

**Экспрессия генов мелатониновых рецепторов у планарий *Schmidtea mediterranea* и их возможная роль в процессах пролиферации и дифференцировки стволовых клеток**

**Expression of melatonin receptor genes in planarians *Schmidtea mediterranea* and their possible role in the processes of proliferation and differentiation of stem cells**

Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Евдокимовский Е.В.

Ermakova O.N., Ermakov A.M., Evdokimovsky E.V.

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН 142290 Пущино,  
Московская обл., ул. Институтская д.3*

*E-mail: ao\_ermakovy@rambler.ru*

**Резюме:** В настоящей работе была исследована экспрессия мембранных рецепторов мелатонина в теле планарий *Schmidtea mediterranea* и их возможная роль в процессах пролиферации и дифференцировки стволовых клеток. Показано, что обнаруженные *in silico* в геноме планарий ортологи рецепторов мелатонина *Smed-mt 1*, *Smed-mt 2* и *Smed-mel 1c* обладают паттерном экспрессии с максимумом в головной и минимумом в хвостовой части тела животных. Регенерация головной и хвостовой части планарий сопровождалась снижением уровня экспрессии всех трех типов мембранных рецепторов мелатонина. РНК интерференция рецептора мелатонина *Smed-mt 2* приводила к нарушению регенерации головного конца тела планарий. Полученные данные объясняют дистопроксимальный ингибирующий эффект мелатонина на регенерацию планарий и проливают свет на новую роль мелатонина и его рецепторов как регуляторов процессов регенерации и морфогенеза планарий.

**Summary:** Investigation of melatonin membrane receptors expression in planarians *Schmidtea mediterranea* revealed that melatonin receptor orthologs *Smed-mt 1*, *Smed-mt 2* и *Smed-mel 1c* are highly expressed in the head area whereas in the tail region their expression is minimal. Regeneration of dissected head and tail parts in planarians was accompanied by a decrease of expression level of all three type melatonin receptors. RNA interference of melatonin receptor *Smed-mt 2* caused defects in process of head regeneration. The data obtained could explain the distoproximal inhibitory effect of melatonin on planarian regeneration and shed light on a new role of melatonin and its receptors as regulators of planarian regeneration and morphogenesis.

**Ключевые слова:** планарии, рецепторы мелатонина, экспрессия, регенерация, стволовые клетки.

**Key words:** planarian, melatonin receptors, expression, regeneration, stem cells.

**Введение.** Мелатонин – уникальный индоламин, который идентифицирован во всех таксонах живых организмов: в бактериях, животных и растениях. Предполагается, что мелатонин является одним из наиболее древних сигнальных молекул [1]. Мелатонин – вещество с разнообразными физиологическими свойствами и функциями, основная из которых – роль регулятора циркадных ритмов. Помимо этого у животных мелатонин выполняет функцию скавенжера свободных радикалов, цитопротектора, иммуномодулятора и онкостатического агента [2].

Биологическая активность мелатонина в большинстве случаев опосредована взаимодействием со специфическими мембранным и ядерными рецепторами. К настоящему времени у млекопитающих идентифицировано два типа мембранных рецепторов мелатонина (MT<sub>1</sub> (Mel 1a) и MT<sub>2</sub> (Mel 1b)) [3]. В остальных таксонах животных помимо вышеперечисленных рецепторов обнаружена еще одна форма – Mel 1c [4]. Эти белки принадлежат к суперсемейству G – связанных рецепторов (superfamily of G-protein coupled receptors), содержащих семь трансмембранных доменов. Первичный ответ данных рецепторов мелатонина приводит к изменению концентрации внутриклеточного cAMP [5].

У человека и приматов был выявлен третий тип мембранного рецептора мелатонина – MT<sub>3</sub>, идентифицированный как хинон редуктаза 2 (quinone reductase 2). Посредством этого фермента - рецептора мелатонин вовлекается в поддержание окислительного статуса клетки [6].

В ядре мелатонин имеет сродство к ядерным ретиноидным орфановым рецепторам (retinoid-related orphan receptor)– ROR 1 $\alpha$ , ROR 2 $\alpha$ , RZR и посредством этих белков мелатонин способен напрямую изменять транскрипционную активность генов [7].

В теле планарий мелатонин синтезируется преимущественно в головной части, причем концентрация этого гормона и активность ферментов, участвующих в его биосинтезе, имеет ярко выраженный циркадный ритм [8, 9]. У декапитированных *Dugesia dorocephala* экзогенно добавляемый мелатонин индуцирует процесс бесполого размножения [10]. Этот гормон оказывает дистопроксимальный эффект на регенерацию

планарий. Так было показано, что экзогенный мелатонин приводит к ингибированию регенерации головной части, но не оказывает воздействия на регенерацию хвостовой части [11]. Мы предполагаем, что биологические эффекты мелатонина у планарий, как и у всех животных опосредуются специфическими рецепторами, причем эти рецепторы играют важную роль в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки стволовых клеток планарий – необластов.

**Цель исследования.** Выявление и исследование экспрессии мембранных мелатониновых рецепторов в теле интактных и регенерирующих планарий, выяснение возможной роли рецепторов мелатонина в процессах пролиферации и дифференцировки стволовых клеток планарий.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на бесполой клональной расе пресноводных плоских червей планарий *Schmidtea mediterranea*. Животных содержали в прудовой воде при комнатной температуре и кормили раз в неделю личинками двукрылых (мотыль). Для стандартизации биологических процессов в эксперимент отбирали планарий длиной около 10 мм и прекращали их кормление за 7 дней до опытов. Регенерация головы вызывалась путем ампутации 2 мм головной части тела планарий, содержащей головной ганглий.

Температура воды в экспериментальном и контрольном сосудах поддерживалась одинаковой, на уровне  $21 \pm 0.5$  °C. Эксперименты в каждой серии повторялись не менее 3-х раз на группах, включающих в среднем по 30 животных.

Для определения изменений уровня экспрессии генов под воздействием исследуемых веществ применяли метод ПЦР в реальном времени. В качестве референсного гена был использован хаус кининг ген - фактор элонгации EF-1 $\alpha$  (*Smed-ef 1 $\alpha$* ), относительно которого нормализовалась экспрессия всех исследованных генов. Для выделения общей матричной РНК из ткани планарий использовали набор «Выделение полноразмерной поли (А) мРНК на магнитных частицах» (Силекс (Москва)), Полученную мРНК использовали для получения комплементарной ДНК, с помощью набора «Синтез первой цепи кДНК (олиго(дТ)15)» фирмы Силекс. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени проводили на приборе ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), используя набор фирмы Синтол (для ПЦР в реальном времени), содержащий интеркалирующий краситель SybrGreen и референсный краситель ROX. Ген - специфические праймеры подбирались с

помощью программы Primer Express 3 (Applied Biosystems). Длина праймеров составляла в среднем 24 нуклеотида. Температура отжига 59-60°C, длина амплифицируемого фрагмента 94-100 пар нуклеотидов. Реакцию проводили по следующей схеме: 1 цикл 95°C – 5 мин; 40 циклов 95°C – 30 сек, 60°C – 40 сек; 1 цикл (стадия диссоциации) 95°C – 15 сек, 60°C – 1 мин, 95°C – 15 сек.

На стадии отладочных экспериментов для проверки специфичности реакции продукты амплификации проверялись электрофорезом в 2% агарозе. Во всех остальных случаях специфичность реакции проверялась на кривых температурной диссоциации полученных ампликонов. Анализ данных, полученных с помощью ПЦР в реальном времени, производили по пороговой флуоресценции методом  $\Delta C(T)$ . Разницу между экспрессией гена в опыте и контроле вычисляли методом  $\Delta\Delta C(T)$ . В работе использовались праймеры со следующими последовательностями:

*Smed-ef 1a*:

F 5'-AACCAATGTGCGTGGAAACAT-3'

R 5'-CGGCAACAGTTTGTTCATATCTC-3'

*Smed-mt 1*

F 5'-GAAACCCGACTGGTGGGACTA-3'

R 5'-CTGTGCATTAATGGACTCATTTCTG-3'

*Smed-mt 2*

F 5'-TGGGCGACGAATATAACACATT-3'

R 5'-GAGAACTATTGAAGTGAGCGATGACT-3'

*Smed-mel 1c*

F 5'-AACATGCGTCGGTCAATGAA-3'

R 5'-AATTGTCCAGGGCATGCTGTA-3'

Для исследования функции гена рецептора мелатонина *Smed-mt 2* применялся метод РНК интерференции. Для этого с помощью ПЦР амплифицировался необходимый участок исследуемого гена при этом дизайн прямого и обратного праймера осуществляли с учетом наличия на 5' (для прямого) или 3' (для обратного) конце специфического промотора для РНК полимеразы фага T7 с последовательностью нуклеотидов 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАGGG-3'. Таким образом амплифицируемый фрагмент содержал промоторы для T7 РНК полимеразы и имел длину 500 пар нуклеотидов. На основе полученной специфичной ДНК осуществляли синтез двухцепочечной РНК (дцРНК) с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага T7 (Fermentas, США). Реакцию

проводили в течение 2 ч. при температуре 37°C. Синтезированную дцРНК обрабатывали ДНКазой (Силекс, Москва), осаждали 96% этанолом и далее растворяли в стерильной воде. Далее полученную дцРНК аликвотировали по 10 мкл и замораживали.

Для РНК интерференции (РНКи) исследуемого гена полученную дцРНК (10 мкл) смешивали с куриным яичным желтком (60 мкл) и полученной смесью кормили планарий 1 раз в день в течение 3-х дней. Скрининг фенотипа производили путем запуска регенерации головного конца тела планарий через 3 и 10 дней после последнего кормления. Также в течение 30 дней наблюдали за интактными животными, подвергшихся РНК интерференции. В качестве отрицательного контроля использовалась интерференция гена из *C. elegans* – *unc-22*, в качестве положительного контроля использовалась интерференция гена планарий *piwi 2*, выключение экспрессии которого приводит к нарушению процессов дифференцировки стволовых клеток планарий [12].

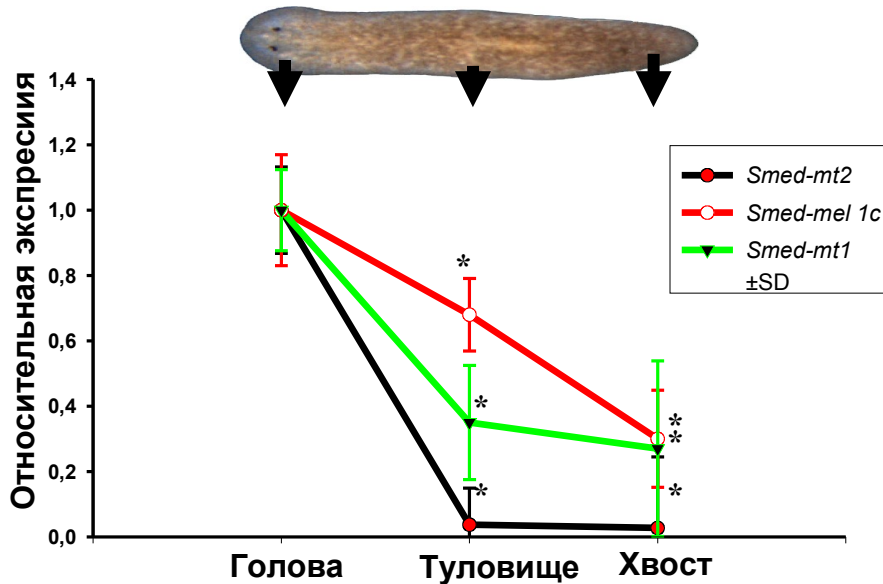
Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Sigma-Plot 9». Для сравнения данных применяли параметрический критерий Стьюдента ( $t_{st}$  тест) и критерий Фишера.

**Результаты.** С помощью поиска *in silico* в геноме *S. mediterranea* [13] нами были найдены ортологи мелатониновых рецепторов *Smed-mt 1*, *Smed-mt 2* и *Smed-mel 1c* [14]. На основании этих данных, используя метод ПЦР в реальном времени, мы исследовали экспрессию обнаруженных рецепторов в теле интактных и регенерирующих планарий.

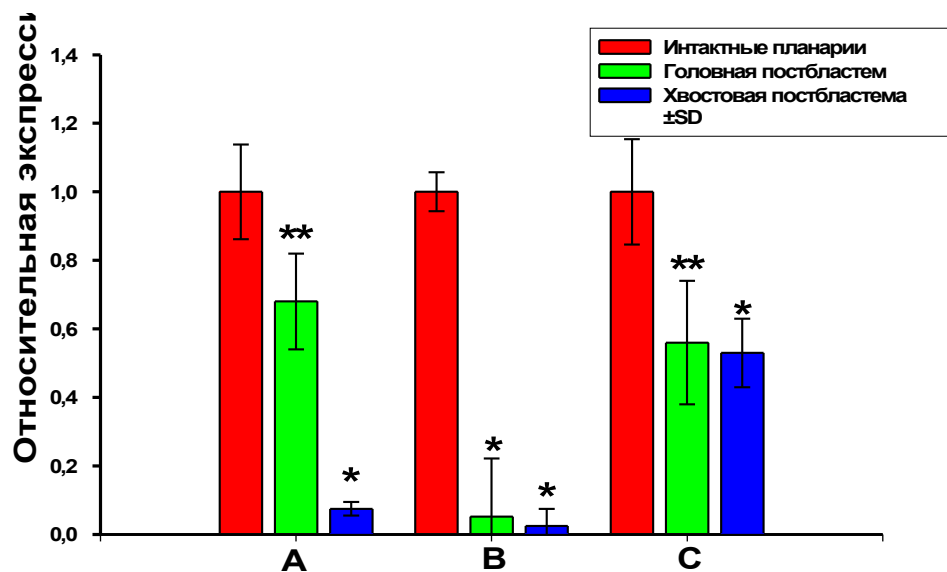
У интактных планарий мы выявили четкий паттерн экспрессии этих белков в теле животных. Так максимальный уровень содержания mRNA *Smed-mt 2* рецептора наблюдался в головной части планарий. В туловищном отделе животных мы наблюдали снижение экспрессии данного рецептора в 16 раз, а в хвостовом в 32 раза. Подобное явление было обнаружено и в экспрессии рецепторов – *Smed-mt 1* и *Smed-mel 1c*, так максимальная концентрация mRNA этих белков наблюдалась в голове и минимальная в хвосте животного (Рис. 1.).

Исследование экспрессии рецепторов мелатонина при регенерации планарий показало, что данный процесс сопровождался снижением уровня экспрессии перечисленных типов рецепторов. Так через сутки после ампутации головной части планарий концентрация mRNA *Smed-mt 2* в головной постбластеме уменьшалась на 30 % по сравнению с интактными животными, экспрессия *Smed-mel 1c* уменьшалась в 10 раз, а *Smed-mt 1* в 2 раза (Рис. 2). Подобным образом снижался уровень экспрессии мелатониновых

рецепторов и во время регенерации хвостовой части планарий. В хвостовой постбластеме регенерирующих животных по сравнению с интактными содержание mRNA рецепторов мелатонина *Smed-mt 2* и *Smed-mel 1c* уменьшилось в 10 раз, а *Smed-mt 1* в 2 раза (Рис. 2).



**Рис. 1.** Уровни экспрессии мелатониновых рецепторов в головном, центральном и хвостовом фрагментах интактных планарий, обозначенные в относительных единицах. В качестве единицы принята экспрессия рецепторов мелатонина в голове, значения представлены в виде средних по трем независимым экспериментальным значениям  $\pm$  стандартное отклонение.  $*p \leq 0,001$

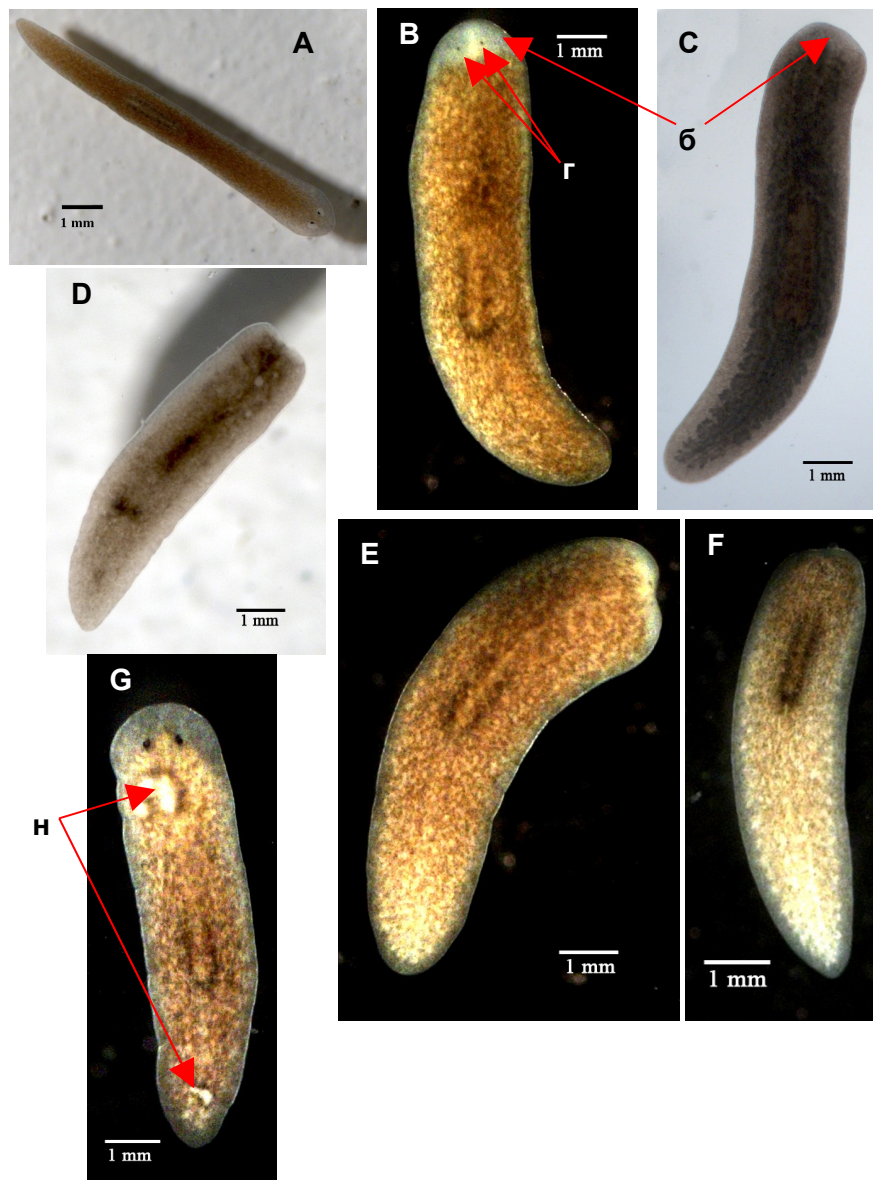


**Рис. 2.** Уровни экспрессии рецепторов мелатонина *Smed-mt2* (А), *Smed-mt1* (В) и *Smed-mel1c* (С) у интактных (части, соответствующие головной и хвостовой постбластеме регенерирующих животных) и регенерирующих планарий (части головной и хвостовой постбластемы). В качестве единицы принята экспрессия рецепторов мелатонина у интактных планарий, значения представлены в виде средних по трем независимым экспериментальным значениям  $\pm$  стандартное отклонение. \* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$

РНК интерференция гена *unc-22* у планарий не приводила к каким либо изменениям у интактных и регенерирующих планарий (рис. 3 А, В). Напротив, выключение экспрессии гена *Smed-piwi 2* приводило к проявлению специфического фенотипа у регенерирующих планарий, который выражался в отсутствии у регенерантов глаз, недоразвитой и регрессирующей бластеме (рис. 3 С, D). У интактных животных на 20 сутки после последнего кормления дцРНК наблюдались некрозы, а на 30 сутки такие животные погибали. РНК интерференция рецептора мелатонина *Smed-mt 2* также приводила к проявлению фенотипа. Так, у регенерирующих планарий (декапитация на 3 сутки после последнего кормления дцРНК) наблюдалась недоразвитые глаза бластема (рис. 3 Е), а у животных, декапитированных через 10 суток после последнего кормления, бластема вовсе не развивалась (рис. 3 F). У интактных планарий на 20 сутки после последнего кормления наблюдалось развитие некрозов, а к 30 суткам такие животные погибали (рис. 3 G).

**Обсуждение.** Регенерация планарий осуществляется за счет пролиферации и дифференцировки стволовых клеток – необластов [15]. Показано, что ингибирующее действие мелатонина на рост бластемы планарий может быть опосредовано его воздействием на пролиферативную активность этих клеток [16]. Подобные эффекты этот гормон вызывает при воздействии на пролиферирующие клетки высших животных. Эксперименты *in vitro* позволили продемонстрировать онкостатическую активность мелатонина на многих типах раковых клеток [1]. Применение специфических агонистов и антагонистов к данным рецепторам позволило продемонстрировать их роль в антипролиферативной активности мелатонина. Этот гормон в терапевтических и физиологических концентрациях способен ингибировать посредством взаимодействия с  $MT_1$  рецептором рост MCF эстрогенчувствительных клеток рака молочной железы в  $G_0/G_1$  фазах клеточного цикла и подавлять метастазирование [17]. Антипролиферативный эффект мелатонина был также продемонстрирован на гепатомах, раковых клетках яичника, матки, меланомы, простаты, кишечных и легочных метастазирующих опухолях

[1]. Показано, что на клетки меланомы мелатонин оказывает воздействие посредством взаимодействия с  $MT_1$  и  $MT_3$  рецепторами [18], а  $MT_2$  рецептор вовлечен в онкостатический эффект этого гормона на раковые клетки матки [19].



**Рис. 3.** Фенотипическое проявление РНК интерференции (РНКи) генов у планарии *S. mediterranea*. А – интактная и В – регенерирующая планария (6 суток регенерации) после РНКи гена *unc-22*; С – регенерирующая планария после РНКи гена *Smed-piwi 2* (6 суток регенерации), у животного нет глаз, бластема недоразвита; D – регенерирующая планария после РНКи гена *Smed-piwi 2* (10 суток регенерации), у животного регрессировала бластема; E - регенерирующая планария после РНКи гена *Smed-mt 2* (6 суток регенерации, декапитация была произведена на 3 сутки после последнего кормления дцРНК), у животного недоразвита бластема и глаза; F - регенерирующая планария после РНКи гена



*Smed-mt 2* (6 суток регенерации, декапитация была произведена на 10 сутки после последнего кормления дцРНК), у животного не формируется бластема; G – интактная планария после РНКи гена *Smed-mt 2* (20 суток после последнего кормления дцРНК), у животного развивается некроз тканей. б – бластема, новая непигментированная ткань; г – глаза; н – некроз тканей планарии.

Дистопроксимальный эффект ингибирования мелатонином регенерации планарий возможно объяснить разным уровнем экспрессии рецепторов к этому гормону в теле животных. Высокий уровень чувствительности к этому гормону регенерирующей головы обусловлен преимущественной экспрессией *Smed-mt 1*, *Smed-mt 2* и *Smed-mel 1c* рецепторов в головной части планарий. Практически полное отсутствие mRNA этих рецепторов в хвостовой части животных делает процесс роста хвостовой бластемы не чувствительным к мелатонину. Можно предположить, что мембранные рецепторы мелатонина (как и сам мелатонин) распространены преимущественно в центральной нервной системе планарий (в головных ганглиях и меньше – нервных стволах). Подобным же образом они распределены и у высших животных [5]. При регенерации, как головной, так и хвостовой части планарий наблюдается снижение уровня экспрессии мелатониновых рецепторов. По-видимому, это снижение является защитным механизмом от действия эндогенных ингибиторов регенерации, к которым относится и мелатонин.

Проявление специфического фенотипа у планарий, подвергшихся РНК интерференции рецептора мелатонина *Smed-mt 2*, в основных чертах схожего с фенотипом после РНК интерференции гена *Smed-piwi 2* указывает на то, что выключение экспрессии данного типа рецептора мелатонина в теле планарий сопровождается нарушением пролиферации стволовых клеток (недоразвитая или отсутствующая бластема) и их дифференцировки (недоразвитые глаза). Некротические процессы и гибель интактных планарий свидетельствуют о полной гибели стволовых клеток в теле животных, которые в норме обеспечивают возобновление популяции самих необластов и дифференцированных клеток [20].

У планарий градиентом экспрессии обладают многие гены, которые контролируют процессы регенерации и морфогенеза, например гомологи НОМ/НОХ гомеобоксных генов [21], ген TCEN49 [22] и т.д. Наличие градиента экспрессии мелатониновых рецепторов, а также нарушение процессов пролиферации и дифференцировки необластов после интерференции гена *Smed-mt 2* указывает на новую роль мелатонина и его рецепторов как важных регуляторов процессов морфогенеза и регенерации, пролиферации

и дифференцировки стволовых клеток у плоских червей, а возможно, и других более высокоорганизованных животных.

**Выводы:**

1. С помощью метода ПЦР в реальном времени выявлено дистально-проксимальное распределение экспрессии рецепторов мелатонина в теле планарий (с максимумом в головной и минимумом в туловищной и хвостовой части), что возможно обуславливает пространственную неоднородность морфогенетической активности мелатонина.
2. Обнаружено снижение экспрессии рецепторов мелатонина во время регенерации планарий, вероятно, это является защитным механизмом от действия эндогенных ингибиторов регенерации, к которым относится мелатонин.
3. Методом РНК интерференции показано, что у планарий рецептор мелатонина *Smed-mt 2* играет важную роль в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки стволовых клеток.

**Благодарности.** Мы благодарим ведущего научного сотрудника ИТЭБ РАН, к.б.н. Ушакову Т.Е., за помощь в проведении молекулярно биологических работ на планариях; старших научных сотрудников ИБК РАН, к.б.н. Шейман И.М. и к.б.н. Крещенко Н.Д. за помощь в работе с культурой планарий, конструктивные комментарии и обсуждение этой работы.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы по направлению 2010-1.3.1-141-022: «Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук по следующим областям:- общая биология и генетика;- физико-химическая молекулярная и клеточная биология;- фундаментальная медицина и физиология»

**Литература:**

1. Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Maestroni G.J.M., Cardinali G.P., Poeggeler B. Hardeland R. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? FEBS Journal, 2006, V. 273, P. 2813–2838.

2. Maharaj D.S, Glass B.D., Daya S. Melatonin: New Places in Therapy. *Biosci. Rep*, 2007, V. 27, P. 299–320.
3. Dubocovich M.L., Cardinali D.P., Delagrange P., Krause D.N., Strosberg D., Sugden D., Yocca F.D. Melatonin receptors. In *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*, 2nd edn. (IUPHAR, ed.), 2000, P. 271–277. IUPHAR Media, London.
4. Ebisawa T., Karne S., Lerner M.R., Reppert S.M. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, V. 91, P. 6133–6137.
5. Dubocovich M.L., Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 2005, V. 27, P. 101–110.
6. Boutin J. A., Audinot V., Ferry G., Delagrange P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci*, 2005, V. 26, P. 412-419.
7. Becker-Andre M., Wiesenberg I., Schaeren-Wiemers N., Andre E., Missbach M., Saurat J.H., Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem*, 1994, V. 269, P. 28531–28534.
8. Morita M., Hall F., Best J.B., Gem W. Photoperiodic modulation of cephalic melatonin in planarians. *J. Exp. Zool*, 1987, V. 214, P. 383-388.
9. Itoh M.T., Shinozawa T., Sumi Y. Circadian rhythms of melatonin-synthesizing enzyme activities and melatonin levels in planarians. *Brain Res*, 1999, V. 830, P. 165–173.
10. Morita M., Best J.B. Effect of photoperiods and melatonin on planarian asexual reproduction. *J. Exp. Zool*, 1984, V. 231, P. 273-282.
11. Yoshizawa Y., Wakabayashi K., Shinozawa T. Inhibition of planarian regeneration by melatonin. *Hydrobiologia*, 1991, V. 227, P. 31-40.
12. Reddien P.W., Oviedo N.J., Jennings J.R., Jenkin J.C., Sanchez Alvarado A. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science*, 2005, Vol. 310, P. 1327–1330.
13. Robb S.M., Ross E., Sanchez Alvarado A. Smedgd: the *Schmidtea mediterranea* genome database. *Nucleic Acids Res*, 2008, V. 36, P. D599-606.
14. Reddien P.W., Newmark P., Sánchez Alvarado A. Gene nomenclature guidelines for the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev. Dyn*, 2008, V. 237, P. 3099–3101.
15. Newmark P., Sánchez Alvarado A. Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev. Bio*, 2000, V. 220, P. 142-153.

16. Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Тирас Х.П. Влияние мелатонина на регенерацию планарий *Girardia tigrina*. Онтогенез, 2009, №6, с.466-469.
17. Cos S., Sanchez-Barcelo E.J. Melatonin and mammary pathological growth. *Front. Neuroendocrin*, 2000, V. 17, P. 133-170.
18. Vieira De Souza A, Visconti M.A., De Lauro Castrucci A.M. Melatonin biological activity and binding sites in human melanoma cells. *J. Pineal Res*, 2003, V. 34, P. 242–248.
19. Kobayashi Y., Itoh M.T., Kondo H. Melatonin binding sites in estrogen receptor-positive cells derived from human endometrial cancer. *J. Pineal Res*, 2003, V. 35, P. 71–74.
20. Pellettieri J., Sanchez Alvarado A. Cell turnover and adult tissue homeostasis: from humans to planarians. *Annu. Rev. Genet*, 2007, V. 41, P. 83–105.
21. Orii H., Kato K., Umesono Y., Sakurai T., Agata K., Watanabe K. The planarian HOM/HOX homeobox genes (*Plox*) expressed along the anteroposterior axis. *Dev. Biol*, 1999 V. 210, P. 456–468.
22. Bueno D., Vispo M., Sancho V., Romero R. Maintenance of AP body regions in planarians by TCEN49, a putative cystine-knot neurotrophin. *Bel. J. Zool*, 2001, V. 131(Sppl.), P. 89-95.