

综述

果蝇神经干细胞不对称分裂研究进展

周 秀 杨小杭*

(浙江大学生命科学学院遗传所, 神经干细胞与发育生物学实验室, 杭州 310058)

摘要 干细胞最大的特点是既能自我更新维持自身的数量, 又能分化产生不同类型的细胞后代以构建正常的组织器官。干细胞通过不对称有丝分裂实现这种性能。不对称分裂使其中一个子细胞继承干细胞特性, 另一个子细胞则分化产生特定类型的细胞。果蝇神经干细胞是研究不对称分裂机制的理想系统。这篇综述主要阐述近年来在果蝇神经干细胞不对称分裂机制研究中所取得的一些突破性进展, 并且讨论了不对称分裂缺陷与肿瘤发生之间的关系。

关键词 果蝇神经干细胞; 不对称分裂; 细胞周期; 中心体; 肿瘤发生

Mechanisms of Asymmetric Cell Division in *Drosophila* Neuroblasts

Zhou Xiu, Yang Xiaohang*

(Development and Neurobiology Lab, Institute of Genetic, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract The most notable characteristics of stem cells are self-renewal and differentiation into multiple cell types. To achieve this balance, stem cells have the potential to divide asymmetrically. After asymmetric division, one daughter cell maintains stem cell identity but the other one is able to differentiate into specific cell type. *Drosophila* neuroblast is an ideal system to study stem cell asymmetric division. In this review, we mainly focus on the breakthrough of *Drosophila* neuroblasts asymmetric division mechanism in recent years, and discuss the connection between the defective in asymmetric division and tumorigenesis.

Key words *Drosophila* neuroblast; asymmetric division; cell cycle; centrosome; tumorigenesis

1 前言

果蝇作为模式生物有许多优点: 生活周期短, 繁殖能力强, 染色体数目少, 遗传背景清楚等。现已建成信息比较全面的果蝇数据库FlyBase(<http://www.flybase.org>), FlyBase几乎涵盖整个果蝇基因组的结构和功能信息。一些研究技术在果蝇中的运用也为我们以果蝇为模式生物研究干细胞不对称分裂提供了方便。如利用P因子转座^[1]和同源重组(利用FRT序列和Flippase)^[2]等来产生突变体; 利

用MARCM(Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker)技术在体内进行干细胞谱系分析(Lineage assay)^[3-4]; 利用酵母的GAL4/UAS系统^[5]构建成各种转基因果蝇, 可用于组织特异性基因过表达或降低基因表达。目前, 已构成覆盖几乎整个基因组(约90%的基因)的UAS-RNAi转基因果蝇库, 并且我们可以从维也纳的VDRC(Vienna *Drosophila* RNAi Center)、美国哈佛医学院的TRiP(Transgenic RNAi Project)、日本的NIG-FLY RNAi Resources获得我们需要的转基因UAS-RNAi果蝇品系^[6]。利用UAS-RNAi果蝇以及特异的GAL4驱动子转基因果蝇可以组织特异性地筛选与果蝇神经干细胞(Neuroblast)不对称分裂相关基因。现已有两个研究团队用不同的GAL4驱动子(*wor-gal4*、*insc-gal4*等)在基因组范围

收稿日期: 2013-03-18 接受日期: 2013-05-02

*通讯作者。Tel/Fax: 0571-88981372, E-mail: xhyang@zju.edu.cn

Received: March 18, 2013 Accepted: May 2, 2013

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-88981372, E-mail: xhyang@zju.edu.cn

网络出版时间: 2013-07-23 16:17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130723.1617.001.html>

内筛选了与果蝇神经干细胞不对称分裂有关的基因并进行了统计分析^[7-8]。

干细胞在生物体的生长发育过程中起着重要作用。有限数量的干细胞可以通过自我更新和分化产生大量的子细胞来维持组织器官的正常功能^[9]。Neuroblast是具有干细胞特性的神经前体细胞, 称其为成神经细胞(neuroblast, NB)或神经干细胞(neural stem cell)。在进化上, 调控Neuroblast自我更新和分化的许多重要的分子机制和信号通路在果蝇和哺乳动物中是相对保守的^[10-12]。因此, 我们可以在果蝇这种简单无脊椎动物中研究复杂的干细胞自我更新和分化机制, 最终推及到人类的相应研究中。

近年来, 在果蝇神经干细胞不对称分裂研究中所取得的成果, 使果蝇神经干细胞成为研究干细胞生物学的一个相当重要的系统。在正常的发育过程中果蝇神经干细胞是理解干细胞生物学的重要模式系统, 而在异常发育过程中它又成为研究干细胞介导的肿瘤形成的重要模式系统^[13-14]。这篇综述将主要总结以果蝇幼虫神经干细胞为模型研究不对称分裂所取得的一些成果, 聚焦于果蝇神经干细胞如何平衡自我更新和分化以防止过度增殖而产生肿瘤, 并讨论肿瘤细胞起源的癌症干细胞假说。

2 果蝇中的神经前体细胞

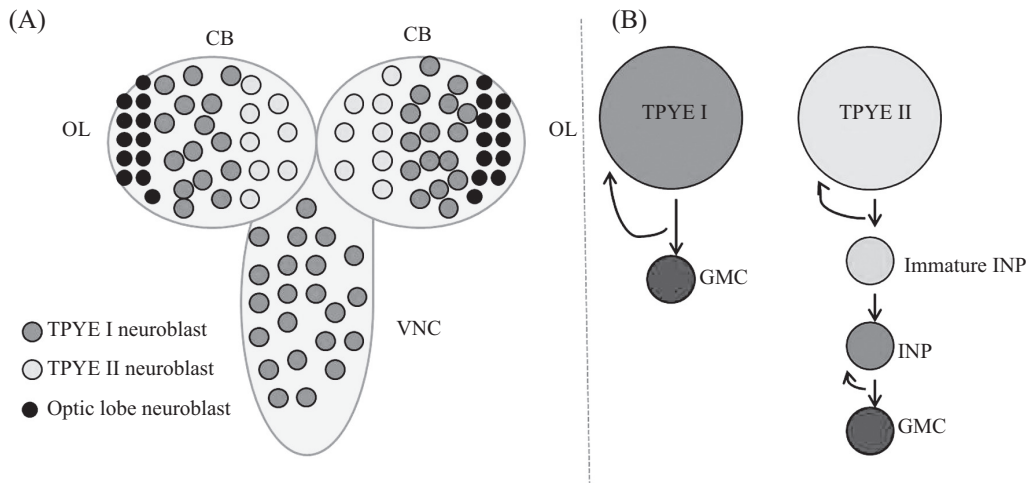
果蝇的神经前体细胞包括成神经细胞和感觉器官前体细胞(sensory organ precursor, SOP)。NB分化产生的神经元和神经胶质细胞构成果蝇的中枢神经系统(central nervous system, CNS)。SOP分化产生的外周感觉器官细胞构成外周神经系统(peripheral nervous system, PNS)。

果蝇NB来源于神经外胚层, 神经外胚层中的某些神经表皮细胞(neuroepithelial cells, NE)受信号的调控向内脱离下来成为胚胎NB^[15]。在胚胎神经发育早期, NB位于上皮细胞层下, 且其往往比较大, 直径约10微米, 在DIC显微镜下, 不用染色就能清楚地观察到。胚胎NB不对称分裂产生两个大小和命运完全不同的子细胞, 顶部大的子细胞继承干细胞特性能够继续进行不对称分裂, 基部小的子细胞称为神经节母细胞(ganglion mother cell, GMC)执行分化命运, GMC经过一轮有丝分裂, 产生两个神经元或者神经胶质细胞^[11-12, 16-17]。在胚胎发育过程中, 每个胚胎NB经过多轮不对称分裂分化所产生的神经元

组成幼虫的中枢神经系统^[18-20]。胚胎NB在胚胎发育的末期(大约Stage 16)停止分裂, 跳出细胞周期, 进入静止状态(quiescence)成为G₀期细胞。但是这种静止状态只是暂时地, 在幼虫孵化出来后, 大约在一龄幼虫末期二龄幼虫初期, 这些静止的NB又会复苏进入细胞周期, 成为幼虫的NB^[20-22]。幼虫NB不对称分裂产生的神经元组成成虫的中枢神经系统^[22]。但是幼虫的NB在发育阶段进入蛹期前会全部消失^[22-23]。果蝇NB这种跳出和再进入细胞周期的行为与果蝇发育阶段高度吻合的现象受时间和空间的严格控制。近几年有很多关于这方面的研究和综述。

研究果蝇幼虫NB不对称分裂多采用果蝇三龄幼虫大脑为材料。果蝇三龄幼虫CNS由大脑和腹神经索(ventral nerve cord, VNC)构成(图1A)。每个三龄幼虫大脑含有两个脑叶(brain lobe), 每个脑叶又可分为两个区域: 中脑(central brain, CB)和视神经叶(optic lobe, OL)。大脑和VNC中都含有NB(图1A), 研究较多的是大脑中的NB。大脑中主要有四类NB: 蘑菇体NB(mushroom body neuroblast); 视神经叶NB(optic lobe neuroblast); I型NB(type I neuroblast)和II型NB(type II neuroblast)。蘑菇体NB分化产生的神经元称为凯尼恩细胞(Kenyon cells), 凯尼恩细胞组成学习记忆中心^[24]。视神经叶NB分化产生的神经元参与构成视神经系统。每个CB约含100个NB, 大多数都是I型NB, 而II型NB大约只有8个。以前一直认为CB中的NB只有一类, 就是现在所谓的I型NB, 到2008年才发现CB中其实还存在另一类NB, 它们虽然数量少, 但是却可以产生大量的神经元。为了区分这两类NB, 就把它们分别命名为I型NB和II型NB^[25-27]。

I型和II型NB的区别主要是: II型NB不表达NB特有的标志性蛋白之中的Asense和Prospero^[25-28]; II型NB不对称分裂产生的小细胞不是GMC而是中间神经前体细胞(intermediate neural precursor, INP), 或称中间放大细胞(transit amplifying cell), 或称次级NB(secondary NB)^[25-27](图1B)。与I型NB相比, II型NB能在较短的时间内产生较多神经元是由于INP放大了NB增殖的结果。II型NB通过不对称分裂实现自我更新同时产生不成熟的INP。不成熟的INP经过一段时间的胞内基因转录翻译等过程成为成熟的INP(图1B)。随后成熟的INP进行数次(3~5次)不对称分裂更新自己并产生GMC^[26], GMC分裂产生神经



A: 果蝇三龄幼虫中枢神经系统示意图。中枢神经系统由两个脑叶和一个腹神经索构成。每个脑叶含有视神经叶和中脑两个区域。I型NB主要分布于中脑和腹神经索中。II型NB定位于脑叶的背侧面。示意图为俯视图。B: I型NB不对称分裂自我更新和产生GMC。II型NB不对称分裂自我更新和产生不成熟的INP。一段时间后, INP成熟, 成熟的INP不对称分裂自我更新和产生GMC。I型NB和II型NB产生的GMC都能分化产生神经元或神经胶质细胞。CNS: 中枢神经系统; VNC: 腹神经索; OL: 视神经叶; CB: 中脑; NBs: 神经干细胞; INP: 中间神经前体细胞。

A: schematic of the *Drosophila* 3rd instar larval CNS. CNS contains two brain lobes and a VNC. Each brain lobe has an OL and a CB. The type I NBs are the most abundant in the CB and VNC. The type II NBs are located on the dorsal surface of the hemispheres. The picture is vertical view. B: type I NB divides asymmetrically to self-renew and generate a GMC. Type II NB asymmetrically divides to self-renew and generate an immature INP. After a period of maturation, INP starts dividing asymmetrically to self-renew and to give rise to a GMC. All GMCs from type I and type II NB can divide once into two differentiating neurons or glial cells. CNS: central nervous system; VNC: ventral nerve cord; OL: optic lobe; CB(Central Brain); NBs(Neuroblasts); INP(Intermediate Neural Precursor).

图1 果蝇三龄幼虫中枢神经系统和I型与II型神经干细胞不对称分裂示意图(改编自参考文献[13]和[32])

Fig.1 Diagrams of the *Drosophila* 3rd instar larval CNS and Type I and Type II neuroblast asymmetric division (modified from reference [13] and reference [32])

元或者神经胶质细胞。可见, 通过INP可以数倍放大II型NB不对称分裂。

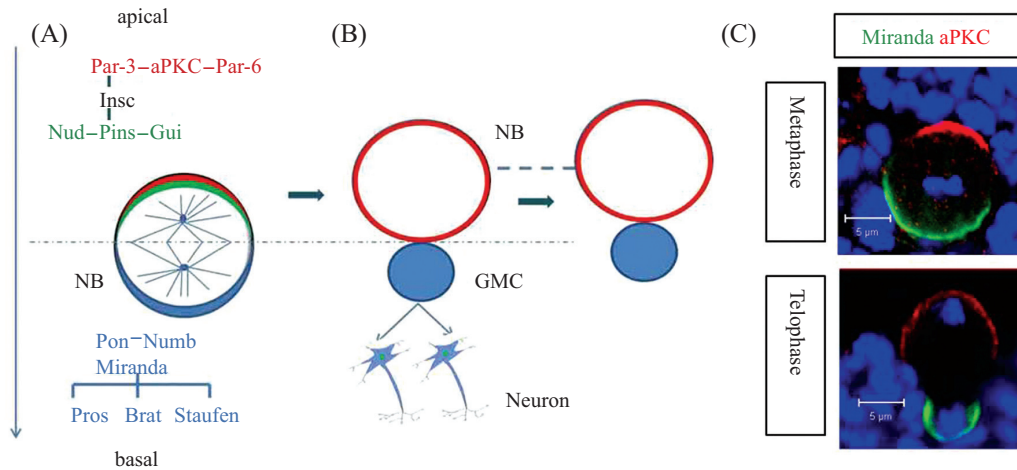
为何INP能分裂数次而GMC却只能分裂一次? 可能是因为II型NB不表达Prospero, 而Prospero可以抑制INP内的细胞周期调控因子的表达^[29-30], 从而不抑制细胞分裂。但是INP仍然不能有NB一样的增殖能力, 只有有限的增殖能力。是什么控制INP这种有限增殖能力而不使其过度增殖? 研究表明, 转录因子Earmuff在保持INP的有限增殖能力中起重要作用^[31]。通过比较, 可以发现II型NB比I型NB更容易过度增殖, 产生大脑肿瘤。可见, INP如何控制其有限的增殖能力, 机制相当复杂, 还需要更进一步的研究来解决此问题。

3 果蝇神经干细胞不对称分裂的分子机制

不对称分裂定义是, 当细胞分裂产生两个有差异的子细胞时, 细胞分裂为不对称。而这种差异却可以体现在许多方面, 例如: 子细胞大小不同、形态不同、基因表达模式不同、分化潜能不同等^[33]。一

般认为有两种不对称分裂模式: 外源性和内源性^[16]。在外源性不对称分裂模式中, 母细胞的分裂是对称的, 即产生的两个子细胞具有相同的潜力。但由于两个子细胞所处的微环境(Niche)不同, 即接受到的外源信号不同, 从而产生两个命运不同的子细胞。果蝇生殖干细胞是研究外源性不对称分裂的理想系统。内源性不对称分裂则是在母细胞分裂时, 母细胞根据细胞极性, 将一些关键蛋白或因子, 不对称地富集在母细胞的顶部或基部皮层, 纺锤体组装方向与细胞极性重合。当细胞分裂时, 富集在顶部的蛋白或因子进入一个子细胞, 而富集在基部的蛋白或因子进入另一个子细胞。两个子细胞从母细胞处遗传继承的蛋白或因子不同, 因而细胞命运也不同。果蝇幼虫大脑NB不对称分裂属于内源性分裂模式(图2)。果蝇NB是研究内源性不对称分裂的理想体系。

内源性机制怎样调控果蝇NB不对称分裂进行过程? 许多综述性文章^[11-12,16-17,32]已经对该过程进行了详细的描述, 下面总结概括主要机制和阐述新增的研究结果。有必要指出的是, 参与这些主要基本



A: 图示果蝇神经干细胞顶部-基部极性和蛋白不对称定位。顶部复合物: Par复合物(红色), Pins/Gai/Mud复合物(绿色)。基部的细胞命运决定因子及其载体蛋白(蓝色)。顶部和基部的蛋白不对称的分离到皮层。B: 图示果蝇神经干细胞不对称分裂所产生的自我更新和分化。C: 果蝇三龄幼虫大脑中处于不对称分裂中期和末期的神经干细胞。图片由共聚焦显微镜拍摄而来, Miranda(绿色), aPKC(红色), Chromosomes(蓝色)。NB: 神经干细胞, GMC: 神经节母细胞。比例尺=5 μm 。

A: the apicobasal polarity and asymmetrical protein localization. The apical complex: Par complex (red), Pins/Gai/Mud complex (green). The basal cell determinants and their adapter (blue). Apical and basal proteins are asymmetrically segregated to cortex. B: diagrams of *Drosophila* neuroblast asymmetric division leading to self-renewal and differentiation. C: the *Drosophila* 3rd instar larval neuroblast in metaphase and telophase. The pictures are from the confocal microscopy. Miranda (green), aPKC (red), Chromosomes (blue). NB: neuroblast, GMC: ganglion mother cell. Scale bars=5 μm .

图2 果蝇神经干细胞不对称分裂示意图(改编自参考文献[13]和[32])和中期末期的果蝇幼虫神经干细胞

Fig.2 Schematic of asymmetric division of *Drosophila* neuroblast (modified from reference [13] and reference [32])

机制的蛋白因子, 从果蝇到哺乳类几乎都有同源基因(表1), 在进化上有保守性^[9]。

一般认为, 果蝇神经干细胞不对称分裂过程中, 除了有正常细胞周期的变化外, 在分裂期, 主要有三个重要步骤: (1)干细胞细胞极性的维持; (2)纺锤体定向; (3)不对称的分离细胞命运决定因子, 以确保细胞命运决定因子进入GMC中。这三个步骤依次发生, 相互偶联, 在不对称分裂中起关键作用。

3.1 果蝇神经干细胞极性的维持

果蝇胚胎神经干细胞是由神经上皮细胞特化而来, 因而继承了神经上皮细胞的极性。NB极性的维持涉及到一个相当重要的复合物——PAR复合物。干细胞依其细胞极性, 不对称富集PAR复合物, 该复合物含蛋白Par-3(Bazooka)、Par-6、aPKC(atypical PKC)。Par-3和Par-6都含有PDZ结构域, 而aPKC则含有蛋白激酶活性^[34-35]。aPKC的磷酸激酶活性在PAR复合物中起核心作用, 有激酶活性的aPKC才能促进神经干细胞自我更新^[36]。PAR复合物是NB顶部皮层复合物(apical complex)的重要组成部分。这是由于在胚胎NB中PAR复合物富集在干细胞的上半球细胞皮层, 形成顶部-基部极性轴(apical-basal axis)。虽然在幼虫NB中极性不再是

顶部-基部方向而是很多方向, 但是PAR复合物和细胞命运决定因子在进入分裂期后总是分居在NB两个半球的细胞皮层, PAR复合物总是被分配到大的具有干细胞特性的子细胞中去(图2)。PAR复合物的主要功能是维持NB极性, 促进细胞命运决定因子基部富集。除了PAR复合物还有许多其他蛋白也参与神经干细胞皮层极性维持。其中有GTPase Cdc42, Cdc42与Par-6结合, 是aPKC活性的另一个重要调控因子^[37-38]。可见, 果蝇NB细胞极性的维持依赖于干细胞内极性蛋白物质的不对称分布。

3.2 纺锤体定向

纺锤体定向, 是纺锤体确定组装方向, 进而确定胞质分裂的方向。在果蝇NB中纺锤体沿着顶部-基部极性轴的方向定向。纺锤体定向也涉及到一个重要的复合物——Gai/Pins/Mud复合物。Gai是G蛋白alpha亚基。Pins(partner of inscuteable)是Inscuteable(Insc)的配体蛋白, Insc又可以和Par-3结合^[39-40], 这样通过蛋白Insc就可以把PAR复合物和Gai/Pins/Mud复合物联系起来。而Mud(mushroom body defective)蛋白又同纺锤体的星体微管结合, 这就使细胞极性与纺锤体的定向联系起来^[41]。Mud蛋白给纺锤体定向组装提供了一个细胞皮层附着点^[42]。因此, 通过Gai/Pins/Mud

表1 参与果蝇神经干细胞不对称分裂的主要蛋白

Table 1 Proteins are involved in *Drosophila* neuroblast asymmetric division

蛋白 Proteins	脊椎动物 同源物 Orthologue(s)	结构特征 Structure feature	作用 Function	突变体表型 Phenotypes of mutant
Localized in NB apical cortex				
aPKC ^[34-36]	PKC ζ ; PKC λ	Protein kinase	A member of Par complex; Establishes a polarity axis in NBs; Promoting self-renewal	Loss of apical-basal polarity; Prematurely enter cell cycle arrest
Bazooa ^[39,73-74]	Par-3	Three PDZ domain; N-terminal PB1 domain	A member of Par complex; Establishes a polarity axis in NB	Loss of apical-basal polarity; Prematurely enter cell cycle arrest
Par-6 ^[75]	Par-6	PDZ domain; CRIB domain	A member of Par complex; Establishes a polarity axis in NB	Loss of apical-basal polarity; Prematurely enter cell cycle arrest
Inscuteable ^[76-78]	Mouse insc	C-terminal motif: PDZ binding domain; A proline-rich region	Adaptor protein of Pins; links the Par complex to Pins/Gai/Mud complex	Misorientation of spindle during NB divisions; NB asymmetrical division transformed into symmetrical division
Pins ^[79-82]	AGS3; LGN	Three GoLoco domains	A member of Pins/Gai/Mud complex; links apical cortex and astral microtubules to orient the mitotic spindle	Misorientation of spindle during NB divisions
Gai ^[83-84]	Gai 1-3	Heterotrimeric G protein subunit	A member of Pins/Gai/Mud complex; links apical cortex and astral microtubules to orient the mitotic spindle	Misorientation of spindle during NB divisions
Mud ^[41-42,85]	NuMA	The microtubule and dynein binding protein	A member of Pins/Gai/Mud complex; links apical cortex and astral microtubules to orient the mitotic spindle	Misorientation of spindle during NB divisions; Over-proliferation in larval central brain and mushroom body neuroblasts
Localized in cortical cortex				
Lgl ^[36,63-64]	Mgl	Cytoskeletal protein	Restricts the Par complex to the apical domain; Promote basal localization of cell determinant	Over-proliferation of NB-like cells
Dlg(Discs large) ^[63,86]	----	Cytoskeletal protein	Tumor suppressor; maintains cortical localization of Lgl; Regulate basal protein localization	Over-proliferation of NB-like cells
Localized in nuclear				
Deadpan ^[87-88]	Hes related*	bHLH domain	Transcription factor; Regulates self-renewal; A direct target of the Notch signaling in type II	Premature loss of NBs and truncated NB lineages
Worniu ^[89-90]	Slug/Snail related*	Zinc finger	Transcription factor; Facilitates self-renewal	Delay in cell cycle; NB elav-induced premature differentiation
Asense ^[91]	Mash3 related*	bHLH domain	Transcription factor; Neural precursor gene	Mild phenotype; only reduced viability
Localized in centrosome				
Aurora-A ^[92-93]	Aurora	Protein kinase	Promoting differentiation	Misorientation of spindle during NB divisions; Defective asymmetric localization of aPKC, Numb and Pon; Over-proliferation of NB-like cells
Polo ^[94-95]	Polo-like kinase 1 (Plk1)	Protein kinase	Promoting differentiation	Misorientation of spindle during NB divisions; Defective asymmetric localization of aPKC, Numb and Pon; Over-proliferation of NB-like cells
Localized in NB basal cortex				
Prospero ^[29-30,56-57]	Prox1	Homeodomain transcription factor	Transcription factor; Promoting differentiation	Over-proliferation of NB-like cells; Reduction in the number of differentiated cells
Numb ^[48-50]	Numb, Numblike	Phosphotyrosine binding (PTB)	Notch signaling inhibitor Promoting differentiation	Over-proliferation of NB-like cells
Staufen ^[58-59]	----	Double stranded RNA binding motif (DSRM)	RNA binding; Promoting differentiation	Over-proliferation of NB-like cells
Brat ^[27,55,60]	Trim2, Trim2, Trim32	B-box type Zinc finger; C-terminal NHL domain	Inhibits growth; Promoting differentiation	Over-proliferation of NB-like cells; At the expense of differentiated cells
Miranda ^[51-55]	----	Coiled-coil protein	The adaptor protein for Pros, Brat, Staufen, localizing these proteins to the basal cortex of NB	Over-proliferation of NB-like cells; At the expense of differentiated cells
Pon ^[96-97]	----	Coiled-coil protein	The adaptor protein for Numb	Numb localization is delayed in metaphase

*表示相关的蛋白组; ----还未鉴定到蛋白的同源物; neuroblasts(NB)。所有的突变体表型都是蛋白失去功能后的表型。图表根据参考文献[10]和[32]修改。

*: groups of related proteins; ----: protein ortholog has not been identified; neuroblasts (NB). All the mutant phenotypes are from proteins loss of function. The table is adapted from references [10] and [32].

复合物可以指导纺锤体定向组装。如果简单的根据两点确定一条直线的原理,那么或许可以猜测基部皮层也存在与纺锤体定向有关的物质。

纺锤体除了正确定向还要正确定位,这样才会产生两个大小不等的子细胞。纺锤体定位在线虫one-cell胚胎(受精卵)和果蝇NB中分别采用不同的方式。在有丝分裂中期,纺锤体最初都是定位在细胞中部的,但是在随后的分裂中两种细胞的纺锤体行为不同。在线虫one-cell胚胎中,由于细胞前后极皮层和星体微管之间产生的拉力大小不同,所以纺锤体产生位移^[12]。又因为细胞后极产生的拉力更大,所以纺锤体向后极位移。然而,分裂沟平分纺锤体,所以最终后部的子细胞体积小,前部的子细胞体积大。此过程涉及微管动力学和动力蛋白与细胞皮层复合物等的相互作用^[43-45]。果蝇神经干细胞采取不同的方式产生两个大小不同的子细胞。果蝇神经干细胞胞质分裂时纺锤体仍然在细胞中部,不发生纺锤体位移,分裂沟在细胞中部形成。随后的分裂过程中两级细胞皮层的运动行为不同,大细胞端向外扩张,小细胞(GMC)端向内部收缩,这就使最终的分裂结果是一大一小两个子细胞。此过程涉及肌球蛋白Myosin II在分裂沟附近的不对称分布^[46],可能也涉及细胞骨架蛋白的解聚重排等。

3.3 细胞命运决定因子的不对称分布

细胞命运决定因子(cell-fate determinants)主要包括两组:一组是Pros(prospéro)、Brat(brain tumor)、Staufen等,以Miranda为载体蛋白;另一组是Numb,以Pon(partner of numb)为载体蛋白^[11-12,47]。这些命运决定因子由于分布在NB基部皮层又被称为基部复合物(basal complex)(图2A)。在不对称分裂末期,它们必须正确地分离到GMC中,以抑制GMC生长,促进GMC分化。

Numb是第一个被鉴定的细胞命运决定因子,它是一个多功能蛋白,它的主要功能是组织特异性地阻遏Notch信号通路,而Notch信号促进自我更新,所以Numb抑制GMC自我更新促进分化^[48-50]。Miranda在NB不对称分裂间期时分布在顶部皮层,当进入分裂期时Miranda分布到基部皮层。当分裂完成Miranda进入GMC后被降解,释放出货物蛋白Pros、Staufen、Brat,然后Pros进入细胞核调控转录^[51-55]。Pros是转录因子,既是转录激活因子,又是转录抑制因子。Pros蛋白和其mRNA都被不对称分离到GMC

中,Pros进入GMC细胞核后抑制细胞周期调控基因(例如Cyclin A、Cyclin E、Cdc25等)的表达,激活神经分化基因的表达^[29-30,56-57]。Staufen是RNA结合蛋白,可以结合Pros的mRNA^[58-59]。Brat是肿瘤抑制因子;它也是翻译调控因子,它抑制控制细胞生长的蛋白MYC的翻译,从而控制细胞生长;Brat还可通过激活Pros的转录,保持Pros的含量水平,促进分化^[55,60]。

细胞命运决定因子的不对称分布与aPKC激酶活性有关,近年来已经证实Numb和Miranda为aPKC的直接作用底物^[61-62]。因此,以aPKC为核心的PAR复合物促进细胞命运决定因子及其配体的不对称分布,并且aPKC磷酸激酶活性在该过程中起重要作用^[32]。Lgl(lethal giant larvae)也参与调控细胞命运决定因子的不对称分布。在lgl突变体中aPKC正常分布,但是Pon和Miranda不能正常分布^[36,63-64]。Lgl是细胞骨架蛋白,在NB细胞皮层分布,且是aPKC的一个重要底物^[65-66]。Lgl调控细胞命运决定因子不对称分布的模式可能是:未被磷酸化的Lgl与aPKC结合抑制aPKC的磷酸激酶活性,当Lgl被磷酸化后分子内部相互作用发生形变,磷酸化的Lgl与aPKC分离进入到细胞质中,这样未与Lgl结合的aPKC发挥磷酸化功能磷酸化Miranda和Numb,使Miranda和Numb从顶部皮层排出富集到基部皮层^[61,66-67]。这样,Lgl就把NB极性和细胞命运决定因子的不对称分布联系起来。在啤酒酵母中Lgl的同源物为Sro7、Sro77,研究发现,这两种蛋白都与参与膜泡运输的整合膜蛋白有关,也许在果蝇NB中Lgl也参与膜泡运输以促进细胞命运决定因子的基部富集^[12,68]。现如今Lgl究竟以何种方式促进细胞命运决定因子基部皮层分布还不清楚。

参与调控果蝇NB不对称分裂的蛋白队伍相当庞大(表1列出主要蛋白)。除了基因编码的蛋白参与干细胞不对称分裂外,还发现基因编码的一些小RNA(small RNAs)在干细胞分裂过程中也起重要作用^[69-70]。其中,发现microRNA(miRNA)与神经系统的发育和功能有关^[71]。在果蝇中,microRNA-124(miR-124)参与调控NB增殖,保持幼虫NB的正常增殖水平需要miR-124的活性^[72]。NB不对称分裂所涉及的信号通路也很繁杂。最近的研究结果表明,Activin信号通路、Hedgehog信号通路、FGF(fibroblast growth factor)信号通路促进NB增殖,Notch信号通路促进NB自我更新^[11]。总之,果蝇NB

不对称分裂的各个步骤都精密准确地进行,且相互之间也存在联系。这样NB才能完成其自我更新和分化,确保果蝇神经发育正常完成。

4 果蝇神经干细胞不对称分裂与细胞周期

果蝇NB不对称分裂的重要步骤都在细胞周期的特定时间段精确完成。例如, NB的极性蛋白Par复合物在分裂间期富集到NB顶部皮层,而细胞命运决定因子在细胞分裂前期被定位到基部细胞皮层。这些重要步骤在时间上都表现出细胞周期依赖性。而且,当不对称分裂的重要基因*aPKC*发生突变,在*aPKC*突变体中NB细胞周期会延长, NB的数目减少^[36]。这说明NB不对称分裂和细胞周期之间存在紧密联系。最近发现几个细胞周期的重要调控因子发生突变时,不对称的蛋白定位会遭到破坏,细胞命运发生变化, NB过度增殖, 大脑形成肿瘤。

最经典的参与不对称分裂的细胞周期调控因子是Cdc2/CDK1激酶^[98]。Cdc2与周期蛋白(cyclin)结合后被激活,成为有蛋白激酶活性的CDK1。CDK1激酶促进细胞从G₂期进入M期(细胞分裂期)。如果细胞失去CDK1活性,细胞周期就会停止在G₂期。可见,CDK1激酶对细胞分裂相当重要。在果蝇中降低Cdc2的含量水平,减弱*cdc2*的作用,但保持细胞周期正常进行,结果发现NB不对称分裂发生缺陷,顶部蛋白复合物不对称分布紊乱,子细胞命运改变。在不对称分裂过程中高水平含量的Cdc2促进顶部复合物的不对称分布,影响细胞在对称分裂和不对称分裂两者之间的抉择^[98]。这是首例证据显示细胞周期调控因子参与不对称分裂,并且也解释了为何如Inscuteable之类的顶部复合物蛋白的不对称分布是细胞周期依赖的。

从另一个方向表明果蝇NB不对称分裂和细胞周期之间存在联系的证据是,近期发现果蝇NB不对称分裂的重要蛋白Worniu参与调控细胞周期进程^[90]。Worniu是转录因子Snail family的成员,在果蝇NB的整个生命过程中都有表达。除了知道Worniu与果蝇胚胎NB离层有关外,对Worniu蛋白的具体功能知之甚少。近期发现在*worniu*突变体中, NB不对称分裂从前期到中期的过渡时间明显延长,剪接因子Elav表达水平升高,诱导NB早熟性分化^[90]。由此可知, Worniu通过促进细胞周期的进程来保持果蝇NB自我更新,防止NB早熟性分化。干细胞早熟

性分化,会减小干细胞池,这会对动物的生长发育造成严重影响。如果是神经干细胞池变小,则会造成大脑发育缺陷。

Aurora-A是在进化上保守的有丝分裂激酶。Aurora-A作为细胞周期调控激酶,主要参与中心体的成熟,从而调控细胞周期进程。若Aurora-A失去功能,会导致中心体成熟缺陷、细胞周期延长或者停止在有丝分裂中期^[99-100]。在哺乳动物中, Aurora-A分布在中心体中,调控细胞周期进程,是一种致癌基因^[100]。在果蝇幼虫NB中, Aurora-A起肿瘤抑制因子的作用,抑制自我更新,促进分化^[92-93]。Aurora-A可能以不同的方式参与调控不对称分裂。首先, Aurora-A是aPKC的上游因子并且参与Notch信号通路,促进aPKC、Numb极性分布,调控自我更新^[92-93]。其次, Aurora-A参与调控有丝分裂纺锤体定向组装,从而调控自我更新^[92]。因为,在*aurora-a*突变体中, aPKC和Numb的分布发生错误,纺锤体的定向组装也发生缺陷, NB由不对称分裂转变为对称分裂, NB过度增殖,形成肿瘤^[92-93]。过表达Numb蛋白可以部分的挽救*aurora-a*突变体的表型,但是纺锤体的错误定向组装没有受到影响。可见, Aurora-A可通过促进Numb不对称定位和调控纺锤体定向组装这两种方式调控NB不对称分裂。Polo也是在进化上保守的有丝分裂激酶,也是细胞周期的重要调控因子,功能与Aurora-A相似。

近年来发现,参与不对称分裂的细胞周期调控因子主要包括蛋白激酶Cdc2/Cdk1、Aurora-A、Polo,后期促进复合物的核心部件和周期蛋白E(cyclin E)等^[17,101]。不同的细胞周期调控因子可能以不同方式参与不对称分裂。例如, Cdc2/Cdk1的含量水平决定神经前体细胞进行对称分裂还是不对称分裂^[98], Aurora-A和Polo激酶作为肿瘤抑制因子抑制自我更新,后期促进复合物参与Miranda及其货物蛋白的不对称分布^[102]。总之,这些都为细胞周期和干细胞不对称分裂之间存在联系提供了依据。只是现在我们还不是特别清楚这些细胞周期调控因子具体是怎样调控不对称分裂的,上下游都是哪些蛋白或者基因。

5 神经干细胞不对称分裂过程中中心体的不对称行为

在NB不对称分裂过程中,纺锤体沿着极性轴

定向组装是不对称分裂的重要步骤,而纺锤体主要由中心体及其发出的星射线构成。因此,我们可以推测中心体在纺锤体定向组装过程起着某些重要作用。近年来发现,在NB不对称分裂过程中组成纺锤体的两个中心体的运动和功能存在差异,且两个中心体的这种差异行为在不对称分裂过程中起着重要作用^[103]。

在果蝇NB不对称分裂间期,中心粒复制形成两个中心体(母中心体和子中心体)。在整个细胞周期进程中,母中心体都具有活性,具有微管组织中心MTOC,有较强的星体微管组装能力,位置相对静止;而另一个子中心体则在进入分裂期之前都没有活性,无微管组织能力,向着细胞核的另一边运动,组成纺锤体的另一个极点,进入分裂期后才获得微管组织能力^[104-105]。并且两个中心体总是被NB不对称分裂产生的两个子细胞不对称地继承,母中心体总是位于NB的顶部皮层附近被具有干细胞特性的子细胞遗传继承,子中心体则被GMC继承^[106]。两个中心体这种功能和行为上的不一致,能够指导不对称分裂纺锤体定向组装^[105-106]。可以把纺锤体定向分为两步。首先,在分裂间期产生单个有微管组织中心的中心体,即纺锤体初步定向。然后,纺锤体和NB细胞皮层相互作用,再次调整纺锤体的方向,即再定向^[105]。这就使得纺锤体定向更加精确,确保不对称分裂正常进行。当然这只是纺锤体定向机制的一种解释。

为什么两个中心体之间存在功能差异?研究表明,这和Polo激酶的分布有关,Polo是促进中心体成熟的重要调控因子。Polo激酶促进中心体的成熟主要通过促进 γ Tubulin的募集,而在分裂间期只有母中心体具有Polo激酶活性,因而母中心体具有MTOC功能^[105]。那又是为什么总是具有干细胞特性的子细胞遗传继承最初有MTOC的母中心粒?在神经干细胞不对称分裂过程中,两个子细胞不对称遗传继承的不只有中心粒和中心体,还有极性蛋白和细胞命运决定因子、毁坏和错误折叠的蛋白、核糖体组件、DNA、囊泡组分等^[107]。我们知道损坏中心体或者中心体功能紊乱可以扰乱高度精确的不对称分裂,甚至产生肿瘤^[105,108]。这么多细胞组分被不对称地遗传继承,一种可能是为了保护干细胞,而另一种可能是母中心体和子中心体也携带不同的自我更新和分化信息。如今这种中心体在不对称分裂

过程中结构功能和行为的差异,不仅在果蝇神经干细胞中存在,在果蝇生殖干细胞、裂殖酵母、蟾蜍、哺乳动物中都有发现。这方面更加深入的研究可能对了解干细胞不对称分裂有所助益。

6 果蝇神经干细胞不对称分裂缺陷与肿瘤的发生

癌症因为不易根治和容易复发,一直是医学史上的难题。有人认为存在癌症干细胞(cancer stem cell),如果把肿瘤看作一种器官,那么应该存在类似于干细胞性能的一类细胞——癌症干细胞,这种癌症干细胞由正常干细胞转化而来,具有产生其他所有肿瘤细胞和自我更新的潜能^[109-111]。近年来所取得的一些研究成果,为该假说提供了有力证据,使该假说越来越被人们接受。

早在30几年前在果蝇的研究中,干细胞与肿瘤形成存在相关性就已经有所显示^[112]。最初发现在果蝇中若一些基因(例如, *lethal giant larvae(lgl)*、*discs large(dlg)*、*scribble(scrib)*)发生突变,会导致果蝇幼虫大脑产生恶性肿瘤,而且发现把这些肿瘤移植到健康的成蝇体内,这些移植后的肿瘤可以自发生长,恶性增殖,并且能够转移到其他器官,最终导致宿主死亡,所以它们被称为肿瘤抑制子(tumor repressor)^[112-114]。而且果蝇肿瘤的这种恶性增殖、可转移性和浸润性都与哺乳动物肿瘤保持一致。后来发现,这些基因都参与调控细胞命运决定因子不对称分布,是NB不对称分裂的重要调控基因^[64,115]。这就把果蝇NB不对称分裂与肿瘤发生联系起来。而且近年来,以果蝇幼虫大脑NB为模型研究干细胞不对称分裂缺陷与肿瘤发生所取得的成果更加有力地支持了癌症干细胞假说。所以果蝇幼虫NB已经成为研究肿瘤发生的新型模式系统^[17]。

肿瘤抑制子(*lgl*, *dlg*, *scrib*)功能丢失会影响果蝇NB的极性,扰乱细胞命运决定因子定位,故干细胞极性的破坏和肿瘤形成之间有高度的联系^[14]。*aPKC*是调控细胞极性的重要蛋白,但是*aPKC*突变体没有诱导肿瘤产生,只是使NB的细胞周期延长,数目变少,若过表达有激酶活性的皮层定位的*aPKC*则会使NB过度增殖^[36]。这说明*aPKC*促进NB自我更新抑制分化。因此,干细胞必须精确平衡自我更新和分化,这样才能抑制肿瘤的产生,不然干细胞就会转变为能无限增殖的肿瘤细胞。

所有的细胞命运决定因子Numb、Prospero、Brat和它们的载体蛋白Miranda、Pon都是肿瘤抑制因子。当这些基因发生突变, 都会在果蝇幼虫大脑内形成肿瘤。在*numb*、*pros*、*brat*突变体中, 果蝇幼虫NB仍然进行不对称分裂, 产生一大一小两子细胞。但是小的子细胞会长到干细胞大小, 能像干细胞一样增殖, 且不会分化出神经元和神经胶质细胞^[16]。显然子细胞的命运发生了转变, 干细胞自我更新和分化间的平衡遭到了破坏。但是这种干细胞样的增殖行为与正常干细胞的自我更新存在差别。因为正常的干细胞自我更新受到增殖信号和发育信号的调控, 并且干细胞也会衰老。正常的果蝇NB在进入蛹期之前就会停止不对称分裂, 最后消失。而且正常的NB移植到成蝇腹部也不会产生肿瘤, 不会侵入其他组织。但是*numb*、*pros*、*brat*突变体中的NB不再受增殖和发育信号的调控, 可以无限增殖, 如果被移植到健康成蝇腹部, 会形成肿瘤, 并发生迁移, 数周后导致宿主死亡^[47,114]。显然这些干细胞已经转变成成为肿瘤细胞了, 是否就是肿瘤干细胞呢? 这还有待进一步研究, 但是可以肯定, 神经干细胞不对称分裂缺陷和幼虫大脑肿瘤的发生存在联系。

一些重要的调控不对称分裂的激酶CDK1、Aurora-A、Polo也是肿瘤抑制因子。Aurora-A、Polo激酶限定aPKC上部皮层富集, 调控细胞命运决定因子Numb基部皮层定位和纺锤体的定向组装^[93-95]。在*aurora-a*、*polo*突变体幼虫大脑中, 神经干细胞也会过度增殖, 当移植到宿主体内时, 也会形成恶性肿瘤^[93-94,108]。此外, 破坏中心体、中心体功能紊乱、中心体数目过多、纺锤体定向错误等也能够导致肿瘤的发生^[105,107-108]。

总之, 通过这些研究, 可以肯定异常的果蝇NB不对称分裂和果蝇幼虫大脑肿瘤发生之间存在联系。而且从表1可以看出大多数参与果蝇NB不对称分裂的蛋白失去功能都能诱发肿瘤。更加有趣的是, 已经有研究指出Numb、Prospero、Brat在人类中的同源物与人类癌症的形成有关^[116-118]。因此, 在果蝇中研究肿瘤发生可以帮助我们理解哺乳动物肿瘤发生。我们也可以利用果蝇NB不对称分裂缺陷所引起的肿瘤作为肿瘤材料来研究肿瘤的治疗。有报道说在果蝇中过表达*dp53*则可以挽救*numb*突变体所引起的肿瘤^[119]。因此, 对果蝇幼虫大脑肿瘤产生机制的研究, 也许会成为我们突破肿瘤治疗的窗口。

7 小结与展望

近年来, 以果蝇幼虫大脑NB为模式系统研究干细胞不对称分裂机制和肿瘤发生机制取得了突出的成果。果蝇NB不对称分裂的基本机制已经比较清楚。新技术新方法的发明使用和资源共享大大促进了研究的进展。现阶段抑制生长分裂、促进分化的主要细胞命运决定因子已经发现, 且功能也基本清楚。并且, 我们已经大致了解了在不对称分裂过程中如何维持细胞极性和纺锤体如何定向组装和定位。我们已经明确不对称分裂缺陷和肿瘤发生之间存在联系, 一些重要的调控细胞周期的因子在不对称分裂过程中发挥着重要作用(例如Aurora-A和Polo等), NB不对称分裂过程中中心体的不对称行为等等。

虽然近年来研究取得了一定的成果, 但是仍有很多问题亟待解决。首先, 果蝇NB如何精确控制自我更新和分化平衡的机制仍模糊不清。例如果蝇NB是怎样控制它的增殖能力, 受何信号调控? 发育过程中NB是怎样精确地进入细胞周期进行不对称分裂, 退出细胞周期成为静止沉默细胞? 其次, 干细胞不对称分裂缺陷和肿瘤发生之间的具体调控关系如何。如干细胞分裂缺陷是否是肿瘤发生的众多形式中的一种形式? 肿瘤干细胞是否不仅仅来源于正常干细胞, 也来源于分化成熟的细胞? 因为在哺乳动物干细胞和果蝇神经前体细胞中延长细胞周期可以诱导细胞分化, 而控制缩短分化成熟细胞G₁期则可使分化成熟的细胞转变为干细胞^[120-121]。再次, 在果蝇NB中的一系列研究成果是否完全可以运用到小鼠等哺乳动物中, 进而运用到人类中仍是未知, 虽然很多分子机制和信号通路在物种之间进化上是保守的, 但是在实际功能上也存在着差异。

其实, 以果蝇神经干细胞为模式系统研究干细胞生物学具有一定的局限性。首先, 果蝇神经干细胞只在发育过程中存在, 成体中没有, 而哺乳动物成体干细胞则在生物体的生命过程中长期存在。其次, 果蝇NB不对称分裂是内源性机制, 不受外部微环境影响。当体外培养分离得到的果蝇幼虫NB时, 它们仍能继续不对称分裂^[122-123]。但是, 哺乳动物成体干细胞则需要外源和内源的信号相互作用来调控不对称分裂^[9]。不过, 近年来人们也开始研究果蝇中的成体干细胞, 例如, 内脏器官肠和马氏管中的干细胞^[124-125]。也许把在果蝇成体干细胞和神经干细胞中的研究成

果结合起来, 可以使我们更加准确地理解哺乳动物干细胞自我更新和分化。

在将来, 以果蝇NB为模式系统的研究会着重于研究肿瘤发生、增殖调控、生长控制、中心体行为、表观遗传调控干细胞不对称分裂与分化等生物过程。细胞周期调控因子在神经干细胞不对称分裂中所起的作用和表观遗传调控神经干细胞自我更新和分化将是重点领域。相信在不久的将来, 在中国以果蝇幼虫NB为模型研究干细胞不对称分裂和肿瘤发生定会取得辉煌的成就。

参考文献 (References)

- Dahmann C. *Drosophila*: Methods and protocols. New Jersey: Humana Press, 2008, 97-117.
- Dahmann C. *Drosophila*: Methods and protocols. New Jersey: Humana Press, 2008, 155-174.
- Lee T, Luo L. Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* 1999; 22(3): 451-61.
- Wu JS, Luo L. A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in *Drosophila*. *Nat Protoc* 2006; 1(6): 2583-9.
- Dahmann C. *Drosophila*: Methods and protocols. New Jersey: Humana Press, 2008, 79-95.
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, et al. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 2007; 448(7150): 151-6.
- Neumuller RA, Richter C, Fischer A, Novatchkova M, Neumuller KG, Knoblich JA. Genome-wide analysis of self-renewal in *Drosophila* neural stem cells by transgenic RNAi. *Cell Stem Cell* 2011; 8(5): 580-93.
- Carney TD, Miller MR, Robinson KJ, Bayraktar OA, Osterhout JA, Doe CQ. Functional genomics identifies neural stem cell sub-type expression profiles and genes regulating neuroblast homeostasis. *Dev Biol* 2012; 361(1): 137-46.
- Januschke J, Gonzalez C. *Drosophila* asymmetric division, polarity and cancer. *Oncogene* 2008; 27(55): 6994-7002.
- Chang KC, Wang C, Wang H. Balancing self-renewal and differentiation by asymmetric division: Insights from brain tumor suppressors in *Drosophila* neural stem cells. *Bioessays* 2012; 34(4): 301-10.
- Doe CQ. Neural stem cells: Balancing self-renewal with differentiation. *Development* 2008; 135(9): 1575-87.
- Gonczy P. Mechanisms of asymmetric cell division: Flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(5): 355-66.
- Saini N, Reichert H. Neural stem cells in *Drosophila*: Molecular genetic mechanisms underlying normal neural proliferation and abnormal brain tumor formation. *Stem Cells Int* 2012; 2012: 486169.
- Wodarz A, Gonzalez C. Connecting cancer to the asymmetric division of stem cells. *Cell* 2006; 124(6): 1121-3.
- Artavanis-Tsakonas S, Delidakis C, Fehon RG. The Notch locus and the cell biology of neuroblast segregation. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 427-52.
- Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 2008; 132(4): 583-97.
- Chia W, Somers WG, Wang H. *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions: Cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and tumorigenesis. *J Cell Biol* 2008; 180(2): 267-72.
- Green P, Hartenstein AY, Hartenstein V. The embryonic development of the *Drosophila* visual system. *Cell Tissue Res* 1993; 273(3): 583-98.
- Hartenstein V, Rudloff E, Campos-Ortega JA. The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol* 1987; 196(8): 473-85.
- Prokop A, Technau GM. The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of *Drosophila melanogaster*. *Development* 1991; 111(1): 79-88.
- Ito K, Hotta Y. Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1992; 149(1): 134-48.
- Truman JW, Bate M. Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1988; 125(1): 145-57.
- Maurange C, Cheng L, Gould A. Temporal transcription factors and their targets schedule the end of neural proliferation in *Drosophila*. *Cell* 2008; 133(5): 891.
- Ito K, Awano W, Suzuki K, Hiromi Y, Yamamoto D. The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 1997; 124(4): 761-71.
- Boone JQ, Doe CQ. Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev Neurobiol* 2008; 68(9): 1185-95.
- Bello BC, Izergina N, Caussinus E, Reichert H. Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development. *Neural Dev* 2008; 3: 5.
- Bowman SK, Rolland V, Betschinger J, Kinsey KA, Emery G, Knoblich JA. The tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in *Drosophila*. *Dev Cell* 2008; 14(4): 535-46.
- Bayraktar OA, Boone JQ, Drummond ML, Doe CQ. *Drosophila* type II neuroblast lineages keep Prospero levels low to generate large clones that contribute to the adult brain central complex. *Neural Dev* 2010; 5: 26.
- Li L, Vaessin H. Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev* 2000; 14(2): 147-51.
- Choksi SP, Southall TD, Bossing T, Edoff K, de Wit E, Fischer BE, et al. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Dev Cell* 2006; 11(6): 775-89.
- Weng M, Golden KL, Lee CY. dFzef/Earmuff maintains the restricted developmental potential of intermediate neural progenitors in *Drosophila*. *Dev Cell* 2010; 18(1): 126-35.
- Homem CC, Knoblich JA. *Drosophila* neuroblasts: A model for stem cell biology. *Development* 2012; 139(23): 4297-310.
- Horvitz H, Herskowitz I. Mechanisms of asymmetric cell division: Two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* 1992; 68(2): 237.
- Rolls MM, Albertson R, Shih HP, Lee CY, Doe CQ. *Drosophila*

- aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J Cell Biol* 2003; 163(5): 1089-98.
- 35 Wodarz A, Ramrath A, Grimm A, Knust E. *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* 2000; 150(6): 1361-74.
- 36 Lee CY, Robinson KJ, Doe CQ. Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* 2006; 439(7076): 594-8.
- 37 Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* 2000; 2(8): 531-9.
- 38 Atwood SX, Chabu C, Penkert RR, Doe CQ, Prehoda KE. Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6 aPKC. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 18): 3200-6.
- 39 Wodarz A, Ramrath A, Kuchinke U, Knust E. Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 1999; 402(6761): 544-7.
- 40 Schober M, Schaefer M, Knoblich JA. Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 1999; 402(6761): 548-51.
- 41 Siller KH, Cabernard C, Doe CQ. The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat Cell Biol* 2006; 8(6): 594-600.
- 42 Bowman SK, Neumuller RA, Novatchkova M, Du Q, Knoblich JA. The *Drosophila* NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev Cell* 2006; 10(6): 731-42.
- 43 Nguyen-Ngoc T, Afshar K, Gönczy P. Coupling of cortical dynein and Γ proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol* 2007; 9(11): 1294-302.
- 44 Kozlowski C, Srayko M, Nedelec F. Cortical microtubule contacts position the spindle in *C. elegans* embryos. *Cell* 2007; 129(3): 499-510.
- 45 Grill SW, Howard J, Schaffer E, Stelzer EH, Hyman AA. The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* 2003; 301(5632): 518-21.
- 46 Ou G, Stuurman N, D'Ambrosio M, Vale RD. Polarized myosin produces unequal-size daughters during asymmetric cell division. *Science* 2010; 330(6004): 677-80.
- 47 Gonzalez C. Spindle orientation, asymmetric division and tumour suppression in *Drosophila* stem cells. *Nat Rev Genet* 2007; 8(6): 462-72.
- 48 Uemura T, Shepherd S, Ackerman L, Jan L, Jan Y. numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell* 1989; 58(2): 349.
- 49 Rhyu MS, Jan LY, Jan YN. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 1994; 76(3): 477-91.
- 50 Schweisguth F. Regulation of notch signaling activity. *Curr Biol* 2004; 14(3): R129-38.
- 51 Shen CP, Jan LY, Jan YN. Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell* 1997; 90(3): 449-58.
- 52 Ikeshima-Kataoka H, Skeath JB, Nabeshima Y, Doe CQ, Matsuzaki F. Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* 1997; 390(6660): 625-9.
- 53 Schuldt AJ, Adams JH, Davidson CM, Micklem DR, Haseloff J, St Johnston D, *et al.* Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. *Genes Dev* 1998; 12(12): 1847-57.
- 54 Matsuzaki F, Ohshiro T, Ikeshima-Kataoka H, Izumi H. Miranda localizes staufer and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development* 1998; 125(20): 4089-98.
- 55 Lee CY, Wilkinson BD, Siegrist SE, Wharton RP, Doe CQ. Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev Cell* 2006; 10(4): 441-9.
- 56 Doe CQ, Chu-LaGriff Q, Wright DM, Scott MP. The prospero gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* 1991; 65(3): 451-64.
- 57 Spana EP, Doe CQ. The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* 1995; 121(10): 3187-95.
- 58 St Johnston D, Beuchle D, Nusslein-Volhard C. Staufer, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 1991; 66(1): 51-63.
- 59 Broadus J, Fuerstenberg S, Doe CQ. Staufer-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 1998; 391(6669): 792-5.
- 60 Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* 2006; 124(6): 1241-53.
- 61 Atwood SX, Prehoda KE. aPKC phosphorylates Miranda to polarize fate determinants during neuroblast asymmetric cell division. *Curr Biol* 2009; 19(9): 723-9.
- 62 Smith CA, Lau KM, Rahmani Z, Dho SE, Brothers G, She YM, *et al.* aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *EMBO J* 2007; 26(2): 468-80.
- 63 Peng CY, Manning L, Albertson R, Doe CQ. The tumour-suppressor genes lgl and dlg regulate basal protein targeting in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 2000; 408(6812): 596-600.
- 64 Ohshiro T, Yagami T, Zhang C, Matsuzaki F. Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast. *Nature* 2000; 408(6812): 593-6.
- 65 Plant PJ, Fawcett JP, Lin DC, Holdorf AD, Binns K, Kulkarni S, *et al.* A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol* 2003; 5(4): 301-8.
- 66 Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* 2003; 422(6929): 326-30.
- 67 Egger B, Chell JM, Brand AH. Insights into neural stem cell biology from flies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008; 363(1489): 39-56.
- 68 Lehman K, Rossi G, Adamo JE, Brennwald P. Yeast homologues of tomosyn and lethal giant larvae function in exocytosis and are associated with the plasma membrane SNARE, Sec9. *J Cell Biol* 1999; 146(1): 125-40.
- 69 Shcherbata HR, Hatfield S, Ward EJ, Reynolds S, Fischer KA, Ruohola-Baker H. The MicroRNA pathway plays a regulatory role in stem cell division. *Cell Cycle* 2006; 5(2): 172-5.
- 70 Stadler BM, Ruohola-Baker H. Small RNAs: Keeping stem cells in line. *Cell* 2008; 132(4): 563-6.
- 71 Christensen M, Schrat GM. microRNA involvement in devel-

- opmental and functional aspects of the nervous system and in neurological diseases. *Neurosci Lett* 2009; 466(2): 55-62.
- 72 Weng R, Cohen SM. *Drosophila* miR-124 regulates neuroblast proliferation through its target anachronism. *Development* 2012; 139(8): 1427-34.
- 73 Kuchinke U, Grawe F, Knust E. Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr Biol* 1998; 8(25): 1357-65.
- 74 Prehoda KE. Polarization of *Drosophila* neuroblasts during asymmetric division. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(2): a001388.
- 75 Suzuki A, Ohno S. The PAR-aPKC system: Lessons in polarity. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 6): 979-87.
- 76 Knoblich JA, Jan LY, Jan YN. Deletion analysis of the *Drosophila* Inscuteable protein reveals domains for cortical localization and asymmetric localization. *Curr Biol* 1999; 9(3): 155-8.
- 77 Kraut R, Chia W, Jan LY, Jan YN, Knoblich JA. Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 1996; 383(6595): 50-5.
- 78 Kraut R, Campos-Ortega JA. inscuteable, a neural precursor gene of *Drosophila*, encodes a candidate for a cytoskeleton adaptor protein. *Dev Biol* 1996; 174(1): 65-81.
- 79 Yu F, Morin X, Cai Y, Yang X, Chia W. Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* 2000; 100(4): 399-409.
- 80 Schaefer M, Shevchenko A, Knoblich JA. A protein complex containing Inscuteable and the Galphai-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr Biol* 2000; 10(7): 353-62.
- 81 Yu F, Ong CT, Chia W, Yang X. Membrane targeting and asymmetric localization of *Drosophila* partner of inscuteable are discrete steps controlled by distinct regions of the protein. *Mol Cell Biol* 2002; 22(12): 4230-40.
- 82 Yu F. Analysis of the roles of Pins and heterotrimeric G proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts. *Methods Enzymol* 2004; 389: 364-82.
- 83 Nipper RW, Siller KH, Smith NR, Doe CQ, Prehoda KE. Galphai generates multiple Pins activation states to link cortical polarity and spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(36): 14306-11.
- 84 Yu F, Cai Y, Kaushik R, Yang X, Chia W. Distinct roles of Galphai and Gbeta13F subunits of the heterotrimeric G protein complex in the mediation of *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *J Cell Biol* 2003; 162(4): 623-33.
- 85 Wang C, Li S, Januschke J, Rossi F, Izumi Y, Garcia-Alvarez G, et al. An ana2/ctpr/mud complex regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Dev Cell* 2011; 21(3): 520-33.
- 86 Mendoza C, Olguin P, Lafferte G, Thomas U, Ebtsch S, Gundelfinger ED, et al. Novel isoforms of Dlg are fundamental for neuronal development in *Drosophila*. *J Neurosci* 2003; 23(6): 2093-101.
- 87 San-Juan BP, Baonza A. The bHLH factor deadpan is a direct target of Notch signaling and regulates neuroblast self-renewal in *Drosophila*. *Dev Biol* 2011; 352(1): 70-82.
- 88 Zhu S, Wildonger J, Barshow S, Younger S, Huang Y, Lee T. The bHLH repressor Deadpan regulates the self-renewal and specification of *Drosophila* larval neural stem cells independently of Notch. *PLoS One* 2012; 7(10): e46724.
- 89 Ashraf SI, Ganguly A, Roote J, Ip YT. Worniu, a Snail family zinc-finger protein, is required for brain development in *Drosophila*. *Dev Dyn* 2004; 231(2): 379-86.
- 90 Lai SL, Miller MR, Robinson KJ, Doe CQ. The Snail family member Worniu is continuously required in neuroblasts to prevent Elav-induced premature differentiation. *Dev Cell* 2012; 23(4): 849-57.
- 91 Jarman AP, Brand M, Jan LY, Jan YN. The regulation and function of the helix-loop-helix gene, asense, in *Drosophila* neural precursors. *Development* 1993; 119(1): 19-29.
- 92 Lee CY, Andersen RO, Cabernard C, Manning L, Tran KD, Lanskey MJ, et al. *Drosophila* Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev* 2006; 20(24): 3464-74.
- 93 Wang H, Somers GW, Bashirullah A, Heberlein U, Yu F, Chia W. Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev* 2006; 20(24): 3453-63.
- 94 van de Weerd BC, Medema RH. Polo-like kinases: A team in control of the division. *Cell Cycle* 2006; 5(8): 853-64.
- 95 Wang H, Ouyang Y, Somers WG, Chia W, Lu B. Polo inhibits progenitor self-renewal and regulates Numb asymmetry by phosphorylating Pon. *Nature* 2007; 449(7158): 96-100.
- 96 Lu B, Rothenberg M, Jan LY, Jan YN. Partner of Numb colocalizes with Numb during mitosis and directs Numb asymmetric localization in *Drosophila* neural and muscle progenitors. *Cell* 1998; 95(2): 225-35.
- 97 Lu B, Ackerman L, Jan LY, Jan YN. Modes of protein movement that lead to the asymmetric localization of partner of Numb during *Drosophila* neuroblast division. *Mol Cell* 1999; 4(6): 883-91.
- 98 Tio M, Udolph G, Yang X, Chia W. cdc2 links the *Drosophila* cell cycle and asymmetric division machineries. *Nature* 2001; 409(6823): 1063-7.
- 99 Glover D, Leibowitz M, McLean D, Parry H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 1995; 81(1): 95.
- 100 Giet R, Petretti C, Prigent C. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol* 2005; 15(5): 241-50.
- 101 Reichert H. *Drosophila* neural stem cells: Cell cycle control of self-renewal, differentiation, and termination in brain development. *Results Probl Cell Differ* 2011; 53: 529-46.
- 102 Slack C, Overton PM, Tuxworth RI, Chia W. Asymmetric localisation of Miranda and its cargo proteins during neuroblast division requires the anaphase-promoting complex/cyclosome. *Development* 2007; 134(21): 3781-7.
- 103 Cabernard C, Doe CQ. Stem cell self-renewal: Centrosomes on the move. *Curr Biol* 2007; 17(12): R465-7.
- 104 Rebollo E, Sampaio P, Januschke J, Llamazares S, Varmark H, Gonzalez C. Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Dev Cell* 2007; 12(3): 467-74.
- 105 Rusan NM, Peifer M. A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J Cell Biol* 2007; 177(1): 13-20.
- 106 Yamashita YM, Mahowald AP, Perlin JR, Fuller MT. Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* 2007; 315(5811): 518-21.
- 107 Neumuller RA, Knoblich JA. Dividing cellular asymmetry:

- Asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev* 2009; 23(23): 2675-99.
- 108 Castellanos E, Dominguez P, Gonzalez C. Centrosome dysfunction in *Drosophila* neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability. *Curr Biol* 2008; 18(16): 1209-14.
- 109 Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23(43): 7274-82.
- 110 Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(4): 311-21.
- 111 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859): 105-11.
- 112 Gateff E. Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1978; 200(4349): 1448-59.
- 113 Gateff E. Tumor suppressor and overgrowth suppressor genes of *Drosophila melanogaster*: Developmental aspects. *Int J Dev Biol* 1994; 38(4): 565-90.
- 114 Caussinus E, Gonzalez C. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 2005; 37(10): 1125-9.
- 115 Wodarz A. Molecular control of cell polarity and asymmetric cell division in *Drosophila* neuroblasts. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(5): 475-81.
- 116 Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V, *et al.* Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol* 2004; 167(2): 215-21.
- 117 Petrova TV, Nykänen A, Norrmén C, Ivanov KI, Andersson LC, Haglund C, *et al.* Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype. *Cancer cell* 2008; 13(5): 407-19.
- 118 Boulay JL, Stiefel U, Taylor E, Dolder B, Merlo A, Hirth F. Loss of heterozygosity of TRIM3 in malignant gliomas. *BMC Cancer* 2009; 9: 71.
- 119 Ouyang Y, Song Y, Lu B. dp53 Restrains ectopic neural stem cell formation in the *Drosophila* brain in a non-apoptotic mechanism involving Archipelago and cyclin E. *PLoS One* 2011; 6(11): e28098.
- 120 Knoblich JA, Sauer K, Jones L, Richardson H, Saint R, Lehner CF. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 1994; 77(1): 107-20.
- 121 Ruiz S, Panopoulos AD, Herrerías A, Bissig K-D, Lutz M, Berggren WT, *et al.* A high proliferation rate is required for cell reprogramming and maintenance of human embryonic stem cell identity. *Curr Biol* 2011; 21(1): 45-52.
- 122 Furst A, Mahowald AP. Differentiation of primary embryonic neuroblasts in purified neural cell cultures from *Drosophila*. *Dev Biol* 1985; 109(1): 184-92.
- 123 Ceron J, Tejedor FJ, Moya F. A primary cell culture of *Drosophila* postembryonic larval neuroblasts to study cell cycle and asymmetric division. *Eur J Cell Biol* 2006; 85(6): 567-75.
- 124 Ohlstein B, Spradling A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 2005; 439(7075): 470-4.
- 125 Singh SR, Liu W, Hou SX. The adult *Drosophila* malpighian tubules are maintained by multipotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2007; 1(2): 191-203.