

Regeneracija pri plaščarju Ciona

ŠPELA GORIČKI¹ IN WILLIAM JEFFERY²

¹ Scriptorium biologorum – Biološka pisarna d.o.o., Nikole Tesla 6, Murska Sobota, goricki.spela@gmail.com

² University of Maryland, Department of Biology, College Park MD, ZDA

Sprejeto

16. 12. 2024

Izdano

15. 9. 2025

DOPISNI AVTOR

goricki.spela@gmail.com

Povzetek *Ciona intestinalis* je plaščar (poddeblo Tunicata, deblo strunarji/Chordata), ki je spoznan za enega najbližjih živečih sorodnikov vretenčarjev. Vendar pa ima *Ciona* v osupljivem nasprotju z večino vretenčarjev, ki kažejo omejene sposobnosti regeneracije, močne regenerativne sposobnosti. Na primer: strukture, odstranjene iz distalnega dela telesa, kot sta sifon (prebavna odprtina) in možgani, se lahko popolnoma regenerirajo iz preostalega proksimalnega dela telesa v le nekaj tednih. Preučevali smo nekatere celične in molekularne mehanizme, ki sodelujejo pri regeneraciji distalnih delov telesa. Odstranitev distalnih struktur sproži celično smrt (apoptozo) na mestu rane in pošlje signal rastnega faktorja *Wnt* v škržno košaro – dihalni in prehranjevalni organ, ki se nahaja v proksimalnem delu telesa. Matične celice v škržni košari se aktivirajo za delitev in pošiljanje migratornih predniških celic na mesto rane, kjer se diferencirajo v regenerirajoča distalna tkiva in organe. Distalna regeneracija zahteva izražanje številnih genov, vključno s *hsp70*, ki je nujen za pravilno zvijanje proteinov, in genov, vključenih v signalno pot Delta/Notch, ki usmerja diferenciacijo v obnavljajočih se tkivih. Namen prihodnjih študij o regeneraciji pri *Cioni* je pojasniti, zakaj je večina vretenčarjev izgubila sposobnost regeneracije in razviti načrt za obnove te sposobnosti.

Ključne besede:

regeneracija,
matične celice,
signalizacija Wnt,
Delta-Notch pot,
asimetrična regeneracija.



<https://doi.org/12.18690/po.12.22.15-25.2025>

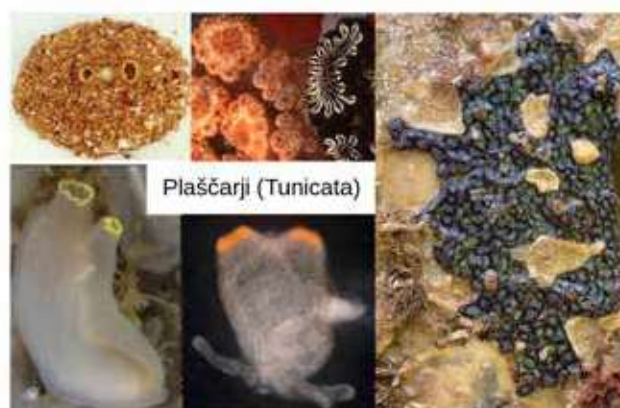
Besedilo © Gorički in Jeffery, 2025



UVOD

Regeneracija je obnavljanje obrabljenih ali poškodovanih in odmrlih delov telesa. Vseživljenjska zaloga pluripotentnih matičnih celic je osnovna zahteva regeneracije. To so še nediferencirane celice, ki so sposobne celične delitve bodisi na dve enaki nediferencirani celici (simetrična delitev) bodisi na dve različni hčerinski celici, od katerih ena ostane nediferencirana, druga pa gre na pot diferenciacije in obnove tkiv in organov (asimetrična delitev). Večina sesalcev, vključno s človekom, ima tekom odraslega življenja, ko se rast preneha, omejene sposobnosti regeneracije. Največkrat je regeneracija omejena le na nekatere telesne organe ali strukture, najbolj očitno in vseprisotno pa je nezmožnost obnove poškodovanih ali izrabljenih celic značilna za sesalce žogane (Brockes in Kumar, 2008).

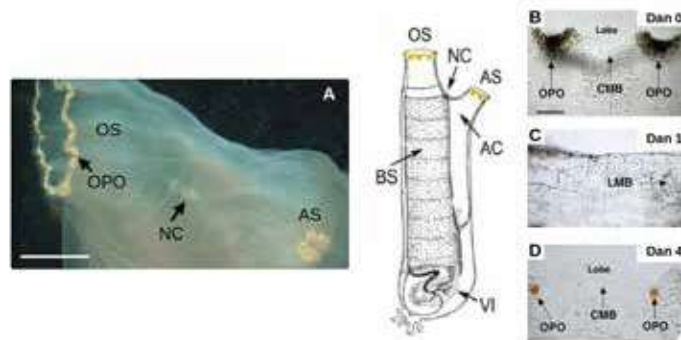
Plaščarji so kljub drugačnemu videzu vretenčarjem sorodne morske živali, ki lahko živijo samotarsko ali pa se združujejo v kolonije, v katerih si osebki delijo določene življenjske naloge (Slika 1). Nekateri plaščarji živijo pritrjeni na podlago, drugi so celo življenje plavajoči, večina pa ima žabjim paglavcem bolj ali manj podobno ličinko. Na osnovi primerjalne anatomije ličinke in zaporedja DNA so plaščarji spoznani za evlucijsko sestrsko vejo vretenčarjev (Delsuc in sod., 2006).



Slika 1. Nekaj primerov pritrjenih plaščarjev, ki jih združujemo v razred kozolnjakov (Asciacea). V smeri urinega kazalca začenši levo zgoraj: solitarna vrsta *Molgula oculata*, dve različno obarvani obliki kolonijske vrste zvezdasti zdrizavec (*Botryllus schlosseri*), prevleka kolonij zvezdastega zdrizavca (*B. schlosseri*), posamezen osebek (zooid) kolonijske vrste *Ecteinascidia turbinata* in solitarni črevesasti kozolnjak (*Ciona intestinalis*) – naš modelni organizem. Slovenska poimenovanja vrst po Turk, 2007.

Ciona je vrsta plaščarja, ki celo življenje živi samotarsko in se prehranjuje tako, da iz vode filtrira mikroskopske organske delce. Najdemo jo v vseh morjih sveta, tudi v Jadranskem morju, kamor se je razširila s pomočjo pomorskega transporta – je torej invazivna vrsta. V nasprotju s človekom pa ima *Ciona* močne regenerativne sposobnosti (Whittaker, 1975; Dahlberg in sod., 2008; Auger in sod., 2010; Jeffery, 2015a). Na primer: strukture, odstranjene z vrhnjega (distalnega) dela telesa, kot sta prebavni od-

prtini (sifona) in možgani, se lahko popolnoma regenerirajo iz preostalega dela telesa v le nekaj tednih (Slika 2). Zanimivo je, da je regeneracija pri *Cioni* asimetrična: proksimalne strukture, ki vsebujejo drobovino, lahko regenerirajo distalne strukture, ki smo jih omenili prej, distalne strukture pa ne morejo regenerirati proksimalnih struktur (Hirschler, 1914; Jeffery in Gorički, 2021). Preučevali smo nekatere celične in molekularne mehanizme, ki sodelujejo pri regeneraciji distalnih delov telesa. Namen naših raziskav o regeneraciji pri *Cioni* je pojasniti, zakaj je večina vretenčarjev izgubila sposobnost regeneracije in razviti načrt za obnovo te sposobnosti.



Slika 2. Anatomija *Cione*. OS – Oralni (dotelalni) sifon, AS – atrialni (izmetalni) sifon, NC – možgani (živčni vozeli), BS – škrgna košara, VI – drobovina (želodec, srce, gonade), AC – kloaka. A. Pogled od zgoraj na distalni del telesa. OPO – oranžno pigmentirani oči. Merilo: 10 mm. B. Rob intaktnega sifona pri mlademu osebkju. Lobe – mišična krpa, CMB – krožna mišična vlakna. Merilo: 1 mm. Merilo je enako na slikah C. in D. C. Rob odrezanega vrha sifona en dan po odstranitvi. LMB – vzdolžna mišična vlakna. D. Rob sifona med regeneracijo četrty dan po odstranitvi prvotnega sifona.

METODE

Za preučevanje regeneracije pri *Cioni* se je v zadnjih desetletjih razvilo več dobrih orodij. Večino laboratorijskih poskusov izvajamo na mladih, pravkar preobraženih osebkjih, ki jih pripravimo s pomočjo *in vitro* fertilizacije v petrijevki (*Ciona* ima zunanjo oploditev) in gojimo v pretočnih sistemih s tretirano morskovo vodo (da preprečimo kontaminacije in okužbe) v kontroliranih pogojih dneвно-nočnega ritma osvetlitve in temperature vode ter ob natančnem doziranju hrane (fitoplankton) (Joly in sod., 2007; Dahlberg in sod., 2009; Jeffery, 2015b, c; Jeffery, 2019; Jeffery in Gorički, 2021). Drug nepogrešljiv pogoj uspešne realizacije in interpretacije laboratorijskih poskusov pa je dobra informacijska podprtost, ki vključuje sekvenciran in anotiran (okarakteriziran) genom (Dehal in sod., 2002), dostopnost številnih, tudi še neobjavljenih, izsledkov in rezultatov preučevanj plaščarjev na različnih področjih (molekularna in celična biologija, sistematika, evolucija, fiziologija, ekologija itd.) ter zmogljivi serverji in dobri algoritmi, vključno s strojnimi učenjem, ki so sposobni analizirati ogromne količine podatkov v razumnem času.

Štirje konceptualni tipi laboratorijskih poskusov so danes potrebni za ugotavljanje vzročno-posledičnih povezav med dvema ali več dogodki na področju preučevanja regene-

racije. (1) Kvantitativna analiza: povečana ali zmanjšana koncentracija neke intrinzične molekule ali pogostost nekega dogodka mora biti značilna za pojav, ki ga proučujemo. V ta sklop spadajo primerjalne analize transkriptoma (koncentracije molekul mRNA specifičnih genov), mikromreže in kvantitativna PCR (Hamada in sod., 2015; Jeffery in sod., 2023). (2) Kvalitativna analiza: prisotnost neke molekule ali dogodka mora biti značilna za tkiva, ki jih preučujemo. V ta sklop spadajo različne in-situ tehnike uporabe specifičnih markerjev, npr. barvanje markerjev matičnih celic z alkalno fosfatazo, barvanje proteinov PIWI, detekcija fragmentacije DNA med apoptozo s testom TUNEL (Jeffery, 2015b; 2019), detekcija podvajanja DNA med delitvijo celic z inkubacijo v raztopini fluorescentno označenih nukleotidov EdU ter in-situ hibridizacija s specifično RNA sondo, ki se prilega tarčni mRNA (Hamada in sod., 2015; Jeffery in Gorički, 2021; Jeffery in sod., 2023). (3) Inhibicija delovanja neke molekule ali odstranitev domnevnega vzroka se mora izraziti v upadu ali odstranitvi pojava, ki ga preučujemo (posledice): farmakološki testi, kjer preučujemo pojav v prisotnosti specifičnih zaviralcev določenih molekul (drog), interferenca RNA, v kateri z dodatkom majhnih specifičnih molekul RNA blokiramo prevajanje tarčnih mRNA v funkcionalno beljakovino (Jeffery in Gorički, 2021; Jeffery in sod., 2023). (4) Indukcija pojava s pomočjo dodatka rekombinantne molekule ali uspešna stimulacija (rešitev) pojava v prisotnosti inhibitorja neke molekule (Jeffery in Gorički, 2021).

REZULTATI

1. Identifikacija niše matičnih celic pri *Cioni*

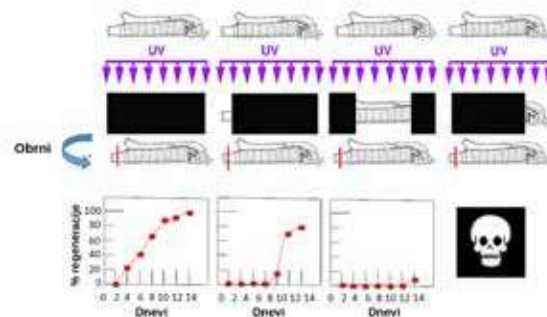
Ko smo od preostalega telesa izolirali osrednji del sifona in ga inkubirali v gojišču, so se na njegovem zgornjem robu pravilno pojavili skupki pigmentiranih čutilnih celic, t.i. oceli, do obnove mišičnih krp med njimi pa ni prišlo (Slika 3) (Auger in sod., 2010).



Slika 3. Poskus ex-situ regeneracije srednjega dela sifona (obroča). 1 – prvi rez, 2 – drugi rez. OPO - ocel.

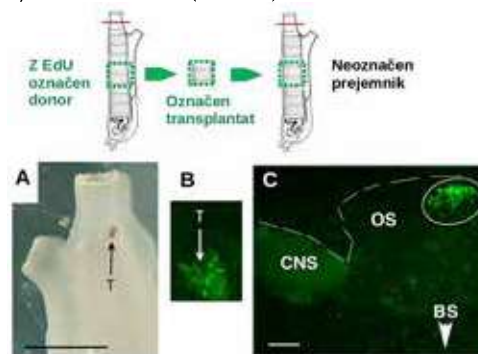
Iz tega sledi, da se nekaj predniških celic sicer nahaja v samem sifonu in tvorijo prvi fiziološki odziv na poškodbo, se pa te celice ne delijo in torej ne morejo izpeljati popolne regeneracije vrhnjega dela sifona. Za slednjo je potrebna celična delitev in migracija matičnih celic iz bolj oddaljenega vira. Ta vir smo s pomočjo testov, ki nam razkrijejo molekule ali procese, značilne za pluripotentne matične celice, našli v škržni košari

(Jeffery, 2015b). To je dobro prekrvavljen dihalno-prebavni organ v osrednjem delu telesa *Cione*. Test pomnoževanja celic je pokazal, da se po poškodbi sifona matične celice v škržni košari začnejo deliti, nastale predniške celice pa potujejo od tam na mesto poškodbe. Ko smo z UV žarki obsevali škržno košaro, smo uničili te celice in do regeneracije sifona ni prišlo (Slika 4).



Slika 4. Iskanje vira matičnih celic za obnovo sifona z uničujočim obsevanjem različnih delov telesa *Cione*. Del telesa, ki ga nismo nameravali obsevati, smo pred UV žarki zaščitili z za svetlobo neprepustno ploščo (črni pravokotniki). Prvi stolpec: kontrola. Drugi stolpec: z obsevanjem sifona smo uničili predniške celice v sifonu, zato smo regeneracijo opazili kasneje, ko so na mesto poškodbe prispele predniške celice iz bolj oddaljenega vira. Tretji stolpec: z obsevanjem škržne košare smo uničili matične celice, zato do regeneracije sifona ni prišlo. Četrty stolpec: živali, ki smo jim obsevali drobovino, niso preživele poskusa.

Nasprotno pa smo s presaditvijo dela zdrave škržne košare z označenimi matičnimi celicami pokazali, da se prav te celice po delitvi vertikalno premaknejo na mesto poškodbe in tam tvorijo manjkajoče dele telesa (Slika 5).

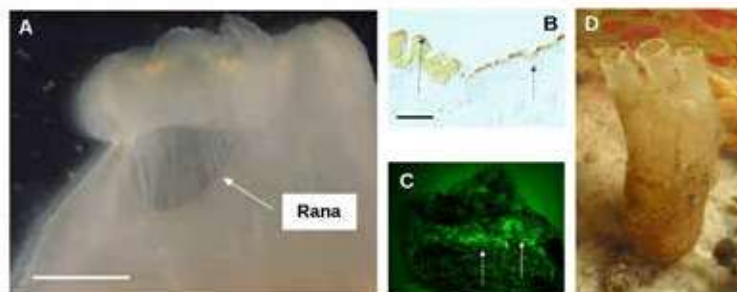


Slika 5. Regeneracija dela sifona iz označenega vsadka (transplantata). A. Položaj vsadka (T) v prejemniku pred odstranitvijo vrha oralnega sifona. Merilo: 10 mm. B. Fluorescentno označene celice koščka škržne košare. C. Nekaj dni po presaditvi so fluorescentno označene celice iz vsadka tvorile nediferencirano tkivo (blastemo) na robu ostanka sifona (označen s črtkano črto). OS – oralni sifon, CNS – možgani, BS – škržna košara. Merilo: 1 mm.

Migratorne predniške celice so specifično obnovile uničena tkiva (Jeffery, 2019; Jeffery and Gorički, 2021): med regeneracijo katerega od sifonov smo označene celice po nekaj dneh zaznali v blastemi na robu sifona, a nikjer drugje, če pa so bili odstranjeni možgani, so se pojavile samo v obnavljajočih se možganih. Tako lahko zaključimo, da vsebuje škržna košara nišo matičnih celic za regeneracijo različnih delov telesa *Cione*, oziroma, da se različni deli telesa pri *Cioni* regenerirajo iz celic, ki prihajajo iz istega vira.

2. Za regeneracijo je potrebna celična smrt (apoptoza)

Logično vprašanje, ki sledi tem ugotovitvam, je: kateri proces definira specifični cilj, kamor se morajo usmeriti migratorne predniške celice iz škrne košare? Na mestu poškodbe se namreč najprej pojavijo celice imunskega sistema, ki odstranijo poškodovane in odmrle celice (nekrotično tkivo) ter preprečujejo vdor patogenov v telo. Poleg njih pa smo s posebnim testom opazili še en pojav: nekatere zdrave celice na robu mesta poškodbe se »žrtvujejo« in umrejo v procesu programirane celične smrti oz. apoptoze (Jeffery, 2019). Če smo apoptozo na mestu poškodbe preprečili z inhibitorji kaspaz (encimi proteaze, ki razgrajujejo beljakovine in sprožijo apoptozo), do regeneracije sifonov ni prišlo (Jeffery in Gorički, 2021). Nasprotno pa smo z odpiranjem ran na različnih mestih v distalnem delu telesa sprožili apoptozo na robu rane, delitev matičnih celic v škržni košari in tvorbo dodatnih sifonov (Von Haffner, 1933; Slika 6) ali celo dodatnih možganov (neobjavljeni rezultati).



Slika 6. Tvorba dodatnega sifona na bazi obstoječega. A. Na robu nezaceljene rane so nekaj dni po poškodbi vidni pigmentirani oceli. Merilo: 5 mm. B. Temneje označene apoptotične celice na robu rane. Merilo: 1 mm. Merilo je enako na sliki C. C. Fluorescentno označene migratorne predniške celice, ki so prispele na rob rane. D. Odrasel osebek *Cione* s tremi sifoni.

3. Identifikacija signalnih molekul, ki sprožajo in usmerjajo regeneracijo

Umirajoče (apoptotične) celice na robu rane pošljejo signal v škržno košaro, kjer se nahajajo matične celice. Te se pod vplivom signalne molekule ali molekul aktivirajo za delitev in pošiljanje migratornih matičnih celic na mesto rane, kjer se diferencirajo v regenerirajoča distalna tkiva in organe. Od številnih možnih kandidatov, ki bi lahko

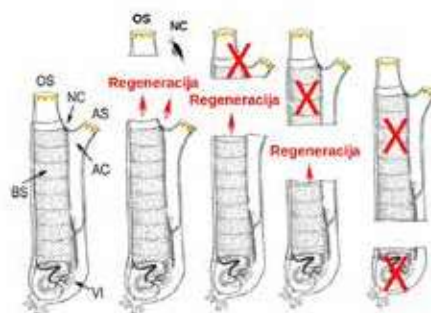
imeli vlogo signalne molekule v tem procesu, smo preizkusili učinek rastnih faktorjev, kot so FGF, BMP in Wnt (Jeffery in Gorički, 2021). Intaktne osebke smo najprej inkubirali v raztopini posamezne molekule, nato smo jim odrezali sifon in jih nazadnje inkubirali v raztopini inhibitorjev kaspaz. Le z dodatkom rekombinantne molekule Wnt3a smo obrnili učinek inhibitorjev kaspaz in dosegli pomnoževanje matičnih celic v škržni košari ter regeneracijo sifonov. To pomeni, da apoptotične celice na mestu poškodbe spodbudijo matične celice v škržni košari k delitvi preko signalne poti Wnt/ β -catenin. Signalna pot Wnt/ β -catenin ima ključno vlogo v treh cikličnih procesih: imunski odziv, celične delitve in cirkadiani (dnevno-nočni) ritem (Lecarpentier in sod., 2019). Migratorne predniške celice po vsej verjetnosti nato proti cilju usmerjajo molekule netrini. To je družina signalnih beljakovin, ki delujejo kot kemotaktični vodniki celicam in aksonom. Povečano izražanje gena *netrin4* v začetni fazi regeneracije sifona smo zaznali tudi v naših poskusih (neobjavljeni rezultati).

V naslednji fazi pa je treba na novo prispеле celice v blastemi usmeriti na pot diferenciacije. V naših poskusih smo se osredotočili na povečano izražanje genov, ki kodirajo signalne molekule sistema Delta/Notch. Ob inhibiciji te signalne poti se mišična vlakna v sifonih niso diferencirala, prav tako ni bilo opaziti diferenciacije ocelov (Hamada in sod., 2015). Molekule mRNA sistema Delta/Notch pa so, presenetljivo, med regeneracijo sifona prisotne ne le v regenerirajočem sifonu, ampak tudi v škržni košari. Ob inhibiciji signalne poti Delta/Notch smo opazili tudi, da so se matične celice v škržni košari prenehale deliti. Med regeneracijo pri *Cioni* bi lahko v škržni košari torej prihajalo do interakcije signalnih poti Wnt/ β -catenin in Delta/Notch. Spomnimo, čeprav sta aktivni istočasno, imata ti dve signalni poti v splošnem na celico nasproten učinek. Sistem Wnt/ β -catenin navadno spodbuja celico k delitvi, Delta/Notch pa diferenciacijo v mišična ali nevralna tkiva. Predlaganih je več možnih mehanizmov, po katerih bi lahko Notch omejeval signalizacijo Wnt, vključno z neposredno inhibicijo (Acar in sod., 2021; Gao in sod., 2021). Naši rezultati pa kažejo, da če ni diferenciacije celic v sifonu (Delta/Notch), se matične celice v škržni košari ne delijo, kljub temu, da jih k temu spodbujajo apoptotične celice na robu sifona (Wnt/ β -catenin). Možno je, da to predstavlja zaščito pred tvorbo neoplazem (raka). Mehanizem, po katerem matične celice zaznajo signal Delta/Notch a se ne diferencirajo, še ni znan. Lahko da gre za razlike v koncentraciji signalnih molekul ali številu receptorjev (Jeffery in Gorički, 2021).

4. Za regeneracijo je potreben tudi stres

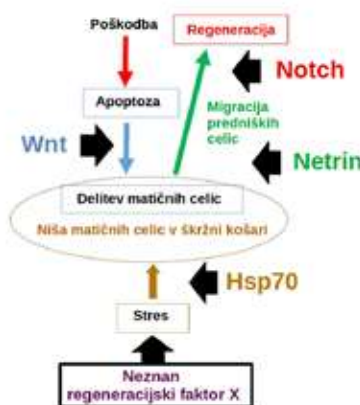
Zanimivo je, da je regeneracija pri *Cioni* asimetrična: proksimalne strukture lahko regenerirajo distalne strukture, distalne strukture pa ne morejo regenerirati proksimalnih struktur (Jeffery in Gorički, 2021). Distalna regeneracija zahteva izražanje številnih genov tudi v škržni košari. Med temi so v naših poskusih izrazito izstopali nekateri geni iz sistema šaperonov Hsp70 (Jeffery in sod., 2023). To so beljakovine, ki pomagajo drugim beljakovinam pri pravilnem zvijanju (Mayer in Bukau, 2005). Še posebej so značilne za odziv celice na temperaturni stres, ko beljakovinam pomagajo obdržati pravilno konfiguracijo. Geni iz sistema Hsp70 pa so se v škržni košari izrazili med

regeneracijo sifona le, če je bila ta povezana s proksimalnim delom telesa, ki vsebuje drobovino. Če smo žival prečno prepolovili in distalnemu delu nato odrezali sifon, je proksimalni del obnovil manjkajoča sifona in možgane, distalni del pa ne, kljub temu, da je vseboval del škvržne košare (Slika 7).



Slika 7. Asimetrična regeneracija pri Cioni. Proksimalni del telesa, ki vsebuje drobovino, lahko regenerira distalne strukture, distalne strukture pa ne morejo regenerirati niti odstranjenega sifona niti proksimalnih struktur.

Regeneracija sifona v distalnem delu brez drobovine je bila uspešna le ob kratkotrajni inkubaciji na višji temperaturi (25 °C) (Jeffery in sod., 2023). Ta temperaturni šok je sprožil izražanje genov Hsp70 v distalnem fragmentu in posledično delitev celic v škvržni košari ter regeneracijo sifona. V nobenem primeru pa se ni regeneriral proksimalni del živali, tudi pri presaditvi delujočega srca ali gonad v distalni del (Jeffery in sod., 2023). Zato predpostavljamo, da je za regeneracijo distalnih delov telesa *Cione* potreben še neznan dejavnik, ki se nahaja v proksimalnem delu telesa. Trenutno nadaljujemo z raziskovanjem osnov za asimetrično regeneracijo, pri čemer želimo ugotoviti vlogo asimetrične celične smrti in identiteto proksimalne komponente X (Slika 8).



Slika 8. Poenostavljen trenutni model celičnih in molekularnih procesov med regeneracijo distalnih struktur pri Cioni.

5. Sposobnost regeneracije upada s starostjo

Sposobnost regeneracije pa se ne razlikuje le med različnimi deli telesa, ampak se spreminja tudi tekom življenja *Cione* (Dahlberg in sod., 2009; Auger in sod., 2010; Jeffery, 2012). Če se omejimo na regeneracijo po metamorfozi in opazujemo osebkke velikosti 1 cm do 14 cm, delež regeneriranih osebkov s starostjo upada, podaljšuje pa se čas regeneracije, in to tako sifonov kot možganov. Pri starejših osebkkih (starost 12-14 mesecev) opazimo v škržni košari manj matičnih celic in manj celičnih delitev med regeneracijo kot pri mlajših osebkkih (6 mesecev) (Jeffery, 2012). Kot pa kažejo neuspešni poskusi regeneracije s presaditvijo dela škržne košare z mlajšega osebkka na starejšega, spremembe v niši matičnih celic niso edini vzrok regenerativnega staranja.

SKLEPI

Problem izrabe in odmiranja celic, organov in osebkov se v evoluciji rešuje na dva medsebojno izključujoča načina. Na eni skrajnosti so celice, tkiva in organizmi, ki so tolerantni na stres, poškodbe in bolezni. Za te je značilno hitro nadomeščanje oz. regeneracija odmrlih delov telesa. Na drugi skrajnosti pa so celice, organi in vrste, ki so razvile različne mehanizme zaščite pred poškodbami, boleznimi in drugimi stresorji. Pri teh je poudarek na dolgoživosti a hkrati zmanjšani sposobnosti regeneracije.

Kako nam torej lahko *Ciona* pomaga odgovoriti na vprašanje, zakaj so sesalčki možgani izgubili sposobnost regeneracije? Nekaj hipotez:

niše matičnih celic se domnevno nahajajo zunaj možganov in so od njih ločene s krvno-možgansko pregrado, ki je neprepustna za migratorne predniške celice;

za regeneracijo je potrebna apoptoza, ki je lahko v možganih potlačena in nezadostna, da bi sprožila celične delitve in regeneracijo;

signalne molekule, ki so potrebne v procesu regeneracije ali njihovi receptorji bi lahko v možganih manjkali.

Še druge možnosti bi lahko odkrili s pomočjo nadaljnjega preučevanja regeneracije pri *Cioni*.

VIRI

Acar, A., Hidalgo-Sastre, A., Leverentz, M. K., Mills, C. G., Woodcock, S., Baron, M., Collu G. M. in Brennan, K. (2021). Inhibition of Wnt signalling by Notch via two distinct mechanisms. *Sci Rep.* 11: 9096.

Auger, H., Sasakura, Y., Joly, J.-S. in Jeffery, W. R. (2010). Regeneration of oral siphon pigment organs in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev Biol.* 339: 374–389.

Brookes, J. P. in Kumar, A. (2008) Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24: 525–549.

Dahlberg, C., Auger, H., Dupont, S., Sasakura, Y., Thorndyke in M., Joly, J.-S. (2009). Refining the *Ciona intestinalis* model of central nervous system regeneration. *PLoS One* 4(2): e4458.

- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, M., Harafuji, N., Hastings, K. E. in drugi. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: Insights into chordate and vertebrate origins. *Science* 298: 2157–2167.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D., Phillipe, H. (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439: 965–968.
- Gao, J., Fan, L., Zhao, L., Su, Y. (2021). The interaction of Notch and Wnt signaling pathways in vertebrate regeneration. *Cell Regen.* 10: 11.
- Hamada, M., Gorički, Š., Byerly, M. S., Satoh, N. in Jeffery, W. R. (2015). Evolution of the chordate regeneration blastema: Differential gene expression and conserved role of notch signaling during siphon regeneration in the ascidian *Ciona*. *Dev Biol.* 405: 304–315.
- Hirschler, J. (1914). Über die Restitutions- und Involutionen voränge bei operierten Exemplaren von *Ciona intestinalis* Flem. (Teil I) nebst Bemerkungen über den Wert des Negativen für das Potenzproblem. *Arch mikr Anat.* 85: 205–227.
- Jeffery, W. R. (2012). Siphon regeneration capacity is compromised during aging in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mech Ageing Dev.* 133: 629–636.
- Jeffery, W. R. (2015a). Closing the wounds: one hundred and twenty five years of regenerative biology in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Genesis* 53: 48–65.
- Jeffery, W. R. (2015b). Distal regeneration involves the age dependent activity of branchial sac stem cells in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Regeneration* 2: 1–18.
- Jeffery, W. R. (2015c). The tunicate *Ciona*: A model system for understanding the relationship between regeneration and aging. *Invertebr Reprod Dev.* 59(Suppl 1): 17–22.
- Jeffery, W. R. (2019). Progenitor targeting by adult stem cells in *Ciona* homeostasis, injury, and regeneration. *Dev Biol.* 448: 279–290.
- Jeffery, W. R. in Gorički, Š. (2021). Apoptosis is a generator of Wnt-dependent regeneration and homeostatic cell renewal in the ascidian *Ciona*. *Biol Open* 10(4): bio058526.
- Jeffery, W. R., Li, B., Ng, M. Li, L., Gorički, Š. in Ma, L., (2023). Differentially expressed chaperone genes reveal a stress response required for unidirectional regeneration in the basal chordate *Ciona*. *BMC Biol.* 21: 148.
- Joly, J.-S., Kano, S., Matsuoka, T., Auger, H., Hirayama, K., Satoh, N., Awazu, S., Legendre, L. in Sasakura, Y. (2007). Culture of *Ciona intestinalis* in closed systems. *Dev Dyn.* 236:1832–1840.
- Lecarpentier, Y., Schussler, O., Hébert, J.-L., in Vallée, A. (2019). Multiple targets of the canonical WNT/ β -Catenin signaling in cancers. *Front Oncol.* 9: 1248.
- Mayer, M. P. in Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *CMLS Cell Mol Life Sci.* 62: 670–84.

Turk, T. (2007). Pod gladino Mediterana. Ljubljana: Založba Modrijan, 590 str.

Von Haffner, K. (1933). Die Überzähligen Siphonen und Ocellen von *Ciona intestinalis* L. (Experimentell-morphologische Untersuchungen). Z Wiss Zool. 143: 16–52.

Whittaker, J. (1975). Siphon regeneration in *Ciona*. Nature 255: 224–225.