



PROVAS ACADÉMICAS
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

Doutoramento:

Ciências Biomédicas

Nome do Aluno:

Susana Conceição Ferreira Rocha

Tema da Tese:

The role of multiple DSL, ligands-D111, D114 and Jag1- in vertebrate neurogenesis.

Área:

Ciências Biomédicas

Especialidade:

Neurociências

Data da Defesa:

04/12/2009

Classificação:

Aprovado com Distinção e Louvor por Unanimidade

Júri:

Presidiu o Vice-Presidente do Conselho Científico da FMUL, Professor Doutor José Melo Cristino e estiveram presentes os vogais: Professores Doutores Achim Gossler, Medizinische Hochschule Hannover, João Bettencourt Relvas, Universidade do Porto, Maria Leonor Parreira, Moisés Mallo, Leonor Saúde, Domingos Henrique, todos da Universidade de Lisboa.



PROVAS ACADÉMICAS
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

RESUMO

A sinalização Notch é uma via de sinalização que é conservada no reino animal e que depende da comunicação directa entre células para permitir a geração de diversidade celular. Desta forma, a via Notch é fundamental para o desenvolvimento de organismos multicelulares. A sinalização Notch é mediada por interações estabelecidas entre receptores Notch e ligandos DSL, que se encontram na superfície membranar de células vizinhas. Esta interacção entre receptor-ligando desencadeia várias reacções proteolíticas do receptor, que resultam por fim na clivagem do domínio intracelular de Notch (NICD). Após a translocação do fragmento NICD para o núcleo, este associa-se com o factor de transcrição CSL e activa a expressão de genes alvo. Alguns destes genes alvo codificam para repressores transcricionais que inibem a expressão de ligandos DSL. Desta forma, é criado um mecanismo de retroacção negativa que amplifica a capacidade sinalizadora de uma célula, ao mesmo tempo que re-enforça o carácter receptor da célula vizinha. Este mecanismo molecular permite a amplificação de pequenas diferenças que possam existir entre duas células que interactuem e que têm potenciais de desenvolvimento semelhantes. No sistema nervoso, a actividade Notch é essencial para vários processos, entre os quais a neurogénese, a especificação de tipos celulares, a viabilidade e a migração celular. Apesar desta via de sinalização convergir sistematicamente na activação do factor de transcrição CSL, a sinalização Notch é capaz de mediar variadas funções no mesmo tecido. Contudo, é sabido que a existência de múltiplos ligandos DSL e moduladores de Notch podem influenciar o resultado final da sinalização Notch e, desta forma, exercer diferentes funções. O objectivo do trabalho descrito nesta tese era o de compreender a função e a contribuição de vários ligandos DSL para o desenvolvimento correcto do sistema nervoso em vertebrados. Para tal, os meus estudos focaram-se em três genes que codificam para ligandos DSL, nomeadamente *Dll1*, *Dll4* e *Jag1*. Estes genes apresentam, no sistema nervoso embrionário, padrões de expressão que tanto podem ser complementares, como podem ocorrer de uma forma coincidente. Esta diversidade nos padrões de expressão dos vários ligandos, sugere por si só, a possibilidade de exercerem diferentes funções. No entanto, muitas questões permanecem por ser respondidas e requerem mais estudo. Nesta tese, descrevo em detalhe o padrão de expressão de *Dll1*, *Dll4* e *Jag1* no tubo neural, retina e telencéfalo. Embora já fosse sabido que *Dll1* e *Jag1* são expressos de forma complementar no tubo neural, eu mostro que as 'riscas' de expressão de *Jag1* correspondem aos domínios restritos de pV1 e dl6. Através da análise de ratinhos com perda de função condicional para *Dll1* e *Jag1*, pude mostrar pela primeira vez que *Jag1* é capaz de activar a sinalização Notch nestes mesmos domínios neurais, e que, desta forma, é suficiente para a manutenção de uma população de progenitores. No telencéfalo onde a expressão de *Jag1* se sobrepõe com a de *Dll1*, *Jag1* não é capaz de activar a via Notch ou pelo menos, não de forma suficiente. Embora permaneça por esclarecer porque é que *Jag1* apresenta diferentes capacidades de activação da via Notch no tubo neural e no telencéfalo, a sua função continua por esclarecer até no tubo neural, onde eu mostro que apesar de ser suficiente para mediar inibição lateral, sinalização Notch mediada por *Jag1* não é necessária para este processo. A expressão de *Dll1* nos domínios adjacentes é capaz de compensar completamente pela perda de função de *Jag1*. Aliás, eu mostro que um único ligando DSL, *Dll1*, é necessário e suficiente para levar a cabo a função de manutenção de progenitores nos três tecidos neuronais analisados. Consequentemente, sinalização Notch mediada por *Dll1* permite a geração de diferentes tipos celulares quando estes são criados ao longo do tempo, tal como é o caso da produção de neurónios e de glia. Em regiões específicas do sistema nervoso de vertebrados, como por exemplo, no domínio pV2 do tubo neural e na retina, vários tipos celulares são produzidos simultaneamente. Nestas regiões, um circuito genético faz uso de dois ligandos DSL, *Dll1* e *Dll4*, que são expressos de forma sequencial em

células que se começam a diferenciar em neurónios. Em adição, eu mostro que nestas regiões onde Dll1 e Dll4 são co-expressos, é possível observarmos a expressão de *hes5*, isto é, a activação de Notch em neurónios nascentes que expressam *Dll1*. Curiosamente, esta activação de Notch não é observada em células que expressam *Dll4*, apesar destas também serem neurónios nascentes uma vez que não apresentam marcadores de progenitores. A análise de mutantes para *Dll1* revelou um fenótipo neurogénico esperado. No entanto, e em contraste com mutantes em que a sinalização Notch se encontra completamente comprometida, a diferenciação neuronal prematura observada não se fez acompanhar por uma perda na diversidade de tipos celulares. Este trabalho levou à proposta de um modelo em que a expressão sequencial de *Dll1* e *Dll4* cria um mecanismo molecular que permite uma dada célula receber sucessivos sinais Notch, que correlacionam com duas decisões de destino celular. Sinalização Notch mediada por Dll1 é necessária numa primeira fase para mediar a decisão progenitor versus neurónio. Quando uma célula inicia a sua diferenciação neuronal, recorre mais uma vez à sinalização Notch, desta vez mediada por Dll4, para impedir células adjacentes, e que também se encontram em diferenciação, de adoptarem a mesma identidade.

