap sense blastema” (formació d'un cervell al post-blastema sense prèvia formació de blastema anterior), amb un cervell més comprimit espacialment i retardat temporalment. El pic mitòtic característic de l'estadi de 2'5 d de regeneració es veu dràsticament reduït en tots dos blastemes del "fenotip fort", així com en el blastema anterior del fenotip "cap sense blastema". Per tant, el tractament amb Alp afecta dos processos: 1-El control de l'activació de la resposta mitòtica a l'inici de la regeneració, probablement com a resultat d'alterar quinases relacionades amb ciclines o a través de la GSK-3, i 2-El control de la determinació inicial anterior, durant les 12 primeres hores de regeneració, fenomen que s'inhibeix molt possiblement quan la via Wnt està activa constitutivament (GSK-3 inhibida).
- En el fenotip intermedi de “cap sense blastema” el blastema posterior no està afectat ni pel que fa al creixement ni en la determinació ni diferenciació. Possiblement la via Wnt estaria controlant, per repressió, la determinació exclusivament del blastema anterior seguint els fenotips descrits per models de vertebrats. En canvi, l'obtenció dels fenotips on la regeneració de tots dos blastemes es veu bloquejada podrien ser resultat de l'efecte sobre les quinases reguladores del cicle cel.lular
- La co-localització dels transcrits de GtWnt-5 i GtGSK-3 en algunes cèl.lules dels ganglis cefàlics indica una possible utilització de la via Wnt canònica per part de GtWnt-5 almenys en aquest contexte espacial i temporal en que tots dos gens exercirien un paper en l'organogènesi i manteniment dels ganglis cefàlics.
- Per RT-PCR detectem a planària un *loop* regulador entre GtWnt-5 i *Gtengrailed*, fet que recolçaria la hipòtesi anterior, ja que sempre s'ha classificat *engrailed* com a gen diana de la via canònica.

- Suggestim una funció reguladora per repressió de la via Wnt sobre aquests processos de la regeneració cefàlica a planària, sobretot pel que fa al procés de determinació del cervell. La implicació de la GSK-3 en funcions més enllà de la regulació de la via Wnt ens fan preguntar perquè no veiem una alteració fenotípica més extesa. Probablement, el motiu sigui que a una determinada dosi de la droga pot ser que encara hi hagi certa activitat enzimàtica suficient perquè certes funcions es mantinguin inalterades. Aquesta pot ser també l'explicació de perquè tampoc no veiem cap anormalitat en els individus intactes tractats amb alsterpaulona

CONCLUSIONS

From this work we conclude :

- There is a Wnt signalling pathway in planarians, at least from what we can deduce after isolation of : a Wnt ligand (GtWnt-5), the negative regulator of the Wnt canonical pathway (GtGSK-3) and one member of the nuclear effectors (GtTCF)
- GtWnt-5 is the first Wnt molecule found so far in Plathihelminths and the first member of the Wnt-5 subclass identified in the Lofotrocozoan clade.
- GtWnt-5 is a new neural marker of planarian CNS. It is found in cephalic ganglia and ventral nerve cords, as well as in the sensors all around the periphery of the organism. In intact organisms the signal forms an iterative pattern at the level of cephalic ganglia, in a gradient shape distribution. The inner neurons remain negative. It is a gene of intermediate regenerative stages and it probably has a role in organization and maintenance of CNS more than in induction and cephalic determination of earlier stages.
- Inhibition by RNA interference has worked with both microinjection and ingestion of bacterially expressed dsRNA methodologies.
- The lack of expression of GtWnt-5 after specific RNAi inhibition has been demonstrated both with RT-PCR analysis and with whole-mount *in situ* hybridizations. GtWnt-5 loss of function produced no changes in the behaviour of organisms, and no detectable alteration in CNS structure. We did not observe changes in the size of cephalic ganglia either. Regeneration in these organisms is a normal process. We hypothesize a redundancy phenomena of *Gtwnt-5* with other genes.
- *Gtgsk-3* sequence contains a 130bp insertion when compared with ortholog genes from other species.
- *Gtgsk-3* transcript is detected by *in situ whole-mount* at the level of the cephalic ganglia in intact and regenerant planarians. However, RT-PCRs show its presence throughout the A-P axis. Expression in intact organisms is restricted to the most peripheral cells of the cephalic ganglia.
- Both RNAi methodologies have demonstrated a practically total absence of *Gtgsk-3* transcripts by RT-PCR. Loss of function of GtGSK-3 produces variable phenotypes with altered anterior regeneration.

- The use of the drug Alsterpaullone as an inhibitor of GSK-3 produced similar phenotypes to those obtained by RNAi methods. Depending on the time of treatment and the dose of the drug, we observed variable percentages of the different phenotypes. Two main types appeared: a “strong phenotype” (absence of both anterior and posterior blastema) and an intermediate phenotype “head without blastema” (appearance of a new brain at the post-blastema level without previous formation of the anterior blastema), with a most constrained and slower-regenerating brain than control brains. The characteristic mitotic peak that takes place at 2,5d of regeneration in normal organisms is drastically reduced in both blastemas of organisms of the “strong phenotype”. Mitosis in the anterior blastema of organisms of “head without blastema” phenotype are also reduced. Therefore, the Alp treatment affects two processes: 1-The control of the activation of the mitotic response at the very beginning of regeneration, probably as a result of directly altering cyclin-dependent kinases or, through GSK-3, and 2-The control of the early anterior determination, during the 12 first hours of regeneration. This phenomenon is probably inhibited when the Wnt pathway is constitutively active (GSK-3 inactive)
- In the “head without blastema” phenotype, the posterior blastema is not affected neither in growth nor in determination or differentiation. Probably, the Wnt pathway is negatively controlling only the determination of the anterior blastema, according to the already known phenotypes found in vertebrate models. On the contrary, the presence of phenotypes where regeneration of both blastemas is blocked can be the consequence of an effect on kinases that regulate the cell cycle.
- Co-localization of *Gtwnt-5* and *Gtgsk-3* transcripts in some cells of the cephalic ganglia suggests that *GtWnt-5* might be using the Wnt canonical pathway at least in this context where both genes could be controlling the organogenesis and the maintenance of the cephalic ganglia.
- By RT-PCR a regulatory *loop* between *Gtwnt-5* and *Gtengrailed* is detected in planarians. This fact would support the previous hypothesis, since *engrailed* has always been classified as a target gene of the Wnt canonical pathway
- We suggest that the Wnt pathway in the processes of cephalic regeneration in planarians is taking a regulatory function by repression, basically on the process

CONCLUSIONS

of brain determination. However, the involvement of GSK-3 in a wide broad of processes besides of the Wnt pathway makes us wander why we don't see a more pleiotropic affectation. The reason could be that at a certain dose of drug some GSK-3 activity is left and this amount might be enough to maintain some of the functions in a correct state. This reason could also be used to explain why no abnormality is seen in intact organisms under Alp treatment.

-Es continuarà amb la cerca tant de més lligands Wnt com dels diferents elements *upstream* i *downstream* de la via, amb l'ajuda de la base de dades de *Schmidtea Mediterranea* que, ara per ara, conté 10^7 seqüències accessibles. La troballa de més proteïnes Wnt permetrà fer comparacions a nivell evolutiu i establir si les planàries contenen en el seu genoma representants de les diferents subfamílies Wnt o si per contra n'han perdut algun al llarg de l'evolució. La cerca dels receptors Frizzled permetria fer estudis d'especificitat lligand-receptor.

-L'aïllament dels diferents efectors citosòlics activadors de la via com Dishevelled o dels negatius com l'Axina o l'APC donarien molt joc, ja que de la mateixa forma que amb GSK-3, podríem activar o inhibir artificialment la via i estudiar-ne les seves conseqüències.

- Sota una senyal Wnt, s'acumula la β -catenina al citosol i es transloca al nucli. Quan injectem dsRNA_{wnt-5}, aquelles cèl.lules que normalment es troben sota aquesta senyalització haurien de presentar uns nivells de β -catenina citosòlica i nuclear baixos, respecte a la situació de senyalització. Els individus amb la GSK-3 inhibida, per un mètode o un altre, haurien de tenir la via Wnt súper-activada i, per tant, uns nivells citosòlics i nuclears de β -catenina incrementats. El clonatge del gen ortòleg de la β -catenina a planària i la producció d'anticòs contra la proteïna de fusió codificada per aquest gen ens permetrà la realització d'immunotincions en individus injectats amb dsRNA_{Gtwnt-5} i individus injectats amb dsRNA_{Gtgsk-3} (o tractats amb alsterpaulona). D'aquesta forma es podria detectar si existeix o no translocació nuclear de la β -catenina. Així es podria inferir si la via Wnt està sent inactivada en un cas i activada en l'altre.

-Si podem posar a punt la transgènesi a planària en un futur, podríem sobreexpressar la β -catenina. Si això mimetitzés el fenotip obtingut amb l'Alp tindríem una demostració de que amb la droga realment estem afectant la via Wnt.

-L'experiment oposat, és a dir, la utilització de RNAi de la β -catenina hauria de bloquejar els fenotips obtinguts amb Alp i amb RNAi de Gtgsk-3.

-Per assegurar encara amb més força que els fenotips obtinguts amb l'Alp són resultat de la inhibició de GtGSK-3, hauríem d'obtenir fenotips similars no només amb RNAi de GtGSK-3 sinó amb el liti (amb condicions optimitzades per evitar la mort dels organismes com fins ara), amb el compost SB-415286 (també un cop trobades les condicions òptimes), i amb altres drogues catalogades com inactivadores de la quinasa GSK-3.

- Segons els nostres resultats sembla que el fenotip de no determinació cefàlica és degut a una inhibició de la GSK-3 i que el de proliferació disminuïda és degut a una inhibició de CDKs. D'ara en endavant podem fer dues coses; en primer lloc, utilitzar com a control de inhibició de CDKs la roscovitina que és una droga que inhibeix les CDKs pero no la GSK3. En segon lloc, podríem testar l'acció d'un inhibidor de la GSK-3 que en canvi no actui sobre les CDKs, com per exemple l'inhibidor AR-A014418 (Calbiochem) (comunicació personal Bayascas, J.R).

-El fenotip "cap sense blastema" mereix un estudi més a fons. La utilització de diferents marcadors neurals en hibridacions *in situ* i immunotincions permetria conèixer amb més detall com és el cervell format *de novo* al post-blastema d'aquests individus. Així mateix seria interessant conèixer com queda afectada la taxa de mort cel.lular comparat amb un organisme control; amb aquest fi es podria utilitzar la ribosonda del gen DAP, marcador d'apoptosi (González *et al.*, en preparació).

-Es podrien realitzar experiments de transplant de peces d'organismes tractats amb Alp en organismes control i fer un seguiment de la regeneració i observar si hi ha un increment o disminució del nombre de regions cefàliques induïdes.

-Cal completar la seqüència de GtTCF, dissenyar una ribosonda per fer un anàlisi de l'expressió per hibridació *in situ* i estudiar el fenotip per manca de funció amb RNAi d'aquest gen. Si l'expressió co-localitza amb les de GtWnt-5 i GtGSK-3 a nivell dels ganglis cefàlics seria una nova suggerència de que GtWnt-5 en aquest contexte utilitza la via Wnt canònica.

-Cal identificar a planària més gens catalogats com a gens diana de la via Wnt canònica. L'estudi de la seva expressió i les RT-PCR poden permetre relacionar-los GtWnt-5 i inferir així si aquest gen utilitza la via Wnt canònica.

A

- Adler, P. N. and Lee, H.** (2001). Frizzled signaling and cell-cell interactions in planar polarity. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 635-40.
- Agata, K.** (2003). Regeneration and gene regulation in planarians. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 492-6.
- Aguinaldo, A., Turbeville, J., Linford, L., Rivera, M., Garey, J., Raff, R. and Lake, J.** (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* **387**, 489-493.
- Ali, A., Hoeflich, KP., Woodgett, JR.** (2001) Glycogen Syntase Kinase-3: Properties, Functions and Regulation *Chem.Rev.*, **101** (8), 2527-2540
- Amador, V., Monte, E., Garcia-Martinez, J. L. and Prat, S.** (2001). Gibberellins signal nuclear import of PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to *Drosophila armadillo*. *Cell* **106**, 343-54.
- Arnold, S. J., Stappert, J., Bauer, A., Kispert, A., Herrmann, B. G. and Kemler, R.** (2000). Brachyury is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mech Dev* **91**, 249-58.
- Auladell, C., García-Valero, J., Baguñà J.** (1993). Ultrastructural Localization of RNA in Chromatid Bodies of Undifferentiated Cells (Neoblasts) in Planarians by the Rnase-Gold Complex Technique. *Journal of morphology* **216**, 319-326
- Axelrod, J. D., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S. and Perrimon, N.** (1996). Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. *Science* **271**, 1826-32.

B

- Baguñà, J., Ballester, R.** (1978). The Nervous System in Planarians: Peripheral and Gastrodermal Plexuses, Pharynx innervation, and the Relationship between Central Nervous System Structure and the Acoelomate Organization. *J. Morph* **155**, 237-252.
- Baguñà, J.** (1981). Planarian neoblasts. *Nature* **290**, 14-15.
- Baguñà, J.** (1998). Planarians. In *Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans*, (ed. P. Ferretti and J. Géraudie), pp. 135-165. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Baguñà, J., Saló, E. and Auladell, C.** (1989). 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., Romero, R., Garcia-Fernández, J., Bueno, D., Muñoz-Mármol, A. M., Bayascas-Ramírez, J. R. and Casali, A.** (1994). Regeneration and pattern formation in planarians: cells, molecules and genes. *Zool. Sci.* **11**, 781-795.
- Bayascas-Ramírez, J. R.** (1997) Estudi comparatiu de gens reguladors del desenvolupament: caracterització de gens amb homeobox del complex Hox i de la família Otx a planàries. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.

BIBLIOGRAFIA

Bayascas, J. R., Castillo, E., Muñoz-Mármol, A. M. and Saló, E. (1997). Planarian Hox genes: novel patterns of expression during regeneration. *Development* **124**, 141-148.

Bayascas, J. R., Castillo, E. and Saló, E. (1998). Platyhelminthes have a Hox code differentially activated during regeneration, with genes closely related to those of spiralian protostomes. *Dev. Genes Evol.* **208**, 467-473.

Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-42.

Behrens, J. and Lustig, B. (2004). The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* **48**, 477-87.

Bode, H. R. (2003). Head regeneration in Hydra. *Dev Dyn* **226**, 225-36.

Bosher, J. M. and Labouesse, M. (2000). RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* **2**, E31-6.

Bradley, R. S. and Brown, A. M. (1990). The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix. *Embo J* **9**, 1569-75.

Bradley, R. S. and Brown, A. M. (1995). A soluble form of Wnt-1 protein with mitogenic activity on mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* **15**, 4616-22.

Brown, J. D., Hallagan, S. E., McGrew, L. L., Miller, J. R. and Moon, R. T. (2000). The maternal Xenopus beta-catenin signaling pathway, activated by frizzled homologs, induces goosecoid in a cell non-autonomous manner. *Dev Growth Differ* **42**, 347-57.

Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L. and Basler, K. (1997). pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in Drosophila. *Nature* **385**, 829-33.

Burrus, L. W. and McMahon, A. P. (1995). Biochemical analysis of murine Wnt proteins reveals both shared and distinct properties. *Exp Cell Res* **220**, 363-73.

C

Cadigan, K. M., Fish, M. P., Rulifson, E. J. and Nusse, R. (1998). Wingless repression of Drosophila frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. *Cell* **93**, 767-77.

Cadigan, K. M. and Nusse, R. (1996). wingless signaling in the Drosophila eye and embryonic epidermis. *Development* **122**, 2801-12.

Cadigan, K. M. and Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* **11**, 3286-305.

Carranza, S., Baguñà, J. and Riutort, M. (1997). Is the Platyhelminthes a Monophyletic Primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 485-497.

Carroll, S. B., Grenier, J. K. and Weatherbee, S. D. (2001). From DNA to diversity. Madison, Wisconsin: Blackwell Science.

Cebrià, F., Kudome, T., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T. and Agata, K. (2002a). The expression of neural-specific genes reveals the structural and molecular complexity of the planarian central nervous system. *Mech Dev.* **116**, (1-2):199-204.

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. *Develop. Growth Differ.* **44**, 135-146.

Chan, S. K. and Struhl, G. (2002). Evidence that Armadillo transduces wingless by mediating nuclear export or cytosolic activation of Pangolin. *Cell* **111**, 265-80.

Chervitz, S. A., Aravind, L., Sherlock, G., Ball, C. A., Koonin, E. V., Dwight, S. S., Harris, M. A., Dolinski, K., Mohr, S., Smith, T. et al. (1998). Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: orthology and divergence. *Science* **282**, 2022-8.

Cho, K. W., Blumberg, B., Steinbeisser, H. and De Robertis, E. M. (1991). Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell* **67**, 1111-20.

Clevers, H. and van de Wetering, M. (1997). TCF/LEF factors earn their wings. *Trends Genet* **13**, 485-9.

Coghlan, M. P., Culbert, A. A., Cross, D. A., Corcoran, S. L., Yates, J. W., Pearce, N. J., Rausch, O. L., Murphy, G. J., Carter, P. S., Roxbee Cox, L. et al. (2000). Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* **7**, 793-803.

Cohen, P. and Goedert, M. (2004). GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 479-87.

Cong, F., Schweizer, L. and Varmus, H. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* **131**, 5103-15.

Cox, R. T., Kirkpatrick, C. and Peifer, M. (1996). Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Biol* **134**, 133-48.

Cross, D. A., Culbert, A. A., Chalmers, K. A., Facci, L., Skaper, S. D. and Reith, A. D. (2001). Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J Neurochem* **77**, 94-102.

Culbert, A. A., Brown, M. J., Frame, S., Hagen, T., Cross, D. A., Bax, B. and Reith, A. D. (2001). GSK-3 inhibition by adenoviral FRAT1 overexpression is neuroprotective and induces Tau dephosphorylation and beta-catenin stabilisation without elevation of glycogen synthase activity. *FEBS Lett* **507**, 288-94.

D

Davidson, B. and Levine, M. (2003). Evolutionary origins of the vertebrate heart: Specification of the cardiac lineage in *Ciona intestinalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11469-73.

Dorsky, R. I., Sheldahl, L. C. and Moon, R. T. (2002). A transgenic Lef1/beta-catenin-dependent reporter is expressed in spatially restricted domains throughout zebrafish development. *Dev Biol* **241**, 229-37.

BIBLIOGRAFIA

Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. and Moon, R. T. (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* **15**, 2625-34.

Duboule, D. (2002). Making progress with limb models. *Nature* **418**, 492-3.

Dudley, A. T., Ros, M. A. and Tabin, C. J. (2002). A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* **418**, 539-44.

E

Eastman, Q. and Grosschedl, R. (1999). Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 233-40.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**, 199-213.

F

Facci, L., Stevens, D. A. and Skaper, S. D. (2003). Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity. *Neuroreport* **14**, 1467-70.

Fagotto, F., Guger, K. and Gumbiner, B. M. (1997). Induction of the primary dorsalizing center in *Xenopus* by the Wnt/GSK/beta-catenin signaling pathway, but not by Vg1, Activin or Noggin. *Development* **124**, 453-60.

Ferkey, D. M. and Kimelman, D. (2000). GSK-3: new thoughts on an old enzyme. *Dev Biol* **225**, 471-9.

Fradkin, L. G., van Schie, M., Wouda, R. R., de Jong, A., Kamphorst, J. T., Radjkoemar-Bansraj, M. and Noordermeer, J. N. (2004). The *Drosophila* Wnt5 protein mediates selective axon fasciculation in the embryonic central nervous system. *Dev Biol* **272**, 362-75.

Frame, S., Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J.* **1;359**(Pt 1):1-16.

Frame, S., Cohen, P. and Biondi, R. M. (2001). A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell* **7**, 1321-7.

Fredieu, J. R., Cui, Y., Maier, D., Danilchik, M. V. and Christian, J. L. (1997). Xwnt-8 and lithium can act upon either dorsal mesodermal or neurectodermal cells to cause a loss of forebrain in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* **186**, 100-14.

G

Garcia-Fernández, J., Baguñà, J. and Saló, E. (1993). Genomic organization and expression of the planarian homeobox genes *Dth-1* and *Dth-2*. *Development* **118**, 241-253.

- Gerhart, J.** (1999). 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology* **60**, 226-39.
- Giese, K., Cox, J. and Grosschedl, R.** (1992). The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* **69**, 185-95.
- Giles, R. H., van Es, J. H. and Clevers, H.** (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1653**, 1-24.
- Gregorieff, A., Grosschedl, R. and Clevers, H.** (2004). Hindgut defects and transformation of the gastro-intestinal tract in Tcf4(-)/Tcf1(-) embryos. *Embo J* **23**, 1825-33.
- Grimson, M. J., Coates, J. C., Reynolds, J. P., Shipman, M., Blanton, R. L. and Harwood, A. J.** (2000). Adherens junctions and beta-catenin-mediated cell signalling in a non-metazoan organism. *Nature* **408**, 727-31.
- Gumbiner, B. M.** (1995). Signal transduction of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 634-40.

H

- Hall, G. F., Chu, B., Lee, G. and Yao, J.** (2000). Human tau filaments induce microtubule and synapse loss in an in vivo model of neurofibrillary degenerative disease. *J Cell Sci* **113 (Pt 8)**, 1373-87.
- Handberg-Thorsager, M.** (2002) Characterization of the Homeobox gene engrailed in the planarian *Girardia tigrina*. M.Sc. Thesis. Universitat de Barcelona I University of Copenhagen
- Hannon, G. J.** (2002). RNA interference. *Nature* **418**, 244-51.
- Harwood, A. J., Plyte, S. E., Woodgett, J., Strutt, H. and Kay, R. R.** (1995). Glycogen synthase kinase 3 regulates cell fate in *Dictyostelium*. *Cell* **80**, 139-48.
- Heisenberg, C. P., Tada, M., Rauch, G. J., Saude, L., Concha, M. L., Geisler, R., Stemple, D. L., Smith, J. C. and Wilson, S. W.** (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* **405**, 76-81.
- Henderson, B. R. and Fagotto, F.** (2002). The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep* **3**, 834-9.
- Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., Snyder, P., Rothbacher, U. and Holstein, T. W.** (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* **407**, 186-9.
- Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M. S., Jin, O. and Woodgett, J. R.** (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* **406**, 86-90.
- Holland, L. Z. and Holland, N. D.** (2001). Evolution of neural crest and placodes: amphioxus as a model for the ancestral vertebrate? *J Anat* **199**, 85-98.
- Holland, P. W. H. and Garcia-Fernández, J.** (1996). *Hox* genes and chordate evolution. *Dev. Biol.* **173**, 382-395.
- Holstein, T. W., Hobmayer, E. and Technau, U.** (2003). Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Dev Dyn* **226**, 257-67.

BIBLIOGRAFIA

Hoppler, S., Brown, J. D. and Moon, R. T. (1996). Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in *Xenopus* embryos. *Genes Dev* **10**, 2805-17.

Hurlstone, A. F., Haramis, A. P., Wienholds, E., Begthel, H., Korving, J., Van Eeden, F., Cuppen, E., Zivkovic, D., Plasterk, R. H. and Clevers, H. (2003). The Wnt/beta-catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature* **425**, 633-7.

Hyman, L. (1940). *The invertebrates* : Protozoa through Ctenophora. New York: McGraw-Hill, 22-39

Hyman, L. (1951). *The invertebrates II*.

Hyman, L. (1959). *The invertebrates: Smaller coelomate*. New York: McGraw-Hill, 750-754

J

Jiménez, E. (2003) Aproximació Evo-Devo a la base filogenètica dels bilaterals: gens Hox i ParaHox a acels i nertodermàtides. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.

Joep, R. S. and Johnson, G. V. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* **29**, 95-102.

Jue, S. F., Bradley, R. S., Rudnicki, J. A., Varmus, H. E. and Brown, A. M. (1992). The mouse Wnt-1 gene can act via a paracrine mechanism in transformation of mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* **12**, 321-8.

K

Kawano, Y. and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**, 2627-34.

Kelly, G. M., Greenstein, P., Erezyilmaz, D. F. and Moon, R. T. (1995). Zebrafish wnt8 and wnt8b share a common activity but are involved in distinct developmental pathways. *Development* **121**, 1787-99.

Kim, C. H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Artinger, K. B., Chandrasekharappa, S. C., Driever, W. and Chitnis, A. B. (2000). Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* **407**, 913-6.

Kitajewski, J., Mason, J. O. and Varmus, H. E. (1992). Interaction of Wnt-1 proteins with the binding protein BiP. *Mol Cell Biol* **12**, 784-90.

Klein, P. S. and Melton, D. A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8455-9.

Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J. and Clevers, H. (1998a). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19**, 379-83.

Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destree, O. and Clevers, H. (1998b). Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol* **18**, 1248-56.

Korswagen, H. C. (2002). Canonical and non-canonical Wnt signaling pathways in *Caenorhabditis elegans*: variations on a common signaling theme. *Bioessays* **24**, 801-10.

Kuhl, M. (2004). The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci* **9**, 967-74.

Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R. and Moon, R. T. (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* **16**, 279-83.

Kuhnert, F., Davis, C. R., Wang, H. T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R. and Kuo, C. J. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 266-71.

Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hroudá, M., Lentfer, J., Schmidt, H. A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M. Q. et al. (2005). Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* **433**, 156-60.

L

Larabell, C. A., Torres, M., Rowing, B. A., Yost, C., Miller, J. R., Wu, M., Kimelman, D. and Moon, R. T. (1997). Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in beta-catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *J Cell Biol* **136**, 1123-36.

Lawrence, N., Langdon, T., Brennan, K. and Arias, A. M. (2001). Notch signaling targets the Wingless responsiveness of a Ubx visceral mesoderm enhancer in *Drosophila*. *Curr Biol* **11**, 375-85.

Lemaire, P., Garrett, N. and Gurdon, J. B. (1995). Expression cloning of *Siamois*, a *Xenopus* homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis. *Cell* **81**, 85-94.

Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y. Z., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Zaharevitz, D. W. et al. (2000). Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur J Biochem* **267**, 5983-94.

Lessing, D. and Nusse, R. (1998). Expression of wingless in the *Drosophila* embryo: a conserved cis-acting element lacking conserved Ci-binding sites is required for patched-mediated repression. *Development* **125**, 1469-76.

Li, L., Yuan, H., Xie, W., Mao, J., Caruso, A. M., McMahon, A., Sussman, D. J. and Wu, D. (1999). Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* **274**, 129-34.

Logan, C. Y. and Nusse, R. (2004). The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*.

Lovestone, S., Reynolds, C. H., Latimer, D., Davis, D. R., Anderton, B. H., Gallo, J. M., Hanger, D., Mulot, S., Marquardt, B., Stabel, S. et al. (1994). Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* **4**, 1077-86.

BIBLIOGRAFIA

Lu, D., Zhao, Y., Tawatao, R., Cottam, H. B., Sen, M., Leoni, L. M., Kipps, T. J., Corr, M. and Carson, D. A. (2004). Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3118-23.

M

MacAulay, K., Hajduch, E., Blair, A. S., Coghlan, M. P., Smith, S. A. and Hundal, H. S. (2003). Use of lithium and SB-415286 to explore the role of glycogen synthase kinase-3 in the regulation of glucose transport and glycogen synthase. *Eur J Biochem* **270**, 3829-38.

Malik, H. S., Eickbush, T. H. and Goldfarb, D. S. (1997). Evolutionary specialization of the nuclear targeting apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13738-42.

Mallatt, J., Winchell, C.J. (2002). Testing the new animal phylogeny: first use of combined large-subunit and small-subunit rRNA gene sequences to classify the protostomes. *Mol Biol Evol.* **9(3)**, 289-301

Mannini, L., Rossi, L., Deri, P., Gremigni, V., Salvetti, A., Salo, E. and Batistoni, R. (2004). Djeyes absent (Djeya) controls prototypic planarian eye regeneration by cooperating with the transcription factor Djsix-1. *Dev Biol* **269**, 346-59.

Marcelle, C., Stark, M. R. and Bronner-Fraser, M. (1997). Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. *Development* **124**, 3955-63.

Maretto, S., Cordenonsi, M., Dupont, S., Braghetta, P., Broccoli, V., Hassan, A. B., Volpin, D., Bressan, G. M. and Piccolo, S. (2003). Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3299-304.

Marsal, M., Pineda, D. and Salo, E. (2003). Gtwnt-5 a member of the wnt family expressed in a subpopulation of the nervous system of the planarian *Girardia tigrina*. *Gene Expr Patterns* **3**, 489-95.

Martinez-Arias, A. and Stewart, A. (2002). Molecular principles of animal development: Oxford University Press.

Matsubayashi, H., Sese, S., Lee, J. S., Shirakawa, T., Iwatsubo, T., Tomita, T. and Yanagawa, S. (2004). Biochemical characterization of the *Drosophila* wingless signaling pathway based on RNA interference. *Mol Cell Biol* **24**, 2012-24.

McMahon, A. P. and Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **62**, 1073-85.

Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R. et al. (2003). GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol* **10**, 1255-66.

Miller, J. R. (2002). The Wnts. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3001.

Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D. and Moon, R. T. (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* **18**, 7860-72.

Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. and Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**, 391-9.

Moon, R. T., Brown, J. D. and Torres, M. (1997a). WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet* **13**, 157-62.

Moon, R. T., Brown, J. D., Yang-Snyder, J. A. and Miller, J. R. (1997b). Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands. *Cell* **88**, 725-8.

Moon, R. T., Campbell, R. M., Christian, J. L., McGrew, L. L., Shih, J. and Fraser, S. (1993). Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development* **119**, 97-111.

Morgan, T. H. (1898). Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. *Archiv für Entwicklungsmechanik der organismen* **7**, 364-397.

Muller, W. A., Teo, R. and Mohrlen, F. (2004). Patterning a multi-headed mutant in *Hydractinia*: enhancement of head formation and its phenotypic normalization. *Int J Dev Biol* **48**, 9-15.

N

Nelson, W. J. and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**, 1483-7.

Newmark, P. A. and Sánchez-Alvarado, A. (2000). Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev. Biol.* **220**, 142-153.

Newmark, P. A. and Sanchez 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., Reddien, P. W., Cebria, F. and Sanchez 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.

Nielsen, C (1995) *Animal Evolution*. Oxford: Oxford University Press, 9-17

Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S. and Hedge, P. (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* **253**, 665-9.

Noordermeer, J., Klingensmith, J., Perrimon, N. and Nusse, R. (1994). dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in *Drosophila*. *Nature* **367**, 80-3.

Nusse, R. (1999). WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet* **15**, 1-3.

Nusse, R. (2003). Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development* **130**, 5297-305.

Nusse, R., Samos, C. H., Brink, M., Willert, K., Cadigan, K. M., Wodarz, A., Fish, M. and Rulifson, E. (1997). Cell culture and whole animal approaches to understanding signaling by Wnt proteins in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**, 185-90.

O

Olson, D. J. and Gibo, D. M. (1998). Antisense wnt-5a mimics wnt-1-mediated C57MG mammary epithelial cell transformation. *Exp Cell Res* **241**, 134-41.

BIBLIOGRAFIA

Orford, K., Crockett, C., Jensen, J. P., Weissman, A. M. and Byers, S. W. (1997). Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* **272**, 24735-8.

Orsulic, S. and Peifer, M. (1996). Cell-cell signalling: Wingless lands at last. *Curr Biol* **6**, 1363-7.

P

Pai, L. M., Orsulic, S., Bejsovec, A. and Peifer, M. (1997). Negative regulation of Armadillo, a Wingless effector in Drosophila. *Development* **124**, 2255-66.

Pan, X. and Goldfarb, D. S. (1998). YEB3/VAC8 encodes a myristylated armadillo protein of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane that functions in vacuole fusion and inheritance. *J Cell Sci* **111** (Pt 15), 2137-47.

Papkoff, J. and Schryver, B. (1990). Secreted int-1 protein is associated with the cell surface. *Mol Cell Biol* **10**, 2723-30.

Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K. et al. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* **273**, 14037-45.

Peterson, K. J., Lyons, J. B., Nowak, K. S., Takacs, C. M., Wargo, M. J. and McPeck, M. A. (2004). Estimating metazoan divergence times with a molecular clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6536-41.

Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T. and De Robertis, E. M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**, 707-10.

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.

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 Pax-6 independent. *Development* **129**, 1423-1434.

Pineda, D. and Salo, E. (2002). Planarian *Gtsix3*, a member of the *Six/so* gene family, is expressed in brain branches but not in eye cells. *Gene Expr Patterns* **2**, 169-73.

Pires-daSilva, A., Sommer, R.J. (2003) The evolution of signalling pathways in animal development. *Nat Rev Genet* **4**(1), 39-49.

Porter, J. A., Young, K. E. and Beachy, P. A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* **274**, 255-9.

Pourquie, O. (2005). Signal transduction: a new canon. *Nature* **20**;433(7023):208-9.

Price, M. A. and Kalderon, D. (2002). Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* **108**, 823-35.

Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frendewey, D., Samuelsson, B. and Radmark, O. (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *Embo J* **21**, 5864-74.

Prud'homme, B., Lartillot, N., Balavoine, G., Adoutte, A. and Vervoort, M. (2002). Phylogenetic analysis of the Wnt gene family. Insights from lophotrochozoan members. *Curr Biol* **12**, 1395.

R

Reddien, P. W. and Sanchez Alvarado, A. (2004). Fundamentals of Planarian Regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol*.

Remane, A. (1963). The enterocelic origin of the coelom. In *The Lower Metazoa*, (ed. E. C. Dougherty), pp. 78-90. Berkeley-Los Angeles: University of California Press.

Rentzsch, F., Hobmayer, B., Holstein, TW. (2005). Glycogen synthase kinase 3 has a proapoptotic function in Hydra gametogenesis. *Dev Biol*. **278**(1), 1-12.

Reuter, M. and Gustafsson, M. (1996). Neuronal signal substances in asexual multiplication and development in flatworms. *Cell Mol Neurobiol* **16**, 591-616.

Reuter, M., Gustafsson, M., Sheiman, I., Terenina, N., Halton, D. and Maule, A. (1995). The nervous system of Tricladida. II. Neuroanatomy of *Dugesia tigrina* (Paludicola, Dugesiiidae): an immunocytochemical study. *Invert Neurosci*. **1**, 133-43.

Reuter, M. and Gustafsson, M. K. (1995). The flatworm nervous system: pattern and phylogeny. *Exs* **72**, 25-59.

Reuter, M., Sheiman, I. M., Gustafsson, M. K. S., Halton, D. W., Maule, A. G. and Shaw, C. (1996). Development of the nervous system in *Dugesia tigrina* during regeneration after fission and decapitation. *Invert. Reprod. and Develop.* **29**, 199-211.

Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. and Weissman, I. L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-14.

Ribas, M. (1990). Cariologia, sistemàtica i biogeografia de les planàries d'aigües dolces als Països Catalans. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.

Riese, J., Yu, X., Munnerlyn, A., Eresh, S., Hsu, S. C., Grosschedl, R. and Bienz, M. (1997). LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell* **88**, 777-87.

Rieger, R. (1985). The phylogenetic status of the acoelomate organisation within the Bilateria: a histological prespective. In *The origin ad relationship of lower invertebrates* vol. (ed. S.C. Morris, J. D. George, R.Gibson and H.M. Platt), pp. 101-122. Oxford: Oxford University Press.

Rieger, R. M., Tyler, S., Simith III, J.P.S., and Rieger, G.R. (1991). Platyhelminthes: Turbellaria. In *Microscopic anatomy of invertebrates*, Vol. 3: Plathelminthe and Nemertinea vol. (ed. F.W. Harrison and B.J. Bogitsch), pp.7-140. New York: Wiley-Liss.

Ruiz-Trillo, I., Riutort, M., Littlewood, J., Herniou, E., Baguña, J. (1999). Acoel Flatworms: Earliest extant bilaterian metazoans, not members of Platyhelminthes. *Science* **283** 1919-1923.

Ruiz-Trillo, I., Paps, J., Loukota, M., Ribera, C., Jondelius, U., Baguña, J. and Riutort, M. (2002). A phylogenetic analysis of myosin heavy chain type II sequences corroborates that

BIBLIOGRAFIA

acoela and nemertodermatida are basal bilaterians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11246-11251.

Ruiz-Trillo I, Riutort M, Fourcade HM, Baguna J, Boore JL. (2004) Mitochondrial genome data support the basal position of Acoelomorpha and the polyphyly of the Platyhelminthes. *Mol Phylogenet Evol* **33**(2), 321-32.

S

Saló, E. (1984). Formació del blastema i re-especificació del patró durant la regeneració de les planàries *Dugesia* (S) *mediterranea* i *Dugesia* (G) *tigrina*: anàlisi morfològica, cel.lular i bioquímica. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.

Saló, E. and Baguñà, J. (1984a). 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. Morph.* **83**, 63-80.

Saló, E. i Baguñà, J. (1984b). Formació del patró durant la regeneració a planàries: Temps de determinació i independència de la grandària del blastema. *Biol. Desenv.* **2**, 265-275.

Saló, E. and Baguñà, J. (1989). Regeneration and pattern formation in planarians. II. Local origin and role of cell movements in blastema formation. *Development* **107**, 69-76.

Saló, E. and Baguñà, J. (2002). Regeneration in planarians and other worms. New findings, new tools and new perspectives. *J. Exp. Zool.* **292**, 528-539.

Salo, 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.

Salvini-Plawen, L.V. (1978). On the origin and evolution of the lower Metazoa. *Z.Zool. Syst. Evolutionsforsch* **16**, 40-48

Sambrook, J., Frisch, E., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual* (ed. C.S.H.L)

Sanchez Alvarado, A., Newmark, P. A., Robb, S. M. and Juste, R. (2002). The Schmidtea mediterranea database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development* **129**, 5659-65.

Sasakura, Y. and Makabe, K. W. (2001). Ascidian Wnt-5 gene is involved in the morphogenetic movement of notochord cells. *Dev Growth Differ* **43**, 573-82.

Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. and Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* **10**, 55-63.

Sayas, C. L., Avila, J. and Wandosell, F. (2002a). Glycogen synthase kinase-3 is activated in neuronal cells by Galpha12 and Galpha13 by Rho-independent and Rho-dependent mechanisms. *J Neurosci* **22**, 6863-75.

Sayas, C. L., Avila, J. and Wandosell, F. (2002b). Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3. *Biochim Biophys Acta* **1582**, 144-53.

Schlesinger, A., Shelton, C. A., Maloof, J. N., Meneghini, M. and Bowerman, B. (1999). Wnt pathway components orient a mitotic spindle in the early *Caenorhabditis elegans* embryo without requiring gene transcription in the responding cell. *Genes Dev* **13**, 2028-38.

Schilde, C., Araki, T., Williams, H., Harwood, A. and Williams, J. G. (2004). GSK3 is a multifunctional regulator of Dictyostelium development. *Development* **131**, 4555-65.

Schneider, S. Q., Finnerty, J. R. and Martindale, M. Q. (2003). Protein evolution: structure-function relationships of the oncogene beta-catenin in the evolution of multicellular animals. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **295**, 25-44.

Schryver, B., Hinck, L. and Papkoff, J. (1996). Properties of Wnt-1 protein that enable cell surface association. *Oncogene* **13**, 333-42.

Schubert, M., Holland, L. Z., Stokes, M. D. and Holland, N. D. (2001). Three amphioxus Wnt genes (AmphiWnt3, AmphiWnt5, and AmphiWnt6) associated with the tail bud: the evolution of somitogenesis in chordates. *Dev Biol* **240**, 262-73.

Schultz, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Sausville, E. A., Meijer, L. and Kunick, C. (1999). Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity. *J Med Chem* **42**, 2909-19.

Sheldahl, L. C., Park, M., Malbon, C. C. and Moon, R. T. (1999). Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* **9**, 695-8.

Siegfried, E. and Perrimon, N. (1994). Drosophila wingless: a paradigm for the function and mechanism of Wnt signaling. *Bioessays* **16**, 395-404.

Siegfried, E., Wilder, E. L. and Perrimon, N. (1994). Components of wingless signalling in Drosophila. *Nature* **367**, 76-80.

Slusarski, D. C., Corces, V. G. and Moon, R. T. (1997a). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* **390**, 410-3.

Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., Busa, W. B. and Moon, R. T. (1997b). Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* **182**, 114-20.

Steitz, M. C., Wickenheisser, J. K. and Siegfried, E. (1998). Overexpression of zeste white 3 blocks wingless signaling in the Drosophila embryonic midgut. *Dev Biol* **197**, 218-33.

Strutt, D. I. (2001). Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the Drosophila wing. *Mol Cell* **7**, 367-75.

Sun, X., Mariani, F. V. and Martin, G. R. (2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* **418**, 501-8.

T

Taipale, J. and Beachy, P. A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* **411**, 349-54.

Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z. and He, X. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* **13**, 149-56.

Tauler, J. (2000). Organització genòmica i expressió de gens amb "homeobox" tipus Hox a políclads. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.

BIBLIOGRAFIA

Tazaki, A., Gaudieri, S., Ikeo, K., Gojobori, T., Watanabe, K. and Agata, K. (1999). Neural network in planarian revealed by an antibody against planarian synaptotagmin homologue. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **260**, 426-432.

Timmons, L., Court, D. L. and Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**, 103-12.

Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P. J. and Yang, Y. (2003). Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* **162**, 899-908.

Torres, M. A., Yang-Snyder, J. A., Purcell, S. M., DeMarais, A. A., McGrew, L. L. and Moon, R. T. (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* **133**, 1123-37.

U

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 evolutionary conserved homeobox genes. *Dev. Genes Evol.* **209**, 31-39.

V

Valentine, J. W., Erwin, D. H. and Jablonski, D. (1996). Developmental evolution of metazoan bodyplans: the fossil evidence. *Dev Biol* **173**, 373-81.

van de Water, S., van de Wetering, M., Joore, J., Esseling, J., Bink, R., Clevers, H. and Zivkovic, D. (2001). Ectopic Wnt signal determines the eyeless phenotype of zebrafish masterblind mutant. *Development* **128**, 3877-88.

van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A. et al. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* **88**, 789-99.

Veeman, M. T., Axelrod, J. D. and Moon, R. T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* **5**, 367-77.

W

Wallingford, J. B., Ewald, A. J., Harland, R. M. and Fraser, S. E. (2001). Calcium signaling during convergent extension in *Xenopus*. *Curr Biol* **11**, 652-61.

Wang, Y. K., Sporle, R., Paperna, T., Schughart, K. and Francke, U. (1999). Characterization and expression pattern of the frizzled gene *Fzd9*, the mouse homolog of FZD9 which is deleted in Williams-Beuren syndrome. *Genomics* **57**, 235-48.

Wesley, C. S. (1999). Notch and wingless regulate expression of cuticle patterning genes. *Mol Cell Biol* **19**, 5743-58.

Weston, C. R. and Davis, R. J. (2001). Signal transduction: signaling specificity- a complex affair. *Science* **292**, 2439-40.

Wikramanayake, A. H., Hong, M., Lee, P. N., Pang, K., Byrum, C. A., Bince, J. M., Xu, R. and Martindale, M. Q. (2003). An ancient role for nuclear beta-catenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation. *Nature* **426**, 446-50.

Willert, K. and Nusse, R. (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 95-102.

Willert, K., Shibamoto, S. and Nusse, R. (1999a). Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev* **13**, 1768-73.

Willert, K., Logan, C. Y., Arora, A., Fish, M. and Nusse, R. (1999b). A Drosophila Axin homolog, Daxin, inhibits Wnt signaling. *Development* **126**, 4165-73.

Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., 3rd and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-52.

Willmer, P. (1990). Invertebrate Relationships. Cambridge: Cambridge Univ. Press.

Wodarz, A. and Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 59-88.

Wolpert, L. (2002) Principles of Development. 2nd edition Oxford Univ. Press

Wu, C. H. and Nusse, R. (2002). Ligand receptor interactions in the Wnt signaling pathway in Drosophila. *J Biol Chem* **277**, 41762-9.

Y

Yamaguchi, T. P., Bradley, A., McMahon, A. P. and Jones, S. (1999a). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* **126**, 1211-23.

Yamaguchi, T. P., Takada, S., Yoshikawa, Y., Wu, N. and McMahon, A. P. (1999b). T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev* **13**, 3185-90.

Yang-Snyder, J., Miller, J. R., Brown, J. D., Lai, C. J. and Moon, R. T. (1996). A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* **6**, 1302-6.

Yost, C., Farr, G. H., 3rd, Pierce, S. B., Ferkey, D. M., Chen, M. M. and Kimelman, D. (1998). GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in Xenopus development and oncogenesis. *Cell* **93**, 1031-41.

Yost, C., Torres, M., Miller, J. R., Huang, E., Kimelman, D. and Moon, R. T. (1996). The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* **10**, 1443-54.

Yu, X., Riese, J., Eresh, S. and Bienz, M. (1998). Transcriptional repression due to high levels of Wingless signalling. *Embo J* **17**, 7021-32.