



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

Doutoramento:

Ciências Biomédicas

Nome do Aluno:

Filipe André Santos de Castro Vilas-Boas

Tema da Tese:

Functional Analysis of the Notch Signalling Cascade in Neural Progenitors

Área:

Ciências Biomédicas

Especialidade:

Biologia do Desenvolvimento

Data da Defesa:

14/01/2011

Classificação:

Aprovado com Distinção e Louvor por Unanimidade

Júri:

Presidiu o Vice - Presidente do Conselho Científico da FMUL, Professor Doutor José Augusto Gamito Melo Cristino e estiveram presentes os vogais Doutores: David Ish-Horowicz, do London Research Institute, Reino Unido, Diogo Pinto da Cruz Sampaio e Castro, do Instituto Gulbenkian de Ciência, Domingos Manuel Pinto Henrique, António Alfredo Coelho Jacinto e Maria Leonor Tavares Saúde, todos da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.



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

Resumo

As constantes melhorias na qualidade de vida reflectem-se no aumento da esperança média de vida. No entanto, o conseqüente envelhecimento da população mundial tem causado um aumento da taxa de incidência de doenças neurodegenerativas. Por esse motivo, torna-se muito importante desenvolver novas estratégias de prevenção ou cura dessas doenças. Estas estratégias poderão envolver, no futuro, o recurso à medicina regenerativa, utilizando células estaminais para reparar tecidos nervosos danificados. As células estaminais podem diferenciar-se em diversos tipos celulares, desde que lhes sejam apresentados os devidos sinais moleculares. Logo, para que seja possível manipular estas células e diferenciá-las em tecido nervoso, é necessário um conhecimento aprofundado dos mecanismos moleculares que controlam a formação do sistema nervoso. Nesta tese, investigou-se um mecanismo utilizado em vários processos do desenvolvimento animal, incluindo o desenvolvimento do sistema nervoso central de vertebrados: a via de sinalização Notch.

Para gerar o número correcto de neurónios durante o desenvolvimento, é necessária a manutenção de uma população residente de progenitores neurais com capacidade proliferativa, assegurando a produção contínua de novos neurónios durante o período de neurogénese. Cada progenitor neural pode dividir-se simetricamente e gerar duas células equivalentes que se dividem novamente (divisão P-P), ou duas células equivalentes que se diferenciam em neurónios (divisão N-N). Pode, ainda, dividir-se assimetricamente, para dar origem a duas células diferentes, em que uma se divide novamente e a outra se diferencia em neurónio (divisão P-N). Sendo assim, para assegurar a manutenção de progenitores durante todo o período de neurogénese, a regulação do número de cada tipo de divisão (P-P, P-N ou N-N) deverá ser importante. O balanço entre proliferação e neurogénese é assegurado pela actividade da via Notch, que restringe a diferenciação neuronal. No entanto, a actividade da via Notch na regulação do número de cada tipo de divisão ainda não foi investigada.

A sinalização Notch é mediada por interacções entre células adjacentes: após o contacto entre um ligando transmembranar de uma célula (Delta ou Serrate), e o receptor transmembranar de outra célula (Notch), o receptor sofre uma clivagem proteolítica catalisada pela γ -secretase, libertando o domínio intracelular de Notch (NICD) da membrana. O fragmento NICD é transportado para o núcleo, onde se liga às proteínas CSL e Mastermind (MAM), transformando a proteína CSL num activador transcrricional, enquanto que na ausência de NICD a proteína CSL actua como repressor transcrricional. O complexo NICD/CSL/MAM activa a transcrição de diversos genes, sendo que os melhor caracterizados são os genes Hes (Hairy and Enhancer of Split). Estes codificam proteínas que possuem o domínio basic helix-loop-helix (bHLH) e são repressoras transcripcionais que inibem a diferenciação neuronal. Alguns dos genes, cuja transcrição é reprimida pelas proteínas HES, são os genes proneurais, que estão envolvidos na promoção da diferenciação neuronal. Durante a neurogénese, os neurónios nascentes expressam altos níveis de proteínas proneurais, que promovem a expressão dos ligandos Delta ou Serrate. Estes ligandos sinalizam para os progenitores neurais vizinhos que expressem o receptor Notch. A activação deste receptor leva à expressão das proteínas HES e à inibição da actividade dos genes proneurais, prevenindo, assim, a diferenciação dos progenitores neurais num processo chamado de inibição lateral. Apesar da actividade Notch ser necessária para a manutenção da população de progenitores neurais, diversos factos sugerem que a actividade Notch não é constante: (a) os diversos passos da via Notch têm curta duração, inclusivé a actividade das proteínas HES, devido à repressão da transcrição dos seus próprios genes, e aos tempos de vida reduzidos dos ARNm's e proteínas codificados pelos genes Hes; (b) a cada instante, os progenitores neurais com actividade Notch são apenas uma pequena porção do total de células que expressam o receptor Notch; (c) há diferentes níveis de expressão dos genes Hes entre células a cada dado momento; (d) os neurónios que se diferenciam acabam por migrar para longe da região onde se encontram os progenitores neurais, sugerindo que, após a diferenciação de uma célula, os progenitores neurais podem sofrer alterações nos níveis de actividade Notch. Esta possível actividade dinâmica de Notch já foi observada num outro processo do desenvolvimento de vertebrados, conhecido por somitogénese. No entanto, a observação de flutuações na actividade de Notch em progenitores neurais ainda não foi comprovada.

Durante o trabalho descrito nesta tese, foram investigados dois genes Hes, tendo como objectivo a determinação das suas funções, utilizando o embrião de galinha como modelo experimental. Estes genes Hes são peculiares, pois não são activados pela via Notch e não inibem a diferenciação, contribuindo, pelo contrário, para terminar a actividade de Notch em neurónios nascentes. Estes genes são expressos em tempos diferentes durante a diferenciação neuronal, sendo que a proteína HES6-2 é expressa antes da HES6-1. Para além disso, estas proteínas actuam por mecanismos diferentes, provavelmente devido a aspectos particulares das suas estruturas que permitem a ligação da proteína HES6-2, mas não da HES6-1, ao ADN, sugerindo que a proteína HES6-2 actua por repressão da transcrição, enquanto que a proteína HES6-1 funciona por interacção com outras proteínas. Estudos funcionais de diferentes variantes destas proteínas, geradas no decorrer do trabalho descrito nesta tese, sugerem um modelo para a terminação da via Notch em neurónios nascentes: a proteína HES6-2 é expressa primeiro e reprime a transcrição dos genes Hes – efectores da via Notch; em seguida, a proteína HES6-1 é expressa e sequestra as proteínas HES; juntas, as duas proteínas HES6 contribuem para o término da actividade da via Notch, ao reprimirem a expressão e inibirem a função de componentes fundamentais desta via. No entanto, enquanto que homólogos dos dois genes Hes6 existem em peixes, rãs, galinhas e ornitorrincos, apenas um gene Hes6 existe em ratinhos e humanos, sendo este um homólogo do gene Hes6-1. Esta observação sugere o desaparecimento do gene Hes6-2 durante a evolução dos mamíferos.

Para além do estudo dos mecanismos responsáveis pelo término da actividade da via Notch, construiu-se um repórter que permite a monitorização da sinalização Notch em progenitores neurais durante o seu ciclo celular. Nesta parte do trabalho, foram vários os objectivos principais: (a) a determinação da existência, ou não, de uma actividade dinâmica da via Notch em progenitores neurais; (b) a observação do início da actividade Notch, determinando se esta actividade pode ser iniciada durante todo o ciclo celular, ou apenas em algumas fases; (c) a determinação de uma possível participação da via Notch nos mecanismos responsáveis pela distinção entre as divisões P-P, P-N e N-N.

A monitorização da actividade Notch permitiu-me concluir que esta pode ocorrer durante diversas fases do ciclo celular dos progenitores neurais, sugerindo a existência de estocasticidade nas activações. Por outro lado, a observação do momento inicial das activações Notch em progenitores neurais sugere que nestas células possam ocorrer activações sucessivas de Notch. Para além disso, a determinação dos tempos exactos das activações Notch durante o ciclo celular sugerem o seguinte modelo para a função desta via na definição do futuro destas células: a actividade da via Notch antes da mitose poderá dar origem a uma divisão celular simétrica, na qual serão geradas duas células progenitoras que entrarão novamente em divisão; pelo contrário, a activação de Notch apenas depois da mitose poderá dar origem a duas células diferentes – a célula que activa Notch poderá dividir-se novamente, enquanto que a célula desprovida de qualquer actividade Notch poderá entrar em diferenciação neuronal. Estes resultados sugerem a existência de uma actividade dinâmica da sinalização Notch e um modelo em que a estocasticidade das activações Notch pode contribuir para a definição dos diferentes tipos de divisão celular.

No seu todo, o trabalho descrito nesta tese revela aspectos fundamentais da função da via de sinalização Notch na manutenção de progenitores neurais durante o desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados e revela alguns mecanismos pelos quais as células em diferenciação promovem o fim da actividade desta via. Por fim, espera-se que, no futuro, este trabalho contribua para as aplicações da medicina regenerativa no tratamento das doenças do sistema nervoso.

Palavras-chave: Sinalização Notch, galinha, espinal medula, neurogénese, repórter de transcrição, HES5, HES6, destino celular, dinâmica de expressão, oscilações, assimetria esquerda-direita, pâncreas.