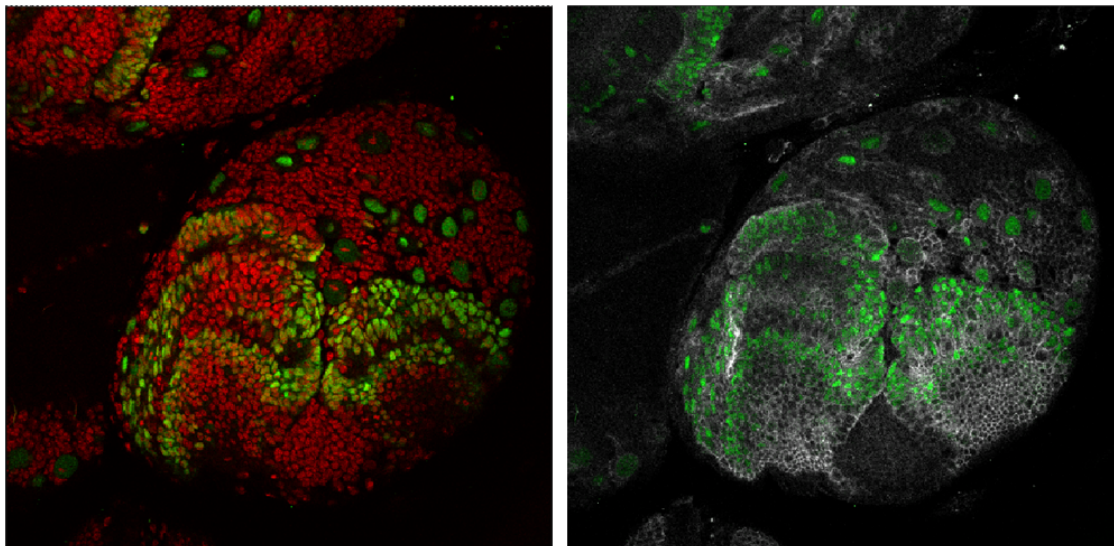


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch στην αυτο-ανανέωση & διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων στον εγκέφαλο της προνύμφης της *D.melanogaster*.



ΕΥΑΝΘΙΑ ΖΑΧΑΡΙΟΥΔΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Χ.ΔΕΛΙΔΑΚΗΣ
Β' ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΤΗΣ : Ν.ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

Ένα θερμό ευχαριστώ:

Στον κ. Δελιδάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του καθώς επίσης και για τη συνεχή καθοδήγηση του.

Σε όλα τα μέλη παλιά και νέα και των δύο ομάδων του εργαστηρίου μας για την ευχάριστη και δημιουργική ατμόσφαιρα που έχουν καλλιεργήσει και για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί αυτή τη χρονιά.

Τέλος, τους γονείς μου καθώς και την ευρύτερη οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη συνεχή ηθική τους υποστήριξη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
SUMMARY.....	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
Εσωτερική & εξωτερική ρύθμιση της αυτό-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων.....	5
Νευρικό σύστημα της <i>D.melanogaster</i> & εσωτερικός μηχανισμός ρύθμισης της αυτό-ανανέωσης.....	6
Εμβρυικοί νευροβλάστες.....	7
Μετεμβρυικοί νευροβλάστες	9
Οι νευροβλάστες ως μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων.....	11
Το μονοπάτι Notch και η διαδικασία αυτό-ανανέωσης-διαφοροποίησης των μετεμβρυικών νευροβλαστών.....	12
Οι πρωτεΐνες HES και η διαδικασία αυτό-ανανέωσης-διαφοροποίησης των μετεμβρυικών νευροβλαστών.....	13
Σκοπός της εργασίας	14
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	15
A. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	16
A1.Σύστημα εκτοπικής υπερέκφρασης UAS-Gal4.....	16
A2.Σύστημα μιτωτικού ανασυνδυασμού FLP/FRT.....	16
A3.Σύστημα MARCM.....	16
A3a.Επαγωγή μωσαϊκών κλώνων MARCM.....	17
A4.Σύστημα TARGET (χρονική και τοπική στόχευση της γονιδιακής έκφρασης).	17
B.ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ.....	19
B1.Μονιμοποίηση προνυμφών.....	19
B2.Χρώσεις	19
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	21
1.Πρότυπα έκφρασης των γονιδίων HES/bHLH-O και συστατικών του μονοπατιού Notch στον εγκέφαλο της προνύμφης της <i>D.melanogaster</i>	22
2.Ο ρόλος του Notch στην ενεργοποίηση των bHLH-O πρωτεϊνών -- έκφραση των bHLH-O πρωτεϊνών σε απώλεια λειτουργίας Notch.....	25
3.Ο ρόλος του Notch στην ενεργοποίηση των bHLH-O πρωτεϊνών -- έκφραση των bHLH-O πρωτεϊνών σε αύξηση λειτουργίας Notch.....	38
4.Επάρκεια και αναγκαιότητα των E(spl)/Dpn για την αυτοανανέωση των νευροβλαστών.....	39
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μετεμβρυϊκοί νευροβλάστες στη *D.melanogaster* είναι νευρικά βλαστικά κύτταρα που προϋπάρχουν και παραμένουν σε ηρεμία μετά το τέλος της εμβρυογένεσης και τα οποία στο στάδιο της προνύμφης εισέρχονται σε ένα νέο κύκλο ασύμμετρων διαιρέσεων για να παράγουν τους νευρώνες που χρειάζονται κατά την επέκταση του κεντρικού νευρικού συστήματος από το έμβρυο στο ενήλικο άτομο. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον σε παγκόσμιο επίπεδο καθώς θα προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες για τους μηχανισμούς διατήρησης και πολλαπλασιασμού των βλαστικών κυττάρων. Στη διαδικασία αυτοανανέωσης – διαφοροποίησης φαίνεται να εμπλέκεται το μονοπάτι Notch καθώς η υπέρ-ενεργοποίησή του οδηγεί σε υπερπλασίες. Κάποια από τα γονίδια bHLH-Orange, γνωστά και ως Hairy-Enhancer of split ή HES, αρκετά από τα οποία είναι στόχοι του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch σε διάφορες διαδικασίες (π.χ δημιουργία κεντρικού (ΚΝΣ) και περιφερικού νευρικού συστήματος στο έμβρυο) φαίνεται να εκφράζονται στους νευροβλάστες (E(spl)mγ, E(spl)mδ και Dpn) ενώ ένα άλλο (Hey) στους νεαρούς νευρώνες. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο ρόλος που διαδραματίζουν αυτά τα HES γονίδια στις διαδικασίες της αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των νευροβλαστών καθώς επίσης και αν βρίσκονται υπό τον έλεγχο του μονοπατιού Notch. Από την ανάλυση κέρδους και απώλειας λειτουργίας του υποδοχέα Notch – καθώς επίσης και άλλων μορίων του μονοπατιού - βρέθηκε ότι τα γονίδια E(spl)mγ, E(spl)mδ και Hey είναι συνέπεια της σηματοδότησης Notch ενώ το γονίδιο Dpn όχι. Τέλος βρέθηκε ότι η υπερέκφραση των γονιδίων E(spl)mγ ή E(spl)mδ είναι ικανή να επάγει υπέρ-πολλαπλασιασμό των μετεμβρυϊκών νευροβλαστών στον κεντρικό εγκέφαλο, φαινότυπο που προκαλεί και η υπέρ-ενεργοποίηση του Notch.

ABSTRACT

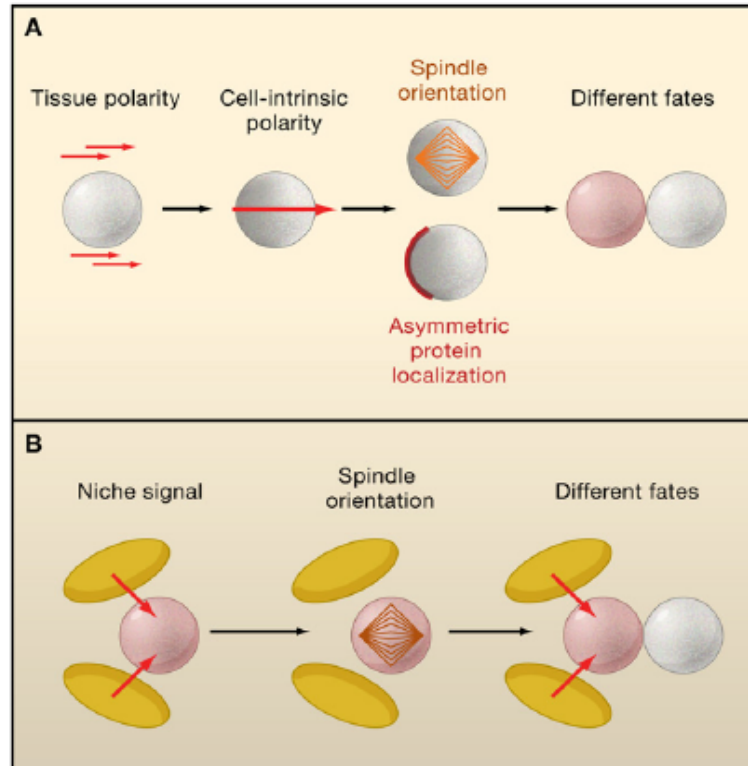
Postembryonic neuroblasts in *D.melanogaster* are neural stem cells that preexist in the central nervous system and remain in quiescence after embryogenesis until larval stages when they enter a new cycle of asymmetric cell divisions to produce all neurons necessary in the adult fly. The mechanisms involved in the self-renewal versus differentiation process have gathered the world-wide interest since they will offer valuable insights into the mechanisms of stem cell proliferation and differentiation. The Notch pathway seems to be involved in the process of self-renewal vs differentiation in the larval brain since its over-activation leads to overgrowths in the central brain. Some of the bHLH-Orange genes, also known as Hairy-Enhancer of split or HES genes, many of which are targets of Notch in several processes (e.g development of CNS and PNS during embryogenesis), seem to be expressed in neuroblasts (E(spl)m γ , E(spl)m8 and Dpn) whereas another gene of the family, Hey, is expressed in the newly synthesized neurons. In this work, we studied the role of these HES genes in self-renewal vs differentiation and the possibility that they are under the control of the Notch pathway. Gain and loss of function analysis for Notch receptor –as well as for other members of the pathway- revealed that E(spl)m γ , E(spl)m8 and Hey are targets of Notch while Dpn is not. Finally, it was found that overexpression of E(spl)m γ or E(spl)m3 is sufficient to provoke overproliferation of neuroblasts in the central larval brain, a phenotype observed during over-expression of Notch.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πολλοί ιστοί, έχουν τη δυνατότητα ανανέωσης ή ανάπλασης ακόμα και κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Αυτό επιτυγχάνεται από μια ομάδα κυττάρων που διαθέτουν, τα επονομαζόμενα βλαστικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται σε κάθε κυτταρική τους διαίρεση δημιουργώντας ένα νέο βλαστικό κύτταρο και ένα διαφοροποιημένο κύτταρο. Τα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται σε φάση ηρεμίας κατά την ενήλικη ζωή. Όταν λάβουν τα κατάλληλα σήματα, εξέρχονται από τη φάση ηρεμίας και ανακτούν την ικανότητά τους να αυτό-ανανεώνονται και να διαφοροποιούνται με αποτέλεσμα να δώσουν τους κυτταρικούς τύπους που χρειάζεται να αναπλαστούν μέσα στον ιστό. Πρόσφατα έχει διατυπωθεί η θεωρία ότι πολλοί όγκοι προέρχονται από τέτοιου είδους βλαστικά κύτταρα τα οποία για διάφορους λόγους, άγνωστους επί το πλείστον, απορυθμίζονται και πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα ([Passague 2006](#)).

Εσωτερική & εξωτερική ρύθμιση της αυτό-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων.

Από έρευνες κυρίως στη *D.melanogaster* φαίνεται ότι η διαδικασία αυτό-ανανέωσης –διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων ρυθμίζεται είτε από έναν εσωτερικό μηχανισμό είτε εξωτερικά. Στην πρώτη περίπτωση, τα βλαστικά κύτταρα εγκαθιδρύουν έναν άξονα πολικότητας κατά την μεσόφαση, τον οποίο αξιοποιούν αργότερα κατά τη μίτωση για την ορθή τοποθέτηση διαφόρων μορίων-καθοριστών της κυτταρικής τύχης. Παράλληλα, ο προσανατολισμός της μιτωτικής ατράκτου κατά μήκος του ιδίου άξονα πολικότητας εξασφαλίζει τον ασύμμετρο διαχωρισμό των καθοριστών μονάχα σε ένα εκ των δύο θυγατρικών κυττάρων το οποίο και οδηγείται σε διαφοροποίηση ενώ το άλλο διατηρεί το χαρακτήρα βλαστικού κυττάρου (εικόνα 1A). Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα στη *D.melanogaster* φαίνεται να ρυθμίζουν την ικανότητα αυτό-ανανέωσης-διαφοροποίησής τους κατά αυτόν τον τρόπο. Ο δεύτερος μηχανισμός αξιοποιεί εξωτερικά μηνύματα προερχόμενα από το γειτονικό περιβάλλον του βλαστικού κυττάρου, τον επονομαζόμενο «θώκο», για τη διατήρηση της ικανότητας αυτό-ανανέωσης. Το βλαστικό κύτταρο δεχόμενο τα μηνύματα αυτά, προσανατολίζει την μιτωτική του άτρακτο κάθετα στο επίπεδο του «θώκου» επιτυγχάνοντας έτσι την στενή επαφή με αυτήν ενός μονάχα θυγατρικού κυττάρου μετά τη μίτωση, το οποίο και θα διατηρήσει την ικανότητα αυτό-ανανέωσης (εικόνα 1B). Αυτός ο μηχανισμός αυτό-ανανέωσης απαντάται στα βλαστικά κύτταρα των γονάδων τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά άτομα της *D.melanogaster* ([Knoblich, 2008](#)).

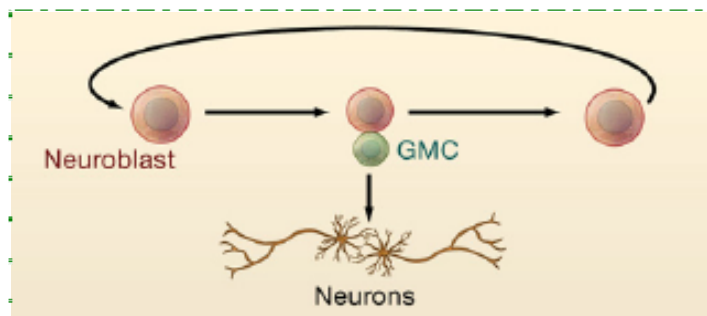


Εικόνα 1: εσωτερική (A) και εξωτερική (B) ρύθμιση της αυτό-ανανέωσης των νευροβλαστών.

● Νευρικό σύστημα της *D.melanogaster* & εσωτερικός μηχανισμός ρύθμισης της αυτό-ανανέωσης.

Η μετάβαση από το νευρικό σύστημα του εμβρύου σε αυτό του ενήλικου στη *D.melanogaster* είναι ένα καλό μοντέλο σύστημα για την εξιχνίαση των εσωτερικών μηχανισμών αυτοανανέωσης-διαφοροποίησης που αναφέρονται παραπάνω. Στην *D.melanogaster*, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα, οι επονομαζόμενοι νευροβλάστες, πολλαπλασιάζονται κατά τη διάρκεια 2 νευρογόνων περιόδων. Στην πρώτη νευρογόνο περίοδο, την εμβρυϊκή, οι νευροβλάστες δημιουργούν τη βασική δομή του νευρικού συστήματος η οποία θα συντηρήσει τις βασικές λειτουργίες κίνησης και τροφής κατά τα προνυμφικά στάδια. Στο τέλος της περιόδου αυτής, οι περισσότεροι νευροβλάστες παύουν να διαιρούνται και εισέρχονται σε μια φάση ηρεμίας. Κατά τη δεύτερη νευρογόνο περίοδο, στο στάδιο της προνύμφης, οι νευροβλάστες αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται ξανά και έτσι παράγεται η πλειοψηφία των νευρώνων που θα απαρτίσουν τον κεντρικό εγκέφαλο και την κοιλιακή νευρική χορδή και οι οποίοι είναι αναγκαίοι για να υποστηρίξουν τη ζωή του ενήλικου ατόμου (Knoblich, 2008). Η επανενεργοποίηση των νευροβλαστών κατά την προνυμφική περίοδο δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως. Είναι μονάχα γνωστό ότι συμμετέχουν σε αυτήν τα σήματα Hedgehog και Branchless (Barrett et al., 2008).

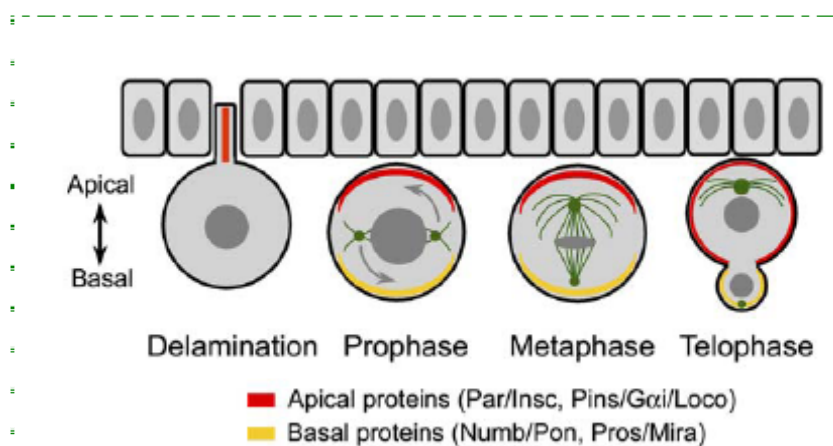
Ο πολλαπλασιασμός των νευροβλαστών και στις δύο περιόδους συνίσταται σε ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση η οποία παράγει έναν νέο νευροβλάστη και ένα γαγγλιακό μητρικό κύτταρο (Gaglion Mother Cell ή GMC) το οποίο με τη σειρά του θα διαιρεθεί μια φορά και θα δώσει δύο μετα-μιτωτικούς απογόνους (νευρώνες ή/και γλοία) (εικόνα 2)(Chia et al., 2008; Knoblich 2008). Έτσι, η μιτωτική δραστηριότητα των νευροβλαστών, ενώ διατηρεί τον αριθμό των βλαστοκυττάρων σταθερό, έχει ως συνέπεια τη γένεση μέχρι και εκατοντάδων νευρώνων ανά νευροβλάστη.



Εικόνα 2: η ασύμμετρη διαίρεση των νευροβλαστών οδηγεί στη δημιουργία ενός νέου νευροβλάστη και ενός γαγγλιακού μητρικού κυττάρου (GMC) το οποίο διαιρούμενο τελικά θα δώσει δύο νευρώνες.

● Εμβρυικοί νευροβλάστες

Πολλά από τα κύρια συστατικά του γενετικού μηχανισμού που υποστηρίζει την ασύμμετρη διαίρεση στους εμβρυικούς νευροβλάστες έχουν αποσαφηνιστεί. Οι εμβρυικοί νευροβλάστες καθορίζονται αρχικά από μια μονοστοιβάδα επιθηλιακών κυττάρων μέσω της διαδικασίας στις πλευρικής αναστολής. Μόλις καθοριστούν, οι νευροβλάστες διαχωρίζονται από το επιθηλιακό στρώμα και εισέρχονται σε μίτωση. Στην πρόφαση, τα 2 κεντροσώματα μεταναστεύουν πλευρικά στις απέναντι πλευρές του νευροβλάστη με παράλληλη ευθυγράμμιση στο επιθηλιακό στρώμα. Στη μετάφαση, η μιτωτική άτρακτος περιστρέφεται κατά 90° και προσανατολίζεται κατά μήκος του κορυφαίο-βασικού άξονα. Στην κυτοκίνηση, προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα με διακριτό μέγεθος και κυτταρική τύχη. Το μεγαλύτερο κορυφαίο κύτταρο διατηρεί την ταυτότητα του νευροβλάστη ενώ το μικρότερο, βασικό κύτταρο μετατρέπεται στο γαγγλιακό μητρικό κύτταρο (GMC) (εικόνα 3) (Yu et al. 2006).



Εικόνα 3: Ο προσανατολισμός της μιτωτικής άτρακτου στην ασύμμετρη διαίρεση του εμβρυικού νευροβλάστη. Η κορυφαίο-βασική πολικότητα του επιθηλίου διατηρείται και στον νέο-σχηματισμένο νευροβλάστη με τη βοήθεια των **κορυφαία** τοποθετημένων **πρωτεϊνικών συμπλόκων**. Στην πρόφαση τα κεντροσώματα είναι ευθυγραμμισμένα παράλληλα με το επιθήλιο. Στην μετάφαση περιστρέφονται κατά 90° και ευθυγραμμίζονται παράλληλα με τον κορυφαίο-βασικό άξονα. Ταυτόχρονα, το **σύμπλοκο Par**, προωθεί τις **πρωτεΐνες καθοριστές της κυτταρικής τύχης** στην **βασική πλευρά** έτσι ώστε να μετα βούν στο **GMC** μετά το πέρας της μίτωσης και να οδηγήσουν στη διαφοροποίησή του.

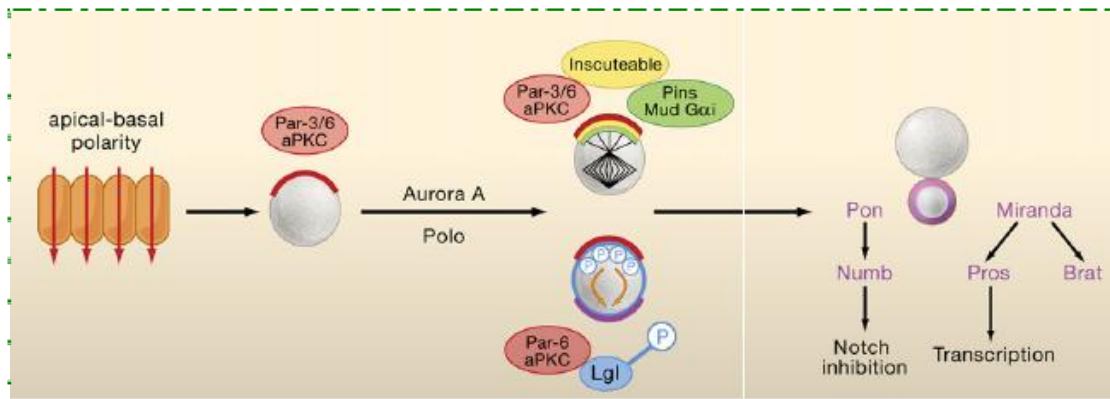
Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω, προκύπτουν 3 κύρια σημεία κατά την ασύμμετρη διαίρεση των νευροβλαστών; α) η υιοθέτηση διαφορετικής κυτταρικής

τύχης από τα δύο θυγατρικά κύτταρα του νευροβλάστη, γεγονός που οφείλεται στον άνισο διαχωρισμό διαφόρων πρωτεϊνών προς ένα εκ των δύο θυγατρικών κυττάρων όπου δρουν ως παράγοντες διαφοροποίησης του και το μετατρέπουν σε GMC β) ο σωστός προσανατολισμός της μιτωτικής ατράκτου κάθετα στο επίπεδο του επιθηλίου και κατά μήκος του κορυφαίο-βασικού άξονα του νευροβλάστη έτσι ώστε να εξασφαλισθεί ο διαχωρισμός των παραγόντων διαφοροποίησης προς τα GMCs και γ) η ίδια η ασυμμετρία της ατράκτου ως προς το μέγεθός της γεγονός που θα οδηγήσει στην παραγωγή ενός θυγατρικού κυττάρου μεγαλύτερου σε μέγεθος (νευροβλάστης) και ενός μικρότερου σε μέγεθος (GMC).

Τα 3 αυτά κύρια χαρακτηριστικά ρυθμίζονται από μια ομάδα πρωτεϊνών που είναι τοποθετημένες στην κορυφαία πλευρά του κυττάρου ξεκινώντας από τη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Στις πρωτεΐνες αυτές ανήκουν οι πρωτεΐνες του συμπλόκου Par: Bazooka (Baz), Par6, atypical-Protein Kinase C (aPKC), η πρωτεΐνη Inscuteable (Insc), τα μέλη του συμπλόκου Pins: Partner of Inscuteable (Pins), οι πρωτεΐνες Gai και η Locomotion defects (Loco) και μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την Pins, η Mushroom body defective (Mud) (Chia et al., 2008; Knoblich 2008).

Αναλυτικότερα, το εξελικτικά συντηρημένο πρωτεϊνικό σύμπλοκο Par εγκαθιδρύει αρχικά την κορυφαίο-βασική πολικότητα των επιθηλιακών κυττάρων. Στη συνέχεια διατηρείται στον νευροβλάστη μετά την αποκοπή του από το μονόστοιβο επιθήλιο όπου και χρησιμεύει σε δύο λειτουργίες. Πρώτον, στρατολογεί την πρωτεΐνη Insc η οποία ενισχύει τη διατήρηση της πολικότητας του συμπλόκου Par και κατ' επέκταση την πολικότητα του νευροβλάστη (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999). Δεύτερον, αποκλείει την τοποθέτηση καθοριστών της κυτταρικής τύχης στην κορυφαία πλευρά και προωθεί την τοποθέτησή τους απέναντι, στη βασική πλευρά. Η προώθηση των πρωτεϊνών καθοριστών στη βασική πλευρά του νευροβλάστη επιτυγχάνεται από τις κορυφαίες πρωτεΐνες μέσω της ενεργοποίησης των κυτταροπλασματικών παραγόντων Discs large (Dlg) και Lethal (2) giant larvae (Lgl) στην κατάλληλη θέση. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της Lgl από την κορυφαία τοποθετημένη aPKC οδηγεί στην απενεργοποίηση της πρώτης στην κορυφαία πλευρά ενώ η μη-φωσφορυλίωσή της Lgl στη βασική πλευρά την διατηρεί ενεργή και ικανή να συμβάλλει στην σωστή τοποθέτηση των πρωτεϊνών – καθοριστών και των συνοδών τους (Betschinger et al., 2003).

Παράλληλα, η πρωτεΐνη Insc, πέρα από τη διατήρηση της πολικότητας του συμπλόκου Par, κατευθύνει την ευθυγράμμιση της μιτωτικής ατράκτου κατά μήκος του κορυφαίο-βασικού άξονα πολικότητας (Kraut et al., 1996). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης της με το σύμπλοκο Pins. Έτσι το σύμπλοκο Pins τοποθετείται κορυφαία και η πρόσδεση της πρωτεΐνης Gai στην Pins καθιστά ικανή τη δεύτερη να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη Mud. Η πρωτεΐνη Mud με τη σειρά της μετατρέπεται άγνωστο πως ακριβώς σε αποβάθρα για αστρικούς μικροσωληνίσκους οι οποίοι έλκουν τυχαία έναν από τους δύο πόλους της ατράκτου στην κορυφαία πλευρά, με αποτέλεσμα την περιστροφή και τον κορυφαίο-βασικό προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου κατά τη μετάφαση (Siller et al., 2006; Izumi et al., 2006; Bowman et al., 2006).



Εικόνα 4: Ο μηχανισμός ασύμμετρης διαίρεσης των εμβρυικών νευροβλαστών. Η κορυφαίο-βασική πολικότητα του επιθηλίου διατηρείται στον νευροβλάστη με τη βοήθεια των συμπλόκων **Par** και **Pins** τα οποία αλληλεπιδρούν μέσω της πρωτεΐνης **Insc**. Το **σύμπλοκο Par** μέσω της φωσφορυλίωσης της **Lgl** από την **aPKC** στην κορυφαία πλευρά αποτρέπει την τοποθέτηση των καθοριστών της κυτταρικής τύχης **Numb**, **Pros** και **Brat** κορυφαία και διασφαλίζει την τοποθέτησή τους στη βασική πλευρά όπου και αγκυροβολούν με τη βοήθεια των πρωτεϊνών **Pon** και **Miranda** έως ότου διαχωριστούν με τη μίτωση στο GMC.

Όπως προαναφέρθηκε, ο απώτερος σκοπός του παραπάνω μηχανισμού είναι η ασύμμετρη τοποθέτηση των πρωτεϊνών καθοριστών της κυτταρικής τύχης και των μοριακών τους συνοδών στη βασική πλευρά έτσι ώστε θα μεταβιβαστούν στο κύτταρο GMC και εκεί οι πρώτες να προωθήσουν τη διαφοροποίησή του.

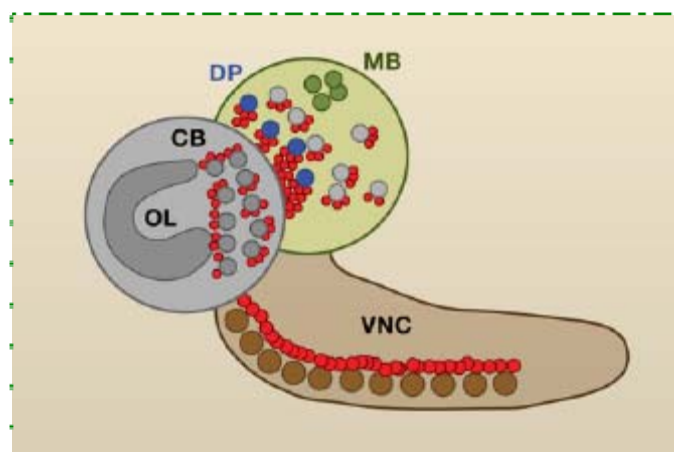
Στους καθοριστές της κυτταρικής τύχης εντάσσονται η πρωτεΐνη καταστολέας του Notch, Numb (Knoblich et al., 1995; Knoblich 2008), ο μεταγραφικός παράγοντας Prospero (Hirata et al., 1995; Knoblich et al., 1995; Knoblich 2008) και η πρωτεΐνη Brat (φέρει τη συντηρημένη περιοχή NHL) (Bello et al., 2006; Betschinger et al., 2006; Lee et al., 2006c; Knoblich 2008) ενώ στους μοριακούς συνοδούς τους ανήκουν οι πρωτεΐνες Miranda και Partner of Numb (Pon) (Knoblich 2008). Οι πρωτεΐνες μοριακοί συνοδοί φροντίζουν για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών-καθοριστών στη βασική πλευρά καθώς αλληλεπιδρούν με αυτές και τις αγκυροβολούν στο περίβλημα του νευροβλάστη. Έτσι η πρωτεΐνη Miranda αλληλεπιδρά με τις Prospero και Brat ενώ η πρωτεΐνη Pon αλληλεπιδρά με τη Numb (Betschinger and Knoblich, 2004). Στο κύτταρο GMC, οι πρωτεΐνες Numb, Prospero και Brat πιστεύεται ότι εμποδίζουν την αυτό-ανανέωση και προωθούν την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση. Η πρωτεΐνη Numb πιθανώς το επιτυγχάνει αυτό προωθώντας την ενδοκύττωση του υποδοχέα Notch, με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της σηματοδότησης Notch σε σχέση με τον νευροβλάστη (Berdnik et al., 2002; Wang et al., 2006). Η πρωτεΐνη Prospero εισέρχεται στον πυρήνα του GMC κυττάρου μετά την αποικοδόμηση του συνοδού της Miranda και εκεί καταστέλλει την έκφραση γονιδίων του κυτταρικού κύκλου και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που απαιτούνται για την τελική διαφοροποίηση (Choksi et al., 2006; Ikeshima-Ktaoka et al., 1997; Li and Vaessin, 2000; Shen et al., 1997). Η πρωτεΐνη Brat ίσως δρα για να προλαμβάνει την κυτταρική αύξηση (Betschinger et al., 2006; Frank et al., 2002).

Κατά την εμβρυογένεση, πέρα από τους εμβρυικούς νευροβλάστες, ορισμένα GMC κύτταρα έχουν βρεθεί να υπόκεινται σε ασύμμετρες διαιρέσεις και οι διαιρέσεις αυτές διέπονται από όμοιους γενετικούς μηχανισμούς με αυτούς που περιγράφονται παραπάνω (Buescher et al., 1998; Wai et al., 1999). Χαρακτηριστικά, κατά την ασύμμετρη διαίρεση του GMC, η πρωτεΐνη Numb δρα ως εσωτερικός καθοριστής της κυτταρικής τύχης. Τοποθετείται ασύμμετρα σε κάποια GMCs και διαχωρίζεται σε έναν εκ των απογόνων όπου δρα ως ανταγωνιστής του μονοπατιού

Notch. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι δύο μεταμιτωτικοί απόγονοι του GMC να έχουν διακριτές ταυτότητες καθώς το ένα κύτταρο κληρονομεί την πρωτεΐνη Numb, και χάνει την ενεργότητα του μονοπατιού Notch ενώ το άλλο, απουσία της Numb, διατηρεί το μονοπάτι Notch ενεργό Notch (Wai et al., 1999). Η πρωτεΐνη Pon βοηθάει στην ασύμμετρη τοποθέτηση της πρωτεΐνης Numb σε ένα κύτταρο GMC (Lu et al., 1998). Επιπλέον οι πρωτεΐνες Insc και Pins χρειάζονται για την ασύμμετρη τοποθέτηση και το διαχωρισμό της Numb με απώτερο σκοπό τη διακρίση της τύχης μεταξύ των αδελφικών νευρώνες (Buescher et al., 1998; Yu et al., 2000)

● Μετεμβρυικοί νευροβλάστες

Στον εγκέφαλο της προνύμφης κατά τη δεύτερη νευρογόνο περίοδο, όπως προαναφέρθηκε, οι νευροβλάστες παύουν να βρίσκονται σε ηρεμία και αρχίζουν να διαιρούνται. Ανάλογα με τη θέση τους εντάσσονται σε διάφορες κατηγορίες. Στην κοιλιακή χορδή, εντοπίζονται περίπου 30 νευροβλάστες ανά ημιμεταμερές και σχηματίζουν τους νευρώνες των θωρακικών και κοιλιακών γαγγλίων. Στον κεντρικό εγκέφαλο, υπάρχουν περίπου 85 νευροβλάστες ανά εγκεφαλικό λοβό και εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς τη διάρκεια του κυτταρικού τους κύκλου και τη ρύθμιση της αυτό-ανανέωσης. Χαρακτηριστικά, μια ομάδα περίπου 10 ραχιαίο-οπίσθιων νευροβλαστών, οι επονομαζόμενοι PAN νευροβλάστες (Posterior Asense Negative Neuroblasts) είναι πιο επιρρεπείς σε μεταλλαγές ογκό-κατασταλτικών γονιδίων, παράγουν περισσότερους απογόνους συγκριτικά και ακολουθούν διαφορετική γενεαλογία όπου πιθανόν τα GMCs να διαιρούνται περισσότερο από μια φορά. (Bowman et al., 2008; Bello et al., 2008). Τέλος υπάρχουν οι νευροβλάστες του οπτικού λοβού οι οποίοι ευθύνονται για το σχηματισμό των οπτικών νευρών και προκύπτουν από δύο πολύστοιβα νεύρο-επιθήλια, τα εσωτερικά και εξωτερικά κέντρα πολλαπλασιασμού (εικόνα 5) (Knoblich et al., 2008).



Εικόνα 5: Οι διάφορες κατηγορίες νευροβλαστών στον εγκέφαλο της προνύμφης. Απεικονίζονται οι **νευροβλάστες της κοιλιακής χορδής (VNC)**, οι **νευροβλάστες του κεντρικού εγκεφάλου (CB)**, οι **PAN νευροβλάστες** ραχιαία και οπίσθια του κεντρικού εγκεφάλου (**DP**), οι **νευροβλάστες του mushroom body (MB)** και οι νευροβλάστες του οπτικού λοβού (**OL**).

Πρόσφατες έρευνες υποδηλώνουν ότι οι μετεμβρυικοί νευροβλάστες χρησιμοποιούν το συντηρημένο μηχανισμό ασύμμετρης διαίρεσης των εμβρυικών νευροβλαστών για να διανείμουν τους παράγοντες πολλαπλασιασμού στο νευροβλάστη και τους παράγοντες διαφοροποίησης στα GMCs με τη μόνη διαφορά ότι οι μετεμβρυικοί νευροβλαστες στον κεντρικό εγκέφαλο διαιρούνται χωρίς συγκεκριμένο προσανατολισμό. Χαρακτηριστικά, το παλιό κεντρόσωμα διαθέτει

συγκεκριμένη θέση καθώς βρίσκεται πάντα κοντά στο σύμπλοκο Insc/Pins/Gai στην κορυφαία πλευρά. Το νέο κεντρόσωμα αρχικά μεταναστεύει τυχαία μέσα στο νευροβλάστη και αργότερα αποκτά καθορισμένη θέση στον απέναντι πόλο (Knoblich 2008).

Οι νευροβλάστες ως μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων.

Οι απλές γενεαλογίες των εμβρυικών νευροβλαστών τους καθιστούν πολύτιμο σύστημα μελέτης των βασικών αρχών της ασύμμετρης διαίρεσης. Ωστόσο, το ενδιαφέρον για την ανακάλυψη ενός πραγματικού μοντέλου βλαστικών κυττάρων έχει στραφεί τα τελευταία χρόνια στους νευροβλάστες της προνύμφης. Οι μετεμβρυϊκοί αυτοί νευροβλάστες μοιράζονται πολλά χαρακτηριστικά με τα βλαστικά κύτταρα. Σε αντίθεση με τους εμβρυϊκούς νευροβλάστες, που μικραίνουν σε μέγεθος έπειτα από κάθε κυτταρική διαίρεση, οι μετεμβρυϊκοί νευροβλάστες επανέρχονται στο αρχικό τους μέγεθος έπειτα από κάθε διαίρεση με αποτέλεσμα να μπορούν πρώτον να διαιρεθούν εκατοντάδες φορές και δεύτερον να παράγουν μεγάλο αριθμό απογόνων (Knoblich et al., 2008). Η ρύθμιση της αυτό-ανανέωσης των μετεμβρυϊκών νευροβλαστών ενάντια στη διαφοροποίηση ελέγχεται στενά κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος της προνύμφης (ΚΝΣ) και σχετίζεται άμεσα με τις ασύμμετρες διαιρέσεις. Ο στενός αυτός έλεγχος εναρμονίζεται πλήρως με την πρόσφατα διατυπωμένη θεωρία όπου πολλοί όγκοι προέρχονται από καρκινικά βλαστικά κύτταρα στα οποία ο φυσιολογικός έλεγχος αυτό-ανανέωσης ενάντια στη διαφοροποίηση έχει διαταραχθεί (Passague 2006). Διαταραχές της διαδικασίας της ασύμμετρης διαίρεσης των μετεμβρυϊκών νευροβλαστών οδηγούν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και άμεσο τερματισμό της διαφοροποίησης. Χαρακτηριστικά, όταν οι εγκεφαλικοί ιστοί μεταλλαγμένων προνυμφών για τα γονίδια *pins*, *mira*, *numb* ή *pros* μεταμοσχεύονται σε αγρίου τύπου ενήλικα, σχηματίζουν κακοήθεις όγκους που σκοτώνουν ραγδαία τον ξενιστή (Caussinus & Gonzales 2005). Επιπλέον, όταν μια μορφή της πρωτεΐνης aPKC, η οποία κληρονομείται από το νευροβλάστη και είναι αναγκαία για την αυτό-ανανέωσή του, υπερεκφράζεται σε όλη την επιφάνειά του, οδηγεί σε υπερπολλαπλασιασμό (Lee et al., 2006b). Αντίθετα, η απώλεια των παραγόντων διαφοροποίησης Brat και Pros – οι οποίοι όπως προαναφέρθηκε διαχωρίζονται ασύμμετρα στο GMC καταστέλλοντας την αυτό-ανανέωση και προωθώντας τη διαφοροποίηση – οδηγεί σε μαζική παραγωγή νευροβλαστών σε βάρος των νευρώνων (Bello et al., 2006; Betschinger et al., 2006; Lee et al., 2006b). Σε μεταλλάγματα Igl, η λάθος τοποθέτηση των aPKC και Brat/Pros οδηγεί στο σχηματισμό όγκων στον εγκέφαλο της προνύμφης (Betschinger et al., 2006; Lee et al., 2006a,b). Επίσης κάποιες κινάσες καθοριστικές για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου όπως η AuroraA και η Polo φαίνεται να εμπλέκονται στη στενή ρύθμιση της αυτό-ανανέωσης – διαφοροποίησης καθώς μεταλλαγές σε αυτές οδηγούν στο σχηματισμό όγκων προερχόμενων από βλαστικά κύτταρα (Lee et al. 2006a; Wang et al., 2006; Wang et al., 2007). Οι δύο αυτές κινάσες ρυθμίζουν τον προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου και την ασύμμετρη τοποθέτηση της Numb. Η ρύθμιση της Numb από την AuroraA γίνεται με άγνωστο τρόπο ενώ από την Polo μέσω της φωσφορυλίωσης της Pon (πρωτεΐνη adaptor της Numb)(Wang et al., 2007).

Παρά την πρόοδο των τελευταίων χρόνων ο λεπτομερής μηχανισμός που διέπει τη διαδικασία της αυτοανανέωσης-διαφοροποίησης των μετεμβρυϊκών νευροβλαστών δεν έχει κατανοηθεί πλήρως.

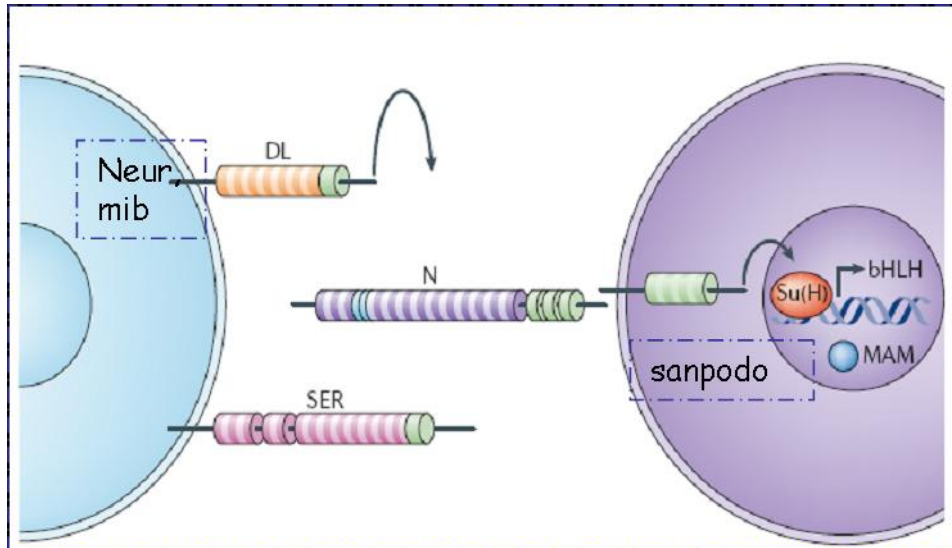
🌿 Το μονοπάτι Notch και η διαδικασία αυτό-ανανέωσης-διαφοροποίησης των μετεμβρυικών νευροβλαστών.

Η ρύθμιση της πρωτεΐνης Numb, η οποία δρα ως καταστολέας του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch φαίνεται να είναι σημαντική στις ασύμμετρες διαιρέσεις και στην λήψη της απόφασης αυτό-ανανέωσης – διαφοροποίησης καθώς η απώλειά της οδηγεί σε ογκογένεση.

Ο σημαντικός ρόλος που φαίνεται να διαδραματίζει η πρωτεΐνη Numb στις ασύμμετρες διαιρέσεις των μετεμβρυικών νευροβλαστών παραπέμπει στον ιδιαίτερο ρόλο της πρωτεΐνης αυτής σε μια άλλη ασύμμετρη διαίρεση, αυτή του πρόδρομου αισθητήριου οργάνου (SOP). Τα πρόδρομα αισθητήρια κύτταρα δίνουν τα κύτταρα των εξωτερικών αισθητήριων οργάνων του περιφερικού νευρικού συστήματος. Κατά τη διαίρεση των SOPs, η πρωτεΐνη Numb διαχωρίζεται ασύμμετρα στο pIIb κύτταρο, καταστέλλει εκεί το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch το οποίο παραμένει ενεργό στο άλλο θυγατρικό κύτταρο, το pIIa, με αποτέλεσμα να καθορίζεται η τύχη των κυττάρων αυτών. Το pIIb θα δώσει το pIIIb (μελλοντικός νευρώνας και στηρικτικό κύτταρο) και το γλοιακό κύτταρο ενώ το pIIa θα δώσει τη σμήριγγα και το περίβλημα της σμήριγγας (Schweisguth, 2004; Le Borgne et al., 2005).

Ίσως λοιπόν και στις διαιρέσεις κάποιων μετεμβρυικών νευροβλαστών το μονοπάτι Notch, βρισκόμενο υπό τον έλεγχο της πρωτεΐνης Numb, να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στις κυτταρικές τύχες των απογόνων των βλαστικών κυττάρων. Ήδη φαίνεται από μελέτες άλλων ερευνητών ότι η υπέρ-ενεργοποίηση Notch μπορεί να προκαλέσει υπερπλασία νευροβλαστών στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο (Wang et al. 2006) και συγκεκριμένα υπερπλασία των νευροβλαστών της γενεαλογίας PAN (Bowman et al., 2008). Αντίθετα, στην κοιλιακή χορδή το μονοπάτι Notch φαίνεται να μην παίζει κάποιο ρόλο τον πολλαπλασιασμό των νευροβλαστών (Almeida and Bray, 2005). Η περαιτέρω μελέτη του ρόλου του μονοπατιού Notch στους μετεμβρυικούς νευροβλάστες θα διαφωτίσει τα αίτια για την ποικιλομορφία αυτή σε φαινοτύπους που απαντάται στις διάφορες θέσεις μέσα στον εγκέφαλο της προνύμφης.

Εν συντομία, είναι γνωστό ότι κατά τη σηματοδότηση Notch, οι δεσμευτές του μονοπατιού Notch, Delta και Ser, αφού ενδοκυττωθούν στο κύτταρο που στέλνει το σήμα, μέσω της δράσης των E3 λιγασών της ουβικουιτίνης Neur και Mib, επανέρχονται ώριμοι πλέον στην πλασματική μεμβράνη για να αλληλεπιδράσουν με τον υποδοχέα Notch στο απέναντι κύτταρο που θα λάβει τη σηματοδότηση. Έπειτα από την αλληλεπίδραση αυτή, ο υποδοχέας Notch υπόκειται σε πρωτεολυτική επεξεργασία και το ενδοκυττάριο τμήμα του μεταβαίνει στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά με τον έως τότε καταστολέα Su(H) για να ενεργοποιήσει τα γονίδια στόχους του μονοπατιού [Enhancer of split (E(spl)), Vestigial (vg), Wingless (wg) και Cut]. Για την μεταγωγή της σηματοδότησης στον πυρήνα απαιτείται ενίοτε η παρουσία της πρωτεΐνης Sanpodo στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου δέκτη (Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Baron, 2003; Skeath & Doe, 1998).



Εικόνα 6: το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch και τα κύρια εμπλεκόμενα σε αυτό μόρια.

● Οι πρωτεΐνες HES και η διαδικασία αυτό-ανανέωσης-διαφοροποίησης των μετεμβρυικών νευροβλαστών.

Επιπλέον, μελέτες της νευρογένεσης στα θηλαστικά, αποκάλυψαν ότι οι πρωτεΐνες HES, μεταγραφικοί στόχοι του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch, εκφράζονται σε νευρικά βλαστοκύτταρα κατά την εμβρυογένεση και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της νευρικής διαφοροποίησης. Συγκεκριμένα, απουσία των HES1, HES3 και HES5 στον εγκέφαλο ποντικού, τα βλαστοκύτταρα του νευροεπιθηλίου δεν πολλαπλασιάζονται επαρκώς, διαφοροποιούνται πρόωρα σε νευρώνες και εξαλείφονται νωρίς προτού προλάβουν να δημιουργήσουν τους τελευταίους κυτταρικούς τύπους-π.χ αστροκύτταρα (Kageyama et al. 2007). Στη Δροσόφιλα οι κυτταρικές διεργασίες που γεννούν το νευρικό σύστημα διαφέρουν σημαντικά από αυτές των θηλαστικών. Επίσης στο γονιδίωμα της Δροσόφιλας δεν υπάρχουν ορθόλογα γονίδια των HES1, 3 και 5, αλλά υπάρχουν 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας καταστολέων (bHLH-Orange) : τα 7 *E(spl)* (*mβ*, *mδ*, *mγ*, *m5*, *m7*, *m8*) καθώς επίσης και τα *dpn*, *Side*, *Hey*, *Her*, *hairy* και *cwo*.

Η οικογένεια των πρωτεϊνών bHLH-Orange ή HES εντάσσεται στην ευρύτερη υπεροικογένεια των bHLH μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχουν σε διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες. Χαρακτηρίζεται από τις περιοχές bHLH, Orange και από το μοτίβο WRPW. Η περιοχή bHLH αποτελείται από 60 αμινοξέα τα οποία διαμορφώνουν μία βασική περιοχή (basic) και δύο αμφιπαθητικές α-έλικες που χωρίζονται από μια θηλειά μεταβλητού μήκους. Η βασική περιοχή (13 αμινοξέα) χρησιμεύει για την πρόσδεση της πρωτεΐνης στο DNA. Η περιοχή HLH προάγει τον ομο- ή ετερό-διμερισμό των πρωτεϊνών αυτών (Murre et al. 1994). Η περιοχή Orange αποτελείται από δύο έλικες της έλικα III και IV, είναι συντηρημένη σε όλες τις πρωτεΐνες bHLH-O και σχετίζεται με αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών. Τέλος το τετραπεπτίδιο WRPW επιστρατεύει έναν συγκαταστολέα, τον Groucho να βοηθήσει τις πρωτεΐνες HES να φέρουν εις πέρας την κατασταλτική τους δράση. (Fisher et al. 1996, Fisher&Caudy 1998)

Τα 7 γονίδια *E(spl)* της οικογένειας bHLH-O είναι γνωστοί στόχοι του μονοπατιού Notch κατά τη δημιουργία του κεντρικού (ΚΝΣ) και περιφερικού νευρικού συστήματος στο έμβρυο της *D.melanogaster*. Όμως αντίθετα με τα θηλαστικά HES, τα γονίδια *E(spl)* εκφράζονται όχι στον ίδιο τον νευροβλάστη, αλλά στα γύρω κύτταρα, σε μια διαδικασία πλευρικής αναστολής, όπου σηματοδότηση μέσω Notch αποτρέπει τα κύτταρα αυτά από το να υιοθετήσουν τη νευρική τύχη. Αντίθετα, ο νευροβλάστης (που στέλνει, αλλά δε λαμβάνει το σήμα Notch) εκφράζει μια άλλη bHLH-O πρωτεΐνη, την Dpn. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων αυτών στον εγκέφαλο της προνύμφης παραμένει ανεξιχνίαστο.

● Σκοπός της εργασίας

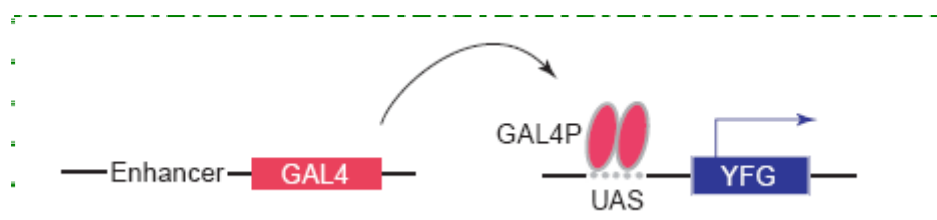
Η διαθέσιμη βιβλιογραφία εμπλέκει το μονοπάτι Notch στον έλεγχο της αυτό-ανανέωσης των μετεμβρυικών νευροβλαστών της *D.melanogaster* αλλά ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος. Μάλιστα υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις για το ρόλο του μονοπατιού στη συγκεκριμένη διαδικασία (Almeida & Bray, 2005; Wang et al., 2007). Το γεγονός ότι μέλη της οικογένειας των HES πρωτεϊνών, που αποτελούν μεταγραφικούς στόχους του μονοπατιού Notch, ελέγχουν την αυτοανανέωση των νευροβλαστών κατά την εμβρυογένεση των θηλαστικών δημιουργεί υποψίες ότι ίσως και στους μετεμβρυικούς νευροβλάστες στη *D.melanogaster* οι πρωτεΐνες HES να είναι οι τελεστές του μονοπατιού Notch στον έλεγχο της αυτό-ανανέωσης. Ωστόσο ακόμα και το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων HES στον εγκέφαλο της προνύμφης παραμένει ανεξιχνίαστο. Στόχος της εργασίας αυτής είναι μία πρώτη μελέτη του ακριβή ρόλου που διαδραματίζει το μονοπάτι Notch και οι πρωτεΐνες HES στη διαδικασία της αυτό-ανανέωσης/ διαφοροποίησης των νευροβλαστών.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

1. Σύστημα εκτοπικής υπερέκφρασης UAS-Gal4

Το δυαδικό σύστημα εκτοπικής υπερέκφρασης UAS-GAL40 επιτρέπει την επιλεκτική έκφραση γονιδίων σε ιστούς όπου αυτά δεν απαντώνται φυσιολογικά. Συγκεκριμένα ένα επιθυμητό προς έκφραση διαγονίδιο τοποθετείται υπό τον έλεγχο υποκινητή που φέρει ρυθμιστικά στοιχεία UAS σε ένα άτομο. Παράλληλα, σε ένα άλλο άτομο ένας ιστοειδικός υποκινητής ή ενισχυτής οδηγεί την έκφραση της πρωτεΐνης-ενεργοποιητή GAL-4 με ένα συγκεκριμένο πρότυπο. Όταν τα δύο παραπάνω άτομα διασταυρωθούν, οι απόγονοί τους θα φέρουν και τα δύο διαγονίδια με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη GAL4 να αναγνωρίσει τα ρυθμιστικά στοιχεία UAS και να ενεργοποιήσει την έκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου κατά το ιστό-ειδικό πρότυπο έκφρασης της ίδιας (Phelps and Brand, 1998).



Εικόνα 7: Το σύστημα εκτοπικής υπερέκφρασης UAS-Gal4. Ένας ενισχυτής καθοδηγεί την έκφραση του παράγοντα Gal4 ο οποίος στη συνέχεια προσδένεται στα στοιχεία UAS και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του επιθυμητού γονιδίου (Your Favourite Gene).

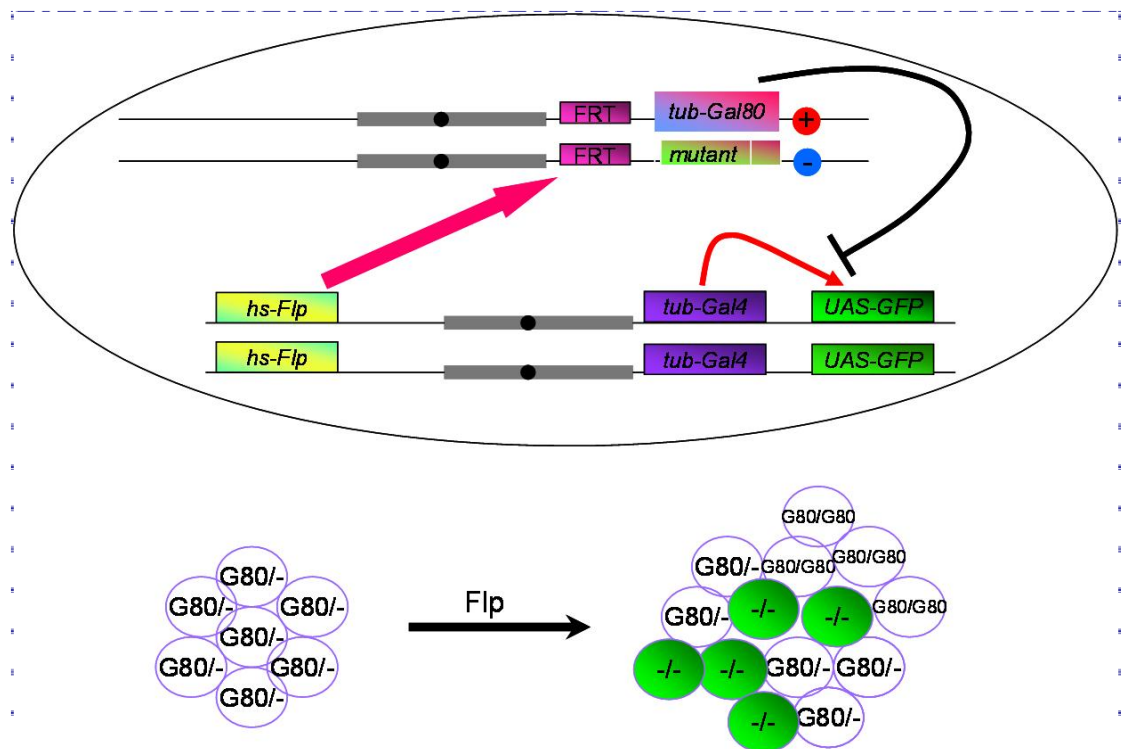
2. Σύστημα μιτωτικού ανασυνδυασμού FLP/FRT

Ο μιτωτικός ανασυνδυασμός FLP/FRT επιτυγχάνεται με τη χρήση της πρωτεΐνης FLP (Flipase) η οποία ανασυνδυάζει συγκεκριμένες αλληλουχίες FRTs (Flipase Recognition Targets). Συγκεκριμένα, η FLP βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ενός θερμο-επαγόμενου υποκινητή (hs promoter). Μετά την θερμο-επαγωγή και τη έκφρασή της, η πρωτεΐνη αυτή ανασυνδυάζει όποιες αλληλουχίες FRTs συναντήσει. Όταν ετερόζυγα για μια μεταλλαγή άτομα φέρουν την επιθυμητή μεταλλαγή σε χρωμοσωμικό σκέλος στη βάση του οποίου υπάρχουν αλληλουχίες FRTs, μετά από ένα συμβάν μιτωτικού ανασυνδυασμού, προκύπτουν δυο ειδών απόγονοι. Οι μεν πρώτοι φέρουν τη μεταλλαγή σε ομοζυγωτία και οι δε άλλοι τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου (Harrison et al., 1993).

3. Σύστημα MARCM

Το σύστημα MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) επιτρέπει τη θετική σήμανση ομόζυγα μεταλλαγμένων κυττάρων σε μωσαϊκούς ιστούς, ιδανικό για μωσαϊκή ανάλυση περίπλοκων ιστών όπως το νευρικό σύστημα. Στο σύστημα αυτό, αρχικά τα κύτταρα είναι ετερόζυγα για το διαγονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη GAL80 η οποία είναι γνωστός καταστολέας της πρωτεΐνης GAL4. Ακολουθεί μιτωτικός ανασυνδυασμός FLP/FRT με αποτέλεσμα το

διαγονίδιο GAL80 να χαθεί από ένα εκ των θυγατρικών κυττάρων και κατ' επέκταση από τους απογόνους του. Αν μια μεταλλαγή είχε τοποθετηθεί στη χρωματίδα in trans αυτής που φέρει το διαγονίδιο GAL80 τότε τα μοναδικά σημασμένα GAL80⁻ κύτταρα θα είναι πλέον ομόζυγα για τη μεταλλαγή. Αν επιπλέον μια φθορίζουσα πρωτεΐνη όπως η GFP βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή UAS, τότε αυτή θα μεταγράφεται από την πρωτεΐνη GAL4 μονάχα στα κύτταρα όπου απουσιάζει ο καταστολέας GAL80 δηλαδή στα GAL80⁻ κύτταρα που είναι ταυτόχρονα ομόζυγα για την επιθυμητή μεταλλαγή καθιστώντας τα έτσι ορατά (Lee & Luo, 2001).



Εικόνα 8: το σύστημα MARCM. Ο in trans ανασυνδυασμός FRT/Flp μεταξύ δύο χρωματίδων που φέρει τον παράγοντα Gal80 και μια επιθυμητή μεταλλαγή αντίστοιχα οδηγεί στο σχηματισμό κλώνων α) που φέρουν την επιθυμητή μεταλλαγή και β) είναι σημασμένοι με GFP σε ένα GFP αρνητικό υπόβαθρο.

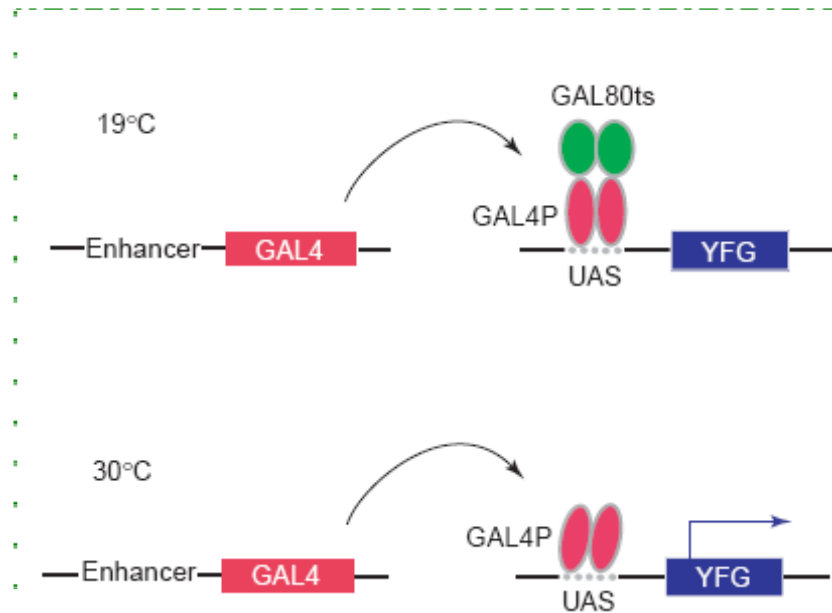
a. Επαγωγή μωσαϊκών κλώνων MARCM

Για τη δημιουργία κλώνων MARCM, προνύμφες οι οποίες είχαν εκκολαφθεί το αργότερο πριν από 24 ώρες, υπόκεινται σε θερμικό σοκ για 1 ώρα στους 37°C και αφήνονται να γεράσουν για 3 μέρες στους 25°C πρώτου συλλεχθούν και χρησιμοποιηθούν σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας.

4. Σύστημα TARGET (χρονική και τοπική στόχευση της γονιδιακής έκφρασης).

Το σύστημα αυτό εξασφαλίζει πέρα από τον συνηθισμένο τοπικό έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων και έλεγχο των γονιδίων στη χρονική διάσταση. Αξιοποιεί το

συμβατικό σύστημα εκτοπικής υπερέκφρασης UAS-Gal4 το οποίο πλέον ελέγχεται από ένα θερμοευαίσθητο αλληλόμορφο του Gal80. Στους 19°C η μεταγραφή του επιλεγμένου γονιδίου που βρίσκεται καθοδικά των UAS αλληλουχιών δεν επιτρέπεται εξαιτίας της καταστολής του Gal4 από τον Gal80. Την επιθυμητή χρονική στιγμή, η καταστολή αυτή αναιρείται με μια αλλαγή της θερμοκρασίας στους 30 °C όπου ο παράγοντας Gal80 αποσταθεροποιείται με αποτέλεσμα την έκφραση του επιθυμητού γονιδίου σε υψηλά επίπεδα. (McGuire et al., 2004).



Εικόνα 9: στο σύστημα Target η έκφρασης ενός γονιδίου βρίσκεται υπό τον έλεγχο του συστήματος UAS-Gal4 και ταυτόχρονα εξασφαλίζεται ο έλεγχός του χρονικά με τη βοήθεια του θερμοευαίσθητου παράγοντα Gal80ts.

B. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ

1. Μονιμοποίηση προνυμφών

- ✓ Αρχικά πραγματοποιείται συλλογή προνυμφών τρίτου σταδίου και ανατομία αυτών σε διάλυμα PBS (130mM NaCl, 70mM Na₂HPO₄, 30mM NaH₂PO₄).
- ✓ Στη συνέχεια οι προνύμφες μονιμοποιούνται σε διάλυμα PEM/4%FA για 20min σε θερμοκρασία δωματίου [διάλυμα 2x PEM: 200mM Pipes, 2mM EGTA, 2mM MgCl₂, pH 6.9].
- ✓ Ακολουθούν 3 γρήγορες πλύσεις με 1x PBS.

2. Χρώσεις

- ✓ Επώαση των μονιμοποιημένων ιστών με διάλυμα PBT (1x PBS, 0.5% BSA, 0.2% TritonX-100) για τουλάχιστον 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Το PBT χάρη στην BSA βοηθάει στην παρεμπόδιση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης αντισωμάτων.
- ✓ Επώαση με το πρωτεύον αντίσωμα το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα PBT για τουλάχιστον 16h στους 4°C.
- ✓ Ακολουθούν πλύσεις της περίσσειας του πρωτεύοντος αντισώματος με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2% Triton-X 100), τρεις φορές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Επώαση με δευτερεύον αντίσωμα το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα PBT σε για 2h σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Ακολουθούν πλύσεις της περίσσειας του δευτερεύοντος αντισώματος με διάλυμα PT (1x PBS, 0.2% Triton-X 100), τρεις φορές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Τέλος, πραγματοποιείται η ανατομία των ιστών και τοποθέτησή τους σε αντικειμενοφόρο με διάλυμα 0.5% propyl-gallate σε 80% γλυκερόλη.

Μεταλλαγμένα γονίδια	Είδος μεταλλαγών	Γονότυποι ατόμων που υπέστησαν ανάλυση MARCM
DI^{revF10}	DI ^{revF10} : Έλλειψη ~760bp που αφαιρεί το 1 ^ο εξώνιο, το σημείο έναρξης της μεταγραφής και το κοντινό τμήμα του υποκινητή (μαζί και την αλληλουχία TATA box) (1) .	• <i>hsFLPtubGal4_UASGFP6MycNLS;FRT82B tubGal80/FRT82B DI^{rev10}</i>
DI^{revF10} & Ser^{RX106}	DI ^{revF10} [βλέπε (1)] & Ser ^{RX106} : Εσωτερική έλλειψη ~9kb του 6 ^{ου} εξωνίου & τμήματος του 7 ^{ου} εξωνίου (2) .	• <i>hsFLPtubGal4_UASGFP6MycNLS;FRT82B tubGal80/FRT82B DI^{rev10} e Ser^{RX106}</i>
DI^{revF10}, my-lacZ reporter	DI ^{revF10} : βλέπε (1)	• <i>hsFLPtubGal4_UASGFP6MycNLS/mg^{3B2}lacZ;FRT82B tubGal80/FRT82B DI^{rev10}</i>
DI^{revF10}, m8-lacZ reporter	DI ^{revF10} : βλέπε (1)	• <i>hsFLPtubGal4_UASGFP6MycNL;/m8lacZ;FRT82B tubGal80/FRT82B DI^{rev10}</i>
DI^{revF10} & Ser^{RX106}, my-lacZ reporter	DI ^{revF10} : βλέπε (1) & Ser ^{RX106} : βλέπε (2)	• <i>hsFLPtubGal4_UASGFP6MycNLS/mg^{3B2}lacZ; FRT82B tubGal80 / FRT82B DI^{rev10} e Ser^{RX106}</i>
DI^{revF10} & Ser^{RX106}, m8-lacZ reporter	DI ^{revF10} : βλέπε (1) & Ser ^{RX106} : βλέπε (2)	• <i>hsFLPtubGal4_UASGFP6MycNLS/m8lacZ; FRT82B tubGal80/ FRT82B DI^{rev10} e Ser^{RX106}</i>
Su(H)^{del47}	Su(H) ^{del47} : ανακριβής αποκοπή ενός μεταθετού στοιχείου P που οδηγεί στην αντικατάσταση 1881bp (από -1145 έως +737) με 9 νουκλεοτίδια κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου Su(H). Σημειακή μεταλλαγή Y141stop.	• <i>hsFLPtubGal4_UASGFP6MycNLS/mg^{3B2}lacZ; tubGal80 FRT40A/ Su(H) FRT40A</i>
Spdo^{G104},my-lacZ reporter	Σημειακή μεταλλαγή L504R (μεταλλαξογόνο EMS)	• <i>hsFLPtubGal4_UASGFP6MycNLS/mg^{3B2}lacZ; FRT82B tubGal80/ FRT82B e Spdo^{G104}</i>
Spdo^{C55},my-lacZ reporter	Σημειακή μεταλλαγή L504R (μεταλλαξογόνο EMS)	• <i>hsFLPtubGal4_UASGFP6MycNLS/mg^{3B2}lacZ; FRT82B tubGal80/ FRT82B e Spdo^{C55}</i>
Mib^{EY9780},my-lacZ reporter	Το μεταθετό στοιχείο P{EPgy2}mib ^{EY9780} έχει εντεθεί 96 νουκλεοτίδια ανοδικά της προβλεπόμενης θέσης έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου mib1 (3) .	• <i>hsFLPtubGal4_UASGFP6MycNLS/mg^{3B2}lacZ; tubGal80 FTR2A/ mib^{EY9780} FRT2A</i>
Mib^{EY9780},m8-lacZ reporter	Βλέπε (3) .	• <i>hsFLPtubGal4_UASGFP6MycNLS/m8lacZ; tubGal80 FTR2A /mib^{EY9780} FRT2A</i>
Notch⁵⁴¹⁹	Έλλειψη της περιοχής 3C6;3C10 (αφαιρεί επίσης τα γονίδια <i>ng2, dnc,vi</i>).	• <i>y, N⁵⁴¹⁹ FRT19A/ y⁺, tubGal80 hsFLP FRT19A ; actGal4, UASmCD8GFP</i>
Notch^{55e11}	Μια ένθεση 3,5kb στην 5' κωδική περιοχή του γονιδίου που οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό των μεταγράφων του.	• <i>N^{55e11} FRT19A/ y⁺, tubGal80 hsFLP FRT19A; actGal4, UASmCD8GFP</i>

Πίνακας 1: γονίδια του μονοπατιού Notch των οποίων τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση MARCM.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

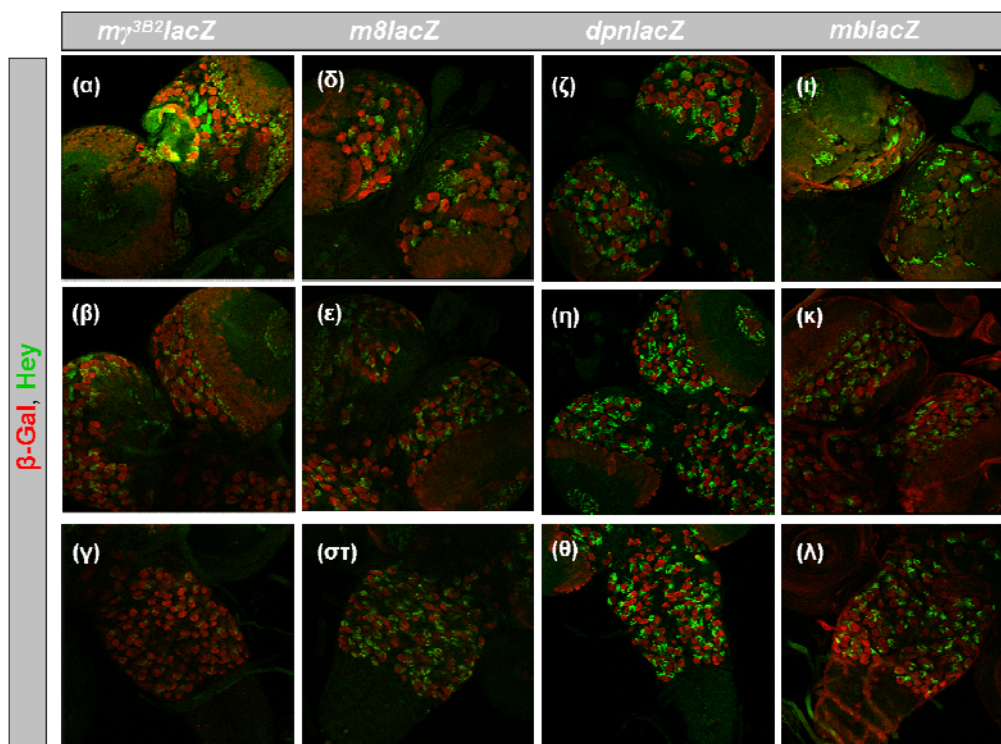
Όπως έχει ήδη προαναφερθεί από μελέτες άλλων εργαστηρίων φαίνεται ότι το μονοπάτι Notch συμμετέχει στη διαδικασία της αυτοανανέωσης των νευροβλαστών στον εγκέφαλο της προνύμφης καθώς η υπερνεργοποίησή του οδηγεί σε υπερπλασίες στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο (Wang et al., 2006; Bowman et al., 2008). Επιπλέον από μελέτες της νευρογένεσης στα θηλαστικά φάνηκε ότι οι πρωτεΐνες HES, μεταγραφικοί στόχοι του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διαδικασίας αυτοανανέωσης –διαφοροποίησης των νευρικών βλαστοκυττάρων κατά την εμβρυογένεση (Kageyama et al. 2007). Η ύπαρξη στο γονιδίωμα της Δροσόφιλας 13 γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας καταστολέων (bHLH-Orange ή HES) δημιουργεί υποψίες ότι ίσως κάποια από τα γονίδια αυτά είναι στόχοι του μονοπατιού Notch στον εγκέφαλο της προνύμφης. Επιπλέον, δημιουργούνται υποψίες ότι ίσως ο έλεγχος του μονοπατιού Notch στη διαδικασία της αυτοανανέωσης-διαφοροποίησης των μετεμβρυικών νευροβλαστών να ασκείται μέσω αυτών των μεταγραφικών του στόχων.

1. Πρότυπα έκφρασης των γονιδίων HES/bHLH-O και συστατικών του μονοπατιού Notch στον εγκέφαλο της προνύμφης της *D.melanogaster*.

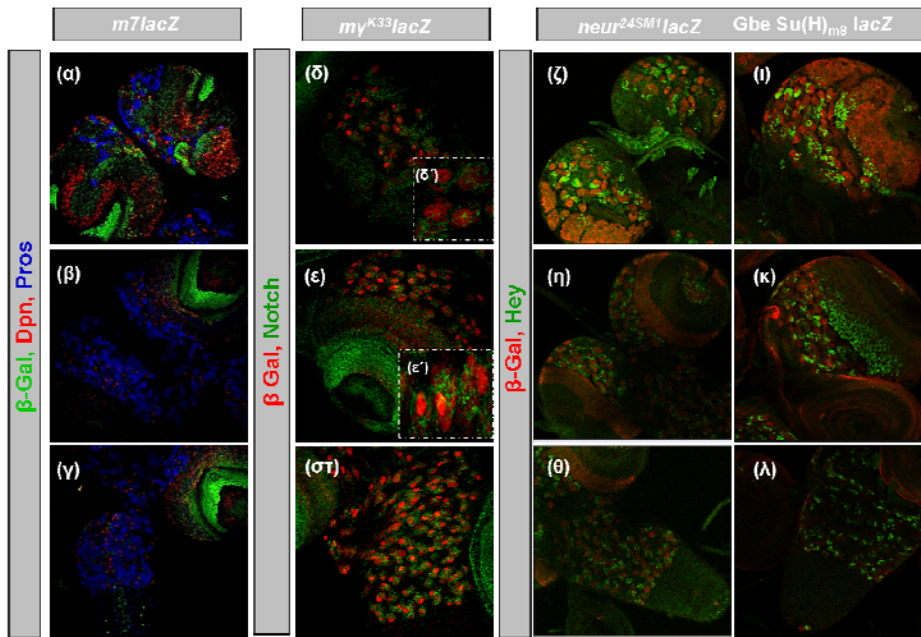
Αρχικά, στην προσπάθεια διαλεύκανσης του ρόλου του μονοπατιού Notch και των πρωτεϊνών HES στη διαδικασία αυτό-ανανέωσης – διαφοροποίησης των μετεμβρυικών νευροβλαστών, μελετήσαμε τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων HES στον εγκέφαλο της προνύμφης. Προβαίνοντας σε ανοσοϊστοχημικές χρώσεις και με τη βοήθεια της συνεστιακής μικροσκοπίας, βρέθηκε ότι κάποιες από τις πρωτεΐνες bHLH-Orange εκφράζονται στο νευρικό σύστημα της προνύμφης της *D.melanogaster*. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες E(spl)m8, E(spl)mγ, E(spl)mβ και Dpn φαίνεται να εκφράζονται στους μετεμβρυικούς νευροβλάστες τόσο του κεντρικού εγκεφάλου όσο και της κοιλιακής νευρικής χορδής (εικόνα 10). Επίσης η πρωτεΐνη E(spl)m3 εκφράζεται στους νευροβλάστες (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται εδώ). Σε αντίθεση με το έμβρυο – όπου οι πρωτεΐνες E(spl) εκφράζονται στο νευροεκτόδερμα ενώ η πρωτεΐνη Dpn στους νευροβλάστες – στην προνύμφη, οι πρωτεΐνες E(spl)m8, E(spl)mγ, E(spl)mβ συνεκφράζονται με την Dpn στους νευροβλάστες, η οποία συνεχίζει να εκφράζεται από το εμβρυικό στάδιο (εικόνα 12). Ωστόσο, οι παγίδες lacZ που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των παραπάνω προτύπων έκφρασης δεν αντικατοπτρίζουν αναγκαστικά τα πρότυπα έκφρασης της ενδογενούς πρωτεΐνης. Για την εύρεση δύο εξ αυτών των προτύπων με ακρίβεια [πρωτεΐνες Dpn και E(spl)mγ] χρησιμοποιήθηκαν αντίσωμα ενάντια στην πρωτεΐνη Dpn (εικόνα 12) και η χημειρική πρωτεΐνη E(spl)mγGFP (εικόνες 12β-η). Επιπλέον, ένα άλλο μέλος της οικογένειας bHLH-O, η πρωτεΐνη Hey, εκφράζεται σε κάποιους νευρώνες που βρίσκονται πολύ κοντά στους νευροβλάστες και οι οποίοι εικάζεται ότι έχουν προκύψει από τις πιο πρόσφατες διαιρέσεις τους (εικόνες 10 & 12). Για τις υπόλοιπες bHLH-O πρωτεΐνες δεν γνωρίζουμε αν εκφράζονται στο προνυμφικό ΚΝΣ εκτός από την Hairγ που φαίνεται να απουσιάζει, βάση του προτύπου δύο παγίδων ενισχυτών Gal4 (h^{U3} και h^{H10}) (δεδομένα μη παρουσιαζόμενα) και για την E(spl)m7 η οποία εκφράζεται στον οπτικό λοβό και ίσως σε GMCs και νευρώνες (εικόνες 11α-γ).

Αν λοιπόν στο στάδιο αυτό της προνύμφης, οι E(spl)m8, και E(spl)mγ είναι στόχοι του μονοπατιού Notch όπως συμβαίνει νωρίτερα στο νευροεκτόδερμα, ενδέχεται να διεξάγεται σηματοδότηση Notch προς τον νευροβλάστη, παρόμοια με την περίπτωση των θηλαστικών και αντίθετα από την περίπτωση του νεογέννητου εμβρυϊκού νευροβλάστη. Πραγματικά, η πρωτεΐνη Notch ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα στην επιφάνεια των αγρίου τύπου μετεμβρυϊκών νευροβλαστών καθιστώντας

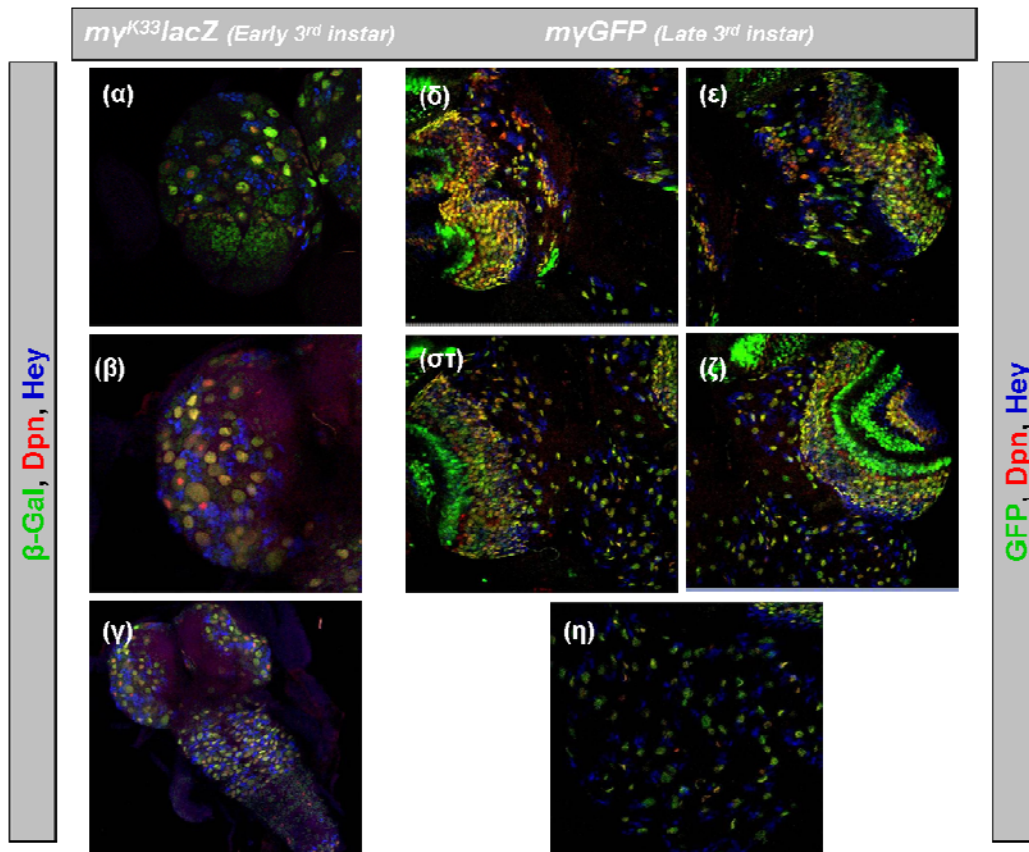
τους έτσι ικανούς για λήψη τέτοιας σηματοδότησης (εικόνες 11δ-11στ, Almeida and Bray, 2005). Επιπλέον η έκφραση στους νευροβλάστες μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch όπως οι προσδέτες D1 και Ser (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται εδώ), η E3 λιγάση της ουβικουΐτινης neuralized (εικόνες 11ζ-11θ) και η πρωτεΐνη Su(H) (εικόνες 11ι-11λ) συνηγορούν υπέρ της σηματοδότησης Notch προς τον νευροβλάστη.



Εικόνα 10: πρότυπα έκφρασης των *E(spl)mγ*, *E(spl)m8* και *Dpn* στους μετεμβρυϊκούς νευροβλάστες της *D.melanogaster*. (α)-(λ) : οι 5'ανοδικά ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων ***E(spl)mγ***, ***E(spl)m8***, ***Dpn*** και ***E(spl)mβ*** οδηγούν την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή ***lacZ*** στους νευροβλάστες. Το αντίσωμα **β -Gal** ανιχνεύει τα επίπεδα έκφρασης του ανταποκριτή. Οι πρωτεΐνες ***E(spl)mγ***, ***E(spl)m8***, ***Dpn*** και ***E(spl)mβ*** εκφράζονται στους νευροβλάστες τόσο του ραχιαίου εγκεφάλου (dCB) [(α)-(δ)-(ζ)-(ι)] όσο και του κοιλιακού εγκεφάλου (vCB)[(β)-(ε)-(η)-(κ)] και της κοιλιακής νευρικής χορδής (vnc)[(γ)-(στ)-(θ)-(λ)]. Η πρωτεΐνη Hey φαίνεται να εκφράζεται στους νεαρούς νευρώνες.



Εικόνα 11: (α)-(γ) η 5' ανωδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου **E(spl)m7** οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή **lacZ** μονάχα στον οπτικό λοβό όπως ανιχνεύεται από το αντίσωμα **β-Gal**. (δ)-(στ) η πρωτεΐνη **Notch** ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα στην επιφάνεια των αγρίου τύπου μετεμβρυϊκών νευροβλαστών ενώ η **E(spl)my** στους νευροβλάστες σε dCB, vCB και vnc. (ζ)-(θ) η 5' ανωδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου **neuralized** οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή **lacZ** στους νευροβλάστες και ίσως στους νεαρούς νευρώνες σε dCB, vCB και vnc ενώ επίσης (ι)-(λ) οι θέσεις πρόσδεσης **Gbe_Su(H)_{m8}** των παραγόντων **Grainyhead και Su(H)** οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή **lacZ** στους νευροβλάστες σε dCB, vCB και vnc όπως ανιχνεύεται από το αντίσωμα **β-Gal**.



Εικόνα 12: Συν-εντοπισμός των **E(spl)mγ** και **Dpn** στους νευροβλάστες σε dCB, vCB και vnc σε εγκεφάλους προνυμφών πρώιμου 3^{ου} σταδίου [(α)-(γ)] και όψιμου 3^{ου} σταδίου [(δ)-(η)]. Για τις προνύμφες πρώιμου 3^{ου} σταδίου, 5'ανοδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου **E(spl)mγ** οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή **lacZ** στους νευροβλάστες όπου και ανιχνεύεται από το αντίσωμα **β-Gal**. Για τις προνύμφες όψιμου 3^{ου} σταδίου, η κωδική αλληλουχία του γονιδίου **E(spl)mγ** είναι συντηγμένη με την κωδική αλληλουχία της φθορίζουσας πρωτεΐνης **GFP** υπό τον υποκινητή του **E(spl)mγ** (Almeida & Bray, 2005).

Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος της ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch και των πρωτεϊνών HES στις γενεαλογίες των μετεμβρυϊκών νευροβλαστών παραμένει ακόμα άγνωστος. Για την περαιτέρω μελέτη του ρόλου αυτών στη διαδικασία της αυτοανανέωσης/ διαφοροποίησης προχωρήσαμε στην παρακάτω αναζήτηση :

- Αν η έκφραση των E(spl) και της συγγενούς πρωτεΐνης Dpn στους μετεμβρυϊκούς νευροβλάστες και η έκφραση της πρωτεΐνης Hey στους νεαρούς νευρώνες είναι συνέπεια σηματοδότησης Notch.
- Αν η υπερέκφραση των E(spl) (ή της Dpn) στους μετεμβρυϊκούς νευροβλάστες είναι ικανή και / ή αναγκαία για να προξενήσει την υπερπλασία που παράγεται από υπερενεργοποίηση του Notch.

2. Ο ρόλος του Notch στην ενεργοποίηση των bHLH-O πρωτεϊνών - έκφραση των bHLH-O πρωτεϊνών σε απώλεια λειτουργίας Notch.

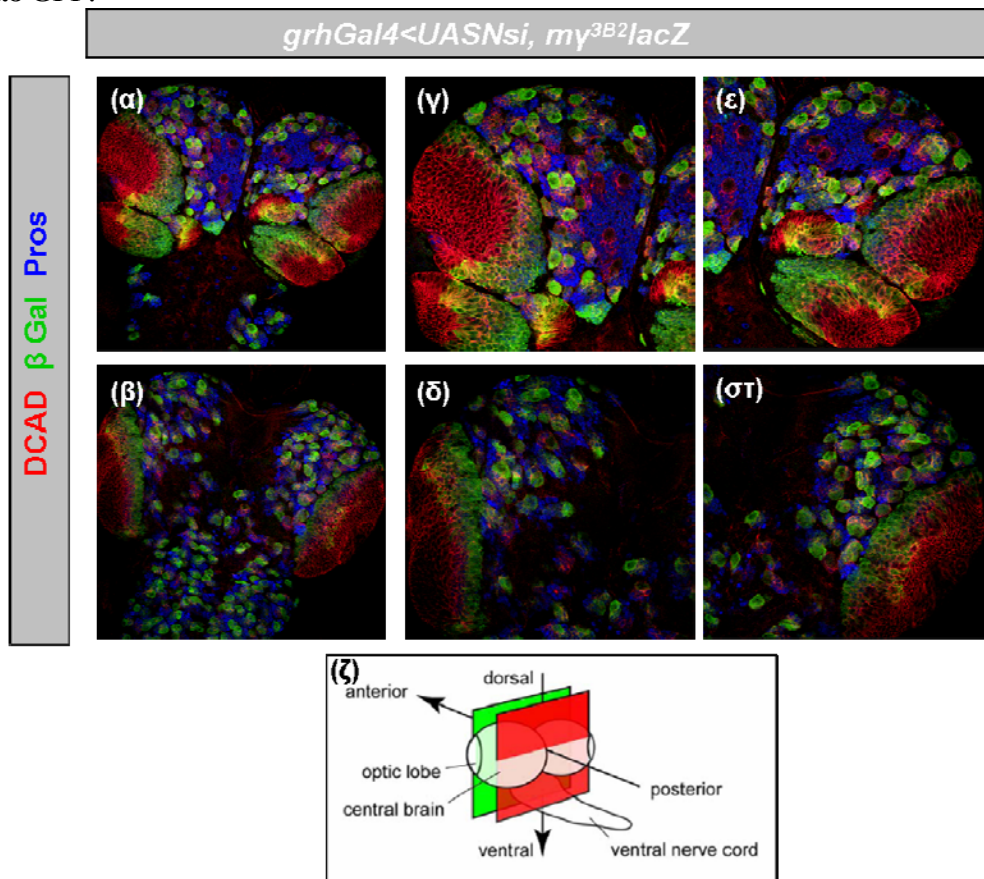
Αρχικά μελετήθηκαν τα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών E(spl), Dpn και Hey απουσία του υποδοχέα Notch στους εγκεφάλους προνυμφών της *D.melanogaster*. Επειδή μεταλλαγές για τον υποδοχέα αυτό είναι θνησιγόνες σε εμβρυικά ακόμα στάδια, χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές τεχνικές για την αποφυγή του εμποδίου αυτού.

Πρώτον, συνδυάζοντας το δυαδικό σύστημα εκτοπικής υπερέκφρασης UAS-GAL4 με την τεχνική σίγησης RNAi επιτεύχθηκε η σίγηση του υποδοχέα Notch ειδικά στους νευροβλάστες. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία siRNAi για την καταστολή του υποδοχέα Notch είχε τοποθετηθεί καθοδικά των ρυθμιστικών στοιχείων UAS τα οποία αναγνωρίζονται από τον παράγοντα GAL4 (Kennerdell and Carthew, 2000). Ο παράγοντας αυτός στη συνέχεια εκφράστηκε ειδικά στους νευροβλάστες χάρις στον ειδικό υποκινητή grainyhead υπό τον έλεγχο του οποίου είχε τεθεί (Phelps and Brand, 1998). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη σίγηση του υποδοχέα Notch ειδικά όπου εκφράζεται ο οδηγός grhGal4 δηλαδή στους νευροβλάστες, στα GMCs και στους πρόσφατα διαφοροποιημένους νευρώνες. Η σίγηση αυτή οδήγησε στην απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης E(spl)mγ σε ορισμένους μονάχα νευροβλάστες στην ραχιαία πλευρά του κεντρικού εγκεφάλου (εικόνες 13-α,γ,ε) ενώ παράλληλα σημειώθηκε ελάχιστη μεταβολή των επίπεδα της E(spl)mγ σε ορισμένους από τους νευροβλάστες του κοιλιακού γαγγλίου ή της κοιλιακής περιοχής του εγκεφάλου (εικόνα 13-β,δ,στ). Ωστόσο, η παραπάνω σύνδεση της απώλειας της έκφρασης της πρωτεΐνης E(spl)mγ με τη σίγηση του υποδοχέα Notch στους συγκεκριμένους νευροβλάστες είναι αμφισβητήσιμη καθώς η θέση των νευροβλαστών αυτών - όπου παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης E(spl)mγ - παραπέμπει στους νευροβλάστες του mushroom body οι οποίοι είναι οι μοναδικοί νευροβλάστες που δεν εκφράζουν

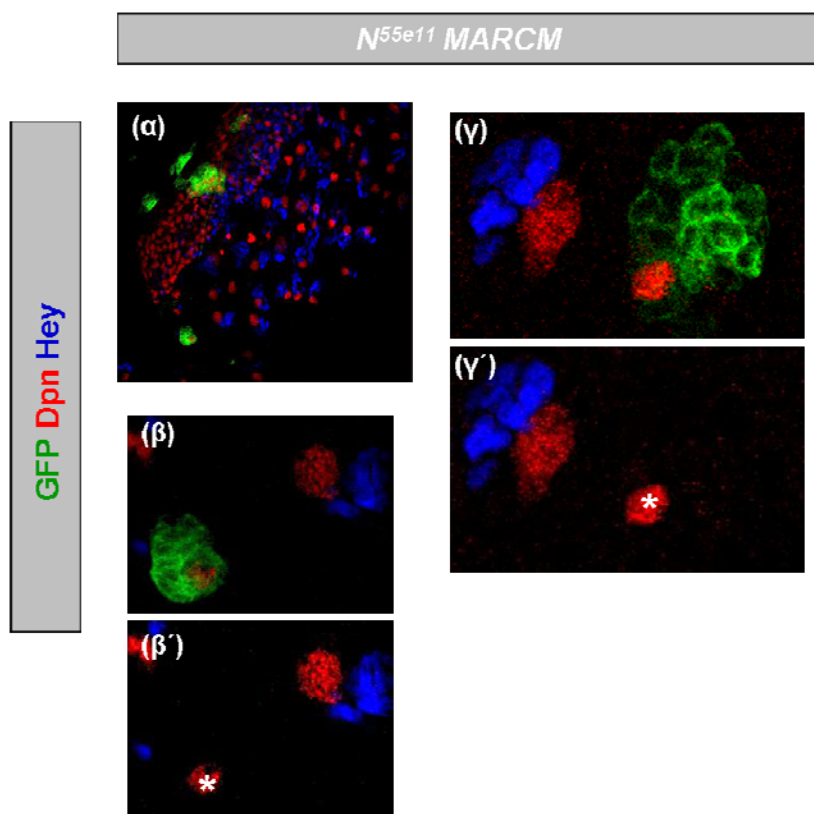
την πρωτεΐνη E(spl)mg υπο φυσιολογικές συνθήκες στο ΚΝΣ της προνύμφης(βλέπε εικόνα 16α). Επιπλέον πειράματα θα πρέπει να πραγματοποιηθούν για την διαλεύκανση του φαινομένου αυτού της καταστολής.

Δεύτερον, κατασκευάστηκαν μωσαϊκά ζώα τα οποία έφεραν ομόζυγες μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του Notch σε κλώνους κυττάρων, οι οποίοι παράλληλα εκφράζουν GFP, σε +/- ετερόζυγο και GFP υπόβαθρο στο ΚΝΣ (τεχνική MARCM, Mosaic analysis with a repressible clone marker) (Lee & Luo, 2001). Οι κλώνοι επάγονται 48 h μετά την εκκόλαψη των εμβρύων για 1 ώρα στους 37°C και οι ιστοί εξετάζονται για παρουσία κλώνων 48 h με 72 h αργότερα. Με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία ανιχνεύθηκε η συσσώρευση ή όχι των υπό μελέτη bHLH-O πρωτεϊνών στους μεταλλαγμένους κλώνους έχοντας ως control τον περίξ ετερόζυγο ιστό. Βρέθηκε ότι στους κλώνους όπου απουσίαζε ο υποδοχέας Notch, η έκφραση της πρωτεΐνης Hey χάνεται από τους νεαρούς νευρώνες ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης Dpn παραμένει αμετάβλητη (εικόνες 14-β,β',γ,γ').

Συγχρόνως και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις εκτιμήθηκε κατά πόσον η απώλεια της σηματοδότησης Notch είτε λόγω σίγησης είτε στους ομόζυγους κλώνους επηρεάζει τον αριθμό ή τη μορφολογία των νευροβλαστών ή των απογόνων τους. Καμία όμως επίπτωση στον αριθμό ή τη μορφολογία των νευροβλαστών και των απογόνων τους δεν παρατηρήθηκε στο βαθμό που μας επιτρέπει να ανιχνεύσουμε η χρώση με GFP.



Εικόνα 13: Η σίγηση του υποδοχέα Notch (N_{SiRNA}) ειδικά στους νευροβλάστες. (α)-(γ)-(ε) στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο (dCB) οδηγεί στην απώλεια της E(spl)mg από μερικούς νευροβλάστες [κώτταρα E-Cadherin⁺(DCAD)], (β) στην κοιλιακή χορδή (vnc) δεν παρατηρείται καμία απώλεια στα επίπεδα της E(spl)mg στους νευροβλάστες ενώ (δ)-(στ) στον κοιλιακό κεντρικό εγκέφαλο (vCB) μερικοί νευροβλάστες εμφανίζουν ελαφρώς μειωμένα επίπεδα της E(spl)mg. Η 5' ανοδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου E(spl)mg οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή lacZ στους νευροβλάστες όπου και ανιχνεύεται από το αντίσωμα β-Gal. Η πρωτεΐνη Pros απαντάται στον πυρήνα των GMCs και των νευρώνων.

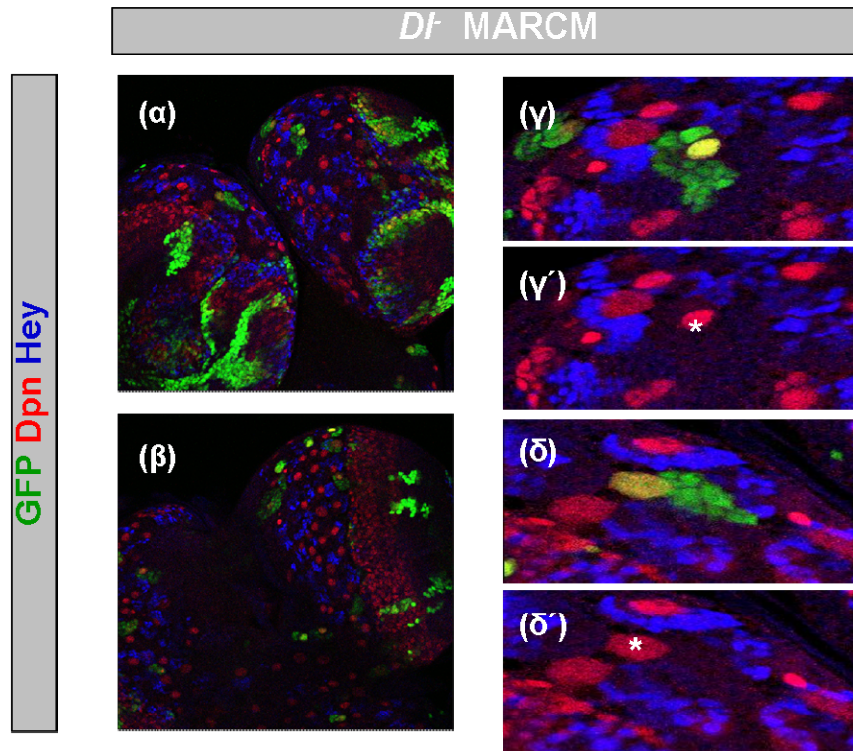


Εικόνα 14: (α) MARCM κλώνοι απόλειας της λειτουργίας του υποδοχέα Notch. (β)-(β'), (γ)-(γ') σε **N^{55e11} κλώνους** χάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης **Hey** από τους νεαρούς νευρώνες ενώ τα επίπεδα της **Dpn** παραμένουν αμετάβλητα.

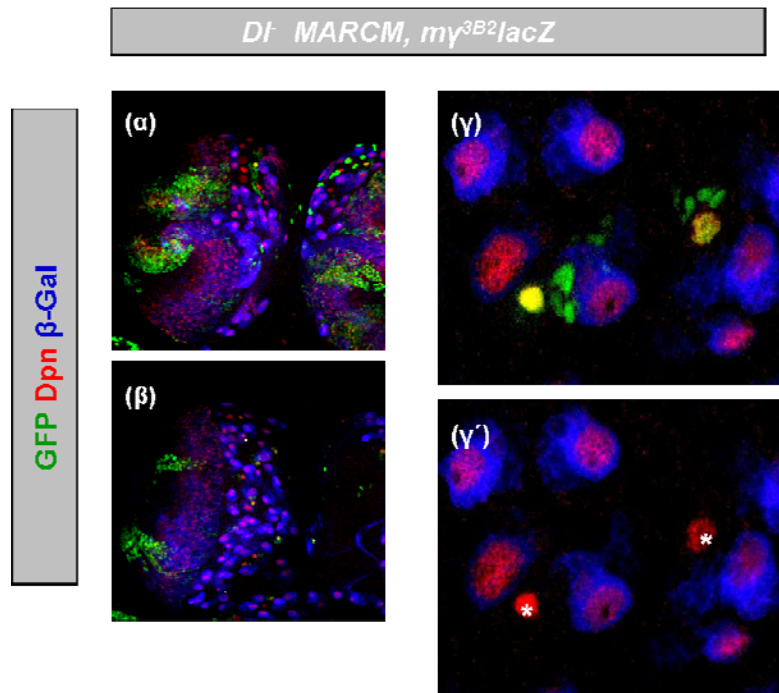
Φάνηκε λοιπόν αρχικά ότι η απουσία του υποδοχέα Notch επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των E(spl) και της Hey αλλά όχι τα επίπεδα έκφρασης της Dpn. Επομένως το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch εμπλέκεται στη ρύθμιση κάποιων από αυτές τις bHLH-O πρωτεΐνες. Μάλιστα το μονοπάτι Notch μάλλον συμμετέχει σε δύο ξεχωριστές περιπτώσεις σηματοδότησης μία προς τον νευροβλάστη και μία προς τους πρόσφατα γεννημένους νευρώνες. Ωστόσο για να περιγράψουμε όσο το δυνατόν πιο εμπειριστωμένα τα δύο αυτά Notch-εξαρτώμενα σηματοδοτικά γεγονότα που απαντώνται στη διαδικασία πολλαπλασιασμού των νευροβλαστών, έπρεπε πέραν του ιδίου του Notch, να μελετηθούν και μεταλλαγές που επηρεάζουν τη λήψη (π.χ Su(H) ή Spdo) ή την αποστολή (π.χ Delta, Ser neur, mib) του σήματος. Η τεχνική MARCM χρησιμοποιήθηκε και πάλι για την κατασκευή μωσαϊκών ζώων που θα έφεραν κλώνους με ομόζυγες μεταλλαγές απόλειας λειτουργίας των μορίων αυτών του μονοπατιού Notch στο ΚΝΣ (σε +/- ετερόζυγο υπόβαθρο).

Αρχικά, δημιουργήθηκαν κλώνοι όπου επηρεάζεται η αποστολή του σήματος Notch. Συγκεκριμένα σε κλώνους απόλειας λειτουργίας του δεσμευτή του μονοπατιού, Dl, η έκφραση της πρωτεΐνης E(spl)mγ εξαλείφεται ολοκληρωτικά (εικόνες 16-γ,γ', διάγραμμα 1), η έκφραση της πρωτεΐνης Hey χάνεται από το 82,3% των κλώνων (εικόνες 15-γ,γ',δ,δ', διάγραμμα 3). Στο υπόλοιπο 17,7% των κλώνων απαντώνται κατά μέσο όρο 3,7 Hey⁺ κύτταρα ανα κλώνο (διάγραμμα 4). Αντίθετα, η έκφραση της πρωτεΐνης E(spl)mδ μειώνεται στο 70% των κλώνων (εικόνες 17-

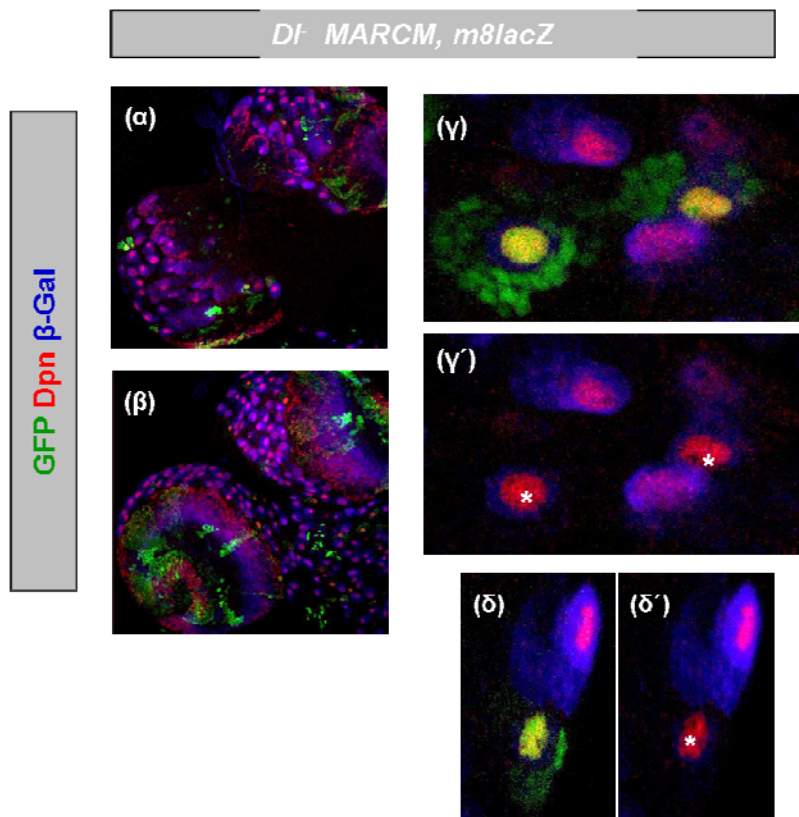
γ,γ',δ,δ', διάγραμμα 2) και τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Dpn παραμένουν αμετάβλητα (εικόνες 15-γ,γ',δ,δ', 16-γ,γ', 17-γ,γ',δ,δ'). Συγχρόνως, εκτιμήθηκε κατά πόσον η απώλεια της του προσδέτη DI στους ομόζυγους κλώνους επηρεάζει τον αριθμό ή τη μορφολογία των νευροβλαστών ή των απογόνων τους. Καμία επίπτωση στον αριθμό ή τη μορφολογία των νευροβλαστών και των απογόνων τους δεν παρατηρήθηκε.



Εικόνα 15: (α)-(β) MARCM κλώνοι απώλειας της λειτουργίας του προσδέτη DI. (γ)-(γ'), (δ)-(δ') σε **DI κλώνους** χάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης **Hey** από τους νεαρούς νευρώνες ενώ τα επίπεδα της **Dpn** παραμένουν αμετάβλητα.



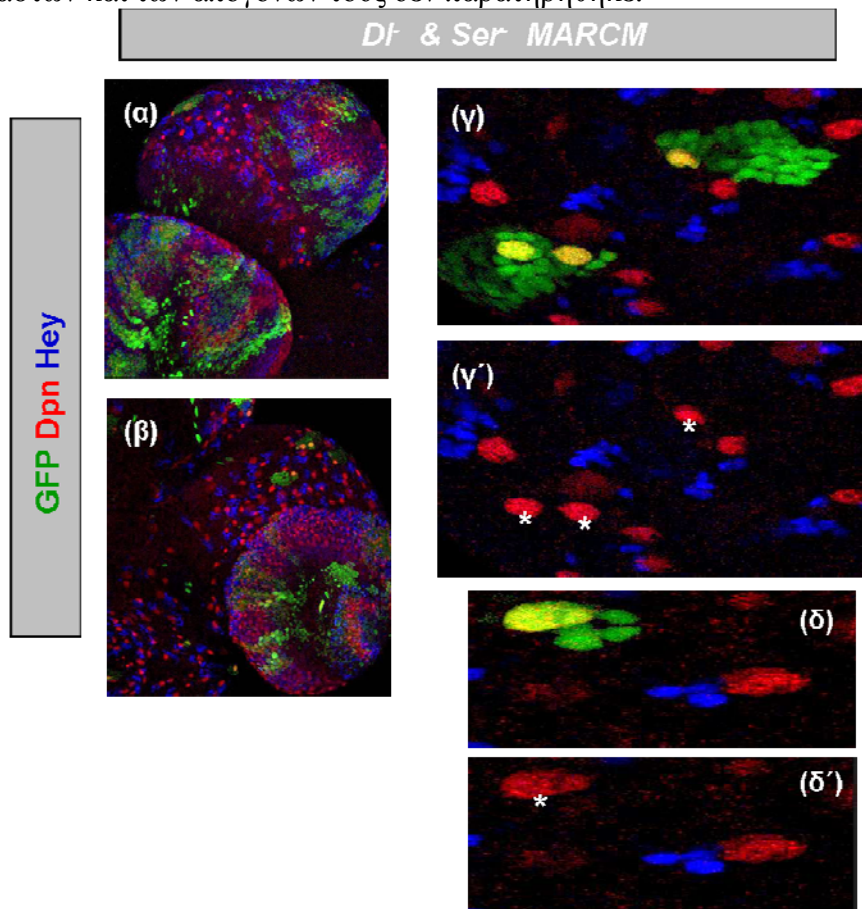
Εικόνα 16: (α)-(β) MARCM κλώνοι απώλειας της λειτουργίας του προσδέτη Df. (γ)-(γ') σε **Df κλώνους** χάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης **E(spl)my** από τους νεαρούς νευροβλάστες ενώ τα επίπεδα της **Dpn** παραμένουν αμετάβλητα. Η 5'ανοδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου **E(spl)my** οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή **lacZ** στους νευροβλάστες όπου και ανιχνεύεται από το αντίσωμα **β-Gal**.



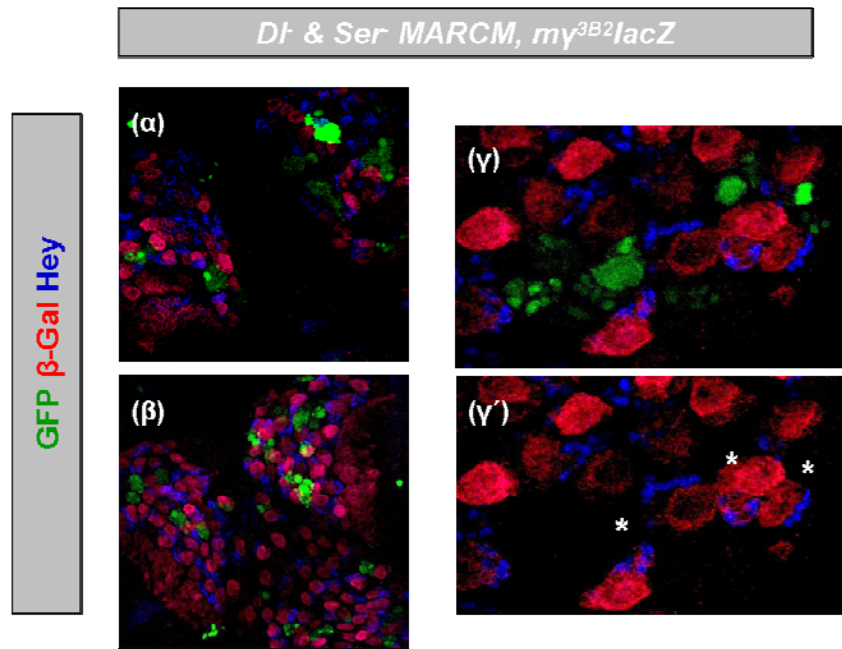
Εικόνα 17 : (α)-(β) MARCM κλώνοι απώλειας της λειτουργίας του προσδέτη Df. (γ)-(γ') & (δ)-(δ') σε **Df κλώνους** η έκφραση της πρωτεΐνης **E(spl)m8** μειώνεται από τους νευροβλάστες. Η μείωση αυτή είναι προφανής από την έλλειψη διατήρησης της **β-Gal** στους μεταλλαγμένους νευρώνες. Τα επίπεδα της **Dpn** παραμένουν αμετάβλητα. Η 5'ανοδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου **E(spl)m8** οδηγεί την

έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή **lacZ** στους νευροβλάστες όπου και ανιχνεύεται από το αντίσωμα **β-Gal**.

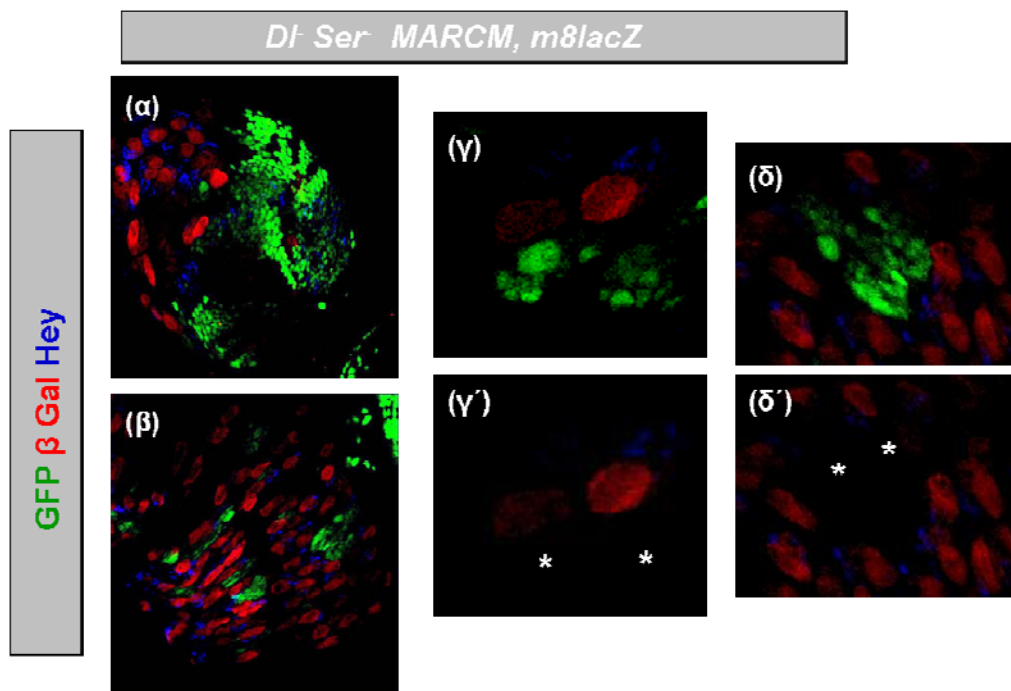
Σε κλώνους όπου απουσίαζαν και οι δύο δεσμευτές του μονοπατιού Notch, οι Delta και Serrate, η έκφραση της πρωτεΐνης E(spl)mγ εξαλείφεται ολοκληρωτικά (εικόνες 19-γ,γ'), της πρωτεΐνης E(spl)m8 στο 97,8% των κλώνων (εικόνες 20-γ,γ',δ,δ', διάγραμμα 2) και της πρωτεΐνης Hey σε ποσοστό 89% επί των κλώνων (εικόνες 18-γ,γ',δ,δ', διάγραμμα 3). Στο υπόλοιπο 11% των κλώνων απαντώνται κατά μέσο όρο 2,4 Hey⁺ κύτταρα ανα κλώνο (διάγραμμα 4). Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Dpn παραμένουν αμετάβλητα (εικόνες 18-γ,γ',δ,δ'). Συγχρόνως, εκτιμήθηκε και πάλι κατά πόσον η απώλεια των προσδετών D1 και Ser στους ομόζυγους κλώνους επηρεάζει τον αριθμό ή τη μορφολογία των νευροβλαστών ή των απογόνων τους. Καμία μορφολογική αλλαγή ή διαφορά στον αριθμό των νευροβλαστών και των απογόνων τους δεν παρατηρήθηκε.



Εικόνα 18: (α)-(β) MARCM κλώνοι απώλειας της λειτουργίας των προσδετών D1 & Ser. (γ)-(γ'), (δ)-(δ') σε **Df & Ser** κλώνους χάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης **Hey** από τους νεαρούς νευρώνες ενώ τα επίπεδα της **Dpn** παραμένουν αμετάβλητα.

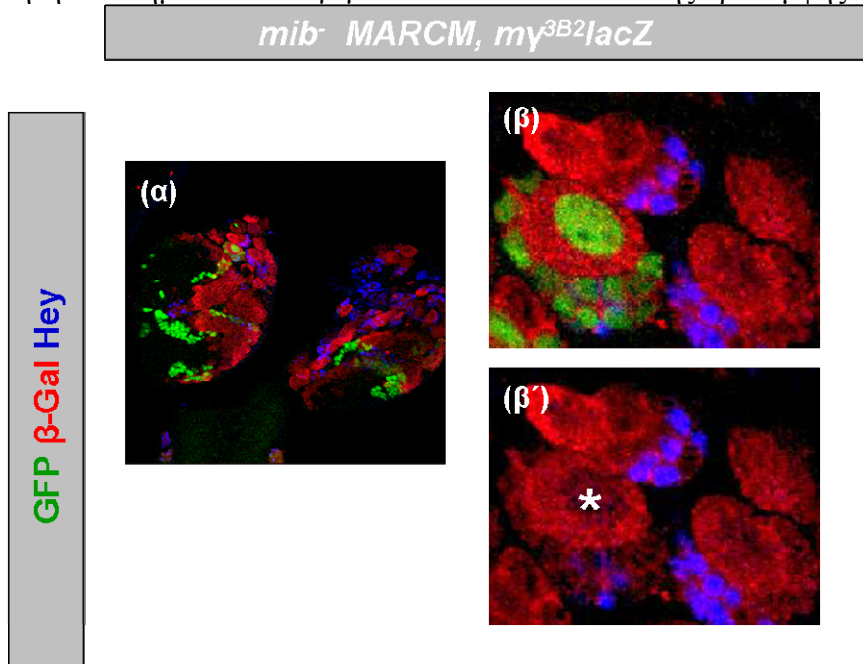


Εικόνα 19: (α)-(β) MARCM κλώνοι απώλειας της λειτουργίας των προσδετών Df & Ser. (γ)-(γ') σε **Df&Ser⁻** κλώνους χάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης **E(spl)mγ** από τους νευροβλάστες καθώς επίσης και η έκφραση της **Hey**. Η 5'ανοδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου **E(spl)mγ** οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή **lacZ** στους νευροβλάστες όπου και ανιχνεύεται από το αντίσωμα **β-Gal**.

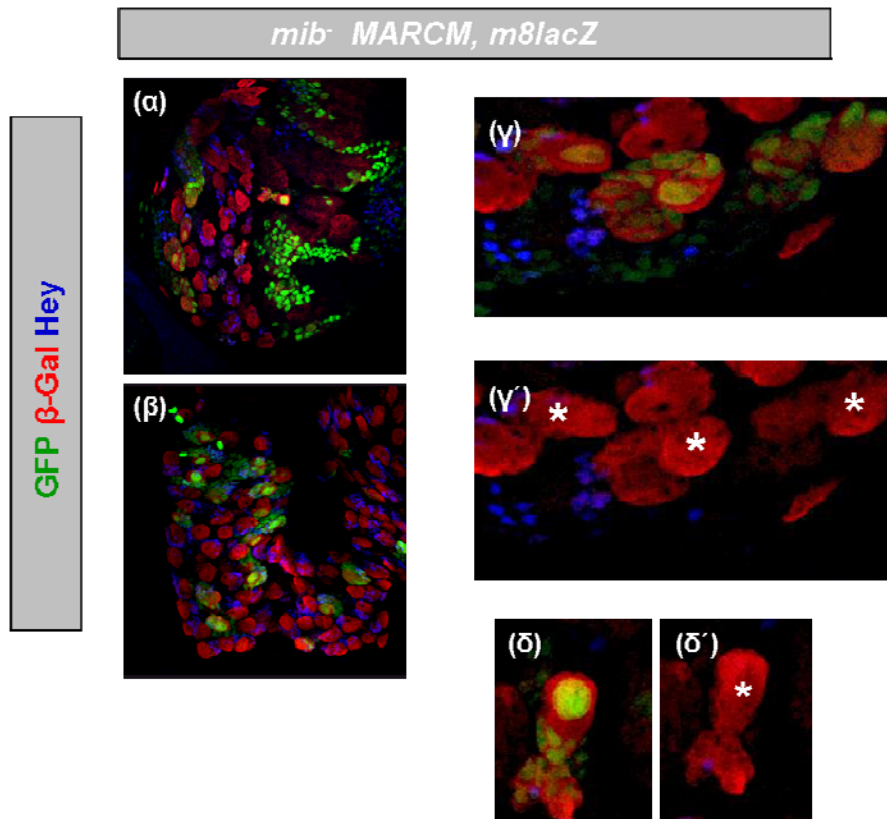


Εικόνα 20: (α)-(β) MARCM κλώνοι απώλειας της λειτουργίας των προσδετών Df & Ser. (γ)-(γ') σε **Df&Ser⁻** κλώνους χάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης **E(spl)m8** από τους νευροβλάστες καθώς επίσης και η έκφραση της **Hey**. Η 5'ανοδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου **E(spl)m8** οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή **lacZ** στους νευροβλάστες όπου και ανιχνεύεται από το αντίσωμα **β-Gal**.

Σε κλώνους όπου απουσιάζει η πρωτεΐνη *neuralized* – μια από τις E3 λιγάσες της ουβικουιτίνης που τροποποιούν τους δεσμευτές Delta και Ser λίγο πριν αυτοί βγούν στην επιφάνεια του κυττάρου για να αλληλεπιδράσουν με τον υποδοχέα Notch– η έκφραση της πρωτεΐνης *E(spl)mγ* εξαλείφεται ολοκληρωτικά (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται εδ). Αντίθετα, σε κλώνους όπου απουσιάζει η πρωτεΐνη *mindbomb* – η άλλη E3 λιγάση της ουβικουιτίνης – καμία από τις πρωτεΐνες *E(spl)mγ* (εικόνες 21-β,β'), *E(spl)m8* (εικόνες 22-γ,γ',δ,δ') και *Hey* (εικόνες 21-β,β' & 22-γ,γ',δ,δ'), δεν επηρεάζονται γεγονός που υποδηλώνει ότι η λιγάση αυτή δεν είναι απαραίτητη στα σηματοδοτικά γεγονότα Notch του ΚΝΣ της προνύμφης.



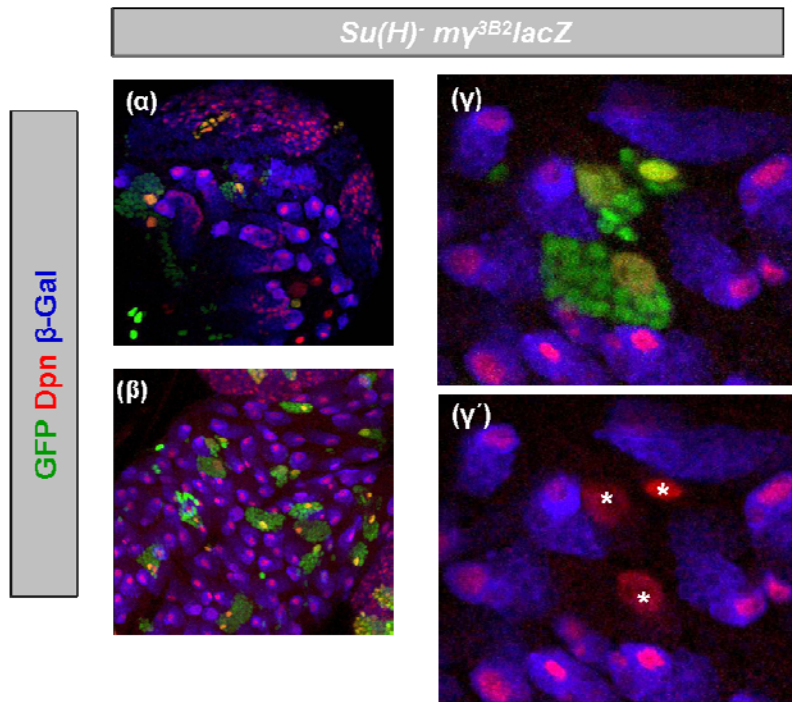
Εικόνα 21: (α) MARCM κλώνοι απώλειας της λειτουργίας της E3 λιγάσης *mindbomb*. (β)-(β') σε ***mib⁻*** κλώνους δεν μεταβάλλεται η έκφραση της πρωτεΐνης ***E(spl)mγ*** από τους νευροβλάστες καθώς επίσης και η έκφραση της ***Hey*** από τους νεαρούς νευρώνες. Η 5'ανοδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου ***E(spl)mγ*** οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή ***lacZ*** στους νευροβλάστες όπου και ανιχνεύεται από το αντίσωμα ***β-Gal***.



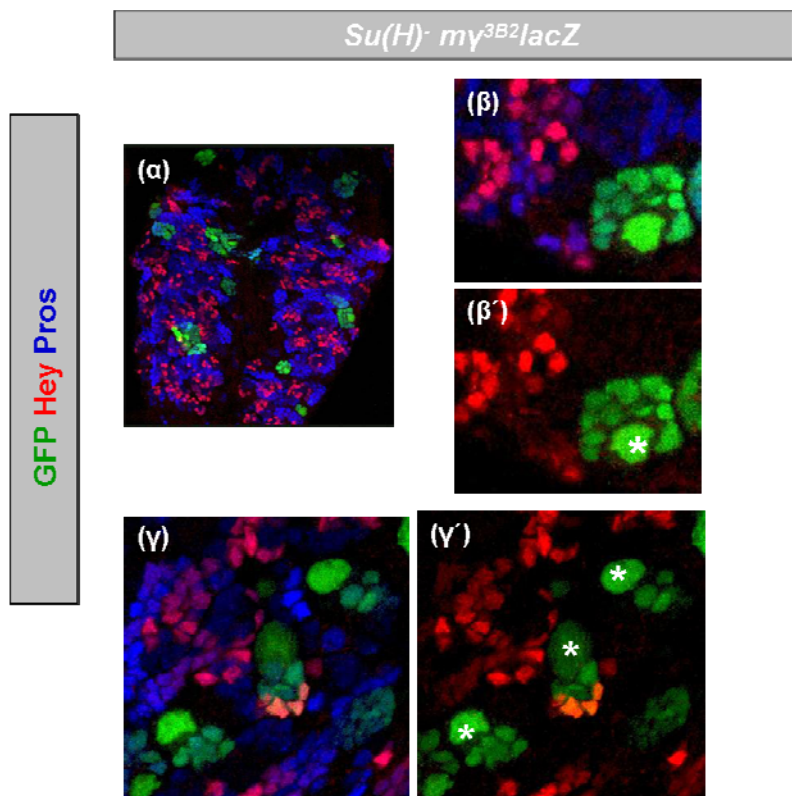
Εικόνα 22 : (α) MARCM κλώνοι απώλειας της λειτουργίας της E3 λιγάσης mindbomb. (β)-(β') σε **mib⁻** κλώνους δεν μεταβάλλεται η έκφραση της πρωτεΐνης **E(spl)m8** από τους νευροβλάστες καθώς επίσης και η έκφραση της **Hey** από τους νεαρούς νευρώνες. Η 5'ανοδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου **E(spl)m8** οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή **lacZ** στους νευροβλάστες όπου και ανιχνεύεται από το αντίσωμα **β-Gal**.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν κλώνοι που έφεραν μεταλλαγές σε γονίδια που επηρεάζουν τη λήψη σηματοδότησης Notch.

Συγκεκριμένα, σε κλώνους απώλειας της πρωτεΐνης Su(H) – μεταγραφικός παράγοντας που το ενδοκυττάριο τμήμα του Notch στρατολογεί για να ενεργοποιήσουν από κοινού τα γονίδια στόχους του δεύτερου – η έκφραση των πρωτεϊνών E(spl)mγ (εικόνες 23-γ,γ') και Hey (εικόνες 24-β,β',γ,γ', διάγραμμα 3) εξαλείφεται ολοκληρωτικά στο σύνολο των κλώνων και στο 95,3% των κλώνων αντίστοιχα. Στο υπόλοιπο 4,7% των Hey θετικών κλώνων απαντώνται κατά μέσο όρο 8 Hey⁺ κύτταρα ανα κλώνο (διάγραμμα 4). Αντίθετα τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Dpn για μία ακόμα φορά παραμένουν αμετάβλητα (εικόνες 23-γ,γ'). Επιπλέον η απώλεια της πρωτεΐνης Su(H) στους ομόζυγους κλώνους δεν είχε καμία επίπτωση στον αριθμό ή τη μορφολογία των νευροβλαστών και των απογόνων τους.

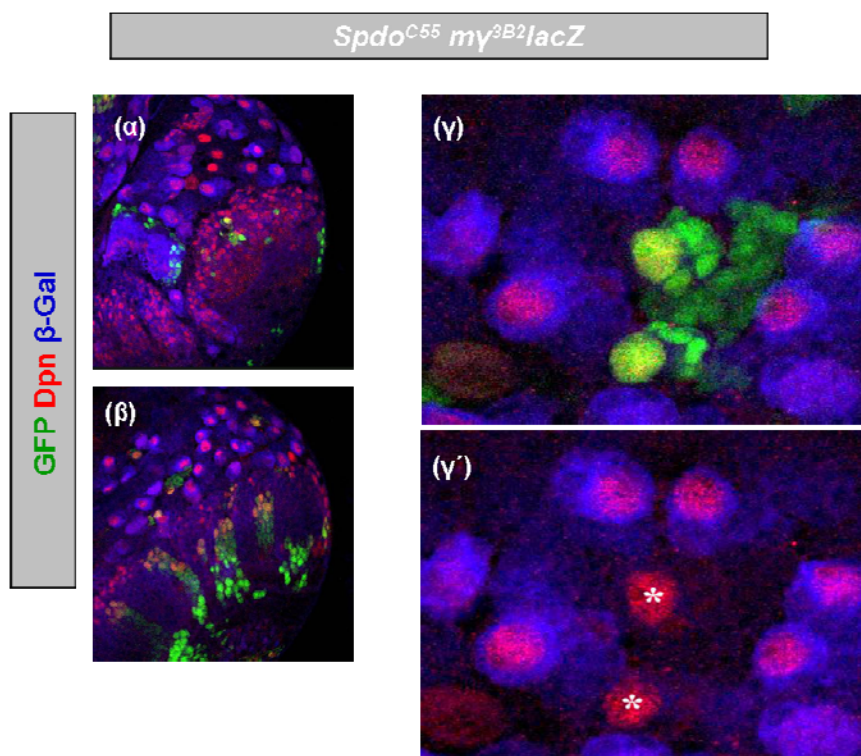


Εικόνα 23: (α)-(β) MARCM κλώνοι απώλειας της λειτουργίας της πρωτεΐνης Su(H). (γ)-(γ') σε **Su(H)**⁻ κλώνους χάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης **E(spl)mγ** από τους νευροβλάστες ενώ η έκφραση της **Dpn** παραμένει αμετάβλητη. Η 5'ανοδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου **E(spl)mγ** οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή **lacZ** στους νευροβλάστες όπου και ανιχνεύεται από το αντίσωμα **β-Gal**.

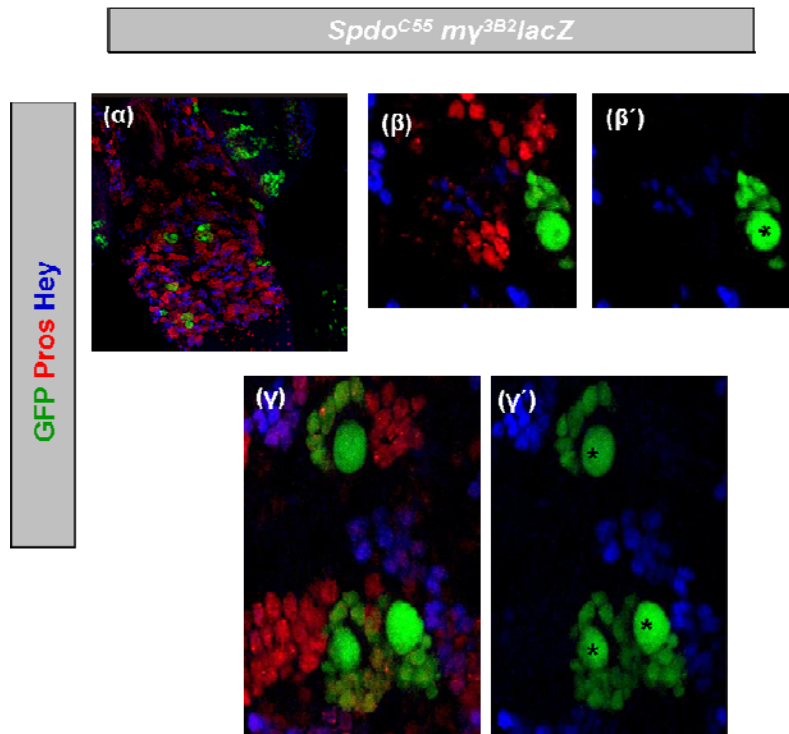


Εικόνα 24: (α) MARCM κλώνοι απώλειας της λειτουργίας της πρωτεΐνης Su(H). (β)-(β') στους περισσότερους **Su(H)**⁻ κλώνους χάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης **Hey** από τους νεαρούς νευρώνες ενώ (γ)-(γ') σε μερικούς **Su(H)**⁻ κλώνους η έκφραση της πρωτεΐνης **Hey** εξακολουθεί να εκφράζεται σε μερικούς νεαρούς νευρώνες σε κάθε κλώνο. Η πρωτεΐνη **Pros** απαντάται στον πυρήνα των GMCs και των νευρώνων.

Τέλος προχωρήσαμε στην κατασκευή κλώνων απώλειας της πρωτεΐνης Sanpodo – της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης της οποίας η παρουσία στην επιφάνεια του κυττάρου που λαμβάνει σήμα Notch είναι ενίοτε αναγκαία για την περαιτέρω μεταγωγή του σήματος στον πυρήνα και την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων –. Για το αλληλόμορφο *spdo*^{C55}, παρατηρήθηκε η ολοκληρωτική εξάλειψη της έκφρασης της πρωτεΐνης E(spl)my στους κλώνους αυτούς (εικόνα 25-γ,γ', διάγραμμα 1) ενώ η Hey πρωτεΐνη εξαλείφεται στο 91,7% των κλώνων (εικόνες 26-β,β',γ,γ'). Στο υπόλοιπο 8,3% των κλώνων απαντώνται κατά μέσο όρο 4 Hey⁺ κύτταρα ανα κλώνο. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Dpn παραμένουν αμετάβλητα και σε αυτούς τους κλώνους (εικόνες 25-γ,γ'). Για το αλληλόμορφο *Spdo*^{G104} παρατηρήθηκε η ολοκληρωτική εξάλειψη της έκφρασης της πρωτεΐνης E(spl)my στους κλώνους αυτούς ενώ η Hey πρωτεΐνη εξαλείφεται στο 95,2% των κλώνων. Στο υπόλοιπο 4,8% των κλώνων απαντώνται κατά μέσο όρο 2 Hey⁺ κύτταρα ανά κλώνο(). Επιπλέον η απώλεια της πρωτεΐνης *Spdo* στους ομόζυγους κλώνους δεν είχε καμία επίπτωση στον αριθμό ή τη μορφολογία των νευροβλαστών και των απογόνων τους.



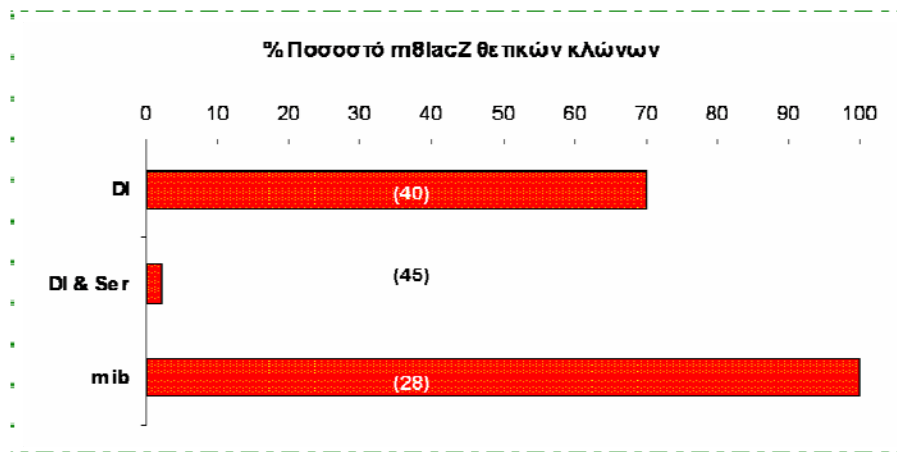
Εικόνα 25: (α)-(β) MARCM κλώνοι απώλειας της λειτουργίας της πρωτεΐνης *Spdo*. (γ)-(γ') σε **Spdo**⁻ κλώνους χάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης **E(spl)my** από τους νευροβλάστες ενώ η έκφραση της **Dpn** παραμένει αμετάβλητη. Η 5'ανοδικά ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου **E(spl)my** οδηγεί την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή **lacZ** στους νευροβλάστες όπου και ανιχνεύεται από το αντίσωμα **β-Gal**.



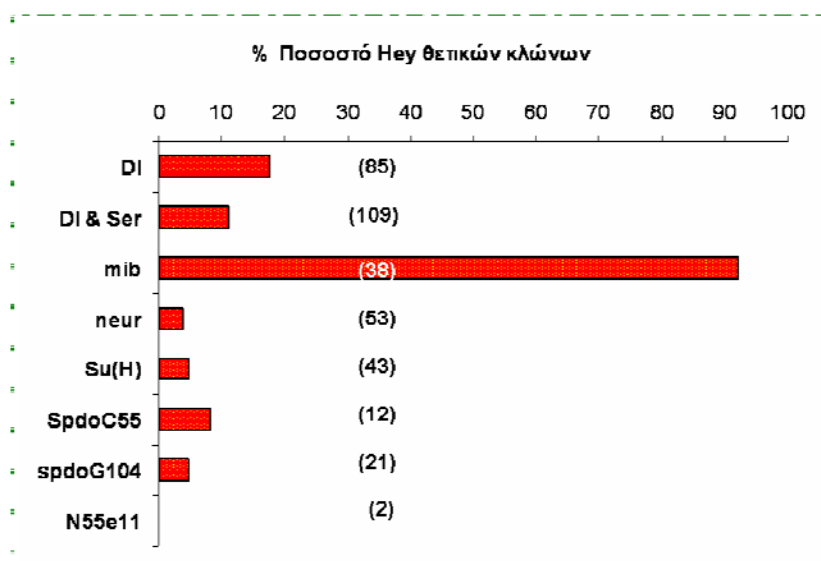
Εικόνα 26: (α) MARCM κλώνοι απόλειας της λειτουργίας της πρωτεΐνης Spdo. (β)-(β'), (γ)-(γ') σε κάποιους **Spdo** κλώνους χάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης **Hey** από τους νεαρούς νευρώνες. Η πρωτεΐνη **Pros** απαντάται στον πυρήνα των GMCs και των νευρώνων.



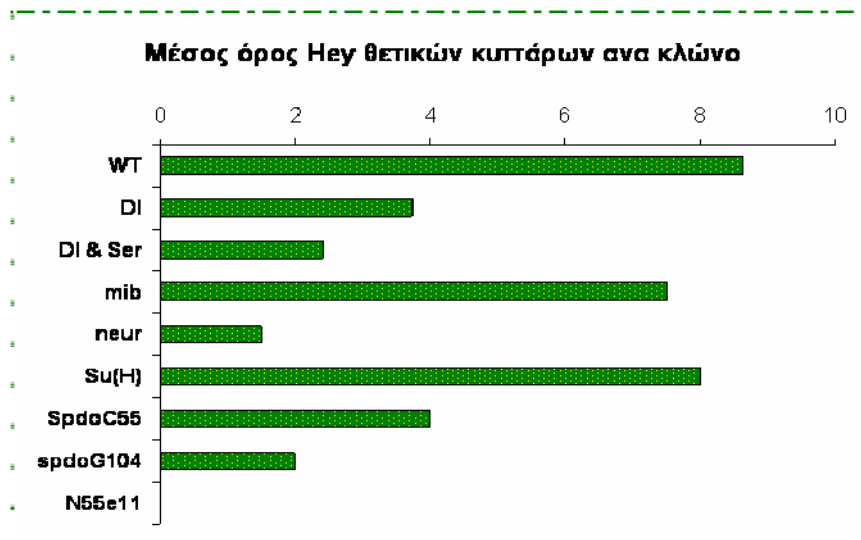
Διάγραμμα 1: στατιστική ανάλυση της παρουσίας της πρωτεΐνης E(spl)mylacZ σε MARCM κλώνους απόλειας της λειτουργίας διαφόρων μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού. Φαίνονται τα ποσοστά των E(spl)my θετικών κλώνων για κάθε μεταλλαγή. Σε παρενθέσεις αναγράφονται οι αριθμοί των κλώνων που εξετάστηκαν για κάθε μεταλλαγή).



Διάγραμμα 2:στατιστική ανάλυση της παρουσίας της πρωτεΐνης E(spl)m8 σε MARCM κλώνους απώλειας της λειτουργίας διαφόρων μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού. Φαίνονται τα ποσοστά των E(spl)m8 θετικών κλώνων για κάθε μεταλλαγή απώλειας της λειτουργίας κάποιου μορίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 70% των DI- κλώνων ναι μεν διατηρούν την έκφραση της E(spl)m8 αλλά σε χαμηλά επίπεδα. Σε παρενθέσεις αναγράφονται οι αριθμοί των κλώνων που εξετάστηκαν για κάθε μεταλλαγή).



Διάγραμμα 3:στατιστική ανάλυση της παρουσίας της πρωτεΐνης Hey σε MARCM κλώνους απώλειας της λειτουργίας διαφόρων μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού. Φαίνονται τα ποσοστά των Hey θετικών κλώνων για κάθε μεταλλαγή. Σε παρενθέσεις αναγράφονται οι αριθμοί των κλώνων που εξετάστηκαν για κάθε μεταλλαγή).



Διάγραμμα 4: απεικόνιση του μέσου όρου των Hey θετικών κυττάρων που απαντώνται ανά κλώνο στους MARCM κλώνους απώλειας της λειτουργίας διαφόρων πρωτεϊνών –μελών του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch.

Συνολικά από την κλωνική ανάλυση MARCM προκύπτει ότι στις γενεαλογίες των μετεμβρικών νευροβλαστών ΚΝΣ λαμβάνουν χώρα δύο σηματοδοτικά γεγονότα Notch, ένα προς τους νευροβλάστες και ένα προς τους πρόσφατα γεννημένους νευρώνες.

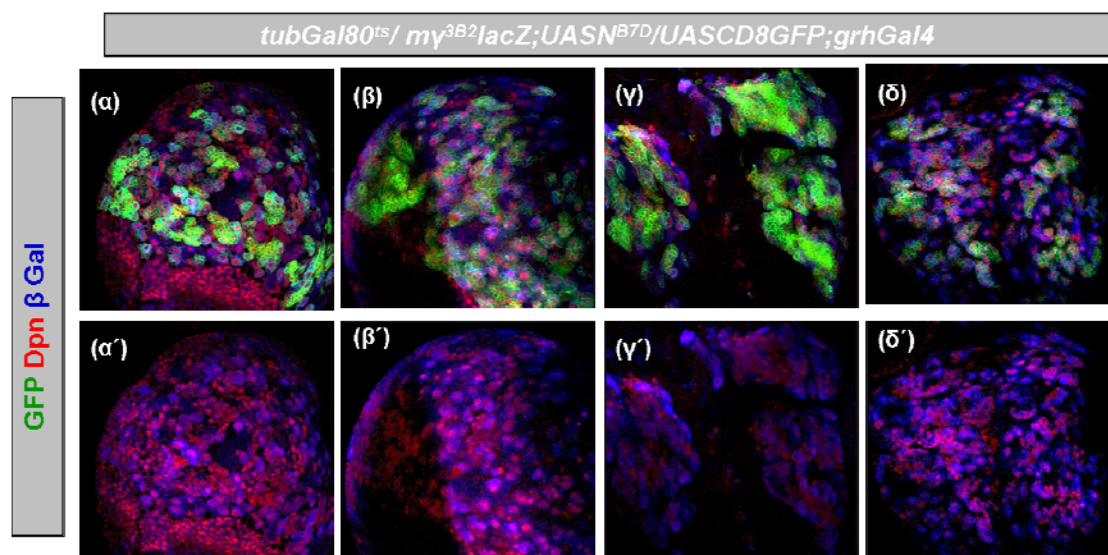
Το σήμα προς τους νευροβλάστες πρέπει να προέρχεται από τα GMCs και να είναι DI/Ser -εξαρτώμενο και ανεξάρτητο της E3 λιγάσης mib.

Από την άλλη, το σήμα προς τους νευρώνες πρέπει να προέρχεται από διάφορα γειτονικά κύτταρα αλλά κυρίως από κύτταρα της ίδιας της γενεαλογίας και πρέπει να είναι εξαρτώμενο από την E3 λιγάση neur και ανεξάρτητο από την λιγάση mib.

3. Ο ρόλος του Notch στην ενεργοποίηση των bHLH-O γονιδίων -- έκφραση των bHLH-O πρωτεϊνών σε αύξηση λειτουργίας Notch.

Στη συνέχεια, για να διαλευκανθεί περισσότερο ο ρόλος του μονοπατιού Notch στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών, προχωρήσαμε σε υπερενεργοποίηση του υποδοχέα Notch στους νευροβλάστες και στα GMCs. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα διαγονίδιο που εκφράζει το συστατικά ενεργό ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, το Nintra. Την επιλεκτική έκφρασή του στους νευροβλάστες και στα GMCs της προνύμφης την πετύχαμε χρησιμοποιώντας το δυαδικό σύστημα διαγονιδίων UAS-Gal4 (Phelps and Brand, 1998) του οποίου η έκφραση καθοδηγείται στους νευροβλάστες από τον υποκινητή grainyhead ανοδικά του παράγοντα Gal4. Επειδή η υπερέκφραση του συστατικά ενεργού υποδοχέα Nintra καθόλη τη διάρκεια της ζωής ενός ζώου είναι θνησιγόνος, έπρεπε να ελεγχεί χρονικά. Για το λόγω αυτό στο παραπάνω σύστημα προσθέσαμε έλεγχο στη χρονική διάσταση με μια τεχνική που μας επιτρέπει να κρατάμε τον Gal4 ενεργοποιητή ανενεργό μέσω του αναστολέα του Gal80 (McGuire et al., 2004). Σε μικρό χρονικό διάστημα (8 ώρες) μετά την υπερέκφραση του Nintra ελέγξαμε με ανοσοφθορισμό τα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών E(spl)mg και Dpn το κατά πόσο έχουν επαχθεί εκτοπικά οι πρωτεΐνες. Διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες αυτές είχαν επαχθεί εκτοπικά μάλιστα όχι μονάχα

στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο όπως υποστηρίζει η υπάρχουσα βιβλιογραφία (Lee et al. 2006; Wang et al. 2006) αλλά και στον κοιλιακό κεντρικό εγκέφαλο και στην κοιλιακή χορδή. Επιπλέον βρέθηκε ότι επιφανειακά στην περιοχή υπερέκφρασης του Notch, τα μεγάλα σε μέγεθος κύτταρα δηλαδή οι νευροβλάστες είναι N_{intra}^{+} (GFP⁺) – E(spl)my⁺ - Dpn⁺. Όλα τα μικρότερα σε μέγεθος N_{intra}^{+} (GFP⁺) κύτταρα είναι και Dpn⁺ κύτταρα. Στα παρασκευάσματα αυτά όπου υπερεκφράζεται ο υποδοχέας Notch, υπάρχει το εξής παράδοξο φαινόμενο. Η πρωτεΐνη Dpn φαίνεται να είναι στόχος του Notch σε αντίθεση με την ανάλυση απώλειας λειτουργίας του Notch όπου τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Dpn παρέμεναν αμετάβλητα με αποτέλεσμα αυτή να μην θεωρείται στόχος του μονοπατιού Notch. Στα ίδια παρασκευάσματα εκτιμήθηκε κατά πόσον η υπερενεργοποίηση του Notch επέφερε αλλοιώσεις στον αριθμό ή χαρακτήρα των διαφόρων κυτταρικών τύπων που παράγονται από τους νευροβλάστες. Όντως προκλήθηκε υπερπλασία νευροβλαστών καθώς εμφανίζονται πολυάριθμα Dpn⁺ κύτταρα ωστόσο δεν είναι γνωστό αν η υπερπλασία αυτή προέκυψε σε βάρος των νευρώνων. Χρώσεις στο μέλλον με δείκτες για τους νευρώνες (π.χ Elav) θα αποκαλύψουν αν τα Dpn⁺ κύτταρα των υπερπλασιών καταλαμβάνουν θέσεις τις οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες κατέχουν οι νευρώνες.



Εικόνα 27: χρονικά ελεγχόμενη (Gal80^{ts}) υπερέκφραση του **Nintra**, του συστατικά ενεργού ενδοκυττάριου τμήματος του υποδοχέα, στους νευροβλάστες με τη βοήθεια του οδηγού grhGal4. Παρατηρείται υπερπλασία των **E(spl)my⁺ - Dpn⁺** κυττάρων (α)-(α') στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο, (β)-(β') στον κοιλιακό κεντρικό εγκέφαλο, (γ)-(γ') ραχιαία στο κοιλιακό γάγγλιο και (δ)-(δ') κοιλιακά του κοιλιακού γαγγλίου.

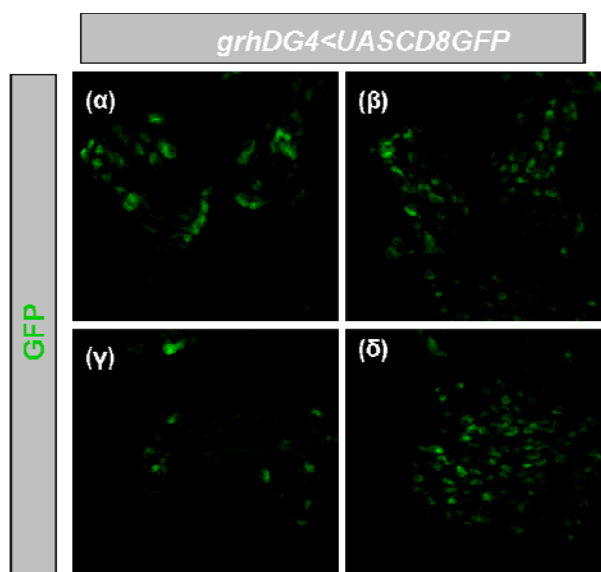
4. Επάρκεια και αναγκαιότητα των E(spl)/Dpn για την αυτοανανέωση των νευροβλαστών.

Καθώς η έκφραση της E(spl)my και της Dpn αποδείχθηκε να είναι συνέπεια της σηματοδότησης Notch (με τα ανωτέρω πειράματα), προχωρήσαμε σε μελέτη του κατά πόσον οι bHLH-O αυτές πρωτεΐνες αποτελούν τελεστές του εν λόγω σήματος. Γνωρίζουμε από το παραπάνω πείραμα και από τη βιβλιογραφία ότι παρατεταμένη έκθεση των νευροβλαστών/GMCs σε σήμα Notch προξενεί υπερπλασία νευροβλαστών - ίσως λόγω μετατροπής των GMCs σε νέους νευροβλάστες (Wang et al., 2007 ; Wang et al., 2006). Ερωτώμενοι αν θα συμβεί το ίδιο μετά από παρατεταμένη υπερέκφραση μόνο ενός E(spl) γονιδίου ή του γονιδίου dpn,

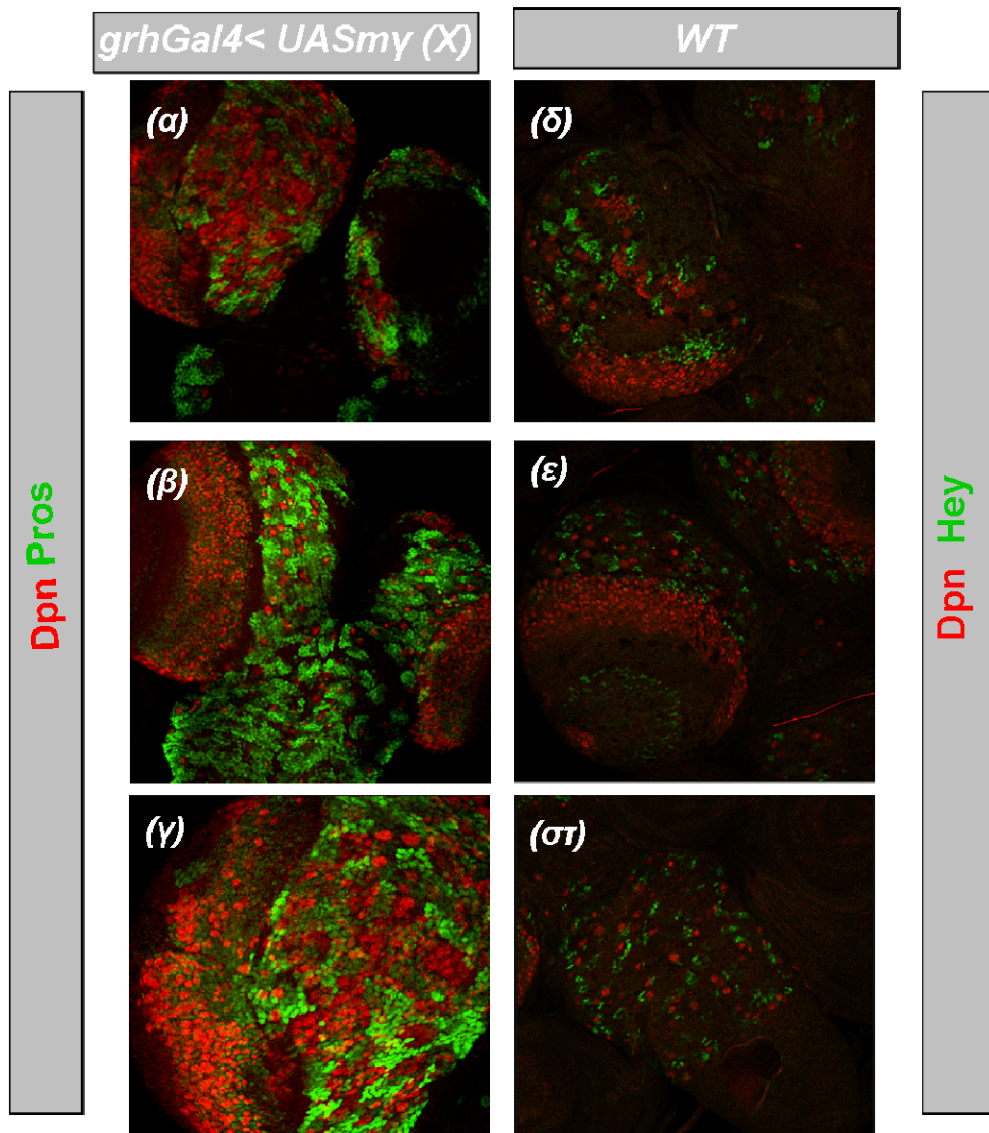
χρησιμοποιήσαμε UAS-E(spl) και UAS-dpn διαγονίδια τα οποία εκφράστηκαν εκτοπικά στους νευροβλάστες με τη βοήθεια του οδηγού grainyhead-Gal4 (εικόνα 28, το ιστο-ειδικό πρότυπο του οδηγού grhGal4 αποκαλύπτεται όταν οδηγεί την έκφραση της μεμβρανικής φθορίζουσας πρωτεΐνης, CD8-GFP).

Βρέθηκε ότι από το σύνολο των E(spl) [E(spl)mγ, mβ, mδ, m3, m5, m7, m8, m7m8] και Dpn που εξετάστηκαν (εικόνες 29,30), η εκτοπική έκφραση μονάχα των E(spl)mγ και E(spl)m3 στους νευροβλάστες (εικόνες 29,31) οδήγησε σε υπερπλασία (υπερβολικά μεγάλος αριθμός Dpn⁺ κυττάρων όπου Dpn χαρακτηριστικός δείκτης των νευροβλαστών) στο ραχιαίο μόνο τμήμα του κεντρικού εγκεφάλου. Αντίθετα η εκτοπική υπερέκφραση της Dpn δεν οδήγησε σε υπερπλασία όπως αναμενόταν. Η εκτοπική υπερέκφραση των υπολοίπων E(spl) γονιδίων δεν προκάλεσε υπερπλασίες (εικόνες 30-β,δ,ε,στ,ζ,θ) με εξαίρεση μια ήπια υπερπλασία που προκάλεσε η ταυτόχρονη υπερέκφραση των E(spl)m7 και E(spl)m8 (εικόνα 30η). Επιπλέον ενδιαφέρον παρουσιάζει η υπερέκφραση μιας μεταλλαγμένης μορφής της E(spl)mγ, της E(spl)mγKNEQ, η οποία σε αντίθεση με την υπερέκφραση της φυσιολογικής πρωτεΐνης, δεν οδήγησε σε υπερπλασία (εικόνα 30-γ). Η E(spl)mγKNEQ φέρει 2 σημειακές μεταλλαγές στη βασική της περιοχή [Λυσίνη(K) σε ασπαραγίνη(N) και γλουταμινικό οξύ(E) σε γλουταμίνη(Q)] με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προσδεθεί στο DNA για να καταστείλει τα γονίδια στόχους της (Jimenez and Ish-Horowicz, 1997). Επομένως η πρόσδεση της E(spl)mγ στην ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων στόχων της είναι απαραίτητη για τη δράση της ως επαγωγέας της υπερπλασίας.

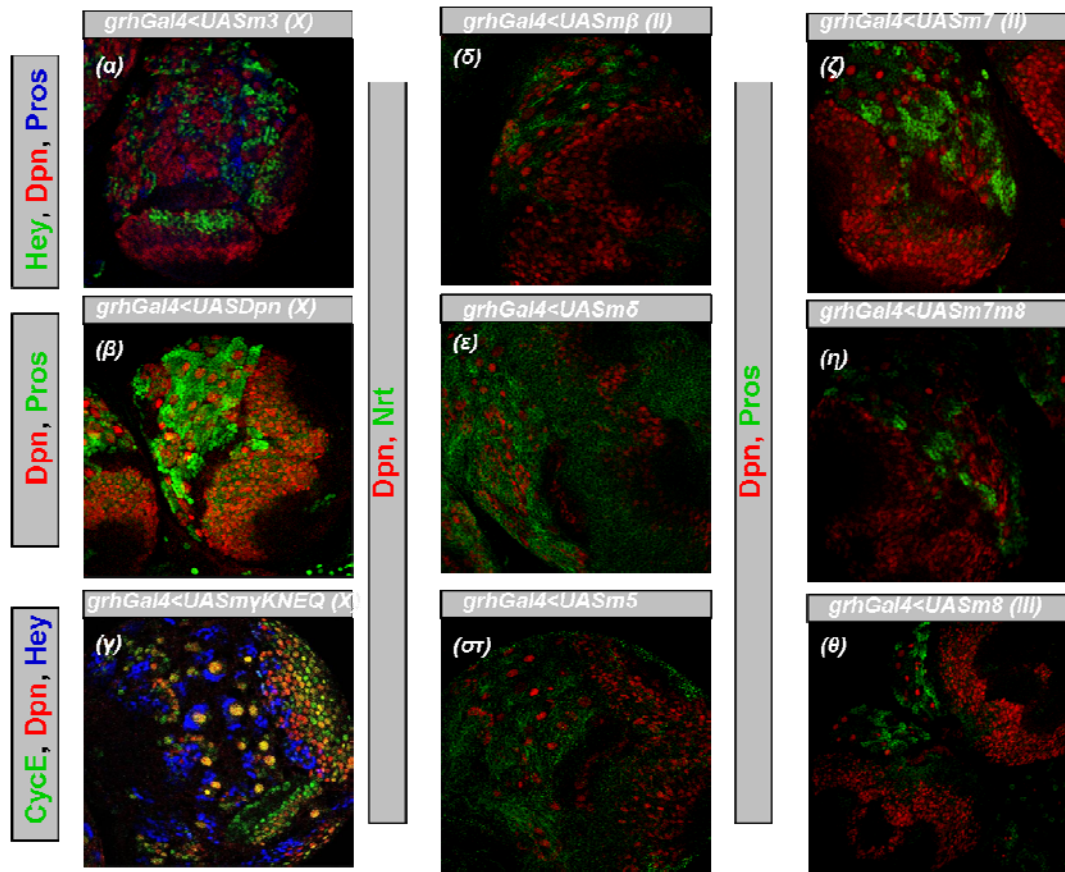
Επομένως φαίνεται ότι η εκτοπική έκφραση ξεχωριστά δύο εκ των πρωτεϊνών bHLH-O, των E(spl)mγ και E(spl)m3 είναι επαρκής για την δημιουργία υπερπλασιών στον κεντρικό εγκέφαλο.



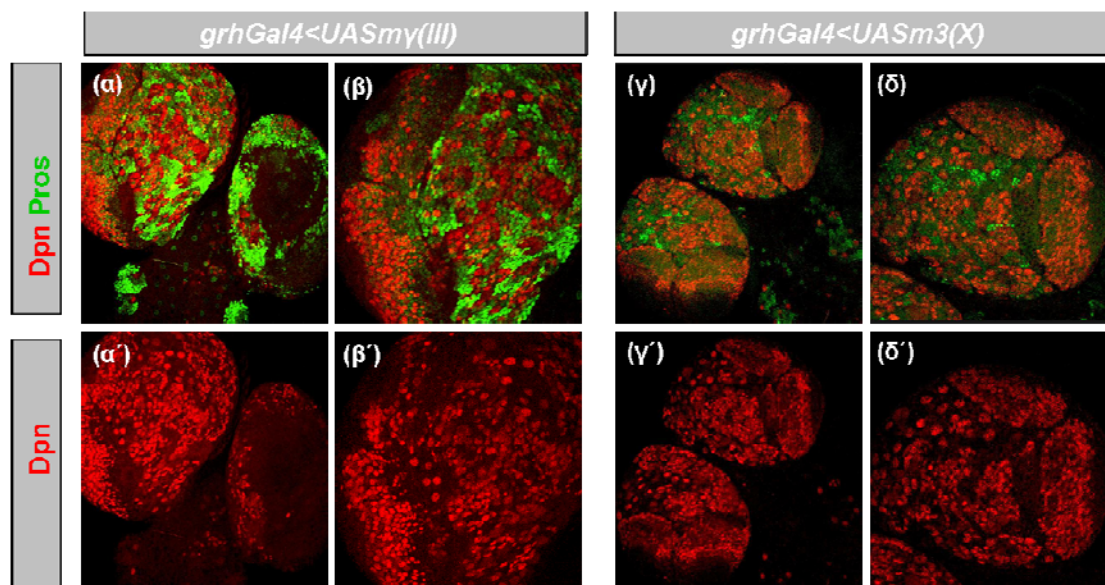
Εικόνα 28: πρότυπο έκφραση του οδηγού **grh-Gal4**. Η φθορίζουσα πρωτεΐνη CD8-GFP βρίσκεται καθοδικά των ρυθμιστικών στοιχείων **UAS** τα οποία αναγνωρίζει ο οδηγός grh-Gal4, προσδένεται σε αυτά και επάγει την έκφραση της **CD8-GFP** κατά το πρότυπο έκφρασης του. Έτσι αποκαλύπτεται ότι ο οδηγός αυτός επάγει την έκφραση γονιδίων στους νευροβλάστες, τα GMCs και τους πρόιμους νευρώνες (α) του ραχιαίου κεντρικού εγκεφάλου, (β) του κοιλιακού κεντρικού εγκεφάλου, (γ) ραχιαία του κοιλιακού γαγγλίου και (δ) κοιλιακά του κοιλιακού γαγγλίου.



Εικόνα 29: εκτοπική έκφραση της πρωτεΐνης E(spl)my υπό τον οδηγό grh-Gal4. (α)-(γ) η εκτοπική υπερέκφραση της E(spl)my στους νευροβλάστες οδηγεί στην υπερπλασία **Dpn**⁺ κυττάρων στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο (α), και (γ) σε μεγέθυνση αλλά όχι στον κοιλιακό κεντρικό εγκέφαλο και στην κοιλιακή νευρική χορδή (β). (δ)-(στ) φυσιολογικός εγκέφαλος και το πρότυπο κατανομής των **Dpn**⁺ κυττάρων (νευροβλάστες). Η πρωτεΐνη **Hey** εκφράζεται σε νεαρούς νευρώνες ενώ η πρωτεΐνη **Pros** εκφράζεται σε νευρώνες και GMCs.



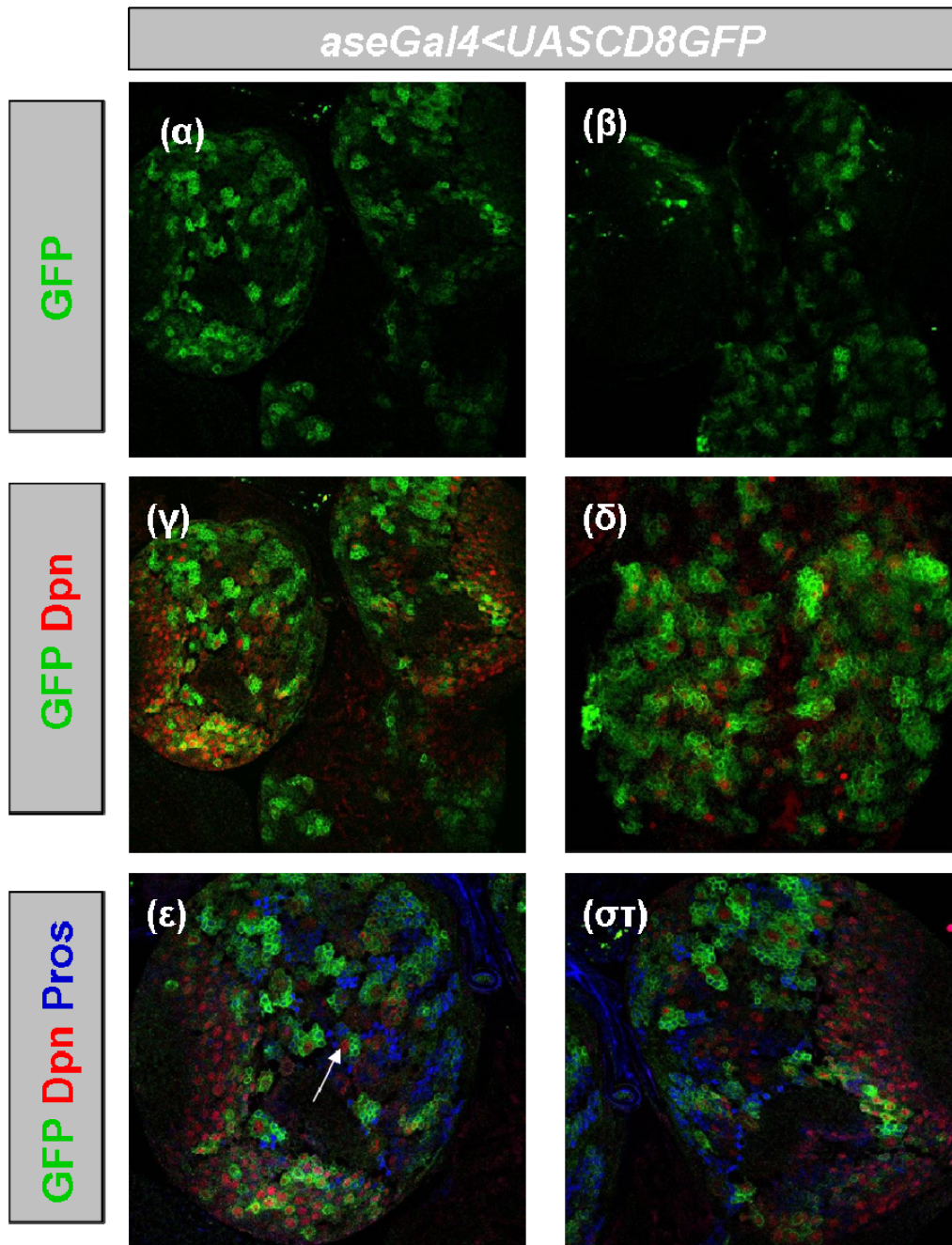
Εικόνα 30: η εκτοπική έκφραση των bHLH-O στους νευροβλάστες με τη χρήση διαγονιδίων UAS-E(spl) και UAS-Dpn και του οδηγού grhGal4. οι υπερπλασίες εμφανίζονται ως παρουσία μεγάλου αριθμού Dpn⁺ κυττάρων (α) υπερέκφραση της E(spl)m3 στους νευροβλάστες, (β) υπερέκφραση της Dpn, (γ) υπερέκφραση της E(spl)mγKNEQ, (δ) υπερέκφραση της E(spl)mβ, (ε) υπερέκφραση της E(spl)mδ, (στ) υπερέκφραση της E(spl)m5, (ζ) υπερέκφραση της E(spl)m7, (η) ταυτόχρονη υπερέκφραση της E(spl)m7και E(spl)m8, (θ) υπερέκφραση της E(spl)m8. Η πρωτεΐνη **Dpn** εκφράζεται στους νευροβλάστες, η πρωτεΐνη **Pros** βρίσκεται στον πυρήνα των GMCs και των νευρώνων, η πρωτεΐνη **Hey** εκφράζεται στους νεαρούς νευρώνες, η πρωτεΐνη **Neurotactin (Nrt)** στους νεαρούς και ώριμους νευρώνες, ενώ η **Cyclin E** στα μιτωτικά ενεργά κύτταρα.



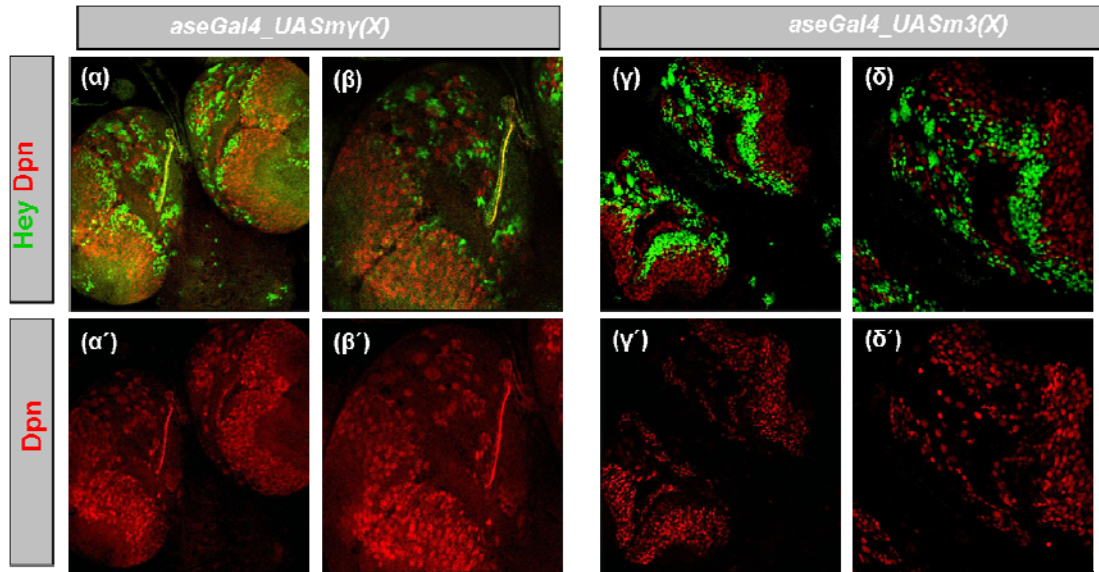
Εικόνα 31: Σύγκριση των εκτοπικών εκφράσεων των E(spl)mγ και E(spl)m3 στους νευροβλάστες με τη βοήθεια της σειράς grainyhead-Gal4. (α)-(α') και (β)-(β') η εκτοπική υπερέκφραση της E(spl)mγ

στους νευροβλάστες οδηγεί σε υπερπολλαπλασιασμό των **Dpn⁺** κυττάρων στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο. (γ)-(γ') και (δ)-(δ') η εκτοπική υπερέκφραση της E(spl)m3 στους νευροβλάστες επίσης οδηγεί σε υπερπολλαπλασιασμό των Dpn⁺ κυττάρων στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο.

Το γεγονός ότι η εκτοπική υπερέκφραση των πρωτεϊνών E(spl)mγ και E(spl)m3 οδηγεί σε υπερπλασίες μονάχα στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο δημιουργεί υποψίες για τα κύτταρα που ευθύνονται για τη υπερπλασία αυτή. Πρόσφατα διατυπώθηκε η θεωρία ότι οι υπερπλασίες που παρατηρούνται στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο απουσία των γονιδίων-καθοριστών της διαφοροποίησης Brat και Numb προκαλούνται από μια ομάδα νευροβλαστών, τους PAN (Posterior Asense Negative Neuroblasts) που εντοπίζονται ραχιαία και μεσο-οπίσθια στον κεντρικό εγκέφαλο. Οι PAN νευροβλάστες εντάσσονται σε μια νέα, αχαρακτήριστη μέχρι πρόσφατα γενεαλογία νευροβλαστών η οποία διαθέτει ένα παροδικά πολλαπλασιαζόμενο δυναμικό ενδιάμεσων πρόδρομων κυττάρων δηλ ένα είδος δευτερευόντων νευροβλαστών. Οι πρωτεύοντες νευροβλάστες που παράγουν αυτή τη γενεαλογία δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη Asense. Οι πρωτεΐνες Brat και Numb προωθούν την ωρίμανση των ενδιάμεσων πρόδρομων και απουσία τους, αποτυγχάνει η διαδικασία της ωρίμανσης, οι ανώριμοι πρόδρομοι αρχίζουν να διαιρούνται και οι απόγονοι τους δε διαφοροποιούνται οδηγώντας έτσι σε υπερπλασίες. (Bowman et al. 2008; Bello et al. 2008). Επομένως, για να διαπιστωθεί αν οι υπερπλασίες που προκαλούν οι E(spl)mγ και E(spl)m3 όταν υπερεκφράζονται στον κεντρικό εγκέφαλο προκύπτουν από απορρύθμιση των PAN νευροβλαστών, προχωρήσαμε στην εκτοπική έκφραση των E(spl)mγ και E(spl)m3 χρησιμοποιώντας διαφορετική GAL4 σειρά, την asense-Gal4, η οποία προκαλεί εκτοπική έκφραση των επιθυμητών γονιδίων σε όλους τους νευροβλάστες πλην των PANs (εικόνα 32). Τελικά, δεν παρατηρήθηκαν υπερπλασίες γεγονός που υποδεικνύει ότι τα πολυάριθμα Dpn⁺ κύτταρα που παρατηρούνται κατά την υπερέκφραση των E(spl)mγ και E(spl)m3 προέρχονται από τους νευροβλάστες PANs οι οποίοι όταν δεχθούν υπερβολική δόση E(spl) ή Notch χάνουν τον έλεγχο της διαδικασίας της αυτό-ανανέωσης / διαφοροποίησης και οδηγούνται στο σχηματισμό υπερπλασιών. Ωστόσο, η διαφορά μεταξύ των φαινοτύπων που παρατηρείται κατά τις υπερεκφράσεις με οδηγούς grhGal4 και aseGal4 θα μπορούσε να οφείλεται στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των δύο οδηγών. Για να αποκλειστεί η πιθανότητα αυτή θα πρέπει μελλοντικά να υπερεκφραστεί το συστατικά ενεργό ενδοκυττάριο τμήμα Nintra με τον οδηγό aseGal4. Αν παρατηρηθεί υπερπλασία τότε θα μπορεί να γίνει αποδεκτή, με μεγαλύτερη βεβαιότητα, η πρόταση ότι οι υπερπλασίες που προκαλούνται από την υπερέκφραση των E(spl)mγ και E(spl)m3 προέρχονται από απορρύθμιση των PAN νευροβλαστών.



Εικόνα 32: πρότυπο έκφραση της σειράς **asense-Gal4**. Η φοριζουσα πρωτεΐνη CD8-GFP βρίσκεται καθοδικά των ρυθμιστικών στοιχείων **UAS** τα οποία αναγνωρίζει ο οδηγός ase-Gal4, προσδένεται σε αυτά και επάγει την έκφραση της **CD8-GFP** κατά το πρότυπο έκφρασης του. Ετσι αποκαλύπτεται ότι ο οδηγός αυτός επάγει την έκφραση γονιδίων στους νευροβλάστες (α)-(γ)-(ε)-(στ) του ραχιαίου κεντρικού εγκεφάλου πλην των νευροβλαστών PAN (ε άσπρο βελάκι)-(στ), (β) του κοιλιακού κεντρικού εγκεφάλου, και (δ) κοιλιακά του κοιλιακού γαγγλίου.



Εικόνα 33: Σύγκριση των εκτοπικών εκφράσεων των $E(spl)my$ και $E(spl)m3$ στους νευροβλάστες με τη βοήθεια της σειράς *Asense-Gal4*. (α)-(α') και (β)-(β') η εκτοπική υπερέκφραση της $E(spl)my$ στους νευροβλάστες δεν επάγει τον υπερπολλαπλασιασμό των Dpn^+ κυττάρων στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο. (γ)-(γ') και (δ)-(δ') η εκτοπική υπερέκφραση της $E(spl)m3$ στους νευροβλάστες επίσης δεν οδηγεί σε υπερπολλαπλασιασμό των Dpn^+ κυττάρων στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ρύθμιση της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης των νευροβλαστών είναι σημαντική για τον σχηματισμό και την επισκευή πολλών ιστών. Στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι το μονοπατιού Notch και οι πρωτεΐνες HES (bHLH-O) – ορισμένες από τις οποίες είναι μεταγραφικοί στόχοι του πρώτου – διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αυτό-ανανέωσης των μετεμβρυικών νευροβλαστών στη *D.melanogaster*. Το ενδιαφέρον για τη μελέτη αυτή προέκυψε από αναφορές στη βιβλιογραφία που ενοχοποιούσαν στην υπερενεργότητα του υποδοχέα Notch στην εμφάνιση υπερπλασιών στον κεντρικό εγκέφαλο της προνύμφης (Wang et al., 2006; Bowman et al., 2008) καθώς επίσης και από έρευνες στα θηλαστικά που καταδείκνυαν τη συμμετοχή των πρωτεϊνών HES στη διαδικασία της αυτοανανέωσης καθώς απουσία τους τα πρόδρομα νευρικά βλαστοκύτταρα σε έμβρυα ποντικών οδηγούνταν σε πρόωρη διαφοροποίηση (Kageyama et al., 2007).

Αρχικά, η ανάλυση των προτύπων έκφρασης των μελών της οικογένειας HES στον εγκέφαλο της προνύμφης αποκάλυψε ότι οι πρωτεΐνες E(spl)mγ, E(spl)mδ, E(spl)mβ και Dpn συνεκφράζονται στους μετεμβρυικούς νευροβλάστες. Επίσης η πρωτεΐνη E(spl)m3 εκφράζεται στους νευροβλάστες (δεδομένα που δεν παρουσιάστηκαν εδώ). Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με την εμβρυογένεση των θηλαστικών (Kageyama et al., 2007) και σε αντίθεση με την εμβρυογένεση στην *D.melanogaster* όπου η πρωτεΐνη Dpn εκφράζεται στους νευροβλάστες και οι πρωτεΐνες E(spl) στο γειτονικό νευροεκτόδερμα αποτρέποντας το έτσι από την υιοθέτηση της νευρικής τύχης (Fisher & Caudy, 1998). Μία άλλη πρωτεΐνη της οικογένειας των bHLH-O, η Hey, βρέθηκε να εκφράζεται στους πιο κοντινούς νευρώνες προς τον νευροβλάστη οι οποίοι είναι και οι πιο πρόσφατα διαφοροποιημένοι. Τέλος, η πρωτεΐνη E(spl)m7 βρέθηκε να εκφράζεται στον οπτικό λοβό ενώ η πρωτεΐνη Hairy φαίνεται να μην εκφράζεται στο ΚΝΣ της προνύμφης (δεδομένα που δεν παρουσιάστηκαν εδώ). Εκκρεμεί, ωστόσο, η εύρεση των προτύπων έκφρασης των γονιδίων *E(spl)m5*, *E(spl)mδ*, *Side*, *Her*, και *cwo* και θα πρέπει μελλοντικά να διερευνηθεί για να ολοκληρωθεί η εικόνα των προτύπων έκφρασης των πρωτεϊνών bHLH-O στον εγκέφαλο της προνύμφης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η έκφραση μελών της οικογένειας bHLH-O σε δύο διαφορετικές θέσεις μέσα στη γενεαλογία των μετεμβρυικών νευροβλαστών, στους ίδιους τους νευροβλάστες και στους νεαρούς νευρώνες που διαφοροποιήθηκαν πολύ πρόσφατα από τα GMCs. Επομένως, υπάρχουν δύο ξεχωριστές σηματοδοτήσεις Notch μέσα στην ίδια γενεαλογία και οι στόχοι αυτών να είναι οι πρωτεΐνες HES όπως προέκυψε από τη γενετική ανάλυση. Το ερώτημα ποιον ακριβώς σκοπό εξυπηρετούν οι δύο αυτές σηματοδοτήσεις παραμένει αναπάντητο και χρήζει διερεύνησης.

Στα πλαίσια της διερεύνησης του παραπάνω ερωτήματος έγινε μια προσπάθεια συσχετισμού αυτών των σηματοδοτήσεων με τη διαδικασία αυτό-ανανέωσης – διαφοροποίησης των νευροβλαστών. Αρχικά έπρεπε να βρεθεί αν οι πρωτεΐνες HES που εκφράζονται στις γενεαλογίες των μετεμβρυικών νευροβλαστών είναι στόχοι του μονοπατιού Notch. Η κλωνική ανάλυση της απώλειας λειτουργίας του Notch με την τεχνική MARM αποκάλυψε ότι οι πρωτεΐνες E(spl)mγ, E(spl)mδ και Hey είναι συνέπεια της σηματοδότησης Notch στους νευροβλάστες και στους πρόσφατα διαφοροποιημένους νευρώνες αντίστοιχα. Αντίθετα η πρωτεΐνη Dpn δεν είναι συνέπεια της σηματοδότησης Notch. Η περαιτέρω κλωνική ανάλυση MARCM της απώλειας της λειτουργίας άλλων μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch που επηρεάζουν τόσο την αποστολή όσο και τη λήψη του σήματος βοήθησε στον

χαρακτηρισμό σε βάθος των εμπλεκόμενων μορίων στα δύο αυτά γεγονότα σηματοδότησης.

Έτσι για την ενεργοποίηση του γονιδίου *E(spl)mγ* στον νευροβλάστη βρέθηκε ότι η αποστολή του σήματος πραγματοποιείται μέσω του προσδέτη DI, την ωρίμανση του οποίου προωθεί όχι η E3 λιγάση της ουβικουιτικής mindbomb (όπως φάνηκε από τους κλώνους απώλειας λειτουργίας της) αλλά η E3 λιγάση neuralized (η οποία βρίσκεται σε αφθονία στον νευροβλάστη και επιπλέον σε κλώνους απώλειας της λειτουργίας του προσδέτη DI δεν επηρεάζονται τα επίπεδα έκφρασης της καθώς βρίσκεται ανοδικά αυτού στο μονοπάτι σηματοδότησης (δεδομένα που δεν παρουσιάστηκαν). Για τη λήψη του σήματος φάνηκε ότι η παρουσία της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης Spdο στην πλασματική μεμβράνη είναι αναγκαία έτσι ώστε να προωθηθεί η μεταγωγή του σήματος από το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα N προς τον πυρήνα. Εκεί φάνηκε ότι είναι απαραίτητη η παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα Su(H) για να αλληλεπιδράσει μαζί του το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα Notch και να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή του γονιδίου *E(spl)mγ*.

Για την ενεργοποίηση του γονιδίου *E(spl)mδ* στους νευροβλάστες βρέθηκε να ισχύουν τα παραπάνω με μοναδική εξαίρεση το γεγονός ότι το 70% των κλώνων απώλειας της λειτουργίας του προσδέτη DI διατηρούν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *E(spl)mδ*, ενώ αυτό συμβαίνει μονάχα για το 2,2% των κλώνων απώλειας της λειτουργίας και των δύο προσδετών DI και Ser. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι το γονίδιο *E(spl)mδ* φέρει ρυθμιστικές αλληλουχίες που το καθιστούν ευαίσθητο στην παρουσία χαμηλών επιπέδων σηματοδότησης Notch. Κατά αυτόν τον τρόπο, απουσία του ενός μόνο προσδέτη, η ύπαρξη του άλλου είναι ικανή να επάγει χαμηλά επίπεδα σηματοδότησης και κατ' επέκταση τη μεταγραφή του γονιδίου αυτού.

Για την ενεργοποίηση του γονιδίου *Hey* στους νεαρούς νευρώνες βρέθηκε να απαιτούνται τα ίδια μόρια του μονοπατιού Notch που απαντώνται και κατά την ενεργοποίηση του γονιδίου *E(spl)mγ* στους νευροβλάστες. Ωστόσο, αρκετά συχνά παρατηρούνται κλώνοι όπου δεν έχει χαθεί η έκφραση της πρωτεΐνης Hey πλήρως από όλους τους νευρώνες. Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο για μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του προσδέτη DI, όπου το 17,7% των κλώνων απώλειας του προσδέτη προσδέτη αυτού φέρει κατά μέσο όρο 3,7 Hey^+ κύτταρα. Τα ποσοστά αυτά μειώνονται στους κλώνους απώλειας και των δύο προσδετών DI και Ser, όπου μονάχα το 11% των κλώνων φέρει κατά μέσο όρο 2,4 Hey^+ κύτταρα ανά κλώνο. Η ύπαρξη Hey^+ κυττάρων σε κλώνους απώλειας της λειτουργίας του προσδέτη DI και σε κλώνους απώλειας λειτουργίας των προσδετών DI και Ser ίσως να δικαιολογούνται από την ύπαρξη μη αυτόνομης σηματοδότησης από γειτονικά κύτταρα, έξω από τους κλώνους. Τέλος, η E3 λιγάσης neur φαίνεται να είναι αυτή που τροποποιεί τον προσδέτη κατά την ενεργοποίηση του γονιδίου *Hey* (ελάχιστο ποσοστό -3,8% -των κλώνων απώλειας της neur φέρει κατά μέσο όρο 1,5 Hey^+ κύτταρα). Για τη λήψη της σηματοδότησης απαιτούνται οι πρωτεΐνες Spdο και Su(H) καθώς ελάχιστα είναι τα ποσοστά των Hey^+ κλώνων σε αυτά (8,3% και 4,8% των κλώνων φέρουν κατά μ.ό. 4 και 2 Hey^+ κύτταρα στην πρώτη περίπτωση ενώ 4,6% των κλώνων φέρουν κατά μ. ό. 8 Hey^+ κύτταρα στην δεύτερη περίπτωση. Η διαφυγή Hey^+ κυττάρων από τους Su(H) κλώνους μπορεί να οφείλεται στη δομή της χρωματίνης στις θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Su(H) η οποία θα έχει λάβει τέτοια διαμόρφωση έτσι ώστε απουσία του μεταγραφικού παράγοντα Su(H) να επιτρέπει για λίγο ακόμα τη μεταγραφή του γονιδίου *Hey*. Η διαφυγή Hey^+

κυττάρων από τους *Sprdo* κλώνους δεν μπορεί να ερμηνευτεί καθώς ο τρόπος δράσης της πρωτεΐνης αυτής παραμένει άγνωστος.

Η ανάλυση της απώλειας λειτουργίας του υποδοχέα Notch καθώς επίσης και μορίων που επηρεάζουν την αποστολή και λήψη σήματος έδειξε ότι οι πρωτεΐνες *E(spl)mγ*, *E(spl)m8* και *Hey* απαιτούν σήμα Notch για την ενεργοποίησή τους στις εκάστοτε γενεαλογίες. Αντίθετα, η χρονικά και ιστό-ειδικά ελεγχόμενη υπερέκφραση ενός συστατικά ενεργού ενδοκυττάρου τμήματος του υποδοχέα Notch (*Nintra*) στους νευροβλάστες οδήγησε στην υπερπλασία νευροβλαστών $Dpn^+ E(spl)mγ^+$ στην επιφάνεια και $Dpn^+ E(spl)mγ^-$ στο βάθος όχι μόνο στον ραχιαίο εγκέφαλο, όπως έδειχνε μέχρι πρόσφατα η βιβλιογραφία ([Wang et al., 2006](#), [Bowman et al., 2008](#)) αλλά και στον κοιλιακό εγκέφαλο, και στην κοιλιακή νευρική χορδή. Χαρακτηριστικά, στην κοιλιακή νευρική χορδή, μια ομάδα είχε προβεί στην υπερέκφραση του υποδοχέα Notch εκεί και δεν είχε παρατηρήσει καμία υπερπλασία ([Almeida and Bray, 2005](#)). Μάλιστα, οι υπερπλασίες που παρατηρήθηκαν στην παρούσα εργασία προέκυψαν σε σύντομο χρονικό διάστημα (8 ώρες) μετά την υπερέκφραση του N^{intra} . Οι διαφορές αυτές με την υπάρχουσα βιβλιογραφία ίσως να σχετίζονται με τη χρήση διαφορετικών οδών για την υπερέκφραση του N^{intra} γεγονός που υποδηλώνει την πολυπλοκότητα και ιστό-ειδικότητα των γεγονότων που ρυθμίζουν τη διαδικασία αυτό-ανανέωσης και διαφοροποίησης στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Επιπλέον, η προέλευση των Dpn^+ κυττάρων που απαντώνται στις υπερπλασίες μάλλον είναι ετερογενής. Στον ραχιαίο κεντρικό εγκέφαλο, κατόπιν υπερέκφρασης τόσο του *Nintra* όσο και των *E(spl)mγ* ή *E(spl)m3*, η υπερπλασία των Dpn^+ κυττάρων μάλλον οφείλεται στις PAN γενεαλογίες νευροβλαστών και έχει παρατεταμένη διάρκεια. Οι γενεαλογίες αυτές ίσως να χάνουν τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των ενδιάμεσων δευτερογενών νευροβλαστών τους με αποτέλεσμα αυτοί να μην μπορούν να ωριμάσουν και να διαφοροποιηθούν αλλά να υιοθετούν την τύχη του νευροβλάστη και να παράγουν πολυάριθμα Dpn^+ κύτταρα. Στις υπόλοιπες περιοχές όπου υπερεκφράζεται το *Nintra*, τα Dpn^+ κύτταρα ίσως να προκύπτουν από την αποδιαφοροποίηση και μετατροπή των GMCs σε νευροβλάστες. Συγκεκριμένα, τα GMCs ίσως να χάνουν την ικανότητα δέσμευσης στην τύχη της διαφοροποίησης, να μεγαλώνουν ξανά σε μέγεθος και θα αποκτούν χαρακτηριστικά νευροβλάστη. Οι υπερπλασίες αυτές ίσως μερικές φορές να διαρκούν για μικρό χρονικό διάστημα και να χάνονται αργότερα αζαιταίς της διαφοροποίησης των υπερπλαστικών νευροβλαστών, γεγονός που ίσως εξηγεί τη μη παρατήρησή τους σε άλλες έρευνες. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για να αποσαφηνιστούν οι παραπάνω θεωρίες και για να βρεθούν όλοι εκείνοι οι παράγοντες που σε συνεργασία με το μονοπάτι Notch οδηγούν στην υπερπλασία. Αναλυτικότερη διερεύνηση και επαγωγή για μεγαλύτερα και μικρότερα των 8 ωρών χρονικά διαστήματα της υπερενεργοποίησης του Notch θα προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για τις υπερπλασίες.

Η έκφραση των *E(spl)* -αλλά όχι και της *Dpn*- αποδείχθηκε να είναι συνέπεια της σηματοδότησης Notch (με τα ανωτέρω πειράματα). Το επόμενο ερώτημα που προκύπτει είναι κατά πόσο αυτές οι *E(spl)* πρωτεΐνες αποτελούν τελεστές του εν λόγω σήματος. Είναι γνωστό ότι παρατεταμένη έκθεση των νευροβλαστών/GMCs σε σήμα Notch προξενεί υπερπλασία νευροβλαστών - ίσως λόγω μετατροπής των GMCs σε νέους νευροβλάστες ([Wang et al., 2007](#) ; [Wang et al., 2006](#)). Θα μπορούσε να συμβεί το ίδιο έπειτα από παρατεταμένη υπερέκφραση μόνο ενός εκ των *E(spl)mγ* ή *E(spl)m3* γονιδίων; Η απάντηση στο παραπάνω ερώτημα ήταν καταφατική υποδηλώνοντας ότι η υπερέκφραση ενός και μόνο *E(spl)mγ* ή *E(spl)m3* γονιδίου είναι επαρκής για την επαγωγή υπερπλασίας. Ωστόσο το ερώτημα της αναγκαιότητας

των *E(spl)my* και *m3* για την επαγωγή υπερπλασίας παραμένει αναπάντητο. Θα πρέπει μελλοντικά να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονη υπερέκφραση του γονιδίου *Nintra* σε μιτωτικούς κλώνους απώλειας λειτουργίας όλων των γονιδίων *E(spl)* για να διαπιστωθεί αν θα μπορέσει η υπερενεργοποίηση του μονοπατιού Notch να επαγάγει υπερπλασία των νευροβλαστών απουσία των πρωτεϊνών *E(spl)*.

Σε ένα αντίστροφο πείραμα, για την εδραίωση της επάρκειας θα πρέπει να συμβεί υπερέκφραση των γονιδίων *E(spl)my* ή *E(spl)m3* και ταυτόχρονη απενεργοποίηση (σε μωσαϊκά) του γονιδίου Notch για να διαπιστωθεί αν τα πρώτα είναι ικανά να επάγουν την αυτοανανέωση των νευροβλαστών απουσία σηματοδότησης Notch.

Η έκφραση πολλών γονιδίων της ίδιας οικογένειας [*E(spl)my*, *E(spl)m8*, *Dpn*] στην ίδια θέση, (νευροβλάστες) πιθανώς να υποδεικνύει την ύπαρξη αλληλεπικάλυψης των λειτουργιών τους. Παρόμοιο φαινόμενο απαντάται και στα θηλαστικά όπου υπάρχει αλληλεπικάλυψη μεταξύ των *HES1*, *HES3* και *HES5* για την διατήρηση της ικανότητας αυτό-ανανέωσης των νευροβλαστών του ποντικού (Kageyama et al. 2007). Η δημιουργία διπλών μεταλλάγματα *dpr* και *Espl* θα προσφέρει πληροφορίες για τυχόν πλεονάζουσα δράση αυτών των bHLH-O παραγόντων.

Οι πρωτεΐνες *E(spl)* και *Dpr* ανήκουν σε οικογένεια καταστολέων οπότε ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε μελλοντικά η εύρεση των γονιδίων στόχων τους καθώς φαίνεται ότι η καταστολή τους είναι σημαντική για την εύρυθμη λειτουργία του νευροβλάστη. Αντίστοιχες μελέτες σε θηλαστικά (Shimojo et al. 2008) δημιουργούν υποψίες για τη φύση των γονιδίων αυτών και στη *D.melanogaster*. Πιθανότατα θα είναι γονίδια τα οποία συμβάλλουν στη νευρική διαφοροποίηση των κυττάρων και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου του νευροβλάστη.

Με τα παραπάνω πειράματα προσεγγίστηκε ποιοτικά η επίδραση του μονοπατιού Notch στην αυτο-ανανέωση των νευροβλαστών. Ωστόσο, απουσιάζουν πληροφορίες για την δυναμική του μηχανισμού αυτού στο χώρο και στο χρόνο. Πολλά ερωτήματα παραμένουν ανεξιχνίαστα όπως πότε ενεργοποιείται ή καταστέλλεται το μονοπάτι Notch, ποια είναι η διάρκεια της σηματοδότησης του προς το νευροβλάστη και προς τους νεαρούς νευρώνες, ποια κύτταρα - πέρα από τα GMCs στη σηματοδότηση προς το νευροβλάστη και πέρα από τους γειτονικούς νευρώνες της ίδιας γενεαλογίας στη σηματοδότηση προς τους νεαρούς νευρώνες – στέλνουν σήμα Notch (μη αυτόνομα γεγονότα σηματοδότησης). Απάντηση στα ερωτήματα αυτά θα μπορούσε να δοθεί μελλοντικά παρατηρώντας τα γεγονότα αυτά ζωντανά τη στιγμή που λαμβάνουν χώρα και μέσα στον εγκέφαλο (in vivo live imaging). Η κατασκευή δύο εργαλείων, ενός κατάλληλου ανταποκριτή της ενεργότητας του μονοπατιού Notch [*E(spl)my-dEGFP* όπου η dEGFP αποικοδομείται πολύ γρήγορα] και ενός μάρτυρα απεικόνισης των κυττάρων [η συντηγμένη πρωτεΐνη H2B-RFP αποκαλύπτει τα χρωμοσώματα και πόσο συμπαγή είναι αυτά στους πυρήνες κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου] θα καταστήσει εφικτή τη βιντεοσκόπηση ζωντανά μέσα στον εγκέφαλο.

Τέλος, το γεγονός ότι οι N⁺ κλώνοι δεν προξενούν απώλεια των νευροβλαστών (παρατηρήσεις της παρούσας εργασίας, Almeida & Bray, 2005) υποδηλώνει την ύπαρξη πλεοναζόντων μονοπατιών πλην της σηματοδότησης Notch που συνεισφέρουν στη διατήρηση των νευροβλαστών.

Το μικροπεριβάλλον του νευροβλάστη είναι πιθανόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα του να αυτο-ανανεώνεται όπως συμβαίνει άλλωστε και σε άλλα είδη βλαστικών κυττάρων [π.χ τα βλαστικά κύτταρα της γαμετικής σειράς (Germline Stem Cells) στη Δροσόφιλα]. Τα βλαστικά κύτταρα της γαμετικής

σειράς ελέγχουν τη αυτό-ανανέωσή τους μέσω μικρής εμβέλειας διαχεόμενων σημάτων (Dpp και πρωτεΐνες της οικογένειας BMP) που προέρχονται από τα γειτονικά τους κύτταρα με τα οποία επικοινωνούν με adherens junctions που περιέχουν β-catenin και DE-Cadherin (Knoblich, 2008). Ομοίως, στον εγκέφαλο της προνύμφης της Δροσόφιλας, η πρωτεΐνη Dpn, η αυτό-ανανέωση των νευροβλαστών, πέρα από τον έλεγχο του Notch, θα μπορούσε να υπόκειται στη ρύθμιση σημάτων με προέλευση από το μικροπεριβάλλον. Τα κύτταρα της γλοίας που πλαισιώνουν τους νευροβλάστες και τους απογόνους τους και τα οποία μαζί με τους νευροβλάστες και τους πιο πρόσφατα διαφοροποιημένους νευρώνες τους εκφράζουν στην επιφάνειά τους τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη DE-Cadherin (Dumstrei et al 2003), θα μπορούσαν να στέλνουν μικρής εμβέλειας σήματα στους νευροβλάστες και να ρυθμίζουν πιθανώς την αυτό-ανανέωσή τους ή και την πρωτεΐνη Dpn. Η θεωρία αυτή χρήζει μελέτης μελλοντικά.

Ένας άλλος μηχανισμός που θα μπορούσε να συμμετέχει στη ρύθμιση του γονιδίου *dpr* είναι η επιγενετική ρύθμιση της χρωματίνης. Πρόκειται για ένα μηχανισμό μνήμης όπου η μεταγραφικά ενεργή ή κατεσταλμένη κατάσταση στην οποία βρίσκεται ένα γονίδιο διατηρείται σταθερή έπειτα από αλληπάλληλες κυτταρικές διαιρέσεις, απουσία του σήματος ή του γεγονότος που διαμόρφωσε αρχικά την κατάσταση αυτή του γονιδίου (Ringrose & Paro 2007). Έτσι, μεταγραφικά πρότυπα που ορίστηκαν κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης μπορούν να διατηρηθούν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μέχρι και την ενήλικη ζωή και να αποφευχθούν αλλαγές της ταυτότητας των κυττάρων. Τη διατήρηση της ενεργοποιημένης ή της κατεσταλμένης κατάστασης ενός γονιδίου εξασφαλίζει η πρόσδεση των συμπλόκων Trithorax (Trx) και Polycomb (PcG) στα ρυθμιστικά στοιχεία TREs και PREs αντίστοιχα (με τη βοήθεια διάφορων παραγόντων πρόσδεσης στο DNA όπως π.χ pipesqueak, GAF, PHO, zeste κ.α) και η εναπόθεση κατάλληλων σημάτων στις ουρές των ιστονών (ακετυλιώσεις, μεθυλιώσεις, ουβικουΐτινυλιώσεις κ.α) που αποτελούν τον επιγενετικό κώδικα πληροφόρησης για την κατάσταση στην οποία βρίσκεται η χρωματίνη (ενεργή/ανεργή) (Schuettengruber et al. 2007). Το γονίδιο *dpr* είναι ιδανικός υποψήφιος να ελέγχεται από επιγενετικούς παράγοντες καθώς ενεργοποιείται στους νευροβλάστες κατά την εμβρυογένεση και έκτοτε παραμένει ενεργό στους μετεμβρυϊκούς νευροβλάστες σε όλα τα προνυμφικά στάδια. Αξίζει λοιπόν μελλοντικά να διερευνηθεί αν η έκφραση της πρωτεΐνης Dpn στους μετεμβρυϊκούς νευροβλάστες επηρεάζεται από την απουσία/ υπερενεργοποίηση διάφορων επιγενετικών ρυθμιστών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Almeida, M.S., and Bray, S.J.** (2005). Regulation of post-embryonic neuroblasts by *Drosophila* Grainyhead. *Mech Dev* **122**, 1282-93.
- **Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776.
- **Baron, M.** (2003). An overview of the Notch signaling pathway. *Sem. Cell & Dev. Biol.* **14**, 113-119.
- **Barrett, A.L., Krueger, S. and Datta, S.** (2008) Branchless and Hedgehog operate in a positive feedback loop to regulate the initiation of neuroblast division in the *Drosophila* larval brain. *Dev Biol.* **317**, 234-45.
- **Bello, B.C, Holbro, N., and Reichert, H.** (2007). Polycomb group genes are required for neural stem cell survival in postembryonic neurogenesis of *Drosophila*. *Development* **134**, 1091-1099.
- **Bello, B.C., Izergina, N., Caussinus, E. and Reichert, H.** (2008). Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development. *Neural Dev.* **3**: 5
- **Bello, B.C, Reichert, H., and Hirth, F.** (2006). The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of *Drosophila*. *Development* **133**, 2639–2648.
- **Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M., and Knoblich, J.A.** (2002). The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev. Cell* **3**, 221–231.
- **Betschinger, J., and Knoblich, J.A.** (2004). Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr. Biol.* **14**, R674–R685.
- **Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J.A.** (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326–330.
- **Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J.A.** (2006). Asymmetric segregation of the tumor suppressor *brat* regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* **124**, 1241–1253.
- **Bowman, S.K., Neumuller, R.A., Novatchkova, M., Du, Q., and Knoblich, J.A.** (2006). The *Drosophila* NuMA homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev. Cell* **10**, 731–742.
- **Bowman, S.K., Rolland, V., Betschinger, J., Kinsey, K.A., Emery, G., and Knoblich, J.A.** (2008). The tumor suppressors *Brat* and *Numb* regulate transit-amplifying neuroblasts lineages in *Drosophila*. *Dev. Cell* **14**, 535-546.
- **Buescher, M., Yeo, S. L., Udolph, G., Zavortink, M., Yang, X., Tear, G. and Chia, W.** (1998). Binary sibling neuronal cell fate decisions in the *Drosophila* embryonic central nervous system are non-stochastic and require *inscuteable* mediated asymmetry of ganglion mother cells. *Gene Dev.* **12**, 1858-1870.
- **Chia, W., Somers, W.G., and Wang, H.** (2008). *Drosophila* neuroblasts asymmetric divisions: cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and tumorigenesis. *J. Cell Biol* **180**, 267-72.
- **Choksi, S.P., Southall, T.D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B.E., van Steensel, B., Micklem, G., and Brand, A.H.** (2006). Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Dev. Cell* **11**, 775–789.

- **Dumstrei, K., Wang, F., and Hartenstein, V.** (2003). Role of DE-Cadherin in neuroblast proliferation, neural morphogenesis and axon tract formation in *Drosophila* larval brain development. *J.neurosci.* 23 (8), 3325-3335.
- **Fisher, A., Caudy, M.** (1998). The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *Bioessays* 20:298-306.
- **Fisher, A., Ohsako, S., Caudy, M.** (1996). The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol. Cell Biol.* 16: 2670-2677.
- **Frank, D.J., Edgar, B.A., and Roth, M.B.** (2002). The *Drosophila melanogaster* gene brain tumor negatively regulates cell growth and ribosomal RNA synthesis. *Development* 129, 399–407.
- **Harrison, D.A. and Perrimon N.** (1993). Simple and efficient generation of marked clones in *Drosophila*. *Curr Biol.* 3, 424-33.
- **Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y., and Matsuzaki, F.** (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* 377, 627–630.
- **Ikeshima-Kataoka, H., Skeath, J.B., Nabeshima, Y., Doe, C.Q., and Matsuzaki, F.** (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* 390, 625–629.
- **Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T., and Matsuzaki, F.** (2006). *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat. Cell Biol.* 8, 586–593.
- **Jiménez, G. and Ish-Horowicz, D.** (1997). A chimeric Enhancer- of-split transcriptional activator drives neural development and achaete-scute expression. *Mol.Cell. Biol.* 17, 4355-4362.
- **Kageyama, R., Ohtsuka, T., and Kobayashi, T.** (2007). The HES gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* 134, 1243-51.
- **Kennerdell JR, and Carthew RW.** (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* 18: 896–898.
- **Kraut, R., Chia, W., Jan, L.Y., Jan, Y.N., and Knoblich, J.A.** (1996). Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 383, 50–55.
- **Knoblich, J.A** (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 132, 583-597.
- **Knoblich, J.A., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.** (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* 377, 624–627.
- **Le Borgne, R., Bardin, A., and Schweisguth, F.** (2005). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132, 1751–1762.
- **Lee, C.Y., Andersen, R.O., Cabernard, C., Manning, L., Tran, K.D., Lanskey, M.J., Bashirullah, A., and Doe, C.Q.** (2006a). *Drosophila* Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev.* 20, 3464–3474.
- **Lee, C.Y., Robinson, K.J., and Doe, C.Q.** (2006b). Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* 439, 594–598.

- **Lee, C.Y., Wilkinson, B.D., Siegrist, S.E., Wharton, R.P., and Doe, C.Q.** (2006c). Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev. Cell* **10**, 441–449.
- **Lee, T., and Luo, L.** (2001). Mosaic analysis with repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci* **20**, 251-4.
- **Li, L., and Vaessin, H.** (2000). Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev.* **14**, 147–151.
- **Lu, B., Rothenberg, M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1998). Partner of Numb, a novel protein that colocalises with Numb during mitosis, directs Numb asymmetric localisation in *Drosophila* neural and muscle progenitors. *Cell* **95**, 225-35.
- **McGuire, S.E. Roman, G., and Davis, R.L.**(2004). Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. *Trends Genet* **20**, 384-91.
- **Murre, C., G. Bain, M. A. v. Dijk, I. Engel, B. A. Furnari, M. E. Massari, J. R. Matthews, M. W. Quong, R. R. Rivera, and M. H. Stuver.** 1994. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1218**:129–135.
- **Passague, E.** (2006). Cancer biology: a game of subversion. *Nature* **442**, 754-755.
- **Phelps, C.B., and Brand, A. H.** (1998). Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* **14**, 367-79.
- **Ringrose L., and Paro, R.** (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* **134**, 223-232.
- **Schober, M., Schaefer, M., and Knoblich, J.A.** (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 548–551.
- **Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G.** (2007). Genome regulation by Polycomb and Trithorax proteins. *Cell* **128**, 735-745.
- **Schweisguth, F.** (2004). Notch signaling activity. *Curr. Biol.* **14**, R129–R138.
- **Shen, C.P., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.** (1997). Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell* **90**, 449–458.
- **Skeath, J.B., and Doe, C.Q.** (1998). Sanpodo and Notch act in opposition to numb to distinguish sibling neuron fates in the *Drosophila* CNS. *Development* **125**, 1857-1865.
- **Siller, K.H., Cabernard, C., and Doe, C.Q.** (2006). The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat. Cell Biol.* **8**, 594–600.
- **Wai P., Truong, B. and Bhat, K.M.** (1999). Cell division genes promote asymmetric interaction between Numb and Notch in the *Drosophila* CNS. *Development* **126**, 2759-2770.
- **Wang, H., Ouyang, Y., Somers, W.G., Chia, W., and Lu, B.** (2007). Polo inhibits progenitor self-renewal and regulates Numb asymmetry by phosphorylating Pon. *Nature* **449**, 96-100.
- **Wang, H., Somers, G.W., Bashirullah, A., Heberlein, U., Yu, F., and Chia, W.** (2006). Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev* **20**, 3453-63.

- **Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U., and Knust, E.** (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 544–547.
- **Yu, F., Kuo, C.T., and Jan, Y.N.** (2006). *Drosophila* neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. *Neuron* **51**, 13-20.
- **Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X. and Chia, W.** (2000). Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals two distinct steps in Inscuteable apical localisation. *Cell* **100**, 399-409.